



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003 年 4 月创刊 第 21 卷 第 6 期 (总第 209 期) 2023 年 6 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

微生物感染治疗药物发现新策略研究专题

(1403) 新型抗真菌药物研发的现状 & 未来

..... 王曦悦, 刘润松, 仲华, 等

(1412) CRISPR 系统在白假丝酵母菌基因功能研究中的应用

..... 运照临, 王欣荣, 刘昕, 等

研究论文

(1417) 灵芝孢子粉通过 JAK1/STAT6 信号通路抑制 M2 型巨噬细胞极化
..... 王思维, 陈云娜, 陈卫东, 等

(1422) 复合诱导子不同处理时间对丹参毛状根生长和初次生代谢产物
积累的影响 李俊伶, 吴家慧, 李堰, 等

(1429) 桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的潜在作用机制与药效物质基础研究
..... 张嘉宁, 任越, 王梓安, 等

(1436) 共载姜黄素与胡椒碱纳米结构脂质载体的体外释放研究
..... 吴赵莉, 韩新宇, 田思宇, 等

(1441) 石菖蒲挥发油 - 丹参酮 II A 复合纳米乳的制备、抗肿瘤活性及药
动力学研究 方亮, 程红艳, 陈卫东, 等

(1447) 基于杀酶保苷的经典名方中“去皮尖研泥”桃仁的炮制工艺研究
..... 马艳红, 寇娜娜, 宋婉婷, 等

(1453) 黄芩苷微囊片的制备 刘润佳, 张赏玺, 郭荣, 等

(1459) 磷脂包覆技术制备布地奈德吸入气雾剂及体外性质评价
..... 胡慧, 陈晶晶, 王琴, 等

(1465) 去氧胆酸的合成工艺研究 刘会强, 宣博鑫, 苏睿, 等

(1472) 高良姜素通过抑制 JAK2-STAT3 磷酸化减轻小鼠内皮炎症改善
动脉粥样硬化 陈杨, 喻霞, 赵紫玄, 等

(1480) 麦冬须根发酵制备鲁斯可皂苷元的菌种筛选及工艺优化
..... 石璐, 谢鑫荣, 刘秀峰, 等

(1486) 金银花表面微生物的分离、鉴定及抑菌活性研究
..... 周娜, 任广喜, 姜丹, 等

(1491) 磷酸氯喹柔性脂质体的制备及其离体皮肤渗透特性研究
..... 彭汐涯, 种思茹, 李娇, 等

(1496) 雷公藤内酯酮对来那度胺原发耐药 RPMI-8226 细胞增殖及凋亡
的影响 王家敏, 汪玉洁, 唐欣欣, 等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编 (按姓氏笔画排列)

王 玉 向大雄 刘 韶 刘芳群
孙国祥 孙铁民 苏薇薇 张毕奎
范国荣 赵志刚 原永芳 潘卫三

编委 (按姓氏笔画排列)

丁劲松 于海洋 马恩龙 王 玉
王 珊 王立辉 王永军 王淑梅
王朝辉 文晓柯 方平飞 尹 桃
邓银华 左美玲 左笑丛 卢海儒
史志华 冯 星 边 原 吕永宁
朱运贵 向大雄 刘 韶 刘芳群
刘茂柏 刘建平 刘高峰 刘塔斯
刘雁鸣 汤海峰 孙 进 孙平华
孙国祥 孙铁民 劳海燕 苏薇薇
李 昕 李 勇 李文龙 李文莉
李顺祥 李晓宇 李健和 李湘平
杨志平 杨星钢 杨献文 肖 雪
肖贵南 何 丹 何江江 何鸽飞
余自成 谷福根 张 俐 张 峻
张毕奎 张洪文 陈 力 陈 琦
陈 碧 陈卫东 陈西敬 陈勇川
武新安 范国荣 金鹏飞 周 权
屈 建 孟宪生 赵立波 赵志刚
姜德建 姜月芬 宫 建 祝德秋
秦红岩 袁 成 袁 易 贾素洁
夏道宗 原永芳 徐 珽 徐 萍
徐必学 高利臣 郭 韧 郭怀忠
郭建军 唐 芳 曹 玲 常福厚
巢志茂 彭文兴 董亚琳 董得时
蒋孟良 傅 强 温金华 谢 诚
谢奕丹 睢大箕 肇丽梅 翟 青
黎 敏 颜 苗 潘卫三 魏高文

(1502) 注射用丹参多酚酸对缺氧所致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及
机制研究 陈璐, 聂永伟, 张燕欣, 等

(1509) 基于网络药理学和体外实验研究橙皮苷抗轮状病毒的作用机制
..... 周玉晶, 钱余培, 袁月, 等

(1516) 滑膜炎固体制剂的溶出度评价... 李花花, 黄嘉怡, 彭紫薇, 等

综述

(1521) 基于铁死亡机制的多模式联合治疗肿瘤的纳米递药系统的研究
进展 阙玉萍, 李士壮, 王雪莹, 等

(1529) 石蒜科生物碱成分的生物合成及其分类研究进展
..... 孙小情, 王贞妮

(1537) 常用抗病毒蛋白酶抑制剂药物相互作用研究进展
..... 张艳, 王丹, 成蕾, 等

(1544) 调控 T 细胞代谢在肿瘤免疫治疗中的研究进展
..... 褚欣宇, 尹莉芳, 秦超

(1550) 中药抑制脉络膜新生血管的研究进展
..... 陈美琪, 杨嘉玮, 王国平, 等

(1557) 维生素 B₁ 在中枢认知功能中的作用研究进展
..... 张佳怡, 郝琨, 刘李

(1565) 转运体基因多态性与霉酚酸类药物暴露和不良反应相关性的研究
进展 吕建琼, 宋沧桑, 毛盼盼, 等

(1572) 铁死亡的分子调控机制及其在急慢性肝病中的进展
..... 刘森, 沈佳妍, 李盼盼, 等

(1581) 靶向 KRAS^{G12D} 抑制剂的研究现状 陈晓睿, 毛国梁

(1589) 倍半萜内酯类天然产物抗肿瘤活性及机制研究进展
..... 林金榕, 陈四保

(1599) 氧化应激诱导高血压的分子遗传学机制研究进展
..... 张慧丹, 孟璐, 龙涛, 等

中药资源开发与利用

(1605) 2020 年版《中国药典》果实种子类中药功能及应用特点分析
..... 周欣欣, 刘茜茜, 孔小莉, 等

药物分析与检验

(1612) 金银花-连翘药对配方颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分
含量测定研究 方朝缙, 甘力帆, 黄醒鹏, 等

(1621) 非抑制型离子色谱法测碳酸镧和碳酸镧咀嚼片中镧的含量
..... 张蕊, 李耕, 于青, 等

(1625) “蒂达”类藏药川西獐牙菜的 HPLC 指纹图谱研究
..... 杨增亮, 刘学良, 苏媛, 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：郭志娟 彭金飞 李 科
陆窈窕

本刊声明：

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

除非特别声明，本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

- (1630) 都梁丸指纹图谱的建立及 4 种成分的含量测定研究
..... 王静，朱春璐，袁子民
- (1634) 基于 UPLC-MS 分析技术测定不同产区制何首乌饮片中 8 个化学成分的含量 刘野，武俊颖，贺奥城，等
- (1640) 盐酸替罗非班注射液中对映异构体分析方法的建立
..... 崔芹芹，刘阿利，王昭钦，等

医院药学

- (1643) 固定剂量与按体重调整剂量使用重组人血小板生成素临床疗效的探索性分析 刘丹娜，陈露，苏田丽，等
- (1647) 左乙拉西坦致横纹肌溶解的临床特征分析
..... 孙文静，何阳，龙远雄，等
- (1653) 重症耶氏肺孢子菌肺炎患者复方磺胺甲噁唑血药浓度监测的临床研究 潘欢妍，祁慧，梁培，等
- (1659) 粒细胞或粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子致肺毒性临床特征分析
..... 向必晓，左笑丛，谢悦良
- (1664) 基于数据挖掘探究芳香中药治疗抑郁症的用药规律
..... 王梓安，刘超群，张嘉宁，等
- (1670) 基于 openFDA 数据库挖掘与评价 Paxlovid 上市后的不良反应
..... 刘胜男，冀召帅，王雪，等
- (1674) 基于 CiteSpace 的 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的研究现状可视化分析 刘晓晨，农雅琴，张洪茂，等
- (1684) 华法林抗凝质量影响因素的 Meta 分析与预测模型
..... 史金平，张琰，唐亚娟，等

药品不良反应

- (1690) 1 例由奥希替尼引起肺腺癌老年患者血小板减少致停药的病例分析
..... 鲁文茹，谢聪，罗晓媛，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*290*zh*P*25.0*46*2023-6

本期责任编辑：陆窈窕，彭金飞，郭志娟，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 6 June 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

- (1404) Current situation and future development of novel antifungal drugs
..... WANG Xi-yue, LIU Run-song, ZHONG Hua, et al
- (1412) CRISPR system in the study of gene function of *Candida albicans*
..... YUN Zhao-lin, WANG Xin-rong, LIU Xin, et al
- (1417) Ganoderma lucidum spore powder inhibits M2-type macrophage polarization through JAK1/STAT6 signaling pathway
..... WANG Si-wei, CHEN Yun-na, CHEN Wei-dong, et al
- (1422) Effect of different treatment time of combined elicitors on the growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots and accumulation of the primary and secondary metabolites LI Jun-ling, WU Jia-hui, LI Yan, et al
- (1429) Potential mechanism and pharmacodynamic substance of Guilin Xiguashuang for the treatment of oral ulcer
..... ZHANG Jia-ning, REN Yue, WANG Zi-an, et al
- (1436) In vitro release of curcumin and piperine nanostructured lipid carriers
..... WU Zhao-li, HAN Xin-yu, TIAN Si-yu, et al
- (1441) Preparation, antitumor activity, and bioavailability of volatile oil of Acorus tatarinowii-Tanshinone II A composite nanoemulsion
..... FANG Liang, CHENG Hong-yan, CHEN Wei-dong, et al
- (1448) Process of peach kernel for "peeling and grinding mud" in classic prescriptions based on glycoside protection by inactivating the enzyme
..... MA Yan-hong, KOU Na-na, SONG Wan-ting, et al
- (1453) Preparation of baicalin microcapsule tablets
..... LIU Run-jia, ZHANG Shang-xi, GUO Rong, et al
- (1459) Preparation of budesonide inhalation aerosol by phospholipid coating and its in vitro property evaluation
..... HU Hui, CHEN Jing-jing, WANG Qin, et al
- (1465) Synthesis of deoxycholic acid
..... LIU Hui-qiang, XUAN Bo-xin, SU Rui, et al
- (1472) Galangin alleviates the endothelial inflammation and attenuates atherosclerosis via inhibiting JAK2-STAT3 phosphorylation in mice
..... CHEN Yang, YU Xia, ZHOU Zi-xuan, et al
- (1480) Optimization of bacteria strain and fermentation for fibrous roots of *Ophiopogon japonicus* to prepare ruscogenin
..... SHI Lu, XIE Xin-rong, LIU Xiu-feng, et al
- (1486) Isolation, identification and antibacterial activity of surface microorganisms of *Lonicera Japonica* Flos
..... ZHOU Na, REN Guang-xi, JIANG Dan, et al

Postal code

42-290

PublishEditorial Office of Central South
Pharmacy**Subscribe**Post office nationwide for
subscription please contact the
Publishing House of our journal**Price**

¥ 25.00 an issue

¥ 300.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2023 by the
Central South Pharmacy**

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

- (1491) Preparation of chloroquine phosphate flexible liposomes and their ex vivo skin permeation properties
..... PENG Xi-ya, CHONG Si-ru, LI Jiao, et al
- (1496) Effect of triptonide on the proliferation and apoptosis of primary lenalidomide-resistant RPMI-8226 cells
..... WANG Jia-min, WANG Yu-jie, TANG Xin-xin, et al
- (1502) Protective effect of salvianolic acid for injection on hypoxia-induced injury of SH-SY5Y cells and related mechanism
..... CHEN Lu, NIE Yong-wei, ZHANG Yan-xin, et al
- (1509) Anti-rotavirus mechanism of hesperidin based on network pharmacology and in vitro experiments
..... ZHOU Yu-jing, QIAN Yu-pei, YUAN Yue, et al
- (1516) Evaluation of dissolution of synovitis solid formulations
..... LI Hua-hua, HUANG Jia-yi, PENG Zi-wei, et al
- (1521) Research progress in nano drug delivery system for multimodal therapy for tumor based on ferroptosis mechanism
..... KAN Yu-ping, LI Shi-zhuang, WANG Xue-ying, et al
- (1529) Research progress in classification and biosynthesis of alkaloids from amarillidaceae SUN Xiao-qing, WANG Zhen-ni
- (1537) Research progress in drug interactions of commonly used antiviral protease inhibitors ZHANG Yan, WANG Dan, CHENG Lei, et al
- (1544) Progress in regulating T cell metabolism in tumor immunotherapy
..... CHU Xin-yu, YIN Li-fang, QIN Chao
- (1550) Research advances of traditional Chinese medicine for choroidal neo-vascularization
..... CHEN Mei-qi, YANG Jia-wei, WANG Guo-ping, et al
- (1557) Research progress in the role of vitamin B₁ in central cognitive function
..... ZHANG Jia-yi, HAO Kun, LIU Li
- (1565) Association between transporter gene polymorphism and mycophenolic acids exposure and related adverse reactions
..... LYU Jian-qiong, SONG Cang-sang, MAO Pan-pan, et al
- (1572) Molecular mechanism of ferroptosis and its advances in acute and chronic liver diseases LIU Miao, SHEN Jia-yan, LI Pan-pan, et al
- (1581) Research status of targeted KRAS^{G12D} inhibitors
..... CHEN Xiao-rui, MAO Guo-liang
- (1589) Advance in antitumor activity and mechanism of natural sesquiterpene lactones LIN Jin-rong, CHEN Si-bao
- (1599) Research progress in molecular genetic mechanism of oxidative stress-induced hypertension ZHANG Hui-dan, MENG Lu, LONG Tao, et al
- (1605) Function and application of fruit and seed traditional Chinese medicine in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia
..... ZHOU Xin-xin, LIU Xi-xi, KONG Xiao-li, et al
- (1612) Content determination of multi-component and establishment of fingerprint of flos Ionicerae-fructus forsythiae formula granules
..... FANG Chao-zuan, GAN Li-fan, HUANG Xing-peng, et al
- (1621) Determination of lanthanum in lanthanum carbonate and lanthanum carbonate chewable tablets by non-suppressive conductance detection ion chromatography ZHANG Rui, LI Geng, YU Qing, et al

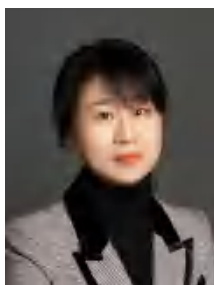
- (1625) Fingerprints of commonly used “Dida” Tibetan medicine *Swertia mussotii* Franch by HPLC
..... YANG Zeng-liang, LIU Xue-liang, SU Yuan, et al
- (1630) Fingerprint and determination of 4 components of Duliang pills
..... WANG Jing, ZHU Chun-lu, YUAN Zi-min
- (1635) Determination of 8 chemical components in *Polygonum multiflorum* Thunb. from different production areas based on UPLC-MS
..... LIU Ye, WU Jun-ying, HE Ao-cheng, et al
- (1640) Determination of enantiomer in tirofiban hydrochloride injection
..... CUI Qin-qin, LIU A-li, WANG Zhao-qin, et al
- (1643) Efficacy of fixed dose and body weight adjusted dose of recombinant human thrombopoietin LIU Dan-na, CHEN Lu, SU Tian-li, et al
- (1648) Clinical features of rhabdomyolysis induced by levetiracetam
..... SUN Wen-jing, HE Yang, LONG Yuan-xiong, et al
- (1653) Concentration monitoring of compound sulfamethoxazole in patients with severe pneumocystis jassinii pneumonia
..... PAN Huan-yan, QI Hui, LIANG Pei, et al
- (1659) Clinical features of pulmonary toxicity induced by granulocytes or granulocyte-macrophage colony-stimulating factors
..... XIANG Bi-xiao, ZUO Xiao-cong, XIE Yue-liang
- (1664) Medication rules of aromatic Chinese medicine for depression based on data mining
..... WANG Zi-an, LIU Chao-qun, ZHANG Jia-ning, et al
- (1670) Data mining and evaluation of adverse reactions of Paxlovid after marketing based on openFDA database
..... LIU Sheng-nan, JI Zhao-shuai, WANG Xue, et al
- (1674) Visual analysis of research status of Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors based on CiteSpace
..... LIU Xiao-chen, NONG Ya-qin, ZHANG Hong-mao, et al
- (1684) Factors affecting the anticoagulation quality of warfarin: a meta-analysis and prediction model
..... SHI Jin-ping, ZHANG Yan, TANG Ya-juan, et al

微生物感染治疗药物发现新策略研究专题

【编者按】

微生物是主要包括细菌、病毒、真菌以及一些小型的原生生物、显微藻类等在内的一大类生物群体，与人类健康密切相关。真菌感染是一种常见病，随着过去三年全球新型冠状病毒感染疫情的蔓延，侵袭性真菌感染（深部真菌感染）作为致死率极高的并发症也极大地引起了人们的关注，然而临床上治疗侵袭性真菌感染的药物十分有限。近年来，有研究表明肠道微生物群失衡和结直肠癌的发病相关，而目前该领域的研究尚处于起步阶段。本课题组多年来从事抗感染药物发现研究，本专栏主要对真菌和肠道致病菌的药物发现新策略进行综述和相关成果报道，旨在为抗感染新药研发提供新的科研思路。

【特邀专家简介】



刘娜，女，海军军医大学（原第二军医大学）药学院副教授，硕士研究生导师。主要研究方向为抗感染药物研究，抗真菌新靶点、新机制和新分子骨架发现。主持国家自然科学基金等项目，授权发明专利 17 项，以第一作者或通信作者在 *Adv Drug Delivery Rev*、*APSB*、*J Med Chem* 等权威期刊发表 SCI 论文 27 篇（其中封面论文 4 篇），主编/参编中英文专著 7 部。获上海市科技进步二等奖、全国高等学校药学类专业青年教师微课教学大赛二等奖。入选海军军医大学 A 级优秀教员和“远航”人才计划。

新型抗真菌药物研发的现状与未来

王曦悦¹，刘润松¹，仲华^{2, 3*}，王彦^{2, 3*}（1. 海军军医大学基础医学院，上海 200433；2. 海军军医大学药学院，上海 200433；3. 海军军医大学军事药学国家级实验教学示范中心，上海 200433）

摘要：真菌感染常发生于免疫功能低下人群，近 20 年来免疫功能低下人群逐年增多，使得真菌感染的发病率和死亡率显著升高。目前临床可用的抗真菌药物品种非常有限，已无法满足临床需求，抗真菌新药研发迫在眉睫。近些年，新结构、新靶点、新组合、新剂型的抗真菌药物开发取得了一定的进展。新型活性小分子化合物及多肽类药物包括影响真菌细胞壁的 fosmanogepix、雷扎芬净、ibrexafungerp、尼可霉素 z 等，影响真菌细胞膜的 oteseconazole (VT-1161)，影响线粒体功能的 T-2307、冬青生菌素 H，鞘脂合成抑制剂 BIBM 和 D13，以及其他机制的小分子和肽类药物（turbinmicin、AR-12、VL-2397、olorofim 等）。联合用药的组合包括氟康唑联合小檗碱、卡泊芬净联合利巴韦林、金诺芬联合喷他咪、两性霉素 B 联合 ent-hardwickiic 酸等。抗真菌药物的新剂型包括氟康唑与纳米囊泡载体、新型卢立康唑弹性纳米载体、嵌合型口服两性霉素 B 等。可用于开发新型抗真菌药物的靶点或通路包括热休克蛋白 90、鞘脂途径和微生物群体感应分子等。总之，抗真菌药物研发策略百花齐放，新药研发的进程才能更快，临床的抗真菌治疗才会有更多选择。

关键词：抗真菌；小分子药物；多肽类药物；联合用药；靶点

中图分类号：R978.5

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2023)06-1403-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.001

基金项目：国家自然科学基金项目 (No. 82204470)；生物安全研究专项 (No.20SWAQR29-1-6)。

作者简介：王曦悦，女，主要从事药理学方向的研究，email: wxy3452311@126.com *通信作者：王彦，女，教授，博士研究生导师，主要从事抗感染药理学研究，email: wangyansmmu@126.com；仲华，女，讲师，主要从事抗感染药理学研究，email: zhonghuasmmu@hotmail.com

Current situation and future development of novel antifungal drugs

WANG Xi-yue¹, LIU Run-song¹, ZHONG Hua^{2,3*}, WANG Yan^{2,3*} (1. School of Basic Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433; 3. National Demonstration Center for Experimental Military Pharmacy Education, Naval Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: Fungal infections often occur in immunocompromised people. The number of immunocompromised people has increased in the past two decades, which increases the morbidity and mortality of fungal infection obviously. Currently, the clinically available antifungal drugs are limited, failing to meet the clinical needs. Therefore, the research and development of antifungal drugs is urgent. Recent years has witnessed progress in the development of antifungal drugs with new structures, targets, combinations and dosage forms. Novel active small molecules and peptides include fosmanogepix, razafungin, ibrexafungerp, and nikkomycin Z, which affect the fungal cell wall; oteseconazole (VT-1161), which affect the fungal cell membrane, T-2307 and ilicicolin H, have the ability to affect the mitochondrial function, BIBM and D13, as sphingolipid synthesis inhibitors, and others with different mechanisms (turbinmicin, AR-12, VL-2397, olorofim, etc.). Fluconazole combined with berberine, caspofungin combined with ribavirin, auranofin combined with pentamidine, and amphotericin B combined with ent-hardwickiic acid are all novel combinations with synergistic antifungal effect. New antifungal formulations include fluconazole with nanovesicle carriers, novel luliconazole elastic nanocarriers, chimeric oral amphotericin B, etc. Potential targets or pathways for developing novel antifungal agents include heat shock protein 90, sphingolipid pathways, and microbial quorum sensing molecules. In conclusion, the supporting development strategies of antifungal drugs accelerate the process of new drug research, expanding the antifungal treatment options.

Key words: antifungal; small molecule drug; polypeptide drug; drug combination; target

目前,全世界约有 17 亿真菌感染患者,每年导致约 170 万人死亡^[1-2]。在 500 万种已知的真菌中,约 300 种是人类的病原真菌^[3-4],常见的致病真菌包括白假丝酵母菌、新型隐球菌、烟曲霉菌等。自 2009 年以来,耳念珠菌在全球快速传播,以其高度的耐药性和传播速度引起了广泛关注。目前临床常用的抗真菌药物有 5 类,分别是多烯类、烯丙胺类、唑类、棘白菌素类和嘧啶类。这些药物在过去几十年间发挥了较好的抗真菌疗效,但是也不可避免地出现了一些问题。以唑类药物和棘白菌素类药物为例,伴随着药物的长疗程使用和环境暴露,真菌对唑类药物的耐药性问题愈发突显^[5]。现有抗真菌药物已经不能满足临床需求,研发新型抗真菌药物意义重大。

新靶点新结构原创药的发现、联合用药、药物新剂型的开发是目前可行的 3 种抗真菌新药研发策略。在原创药方面,新型小分子化合物和多肽类药物是广受关注的新型抗真菌药物的研发方向,如 fosmanogepix (又名 APX001)、尼可霉素 Z (nikkomycin Z) 以及冬青生菌素 H (ilicicolin H) 等,具有较好的抗真菌活性和开发前景;在联合用

药方面,抗真菌药物之间联合、抗真菌药物与非抗真菌药物联合等都是抗真菌药物研发的可行思路;在药物新剂型方面,纳米技术在氟康唑等经典药物的剂型开发中得到应用。除此之外,还有许多蛋白和通路有潜力成为抗真菌药物的新靶点和新策略。本文将从以上几个方面,对近年来的新型抗真菌药物研发情况进行综述。

1 新型活性小分子化合物及多肽类药物

1.1 影响细胞壁的药物

1.1.1 糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定蛋白抑制剂 Fosmanogepix (见图 1) 是 Amplyx 公司开发的一种小分子抗真菌药物,美国 FDA 于 2019 年 9 月允许其通过快速通道审批上市,用于治疗 7 种侵袭性真菌感染,包括曲霉病、念珠菌病、赛多孢子菌病、镰刀菌病、毛霉菌病、隐球菌病和球孢子菌病。它是 APX001A 的 *N*-磷酸氧甲基前药,靶向 Gwt1 酶。Gwt1 催化 GPI 锚定生物合成途径的一步早期反应^[6],抑制 Gwt1 可以阻止甘露糖蛋白的定位,进而影响真菌细胞壁以及真菌的生长^[6-7]。Fosmanogepix 的抗真菌谱包括念珠菌属 (*Candida spp.*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus*

neoformans)、丝状真菌(如烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus*)、茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、多育赛多孢菌(*Scedosporium prolifica*)和波氏假阿利什霉(*Pseudallescheria boydii*)等。对耐氟康唑的耳念珠菌,其最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)是阿尼芬净的1/8(MIC₉₀为0.008~0.015 μg·mL⁻¹),对曲霉属(*Aspergillus spp.*)、镰刀菌属(*Fusarium spp.*)、鞭毛孢子菌属(*Scedosporium spp.*)最低有效浓度(minimal effective concentration, MEC₉₀)均低于0.25 μg·mL⁻¹,对毛霉属和大部分根霉属的MEC₉₀范围分别为1~8 μg·mL⁻¹和4~8 μg·mL⁻¹,仅对部分根霉属的MEC₉₀高于8 μg·mL⁻¹[8]。Fosmanogepix在体内也表现出良好的抗真菌活性。在播散性耳念珠菌(*Candida auris*)感染模型中,Fosmanogepix能显著提高耳念珠菌感染小鼠的生存率,延长小鼠的存活时间(78 mg·kg⁻¹,每日3次,100%存活),并显著降低小鼠肾脏、肺和脑的菌量。Fosmanogepix除了抗真菌药效明确,安全性也较好。然而,该药的缺点是半衰期短,因此需要频繁用药。为解决半衰期短的问题,研究者对Fosmanogepix进行结构优化,进一步获得了APX2104等药物[9]。

1.1.2 β-1, 3-葡聚糖合成酶抑制剂 研究较多的β-1, 3-葡聚糖合成酶抑制剂是棘白菌素衍生物,此类药物可以破坏真菌细胞壁的完整度。目前棘白菌素类药物在临床使用已近20年,然而,传统棘白菌素类药物溶解度差[10],半衰期短。新型棘白菌素类药物雷扎芬净(rezafungin,见图1)的溶解性和半衰期问题得到了显著改善[11]。从抗菌谱来看,雷扎芬净对念珠菌和曲霉菌表现出明显的抑制作用,对多数念珠菌属的MIC≤0.008~2 μg·mL⁻¹,对曲霉属的MEC≤0.015~2 μg·mL⁻¹,对近平滑念珠菌MIC值较高(0.5~2 μg·mL⁻¹),但对隐球菌无效[8]。雷扎芬净的体内抗真菌活性较好,在白假丝酵母菌和烟曲霉感染的免疫功能低下的小鼠模型中,雷扎芬净能显著减少组织的真菌菌量并提高小鼠生存率[8]。

Ibrexafungerp(见图1),又名SCY-078、MK-3118,是一种新型三萜类β-1, 3-葡聚糖合成酶抑制剂。该药已进入Ⅲ期临床,在Ⅱ期临床试验中表现出较好的安全性和治疗效果[12-13]。该药能通过胃肠道吸收,可口服,给药方式与棘白菌素类药物相比有了很大改进[14]。Ibrexafungerp有望开发出一种新的抗真菌口服制剂[15]。Ibrexafungerp对各种念珠菌属均有杀菌活性,包括对棘白菌素耐药的FKS1和FKS2突变株以及氟康唑耐药株。该药物对耳念珠菌也有抗真菌活性,同时能够抑制生物被膜的形成。

1.1.3 几丁质合成抑制剂 尼可霉素家族是一类从链霉菌(*Streptomyces tendineus*)中分离出的嘧啶核苷,能够竞争性抑制几丁质合成酶催化UDP-N-乙酰葡萄糖胺,从而分离真菌细胞并造成渗透应激,抑制真菌细胞壁的重要成分几丁质的合成。尼可霉素Z(nikkomycin Z,见图1)在体内外均有较强的抗粗球孢子菌和皮炎芽生菌活性,对白假丝酵母菌有一定活性,对耳念珠菌的MIC₉₀为32 μg·mL⁻¹。但对新型隐球菌、曲霉属和镰刀菌属无效[16]。研究表明0.5 μg·mL⁻¹的尼可霉素Z对几丁质的合成有显著抑制作用[17]。在几项动物安全性研究中未发现其有明显的毒性,Ⅰ期临床研究也证实了尼可霉素Z的安全性。

1.2 作用于细胞膜的药物

Oteseconazole(VT-1161,见图1)是一种可口服的抗真菌药物,可以有效结合并抑制白假丝酵母菌的CYP51(K_d<39 nmol·L⁻¹),但对人CYP51无明显作用。VT-1161可以用来治疗急性外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC),由于其对真菌CYP51的高度选择性,能避免脱靶毒性,如通常与唑类药物相关的妊娠和流产问题。VT-1161对白假丝酵母菌的MIC值为0.001~1.0 μg·mL⁻¹[18]。与现有治疗VVC的药物氟康唑相比,VT-1161的MIC值更低,并且具有更好的耐药性[18]。

1.3 线粒体功能抑制剂

1.3.1 T-2307 芳基脒 T-2307(见图1)的抗真菌谱包括念珠菌属、曲霉属和隐球菌属,对氟康唑耐药菌株同样有效[19]。体内活性近似或优于其他常用抗真菌药物[20-21]。该化合物通过多胺转运体被白假丝酵母菌细胞内化,而在哺乳动物细胞中不会发生内化,因此该化合物对真菌有特异性[19]。一旦内化到真菌细胞中,T-2307主要抑制呼吸链的线粒体复合物Ⅲ和Ⅳ,破坏线粒体膜电位[19]。该化合物在人体Ⅰ期临床研究中耐受性良好,正准备开展Ⅱ期临床试验。

1.3.2 冬青生菌素 H 冬青生菌素 H(ilicicolin H,见图1)是一种聚酮化合物,分离自粉红粘帚霉(*Gliocadium roseum*),对隐球菌、念珠菌和曲霉属具有活性,MIC分别为0.1~1.56、0.01~5.0、0.08 μg·mL⁻¹[22]。该化合物的作用机制与抑制线粒体细胞色素bc1还原酶有关[半数抑制浓度(IC₅₀)为2~3 μg·mL⁻¹][23]。在动物模型中,冬青生菌素H可显著抑制新型隐球菌[24],而对大鼠线粒体的影响很小[24]。这些结果表明冬青生菌素H具有成为选择性抗真菌药物的潜力。

1.4 鞘脂合成抑制剂

BHBM(见图1)是从化合物库中筛选出来的真

菌鞘脂合成抑制剂^[25]。进一步研究 BHBH 衍生物发现了更有效的化合物 D13 (见图 1)。D13 在体外和体内都表现出较好的抗真菌活性,在隐球菌病、念珠菌病和肺曲霉病的体内模型中表现优于 BHBH^[26]。

1.5 其他途径

1.5.1 海洋抗真菌药物 Turbinmicin (见图 1) 是海刺微生物组成分,具有高度功能化的多环核和亲脂性侧链^[27]。有研究表明, Turbinmicin 具有良好的安全性和选择性,其主要抗真菌靶点是 Sec14p,能削弱囊泡介导的转运功能^[27]。Turbinmicin 对常见病原真菌,如白假丝酵母菌、耳念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、烟曲霉菌、镰刀菌属和根霉属以及多药耐药真菌,都表现出较好的抑制作用,对多药耐药耳念珠菌 B11211, Turbinmicin 的 MIC 值为 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,远低于唑类药物和两性霉素 B (氟康唑的 MIC $> 256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,两性霉素 B 的 MIC 为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[27],具有较高的开发潜力。

1.5.2 AR-12 塞来昔布 (celecoxib) 衍生物 AR-12 (见图 1) 被开发为蛋白激酶抑制剂 (protein kinase inhibitors, PKI),最初作为抗肿瘤药物进行了 I 期临床试验 (注册号 NCT00978523)。后续研究表明, AR-12 可以抑制真菌中的乙酰辅酶 A 合成酶,从而抑制多种真菌的生长,包括白假丝酵母菌、新型隐球菌和丝状真菌 (如烟曲霉菌)^[28]。AR-12 与氟康唑等药物合用可以克服真菌对唑类药物耐药的问题^[29]。

1.5.3 VL-2397 VL-2397 (见图 1) 是从桃色顶孢霉 (*Acremonium persicinum*) 中分离的一种环状六肽^[29],是铁载体的结构类似物。其分子中含有铝元素,代替铁元素通过铁载体转运体 1 (siderophore iron transporter 1, Sit1),以主动转运的方式进入真菌细胞,可以抑制曲霉菌、茄病镰刀菌、念珠菌和新型隐球菌^[30-31]。铁是烟曲霉等病原真菌生长和存活的关键因素,铁载体转运体能够将结合了铁元素的铁载体从环境中转运到真菌细胞内加以利用。哺乳动物细胞不具备 Sit1, VL-2397 不会通过这种机制进入人体细胞,因此 VL-2397 可能具有良好的安全性^[32]。但该化合物的活性易受铁元素的影响^[33], VL-2397 结构中的铝易被铁元素取代,生成化合物 AS2488053 而导致抗真菌活性降低^[30]。VL-2397 在健康志愿者体内耐受性良好,成功通过了 I 期临床试验^[33]。但因为经济原因, VL-2397 II 期临床研究被迫停止。尽管如此, VL-2397 仍然有望开发成一类具有独特作用机制的新型抗真菌药物。

1.5.4 Olorofim (F-901318) Olorofim (见图 1) 是新型抗真菌药物 orotomides 中的一种新型的核酸代谢类抗真菌药物,它能选择性靶向嘧啶生物合成

途径中的二氢乳清酸脱氢酶。Olorofim 对念珠菌属没有活性,但在体外对曲霉菌属和其他对唑类耐药的罕见病原真菌具有明显抑制作用。研究表明,olorofim 可以抑制赛多孢菌 (MIC_{50}/MIC_{90} 为 $0.06/0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和多产链球菌 (*L. prolificans*) (MIC_{50}/MIC_{90} 为 $0.12/0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的生长^[8],并且可以抑制多产链球菌生物膜的形成^[18]。

2 联合用药

2.1 小檗碱 (berberine) 联合氟康唑 (fluconazole)

小檗碱是黄连、黄柏的主要成分,具有抗糖尿病、抗动脉粥样硬化、抗菌消炎等作用^[34]。小檗碱单用也可以抑制念珠菌属,但活性比较差^[29], MIC 在 $10 \sim 160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。小檗碱与氟康唑合用则对氟康唑耐药菌株表现出很好的抗真菌活性^[34]。其机制可能是氟康唑能够通过抑制细胞膜上麦角甾醇的合成,使细胞膜通透性增加,从而帮助小檗碱穿过细胞膜,增加小檗碱在真菌细胞内的浓度,而小檗碱则起到主要的杀菌作用^[35]。

2.2 卡泊芬净 (caspofungin, CAS) 联合利巴韦林 (ribavirin, RBV)

CAS 是新一代抗真菌药物,但是对 CAS 耐药的菌株也已经在临床上出现。CAS 联合 RBV 能有效抑制白假丝酵母菌,据体外研究结果显示,与 RBV 联合使用时, CAS 的 MIC 从 $0.5 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下降到 $0.0625 \sim 0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,协同指数 (FICI) ≤ 0.5 ; CAS 的 sMIC (sessile MIC) 从 $0.5 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降到 $0.0625 \sim 0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RBV 的 sMIC 从 $4 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下降到 $1 \sim 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, FICI < 0.5 。与 RBV 单药治疗和 CAS 单药治疗相比, RBV + CAS 联合治疗组的菌丝数量和菌丝长度显著减少^[36]。

2.3 非抗真菌药物金诺芬 (auranofin) 联合喷他脒 (pentamidine)

喷他脒是一种抗原虫类药物,通常用于治疗锥虫病和利什曼病,但其抗真菌活性不足,一直未用于临床抗真菌治疗。近年来,研究人员发现它可以破坏微生物的细胞膜,导致细胞膜对抗菌药物的通透性增加;而抗风湿药物金诺芬抗真菌活性不足的部分原因就是真菌细胞膜屏障阻碍了药物的吸收。金诺芬对念珠菌的 MIC 值为 $125.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,但与喷他脒合用后, MIC 降到 $31.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[37]。这种两药协同的研发策略可以为新型抗真菌药物研发提供新的途径。

2.4 两性霉素 B (amphotericin B) 联合 ent-hardwickiic 酸

两性霉素 B 和 ent-hardwickiic 酸两种化合物联合使用能显著降低两者对白假丝酵母菌的 MIC 值,两性霉素 B 的 MIC 从 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降到 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

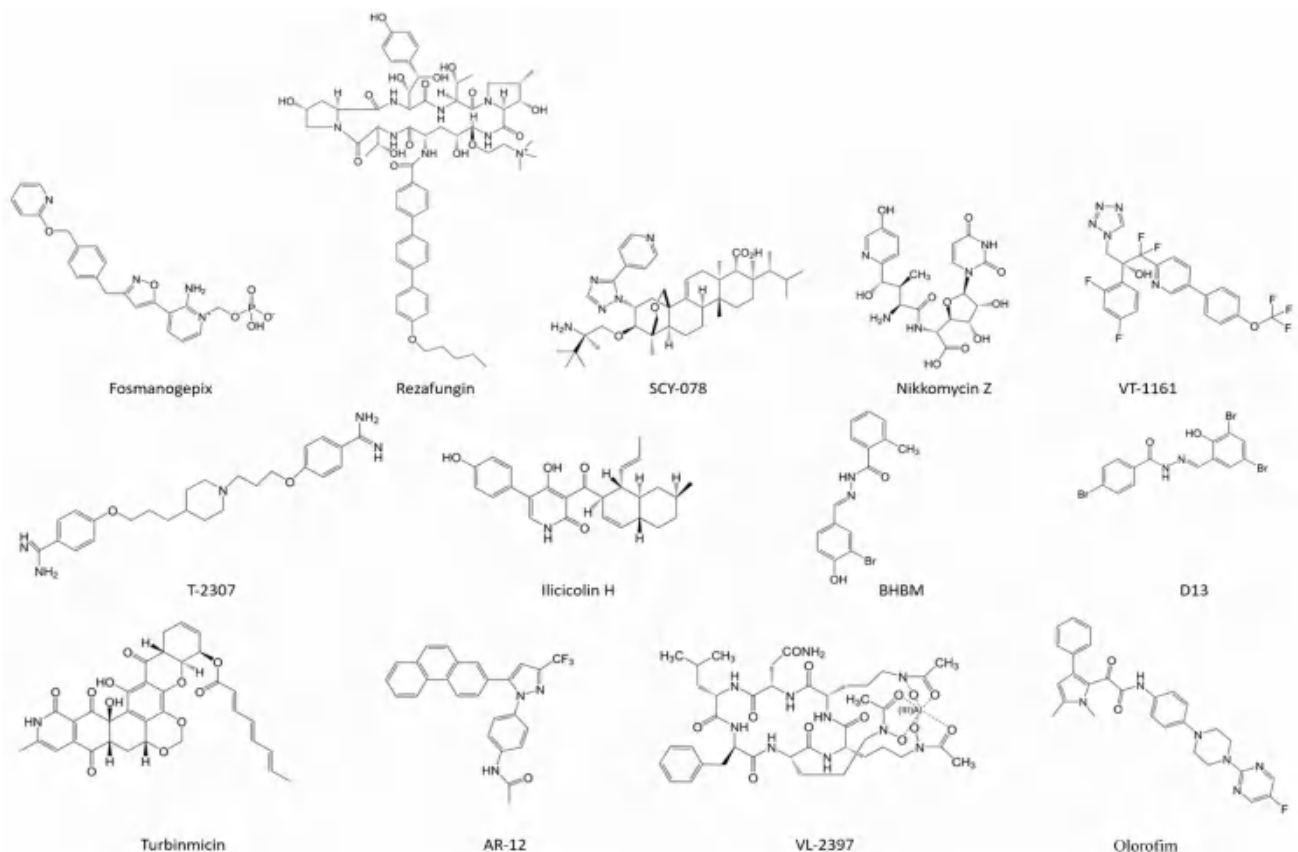


图 1 新型抗真菌药物的结构式

Fig 1 Chemical structure of novel antifungal drugs

ent-hardwickiic 酸的 MIC 从 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降到 $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 两性霉素 B 与 $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ent-hardwickiic 酸的联合用药能在 4 h 内杀死白假丝酵母菌细胞，可以有效治疗白假丝酵母菌的感染^[38]。

3 抗真菌药物的新剂型

3.1 氟康唑 (fluconazole, FLC) 与纳米囊泡载体 (novasomes)

纳米囊泡载体 (novasomes) 技术是 IGI 实验室开发的一种包封工艺，用于解决现有给药系统的有效性和效率相关问题。研究发现，FLC 与纳米囊泡结合的制剂 FN7 具有很好的释放作用，8 h 内氟康唑的释放率可达 96%。在针对白假丝酵母菌进行体外抗真菌试验中，FN7 的 MIC 为 $1.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。值得注意的是，未装载药物的载体也显示出对真菌感染的治疗潜力，FLC 在 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下能够抑制 31% 的真菌生长。纳米囊泡载体中含有油酸，而油酸中含有固定弯曲的 $\text{C} = \text{C}$ 键，允许其在进入真菌膜时占据更宽的横截面，因此有助于其在真菌细胞膜中的渗透和移动，这使得纳米囊泡具有更高的抗真菌作用。另一方面，在膜中加入不饱和脂质会导致细胞发生氧化应激，这可能是游离脂肪酸具有抗真

菌作用的原因^[39]。

3.2 新型卢立康唑 (luliconazole) 弹性纳米载体

卢立康唑对丝状真菌和皮肤癣菌具有显著抑制作用，被美国 FDA 批准用于局部用药抗感染。然而，用卢立康唑治疗存在皮肤渗透缓慢的问题，需要长时间重复给药才能完全治愈浅表真菌病。卢立康唑的弹性囊泡制剂可克服皮肤渗透性差的缺点，提高其抗真菌疗效。研究表明，局部给药可以穿透皮肤的角质层屏障。Kapileshwari 等^[40]制备了负载纳米海绵的水凝胶以增强卢立康唑的渗透和保留时间，Baghel 等^[41]研究了负载纳米结构脂质载体的水凝胶以改善抗真菌功效，Dave 等^[42]制备了能增强局部递送能力的卢立康唑醇质体凝胶。纳米囊泡作为药物递送系统用于局部治疗，能够帮助药物靶向治疗感染部位，具有更好的皮肤渗透和沉积作用，并通过消除药物的全身吸收来减少不良反应，有利于浅表感染的治疗^[43]。

3.3 嵌合型口服两性霉素 B

两性霉素 B 是一种经典的多烯类抗真菌药物，通过与麦角固醇结合形成小孔，使细胞内容物渗漏，从而破坏真菌细胞壁的合成，对酵母菌和霉菌具有广泛抑制作用。但两性霉素 B 口服不易吸收，静脉给药时容易引起急性输液反应和肾毒性。

新开发的嵌合型两性霉素 B (CAmB, MAT2203), 能够实现两性霉素 B 的口服给药。在动物模型中, 单剂量的 CAmB 显示出广泛的组织分布性和对靶组织的渗透作用。在健康成人中进行剂量 200、400 和 800 mg CAmB 的 I 期临床研究中, 200 mg 和 400 mg 的剂量下 CAmB 具有良好的耐受性。最常见的不良反应是胃肠道反应, 在 200、400 和 800 mg 剂量组中分别有 6%、38% 和 56% 的患者产生胃肠道反应。目前, 未观察到 CAmB 具有严重不良事件或肾毒性^[18]。

4 可用于开发新型抗真菌药物的靶点或通路

4.1 热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90)

Hsp90 是真核生物中一种重要的分子伴侣, 调节着蛋白的正确折叠、运输、成熟和降解, 靶向真菌的 Hsp90 能有效地抑制真菌。但由于哺乳动物细胞中也存在 Hsp90, 选择性较差的 Hsp90 抑制剂对哺乳动物细胞毒性也较大。为了解决这一问题, 一方面可以通过结构改造, 设计筛选对真菌 Hsp90 选择性高的化合物; 另一方面也可以通过联合用药的方式降低 Hsp90 抑制剂的用量, 从而降低宿主毒性。研究表明 Hsp90 抑制剂可提高氟康唑的疗效, 预防致死性白假丝酵母菌感染。以化合物 B25 为例, 它作为一类新的真菌 Hsp90 抑制剂, 与氟康唑合用有良好的协同作用, 能有效降低潜在的哺乳动物毒性, 在体外也表现出显著的代谢稳定性^[44]。开发具有抗真菌活性并且对哺乳动物细胞毒性低的新型 Hsp90 抑制剂^[45], 或许有望发掘出新型抗真菌药物。

4.2 鞘脂途径

鞘脂 [如葡萄糖神经酰胺 (GlcCer)、肌醇磷酸神经酰胺 (IPC) 和甘露糖肌醇磷酸神经酰胺 (MIPC)] 是真菌脂筏的主要成分之一^[46]。这类分子在真菌生长、分化和毒力中起着至关重要的作用^[47]。神经酰胺合酶 (CerS) 是真菌致病的重要调节因子, CerS 编码基因的缺失可以使真菌细胞无毒力^[48]。CerS 抑制剂能耗尽复杂鞘脂池并导致毒性中间体蓄积。因此, 靶向真菌而非哺乳动物 CerS 的化合物有望成为一类新的抗真菌药物。

4.3 微生物群体感应分子

相比真菌而言, 细菌的群体感应机制研究是比较透彻的, 已经发现了大量的群体感应抑制分子。研究者能通过抑制信号分子合成、阻断信号传输和促进信号分子降解三种途径抑制微生物的生长, 降低病原菌毒力, 并抑制生物被膜的形成等。同时这类分子对病原菌不易形成选择压力, 可以有效降低耐药性的产生^[49]。就真菌而言, Tian 等^[50]发现, 群体感应肽 Qsp1 对新型隐球菌的有性

生殖有重要的调控作用。Qsp1 参与真菌细胞的分化和减数分裂过程, 部分通过控制信息素来激活异性生殖的交配过程。不仅如此, Qsp1 在同性生殖的启动和调控中也发挥重要作用。位于 Qsp1 信号级联反应下游的非典型锌指调节因子 Cqs2 也参与了 Qsp1 对异性生殖和同性生殖的调控, Cqs2 缺失会消除由 Qsp1 刺激产生的交配反应。因此, 开发作用于真菌群体感应分子的药物, 或许能够有效阻断真菌的生殖过程, 从而发挥抗真菌作用。

5 总结与展望

近年来, 真菌感染的发病率和死亡率居高不下, 新型抗真菌药物的研发迫在眉睫。抗真菌活性化合物的结构多样, 作用机制涵盖了抑制真菌细胞壁、细胞膜、线粒体、鞘脂合成途径以及其他一些关键蛋白等 (见表 1)。然而, 这些化合物真正能进入临床研究阶段并成功上市的极少。目前批准或正在开发的大多数药物仍然是唑类和棘白菌素类的衍生物 (如雷扎芬净、VT-1161), 其作用机制与目前临床上已经投入使用多年的药物相同, 因此可能存在交叉耐药的问题。造成新型抗真菌药发现现状尴尬的原因是多方面的: ① 抗菌活性不够强, 这可能是大多数有抗真菌活性的化合物无法深入开发的主要原因, 如果化合物本身的抗真菌活性与现有药物相当甚至是弱于已有药物, 那么此类化合物研发的前景堪忧; ② 抗菌谱缺乏优势, 抗真菌化合物如果对临床治疗难度大的耐药真菌或罕见真菌有较好的活性, 还有可能被进一步开发为抗真菌药物, 但如果化合物在抗菌活性和抗菌谱方面均缺乏优势, 那么很难成为药物开发的候选化合物; ③ 毒性或副作用大, 真菌作为真核细胞生物, 与哺乳动物细胞同源性较高, 因此化合物的抗真菌作用往往伴随着哺乳动物细胞毒性, 特别是化合物靶点的特异性不够强或者是化合物本身选择性不够高时, 可对宿主机体产生较大的毒副作用, 与化合物的抗真菌活性相权衡时, 临床获益较小, 此类化合物也不具备开发前景; ④ 机制不明, 化合物的抗真菌作用机制不明确也是影响药物审批的一大难点, 因此对于无法明确作用机制的化合物, 在药物开发方面通常不受青睐; ⑤ 市场原因和社会因素, 新药的开发需要付出巨额的时间和经济成本, 特别是对于 1.1 类新药, 寻找全新结构类型的药物成功率极低, 使得药物研发成本进一步提高, 不管是对社会还是企业, 都是需要权衡的因素。此外, 一些社会事件也会影响药物研发的进程, 比如突发的大规模疫情会显著影响药物的临床试验进程。

表 1 新型抗真菌化合物

Tab 1 Novel antifungal compounds

化合物	抗菌谱	MIC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MEC ₉₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	作用机制	目前状态	参考文献
fosmanogepix	耳念珠菌	0.008 ~ 0.015	—	靶向 Gwt1 酶, 阻止甘露糖蛋白的定 位, 破坏真菌细胞壁完整性	II 期临床	[8]
	曲霉菌属	—	< 0.25			
	镰刀菌属	—	< 0.25			
	鞭毛孢子菌	—	< 0.25			
	毛霉菌属	—	1 ~ 8			
	根霉菌属	—	4 ~ > 8			
雷扎芬净	近平滑念珠菌	0.5 ~ 2	—	抑制 β -1, 3- 葡聚糖合成酶	III 期临床	[8]
	白假丝酵母菌	≤ 0.125	—			
	曲霉菌属	—	$\leq 0.015 \sim 2$			
ibrexafungerp (SCY-078)	光滑念珠菌	0.016 ~ 8	—	抑制 β -1, 3- 葡聚糖合成酶	III 期临床	[14]
	白假丝酵母菌	0.016 ~ 0.5	—			
	近平滑念珠菌	0.016 ~ 8	—			
	热带念珠菌	0.06 ~ > 8	—			
	克鲁斯氏念珠菌	0.125 ~ 1	—			
尼可霉素 Z (nikkomycin Z)	粗球孢子菌	—	—	竞争性抑制几丁质合成酶催化 UDP-N- 乙酰葡萄糖胺, 抑制几丁质的合成, 抑制真菌细胞壁的形成	I 期临床	[16]
	白假丝酵母菌	—	—			
	耳念珠菌	32	—			
VT-1161	白假丝酵母菌	0.001 ~ 1.0	—	抑制真菌细胞膜的形成	III 期临床	[18]
T-2307	白假丝酵母菌	0.000 25 ~ 0.0039	—	抑制呼吸链的线粒体复合物 III 和 IV, 破坏线粒体膜电位	II 期临床	[20]
	光滑念珠菌	0.0039 ~ 0.0078	—			
	克柔念珠菌	0.0005 ~ 0.002	—			
	近平滑念珠菌	0.000 25 ~ 0.002	—			
	热带念珠菌	0.000 25 ~ 0.0005	—			
	新型隐球菌	0.0078 ~ 0.0625	—			
	烟曲霉菌	0.125 ~ 4	—			
冬青生菌素 H (ilicicolin H)	隐球菌属	0.1 ~ 1.56	—	抑制线粒体细胞色素 bc1 还原酶	先导化合物	[22]
	白假丝酵母菌	0.04 ~ 0.31	—			
	念珠菌属	0.01 ~ 5.0	—			
	曲霉菌属	0.08	—			
BHBM	新型隐球菌	0.06 ~ 1 (MIC ₈₀)	—	抑制真菌鞘脂的合成	先导化合物	[23]
D13	新型隐球菌	0.06 (MIC ₈₀)	—	抑制真菌鞘脂的合成	先导化合物	[23]
	念珠菌属	—	—			
	肺曲霉属	—	—			
turbimicin	烟曲霉菌	0.03 ~ 0.5	—	靶向 Sec14p, 削弱囊泡介导的转运功 能	临床前研究	[24]
	镰刀菌属	0.03 ~ 0.5	—			
	根霉菌属	0.03 ~ 0.5	—			
	念珠菌属	0.03 ~ 0.5	—			
	耳念珠菌 B11211	0.25	—			
AR-12	白假丝酵母菌	2 ~ 4	—	抑制乙酰辅酶 A 合成酶	I 期临床 *	[28]
	光滑念珠菌	4	—			
	新型隐球菌	4	—			
VL-2397	烟曲霉菌	0.06 ~ 0.5	—	通过铁载体转运体 1 以主动运输的方 式进入真菌细胞	II 期临床 (已终止)	[30]
	耐唑类烟曲霉菌	0.06 ~ 1	—			
	黑曲霉菌	1 ~ > 16	—			
	黄曲霉菌	2 ~ > 16	—			
	土曲霉菌	0.25 ~ > 8	—			
	构巢曲霉	16 ~ > 16	—			
	茄病镰刀菌	0.25 ~ > 16	—			
	念珠菌	1 ~ 2	—			
	新型隐球菌	1 ~ 2	—			

续表 1

化合物	抗菌谱	MIC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MEC ₉₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	作用机制	目前状态	参考文献
olorofim	塞多孢菌	0.25	—	选择性靶向嘧啶生物合成途径中的二	II 期临床	[8]
	曲霉菌属	—	—	氢乳酸酸脱氢酶		
	多产链球菌	0.2	—			

注 (Note): * 对其抗肿瘤活性做过 I 期临床试验, 未对抗真菌活性做临床试验 (Phase I clinical trials were conducted on its anticancer activity, but not its antifungal activity)。

相比于全新结构类型药物的研发过程, 联合用药是一种相对简便的新药研发手段。联合用药在临床上应用广泛, 比如两性霉素 B 与 5- 氟胞嘧啶联合使用治疗隐球菌病, 两种药物联用能够达到更强的抗真菌效果, 因此可以减少每种药物的原本用药剂量, 从而达到减少药物毒副作用的目的; 同时, 药物联用也能有效减少药物单独使用引起的耐药问题。通过联合用药的思路, 研发更多更高效的药物组合, 这种新型药物研发策略比 1.1 类新药的研发成本相对低廉, 研究周期也 shorter。

传统药物的新剂型开发也是一种新药研发常用策略, 两性霉素 B 脂质体的改造就是一个成功的范例。通过对两性霉素 B 剂型的改变, 在保证疗效的同时大大降低了药物在体内的毒副作用。这种研发策略的成本较 1.1 类新药研发和联合用药都更加低廉。

不管是全新靶点全新结构的药物发现、联合用药还是新剂型的开发, 不同的新药研发策略在创新性、成本和周期方面各有所长, 只有多种研发策略百花齐放, 抗真菌新药研发的进程才能够更好更快的向前推进, 为临床真菌感染的治疗提供更多选择。

参考文献

- Denning DW, Bromley MJ. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline [J]. Science, 2015, 347 (6229): 1414-1416.
- Rauseo AM, Coler-Reilly A, Larson L, et al. Hope on the horizon: novel fungal treatments in development [J]. Open Forum Infect Dis, 2020, 7 (2): ofaa016.
- Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16 (9): 603-616.
- Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia [J]. Swiss Med Wkly, 2016, 146: w14281.
- De Ullivarri MF, Arbulu S, Garcia-Gutierrez E, et al. Antifungal peptides as therapeutic agents [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 105.
- Shaw KJ, Schell WA, Covel J, et al. In vitro and in vivo evaluation of APX001A/APX001 and other Gwt1 inhibitors against cryptococcus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62 (8): e00523-18.
- Watanabe NA, Miyazaki M, Horii T, et al. E1210, a new broad-spectrum antifungal, suppresses Candida albicans hyphal growth through inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56 (2): 960-971.
- 刘锦燕, 郑彧鸣, 项明洁. 新型抗真菌药物研发进展及其作用靶点机制 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2023, 23 (1): 121-125.
- Tu J, Liu N, Huang Y, et al. Small molecules for combating multidrug-resistant superbug Candida auris infections [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12 (11): 4056-4074.
- Zhang Y, Liu YC, Chen SM, et al. Evaluation of the in vitro activity and in vivo efficacy of anidulafungin-loaded human serum albumin nanoparticles against Candida albicans [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 788442.
- Locke JB, Almaguer AL, Donatelli JL, et al. Time-kill kinetics of rezafungin (cd101) in vagina-simulative medium for fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Candida albicans and non-albicans Candida species [J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 2018, 2018: 7040498.
- Wring S, Murphy G, Atiee G, et al. Lack of impact by SCY-078, a first-in-class oral fungicidal glucan synthase inhibitor, on the pharmacokinetics of rosiglitazone, a substrate for CYP450 2C8, supports the low risk for clinically relevant metabolic drug-drug interactions [J]. J Clin Pharmacol, 2018, 58 (10): 1305-1313.
- Spec A, Pullman J, Thompson GR, et al. MSG-10: a phase 2 study of oral ibrexafungerp (SCY-078) following initial echinocandin therapy in non-neutropenic patients with invasive candidiasis [J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74 (10): 3056-3062.
- Quindós G, Miranda-Cadena K, San-Millán R, et al. In vitro antifungal activity of ibrexafungerp (SCY-078) against contemporary blood isolates from medically relevant species of Candida: a European study [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 906563.
- Ghannoum M, Isham N, Angulo D, et al. Efficacy of ibrexafungerp (SCY-078) against Candida auris in an in vivo Guinea pig cutaneous infection model [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64 (10): e00854-20.
- Bentz ML, Nunnally N, Lockhart SR, et al. Antifungal activity of nikkomycin Z against Candida auris [J]. J Antimicrob Chemother, 2021, 76 (6): 1495-1497.
- Larwood DJ. Nikkomycin Z-ready to meet the promise? [J]. J Fungi (Basel), 2020, 6 (4): 261.
- Jacobs SE, Zagaliotis P, Walsh TJ. Novel antifungal agents in

- clinical trials [J]. *F1000Res*, 2021, 10: 507.
- [19] Nishikawa H, Fukuda Y, Mitsuyama J, et al. In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine, against *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72 (6): 1709-1713.
- [20] Yamashita K, Miyazaki T, Fukuda Y, et al. The novel arylamidine T-2307 selectively disrupts yeast mitochondrial function by inhibiting respiratory chain complexes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63 (8): e00374-19.
- [21] Mitsuyama J, Nomura N, Hashimoto K, et al. In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52 (4): 1318-1324.
- [22] Singh SB, Liu W, Li X, et al. Antifungal spectrum, in vivo efficacy, and structure-activity relationship of ilicicolin h [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3 (10): 814-817.
- [23] Covian R, Trumppower BL. Illicicolin inhibition and binding at center N of the dimeric cytochrome bc1 complex reveal electron transfer and regulatory interactions between monomers [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (13): 8614-8620.
- [24] Singh SB, Liu W, Li X, et al. Structure-activity relationship of cytochrome bc1 reductase inhibitor broad spectrum antifungal ilicicolin H [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23 (10): 3018-3022.
- [25] Mor V, Rella A, Farnoud AM, et al. Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of *Fungal Sphingolipids* [J]. *mBio*, 2015, 6 (3): e00647.
- [26] Lazzarini C, Haranahalli K, Rieger R, et al. Acylhydrazones as antifungal agents targeting the synthesis of fungal sphingolipids [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62 (5): e00156-18.
- [27] Zhang F, Zhao M, Braun DR, et al. A marine microbiome antifungal targets urgent-threat drug-resistant fungi [J]. *Science*, 2020, 370 (6519): 974-978.
- [28] Koselny K, Green J, Didone L, et al. The celecoxib derivative AR-12 has broad-spectrum antifungal activity in vitro and improves the activity of fluconazole in a murine model of cryptococcosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60 (12): 7115-7127.
- [29] Xie Y, Liu X, Zhou P. In vitro antifungal effects of berberine against *Candida spp.* in planktonic and biofilm conditions [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 87-101.
- [30] Nakamura I, Yoshimura S, Masaki T, et al. ASP2397: a novel antifungal agent produced by *Acremonium persicinum* MF-347833 [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017, 70 (1): 45-51.
- [31] Nakamura I, Ohsumi K, Takeda S, et al. ASP2397 is a novel natural compound that exhibits rapid and potent fungicidal activity against *Aspergillus Species* through a specific transporter [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63 (10): e02689-18.
- [32] Mammen MP, Armas D, Hughes FH, et al. First-in-human phase 1 study to assess safety, tolerability, and pharmacokinetics of a novel antifungal drug, VL-2397, in healthy adults [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63 (11): e00969-19.
- [33] Dietl AM, Misslinger M, Aguiar MM, et al. The siderophore transporter sit1 determines susceptibility to the antifungal VL-2397 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63 (10): e00807-19.
- [34] Song D, Hao J, Fan D. Biological properties and clinical applications of berberine [J]. *Front Med*, 2020, 14 (5): 564-582.
- [35] Li DD, Xu Y, Zhang DZ, et al. Fluconazole assists berberine to kill fluconazole-resistant *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (12): 6016-27.
- [36] Wang Y, Yan H, Li J, et al. Antifungal activity and potential mechanism of action of caspofungin in combination with ribavirin against *Candida albicans* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2023, 61 (3): 106709.
- [37] Lin J, Xiao X, Liang Y, et al. Repurposing non-antifungal drugs auranofin and pentamidine in combination as fungistatic antifungal agents against *C. albicans* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1065962.
- [38] Teixeira MVS, Aldana-Mejía JA, Da Silva Ferreira ME, et al. Lower concentrations of amphotericin B combined with ent-hardwickiic acid are effective against *Candida* Strains [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12 (3): 509.
- [39] Fatima I, Rasul A, Shah S, et al. Novasomes as nano-vesicular carriers to enhance topical delivery of fluconazole: a new approach to treat fungal infections [J]. *Molecules*, 2022, 27 (9): 2936.
- [40] Kapileshwari GR, Barve AR, Kumar L, et al. Novel drug delivery system of luliconazole-formulation and characterisation [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2020, 55. doi: 10.1016/j.jddst.2019.101302.
- [41] Baghel S, Nair VS, Pirani A, et al. Luliconazole-loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of superficial Tinea infections [J]. *Dermatol Ther*, 2020, 33 (6): e13959.
- [42] Dave V, Bhardwaj N, Gupta N, et al. Herbal ethosomal gel containing luliconazole for productive relevance in the field of biomedicine [J]. *3 Biotech*, 2020, 10 (3): 97.
- [43] Marques SM, Chavan DU, Bhide PJ, et al. Novel luliconazole spanlastic nanocarriers: development and characterisation [J]. *Curr Drug Deliv*, 2023, 20 (6): 792-806.
- [44] Liu L, Sun Y, Gao Z, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel 3, 4-isoxazolidinamide derivatives for the combination treatment of azole-resistant candidiasis [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2022, 355 (12): e2200266.
- [45] Zhen C, Lu H, Jiang Y. Novel promising antifungal target proteins for conquering invasive fungal infections [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 911322.
- [46] Farnoud AM, Toledo AM, Konopka JB, et al. Raft-like membrane domains in pathogenic microorganisms [J]. *Curr Top Membr*, 2015, 75: 233-268.
- [47] Fernandes CM, Goldman GH, Del Poeta M. Biological roles played by sphingolipids in Dimorphic and Filamentous Fungi [J]. *mBio*, 2018, 9 (3): e00642-18.
- [48] Munshi MA, Gardin JM, Singh A, et al. The role of ceramide synthases in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* [J]. *Cell Rep*, 2018, 22 (6): 1392-1400.
- [49] 宋雨, 蔡中华, 周进. 微生物群体感应抑制剂及其在海洋生态中的应用 [J]. *微生物学报*, 2018, 58 (1): 10-18.
- [50] Tian X, He GJ, Hu P, et al. *Cryptococcus neoformans* sexual reproduction is controlled by a quorum sensing peptide [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3 (6): 698-707.

(收稿日期: 2023-03-02; 修回日期: 2023-05-08)

CRISPR 系统在白假丝酵母菌基因功能研究中的应用

运照临, 王欣荣, 刘昕, 施乔, 盛春泉, 王彦*, 刘娜* (中国人民解放军海军军医大学, 上海 200433)

摘要: 成簇的间隔短回文重复 (CRISPR) 系统作为一种有效的基因编辑策略, 已成为多种生物系统基因功能研究的通用工具。真菌感染是导致人类疾病的重要原因, 白假丝酵母菌作为临床最常见的病原真菌, 其基因功能的揭示是探寻新的治疗策略和药物靶点的关键。本文回顾了 CRISPR 系统在白假丝酵母菌中从应用到优化, 从基因敲除到表达调控的发展历程, 以期通过对白假丝酵母菌致病力及耐药机制的研究为新药物靶点的探寻开辟道路。

关键词: CRISPR; Cas9; 真菌; 白假丝酵母菌; 基因编辑

中图分类号: R379.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1412-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.002

CRISPR system in the study of gene function of *Candida albicans*

YUN Zhao-lin, WANG Xin-rong, LIU Xin, SHI Qiao, SHENG Chun-quan, WANG Yan*, LIU Na* (Navy Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: As an effective gene editing strategy, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system has become a general tool for gene function research in many biological systems. Fungal infection is an important cause of human diseases. As the most common clinical pathogenic fungi, the revelation of the gene function of *Candida albicans* is the key to new treatment strategies and drug targets. This paper reviewed the development of CRISPR system in *Candida albicans* from application to optimization, from gene knockout to expression regulation, to pave the way for the exploration of new drug targets via pathogenicity and drug resistance mechanism of *Candida albicans*.

Key words: CRISPR; Cas9; fungus; *Candida albicans*; gene editing

念珠菌是临床最常见的致病真菌, 据统计, 念珠菌感染在医院血源性感染中排第四位, 病死率高达 40% ~ 60%, 每年造成全球 25 万人以上死亡。白假丝酵母菌是临床最常见的致病念珠菌, 在所有念珠菌感染中占比超过 40%^[1-3], 其与致病性和耐药性相关的关键基因的发现和研究对找到抗真菌新策略和新靶点具有重要意义。白假丝酵母菌不含质粒, 因此所有的基因编辑工作都将在基因组上进行^[4]。此外, 白假丝酵母菌一般是二倍体, 因此当纯合子缺陷或突变时, 必须确保两个等位基因都已改变^[5]; 一些白假丝酵母菌基因座是杂合的, 进一步使基因操作复杂化^[6]。总之, 这些局限性使得我们需要一种强有力的手段来进

行白假丝酵母菌基因功能的研究。

CRISPR/CAS (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/crispr associated proteins) 系统是细菌和古菌抵御外源 DNA 侵染的一种获得性免疫系统, 它由 CRISPR 基因座和编码 CAS 蛋白的基因组成, CRISPR 基因座上有多个相同的重复序列 (repeat), 这些重复序列被不同的间隔序列 (spacer) 相互隔开。CRISPR/CAS 广泛存在于细菌与古菌之中 (大约 40% 的细菌与 90% 的古菌)^[7]。当噬菌体、病毒的 DNA 侵染菌体时, 由 CAS 蛋白 (CAS1 和 CAS2) 把这些外源 DNA 的片段整合到 CRISPR 基因座的重复序列之间, 形成新的间隔序列, 从而使细菌获得对这种外源 DNA 的“记

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81973175); 上海市教委科研创新计划重大项目 (No.2019-01-07-00-07-E00073)。

作者简介: 运照临, 男, 硕士研究生, 主要从事抗真菌药物研究, email: 107830451@qq.com *通信作者: 刘娜, 女, 副教授, 主要从事抗感染药物研究, email: liuna@smmu.edu.cn; 王彦, 女, 教授, 主要从事抗感染药理学研究, email: wangyansmmu@126.com

忆”。当带有相同片段的外源 DNA 被整合到细菌的基因组 DNA 上时, CRISPR 的间隔重复就会被转录成 crRNA (CRISPR RNA) 前体, 之后被进一步切割加工为成熟的 crRNA。成熟的 crRNA 只含有一个间隔序列 (可与外源 DNA 上的片段互补), 它将与相关的 CAS 蛋白结合形成复合物并负责引导复合物与基因组中的外源 DNA 结合, 通过自身的核酸酶活性或者募集下游核酸酶来对外源 DNA 造成双链断裂 (DSB), 从而破坏其表达。CRISPR/CAS 系统以效应器模块设计的原则为分类标准, 可以分为两大类: 多亚基效应复合物和单蛋白效应模块^[8-10]。相较于多亚基效应复合物来说, 单蛋白效应模块 crRNA-Cas 复合物的结构更加简单, 作为基因编辑工具在设计上更加简易, 本文关注的 CRISPR/CAS9 系统便是此类。在细菌中, Cas9 蛋白需要在 crRNA 与反式激活的 crRNA (tracrRNA) 共同作用下才能完成对外源 DNA 的识别与定位, 从而发挥核酸酶活性, 造成 DSB^[11]。2012 年 Jinek 等^[12]成功将 crRNA 和 tracrRNA 整合成一条 sgRNA (single guide RNA), sgRNA 可以独自引导 Cas9 蛋白对靶标 DNA 进行 DSB (见图 1)。这样的突破进一步增强了 CRISPR/CAS9 系统在基因编辑中的可操作性, CRISPR/CAS9 系统也逐渐成为了目前研究最为清楚, 应用最为广泛的一类系统。

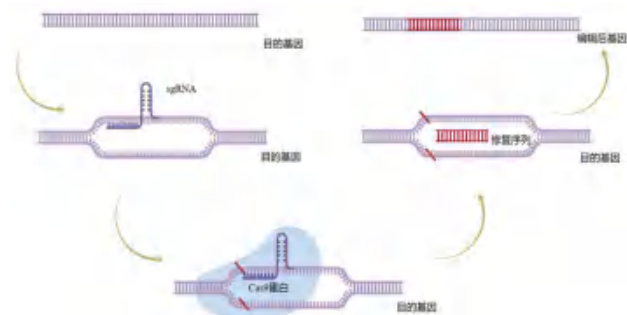


图 1 sgRNA 募集 Cas9 蛋白对目标基因进行切割的示意图

Fig 1 Sketch map of sgRNA recruits Cas9 protein to cut the target gene

1 基于 CRISPR 系统的基因缺陷编辑

1.1 CRISPR 系统在白假丝酵母菌基因编辑中首次应用

Vyas 等^[13]首次将 CRISPR 系统应用于白假丝酵母菌的基因缺陷编辑, 以酿酒酵母中 CRISPR 系统为模板, 将原系统中的 CUG (在白假丝酵母菌中被翻译为丝氨酸而不是亮氨酸) 替换为 CTG, 设计出适用于白假丝酵母菌的 CaCas9 系统; 研究中, 他们以缺陷后出现红色表型的 *ADE2* 基因为靶点, 诺尔斯菌素抗性为选择标记, 设计出了由两个独立质粒分别搭载表达“切割工具”Cas9 蛋白序

列和“定位工具”sgRNA 序列所组成的“duet”系统 (见图 2A), 以及将两者整合在一个质粒上同时进行转化的“solo”系统 (见图 2B)。由于白假丝酵母菌无法维持自主复制的质粒, 因此 CRISPR 系统序列被整合到白假丝酵母菌基因组中, 并通过 ENO1 启动子和 RNA 聚合酶 III (Pol III) 启动子 pSNR52 分别表达 Cas9 蛋白和转录 sgRNA。这两个系统都提供了使用同源重组修复 (HDR) 的修复模板, 通过插入导致转录提前结束的终止密码子或造成移码突变使靶向基因表达缺陷。结果显示, “duet”系统和“solo”系统的转化率分别在 20% ~ 40% 和 60% ~ 80%。相较于传统的基因编辑手段, CRISPR 系统不仅表现出惊人的转化效率, “solo”系统更是可以通过一次转化操作同时沉默两条染色体上的等位基因, 这意味着 CRISPR 系统可高效地应用于多倍体分离株的基因编辑操作中。但此方法局限性在于发挥功能的 CRISPR 组件必须成功整合到白假丝酵母菌基因组上发挥作用, 整合的成功率很大程度上限制了最终基因缺陷构建的成功性。

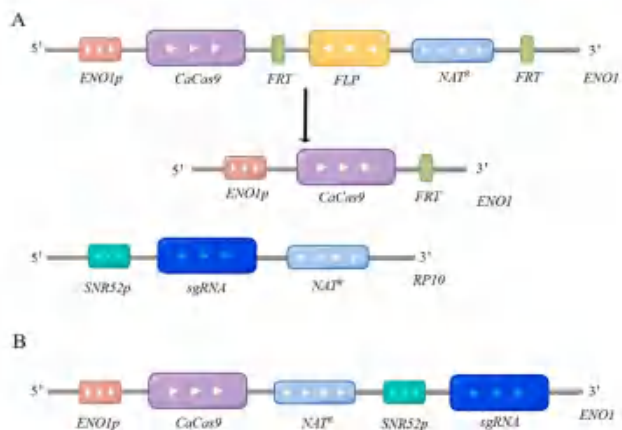


图 2 CRISPR 系统应用的两种不同模式

Fig 2 Two different modes of CRISPR system application

A. “duet”系统, 使用两个不同的质粒, 需要进行两次转化, 并在其间进行一次抗性标记回收 (the “duet” system uses two different plasmids and requires two steps of transformation and one step of recovery of resistance markers); B. “solo”系统, 只使用一个质粒, 进行一次转化 (the “solo” system uses only one plasmid for one step transformation)

1.2 瞬时 CRISPR 系统简化了实验流程

Min 等团队^[14]发现 CRISPR 元件可以从仅短暂存在的基因中表达, 研究开发了一个瞬时 CRISPR 系统, 进一步加速了白假丝酵母菌的基因编辑操作。瞬时 CRISPR-Cas9 系统, 可以在没有稳定整合到念珠菌基因组的情况下发挥瞬时作用, 从而构建基因缺失体。该团队同样选择了 *ADE2* 为目标基因, 利用 PCR 技术扩增出 Vyas 团队^[13]使用的 CRISPR 组件中的 CaCas9 和 sgRNA 的表达片段 (舍弃了整合基因组所必须的同源臂), 以

诺尔斯菌素抗性片段作为修复片段,对白假丝酵母菌 SC5314 进行转化,并得到了较高频率的带有诺尔斯菌素抗性的纯合缺失株(见表 1)。结果表明瞬时存在完整的 CRISPR 组件即可发挥功能,诱导基因缺失,该功能并不依赖 CRISPR 组件在白假丝酵母菌基因组上的整合。随后 Min 团队^[14]以 *FRP1* 为目标基因得到了相同的实验结果。

表 1 瞬时 CRISPR 系统的转化频率

Tab 1 Transform frequency of transient CRISPR-Cas9 system

CaCAS9 表达组件	sgRNA 表达组件	ade2: NAT 修复模板	NAT 抗性株 获取频率	ADE2 纯合 缺失株获取频率
—	—	+	1.4×10^{-6}	0.0
+	—	+	8.3×10^{-7}	0.0
—	+	+	8.3×10^{-7}	0.0
+	+	+	4.3×10^{-5}	2.1×10^{-5}
+	+	—	0.0	0.0

注 (Note): NAT 为 Nourseothricin 的缩写,代表诺尔斯菌素抗性,转化频率的计算方法为 YPD-NAT 上的菌落数除以非选择性 YPD 上的菌落数,每个转化实验重复 4 次 (NAT is the abbreviation of Nourseothricin and stands for nourseothricin resistance. The transformation frequency is calculated by dividing the number of colonies on YPD-NAT by the number of colonies on non-selective YPD. Each conversion experiment was repeated four times)。

1.3 CRISPR 组件、标记回收与 PCR 缝合构建 sgRNA 的高效性

Nguyen 团队对白假丝酵母菌 CRISPR 系统进行了升级,首先设计了两种可以高效快速地回收基因编辑过程中整合到白假丝酵母菌基因组上的功能片段和抗性标记的方法:LEUpOUT 系统和 His-FLP 系统^[15-16]。LEUpOUT 系统适用于 *LEU2/leu2* Δ 变异,即含有 *LEU2* 基因单一拷贝的念珠菌(一种较为常见且易获得的基因编辑模式菌)。在该系统中,研究人员在 CRISPR 组件与标记两侧各拼接一段 *LEU2* 基因的片段,这两段片段可组合成一个完整的 *LEU2* 基因开放阅读框,并存在一段重复的序列,转化后的菌株可通过不含亮氨酸的培养基筛选,借助重复序列的同源性删除(见图 3A)。His-FLP 系统则是一种麦芽糖诱导的 FLP 重组酶介导的 CRISPR 组件与标记的删除,最终将会在插入的 *HIS* 位点留一个 FLP 重组酶靶点 FRT 序列(见图 3B)。两种方式皆在编辑目的外最大限度地保持了原基因组的纯净性,在确认了预期的靶点修饰后,营养素 *N*-乙酰转移酶 (NAT) 标记、Cas9 和 sgRNA 表达框被从基因组中移除。由于没有标记整合在目标基因座上,且 CRISPR/NAT 标记成分在每次转化后被回收,因此实现了真正的无标记基因组编辑。

此外该团队的研究中还利用了一种 PCR 缝合的方式代替原先的质粒克隆来扩增 sgRNA (见图 3C)。通过该方式获得 sgRNA 可在一天内完成白假丝酵母菌的转化,而传统的通过大肠埃希菌培养克隆质粒的方式则至少需要 3 d,更进一步地提高了基因编辑效率。

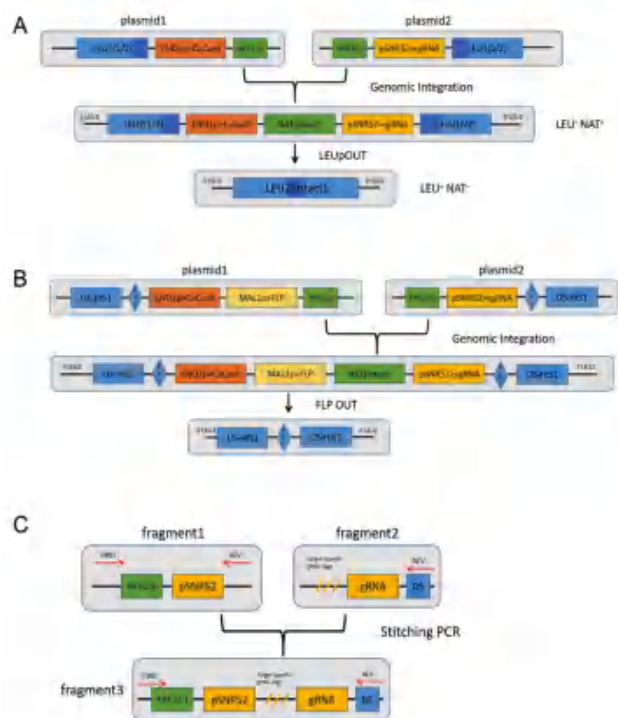


图 3 CRISPR 系统的进步

Fig 3 Progress of the CRISPR system

A. LEUpOUT 系统 (LEUpOUT system); B. His-FLP 系统 (His-FLP system); C. sgRNA PCR 缝合 (sgRNA PCR suture); FWD. 前引物 (forward primer); REV. 后引物 (reverse primer)。

1.4 启动子改造进一步提高编辑效率

此后,对于 CRISPR 编辑盒上诸多元件的优化进一步地提高了 CRISPR 系统的基因编辑效率。Ng 团队^[17]的研究发现,类似于其他物种,在白假丝酵母菌中,CRISPR 系统基因编辑的效率很大程度上受限于 sgRNA 的转录效率。研究者通过测量 CRISPR 系统切割和修复单拷贝酵母增强单体红色荧光蛋白 (RFP) 基因所造成的荧光参数变化来作为量化基因编辑效率的指标,比较各种 sgRNA 启动子和转录后 RNA 处理方案发现,在 *ADHI* 启动子控制下转录的 RNA 使基于 CRISPR 的突变率增加了 10 倍。侧翼是 5'端 tRNA 的 sgRNA 表现出更高的稳定性,从而使白假丝酵母菌的 CRISPR 编辑效率有了重要的提高。

2 基于 CRISPR 系统的非编辑应用

强大的基因组编辑是 CRISPR 系统最引人注目的功能。此外,由于它可以通过使用不具有核

酸酶活性的 Cas9 (dCAS9)^[18], 在同一位置招募 DNA、RNA 和蛋白质, 使得 CRISPR 系统也可以作为一种高效运转的功能平台, 在白假丝酵母菌基因功能的研究中有了更多样的应用, 例如特定基因组的示踪定位和转录调控功能。

近年来, 有两个团队描述了 CRISPR 系统在白假丝酵母菌中的非编辑应用。Román 团队^[19]报道了 CRISPR 系统也可以应用于基因表达水平的调控, 他们设计了一种不具备 DSB 活性的 CAS9 蛋白——dCAS9, 选择编码胞质过氧化氢酶的 *CAT1* 基因, 通过 GFP 融合蛋白的水平来反映该基因表达的上调和下调, 结果发现 dCAS9 本身不足以阻止基因的转录, 但 dCAS9 与 Nrg1 抑制子的结合可以将转录水平下调约 60%。而对于转录激活, 研究者使用了不同的激活结构域和策略: 当表达与 Gal4 激活域融合的 dCAS9 时, 会诱导基因转录水平上调至原来的 2 倍, 这取决于 Cas9 嵌合体的结合部位 (由 sgRNA 主导); 当使用 pADH1-tRNA 启动子来表达目的基因, 转录水平的上调甚至可以更高; 当使用 RNA 支架策略与前面提到的策略相结合时, 额外的 RNA 结构域 (MS2) 被添加到 sgRNA 中, 生成 scRNA 支架, 然后被已知的 RNA 结合蛋白 (MCP) 识别, 通过将激活物融合到 MCP, 通过 RNA 招募一个效应器模块, 将转录水平提高到原来的 15 倍。Wensing 等^[20]则开发了一个类似的 CRISPR 的系统用于遗传干扰, 其中 dCAS9 受 ACT1 启动子控制, SNR52 RNA 聚合酶 III (POL III) 启动子用于驱动 sgRNA 表达, 将该结构整合在中性基因座上。此外, Shapiro 团队还将 dCAS9 与密码子优化的抑制子结构域 Mix1 和转录抑制子 Sin3 融合, 此前有报道这两种结构域可以增强酿酒酵母中的 CRISPR 干扰 (CRISPRi)。该研究还通过针对内源性 *ADE2* 启动子, 证明了 dCAS9 或 dCAS9-抑制子融合都能有效地抑制白假丝酵母菌基因的转录, 其中 dCAS9-Mxi1 融合的抑制作用最强; 报道中, 该系统还被用来耗尽 HSP90 蛋白, 表明该系统也可以对管家基因的表达进行有效的抑制^[20]。

3 总结与展望

近年来, 通过基因编辑技术对病原真菌进行有效生物学研究已不存在技术障碍。对于白假丝酵母菌, 目前已经有多种成熟的基因功能研究策略可供选择, 如营养标记筛选策略、药物抗性标记筛选策略等, 使得白假丝酵母菌成为一个极具优势的真菌致病模型。然而, 基因操作仍然存在一些瓶颈, 诸

如删除筛选工作的繁复、脱靶现象以及不尽如人意的转化效率。因此, 将 CRISPR 技术应用于病原真菌基因功能的分析具有很大的优势。首先, 由于 Cas9 核酸酶在 dsDNA 上产生断裂的效率非凡, 可以同时编辑几个基因, 这对非单倍体或非整倍体真菌菌株来说是一个重要的优势, 可以避免使用不同的标记或循环策略。其次, 有效的基因组编辑不一定需要工具质粒的克隆步骤, 因为该系统可以瞬时表达来自 PCR 片段的成分, 从而大大缩短了遗传操作所需的时间。第三, 该系统的特异性允许在基因编辑后对基因组进行最小程度的改变。这种“干净”的表型在分析基因功能时也是一个优势。

目前, 应用于白假丝酵母菌基因功能研究的 CRISPR 技术已经相对完善成熟, 研究人员不仅可以应用 CRISPR 技术高效地沉默目的基因, 构建基因缺陷菌, 亦可以运用该技术对必需基因的表达进行灵活的调控。近年来, 该技术也逐步在其他念珠菌属及非念珠菌属致病真菌的基础研究中得以应用。

当然, CRISPR 系统的应用有其局限性, 最重要的一点在于, 相较于传统策略中利用同源片段匹配, 通过人为设计的序列替换原基因组序列从而达到基因型的改变, CRISPR 系统则是向真菌细胞中导入了一个具有实在编辑功能的“程序”。这种方法固然可以通过一次转化实现一组等位基因的纯合突变, 或同时对多个基因进行编辑, 但在以诱导杂合子突变为目的基因编辑中 (如管家基因纯合子突变致死的情况), 如何控制这个“程序”仅对一条等位基因进行编辑, 还未见在白假丝酵母菌上的报道。此外, 还有许多尚未探索的因素可能会影响 CRISPR 系统在基因编辑中的效率, 比如 sgRNA 的长度和序列、修复模板的大小和相对于 DSB 的位置、转化真菌细胞的方式等。因此, 预计在未来几年, 这一技术尚存在极大的改进空间。另一方面, 除了基因编辑, CRISPR 系统还提供了一系列潜在用途, 可在不久的将来促进真菌研究。Cas9 核酸酶作为支架平台具有可以募集生命的三个主要分子 RNA、DNA 和蛋白质相互作用的独特能力, 使其存在一系列潜在的应用可能, 如转录调控应用。由于该系统特异性依赖于向导和模板的精确碱基配对, 使得多靶点操作相对容易, 可以应用该策略调控宿主的代谢通路。

总的来说, 利用 CRISPR 系统快速地构建白假丝酵母菌基因缺陷菌库将有广阔的应用前景, 通过构建潜在药物靶点的基因缺陷菌可以对抗真

菌活性化合物进行化合物作用靶点的研究,也可以直接利用基因缺陷菌进行有针对性的化合物的筛选。CRISPR 系统构建的白假丝酵母菌基因缺陷菌库对寻找新药靶和开发新药提供了新策略。

参考文献

- [1] Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, et al. Invasive candidiasis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18026.
- [2] Lee Y, Puumala E, Robbins N, et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond [J]. Chem Rev, 2021, 21 (6): 3390-3411.
- [3] Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal BB, et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis [J]. Curr Opin Microbiol, 2019, 52: 1-6.
- [4] Román E, Prieto D, Alonso-Monge R, et al. New insights of CRISPR technology in human pathogenic fungi [J]. Future Microbiol, 2019, 14: 1243-1255.
- [5] Jones T, Federspiel NA, Chibana H, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (19): 7329-7334.
- [6] Muzzey D, Schwartz K, Weissman JS, et al. Assembly of a phased diploid *Candida albicans* genome facilitates allele-specific measurements and provides a simple model for repeat and indel structure [J]. Genome Biol, 2013, 14 (9): R97.
- [7] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria [J]. Mol Microbiol, 2000, 36 (1): 244-246.
- [8] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9 (6): 467-477.
- [9] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13 (11): 722-736.
- [10] Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems [J]. Mol Cell, 2015, 60 (3): 385-397.
- [11] Kantor A, McClements ME, MacLaren RE. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (17): 6240.
- [12] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337 (6096): 816-821.
- [13] Vyas VK, Barrasa MI, Fink GR. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families [J]. Sci Adv, 2015, 1 (3): e1500248.
- [14] Min K, Ichikawa Y, Woolford CA, et al. *Candida albicans* gene deletion with a transient CRISPR-Cas9 system [J]. mSphere, 2016, 1 (3): e00130-16.
- [15] Huang MY, Mitchell AP. Marker recycling in *Candida albicans* through CRISPR-Cas9-induced marker excision [J]. mSphere, 2017, 2 (2): e00050-17.
- [16] Nguyen N, Quail MMF, Hernday AD. An efficient, rapid, and recyclable system for CRISPR-mediated genome editing in *Candida albicans* [J]. mSphere, 2017, 2 (2): e00149-17.
- [17] Ng H, Dean N. Dramatic improvement of CRISPR/Cas9 editing in *Candida albicans* by increased single guide RNA expression [J]. mSphere, 2017, 2 (2): e00385-16.
- [18] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. Cell, 2013, 154 (2): 442-451.
- [19] Román E, Coman I, Prieto D, et al. Implementation of a CRISPR-based system for gene regulation in *Candida albicans* [J]. mSphere, 2019, 4 (1): e00001-19.
- [20] Wensing L, Sharma J, Uthayakumar D, et al. A CRISPR interference platform for efficient genetic repression in *Candida albicans* [J]. mSphere, 2019, 4 (1): e00002-19.

(收稿日期: 2023-02-10; 修回日期: 2023-03-20)

研究论文

灵芝孢子粉通过 JAK1/STAT6 信号通路
抑制 M2 型巨噬细胞极化

王思维¹, 陈云娜², 陈卫东^{1, 3}, 王雷^{1, 3}, 吴成圆¹, 王强¹, 张雪¹, 吴培云^{1*} (1. 安徽中医药大学药学院中药药理系, 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学细胞分子生物学实验室, 合肥 230012; 3. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

摘要: **目的** 探究灵芝孢子粉对 M2 型巨噬细胞极化的影响及其可能的作用机制。**方法** 采用 IL-4 (100 ng · mL⁻¹) 刺激小鼠 RAW264.7 巨噬细胞, 建立 M2 型巨噬细胞模型, 分别给予灵芝孢子粉 1、2、4 mg · mL⁻¹ 进行孵育。CCK8 法观察灵芝孢子粉对正常巨噬细胞活力的影响, 流式细胞术检测 M2 型巨噬细胞表面分子 CD206 和 CD86 的表达, RT-qPCR、ELISA 检测 TGF-β1、IL-10 和 Arg-1 的表达; Western blot 检测 JAK1 和 STAT6 磷酸化表达水平。**结果** 与正常组相比, IL-4 组 M2 型极化相关标志物 CD206、TGF-β1、IL-10 和 Arg-1 等表达显著升高 ($P < 0.001$), JAK1、STAT6 磷酸化蛋白水平显著上升 ($P < 0.001$); 灵芝孢子粉干预后, 上述 M2 型极化相关标志物和蛋白磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。**结论** 灵芝孢子粉可以抑制 M2 型巨噬细胞极化, 其作用机制可能与抑制 JAK1/STAT6 信号通路有关。

关键词: 灵芝孢子粉; 巨噬细胞; M2 型极化; JAK1/STAT6

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1417-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.003

Ganoderma lucidum spore powder inhibits M2-type macrophage
polarization through JAK1/STAT6 signaling pathway

WANG Si-wei¹, CHEN Yun-na², CHEN Wei-dong^{1, 3}, WANG Lei^{1, 3}, WU Cheng-yuan¹, WANG Qiang¹, ZHANG Xue¹, WU Pei-yun^{1*} (1. Department of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Compound Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 3. Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the effect of Ganoderma lucidum spore powder on the polarization of M2-type macrophages and its possible mechanism. **Methods** Mouse RAW264.7 macrophages were stimulated with IL-4 (100 ng · mL⁻¹) to establish an M2-type macrophage model, and were incubated with Ganoderma lucidum spore powder at 1, 2 and 4 mg · mL⁻¹, respectively. The effect of Ganoderma lucidum spore powder on the viability of normal macrophages was observed by CCK8 method. The expression of M2-type macrophage surface molecules CD206 and CD86 was detected by flow cytometry. The expression of TGF-β1, IL-10 and Arg-1 was detected by RT-qPCR and ELISA. The phosphorylation expression levels of JAK1 and STAT6 was detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the expressions of M2-type polarization-related markers CD206, TGF-β1, IL-10 and Arg-1 ($P < 0.001$), and the phosphorylated proteins of JAK1 and STAT6 increased ($P < 0.001$) in the IL-4 group. After the intervention of Ganoderma lucidum spore powder, the above-mentioned M2-type polarization-related markers and protein phosphorylation levels decreased ($P < 0.05$, $P < 0.001$).

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82073923)。

作者简介: 王思维, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 1607384912@qq.com * **通信作者:** 吴培云, 女, 教授, 主要从事中药的提取、分离、鉴定及药效研究, email: wupeiyun@ahtcm.edu.cn

Conclusion Ganoderma lucidum spore powder can inhibit the polarization of M2-type macrophages, whose mechanism may be related to the inhibition of JAK1/STAT6 signaling pathway.

Key words: Ganoderma lucidum spore powder; macrophage; M2-type polarization; JAK1/STAT6

巨噬细胞是一类可以多向分化的免疫细胞,根据表型分为经典激活的 M1 型巨噬细胞和替代活化的 M2 型巨噬细胞^[1]。M2 型巨噬细胞由 Th2 细胞因子白介素 (IL)-4 等激活,高表达精氨酸酶 1 (Arg-1)、IL-10 等细胞因子^[2-3],具有促进肿瘤生长转移、血管形成等功能,其数量与肿瘤的恶性程度成正比^[4]。调节 M2 型巨噬细胞极化平衡从而改善肿瘤微环境是中药免疫调节的作用机制之一^[5]。STAT6 是 STAT 家族的成员之一,在信号转导与转录激活上发挥关键作用,JAK/STAT6 信号通路是 M2 型巨噬细胞极化过程中最重要的信号通路之一,通过抑制 STAT6 信号通路磷酸化,阻止 M2 型巨噬细胞极化,在临床上有潜在的治疗价值^[6-7]。灵芝孢子粉是灵芝生长成熟期弹射出来的极其微小的孢子,具有灵芝的全部遗传活性,其广泛的临床治疗作用已经被大量研究证实^[8-10]。根据早期研究报道,灵芝的主要有效成分之一是灵芝多糖,灵芝孢子粉的水或乙醇提取物通常由灵芝多糖组成,它不仅可以抑制多种肿瘤细胞的迁移和侵袭,而且在调节机体免疫应答中起重要作用^[11-13]。目前灵芝孢子粉对 M2 型巨噬细胞极化的机制还不明确,本文通过建立 IL-4 诱导 RAW264.7 细胞 M2 型极化模型,探讨灵芝孢子粉对 M2 型巨噬细胞极化相关 JAK1/STAT6 信号通路的影响,为灵芝孢子粉免疫相关作用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞及培养

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞,购自中国科学院上海细胞库。将细胞放置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2 试剂与仪器

灵芝孢子粉 (GLS) (合肥敬道生物科技有限公司,批号 200301); CCK8 试剂盒 (山东思科捷生物技术有限公司); DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); 脂多糖 (LPS)、IL-4 (美国 Sigma 公司); 100×青霉素-链霉素溶液 (上海碧云天生物技术有限公司,批号: C0222); IL-10 试剂盒 (批号: YJ037873)、Arg-1 试剂盒 (批号: YJ037690)、TGF-β1 试剂盒 (批号: YJ002115)、CD86 流式抗体、CD206 流式抗体 (Biolegend); p-STAT6 抗体、STAT6 抗体、JAK1

抗体、P-JAK1 抗体 (美国 Abcam 公司); PCR 引物设计及合成 (合肥臻沃生物科技有限公司); SYBR Green qPCR Mix (山东思科捷生物技术有限公司)。灵芝孢子粉 (合肥敬道生物科技有限公司,批号: 200301); ELX800uv 酶标仪 (美国 Thermo 公司); KQ-300B 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司); Amersham Imager 600 成像系统 (美国 GE 公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); 318MC 型酶标仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物的制备

将 2 g 灵芝孢子粉放入 10 mL 双蒸水中,在 70℃ 搅拌 12 h, 1500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 获得的上清液浓缩并使用冷冻干燥机 (LABCONCO, 美国) 冷冻干燥, 得到其粉末。为了进行后续的体外实验, 将得到的粉末溶解在含 10%FBS 的培养基中, 得到质量浓度为 50 mg·mL⁻¹ 的储存液, 然后通过 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 去除细菌。

2.2 细胞分组

实验分为正常组, IL-4 组和灵芝孢子粉低、中、高剂量组。取对数生长期细胞, 消化调整细胞浓度至 2×10⁵ 个·mL⁻¹, 接种至 6 孔板, 每组设 3 个复孔。细胞种板后, IL-4 组给予 100 ng·mL⁻¹ IL-4 刺激, 灵芝孢子粉低、中、高组分别给予 100 ng·mL⁻¹ IL-4 + 1、2、4 mg·mL⁻¹ 灵芝孢子粉, 孵育 24 h。收集细胞和培养上清液备用。

2.3 CCK8 法检测巨噬细胞活力

RAW264.7 细胞接种至 96 孔板, 加入不同浓度的灵芝孢子粉, 每组 6 个复孔。药物作用 24 h 结束后每孔加入 100 μL 的 CCK8 避光孵育 1.5 h, 酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度值, 计算细胞存活率。

2.4 流式细胞仪检测巨噬细胞表型

收集细胞后, 将细胞转移到 EP 管中, 2000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液。PBS 清洗一遍, 2000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液。向 EP 管中加入 100 μL FITC 标记的 CD86 抗体, 4℃ 避光孵育 30 min。染色后在 2000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液, 向 EP 管中加入 300 μL 流式缓冲剂, 在 2000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液, 向 EP 管中加入 100 μL 破膜液, 在室温下放置 10 min。混匀细胞, 加入 100 μL PE 标记的 CD206 抗体, 并在 4℃ 孵育 30 min。离心后弃上清液, 加入流式缓冲剂清

洗。加入 400 μL PBS 重悬细胞，过膜，上机检测。

2.5 RT-qPCR 检测 RAW264.7 巨噬细胞 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 基因的表达

Trizol 法提取细胞总 RNA， β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内标基因，采用 SYBR (Green) 法测定 RAW264.7 巨噬细胞中 mRNA 的表达，具体程序如下：95 $^{\circ}\text{C}$ (10 min) $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$ (15 s) $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$ (15 s, 40 个循环) $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min, 40 个循环) $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$ (15 s) $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$ (15 s)。其他各基因上下游序列见表 1。

表 1 检测基因的引物序列

Tab 1 Primer sequences for detecting genes

基因	引物	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')
IL-10	Forward primer	TTCTTTCAAACAAAGGACCAGC
	Reverse primer	GCAACCCAAGTAACCTTAAAG
Arg-1	Forward primer	TGAGAGACCACGGGACCTG
	Reverse primer	GCACCACACTGACTCTTCCATTC
TGF- β 1	Forward primer	TTGACTTCCGCAAGGACCTCGG
	Reverse primer	GCGCCCGGTTATGCTGCTGGT
β -actin	Forward primer	GTCCCTCACCTCCCAAAAG
	Reverse primer	GCTGCCTCAACACCTCAACCC

2.6 ELISA 法检测细胞上清液 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 的含量

取细胞培养上清液，1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上清液，根据试剂盒说明书处理，测定细胞上清液中 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 的含量。

2.7 Western blot 检测灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞中 JAK1/STAT6 蛋白表达的影响

收集细胞，加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液后，放置冰上 30 min，离心 (12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)，取蛋白上清液进行蛋白测定。每孔加入相应的蛋白上样，75 V 恒压电泳 30 min，再转为 150 V 恒压电泳分离蛋白，经 200 mA 恒流转膜 2 h，用 5% 脱脂牛奶封闭液常温下封闭 1 h，PBS 洗涤 3 次，每次 10 min，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜 (抗体稀释比例 1 : 1000)，用 TBST 缓冲液洗涤 3 次，每次 10 min，再加入二抗 (1 : 10 000) 室温下孵育 1.5 h，洗涤 3 次，以 GAPDH 作为内参蛋白，蛋白条带由 Amersham Imager 600 成像系统使用 ECL 底物检测。

2.8 统计学方法

统计学处理采用 SPSS 23.0 软件进行分析，数据结果以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞活性的影响

结果如图 1 所示，与正常组比较，灵芝孢子粉在 16 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞存活率下降，而在

0.25 $\sim$ 8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内对 RAW264.7 巨噬细胞无明显毒性，因此，在后续实验中选用灵芝孢子粉 1、2、4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为工作浓度。

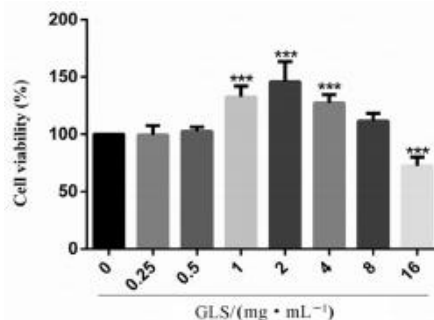


图 1 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞细胞活性的影响 ($n = 6$)

Fig 1 Effect of Ganoderma lucidum spore powder on cell activity of RAW264.7 macrophage ($n = 6$)

注：与正常组比较，*** $P < 0.001$ 。

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

3.2 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞 M2 表型 CD86/CD206 抗体表达的影响

与正常组相比，LPS 刺激后的 RAW264.7 巨噬细胞高表达 CD86 (99.5%)，细胞极化为 M1 型；而 IL-4 刺激的巨噬细胞高表达 CD206 (74.5%)，细胞极化为 M2 型；灵芝孢子粉干预后，CD206 的表达不同程度的降低，说明灵芝孢子粉可以抑制 M2 型巨噬细胞的表型，结果见图 2。

3.3 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 基因表达的影响

与正常组相比，IL-4 组 RAW264.7 巨噬细胞中 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 的基因表达显著升高；与 IL-4 组相比，灵芝孢子粉干预后的 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 因子的基因表达显著下降，结果见图 3。

3.4 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 含量的影响

如图 4 所示，与正常组相比，IL-4 组 RAW264.7 巨噬细胞上清液中 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 的含量显著升高；与 IL-4 组相比，灵芝孢子粉各剂量组中 TGF- β 1、IL-10 和 Arg-1 因子含量下降，除灵芝孢子粉低剂量组 TGF- β 1 的含量外，差异均具有统计学意义。

3.5 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞 JAK1/STAT6 信号通路的影响

与正常组相比，IL-4 组 RAW264.7 巨噬细胞中 P-JAK1、P-STAT6 蛋白的表达显著提高；与 IL-4 组相比，灵芝孢子粉作用后两种蛋白的磷酸化表达水平显著下降，结果见图 5。

4 讨论

巨噬细胞是具有高度异质性的免疫细胞，在体内不同微环境影响下，不同亚型巨噬细胞

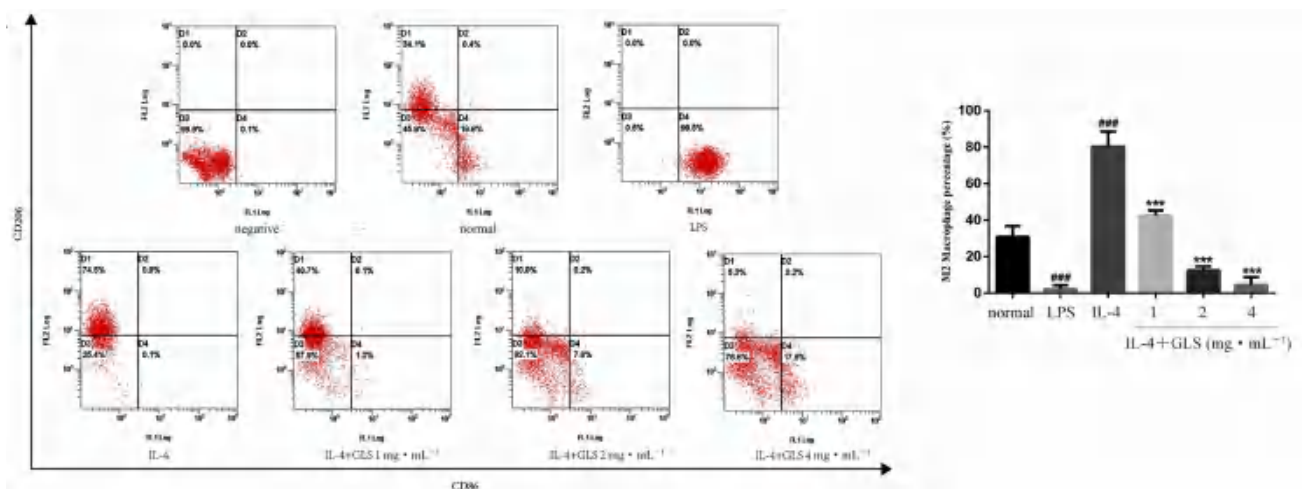


图2 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞表面 CD86/CD206 抗体表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 2 Effect of Ganoderma lucidum spore powder on CD86/CD206 antibody expression on the surface of RAW264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与正常组相比, $^{###}P < 0.001$; 与 IL-4 组相比, $^{***}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, $^{###}P < 0.001$; compared with the IL-4 group, $^{***}P < 0.001$.

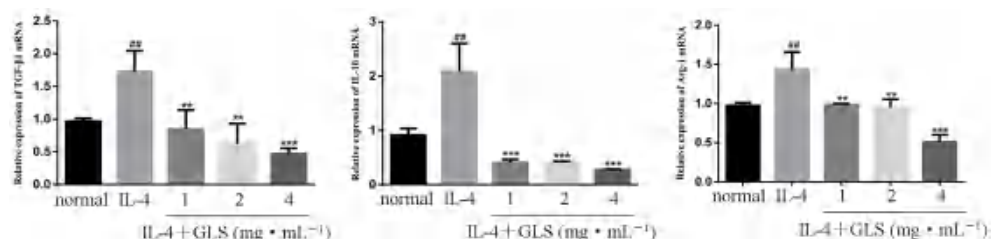


图3 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞中 TGF-β1、IL-10 和 Arg-1 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 3 Effect of Ganoderma lucidum spore powder on TGF-β1, IL-10, and Arg-1 gene expression in RAW264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与正常组相比, $^{###}P < 0.01$; 与 IL-4 组相比, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, $^{###}P < 0.01$; compared with IL-4 group, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

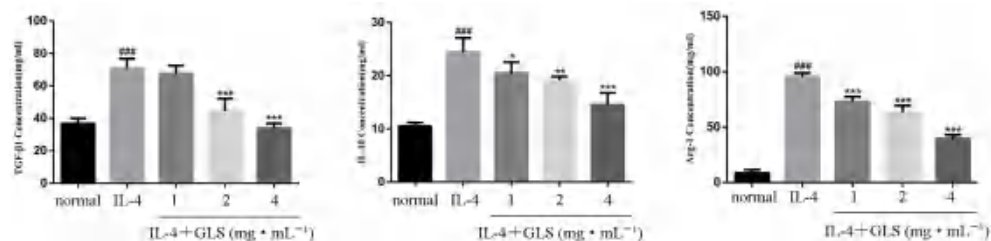


图4 灵芝孢子粉对 RAW264.7 巨噬细胞 TGF-β1、IL-10 和 Arg-1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 4 Effect of Ganoderma lucidum spore powder on TGF-β1, IL-10, and Arg-1 contents of RAW264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与正常组相比, $^{###}P < 0.001$; 与 IL-4 组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, $^{###}P < 0.001$; compared with the IL-4 group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

胞处于动态平衡, 参与抗原吞噬和其他免疫调节过程, 从而在肿瘤等疾病的发展中起关键作用^[14]。肿瘤微环境中的巨噬细胞受到细胞因子、分泌蛋白等刺激, 表现出明显的表型和功能差异^[15-16]。巨噬细胞的极化现象在肿瘤发展中广泛存在, M1 型巨噬细胞通过分泌促炎因子和趋化因子参与机体的炎症反应, M2 型巨噬细胞则是分泌抑制细胞炎症的因子, 抑制炎症, 降低机体免疫反应, 促进肿瘤的转移^[17-18]。既往研究认为巨噬细胞及分泌的细胞因子等与恶性肿瘤的发生发展和预后密切相关, 中药可以通过调节巨噬细胞

胞极化对多种组织来源的肿瘤发挥抑制作用^[19]。

STAT6 途径是细胞因子 IL-4 的常见信号传导途径^[20]。研究表明, IL-4 通过 JAK/STAT6 信号通路可活化 M2 型肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs)。其具体信号通路为: IL-4 和 TAMs 表面的复合体相结合, 将信号传递至下游, 通过 STAT6 抑制 STAT1, 避免向 M1 型 TAMs 活化^[21]。灵芝孢子粉对于提高机体免疫力具有一定作用^[22], 它不但可以激活巨噬细胞、淋巴细胞等, 还可以通过促进细胞因子的生成等途径对机体的免疫系统发挥调控作用^[23]。

灵芝孢子粉对于调节 M1 型巨噬细胞活性的研

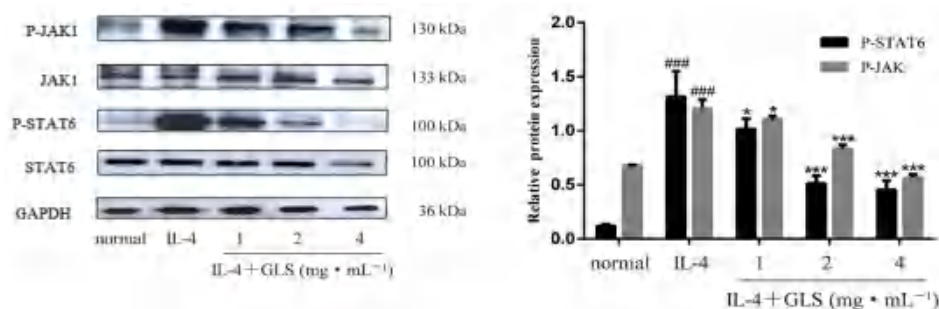


图 5 灵芝孢子粉对巨噬细胞 JAK1/STAT6 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 5 Effect of Ganoderma lucidum spore powder on the expression of JAK1/STAT6 pathway protein in macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与正常组相比, ^{###} $P < 0.001$; 与 IL-4 组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, ^{###} $P < 0.001$; compared with the IL-4 group, ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$.

究已有相关报道, 但对于调节 M2 型巨噬细胞活性的研究报道尚少见。本研究实验结果表明灵芝孢子粉可能通过抑制 JAK1/STAT6 蛋白的磷酸化水平从而抑制 M2 型巨噬细胞的极化, 为后续灵芝孢子粉发挥抗肿瘤作用研究奠定实验基础。

参考文献

- [1] Bader JE, Voss K, Rathmell JC. Targeting metabolism to improve the tumor microenvironment for cancer immunotherapy [J]. Mol Cell, 2020, 78 (6): 1019-1033.
- [2] Baig MS, Roy A, Rajpoot S, et al. Tumor-derived exosomes in the regulation of macrophage polarization [J]. Inflamm Res, 2020, 69 (5): 435-451.
- [3] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas [J]. J Clin Invest, 2012, 122 (3): 787-795.
- [4] Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, et al. Different pathways of macrophage activation and polarization [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2015, 69: 496-502.
- [5] Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. Immunity, 2014, 41 (1): 49-61.
- [6] Yu T, Gan S, Zhu Q, et al. Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24 [J]. Nat Commun, 2019, 10 (1): 4353.
- [7] 王金泗, 张辉, 林彩玲, 等. M2 巨噬细胞分泌的 IL-10 通过 JAK2/STAT3 信号通路调节乳腺癌细胞的增殖、侵袭与凋亡 [J]. 免疫学杂志, 2020, 36 (10): 838-845.
- [8] 袁带秀, 侯娟. 灵芝活性成分、药理作用及其应用 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2006, 79 (2): 110-113.
- [9] Chen Y, Lv J, Li K, et al. Sporoderm-broken spores of Ganoderma lucidum inhibit the growth of lung cancer: involvement of the Akt/mTOR signaling pathway [J]. Nutr Cancer, 2016, 68 (7): 1151-1160.
- [10] Jin X, Ruiz BJ, Sze DM, et al. Ganoderma lucidum (Reishi mushroom) for cancer treatment [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 4 (4): CD007731.
- [11] Chen J, Yu Y. Inhibitory effects of sporederm-broken Ganoderma lucidum spores on growth of lymphoma implanted in nude mouse [J]. Food Funct, 2012, 20 (2): 310-314.
- [12] 胡彦武. 灵芝孢子抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中国药房, 2009, 20 (15): 1196-1198.
- [13] 王筱婧, 徐江平, 程玉芳. 灵芝孢子粉对裸鼠移植性人肝肿瘤血管生成的抑制作用 [J]. 徐州医学院学报, 2006, 26 (2): 115-119.
- [14] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5 (12): 953-964.
- [15] Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, et al. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers [J]. Front Oncol, 2020, 10: 566511.
- [16] Wu K, Lin K, Li X, et al. Redefining tumor-associated macrophage subpopulations and functions in the tumor microenvironment [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1731.
- [17] Palaga T, Wongchana W, Kueanjinda P. Notch signaling in macrophages in the context of cancer immunity [J]. Front Immunol, 2018, 9: 652.
- [18] Zhang W, Chen L, Ma K, et al. Polarization of macrophages in the tumor microenvironment is influenced by EGFR signaling within colon cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7 (46): 75366-75378.
- [19] 王原来, 卞卡, 章丹丹. 肿瘤中巨噬细胞表型极化的调控机制及中药干预的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (2): 180-184.
- [20] Zanganeh S, Spitler R, Hutter G, et al. Tumor-associated macrophages, nanomedicine and imaging: the axis of success in the future of cancer immunotherapy [J]. Immunotherapy, 2017, 9 (10): 819-835.
- [21] Nappo G, Handle F, Santer FR, et al. The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling [J]. Oncogenesis, 2017, 6 (5): e342.
- [22] 宋柏捷, 朱孝娟, 魏丽娜. 灵芝孢子粉对小鼠的免疫调节及抑瘤作用研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44 (5): 464-466.
- [23] 曹娜. 灵芝多糖调节 IL-4 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞活性的研究 [D]. 承德: 承德医学院, 2014.

(收稿日期: 2023-01-11; 修回日期: 2023-02-16)

复合诱导子不同处理时间对丹参毛状根生长和初次生代谢产物积累的影响

李俊伶, 吴家慧, 李堰, 李侯希尔, 张大川, 谭淑婷, 王楠, 王学勇* (北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 考察生物诱导子酵母提取物 (YE) 和非生物诱导子银离子 (Ag^+) 复合诱导子对不同处理时间丹参毛状根生长量和初次生代谢产物积累的综合影响。**方法** 在继代培养 21 d 的丹参毛状根中添加 YE + Ag^+ 复合诱导子, 分别测定诱导后 0、2、4、6、8、10 d 后丹参毛状根的生长量, 采用紫外分光光度法和超高效液相色谱法测定丹参毛状根体内初次生代谢产物的含量。**结果** 在实验浓度条件下, 与空白对照组相比, YE + Ag^+ 对毛状根生长有明显的抑制作用, 且抑制了初生代谢产物总糖和总蛋白的积累。YE + Ag^+ 明显促进了毛状根中次生代谢产物总酚酸类和总丹参酮类的积累, 其中咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、丹参酮 II A 和隐丹参酮含量分别为空白对照组的 2.22、7.47、2.39、32.15、7.65 和 52.89 倍。**结论** YE + Ag^+ 协同作用抑制丹参毛状根的生长, 同时对不同成分的积累具有不同的影响, 抑制初生代谢产物的积累, 促进次生代谢产物的积累。

关键词: 丹参毛状根; 初生代谢产物; 次生代谢产物; 诱导子; 超高效液相色谱法

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1422-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.004

Effect of different treatment time of combined elicitors on the growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots and accumulation of the primary and secondary metabolites

LI Jun-ling, WU Jia-hui, LI Yan, LI Hou-xi'er, ZHANG Da-chuan, TAN Shu-ting, WANG Nan, WANG Xue-yong* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: **Objective** To determine the comprehensive effect of yeast extract (YE) and silver ion (Ag^+) on the growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots and on the accumulation of primary and secondary metabolites at different treatment time. **Methods** After subculture for 21 days, the combination of YE + Ag^+ was added to the *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, and the growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots was measured after 0, 2, 4, 6, 8, and 10 days of induction. The contents of primary and secondary metabolites in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots were determined by ultraviolet spectrophotometer and ultra-high performance liquid chromatography. **Results** At the experimental concentration, YE + Ag^+ had significant inhibition on the growth of hairy roots and the accumulation of total sugar and total protein content of primary metabolites compared with the blank control group (the CK group). YE + Ag^+ significantly promoted the accumulation of total phenolic acids and total tanshinones of secondary metabolites in the hairy roots. The contents of caffeic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B, dihydrotanshinone I, tanshinone II A and cryptotanshinone were 2.22, 7.47, 2.39, 32.15, 7.65 and 52.89 times higher than those of the CK group. **Conclusion** The synergistic effect of YE + Ag^+ affects the growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, and the accumulation of different components, inhibiting the

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81773841); 阿拉伯-伊斯兰医药体系传统草药品种本底梳理与整理项目 (No.2018FY100704)。

作者简介: 李俊伶, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物与分子生药学研究, email: 18340077332@163.com *通信作者: 王学勇, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事国际中药资源研发与分子生药学研究, email: wxypd@163.com

accumulation of primary metabolites and promoting the accumulation of secondary metabolites.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* hairy root; primary metabolite; secondary metabolite; elicitor; ultra-high performance liquid chromatography

丹参是唇形科植物丹参 *Salviae miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 具有活血祛瘀, 通经止痛, 清心除烦, 凉血消痈的功效^[1], 临床上主要用于治疗心脑血管疾病^[2-3]。近年来, 人们越来越关注丹参的质量问题。但目前国内丹参野生资源不断减少, 栽培的丹参品种混杂, 质量极不稳定, 严重限制了丹参产业的发展。中药材的质量主要与原植物的内在遗传因素与外界所处环境有关, 药效成分即次生代谢产物作为评价中药材质量的一个重要指标而备受关注。目前有关丹参品质的研究大多都集中在其次生代谢产物, 脂溶性的丹参酮和水溶性的酚酸类成分上^[4-7]。

毛状根是通过发根农杆菌将外源 DNA 的片段通过其 T-DNA 转移到植物细胞来感染植物。与植物本身的根相比, 毛状根具有生长快、培养期短、合成次生代谢产物能力强等诸多特点, 可以在固体或液体培养基上快速生长, 并且在反复传代培养后其生理和遗传特征可以保持稳定^[8-9]。丹参毛状根常被用作生产大量植物次生代谢产物及合成的机制研究, 是优良的丹参替代材料。

研究证明, 通过添加诱导子来提高植物次生代谢产物含量是一种非常有效的方法^[10-12]。Yan 等^[11]发现 YE 和 Ag⁺能提高丹参毛状根中总酚酸的含量, 王学勇等^[12]发现 YE 和 YE + Ag⁺能提高丹参毛状根中丹参酮类成分的积累, 证明了生物诱导子酵母提取物 (YE) 和非生物诱导子银离子 (Ag⁺) 具有协同作用。植物次生代谢和初生代谢密切相关, 植物初生代谢对于药材品质也至关重要, 而有关丹参初生代谢产物的研究相对缺乏^[4]。一方面, 初生代谢产物为维持植物生长发育和生命活动提供了所必需的前体物质, 如糖类、脂肪、蛋白质等; 另一方面, 次生代谢产物也能对初生代谢产生影响^[13-17]。但以往的研究大多忽略了初次生代谢产物之间的关联与平衡。

在使用诱导子提高丹参次生代谢产物含量方面, 本课题组已有研究基础和发现^[4]。考虑到初生代谢和次生代谢之间的内在关系, 本研究以丹参毛状根为材料, 主要检测了丹参毛状根中初生代谢产物 (总糖和总蛋白) 及次生代谢产物 (总酚酸和总丹参酮) 之间的整体变化, 并用超高效

液相色谱 (UPLC) 法测定了诱导子处理前后丹参毛状根 6 种次生代谢产物的含量变化, 初步探索初生代谢和次生代谢的整体变化, 为探究 YE + Ag⁺诱导子处理下丹参毛状根的代谢活动提供参考, 进而为提高丹参药材品质提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

GL-88B 旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); SIGMA 1-14 高速离心机 (德国 SIGMA); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); 双人单面超净工作台 (苏州苏云净化设备有限公司); TS-211C 恒温摇床 (常州市日天仪器有限公司); HH-4Y 电热恒温水浴锅 (上海启前电子科技有限公司); LMQ-C 型立式灭菌器 (新华牌); UV2800 紫外可见分光光度计 (舜宇恒平); 酶标仪 (Biotek instruments); UPLC Accuracy 系统 (日本岛津公司); 冷冻干燥机 (ALPHA 1-2 LD plus, 德国 Christ); -80℃ 冰箱 (美菱); ME155DU/02 型万分之一电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); SB25-12DTD 型超声波清洗机、SCIENTZ-48 高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

对照品 D (+) - 无水葡萄糖 (批号: S22J12H-137237)、牛血清白蛋白 (批号: Y16J9S52722)、没食子酸 (批号: J05GB153704)、咖啡酸 (批号: M27GB143417)、迷迭香酸 (批号: Y06A9K67402)、丹酚酸 B (批号: P20J10F93457)、二氢丹参酮 I (批号: A09GB144611)、隐丹参酮 (批号: M16GB148633)、丹参酮 II A (批号: J10GB151070) (上海源叶生物科技有限公司, 纯度均大于 98%); 考马斯亮蓝 G250 (批号: S19N9J75319, 上海源叶生物科技有限公司); 酵母提取物 (YE, 批号: 2846115-02, 英国 OXOID); 硝酸银 (AgNO₃, 批号: 20150421)、浓硫酸 (批号: 20171106, 北京化工厂); 5% 苯酚 (批号: 200302, 北京博奥拓达科技有限公司); Folin-酚试剂 (批号: F8060, 索莱宝); 无水乙醇为分析纯 (天津市致远化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯、甲酸为质谱纯 (美国 Fisher 公司); 发根农杆菌 C58C1 由本实验室保存。

2 方法与结果

2.1 丹参毛状根的培养

丹参毛状根由发根农杆菌 C58C1 侵染无菌丹参苗叶片获得^[4], 并置于 6, 7-V 液体培养基^[18]中, 25℃、150 r·min⁻¹摇床上黑暗培养待用。在无菌条件下将 2 g 湿根接种于 300 mL 的 6, 7-V 液体培养基中作为实验材料。

2.2 诱导子的制备

① YE 诱导子用乙醇沉淀法制备, 具体参考文献^[19], 最后将沉淀溶于 40 mL 去离子水中, 115℃灭菌 15 min, 并置于 4℃冰箱备用。② Ag⁺诱导子母液的制备: 称取 AgNO₃ 5.096 g 溶于 100 mL 去离子水, 制备得 300 mmol·L⁻¹的 Ag⁺母液, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 置于 4℃冰箱备用。

2.3 诱导子对丹参毛状根的处理

将丹参毛状根黑暗培养 21 d 后, 加入 100 μL Ag⁺诱导子母液和 3 mL YE 诱导子进行诱导处理, 空白对照组加等量无菌水, 设置 3 次重复。观察

毛状根诱导培养第 0、2、4、6、8、10 日的生长情况, 并测定其鲜重; 于 -80℃冰箱中冷冻后置于冷冻干燥机中冻干, 研磨备用。

2.4 丹参毛状根表型及生长量变化

观察 YE + Ag⁺诱导 (YE + Ag⁺组) 和未被诱导的空白对照组 (CK 组) 的丹参毛状根在诱导培养各时间点的生长情况 (见图 1) 并取样, 蒸馏水冲洗 3 遍, 滤纸吸干, 测定鲜重 (见图 2)。结果表明, 随培养时间增加, 丹参毛状根鲜重先增加后减少, 两组均在培养第 6 日达到峰值后下降, 第 6 日开始丹参毛状根由生长期转向衰老期。但 YE + Ag⁺组丹参毛状根生长量一直低于 CK 组, 在第 8 日差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 这说明 YE + Ag⁺协同诱导显著抑制了丹参毛状根的生长。从诱导培养第 2 日起, 随培养时间增加, YE + Ag⁺组的毛状根表皮色泽及液体培养基颜色比 CK 组明显加深 (见图 1)。

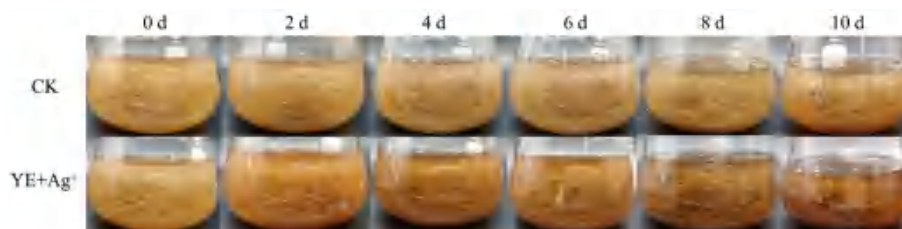


图 1 YE + Ag⁺诱导条件下丹参毛状根生长表型对比变化结果

Fig 1 YE + Ag⁺ elicitors on comparative change of growth phenotype of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots at different induction stages

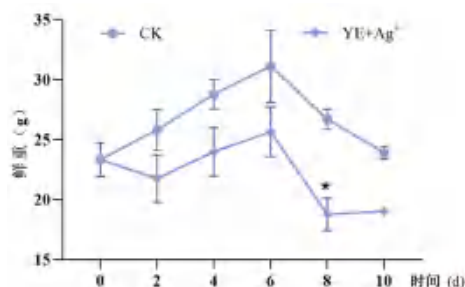


图 2 丹参毛状根鲜重

Fig 2 Fresh weight of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots

注: 与 CK 组比较, * $P < 0.05$ 。

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

2.5 丹参毛状根中初生代谢产物含量测定

2.5.1 总糖含量测定 以 D (+)-无水葡萄糖作为对照品。称取丹参毛状根冻干粉 50.0 mg 于 10 mL 离心管中, 加入 6 mL 80% 的乙醇, 80℃水浴 30 min, 其间不断搅拌, 溶液冷却至室温后 4000 r·min⁻¹离心 10 min, 残渣加入 3 mL 80% 的乙醇重复浸提, 提取液合并定容至 10 mL 备用, 用苯酚-硫酸法^[20]测定总糖含量。YE + Ag⁺处理后丹参毛状根中总糖含量变化见图 3, 在诱导后第 2、4、6、

8 日时 YE + Ag⁺组毛状根总糖含量均低于 CK 组, 第 2、4、8 日时差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组总糖含量均呈现先上升后下降趋势, 但变化趋势不同, CK 组较缓, 在第 4 日达到峰值后持续下降, 至第 10 日出现最低点; 而 YE + Ag⁺组在第 2、8 日的下降和在第 4、6、10 日的上升变化幅度均较大, 在第 6 日出现峰值, 在第 8 日出现最低点, 这说明 YE + Ag⁺可能下调了初生代谢活动。

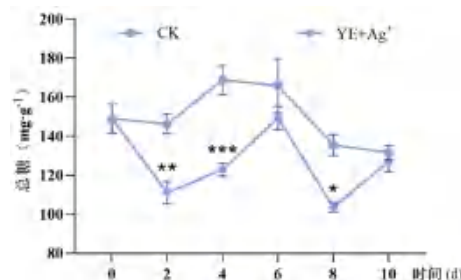


图 3 丹参毛状根不同诱导阶段总糖含量动态变化

Fig 3 Dynamic changes of content of total sugar in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots at different induction stages

注: 与 CK 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the CK group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.5.2 总蛋白含量测定 以牛血清蛋白作为对照品。称取丹参毛状根冻干粉末 50.0 mg, 置研钵中, 与少许石英砂、蒸馏水研磨成匀浆后, 匀浆与清洗液转移并定容至 10 mL 量瓶中, 5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液即为蛋白质提取液。精密量取上清液 0.1 mL 于离心管中, 加入 0.9 mL 蒸馏水和 5 mL 考马斯亮蓝 G250 试剂, 充分混匀, 2 min 后在 595 nm 的波长下检测其吸光度, 以空白调零。结果如图 4 所示, 在诱导后第 2、10 日时 YE + Ag⁺ 组毛状根总蛋白含量低于 CK 组 ($P < 0.05$)。两组均呈现先下降后上升的趋势。与 CK 组相比, YE + Ag⁺ 组在第 8 日达到峰值, 总蛋白含量达 $50.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 随后下降, 而 CK 组持续上升, 在第 10 日差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。这进一步说明了 YE + Ag⁺ 可能对初生代谢活动有下调作用。

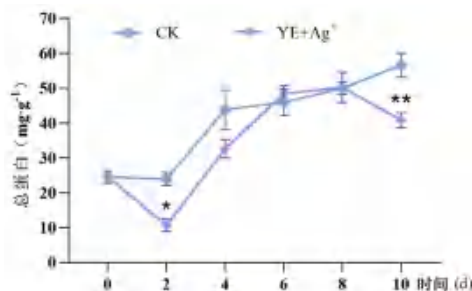


图 4 丹参毛状根不同诱导阶段总蛋白含量动态变化
Fig 4 Dynamic changes of content of total protein in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots at different induction stages

注: 与 CK 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

2.6 丹参毛状根中次生代谢产物含量测定

2.6.1 丹参毛状根次生代谢产物的提取 称取丹参毛状根冻干粉末 20.0 mg, 于 2 mL 离心管中, 加入 75% 甲醇提取液 1 mL 并称重, 30℃、40 kHz 超声提取 1 h, 每 10 min 震荡摇匀一次, 用 75% 甲醇补足重量; 然后 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 将上清液全部转移至新的 2 mL 离心管中; 重复上述步骤将残渣提取两次; 最后合并三次上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 置于 4℃ 冰箱保存, 作为毛状根供试样品提取液。

2.6.2 总酚酸含量测定 以没食子酸作为对照品。取制备的毛状根供试样品提取液 100 μL , 参照 Yan 等^[11] 的方法, 以 Folin-酚法测定总酚酸含量。结果如图 5 所示, 在诱导第 6 日后 YE + Ag⁺ 组毛状根的总酚酸含量高于 CK 组 ($P < 0.01$)。在第 8 日时, YE + Ag⁺ 组总酚酸含量达到峰值 $37.32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 是 CK 组的 2.14 倍。两组都呈现先下降

后上升再下降的趋势, 但 YE + Ag⁺ 组总酚酸含量变化幅度更大, 变化趋势更快, 这表明 YE + Ag⁺ 对于次生代谢活动总酚酸的积累有促进作用。

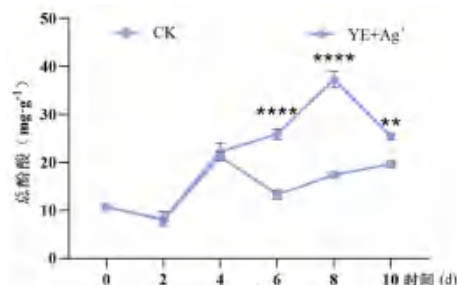


图 5 丹参毛状根不同诱导阶段总酚酸含量动态变化

Fig 5 Dynamic changes of content of total phenolic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots at different induction stages

注: 与 CK 组比较, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

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

2.6.3 总丹参酮含量测定 以丹参酮 II A 作为对照品。取样品提取液, 测定其在 268 nm 下的吸光度, 以样品提取液为空白对照。结果如图 6 所示, 在诱导后第 4、6 日时 YE + Ag⁺ 组毛状根的总丹参酮含量显著高于 CK 组 ($P < 0.01$), 在第 8 日, YE + Ag⁺ 组总丹参酮含量达到峰值 $94.65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。两组都呈现先下降后上升的趋势, 且 YE + Ag⁺ 组变化趋势更快, 这可能与 YE + Ag⁺ 上调毛状根中次生代谢活动总丹参酮的积累有关。

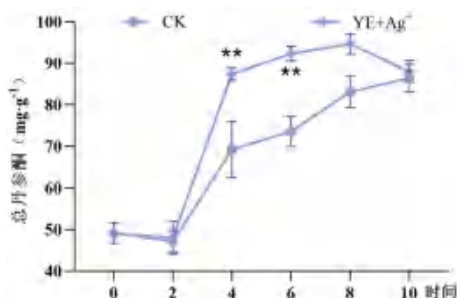


图 6 丹参毛状根不同诱导阶段总丹参酮含量动态变化

Fig 6 Dynamic changes of content of total tanshinone in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots at different induction stages.

注: 与 CK 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the CK group, ** $P < 0.01$ 。

2.6.4 酚酸类成分和丹参酮类成分含量的测定

① 色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱 Waters CORTECS UPLC C18 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.6 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱 (0~3 min, 5%~20%B; 3~15 min, 20%~30%B; 15~16 min, 30%~40%B; 16~27 min, 40%~50%B; 27~31 min, 50%~70%B; 31~34 min, 70%~100%B; 34~38 min, 100%B; 38~41

min, 100% ~ 5%B; 41 ~ 45 min, 5%B); 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $2 \mu\text{L}$, 柱温 35°C , 样品管理器温度 4°C , 检测波长为 270 nm 。在此色谱条件下, 咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II A 与样品中其他成分分离度均大于 1.5, 理论塔板数不低于 5000。样品和对照品 UPLC 色谱图见图 7。

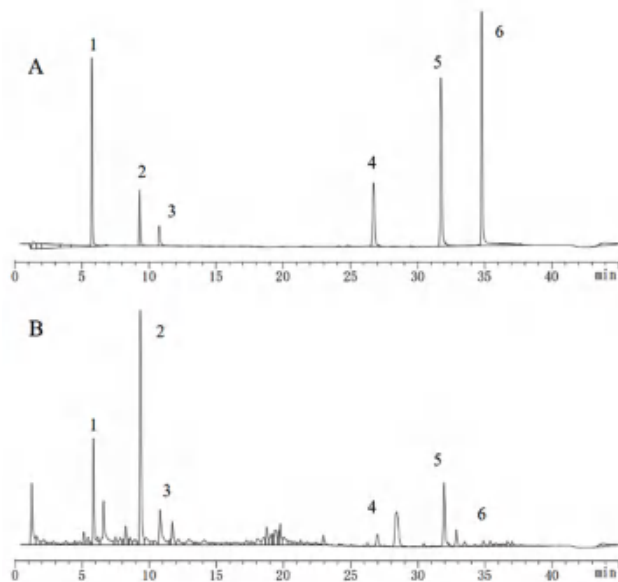


图 7 丹参毛状根的 UPLC 色谱图

Fig 7 UPLC chromatogram of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots

A. 混合对照品 (mixed reference solution); B. 供试品 (sample); 1. 咖啡酸 (caffeic acid); 2. 迷迭香酸 (rosmarinic acid); 3. 丹酚酸 B (salvianolic acid B); 4. 二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I); 5. 隐丹参酮 (cryptotanshinone); 6. 丹参酮 II A (tanshinone II A)

② 混合对照品溶液的制备: 分别取对照品咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 适量, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶, 加入 75% 甲醇超声溶解并定容, 制成质量浓度分别为 650 、 520 、 480 、 320 、 500 、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品储备液, 备用。分别精密量取上述对照品储备液各 1 mL , 置同一 10 mL 量瓶中, 加 75% 甲醇至刻度混匀, 得到咖啡酸 $65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、迷迭香酸 $52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丹酚酸 B $48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、二氢丹参酮 I $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、隐丹参酮 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丹参酮 II A $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

③ 标准曲线的制备: 精密吸取咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 各对照品储备液, 以 75% 甲醇配制成不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 进样测定。以峰面积 (y) 为纵坐标, 质量浓度为横坐标 (x), 用外标两点法计算并绘制标准曲线, 进行

线性回归分析, 结果见表 1, 6 种成分在相应线性范围内与峰面积线性关系良好。

表 1 6 种成分的回归方程、线性范围及相关系数

Tab 1 Regression equation, linearity and correlation coefficients of 6 components

化合物	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r
咖啡酸	$y = 2.33 \times 10^4 x - 1.040 \times 10^4$	3.25 ~ 65	0.9997
迷迭香酸	$y = 1.13 \times 10^4 x + 8.03 \times 10^3$	6.25 ~ 1000	0.9999
丹酚酸 B	$y = 9.761 \times 10^3 x - 3.02 \times 10^5$	7.5 ~ 600	0.9993
二氢丹参酮 I	$y = 3.60 \times 10^4 x - 1.778 \times 10^3$	0.075 ~ 9	0.9999
隐丹参酮	$y = 4.94 \times 10^4 x - 8.593 \times 10^3$	0.0625 ~ 25	0.9994
丹参酮 II A	$y = 4.81 \times 10^4 x - 64.49$	0.0625 ~ 5	0.9995

④ 精密度试验: 精确吸取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 测得咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积 RSD 值分别为 0.48%、0.96%、0.66%、0.52%、0.53%、0.47%, 表明仪器精密度良好。

⑤ 稳定性试验: 精密吸取“2.6.1”项下一份毛状根供试样品提取液 (样品编号: Y-10), 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样检测。计算得咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积的 RSD 值分别为 0.84%、0.31%、1.2%、0.20%、0.15%、0.91%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

⑥ 重复性试验: 称取丹参毛状根样品粉末 (样品编号: Y-10) 6 份, 按照“2.6.1”项下方法制备供试品溶液, 进样检测。计算得咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积的 RSD 值分别为 1.3%、0.81%、1.8%、0.61%、0.40%、0.93%, 表明该方法重复性良好。

⑦ 加样回收试验: 称取丹参毛状根样品粉末 (样品编号: Y-10), 精密称定约 20.0 mg , 每份加入等量的 6 份混合对照品溶液, 按照“2.6.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II A 的平均加样回收率为 99.53%、99.26%、100.29%、98.48%、100.28%、98.98%; RSD 分别为 1.1%、0.84%、1.7%、0.37%、0.80%、0.45%。表明该方法的回收率良好。

⑧ 样品含量测定: 取不同诱导时间下的丹参毛状根样品粉末, 按“2.6.1”项下方法制备成供试品溶液, 进样测定, 计算出各时间点下丹参毛状根中 6 种成分的含量, 用折线统计图表示含量

动态变化, 结果见图 8。YE + Ag⁺诱导条件下, 咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、丹参酮 II A 5 种成分变化趋势基本一致, 在第 6 日出现下降后第 8 日骤升, 而隐丹参酮含量随诱导时间一直上升。并且 YE + Ag⁺组各成分除了

丹酚酸 B 在第 6 日出现短暂下降至 CK 组水平以下外, 其余成分在各个时间点均显著高于 CK 组, ($P < 0.01$), 证明添加 YE + Ag⁺诱导子以后, 毛状根的次生代谢活动加强, 促进了次生代谢产物的积累。

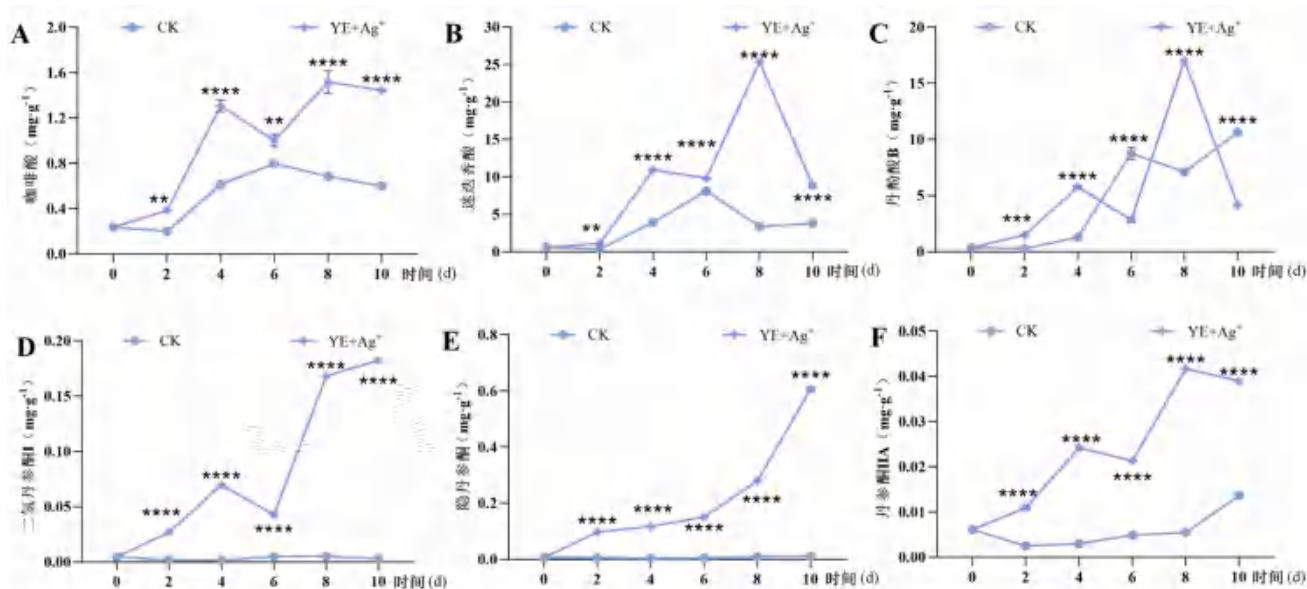


图 8 丹参毛状根不同诱导阶段 6 种次生代谢产物含量动态变化变化。

Fig 8 Dynamic changes of content of 6 secondary metabolites in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots at different induction stages

A. 咖啡酸 (caffeic acid); B. 迷迭香酸 (rosmarinic acid) C. 丹酚酸 B (salvianolic acid B); D. 二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I); E. 隐丹参酮 (cryptotanshinone); F. 丹参酮 II A (tanshinone II A)

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

3 讨论

3.1 YE + Ag⁺处理对丹参毛状根中次生代谢产物积累的影响

YE + Ag⁺诱导促使丹参毛状根体内酚酸类和丹参酮类积累量增加, 且总体呈上升趋势, 这与文献结果一致^[9-10]。丹参毛状根在培养过程中经 YE + Ag⁺处理不同时间后, 咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、丹参酮 II A 5 种次生代谢产物含量均在 YE + Ag⁺处理第 8 日左右达到峰值, 其产量分别提高为 CK 组的 2.22、7.47、2.39、32.15 和 7.65 倍。而 YE + Ag⁺组的隐丹参酮含量持续上升, 在诱导培养第 10 日, 达到 52.89 倍, 是增长量最高的成分。这表明 YE + Ag⁺是促进丹参毛状根中次生代谢产物积累的有效诱导因子。

3.2 YE + Ag⁺处理对丹参毛状根中初次生代谢产物的整体变化关系

本实验探讨了 YE + Ag⁺处理下丹参毛状根生长量与其体内初次生代谢产物积累之间的整体关系。YE + Ag⁺处理整体抑制了丹参毛状根的

生长, 引起丹参毛状根体内初生代谢产物总糖和总蛋白含量的下降, 但促进了次生代谢产物含量的增加, 且次生代谢产物含量的增加发生于初生代谢产物含量积累之后, 这说明初生代谢产物和次生代谢产物处于动态平衡的状态。这表明植物的初生代谢过程与次生代谢过程密切相关。

随培养时间的增加, 丹参毛状根色泽逐渐加深, 生长量逐渐增加, CK 组和 YE + Ag⁺组均在第 6 日达到峰值, 与此同时 YE + Ag⁺组总糖含量也达到峰值, 总蛋白含量随后在第 8 日达到峰值; 但是其次生代谢产物咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、丹参酮 II A 在第 6 日均有不同程度的下降, 并且总酚酸和总丹参酮含量在第 6 日增长趋势变缓。丹参毛状根生长量在培养第 8 日骤降, 总糖含量也骤降, 总蛋白含量在第 8 日峰值后也骤降; 但总酚酸和总丹参酮以及咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、丹参酮 II A 5 种次生代谢产物均在第 8 日达到峰值。以上结果表明, 丹参毛状根的初生代谢物和次生代谢物呈现出一种“此消彼涨”的动态变化过程。

3.3 小结

本实验结果进一步表明生物和非生物诱导子 YE + Ag⁺ 联合使用能有效促进丹参毛状根体内酚酸类和丹参酮类成分的积累。在此基础上, 初步分析了丹参毛状根体内初生代谢和次生代谢之间的整体变化关系。由于本研究检测的代谢产物有限, 仅能部分揭示初次生代谢活动规律, 未来还需要更多的数据来支持和探索植物体内初次生代谢活动。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 77.
- [2] 边丽华, 邹琳, 周冰谦, 等. 稀土元素钕与丹参毛状根中活性成分及其生物合成中关键酶的量效关系[J]. 中国现代中药, 2017, 19(3): 387-392.
- [3] 杨志霞, 林谦, 马利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 93-114.
- [4] Xu WJ, Jin XY, Luo LL, et al. Primary and secondary metabolites produced in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by an endophytic fungal elicitor from *Mucor fragilis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 160: 404-412.
- [5] Ma XH, Ma Y, Tang JF, et al. The Biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Molecules, 2015, 20(9): 16235-16254.
- [6] Liu AH, Li L, Xu M, et al. Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method-ScienceDirect [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(1): 48-56.
- [7] Wang X, Han C, Qin JJ, et al. Pretreatment with *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides protects from lipopolysaccharides/d-galactosamine-induced liver injury in mice through inhibiting TLR4/MyD88 signaling pathway [J]. J Interferon Cytokine Res, 2019, 39(8): 495-505.
- [8] Moyano E, Fornalé S, Palazón J, et al. Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the *pmt* gene [J]. Phytochemistry, 2002, 59(7): 697-702.
- [9] Maistrenko OM, Luchakivska YS, Zholobak NM, et al. Obtaining of the transgenic *Heliantus tuberosus* L. plants, callus and hairy root cultures able to express the recombinant human interferon *alpha-2b* gene [J]. Tsitol Genet, 2015, 49(5): 38-44.
- [10] 张金家, 谈荣慧. 诱导子对丹参毛状根丹酚酸类化合物积累的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(5): 91-94.
- [11] Yan Q, Shi M, Ng J, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Sci, 2006, 170(4): 853-858.
- [12] 王学勇, 崔光红, 黄璐琦, 等. 诱导子对丹参毛状根中丹参酮类成分积累影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 976-978.
- [13] 董娟娥, 张康健, 梁宗锁. 植物次生代谢与调控[M]. 咸阳: 西北农林科技大学出版社, 2009.
- [14] 刘思琦, 刘春生, 王学勇, 等. 不同产地丹参中淀粉与有效成分含量的比较[J]. 中国医药导报, 2015, 12(9): 125-129.
- [15] 王春丽. 丹参中次生物质积累与可溶性糖代谢及激素关系的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012, 43.
- [16] 阎岩. 微生物对丹参毛状根生长和次生代谢的影响及其机制[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014.
- [17] 吴发明, 蔡晓洋, 陈辉, 等. 麦冬块根发育过程中主要化学组分积累动态研究[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(7): 533-537.
- [18] 张夏楠, 崔光红, 蒋喜红, 等. 丹参转基因毛状根离体培养体系的建立及分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2257-2261.
- [19] Ge XC, Wu JY. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor [J]. Plant Sci, 2005(2): 168.
- [20] 张顺仓, 刘岩, 沈双, 等. 诱导子对丹参毛状根酚酸类和丹参酮类成分积累的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1269-1274.

(收稿日期: 2023-02-21; 修回日期: 2023-04-19)

桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的潜在作用机制与药效物质基础研究

张嘉宁¹, 任越¹, 王梓安¹, 李莹莹¹, 李纯², 常华², 张燕玲^{1*} (1. 北京中医药大学 中药学院 国家中医药管理局中药信息工程重点实验室 中药制药与新药开发关键技术教育部工程研究中心, 北京 102488; 2. 广西中药新药研发中心, 广西 桂林 541004)

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接以及体外实验探讨桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的潜在作用机制及物质基础。**方法** 收集桂林西瓜霜的成分及靶标, 与口腔溃疡的疾病靶标取交集, 并进行拓扑及 KEGG 分析。选择关键靶标与活性成分进行分子对接以发现桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的潜在物质基础。体外实验基于一氧化氮 (NO) 释放量、中性红吞噬作用、免疫荧光实验验证桂林西瓜霜的抗炎以及免疫调节作用, 并进一步对关键靶标及物质基础进行验证。**结果** 共获得交集靶标 126 个。KEGG 结果表明桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的机制与抗炎、调节免疫等相关, 其中, C 型凝集素受体、PI3K-Akt 等信号通路可能为主要作用途径, 原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、肿瘤坏死因子 (TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等可能是关键靶标。分子对接结果发现桂林西瓜霜中的射干、大黄等中药所包含的木犀草素、谷甾醇等活性成分可能为治疗口腔溃疡的潜在物质基础。体外实验验证结果发现桂林西瓜霜可促进 RAW264.7 细胞释放 NO, 同时抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO; 增强 RAW264.7 细胞吞噬能力, 促进 RAW264.7 细胞向 M1 型极化, 并可调节 SRC、TNF、VEGFA mRNA 的表达量。药效实验结果显示射干、大黄等中药可能通过改变正常以及脂多糖诱导条件下 RAW264.7 细胞 NO 的释放量以发挥抗炎及免疫调节的作用。**结论** 桂林西瓜霜通过多成分、多靶点、多通路协同作用抑制口腔溃疡的发生发展, 可为今后临床进一步探讨桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的机制及物质基础提供理论依据, 并指导其二次开发。

关键词: 桂林西瓜霜; 口腔溃疡; 作用机制; 物质基础

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1429-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.005

Potential mechanism and pharmacodynamic substance of Guilin Xiguashuang for the treatment of oral ulcer

ZHANG Jia-ning¹, REN Yue¹, WANG Zi-an¹, LI Ying-ying¹, LI Chun², CHANG Hua², ZHANG Yan-ling^{1*} (1. Key Laboratory of TCM-information Engineering of State Administration of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Guangxi Research Center for Traditional Chinese Medicine, Guilin Guangxi 541004)

Abstract: Objective To determine the potential mechanism and pharmacodynamic substance of Guilin Xiguashuang against oral ulcer based on network pharmacology, molecular docking, and in vitro experiments. **Methods** The components and potential targets of Guilin Xiguashuang were collected, and their intersections with disease targets of oral ulcer were analyzed by topology and KEGG. The key targets were selected for molecular docking with active components to determine the potential pharmacodynamic substance. Finally, the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Guilin Xiguashuang were verified based on nitric oxide (NO) release, neutral red phagocytosis and immunofluorescence, and the key targets and pharmacodynamic substance were further verified. **Results** Totally 126 targets were obtained by mapping the drug targets and disease

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82073996); 桂林西瓜霜制剂作用机制解析研究 (No.BUCM-2021-JS-FW-017)。

作者简介: 张嘉宁, 女, 硕士研究生, 主要从事中药信息学研究, email: zzzhangjianing@163.com * **通信作者:** 张燕玲, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药物设计与优化、中药信息学研究, email: zhangyanling@bucm.edu.cn

targets. The mechanism of Guilin Xiguashuang for oral ulcer was related to the anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Among them, C-type lectin, PI3K-Akt and other signaling pathways might be the main pathways; proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC), tumor necrosis factor (TNF), and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) might be the key targets. Luteolin, sitosterol and other active components in traditional Chinese medicine such as *belamcandae rhizoma* and *rhei radix et rhizoma* might be the potential effective pharmacodynamic substances for oral ulcer. In vitro validation showed that Guilin Xiguashuang promoted NO release from RAW264.7 cells and inhibited NO release from lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. It also enhanced the phagocytic ability, promoted the polarization of RAW264.7 cells to M1 type, and regulated the expression of *SRC*, *TNF* and *VEGFA* mRNA. The pharmacodynamic results showed that *belamcandae rhizoma* and *rhei radix et rhizoma* may exert anti-inflammatory and immunomodulatory effects by changing the release of NO from RAW264.7 cells under normal and lipopolysaccharide conditions.

Conclusion Guilin Xiguashuang can inhibit the occurrence and development of oral ulcer through the synergistic effect multi-components, multi-targets and multi-pathways, which provides a theoretical basis for further research on the mechanism and pharmacodynamic substance of Guilin Xiguashuang for oral ulcer, and possible second development.

Key words: Guilin Xiguashuang; oral ulcer; mechanism; pharmacodynamic substance

口腔溃疡是临床上常见的一种口腔黏膜疾病,以周期性、自限性、复发性为主要特点,具有较高的发病率^[1-4]。溃疡周围黏膜呈白色过角化,外形不规则,深浅不一致,发作时黏膜疼痛剧烈,难以进食、沟通困难,严重影响患者的生活质量^[5]。中医认为,口腔溃疡多因心脾积热或阴虚火旺熏灼而起。因此临床常用具有清热解毒、燥湿泻火等功的中药治疗口腔溃疡^[6-7]。

桂林西瓜霜制剂由西瓜霜、煅硼砂、黄芩、黄连、大黄、黄柏、山豆根、射干、青黛、浙贝母、冰片、薄荷脑、无患子果(炭)、甘草 14 味中药组成,具有清热解毒、消肿止痛、清音润喉的功效,临床上常用于治疗口腔溃疡。其药性平和,疗效显著,多年来稳居咽喉类用药综合第一品牌地位。现代药理学研究表明桂林西瓜霜制剂可能通过抗炎、抑菌、促进创面愈合、镇痛等作用治疗口腔溃疡^[8-11],但其作用机制及物质基础尚不明确。因此,本研究拟通过网络药理学探讨桂林西瓜霜对口腔溃疡的潜在作用机制,并利用分子对接和体外实验发现并验证其物质基础,为桂林西瓜霜应用于口腔溃疡的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 (中国协和医科大学基础医学研究所)。

1.2 试药

桂林西瓜霜药粉(批号: 210205)、射干(批号: 201003)、甘草(批号: 201203)、黄芩(批号: 201201)、大黄(批号: 201102)、黄柏(批号:

201101)、山豆根(批号: 201201)粉末(广西中药新药研发中心)。DMEM 高糖培养基(Corning 公司); 特级胎牛血清(BI 公司); 青霉素、链霉素(Gibco 公司); MTT 粉末(Amresco 公司); 一氧化氮(NO)检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司); 反转录试剂盒、荧光定量试剂盒(TaKaRa 公司); CD86 多克隆抗体、CD206 单克隆抗体(Proteintech 公司)。脂多糖(LPS, SIGMA 公司); 牛血清白蛋白(BSA, 上海翊圣生物公司); 多聚甲醛(LabLead 公司)。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱(Thermo Scientific 公司, 型号 FormaTM 系列 II 3110); 倒置显微镜(Leica 公司, 型号 DMi1)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学研究

2.1.1 药效及机制解析 本研究利用 TCMSP 数据库获取桂林西瓜霜的活性成分, 利用 SwissTargetPrediction 数据库预测潜在作用靶标, 并基于相关文献进行补充。利用 OMIM、GeneCards、DisGeNET 数据库获取口腔溃疡相关疾病靶标。将药物靶标及疾病靶点取交集, 共获得 126 个交集靶标, 并导入 Metascape 数据库对其进行 KEGG 分析。选取前 15 条通路绘制“中药-成分-靶点-通路”网络图, 见图 1。提示潜在作用通路可能为 AGE-RAGE 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等, 与抗炎、调节免疫、促进创伤愈合等药效高度相关。

2.1.2 潜在药效物质基础的发现 将交集靶标通过 Cytoscape 计算度值(degree), 发现原癌基因酪氨

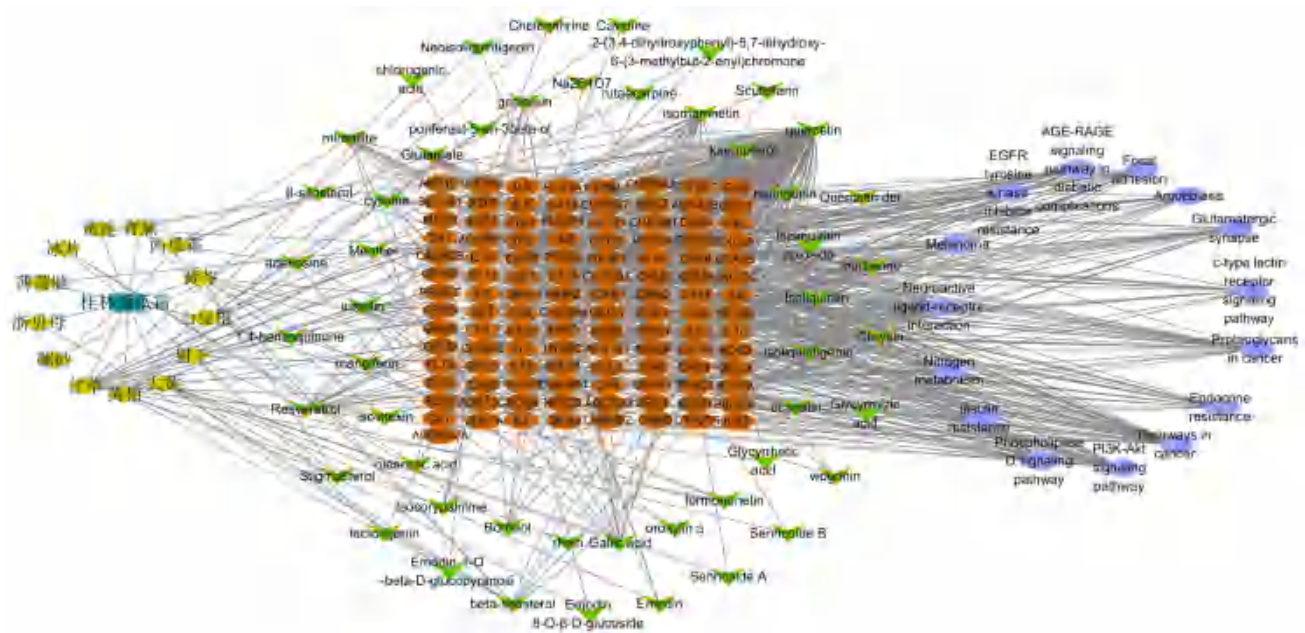


图 1 桂林西瓜霜的中药-成分-靶标-通路网络图

Fig 1 Traditional Chinese medicine-component-target-pathway network of Guilin Xiguashuang

酸蛋白激酶 (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 等可能是桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的关键靶点。选择 TNF 以及 SRC 进行分子对接。以原配体的打分值作为截断值, 筛选具有较高活性的活性化合物^[12], 并对其来源中药进行溯源, 结果见表 1 及图 2。木犀草素、谷甾醇等可能为桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的核心成分, 且主要来源于射干、甘草等中药, 推测桂林西瓜霜中的射干、甘草、黄芩、大黄、黄柏、山豆根可能是治疗口腔溃疡的关键中药。

2.2 统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.3 体外实验验证

2.3.1 中药提取液的制备 分别称取桂林西瓜霜、射干、甘草、黄芩、大黄、黄柏、山豆根粉末各 300 mg, 分别加入 300 mL PBS 溶解, 100 μ L DMSO 增溶^[13], 涡旋混匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 置 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.2 细胞培养及模型建立 RAW264.7 细胞加入培养基 (89%高糖 DMEM 培养基+ 10%胎牛血清+ 1%青链霉素), 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养。细胞密度为 80% 时进行传代。炎症模型的建立由含 50 ng $\cdot$ mL⁻¹ 脂多糖 (LPS) 的 DMEM 培养基制成炎症诱导液诱导 24 h。

2.3.3 中药提取物毒性评价 RAW264.7 细胞以

表 1 活性成分分子对接及溯源结果			
Tab 1 Molecular docking and traceability of active components			
成分名称	- CDOCKER ENERGY (TNF)	- CDOCKER ENERGY (SRC)	来源
木犀草素	28.5058	41.1191	射干
鼠李素	22.9481	40.7296	射干
大黄酸	25.3259	38.9681	大黄
黄芩素	26.8355	38.1128	黄芩
反 - 二十碳烯酸	28.4405	37.6041	甘草
大黄酒	22.1585	35.5004	大黄、山豆根
柚皮素	—	33.3291	甘草
甘草素	21.3571	33.1725	甘草
白杨素	22.4341	32.3030	黄芩、黄柏
千层纸素 A	—	32.2431	黄芩
刺槐素	—	31.6330	黄芩
谷甾醇	27.5616	31.2196	甘草、黄芩
2AZ5	20.2350	—	TNF 原配体
1YOL	—	29.6705	SRC 原配体

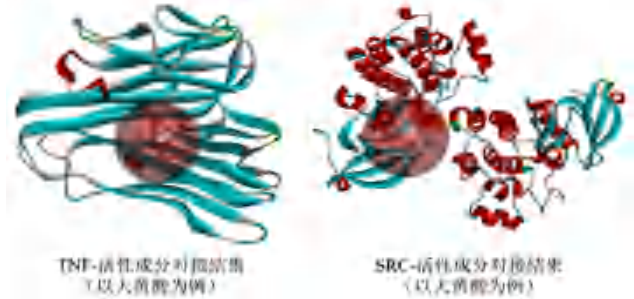


图 2 关键靶标分子对接模式

Fig 2 Key target molecular docking model

60 000 个 / 孔的细胞密度接种于 96 孔板中。孵育 24 h 后将细胞分为对照组, 模型组及药物组。对照组加入完全培养基, 模型组加入 50 ng $\cdot$ mL⁻¹ LPS

溶液。给药组加入 6 个浓度梯度的药物培养基,以考察 LPS 及各中药提取物对 RAW264.7 细胞活性的影响。孵育 24 h 后加入 MTT 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),再孵育 4 h 后弃去上清液,加入 DMSO 溶液。在 490 nm 波长处测量其吸光度,并计算各组细胞的存

活率。结果显示,与对照组及模型组相比,质量浓度为 $15.7 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的各中药提取液对细胞存活率无显著影响,见图 3。因此研究在此浓度范围内进行后续药效评价及验证。

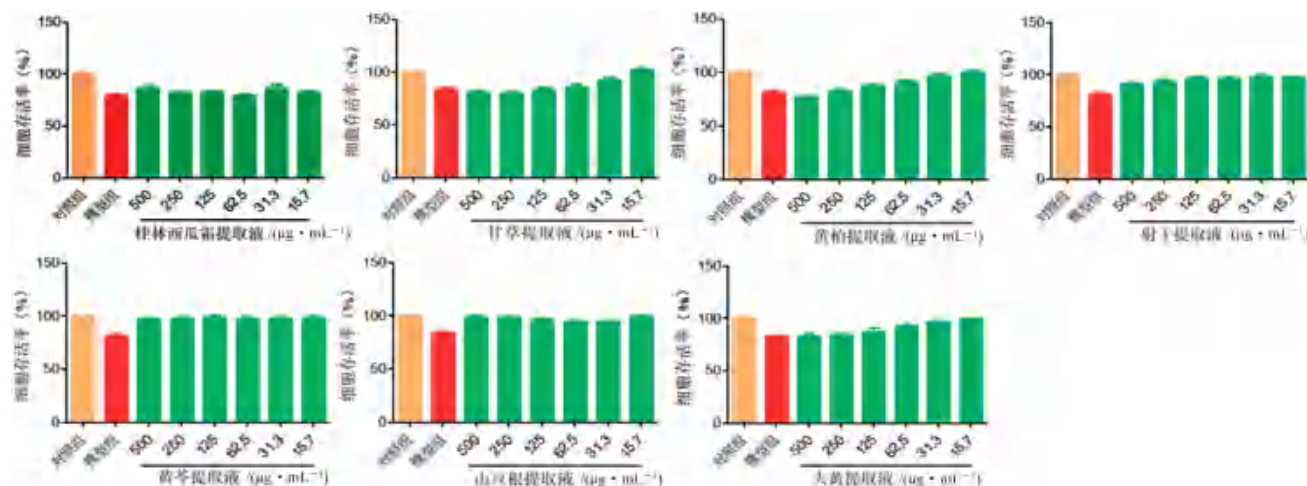


图 3 各中药提取液对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Fig 3 Effect of each traditional Chinese medicine on the survival rate of RAW264.7 cells

2.3.4 桂林西瓜霜药效及分子机制验证

① 桂林西瓜霜对 NO 释放的影响: 为明确桂林西瓜霜的抗炎及免疫调节作用,将桂林西瓜霜分别作用于正常条件以及 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞,并以 NO 释放量表征^[14-15]。桂林西瓜霜直接作用于 RAW264.7 细胞时,将细胞分为对照组和药物组。对照组加入完全培养基,药物组加入浓度梯度的桂林西瓜霜提取液。采用 NO 检测试剂盒测定 NO 释放量。结果显示,桂林西瓜霜在 $250 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内可显著促进 RAW264.7 细胞释放 NO。对于 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞,将细胞分为对照组、模型组和药物组。对照组加入完全培养基,模型组加入 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 溶液,药物组加入 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 和浓度梯度的中药提取物混合液。检测其 NO 释放量发现桂林西瓜霜在 $250 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内可抑制其 NO 的释放,结果见图 4。提示桂林西瓜霜具有抗炎及免疫调节的双向调节作用。

② 桂林西瓜霜对细胞吞噬能力的影响: 药物干预 RAW264.7 细胞后,加入 $100 \mu\text{L}$ 中性红溶液, 37°C 孵育 1 h,加入细胞裂解液 (乙醇和 0.01% 乙酸 = 1 : 1) 裂解细胞,测其吸光度并计算吞噬率。结果见图 5,桂林西瓜霜提取物在 $62.5 \sim 250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,随着质量浓度的增高,其吞噬率随之增大。且在 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与对照组比较吞噬率差异具有统计学意义。

③ RT-qPCR 法检测关键靶标的表达: 对“2.1.2”

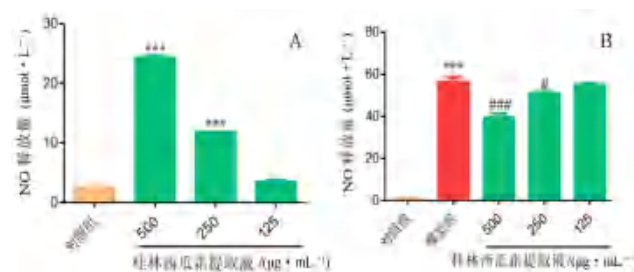


图 4 桂林西瓜霜对 RAW264.7 细胞 (A) 及 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 (B) NO 释放量的影响

Fig 4 Effect of Guilin Xiguashuang on NO release in RAW264.7 cells (A) and LPS-induced RAW264.7 cells (B)

注: 与对照组比较, $***P < 0.001$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$ 。

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

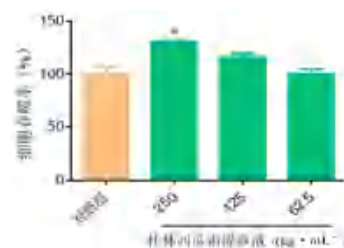


图 5 桂林西瓜霜对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响

Fig 5 Effect of Guilin Xiguashuang on phagocytic activity in RAW264.7 cells

注: 与对照组比较, $^{\ast}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $^{\ast}P < 0.05$.

得到的关键靶标 TNF、SRC 以及 VEGFA 进行验证。研究采用 TRIzol 法提取总 RNA,使用反转录

试剂盒进行反转录,采用荧光定量试剂盒定量检测关键靶标在 RAW264.7 细胞的表达量,引物序列见表 2。结果如图 6 所示,与对照组相比,桂林西瓜霜提取液在 125 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内可显著上调 RAW264.7 细胞的 *TNF*、*VEGFA* 及 *SRC* mRNA 的表达量。而在 LPS 诱导后,RAW264.7 细胞中 *TNF*

及 *VEGFA* mRNA 的表达量上调,桂林西瓜霜在 125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可降低 *TNF* mRNA 的表达量,在 125 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内显著抑制 *VEGFA* mRNA 的表达。推测桂林西瓜霜可通过作用于 *TNF*、*SRC*、*VEGFA* 发挥相应的抗炎及调节免疫的作用,缓解口腔溃疡的疾病进程。

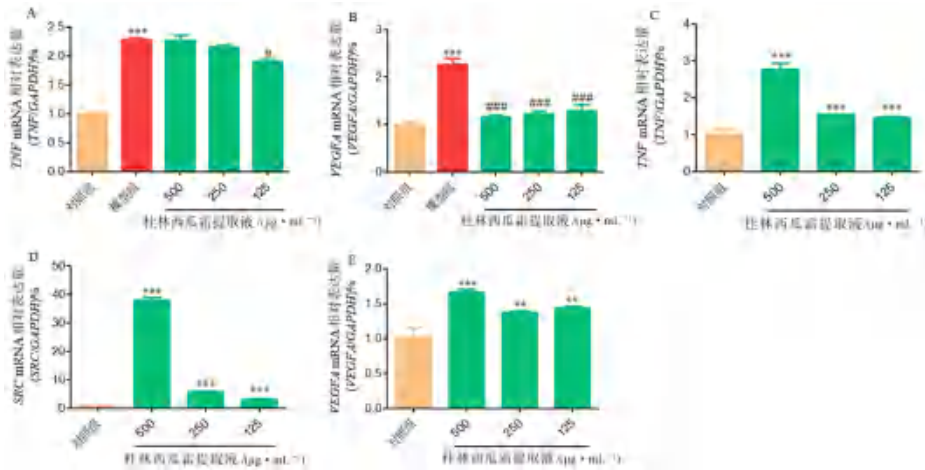


图 6 桂林西瓜霜对 RAW264.7 细胞对 *TNF*、*SRC*、*VEGFA* mRNA 表达的影响

Fig 6 Effect of Guilin Xiguashuang on *TNF*, *SRC*, and *VEGFA* mRNA expression in RAW264.7 cells

A、B. LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 (LPS-induced RAW264.7 cells); C ~ E. RAW264.7 细胞 (RAW264.7 cells)

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。

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

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	正向引物	反向引物
<i>GAPDH</i>	TCACATCTTCCAG- GAGCGAGAC	TGAGCCCTTCCACAATGC- CAAAG
<i>SRC</i>	TCACCGCCTCACTAC- CGTATGTC	CATCCACACCTCTCCGAAG- CAAC
<i>TNF</i>	CGCTCTTCTGTC- TACTGAACCTTCGG	GTGGTTTGTGAGTGTGAGG- GTCTG
<i>VEGFA</i>	GGGCTCTTCTCGCTC- CGTAGTAG	CCCTCTCTCTTCCTTC TCTTCTC

④ 桂林西瓜霜对 RAW264.7 细胞极化的影响:通过免疫荧光实验检测 M1 型巨噬细胞标记物 CD86 和 M2 样巨噬细胞标记物 CD206 的表达。RAW264.7 细胞经药物孵育后,4%多聚甲醛固定 15 min。用 0.1%的 Triton X-100 通透 15 min,加入 5%的 BSA 在室温下作用 1 h。随后,用 CD86 多克隆抗体 (1:500 稀释) 和 CD206 单克隆抗体 (1:500 稀释) 在 4℃下孵育过夜。加入二抗 (羊抗兔和羊抗小鼠) 作用 1 h 后,使用 Hoechst 染色 20 min,在荧光显微镜下观察。结果见图 7,桂林西瓜霜可使 RAW264.7 细胞中 CD86 表达上调,对 CD206 的表达无影响。提示桂林西瓜霜可促进 RAW264.7 细胞向 M1 极化。

2.3.5 潜在物质基础药效验证 已有研究表明木

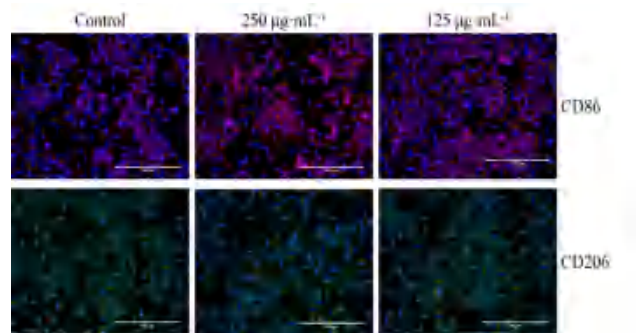


图 7 桂林西瓜霜对 RAW264.7 细胞极化的影响

Fig 7 Effect of Guilin Xiguashuang on polarization in RAW264.7 cells

犀草素、谷甾醇、大黄酸、白杨素等活性成分具有显著的抗炎、调节免疫、促进创伤愈合等作用^[16-20],因此本研究对其进行验证。

① RAW264.7 细胞的 NO 释放量:按照“2.3.4”项下方法检测正常条件下 RAW264.7 细胞的 NO 释放量。与对照组相比,125 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甘草、大黄、射干、黄柏作用于 RAW264.7 细胞时,NO 释放量可显著增加,山豆根在 250 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内可显著性地刺激 RAW264.7 细胞释放 NO;黄芩对 NO 释放量无影响,见图 8。结果提示甘草、大黄、射干、黄柏、山豆根刺激 RAW264.7 细胞释放 NO,导致正常巨噬细胞诱发炎症反应,参与机体免疫调节过程。

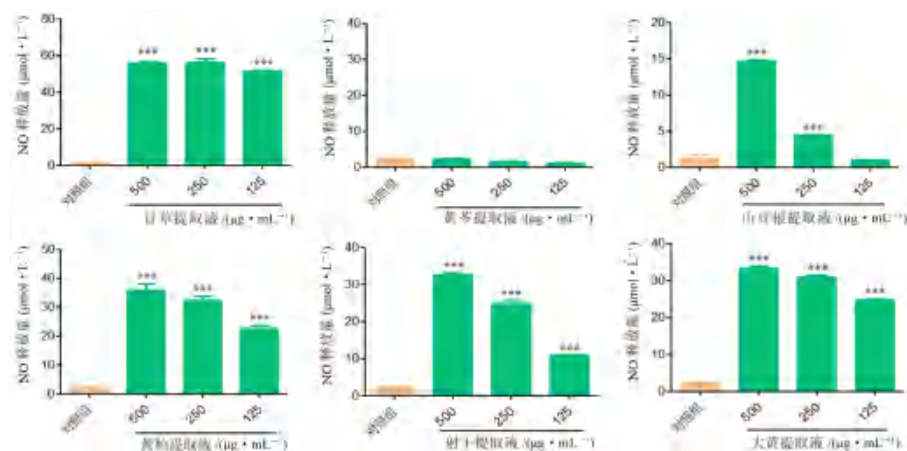


图 8 各中药提取液对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

Fig 8 Effect of each traditional Chinese medicines on NO release in RAW264.7 cells

注：与对照组比较，*** $P < 0.001$ 。

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

② LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 NO 释放量：检测方法同“2.3.4”项下。与模型组相比，大黄、射干、山豆根在 $125 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可有效抑制 NO 的释放；黄芩、黄柏在 $250 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

可显著性地抑制炎症细胞释放 NO；甘草仅在 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抑制 NO 的释放，见图 9。提示黄柏、大黄、黄芩、射干、山豆根、甘草可有效地抑制机体炎症反应。

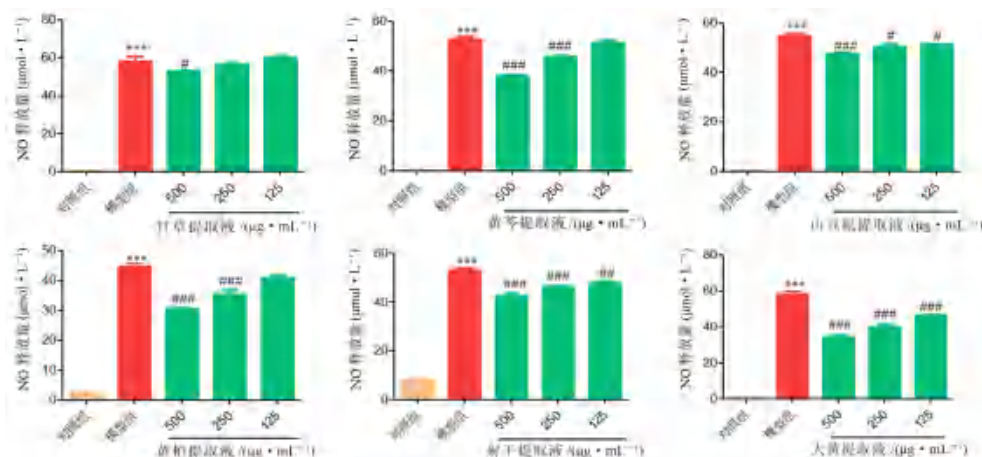


图 9 各中药提取液对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

Fig 9 Effect of each traditional Chinese medicine on NO release in RAW264.7 cells induced by LPS

注：与对照组比较，*** $P < 0.001$ ，与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。

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

3 讨论

口腔溃疡，即“口糜”或“口疮”，其病因在于热气循少阴心经、太阴脾经上冲咽喉达口舌。中医治疗常予苦寒药物内服、清热泻火剂外敷^[21]。而桂林西瓜霜中，西瓜霜、黄芩、黄柏等大部分中药均可清热泻火，配以硼砂、冰片等中药消肿止痛，治疗口腔溃疡效果显著，但其作用机制及物质基础目前仍不清晰。

因此，本研究综合网络药理学、分子对接以及体外药效实验，对桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的机制及物质基础进行了初步探索。网络药理学结果表明，桂林西瓜霜可能作用于 C 型凝集素

受体、PI3K-Akt 等信号通路发挥抗炎、调节免疫等药效。富集出的关键靶标包括 TNF、SRC、VEGFA 等，涉及免疫炎症、血管生长等多个方面。桂林西瓜霜主要是通过黏膜表面吸收入体直接进入血液循环，但药物作用于细胞模型主要是通过被动转运的方式，在通透性和代谢等方面无法完全模拟在体组织的复杂情况^[22]，无法体现出黏膜吸收的缓控释作用。因此，本研究采用 PBS 溶解辅以 DMSO 增溶的提取方式，旨在充分完全的提取有效成分，达到方剂多成分协同发挥作用的的目的，以初步验证方剂整体的抗炎及免疫调节作用，为研究在体吸收提供基础。

将 RAW264.7 细胞的 NO 释放量作为药效指标对桂林西瓜霜进行验证^[23],发现桂林西瓜霜可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO,同时又可刺激 RAW264.7 细胞释放 NO;另一方面,又可直接引起 RAW264.7 细胞的吞噬能力增加,促进 RAW264.7 细胞向 M1 型极化,表明该方同时具有抗炎、促炎的双向作用。进一步对关键靶标进行验证,发现桂林西瓜霜可降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 *TNF*、*VEGFA* mRNA 的表达量,升高 RAW264.7 细胞中 *TNF*、*SRC*、*VEGFA* mRNA 的表达量,表明桂林西瓜霜可通过作用于 *TNF*、*SRC*、*VEGFA* 等靶标发挥抗炎及免疫调节的作用,从而达到治疗口腔溃疡的目的。

因 *VEGFA* 的分辨率较高,且复合活性配体较少,本研究选择 *TNF*、*SRC* 与活性成分进行对接,结果表明,甘草、大黄等中药的木犀草素、大黄酸等成分可通过调节免疫炎症以及促进创伤愈合等反应,缓解口腔溃疡的症状;进一步通过药效实验对分子对接得到的中药进行验证,发现黄柏、大黄、射干、甘草、山豆根可刺激 RAW264.7 细胞产生 NO,在 LPS 刺激产生炎症反应时,又可减少 NO 的释放量。已有文献证实大黄、黄芩等中药确有广谱的抗菌、抗炎等活性^[24-25]。这些研究结果为分子对接的结果提供了一定的支撑,由此可推测黄柏、大黄、射干、黄芩、山豆根、甘草可能为桂林西瓜霜发挥免疫抗炎作用的关键中药。此外,桂林西瓜霜也可通过网络药理学富集出的其他通路及关键靶标发挥相应作用,相关实验结果需进一步验证。

综上,本研究利用网络药理学、分子对接以及体外实验等方法对桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的机制及潜在药效物质基础进行了初步探索,得出桂林西瓜霜中的黄柏、大黄、射干、黄芩、山豆根、甘草等中药所含的木犀草素、鼠李素、大黄酸等成分可以通过影响 *TNF*、*SRC* 等靶标的表达,调节 C 型凝集素受体、PI3K-Akt 等信号通路以发挥治疗口腔溃疡的作用,为后续深入研究提供研究基础。

参考文献

- [1] 王爱云,王志刚.双黄连口服液与雷尼替丁治疗口腔溃疡临床观察[J].当代医学,2011,17(3):148-149.
- [2] 叶刚.清胃凉血愈疮汤联合口腔溃疡含片治疗口腔溃疡的临床观察[J].中国中医药科技,2021,28(5):841-842.
- [3] 杨春草,周小青,王焱,等.周小青教授从热郁虚络论治复发性口腔溃疡[J].亚太传统医药,2021,17(5):104-106.
- [4] 岳金涵,王非,辛川,等.自伤性口腔溃疡的病因和临床诊疗特点[J].国际口腔医学杂志,2020,47(5):595-600.

- [5] 黄春江,张玲,王艺,等.喉咽清口服液治疗复发性口腔溃疡的效果[J].中外医学研究,2022,20(13):131-135.
- [6] 杨泳,杨惠卿.《伤寒杂病论》经方治疗复发性口腔溃疡探讨[J].四川中医,2022,40(9):52-55.
- [7] 朱润秋,林旭馨,何佳苇.复发性口腔溃疡的病因以及临床治疗研究概述[J].黑龙江医学,2020,44(2):287-288.
- [8] 孙建国.桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的临床分析[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(72):93.
- [9] 苏玉石.桂林西瓜霜抑菌作用的研究[J].中草药,2004,35(3):311,334.
- [10] 倪琦,林化.桂林西瓜霜对小鼠皮肤创面愈合影响的研究[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(15):41,44.
- [11] 邹节明,潘佐静,张家铨,等.桂林西瓜霜药效学及毒理研究[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2003,11(4):159-163.
- [12] 贡巴加,任越,马婧,等.基于网络药理学与分子对接技术探讨藏族药佐木阿汤治疗高血压病的作用机制[J].中国中药杂志,2020,45(22):5383-5392.
- [13] 孙淑萍,杜云艳,锁孝国,等.冰片对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型的影响[J].通化师范学院学报,2019,40(4):61-68.
- [14] Chen LZ, Sun WW, Bo L, et al. New arylpyrazoline-coumarins: synthesis and anti-inflammatory activity [J]. Eur J Med Chem, 2017, 138: 170-181.
- [15] Byun J, Kim SK, Ban JY. Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of Korean Ginseng berry extract in LPS-activated RAW264.7 macrophages [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(3): 719-735.
- [16] 王旭光,陈根殷,陈妙萍.木犀草素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 COX-2 及 mPGES-1 表达的影响[J].中药材,2007,30(10):1263-1266.
- [17] 周强,张坤,李富强,等. β -谷甾醇缓解 LPS 诱导的急性肺损伤大鼠炎症反应和纤维化[J].西部医学,2022,34(6):813-818.
- [18] 胡乃华.大黄酸通过巨噬细胞激活的串扰调控肠道炎症中氧化还原介导的 Nlrp3 炎症小体的激活[J].天然产物研究与开发,2022,34(1):56.
- [19] 蔡苏娜,李强,周慧,等.白杨素通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥抗炎和抗氧化作用:基于蛋白质芯片方法[J].南方医科大学学报,2021,41(10):1554-1561.
- [20] 张宜.基于 NLRP3 通路探讨芦荟大黄素保护血管内皮的作用机制[D].广州:广州中医药大学,2021.
- [21] 江媛媛,袁雅琪,杨以太,等.探析潜阳伏火法治疗复发性口腔溃疡[J].广西中医药大学学报,2022,25(3):35-37.
- [22] 王双庆.颊黏膜递药系统体外渗透模型的研究[D].延边:延边大学,2021.
- [23] 陈一晴,聂少平,黄丹菲,等.大粒车前子多糖对 RAW264.7 细胞一氧化氮生成的影响[J].中国药理学通报,2009,25(8):1119-1120.
- [24] 张瑞清,荆进,吴迎涛.大黄应用于牙周治疗的研究进展[J].北京口腔医学,2022,30(1):73-76.
- [25] 周羽.芍药苷联合黄芩苷在口腔炎症性疾病中的抗炎作用[D].太原:山西医科大学,2021.

(收稿日期:2022-11-28;修回日期:2023-03-07)

共载姜黄素与胡椒碱纳米结构脂质载体的体外释放研究

吴赵莉¹, 韩新宇¹, 田思宇¹, 张程皓¹, 任金妹², 唐景玲^{1*} (1. 哈尔滨医科大学药学院, 哈尔滨 150086; 2. 复旦大学附属中山医院青浦分院, 上海 201700)

摘要: **目的** 制备姜黄素/胡椒碱纳米结构脂质载体 (CP-NLCs) 并对其外观性状、包封率、载药量和体外药物释放进行考察。**方法** 本研究使用乳化蒸发-高压均质法制备 CP-NLCs, 并对制备的 CP-NLCs 进行质量评价, 包括利用透射电镜对 CP-NLCs 的外观形态进行观察; Malvern 激光粒度仪测定 CP-NLCs 的粒径、Zeta 电位和多分散系数 (PDI); 采用超滤离心法测定 CP-NLCs 的包封率和载药量; 利用正向动态透析法研究 CP-NLCs 以及姜黄素、胡椒碱溶液的体外释放行为。**结果** 测得 CP-NLCs 外观为类球状颗粒, 平均粒径为 38.59 nm, PDI 为 0.217, Zeta 电位为 -6.86 mV。CP-NLCs 中姜黄素的包封率为 (99.48±0.41)%, 载药量为 (13.26±0.06)%; 胡椒碱的包封率为 (97.28±0.19)%, 载药量为 (6.48±0.13)%。体外释放实验显示姜黄素溶液在 48 h 释放 69.30%, 胡椒碱溶液在 24 h 释放 68.86%, 而 CP-NLCs 中的姜黄素在 48 h 内累积释放 86.02%, CP-NLCs 中的胡椒碱在 24 h 内累积释放 90.35%。**结论** CP-NLCs 粒径较小, 包封率、载药量较高, 具有一定的缓释作用, 并能显著增加难溶性药物的释放量。

关键词: 姜黄素; 胡椒碱; 纳米结构脂质载体; 体外释放

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1436-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.006

In vitro release of curcumin and piperine nanostructured lipid carriers

WU Zhao-li¹, HAN Xin-yu¹, TIAN Si-yu¹, ZHANG Cheng-hao¹, REN Jin-mei², TANG Jing-ling^{1*} (1. College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150086; 2. Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700)

Abstract: Objective To prepare nanostructured lipid carriers co-loaded with curcumin and piperine (CP-NLCs), and measure their appearance, encapsulation efficiency, drug loading and drug release in vitro. **Methods** CP-NLCs were prepared with emulsification evaporation-high pressure homogenization method. The quality of the CP-NLCs was evaluated, including observing the appearance and morphology of CP-NLCs by transmission electron microscopy. Malvern laser particle sizer was used to measure the particle size, Zeta potential, and polydispersity index (PDI) of CP-NLCs. The encapsulation efficiency and drug loading of CP-NLCs were measured by ultrafiltration centrifugation. Forward dynamic dialysis was used to determine the in vitro release behaviors of CP-NLCs. **Results** Transmission electron microscopy showed that freshly prepared CP-NLCs had smooth spherical particles without aggregation and adhesion, with small particle size and good dispersion. The optimized CP-NLCs demonstrated mean particle size of 38.59 nm, Zeta potential of -6.86 mV, and PDI of 0.217. The encapsulation rate of curcumin in CP-NLCs was (99.48±0.41)%, and the drug loading was (13.26±0.06)%. The encapsulation rate of piperine was (97.28±0.19)%, and the drug loading was (6.48±0.13)%. The in vitro release showed that the curcumin solution released 69.30% at 48 h, and the curcumin in CP-NLCs released 86.02% at 48 h. The piperine solution released 68.86% at 24 h, and the piperine in CP-NLCs released 90.35% at 24 h. **Conclusion** CP-

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (No. H2018013); 哈尔滨医科大学药学院杰出人才基金项目 (No. 2019-JQ-03); 上海市青浦区科技发展基金项目 (No. QKY2019-18); 复旦大学附属中山医院青浦分院院级课题 (No. QYP2020-03)。

作者简介: 吴赵莉, 女, 在读硕士研究生, 主要从事新型药物载体的研究, email: 2942593301@qq.com *通信作者: 唐景玲, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事新型药物传递系统, email: yaoji636@126.com

NLCs have small particle size, high entrapment efficiency and drug loading, and has sustained release effect and can greatly increase the release of insoluble drugs.

Key words: curcumin; piperine; nanostructured lipid carrier; in vitro release

姜黄素 (curcumin, Cur) 是从姜黄根茎中提取出的多酚成分, 研究表明其具有良好的抗肿瘤作用^[1-2]。但是姜黄素的水溶性差, 口服生物利用度低, 而且它是 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的底物, 因此临床应用受到限制^[3]。胡椒碱 (piperine, Pip) 为胡椒提取物, 常作为 P-gp 抑制剂与抗肿瘤药物联用, 来增强抗肿瘤药物对肿瘤细胞的作用^[4-6]。纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carriers, NLC) 是高度可扩展和可生物降解的纳米载体^[7], 其相较于初代固体脂质纳米粒具有更高的稳定性和载药量, 在药物递送应用中显示出巨大的前景^[8-10]。本实验拟采用溶剂挥发-高压均质法制备共载姜黄素与胡椒碱的纳米结构脂质载体, 并对其质量进行初步评价, 得到稳定性好、载药量高、适宜的工业大规模生产的纳米制剂。

1 仪器与试药

1.1 仪器

BSA124S-CW 型电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; KQ5200E 医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XW-80A 型旋涡混合器 (海门市麒麟医用仪器厂); HZQ-C 空气浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); Nano 微射流均质机 (上海诺泽流体科技有限公司); 5430R 低温超速离心机 (德国 Eppendorf 公司); NanoZS90 光散射粒径分析仪 (英国 Malvern 公司); Agilent1260 Infinity 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。

1.2 试药

姜黄素原料药 (纯度 $\geq 95\%$)、胡椒碱原料药 (纯度 $\geq 97\%$) (大连美仑生物技术有限公司); 大豆磷脂 (上海艾伟拓医药科技有限公司); 单硬脂酸甘油酯 [嘉法狮 (上海) 贸易有限公司]; 辛酸/癸酸甘油三酯 (广州市创品植源化工有限公司); 吐温 80 (Tween 80, 天津市富宇精细化工有限公司); 无水乙醇 (天津市天力化学试剂有限公司); 甲醇 (色谱纯) (山东禹王实业有限公司); 乙腈 (色谱纯) (天津市科密欧化学试剂有限公司); 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CP-NLCs 的制备

本实验选择单硬脂酸甘油酯 (glyceryl monostearate, GMS) 和磷脂 (lecithin, LEC) 作为固体脂质, 辛酸/癸酸甘油三酯 (caprylic/capric triglyceride, GTCC) 作为液体脂质, 以 Tween 80 作为乳化剂, 通过乳化蒸发-高压均质法制备 CP-NLCs。称取一定量的 GMS、LEC、GTCC 置于小烧杯中, 精密称取一定比例的 Cur、Pip, 加入 3 mL 无水乙醇, 加热混匀使成为均一液体作为油相。水相为纯化水中加入适量的 Tween 80。同时加热油相与水相至 55°C , 而后保持水相处于搅拌的状态下, 并滴入油相, 搅拌 15 min 蒸发乙醇后, 进行高压均质, 4°C 冷冻固化即得 CP-NLCs。结果新鲜制备的 CP-NLCs 的外观澄清透明, 具橙黄色乳光, 且在 4°C 条件下放置 24 h 后外观无变化。

2.2 CP-NLCs 粒径、电位和外观形态的测定

用 Malvern Nano ZS90 分析仪测定 CP-NLCs 的粒径及粒度分布。取 10 μL 的 CP-NLCs, 加纯化水稀释至 1 mL, 再加至样品池中, 测定 CP-NLCs 的粒径。实验结果如图 1A 所示, CP-NLCs 的平均粒径为 $(38.59 \pm 0.75) \text{ nm}$, 多分散系数 (PDI) 为 0.217。将 CP-NLCs 用一次性注射器的针筒转移至样品池中, 直至样品充满样品池。观察样品池中是否无气泡。若无气泡, 将样品池插入插槽中, 并关上仪器盖子后, 即可进行电位的测定。结果见图 1B 所示, CP-NLCs 的 Zeta 电位为 $(-6.86 \pm 0.09) \text{ mV}$, 说明 CP-NLCs 带有一定的负电荷。将一滴新鲜制备的 CP-NLCs 溶液 (10 倍稀释) 滴到覆有支撑膜的铜网上, 自然干燥, 置于透射电子显微镜下观察。可以看出新鲜制备的 CP-NLCs 外观为光滑的类球状颗粒, 粒径较小, 无聚集与粘连, 结果如图 1C。

2.3 CP-NLCs 载药量 (EE) 与包封率 (DL) 的测定

平行制备 3 份 CP-NLCs, 采用超滤离心法测定 CP-NLCs 的 EE 和 DL, 并采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析样品。具体步骤如下: 分别精密吸取 400 μL CP-NLCs 置于 Millipore 超滤管中 (截留分子量 100 kD), 于 4°C 、13 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 30 min, 取 10 μL 滤液用甲醇稀释 100

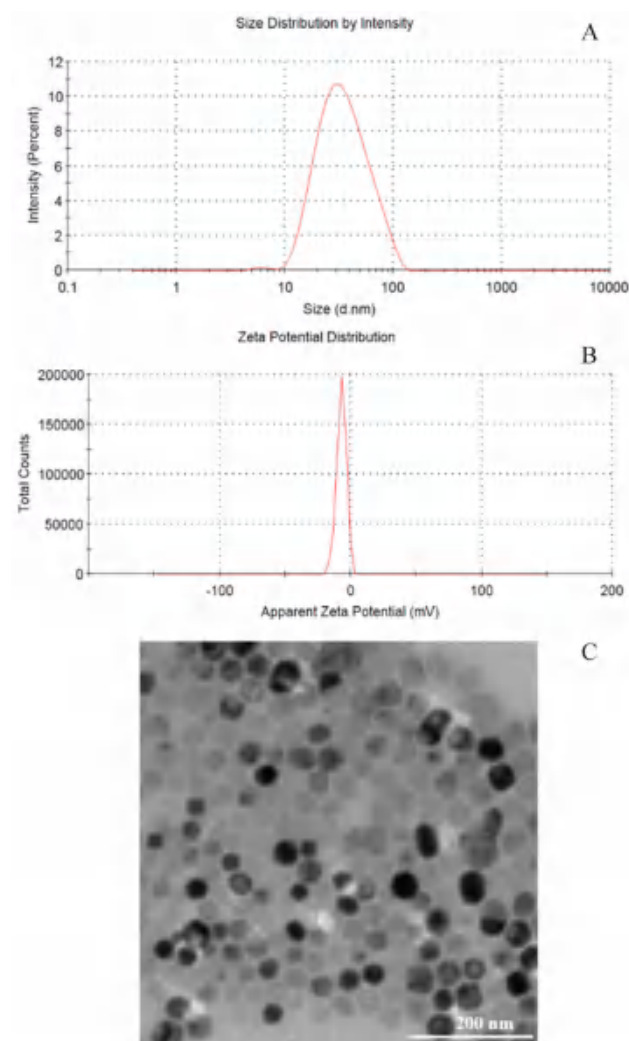


图 1 CP-NLCs 的粒径、Zeta 电位和透射电镜测定结果
Fig 1 Particle size, zeta potential and transmission electron microscopy image of CP-NLCs
A. 粒径 (particle size); B. Zeta 电位 (Zeta potential); C. 透射电镜图 (transmission electron microscopy image)

倍, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 有机滤膜, 取过滤后滤液进 HPLC 分析, 测定并计算出游离药物的含量 ($W_{\text{游离}}$)。HPLC 测定原稀释样品浓度, 代入标准曲线计算样品中药物的总含量 ($W_{\text{总}}$), 并运用下面的公式计算包封率 (EE) 和载药量 (DL)。

$$EE(\%) = W_{\text{药}}/W_{\text{总}} \times 100\%$$

$$DL(\%) = W_{\text{药}}/W_{\text{纳米粒}} \times 100\%$$

其中, EE 为 CP-NLCs 溶液中 Cur、Pip 的包封率, DL 为 CP-NLCs 溶液中 Cur、Pip 的载药量; $W_{\text{药}}$ 为包载于 CP-NLCs 溶液中的 Cur、Pip 药量; $W_{\text{总}}$ 为制备 CP-NLCs 加入的 Cur、Pip 总药量; $W_{\text{纳米粒}}$ 为载药 NLCs 的总重量。

采用 HPLC 法测定 CP-NLCs 中 Cur、Pip, 分析方法的专属性、线性、精密度、回收率、稳定性及加样回收率均符合方法学要求。测得 Cur 的 EE

为 $(99.48 \pm 0.41)\%$, DL 为 $(13.26 \pm 0.06)\%$; Pip 的 EE 为 $(97.28 \pm 0.19)\%$, DL 为 $(6.48 \pm 0.13)\%$ 。

2.4 CP-NLCs 体外释放研究

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil 100-5-C18 柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈-4% 冰醋酸溶液 ($60:40$); 流速: $1.0\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: $25\ ^\circ\text{C}$; 进样量: $20\ \mu\text{L}$ 。

2.4.2 溶液的配制

① 空白溶液: 配制含 20% 乙醇和 3% Tween 80 的 PBS 溶液 ($\text{pH}\ 5.5$) 备用, 用时过滤即为空白溶液。

② 对照品溶液: 精密称定 2 mg 的 Cur、1 mg Pip 分别置于 2 个 100 mL 量瓶中, 加入含 20% 乙醇和 3% Tween 80 的 PBS 溶液 ($\text{pH}\ 5.5$) 定容, 即得 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cur 对照品母液和 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pip 对照品母液。

③ 样品溶液: 精密移取新制的 CP-NLCs 混悬液 $50\ \mu\text{L}$, 定容至 10 mL 并超声处理, 过滤, 取滤液即得。

2.4.3 专属性试验 取“2.4.2”项下 4 种溶液, 进样并保存色谱图, 考察此方法专属性。进样后的色谱图如图 2 所示, 释放介质的色谱图未出现杂峰, 对照品与供试品的峰形尖锐, 释放介质且不干扰 Cur 与 Pip 的含量测定, 说明该方法的专属性好。

2.4.4 线性关系考察 取“2.4.2”项下 Cur 对照品溶液和 Pip 对照品溶液, 分别用释放介质稀释成 0.2 、 2.0 、 5.0 、 7.5 、 10.0 、 12.5 、 $15\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Cur 溶液和 0.3 、 1.0 、 2.0 、 3.5 、 5.0 、 6.0 、 $7.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Pip 溶液。按“2.4.1”项下色谱条件, 依次进样并记录峰面积。以峰面积 (A) 为纵坐标, 质量浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得线性方程。Cur 对照品回归方程: $A = 78.922C - 10.708$, $r = 0.9999$, 表明 Cur 在 $0.2 \sim 15\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。Pip 对照品回归分析方程为: $A = 31.276C - 1.4991$, $r = 0.9998$, 表明 Pip 在 $0.3 \sim 7\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 分别配制备低 ($2.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 ($7.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高 ($12.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的 Cur 溶液及低 ($1.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 ($3.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高 ($6.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的 Pip 溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样且分析。1 d 内进低、中、高浓度的样品 5 次, 即日内精密度; 5 d 内同法进低、中、高浓度的样品, 即日间精密度。结果表明 3 种浓

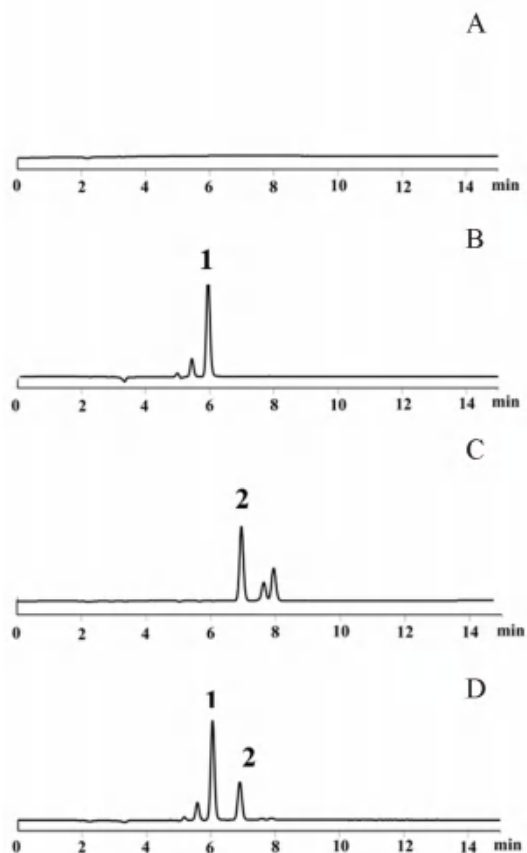


图2 姜黄素、胡椒碱的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatogram for the determination of curcumin and piperine

A. 空白溶液 (blank solution); B. 姜黄素对照品 (reference solution of curcumin); C. 胡椒碱对照品 (reference solution of piperine); D. 供试品 (test solution); 1. 姜黄素 (curcumin); 2. 胡椒碱 (piperine)

度 Cur 和 Pip 溶液的日内和日间精密度 RSD 均小于 2%，表明方法的精密度符合要求。

2.4.6 回收试验 吸取适量的释放介质溶液，加入适量的 Cur 对照品，制备低 ($3.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 ($6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和高 ($7.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种质量浓度的 Cur 溶液，同法制备低 ($1.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 ($2.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和高 ($3.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的 Pip 溶液，利用 HPLC 分析后，计算 3 种浓度的回收率。结果表明 3 种浓度的 Cur 和 Pip 溶液的回收率均在 (100 ± 2)%，表明此方法的回收率符合分析方法的要求。

2.4.7 稳定性试验 取样品溶液在 12 h 内每间隔 2 h 进样一次，24 h 时再次进样，分别记录药物 Cur 和 Pip 的峰面积 A_1 和 A_2 ，求出浓度进而计算出 RSD ，考察其放置稳定性。计算后得，24 h 内制剂中 Cur 和 Pip 含量测定的稳定性试验结果 RSD 分别为 1.6% 和 0.89%，表明溶液放置 24 h 后对其含量无影响。

2.4.8 CP-NLCs 的体外释放研究 CP-NLCs 体外释放实验采用正向动态膜透析法。在实验中以可用作注射用溶剂的聚乙二醇 400 作为溶剂，制备 Cur 与 Pip 的溶液为对照组。选择 pH 5.5 的 PBS 溶液作为释放介质 (释放介质满足漏槽条件)，以此来模拟肿瘤的酸性环境。移取 1 mL 新制的 CP-NLCs 溶液至预先处理好的一端夹紧的透析袋 (截留分子量: 8000 ~ 14 000) 中，装入 CP-NLCs 后固定另一端，放于预盛 200 mL 介质的烧杯中，对照组按同法操作，全部固定好后将对照组和实验组按顺序摆放在恒温振荡器中，温度 37°C ，转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在 0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、24 和 48 h 依序用移液枪移取 1 mL 释放液，同时补充相同体积的空白介质溶液。依次用 HPLC 测定样品，记录每个时间点对应的峰面积 A ，代入标准曲线计算样品中的药物浓度，计算累积释放量。

累积释放量 (Q_n) 及累积释放百分数 ($Q\%$) 由以下公式计算求得：

$$Q_n = V_0(C_n + \frac{V}{V_0} \sum_{i=1}^{n-1} C_i) = V_0 C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

$$Q\% = Q_n / Q_0 \times 100\%$$

其中 C_n 为在 t 时刻 Cur、Pip 的测定浓度， C_i 为 t 时刻之前测定的 Cur、Pip 浓度， V_0 为接受池中加入的溶液体积， V 为每次取样体积， Q_0 为起始时给药池中 Cur、Pip 总量。体外释放研究的累积释放曲线见图 3。Cur 溶液在 48 h 释放 69.30%，Pip 溶液在 24 h 释放 68.86%，而 CP-NLCs 中的 Cur 在 48 h 内累积释放 86.02%，CP-NLCs 中的 Pip 在 24 h 内累积释放 90.35%，相比于 Cur、Pip 溶液，CP-NLCs 显著增加了难溶性药物 Cur、Pip 的释放量。

3 讨论

本文通过乳化蒸发-高压均质法成功制备了 CP-NLCs，并选择了对 Cur、Pip 均有较好溶解度的 GMS、LEC、GTCC 作为脂质来包裹药物，以保证能包载更多的药物。实验测得 CP-NLCs 的粒径为 (53.72 ± 1.43) nm，PDI 为 0.208。CP-NLCs 具有超小的粒径，超小型的 NLC (尺寸小于 100 nm) 是理想的肿瘤靶向载体，因为它允许更好的肿瘤部位的积累和渗透^[11-13]；CP-NLCs 的 Zeta 电位 - 6.86 mV，说明 CP-NLCs 带有一定的负电荷，不易在放置过程中发生凝聚、沉淀，有利于 CP-NLCs 的储存。同时 CP-NLCs 具有良好的载药量与包封率。体外释放实验结果表明 CP-NLCs

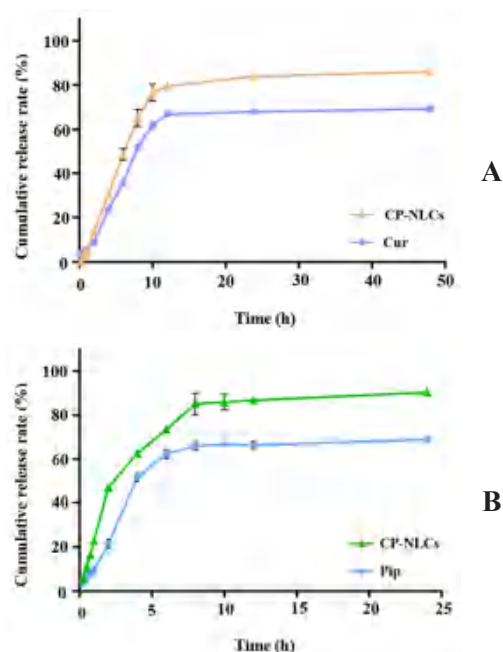


图3 CP-NLCs中Cur (A)、Pip (B)在PBS (pH 5.5)中的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig 3 In vitro release of Cur (A) and Pip (B) in CP-NLCs in PBS (pH 5.5) ($n=3$)

具有一定的缓释作用,并能显著增加难溶性药物的释放量且释放完全,可以在肿瘤部位持续释放更多的药物,提高了药物的生物利用度;并且Pip早于Cur释放,可以更好地提高联合用药的治疗效果。

参考文献

- [1] Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and cancer [J]. Nutrients, 2019, 11 (10): 2376-2396.
- [2] Shabgah AG, Zarifi SH, Kiapey SSM, et al. Curcumin and cancer are long non-coding RNAs missing link [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2021, 164: 63-71.
- [3] 刘祖浩, 陈仕红, 何晓玲, 等. 姜黄素与胡椒碱联合用药的研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2019, 21 (4): 121-125.
- [4] Abolhassani H, Safavi MS, Handali S, et al. Synergistic effect of self-assembled curcumin and piperine Co-load-

- ed human serum albumin nanoparticles on suppressing cancer cells [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2020, 46 (10): 1647-1655.
- [5] Bolat ZB, Islek Z, Demir BN, et al. Curcumin-and piperine-loaded emulsomes as combinational treatment approach enhance the anticancer activity of curcumin on HCT116 colorectal cancer model [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 50.
- [6] Slika L, Moubarak A, Borjac J, et al. Preparation of curcumin-poly (allyl amine) hydrochloride based nanocapsules: piperine in nanocapsules accelerates encapsulation and release of curcumin and effectiveness against colon cancer cells [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 109: 110550.
- [7] 高国太, 周蕾. 姜黄素纳米结构脂质载体的制备及其理化性质考察 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16 (S1): 3-5, 8.
- [8] Eslami SS, Jafari D, Montazeri H, et al. Combination of curcumin and metformin inhibits cell growth and induces apoptosis without affecting the cell cycle in LNCaP prostate cancer cell line [J]. Nutr Cancer, 2021, 73 (6): 1026-1039.
- [9] Li M, Pei J, Ma Z, et al. Docetaxel-loaded ultrasmall nanostructured lipid carriers for cancer therapy: in vitro and in vivo evaluation [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85 (4): 731-739.
- [10] Saporito F, Sandri G, Bonferoni MC, et al. Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 27 (13): 175-186.
- [11] Li M, Pei J, Ma Z, et al. Docetaxel-loaded ultrasmall nanostructured lipid carriers for cancer therapy: in vitro and in vivo evaluation [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85 (4): 731-739.
- [12] Zhao X, Tang D, Yang T, et al. Facile preparation of biocompatible nanostructured lipid carrier with ultra-small size as a tumor-penetration delivery system [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 170: 355-363.
- [13] Kim JY, Choi WI, Kim YH, et al. In-vivo tumor targeting of pluronic-based nano-carriers [J]. J Control Release, 2010, 147 (1): 109-117.

(收稿日期: 2022-10-11; 修回日期: 2022-11-08)

石菖蒲挥发油 - 丹参酮 II A 复合纳米乳的制备、抗肿瘤活性及药动力学研究

方亮^{1, 2, 3, 4}, 程红艳^{1, 2, 3, 4}, 陈卫东^{1, 2, 3, 4}, 彭灿^{1, 2, 3, 4}, 张彩云^{1, 2, 3, 4*} (1. 安徽中医药大学 药学院 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 合肥 230012; 2. 安徽省教育厅现代药物制剂工程技术研究中心, 合肥 230012; 3. 安徽省道地中药材品质提升创新协同中心, 合肥 230012; 4. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

摘要: 目的 联合纳米乳和石菖蒲挥发油 (VOA) “引药上行”作用制备 VOA-Tan II A 复合纳米乳 (VOA-Tan II A NE), 提高丹参酮 II A (Tan) 的抗肿瘤活性和生物利用度。方法 通过伪三元相图确定 VOA-Tan II A NE 的最优处方; 测试 VOA-Tan II A NE 的粒径、电位、形貌及体外释放情况; 采用 CCK8 法探究 VOA-Tan II A NE 体外抗脑胶质瘤 (C6) 能力及血脑屏障下对 C6 细胞的抑制作用。药动力学实验评价 VOA-Tan II A NE 的生物利用度。结果 处方优化得 VOA-Tan II A NE 的粒径和多分散系数分别为 (28.90 ± 2.01) nm 和 (0.14 ± 0.04) , 包封率为 $(96.58 \pm 0.26)\%$, 呈分散均匀的球形。VOA-Tan II A NE 的体外释放呈缓释效果, 同时显著抑制 C6 细胞生长 (其 IC_{50} 值为 Tan II A 的 0.18 倍)。药动力学结果显示 VOA-Tan II A NE 的 $AUC_{0 \sim t}$ 较 Tan II A 提高了 2.57 倍。结论 VOA-Tan II A NE 有效提高了 Tan II A 体外抗肿瘤作用和体内生物利用度, 有望成为 Tan II A 脑部递送的新型纳米制剂。

关键词: 丹参酮 II A; 石菖蒲挥发油; 纳米乳; 抗肿瘤活性; 生物利用度

中图分类号: R283, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1441-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.007

Preparation, antitumor activity, and bioavailability of volatile oil of Acorus tatarinowii-Tanshinone II A composite nanoemulsion

FANG Liang^{1, 2, 3, 4}, CHENG Hong-yan^{1, 2, 3, 4}, CHEN Wei-dong^{1, 2, 3, 4}, PENG Can^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Cai-yun^{1, 2, 3, 4*} (1. Anhui Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Engineering Technology Research Center of Modern Pharmaceutical Preparations, Education Bureau of Anhui, Hefei 230012; 3. Collaborative Innovation Center for Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials Quality Improvement, Hefei 230012; 4. Engineering Technology Research Center for Modern Pharmaceutical Preparation, Hefei 230012)

Abstract: Objective To prepare volatile oil of Acorus tatarinowii-Tanshinone II A composite nanoemulsion (VOA-Tan II A NE) by combining the advantages of nanoemulsion and “up-priming” effect of volatile oil of Acorus tatarinowii, and improve the anti-tumor activity and bioavailability of Tanshinone II A (Tan II A). **Methods** The optimal prescription of VOA-Tan II A NE was determined by pseudo ternary phase diagram. The particle size, potential, morphology, and release of VOA-Tan II A NE were measured. The in vitro anti-glioma (C6) ability of VOA-Tan II A NE and its inhibitory effect on C6 cells under the blood-brain barrier was detected by CCK8. The bioavailability of VOA-Tan II A NE was evaluated by in vivo pharmacokinetics. **Results** The prepared VOA-Tan II A NE was spherical and uniformly dispersed, with a particle size of (28.90 ± 2.01) nm, a polydisperse index of (0.14 ± 0.04) , and an encapsulation rate of $(96.58 \pm 0.26)\%$. In vitro release of VOA-Tan II A NE

基金项目: 安徽省科技重大专项项目 (No.202203a07020031); 安徽省教育厅基金项目 (No.KJ2021ZD0065)。

作者简介: 方亮, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药新剂型及其初步药动学的研究, email: 1932703517@qq.com *通信作者: 张彩云, 女, 博士研究生导师, 主要从事中药制剂、缓控释纳米制剂及药代动力学研究, email: cyzhang6@ustc.edu.cn

showed sustained release effect. The IC_{50} value of VOA-Tan II A NE on C6 cells was 0.18 times of that of Tan II A. VOA-Tan II A NE significantly inhibited the growth of C6 cells under the blood-brain barrier. Pharmacokinetics showed that $AUC_{0 \sim t}$ of VOA-Tan II A NE was 2.57 times higher than that of Tan II A. **Conclusion** VOA-Tan II A NE may effectively improve the in vitro anti-tumor effect of Tan II A and in vivo bioavailability, providing a novel nano preparation for brain delivery of Tan II A.

Key words: Tanshinone II A; volatile oil of Acorus tatarinowii; nanoemulsion; antitumor activity; bioavailability

脑胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统恶性肿瘤,死亡率高、复发率高、生存时间短,手术切除治疗和术后化疗效果并不乐观^[1]。由于血脑屏障(BBB)的存在,大多脑胶质瘤治疗药物不能有效递送入脑^[2]。丹参酮 II A (Tan II A) 是中药丹参的主要活性成分,具有广泛的抗肿瘤、抗氧化、抗凋亡等药理作用^[3-4]。然而, Tan II A 的水溶性低、半衰期短等缺点严重限制了其体内抗肿瘤疗效^[5]。

纳米乳液是水相、油相、(助)表面活性剂按适当比例形成的热力学稳定系统,可提高药物的溶解度和生物利用度,常用于递送水溶性和渗透性差的药物^[6]。纳米乳液油相成分可以增加药物对脑毛细血管内皮细胞的亲和力,而表面活性剂可降低 BBB 上 P-糖蛋白对药物的外排,可增强药物的脑靶向性^[7]。

中药石菖蒲具有“芳香开窍、引药上行”的作用,在中药复方配伍中常用作使药^[8]。石菖蒲挥发油 (VOA) 是石菖蒲醒脑开窍的主要药效成分,含有 α -细辛醚、 β -细辛醚等化学成分^[9]。VOA 自身较易通过 BBB,同时可促进其他药物入脑^[10-11]。石菖蒲主要用于治疗中枢神经系统疾病,可改善学习记忆障碍和认知功能,同时具有一定的抗肿瘤作用^[12]。在中医临床中石菖蒲-丹参配伍具有开窍醒脑、活血化瘀之功,是治疗老年性痴呆等脑部疾病的常用组合,于洁等^[13]研究发现石菖蒲-丹参配伍后,提高了丹参有效成分的体内生物利用度。

本研究联合纳米乳液优势和 VOA “引药上行”的作用,构建了石菖蒲挥发油-丹参酮 II A 复合纳米乳 (VOA-Tan II A NE) 以提高 Tan II A 生物利用度和抗肿瘤疗效,现报道如下。

1 材料

1.1 试药

丹参酮 II A 原料药 (Tan II A, 源叶生物技术有限公司,纯度 > 98%); 丹参酮 I (Tan I, 如吉生物科技有限公司,纯度 ≥ 98%); 石菖蒲挥发油 (实验室自制); 中链甘油三酯 (MCT, 源叶生物技术有限公司); 聚氧乙烯蓖麻油 (CEL, 阿拉丁生化科技有限公司); 1, 2-丙二醇 (国药集团

化学试剂有限公司); 吐温-80 (麦克林生化科技有限公司); F12 培养基 (Biosharp 公司); DMEM 培养基 (赛默飞世尔生化制品有限公司); 马血清 (Biosharp 公司); 胎牛血清 (康源生物有限公司); 甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

高效液相色谱仪 (ThermoFisher 公司); 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 酶标仪 (赛默飞世尔科技公司)。

1.3 实验细胞与动物

大鼠脑胶质瘤细胞 (C6, 中国武汉普诺赛生命科技有限公司)。大鼠脑微血管内皮细胞 (BMEC, 中国科学院上海细胞库)。健康 SD 大鼠 (180 ~ 200 g)、健康家兔 (2 ~ 3.0 kg) [辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (辽) 2020-0001]。

2 方法与结果

2.1 VOA-Tan II A NE 的制备

2.1.1 VOA-Tan II A NE 制备方法的选择 采用剪切搅拌法制备纳米乳液^[14]。制备过程中油相为 VOA 和 MCT (1 : 2, w/w), 表面活性剂为 CEL, 助表面活性剂为 1, 2-丙二醇, 然后将 Tan II A 溶于油相和表面活性剂的混合溶液中混合均匀, 在均匀搅拌过程中滴入水相 (超纯水)。

2.1.2 伪三元相图的绘制 将表面活性剂与助表面活性剂按质量比 (K_m) 1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1 混合, 再将混合表面活性剂与油相按不同 K_m (1 : 9、2 : 8、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1) 混匀滴入水相。并计算终点时各成分的质量百分比, 以油相、水相、混合表面活性剂为坐标, 绘制伪三元相图, 结果如图 1 所示。当 $K_m = 1 : 1$ 、 $K_m = 4 : 1$ 时无法形成伪三元相图, 在 K_m 值为 3 : 1 时, 纳米乳液区域面积最大。因此, 本研究选择 K_m 值为 3 : 1, 油相和混合表面活性剂比为 3 : 7 作为后续 VOA-Tan II A NE 的最优处方, 即 VOA/MCT/CEL/1, 2-丙二醇/水的质量比为 0.16 : 0.32 : 0.84 : 0.28 : 5。

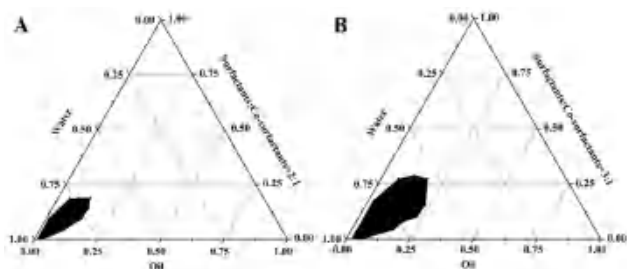


图 1 VOA-Tan II A NE 伪三元相图

Fig 1 Pseudo ternary phase diagrams of VOA-Tan II A NE

 A. $K_m = 2:1$; B. $K_m = 3:1$

无 VOA 的丹参酮 II A 纳米乳 (Tan II A NE) 的制备处方是基于上述处方, MCT/CEL/1, 2-丙二醇/水的质量比为 0.48:0.84:0.28:5。

2.1.3 处方单因素考察 固定其他因素不变, 分别考查温度、滴速、转速及 Tan II A 投药量对纳米乳的粒径和分散系数 (PDI) 的影响, 结果见表 1。可知当转速为 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、温度 35°C 时粒径和 PDI 均最小。在滴加速度为 0.3、 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时粒径和 PDI 较小, 从节省时间上选择滴加速度为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在 Tan II A 投药量为 3 mg 时, 所得 VOA-Tan II A NE 的 PDI 最小, 体系稳定。因此经单因素考察, 制备 VOA-Tan II A NE 的最佳工艺确定为: 转速为 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 35°C , 滴加速度为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 投药量为 3 mg。

表 1 不同因素水平下 VOA-Tan II A NE 的粒径和 PDI

Tab 1 Particle size and PDI of VOA-Tan II A NE at different factor levels

因素		粒径 /nm	PDI
温度 / $^\circ\text{C}$	25	40.67 ± 1.13	0.296 ± 0.022
	35	29.60 ± 1.07	0.097 ± 0.001
	45	30.52 ± 0.99	0.114 ± 0.013
	55	43.15 ± 3.29	0.262 ± 0.007
滴加速度 / ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	0.1	47.46 ± 3.74	0.473 ± 0.010
	0.3	27.53 ± 0.170	0.170 ± 0.012
	0.5	26.73 ± 0.74	0.132 ± 0.012
	0.7	37.28 ± 2.53	0.363 ± 0.010
转速 / ($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)	100	42.35 ± 1.93	0.280 ± 0.004
	200	30.26 ± 1.46	0.125 ± 0.013
	300	29.38 ± 1.67	0.094 ± 0.008
	400	39.85 ± 1.20	0.268 ± 0.001
投药量 /mg	1	38.09 ± 1.43	0.259 ± 0.007
	2	48.21 ± 5.06	0.330 ± 0.032
	3	40.13 ± 4.49	0.248 ± 0.007
	4	42.70 ± 2.36	0.274 ± 0.002

2.2 VOA-Tan II A NE 的表征和质量评价

2.2.1 粒径、Zeta 电位和形貌考察结果 最优处方下 VOA-Tan II A NE 的平均粒径为 $(28.90 \pm 0.01) \text{ nm}$ (见图 2A、B), PDI 为 (0.14 ± 0.04) , Zeta 电位为 $(-4.61 \pm 0.16) \text{ mV}$ 。TEM 观察 VOA-Tan II A NE 的形貌呈圆球形, 粒子之间无明显粘连, 结果见图 2C。可见, VOA-Tan II A NE 粒径分布窄, 大小均匀。

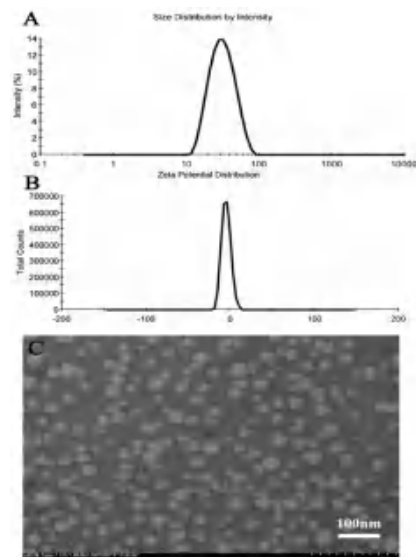


图 2 VOA-Tan II A 的粒径分布 (A)、Zeta 电位 (B) 及透射电镜图 (C)

Fig 2 Particle size distribution (A), Zeta potential (B) and the transmission electron microscope of VOA-Tan II A NE (C)

2.2.2 差示扫描量热法 (DSC) 分析 取适量 Tan II A 原料药、空白纳米乳、空白纳米乳与 Tan II A 原料药物理混合物及 VOA-Tan II A NE, 在 $25 \sim 350^\circ\text{C}$ 进行 DSC 分析, 升温扫描速度为 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 结果如图 3 所示。Tan II A 原料药在 218.17°C 处有一个特征峰, 空白纳米乳无特征峰, Tan II A 和空白纳米乳的物理混合物在 214.16°C 观察到 Tan II A 特征峰, 而 VOA-Tan II A NE 则在 113.17°C 出现一个新的特征峰, Tan II A 特征峰消失。说明本研究成功制备了 VOA-Tan II A NE, Tan II A 被包载于纳米乳中, 构成一新的物相。

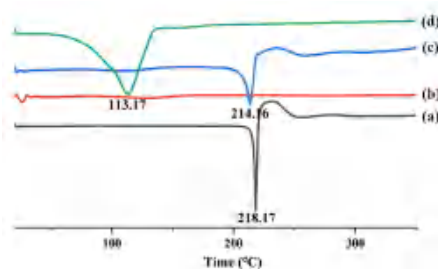


图 3 DSC 图谱

Fig 3 DSC analysis

a. Tan II A; b. 空白纳米乳 (blank NE); c. Tan II A 和空白纳米乳物理混合物 (physical mixture of Tan II A and blank NE); d. VOA-Tan II A NE

2.2.3 VOA-Tan II A NE 稳定性研究 将 VOA-Tan II A NE 置于 4°C 冰箱储存 4 周进行稳定性考察, 记录过程中粒径及包封率变化, 结果如表 2 所示。VOA-Tan II A NE 在 4°C 条件下储存 4 周粒径基本不变、PDI 和包封率变化不明显, 表明在实验条件下稳定性良好。

表 2 VOA-Tan II A NE 在 4℃ 下的表征 ($n = 3$)Tab 2 Characterization of VOA-Tan II A NE at 4℃ ($n = 3$)

储存时间 / 周	粒径 / nm	PDI	包封率 / %
1	29.98 ± 1.64	0.13 ± 0.03	94.55 ± 1.12
2	30.71 ± 0.52	0.13 ± 0.01	93.59 ± 0.94
4	31.73 ± 0.61	0.14 ± 0.02	93.10 ± 1.06

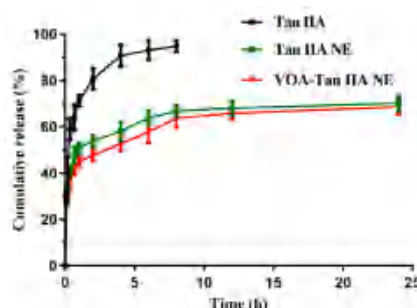
2.2.4 Tan II A 含量测试条件 采用高效液相色谱法, 色谱柱: WondaSil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长: 270 nm。流动相为甲醇: 水 (80 : 20, V/V), 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 柱温: 35℃, 进样量: 10 μL。

2.2.5 包封率的测定 采用超滤离心法测定 VOA-Tan II A NE 的包封率 (EE%)。精密量取 0.2 mL VOA-Tan II A NE 溶液稀释后取 1.0 mL 置于超滤离心管中, 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 滤液过膜后进样, 测定游离 Tan II A 含量 (W_1)。另精密量取 0.2 mL 的 VOA-Tan II A NE 溶液, 加等量甲醇超声破乳, 过膜后进样, 得到 VOA-Tan II A NE 中总 Tan II A 含量 (W_2)。EE (%) = ($W_2 - W_1$) / $W_2 \times 100\%$, 结果制剂的 EE 为 (96.58 ± 0.26) %, 说明此载体能较好地包载药物 Tan II A。

2.2.6 体外释放研究 精密量取 1 mL 的 Tan II A、Tan II A NE 和 VOA-Tan II A NE 溶液分别置于透析袋中, 于含 100 mL 含 1% 吐温 -80 的释放介质 (pH 7.4 的 PBS) 的烧杯中, 37℃ 水浴中振荡 (100 r · min⁻¹)。分别在 0.083、0.167、0.333、0.667、1、2、4、6、8、12、24 h 取样 0.2 mL 并同时补充相同体积释放介质。所取样品过膜后, 按“2.2.4”项下条件进样, 计算 Tan II A 浓度, 并计算累积释放百分率 (Q): $Q(\%) = \{C_i \times V_1 + (C_1 + C_2 + \dots + C_{i-1}) \times V_2\} / M \times 100\%$, 式中 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 Tan II A 浓度, V_1 代表释放介质总体积, V_2 代表所取样品体积, M 代表药物 Tan II A 初始质量。从图 4 释放结果可知, Tan II A 在 4 h 内几乎释放 90%, 而 VOA-Tan II A NE 在 12 h 内累积释放量为 65.8%。可见, VOA-Tan II A NE 在体外呈缓释特性。

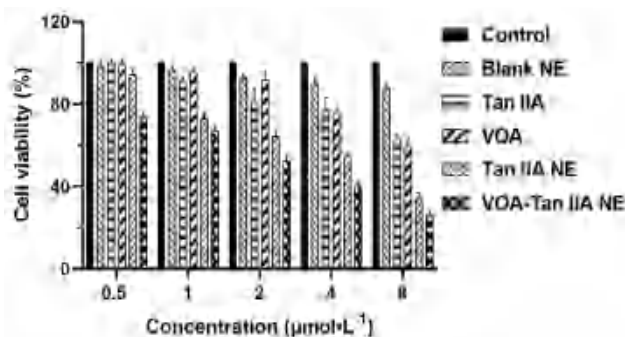
2.3 VOA-Tan II A NE 体外抗肿瘤活性研究

将对数生长期 C6 细胞胰酶消化后接种至 96 孔板内 (5×10^3 个 / 孔), 孵育 24 h 后, 实验组各孔加入对应药物 ($n = 3$)。孵育 24 h 后每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 继续孵育 0.5 h 后置于酶标仪 (450 nm) 下检测吸光度值 (A), 计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = ($A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}$) / ($A_{\text{空白}} - A_{\text{调零}}$) × 100%, 其中 $A_{\text{给药}}$ 代表含细胞加药物组 A 值, $A_{\text{空白}}$ 代表细胞加空白培养基组 A 值, 而 $A_{\text{调零}}$

图 4 Tan II A 和 VOA-Tan II A NE 的释放曲线 ($n = 3$)Fig 4 Tan II A release profiles from VOA-Tan II A NE ($n = 3$)

代表无细胞的空白培养基组 A 值。

结果如图 5 所示, 空白纳米乳对细胞无明显毒性, 存活率均超过 85%, 说明该载体安全。Tan II A ($IC_{50} = 12.65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、VOA 溶液 ($IC_{50} = 13.35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Tan II A NE ($IC_{50} = 4.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 VOA-Tan II A NE ($IC_{50} = 2.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 C6 细胞均有一定的抑制作用, 并呈现浓度依赖性。Tan II A NE 和 VOA-Tan II A NE 对 C6 细胞均具有明显的抑制作用, Tan II A NE 和 VOA-Tan II A NE 的 IC_{50} 值分别是为 Tan II A 的 0.33 倍和 0.18 倍。与 Tan II A、VOA 及 Tan II A NE 相比, VOA-Tan II A NE 对 C6 细胞增殖的抑制能力最强。

图 5 Tan II A 溶液、VOA 溶液、Tan II A NE 和 VOA-Tan II A NE 对 C6 细胞的存活率的影响 ($n = 3$)Fig 5 Effect of Tan II A solution, VOA solution, Tan II A NE and VOA-Tan II A NE on the cell viability of C6 cells ($n = 3$)

2.4 VOA-Tan II A NE 在体外血脑屏障下抗肿瘤活性研究

2.4.1 BMEC/C6 共培养模型的建立 利用 BMEC 细胞建立体外 BBB 模型^[15]: 以每孔 2×10^4 个细胞密度种于 12 孔板 Transwell 小室中, 连续孵育 5 ~ 7 d 后, 检测电阻值 TEER。结果发现, TEER 值为 (243.04 ± 8.75) $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 3$), 高于 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, 表明体外 BBB 模型建立成功。同时, 将 C6 细胞接种在另一 12 孔板中培养过夜, 将铺有 BMEC 细胞的 Transwell 小室转移至培养 C6 细胞的 12 孔板中, 进行 BMEC/C6 共培养孵育^[16]。

2.4.2 VOA-Tan II A NE 在体外血脑屏障下抗肿瘤活性评价 BMEC/C6 共培养孵育 24 h 后, 分别于上室加入相应药物溶液孵育 24 h。采用 CCK8 法检测各组 C6 细胞活力, 结果如图 6 所示。与 Tan II A 溶液相比, VOA-Tan II A NE 能有效透过 BBB, 显著抑制了体外 BBB 下 C6 细胞的增殖。因此, VOA-Tan II A NE 可促透 Tan II A 透过 BBB, 有利于提高其向脑部递送, 提高抗脑胶质瘤活性。

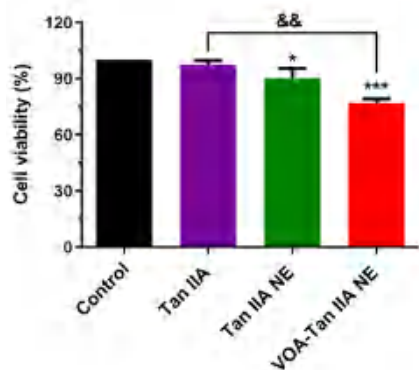


图 6 Tan II A 溶液、Tan II A NE 和 VOA-Tan II A NE 培养 24 h 对 C6 细胞存活率的影响 ($n = 3$)

Fig 6 Effect of Tan II A solution, Tan II A NE and VOA-Tan II A NE culturing for 24 h on the cell viability of C6 cells ($n = 3$)

注: 与 Tan II A 溶液相比, $\&\&P < 0.01$; 与对照组相比, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ 。

Note: Compared with the Tan II A solution, $\&\&P < 0.01$; compared with the control group, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$.

2.5 VOA-Tan II A NE 的安全性评价

2.5.1 血管刺激性实验 家兔随机分成两组, 每组家兔右耳缘静脉注射相应药物 Tan II A 及 VOA-Tan II A NE, 左耳缘静脉注射等量生理盐水作为空白对照。每日给药 1 次 (剂量为 $2.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续 3 d。每组于最后一次给药 12 h 后处死, 取自距离靠近心脏的注射部位 1 cm 处组织进行 HE 染色观察。如图 7 所示, 空白对照组血管内壁完整无明显红肿, 表明生理盐水对兔耳基本没有刺激性; 而 Tan II A 组血管红肿, 管周疏松的结缔组织存在大量的嗜中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润。VOA-Tan II A NE 组兔耳有少量充血, 血管壁及管周基本完好, 未见其他明显异常, 说明 VOA-Tan II A NE 安全性较好, 可用于静脉注射给药。

2.5.2 溶血性实验 在实验中, 阴性对照组、阳性对照组分别用生理盐水、蒸馏水处理。将 2% 兔红细胞悬液加入含有生理盐水、蒸馏水和不同浓度 VOA-Tan II A NE 溶液 (3.125 、 6.25 、 12.5 、 25 、 50 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的离心管中。混合后分别孵育 1、2 和 4 h, 然后 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。上清液于 545 nm 处测定 A , 计算各组溶血率

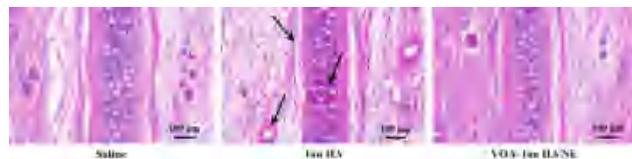


图 7 生理盐水、Tan II A 溶液、VOA-Tan II A NE 给药后静脉血管切片 HE 染色

Fig 7 HE staining of venous vessel sections after administration of normal saline, Tan II A solution and VOA-Tan II A NE

(HR), $\text{HR}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$ 。

如图 8 所示, 生理盐水组为澄清透明的液体, 离心管底部的红细胞没有溶血。阳性对照组为红色液体, 没有沉淀, 说明红细胞全部溶血。VOA-Tan II A NE 实验组液体澄清, 离心管底部有红细胞沉淀, 说明没有发生溶血现象。在本研究范围内 VOA-Tan II A NE 溶血率均低于 5%, 说明制剂安全性良好, 可用于静脉注射。

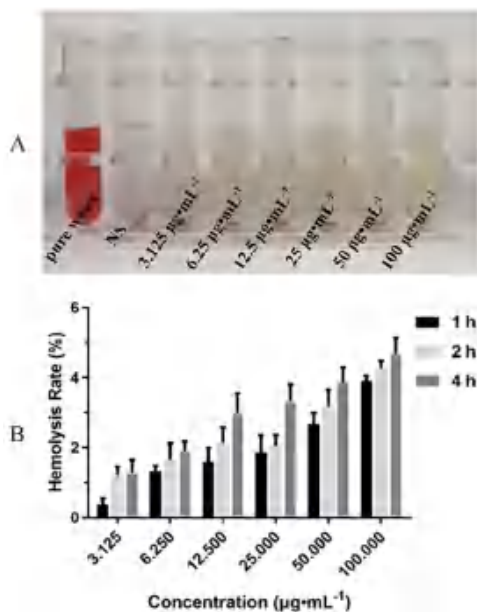


图 8 不同浓度 VOA-Tan II A NE 的溶血照片 (A) 和溶血率 (B)

Fig 8 Hemolysis photos (A) and hemolysis rate (B) of different concentrations of VOA-Tan II A NE

2.6 VOA-Tan II A NE 的药动力学研究

2.6.1 实验设计及给药方式 SPF 级 SD 大鼠 18 只, 给药前禁食 12 h, 自由饮水, 随机分为 Tan II A 原料药组、Tan II A NE 组、VOA-Tan II A NE 组。采用尾静脉注射给药 (各组以 Tan II A 换算剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。分别于给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 眼眶静脉取血 $500 \mu\text{L}$, 离心后取上清液待测。

2.6.2 Tan II A 检测方法 采用超高效液相色谱法测定: 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$), 流动相为甲

醇:水 (80:20, V/V), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 270 nm , 进样量 $2 \mu\text{L}$, 柱温 35°C 。

2.6.3 血浆样品处理方法 取大鼠血浆 $80 \mu\text{L}$, 依次加入 $10 \mu\text{L}$ Tan II A、内标溶液及 1 mL 乙酸乙酯涡旋, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液置于 EP 管中, 37°C 氮气吹干。最后加入 $100 \mu\text{L}$ 甲醇复溶, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液进 UPLC 分析。

2.6.4 标准曲线的建立 取 Tan II A 标准储备液按照“2.6.3”项下方法处理后加入空白血浆和内标 Tan I 溶液配制成 Tan II A 终质量浓度分别为 0.025 、 0.050 、 0.10 、 0.50 、 2.50 、 5.00 、 10.00 、 15.00 和 $20.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样本。样品按照“2.6.3”项下方法处理, 再按“2.6.2”项下方法进样分析, 以峰面积比 (R_i) 为纵坐标 ($R_i = A_{\text{Tan II A}}/A_{\text{Tan I}}$), Tan II A 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 0.1623X + 0.0019$ ($R^2 = 0.9997$)。结果表明 Tan II A 大鼠血浆质量浓度在 $0.025 \sim 20.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积比线性关系良好。

2.6.5 实验结果 血浆样品按照“2.6.3”项下方法处

理, 再经“2.6.2”项下条件测定后, 采用 Graph Pad Prism 8 和 DAS 2.0 软件分别绘制血药浓度-时间曲线及拟合计算药动学参数, 结果见图 9 及表 3。结果表明, Tan II A NE 组和 VOA-Tan II A NE 组相对于 Tan II A 组, 其 $AUC_{0 \sim t}$ 分别增加了 1.91 倍和 2.57 倍, 说明 VOA-Tan II A NE 的生物利用度较高, 可以在较长时间内保持较高的血药浓度。

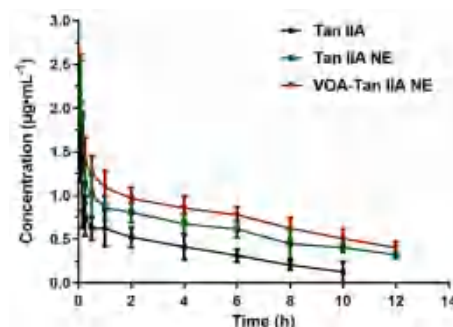


图 9 静脉注射给药后 Tan II A 溶液、Tan II A NE 和 VOA-Tan II A NE 的平均血药浓度-时间曲线

Fig 9 Mean plasma concentration-time course of Tan II A solution, Tan II A NE and VOA-Tan II A NE in rats' plasma after intravenous administration

表 3 静脉注射 Tan II A 各制剂后 Tan II A 的药动学参数 ($n = 6$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of Tan II A in plasma after intravenous administration ($n = 6$)

制剂	$t_{\max}/\text{h}$	$C_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$t_{1/2}/\text{h}$	$AUC_{0 \sim t}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	$CL/[L/(h \cdot \text{kg})]$
Tan II A	0.083	1.431 ± 0.270	4.609 ± 1.846	3.575 ± 0.867	4.157 ± 0.884
Tan II A NE	0.083	2.061 ± 0.482	7.888 ± 3.087	6.823 ± 1.438	1.825 ± 0.295
VOA-Tan II A NE	0.083	2.161 ± 0.462	8.141 ± 2.785	9.178 ± 1.485	1.419 ± 0.290

3 结论

根据课题组前期研究基础^[14]及预实验结果, 本研究采用剪切搅拌法制备 VOA-Tan II A NE 的最优处方中 VOA/MCT/CEL/1, 2-丙二醇/水的质量比为 $0.16:0.32:0.84:0.28:5$ 。所制 VOA-Tan II A NE 呈球形, 粒径小、分布均匀。VOA-Tan II A NE 体外释放曲线显示出一定的缓释行为, 对 C6 细胞具有较强的抗肿瘤作用。同时, 在 BMEC/C6 共培养模型中发现 VOA-Tan II A NE 可有效透过 BBB 抑制 C6 增殖。血管刺激性和血液相容性测试发现, VOA-Tan II A NE 在 $3.125 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与血液相容性良好。体内血药浓度-时间曲线及药动学参数结果显示 VOA-Tan II A NE 的 $t_{1/2}$ 和 $AUC_{0 \sim t}$ 分别为 Tan II A 的 1.77 倍和 2.57 倍, 表明 VOA-Tan II A NE 有效提高了 Tan II A 的生物利用度。

本研究将纳米乳液与 VOA 联合包载 Tan II A, 有效解决了 Tan II A 的水溶性低和半衰期短等问题, 增加了 Tan II A 抗肿瘤活性和生物利用度, 有望成为脑胶质瘤等脑部疾病治疗的新型给药系统。

参考文献

- [1] Jiang T, Nam DH, Ram Z, et al. Clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas [J]. Cancer Lett, 2021, 499: 60-72.
- [2] 魏曼, 张楠, 张宇佳, 等. 冰片在促进药物跨血脑屏障转运中的应用[J]. 中南药学, 2017, 15(10): 1409-1412.
- [3] Guo R, Li L, Su J, et al. Pharmacological activity and mechanism of tanshinone II A in related diseases [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 4735-4748.
- [4] Xu L, Xu Y, Zhu Z, et al. Tanshinone II A attenuates renal injury during hypothermic preservation via the MEK/ERK1/2/GSK-3 β pathway [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 257-269.
- [5] Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques [J]. ISRN Pharm, 2012, 2012: 1-10.
- [6] Handa M, Ujjwal RR, Vasdev N, et al. Optimization of surfactant and cosurfactant-aided pine oil nanoemulsions by isothermal low-energy methods for anticholinesterase activity [J]. ACS Omega, 2020, 6(1): 559-568.
- [7] Dordević SM, Cekić ND, Savić MM, et al. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery

- of risperidone: design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation [J]. Int J Pharm, 2015, 493: 40-54.
- [8] Zang ZZ, Chen ML, Liu Y, et al. Uncovering the protective mechanism of the volatile oil of Acorus tatarinow II against acute myocardial ischemia injury using network pharmacology and experimental validation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6630795.
- [9] Zhang YL, Long Y, Yu S, et al. Natural volatile oils derived from herbal medicines: a promising therapy way for treating depressive disorder [J]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105376.
- [10] Handa M, Ujjwal RR, Vasdev N, et al. Optimization of surfactant and cosurfactant-aided pine oil nanoemulsions by isothermal low-energy methods for anticholinesterase activity [J]. ACS Omega, 2020, 6 (1): 559-568.
- [11] 汪鼎. 定志小丸中石菖蒲促进 5 种皂苷类成分“脑靶向”特性的研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- [12] 李冀, 李想, 高彦宇, 等. 中药石菖蒲研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21 (10): 13-17.
- [13] 于洁, 董娟妮, 吴一振, 等. 石菖蒲对大鼠中丹参素和原儿茶酸药动学的影响 [J]. 中成药, 2013, 35 (10): 2126-2129.
- [14] Wang B, Hong L, Liu Y, et al. Preparation, preliminary pharmacokinetics and brain tissue distribution of Tanshinone II A and Tetramethylpyrazine composite nanoemulsions [J]. Pharm Dev Technol, 2019, 24 (10): 1236-1242.
- [15] Rodrigues BDS, Oue H, Banerjee A, et al. Dual functionalized liposome-mediated gene delivery across triple co-culture blood brain barrier model and specific in vivo neuronal transfection [J]. J Control Release, 2018, 286: 264-278.
- [16] Masoud F, Solmaz MJ, Salar H, et al. Enhanced BBB and BBTB penetration and improved anti-glioma behavior of Bortezomib through dual-targeting nanostructured lipid carriers [J]. J Control Release, 2022, 345: 371-384.
- (收稿日期: 2023-02-13; 修回日期: 2023-03-19)

基于杀酶保苷的经典名方中“去皮尖研泥”桃仁的 煨制工艺研究

马艳红¹, 寇娜娜¹, 宋婉婷¹, 李丹^{1, 2}, 王淑君^{1*} (1.沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2.沈阳君弘医药科技有限公司, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 通过比较不同煨桃仁炮制品的苦杏仁酶活性及煎煮入汤剂后的苦杏仁苷含量, 探讨经典名方中“去皮尖研泥”使用的桃仁的最佳炮制工艺。**方法** 通过苦味酸-碳酸钠试纸变色反应测定不同煨桃仁炮制品中苦杏仁酶的活性, 采用不同煨桃仁炮制品制备桃红四物汤, 通过 HPLC 测定苦杏仁苷含量, 考察沸水中煎煮时间对苦杏仁苷含量的影响, 采用 15 批不同产地桃仁进行工艺重现。**结果** 当桃仁“去皮尖”后再于沸水中煮 10 min 及以上时苦杏仁酶完全灭活; 桃仁“去皮尖”后研泥煎煮苦杏仁苷含量 (S_2) 远低于其原药煎煮的含量 (S_1); 桃仁“去皮尖”后再次于沸水中煎煮时, 随着煎煮时间的增加, 苦杏仁苷的含量先增加后减少, 煎煮 10 min 时含量 (S_5) 最高, 且高于 S_1 ; 15 批桃仁炮制所得煨桃仁苦杏仁酶完全灭活, 含量符合规定。“去皮尖研泥”使用的桃仁最佳煨制工艺为: 取生桃仁适量, 置 10 倍量沸水中煮 3 min, 冷水中泡 1 min, 除去种皮, 再于沸水中煮 10 min, 捞出, 60℃低温干燥 4 h。**结论** 该煨制工艺重现性良好, 可达到杀酶保苷、增效减毒的作用, 且有利于有效成分煎出, 提高疗效, 为古方中桃仁“去皮尖研泥”的现代化应用、桃仁的炮制技术规范及质量控制提供参考, 有利于促进经典名方的创新开发与研究。

关键词: 经典名方; 桃红四物汤; 桃仁; 苦杏仁苷; 苦杏仁酶; 杀酶保苷

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1447-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.008

作者简介: 马艳红, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新药的研究与开发, email 15890958229@163.com * **通信作者:** 王淑君, 女, 教授, 博士, 主要从事药物新剂型与药物动力学研究, email 101030124@syphu.edu.cn

Process of peach kernel for “peeling and grinding mud” in classic prescriptions based on glycoside protection by inactivating the enzyme

MA Yan-hong¹, KOU Na-na¹, SONG Wan-ting¹, LI Dan^{1,2}, WANG Shu-jun^{1*} (1. *Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016*; 2. *Shenyang Junhong Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Shenyang 110016*)

Abstract: Objective To determine the optimal process of peach kernel for “peeling and grinding mud” in classic prescriptions by comparing the activity of emulsin in different processed peach kernel products and the content of amygdalin after decoction. **Methods** The activity of emulsin in different processed peach kernel products was determined by the discoloration reaction of picric acid-sodium carbonate test paper, and processed peach kernel products were prepared for Taohong Siwu decoction. The content of amygdalin was determined by HPLC, and the effect of decoction time in boiling water on the content of amygdalin was determined. Fifteen batches of peach kernel from different origins were used to repeat the process. **Results** When the peach kernels were “peeled and tipped” and then boiled in water for over 10 min, the emulsin was completely inactivated. The content of amygdalin (S_2) was much lower than the content of its original medicine decoction (S_1). When the peach kernel was “peeled and tipped” and then decocted in boiling water again, with the increase of decoction time, the content of amygdalin first increased and then decreased. The content was the highest after decoction for 10 min (S_5), and was higher than that of S_1 . The amygdala enzyme in the 15 batches of processed peach kernel was completely inactivated, and the content met the requirements. The best process for peach kernel after “peeling and grinding mud” was as follows: an appropriate amount of raw peach kernel, boiling in 10 times of boiling water for 3 min, soaking in cold water for 1 min, removing the seed coats, reboiling for 10 min, and dring at 60 °C for 4 h. **Conclusion** The process has good reproducibility, which can inactivate the enzyme, protect glycosides, enhance efficacy and reduce toxicity, and is conducive to the decoction of active ingredients and improves the curative effect. This method provides reference for the modern application of “peeling, sharpening and grinding” for peach kernels in ancient recipes, as well as the processing technical specifications and quality control of peach kernels, and is conducive to promoting the innovative development and research of classic recipes.

Key words: classic prescription; Taohong Siwu decoction; peach kernel; amygdalin; emulsin; glycoside protection by inactivating the enzyme

桃仁是临床常用中药, 具有活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘的功效^[1-3]。苦杏仁苷作为桃仁的主要有效成分之一, 具有免疫调节、镇痛抗炎、抗肿瘤等药理作用^[4-6], 但桃仁含有的苦杏仁酶可破坏苦杏仁苷, 使药效降低, 同时分解出大量氢氰酸而产生毒副作用^[7-8]。故临床上通常将桃仁炮制使用, 以达到杀酶保苷的作用, 焯制是较为常见的炮制方法。桃仁焯制多采用“去皮尖”的工艺, 但古方中亦有“去皮尖研泥”使用的工艺, 例如经典名方桃红四物汤处方中桃仁为“去皮尖研泥”使用。此工艺中苦杏仁苷是否因发生酶解反应而损失及研泥使用的桃仁焯制工艺均未见文献报道。苦杏仁若原药

入药煎汤, 因为苦杏仁酶与苦杏仁苷分别处于不同细胞, 苦杏仁酶对苦杏仁苷无破坏作用; 但若将苦杏仁压碎后煎汤, 苦杏仁苷与苦杏仁酶反应而损失^[9]。同理推测“去皮尖研泥”桃仁苦杏仁苷含量明显下降的原因是“去皮尖研泥”过程中细胞壁被破坏, 苦杏仁苷发生酶解反应造成损失, 故“去皮尖研泥”使用的桃仁应与“去皮尖”使用的桃仁炮制方法有所区别。为解决“去皮尖研泥”桃仁中苦杏仁苷酶解损失的问题, 本研究以沸水中煎煮的时间为变量, 苦杏仁苷含量、苦杏仁酶活性为指标, 以桃红四物汤为例, 对“去皮尖研泥”桃仁的炮制工艺进行研究, 并采用 15 批不同产地桃仁进行工

艺重现,以期达到完全灭活苦杏仁酶,减少苦杏仁苷的损失,为经典名方中“去皮尖研泥”使用的桃仁的工业化生产及质量控制提供参考。

1 材料

FA2004B 型电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司),EX125DZH 型电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司],全自动智能煎药壶(潮州市一壶百饮电器实业有限公司),LC-2010C 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司)。

苦杏仁苷对照品(质量分数:93.1%,批号:

110820-202109,中国食品药品检定研究院),苦味酸-碳酸钠试纸(北京华科盛精细化工产品贸易有限公司),水为纯化水,甲醇为色谱纯(山东禹王和天下新材料有限公司),磷酸为分析纯[利安隆博华(天津)医药化学有限公司]。酒地黄饮片(河北金叶子药业有限公司),酒当归饮片、酒白芍饮片、川芎饮片、生桃仁、红花饮片(河北华都药业有限公司),经沈阳药科大学药学院王淑君教授鉴定,各饮片均符合《中国药典》2020 年版一部相关项下的性状规定,详见表 1。15 批生桃仁样品信息见表 2。

表 1 桃红四物汤的饮片信息

Tab 1 Information on the pieces of Taohong Siwu decoction

饮片名称	产地	基原
酒地黄	河南	玄参科地黄属植物地黄 <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. 的干燥块根的酒制品
酒当归	甘肃	伞形科当归属植物当归 <i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels 的干燥根的酒制品
酒白芍	安徽	毛茛科芍药属植物芍药 <i>Paeonia lactiflora</i> Pall. 的干燥根的酒制品
川芎	四川	伞形科藁本属植物川芎 <i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort. 的干燥根茎
生桃仁	山西	蔷薇科樱桃属植物桃 <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch 的干燥成熟种子
红花	新疆	菊科红花属植物红花 <i>Carthamus tinctorius</i> L. 的干燥花

表 2 15 批生桃仁样品信息

Tab 2 Sample information sheet of 15 batches of raw peach kernel

编号	品种	产地	编号	品种	产地	编号	品种	产地
T1	生桃仁	山西	T6	生桃仁	河南	T11	生桃仁	山东
T2	生桃仁	山西	T7	生桃仁	山西	T12	生桃仁	陕西
T3	生桃仁	山西	T8	生桃仁	山西	T13	生桃仁	甘肃
T4	生桃仁	山西	T9	生桃仁	河南	T14	生桃仁	河北
T5	生桃仁	河南	T10	生桃仁	山西	T15	生桃仁	山西

2 方法与结果

2.1 炮制品制备

取生桃仁 T1 适量,置 10 倍量沸水中煮 3 min,冷水中泡 1 min,除去种皮,60℃低温干燥 4 h^[10],即得燂桃仁炮制品 TR₀。取生桃仁 T1 适量,置 10 倍量沸水中煮 3 min,冷水中泡 1 min,除去种皮,再分别于沸水中煮 5、8、10、15、20 min,捞出,60℃低温干燥 4 h,即得燂桃仁炮制品 TR_{5 min}、TR_{8 min}、TR_{10 min}、TR_{15 min}、TR_{20 min}。

2.2 苦杏仁酶活性检验^[11-12]

分别取不同燂桃仁炮制品粗粉 0.2 g 于具塞试管中,加水使其浸润,在试管口悬挂一条苦味酸-碳酸钠试纸,塞紧试管口,将试管置 60℃水浴中加热 30 min,观察试纸颜色变化,加热 30 min 后结果见图 1。根据苦杏仁酶活性检验结果可知,桃仁去皮尖(TR₀)后并未完全灭活苦杏仁酶,试纸由黄色变为深红色,对其进行再次炮制,随着沸水中炮制时间的增加,试纸逐渐变浅红色,说明苦杏仁酶逐渐灭活,炮制 10 min (TR_{10 min}) 时试纸未变色即苦杏仁酶完全灭活。

2.3 桃红四物汤溶液的制备

按照《古代经典名方目录(第一批)》^[13]中桃红四物汤的处方组成以及剂量换算和前期研究结果,称取酒地黄饮片 11.19 g,酒当归饮片 14.92 g,酒白芍饮片 5.60 g,川芎饮片 3.73 g,燂桃仁 3.78 g,酒红花 3.73 g,加入 12 倍量水,浸泡 1 h 后,武火煮沸后文火煎煮 40 min,倾出药液,药材残渣加入 12 倍量水,武火煮沸后文火煎煮 20 min,合并两次煎液,过滤,即得。

2.4 桃红四物汤中苦杏仁苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Amethyst C18-H (4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液,梯度洗脱(0~25 min, 15%甲醇;25~40 min, 50%甲醇;40~50 min, 15%甲醇);检测波长 210 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样体积 10 μL;柱温 25℃。

2.4.2 对照品溶液的制备 取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加甲醇-0.1%磷酸溶液(15:85)制成每 1 mL 约含苦杏仁苷 50 μg 的溶液,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密量取桃红四物汤

溶液 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，用甲醇-0.1% 磷酸溶液（15：85）稀释至刻度，摇匀即得。

2.4.4 定量限 取对照品溶液逐级稀释，当 S/N 为 10 时，所进样品量定为定量限，测得定量限为 $0.2957 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.5 线性关系考察 取苦杏仁苷对照品适量，精密称定，加甲醇-0.1% 磷酸溶液（15：85）制成每 1 mL 约含苦杏仁苷 $500 \mu\text{g}$ 的溶液，即得对照品储备液。将其逐级稀释，制得质量浓度分别约为 0.3（定量限浓度）、25、50、75、 $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。进样测定，以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，得回归方程 $Y = 9299.3X - 3186.4$ ，线性相关系数 r 为 0.9999，表明苦杏仁苷在 $0.3 \sim 125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好线性关系。

2.4.6 精密度试验 取同一对照品溶液，连续进样测定 6 次，计算得苦杏仁苷峰面积的 RSD 为 0.94%，表明仪器精密度良好。

2.4.7 重复性试验 取同一批桃红四物汤溶液，按“2.4.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，计算得苦杏仁苷峰面积的 RSD 为 2.2%，表明该方法重复性良好。

2.4.8 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 进样测定，计算得苦杏仁苷峰面积的 RSD 为 0.86%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.9 加样回收试验 精密量取已知含量的同一批桃红四物汤 9 份，分别按已知含量的 50%、100%、150% 水平精密加入对照品溶液 0.1、0.2、0.3 mL，每个水平 3 份，制备低、中、高浓度供试品溶液，进样测定，计算得低、中、高浓度平均回收率分别为 96.0%、94.5%、94.6%， RSD 分别为 1.6%、0.80%、2.3%。结果表明该方法准确度良好。

2.4.10 桃红四物汤中苦杏仁苷含量测定 取燀桃仁炮制品 TR_0 直接入药和燀桃仁炮制品 TR_0 、 $\text{TR}_{5 \text{ min}}$ 、 $\text{TR}_{8 \text{ min}}$ 、 $\text{TR}_{10 \text{ min}}$ 、 $\text{TR}_{15 \text{ min}}$ 、 $\text{TR}_{20 \text{ min}}$ 研泥入药，按“2.3”项下方法煎煮得 7 份桃红四物汤溶液，精密

量取桃红四物汤溶液 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀，即得供试品溶液 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 、 S_5 、 S_6 、 S_7 。取各供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$ ，进样测定，计算苦杏仁苷含量（见表 3）。结果可知， S_1 苦杏仁苷含量远高于 S_2 ，随着沸水中炮制时间的增加，燀桃仁研泥入药后苦杏仁苷含量先增加后降低，炮制 10 min（ $\text{TR}_{10 \text{ min}}$ ）其苦杏仁苷含量 S_5 最高。

表 3 桃红四物汤中苦杏仁苷的含量
Tab 3 Content of amygdalin content in Taohong Siwu decoction

样品	含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
S_1	1.71
S_2	0.47
S_3	1.19
S_4	1.52
S_5	1.80
S_6	1.68
S_7	1.47

3 工艺重现性研究

3.1 燀桃仁的制备

燀制工艺 1：取生桃仁 $T_1 \sim T_{15}$ 适量，置 10 倍量沸水中煮 3 min，冷水中泡 1 min，除去种皮， 60°C 低温干燥 4 h 即得燀桃仁 1（ $T_1 \sim T_{15}$ ）。

燀制工艺 2（最佳燀制工艺）：取生桃仁 $T_1 \sim T_{15}$ 适量，置 10 倍量沸水中煮 3 min，冷水中泡 1 min，除去种皮，再于沸水中煮 10 min，捞出， 60°C 低温干燥 4 h 即得燀桃仁 2（ $T_1 \sim T_{15}$ ）。

3.2 生桃仁、燀桃仁 1、燀桃仁 2 苦杏仁酶活性检验

按“2.2”项下方法检验生桃仁、燀桃仁 1、燀桃仁 2，结果见图 2。15 批生桃仁试纸为深红色，15 批燀桃仁 1 试纸为红色，15 批燀桃仁 2 试纸未变色。

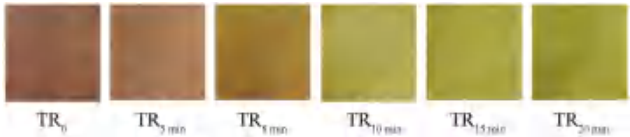


图 1 苦杏仁酶活性检验图

Fig 1 Bitter almond enzyme activity test chart

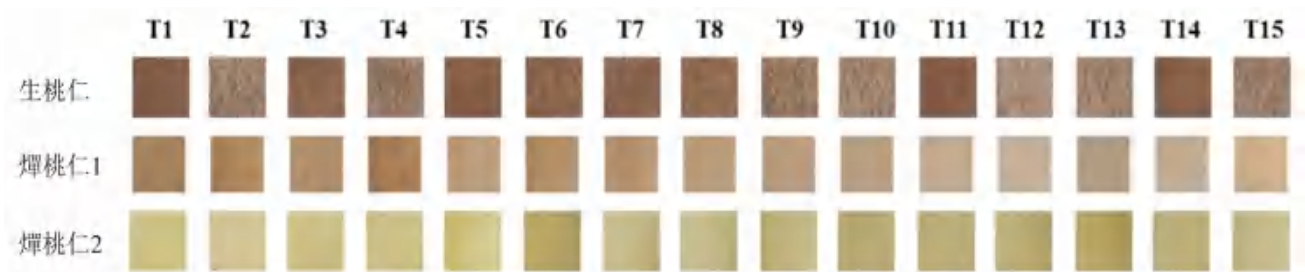


图 2 苦杏仁酶活性检验图

Fig 2 Bitter almond enzyme activity test chart

3.3 生桃仁、燂桃仁中苦杏仁苷的含量测定

3.3.1 色谱条件 色谱柱: Amethyst C18-H (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (20:80); 检测波长为 210 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积 10 μL; 柱温 25℃。

3.3.2 对照品溶液的制备 取苦杏仁苷对照品适量, 精密称定, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 约含苦杏仁苷 80 μg 的溶液, 即得。

3.3.3 供试品溶液的制备 取本品粗粉约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加石油醚 (60~90℃) 50 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 弃去石油醚液, 药渣及滤纸挥干溶剂, 放入原锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得^[1]。

3.3.4 生桃仁、燂桃仁苦杏仁苷含量测定 分别取生桃仁粗粉、燂桃仁粗粉约 0.3 g, 各精密称定 15 份, 按“3.3.3”项下方法制备供试品溶液。精密吸取各批生桃仁和燂桃仁供试品溶液各 10 μL, 进样测定, 得到色谱图, 分别将 15 批生桃仁和 15 批燂桃仁指纹图谱导入“中药指纹图谱相似度评价系统 (2012.0 版本)”, 生成指纹图谱叠加图 (见图 3), 计算苦杏仁苷含量 (见表 4)。结果可知, 15 批生桃仁苦杏仁苷含量为 2.5~3.2 mg·g⁻¹, 15 批燂桃仁苦杏仁苷含量为 2.1~2.6 mg·g⁻¹, 符合《中国药典》规定。

表 4 生桃仁与燂桃仁苦杏仁苷的含量测定结果 (mg·g⁻¹)

Tab 4 Content of amygdalin content in raw peach kernel and processed peach kernel product (mg·g⁻¹)

编号	生桃仁	燂桃仁
T1	3.1	2.6
T2	3.0	2.4
T3	2.8	2.5
T4	2.7	2.4
T5	2.9	2.3
T6	2.8	2.3
T7	2.5	2.4
T8	2.5	2.3
T9	2.8	2.2
T10	3.0	2.3
T11	2.7	2.1
T12	2.9	2.2
T13	3.0	2.4
T14	3.2	2.6
T15	3.2	2.5

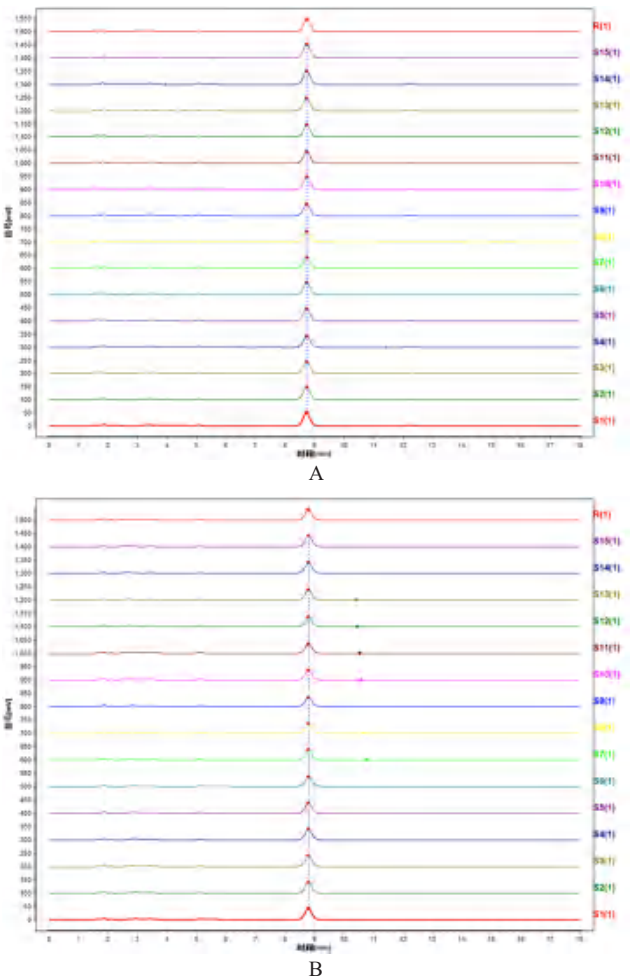


图 3 15 批生桃仁 (A) 及燂桃仁 (B) 指纹图谱叠加图
Fig 3 Fingerprint and chromatogram of 15 batches of raw peach kernel (A) and processed peach kernel product (B)

4 讨论

桃仁为活血化瘀之要药, 桃红四物汤的君药, 苦杏仁苷是其主要有效成分之一^[14]。在潮湿条件下苦杏仁苷易被桃仁含有的苦杏仁酶水解产生氢氰酸, 苦味酸-碳酸钠试纸能对氢氰酸定性鉴别, 从而确定桃仁炮制后苦杏仁酶是否完全灭活。根据苦杏仁酶活性检验结果可知, 桃仁去皮尖 (TR₀) 后并未完全灭活苦杏仁酶, 试纸由黄色变为深红色, 对其进行再次炮制, 随着沸水中炮制时间的增加, 试纸逐渐变浅红色, 说明苦杏仁酶逐渐灭活, 炮制 10 min (TR_{10 min}) 时试纸未变色即苦杏仁酶完全灭活。

由“去皮尖”桃仁 (TR₀) 原药入汤剂 (S₁) 和研泥入汤剂 (S₂) 的结果可知, S₁ 苦杏仁苷含量远高于 S₂, 证明了推测: 苦杏仁酶与苦杏仁苷分别处于桃仁不同细胞, 当其研泥入汤剂 (S₂) 时细胞壁被破坏, 苦杏仁酶与苦杏仁苷相遇发生水解反应, 苦杏仁苷含量降低。将桃仁“去皮尖”后再放

入沸水中炮制所得的炮制品研泥入汤剂的苦杏仁苷含量均高于 S_2 ，说明二次炮制具有杀酶保苷的作用， S_5 苦杏仁苷含量最高，且高于 S_1 ，说明研泥有利于有效成分煎出； S_3 和 S_4 含量较低推测因为炮制时间较短，桃仁内部温度未达到苦杏仁酶灭活温度所致；同时苦杏仁苷易溶于水，在炮制过程中苦杏仁苷会有所损失，由 S_6 和 S_7 结果可知炮制时间越长，苦杏仁苷损失越多。综上所述，“去皮尖”的桃仁研泥使用时苦杏仁苷含量大幅降低，故“去皮尖研泥”使用的桃仁应与“去皮尖”使用的桃仁炮制方法有所区别；桃仁炮制过程中苦杏仁苷的损失由苦杏仁酶与苦杏仁苷发生水解反应和苦杏仁苷溶于水两方面造成，故应对其在沸水中炮制时间予以研究。本研究得出桃仁“去皮尖研泥”使用时其最佳炮制工艺为：取生桃仁适量，置 10 倍量沸水中煮 3 min，冷水中泡 1 min，除去种皮，再于沸水中煮 10 min，捞出，60℃低温干燥 4 h。

采用 15 批桃仁进行工艺重现，由图 2 可知，15 批炮制桃仁 1 苦杏仁酶仍有高活性，试纸呈红色，15 批炮制桃仁 2 苦杏仁酶完全灭活，试纸未变色，说明工艺重现性良好；并对 15 批生桃仁和 15 批炮制桃仁进行苦杏仁苷含量测定，结果 15 批生桃仁苦杏仁苷含量均大于 2.0%，15 批炮制桃仁苦杏仁苷含量均大于 1.60%，符合《中国药典》规定^[1]。

本研究所得最佳炮制工艺达到杀酶保苷、增效减毒的作用，为桃红四物汤中桃仁“去皮尖研泥”使用时苦杏仁苷含量的提高提供了有效的桃仁炮制方法，有利于经典名方的“古为今用”及古方中桃仁“去皮尖研泥”的现代化研究、质量控制和临床应用。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 290-291.
- [2] 张妍妍, 韦建华, 卢澄生, 等. 桃仁化学成分、药理作用及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 234-241.
- [3] 赵永见, 牛凯, 唐德志, 等. 桃仁药理作用研究近况[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 888-890.
- [4] 张德珂, 聂金娥, 钱芳芳. 中药苦杏仁药理作用研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(22): 100-102, 105.
- [5] 罗德梅, 刘青, 董旭南, 等. 苦杏仁苷对 II 型胶原诱导关节炎大鼠关节滑膜 ASIC3 表达的影响[J]. 中华全科医学, 2017, 15(11): 1839-1842, 1866.
- [6] 伍玉南. 苦杏仁苷通过 JAK2/STAT3 通路促进 T 细胞活性抑制 HBV 相关性肝癌进展的机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [7] 修春, 李铭源, 宓穗卿, 等. 桃仁的主要化学成分及药理研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(24): 1903.
- [8] 穆静. 苦杏仁苷的研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(5): 366.
- [9] 吕秉森, 胡云川. 破坏苦杏仁酶的方法比较[J]. 中国药理学杂志, 1981, 16(1): 23-24.
- [10] 张晓男, 魏惠珍, 吕尚, 等. 多指标综合评分法优化桃仁“炮制”炮制工艺[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(1): 403-407.
- [11] 许亚韬, 孙飞, 孟江, 等. 桃仁炮制机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 1-4.
- [12] 刘青, 肖炯昌, 张文芳, 等. 建立超高效液相色谱特征图谱评价桃仁饮片质量[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(11): 2639-2645.
- [13] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(7 首方剂)》的通知[EB/OL]. (2020-10-15) [2020-11-10]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html>.
- [14] 许筱凰, 李婷, 王一涛, 等. 桃仁的研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2649-2655.

(收稿日期: 2023-01-02; 修回日期: 2023-03-08)

黄芩苷微囊片的制备

刘润佳, 张赏玺, 郭荣, 韩翠艳* (齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: **目的** 制备黄芩苷微囊并对其处方工艺进行优化; 将微囊压制成片剂使其具有缓释作用。**方法** 采用单凝聚法制备微囊, 以包封率和载药量为评价指标, 星点设计响应面试验优化微囊处方工艺; 通过单因素试验, 以硬度、外观和崩解时间为指标, 确定乳糖和微晶纤维素用量, 得到片剂的最优处方工艺。**结果** 微囊最优处方工艺为温度 45℃, pH 3.9, 转速 550 r·min⁻¹ 制得的微囊分散性好, 载药量为 (22.80±0.33)%、包封率为 (82.40±0.45)%; 当黄芩苷微囊 50 mg, 乳糖 855 mg 和微晶纤维素 345 mg, 采用粉末直接压片法制得的片剂成型性好, 崩解时限 6 min, 24 h 释放达到 87.2%。**结论** 该处方工艺简单, 稳定可行, 粉末直接压片法能够得到成型性好的片剂, 具有一定的缓释作用。

关键词: 黄芩苷; 单凝聚法; 微囊; 星点设计响应面; 微囊片

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1453-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.009

Preparation of baicalin microcapsule tablets

LIU Run-jia, ZHANG Shang-xi, GUO Rong, HAN Cui-yan* (School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar Heilongjiang 161006)

Abstract: **Objective** To prepare baicalin microcapsules and optimize the formulation process, to compress the microcapsules into tablets with a sustained release effect. **Methods** The microcapsules were prepared by single coacervation method, and the encapsulation efficiency and drug loading were used as evaluation indicators. The central composite design and response surface methodology was used to optimize the microcapsule formulation process. The single factor test, hardness, appearance and disintegration time were used as indicators to determine the lactose and the dosage of microcrystalline cellulose to obtain the optimal formulation technology for the tablets. **Results** The optimal formulation process for microcapsules temperature was 45℃, pH 3.9, and rotation speed at 550 r·min⁻¹. The prepared microcapsules had good dispersibility, the drug loading was (22.80±0.33)%, the encapsulation efficiency was (82.40±0.45)%, the baicalin microcapsules was 50 mg, lactose was 855 mg and microcrystalline cellulose was 345 mg. The tablets obtained by the powder direct compression method had good formability. The disintegration time limit was 6 min, and the release reached 87.2% in 24 h. **Conclusion** The formulation process is simple, stable and feasible. The tablets with good formability can be obtained by direct powder compression method, which has a slow release effect.

Key words: baicalin; single coacervation method; microcapsule; central composite design and response surface methodology; microcapsule tablet

黄芩 (Scutellariae Radix) 是唇形科植物黄芩的干燥根, 其提取物黄芩苷 (Baicalin) 属于植物中最有效的抗氧化剂和最主要的黄酮类化合物之一, 在碱液中不稳定, 渐变暗棕色, 微溶于热冰醋酸, 难溶于甲酸、乙酸、丙酮, 几乎不溶于水、

乙醚、苯、氯仿等。黄芩苷具有抗菌、利尿、抗炎作用, 并能抑制醛糖还原酶, 还可以扩张血管, 促进胰岛素分泌, 降低血糖, 调节内分泌功能, 提高机体免疫力和增强抗病毒能力。黄芩苷还可以抑制体内黑色素的沉淀, 防止氧化和衰老, 清

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练 (No.202011230003)。

作者简介: 刘润佳, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物递送系统与靶向给药研究, email: 1349213788@qq.com *通信作者: 韩翠艳, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物递送系统与靶向给药研究, email: hcymuphar@qmu.edu.cn

除自由基,并减少活性氧对人体的损害^[1],但黄芩苷味苦,水溶性和口服生物利用度差,限制了它的临床应用^[2-3]。

微囊主要应用于药物的口服给药,改善药物的溶解能力、降低释放速率、掩盖或遮蔽药物的苦味与异味等^[4],然而微囊一般作为中间体,药物经微囊化进而制备成胶囊剂、片剂等其他剂型^[5];片剂具有质量稳定、剂量准确、易于储存和给药等优点,因此将药物制成微囊片,具有微囊和片剂的双重优势,能提高药效的发挥,起到缓释的作用,提高药物稳定性^[6-8]。本研究通过单凝聚法将黄芩苷制成微囊,并采用粉末直接压片法制备黄芩苷微囊片,使其能缓慢释放,减少服药剂量,提高患者生活质量,对黄芩苷新剂型研究具有重要意义。

1 材料

1.1 仪器

UV-2500 紫外分光光度计(昆山市超声仪器有限公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器、予华牌循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);CF0 型送风型定温干燥箱(天津市北华实验仪器有限公司);RCZ-8B 溶出试验仪(上海精胜科学仪器公司);78X-2 型片剂四用测定仪(上海黄海药检仪器有限公司);单冲压片机(北京国药龙立科技有限公司);奥林巴斯生物显微镜 CX31(北京澎昆博远科贸发展有限责任公司)。

1.2 试药

黄芩苷对照品(纯度>98%)、黄芩苷(上海诗丹德标准技术服务有限公司);明胶、硬脂酸镁(天津市福晨化学试剂厂);司盘 60(国药集团化学试剂有限公司);液体石蜡、无水乙醇(天津市天力化学试剂有限公司);50%戊二醛(天津市大茂化学试剂厂);正己烷、异丙醇、乳糖(天津市科密欧化学试剂有限公司);微晶纤维素(江西益普生药业有限公司)。

2 方法

2.1 黄芩苷微囊的制备

2.1.1 黄芩苷微囊的制备 精密称取明胶 1.0 g,加纯化水 5 mL,溶胀 30 min,45℃溶解,用 10%的醋酸溶液调 pH(3.9~4.1),保温备用,按芯材比加入黄芩苷原料药,充分搅拌,保温备用,取液体石蜡 12.5 mL 加司盘 60 0.25 g 溶解,在一定转速下将明胶溶液以线状加入到液体石蜡中,边加边搅拌,5 min 后,迅速冷却至 4℃以下,搅拌 20 min,加 50%戊二醛 5 mL 固化,以异丙醇 10

mL 脱水,冰箱放置 24 h,取出,抽滤,先以少量异丙醇洗涤,再用正己烷洗涤,抽干,45℃烘干得微囊^[9]。

2.1.2 载药量和包封率的测定 精密称取黄芩苷微囊适量于 10 mL 量瓶中,加入 50%乙醇 10 mL 超声 30 min,定容,在 278 nm 处测定吸光度,计算药物的载药量和包封率。

载药量(%) = 微囊中所含药物量 / 微囊总质量 × 100%

包封率(%) = 微囊中所包载药物的量 / 制备微囊时投入的药物总量 × 100%

2.1.3 单因素考察 以微囊的载药量和包封率为评价指标,进行单因素试验。固定“2.1”项下制备方法中其他条件不变的情况下,分别取不同的芯材比、不同的转速、不同的成囊温度、不同的 pH 等,制备黄芩苷微囊,观察并测定。

2.1.4 星点设计响应面试验 单因素结果表明,转速(X_1 , r·min⁻¹)、温度(X_2 ,℃)、pH(X_3)为主要影响因素,以载药量(Y_1 ,%)和包封率(Y_2 ,%)为评价指标,根据 Box-Behnken 响应面设计原理设计了 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验,因素和水平见表 1。利用 Design-Expert 8.0.6 软件设计响应面试验方案见表 2,其中,试验 2、5、7、11、15 为 5 个中心试验,用于估计试验误差,其余为析因试验。

表 1 因素和水平表
Tab 1 Factor and level

编码	X_1 转速 / (r·min ⁻¹)	X_2 温度 /℃	X_3 pH
-1	500	45	3.9
0	550	50	4.0
1	600	55	4.1

2.1.5 微囊体外释放试验 精密称取适量最优处方制得的黄芩苷微囊粉末,照《中国药典》2020 年版释放度测定第二法浆法操作。以 500 mL pH 6.8 的磷酸盐缓冲溶液为释放介质,模拟体内小肠 pH,转速为 100 r·min⁻¹,依法操作,分别在 1、2、4、6、8、10、12、24 h 取溶液 5 mL(同时立即补充 5 mL 等温的释放介质),0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液在 278 nm 处测定吸光度,计算不同时间的累积释放量;黄芩苷原料药同法操作,计算不同时间的累积释放量,绘制释放曲线。

2.2 微囊片的制备

2.2.1 填充剂的筛选 分别选用预胶化淀粉、微晶纤维素、乳糖作为填充剂,考察片剂的成型性。取黄芩苷微囊,与适量填充剂按等量递加法混合均匀后,加入硬脂酸镁混匀,粉末直接压片即得。

2.2.2 崩解剂的筛选 本研究选择交联聚维酮、低

表 2 响应面分析法试验方案

Tab 2 Response surface analysis test plan

试验序号	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	1	0	-1	13.75	50.15
2	0	0	0	16.21	54.27
3	1	0	1	11.54	41.54
4	0	-1	-1	24.30	85.70
5	0	0	0	16.59	54.25
6	0	1	-1	15.26	48.75
7	0	0	0	16.40	54.20
8	-1	-1	0	21.46	65.30
9	1	-1	0	15.39	51.34
10	0	1	1	13.20	42.70
11	0	0	0	16.40	54.27
12	-1	0	1	16.60	50.43
13	0	-1	1	21.15	76.50
14	1	1	0	9.620	25.40
15	0	0	0	16.40	54.18
16	-1	0	-1	16.40	46.97
17	-1	1	0	11.50	28.75

取代羟丙纤维素为崩解剂。取黄芩苷微囊，与适量填充剂、崩解剂按等量递加法混合均匀后，加入硬脂酸镁混匀，粉末直接压片即得。

2.2.3 微囊片的制备工艺的筛选 以自制的黄芩苷微囊为主药，硬脂酸镁为润滑剂，微晶纤维素为填充剂，交联聚维酮为崩解剂，分别以淀粉浆、羟丙甲纤维素、聚维酮为黏合剂采用湿法制粒压片法压制片剂；以自制的黄芩苷微囊为主药，硬脂酸镁为润滑剂，交联聚维酮为崩解剂，分别以乳糖、预胶化淀粉、微晶纤维素为填充剂采用粉末直接压片法压制片剂。

2.2.4 黄芩苷微囊片体外释放试验 对黄芩苷微囊片进行释放度试验并绘制释放曲线。按照《中国药典》2020 年版释放度测定法第二法（浆法）进行测定，抽取同一处方片剂 3 片。以 500 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液为释放介质，转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，分别在 1、2、4、6、8、10、12、24 h 时取样 5 mL（同时立即补充 5 mL 等温的释放介质），0.22 μm 微孔滤膜过滤，按紫外分光光度法进行测定。

3 结果与结论

3.1 单因素考察结果

当芯材比为 1:2 时，微囊的载药量和包封率较 1:3 和 1:4 时高，故选择芯材比为 1:2，因转速、成囊温度、pH 对微囊的载药量和包封率结果均有较大的影响，故选择其作为考察因素，进行星点设计响应面试验，结果见表 3。

3.2 处方优化结果

借助统计分析软件 Design-Expert 8.0.6，分别以微囊的载药量（ Y_1 ）和包封率（ Y_2 ）为因变量，

表 3 单因素试验结果

Tab 3 Single factor experiment results

因素	水平	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
芯材比 (g/g)	1:2	26.34	83.57
	1:3	10.37	28.63
	1:4	7.530	28.16
转速 / ($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)	400	12.82	38.24
	450	15.65	53.59
	500	21.46	65.38
	550	23.15	80.60
	600	18.56	56.70
温度 / $^{\circ}\text{C}$	40	18.55	45.48
	45	24.35	84.60
	50	14.64	53.12
	55	15.37	49.63
	60	10.37	29.09
pH	3.8	9.620	21.00
	3.9	23.29	83.77
	4.0	16.32	52.70
	4.1	13.32	41.53

转速（ X_1 , $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ）、成囊温度（ X_2 , $^{\circ}\text{C}$ ）、pH（ X_3 ）为自变量，选择适当模型进行回归拟合，分别建立方程： $Y_1 = 16.44 - 2.00X_1 - 4.09X_2 - 0.86X_3 + 1.05X_1X_2 - 0.69X_1X_3 + 0.27X_2X_3 - 2.88X_1^2 + 0.93X_2^2 + 1.10X_3^2$ ， $Y_2 = 54.32 - 3.21X_1 - 16.65X_2 - 2.89X_3 + 2.65X_1X_2 - 2.34X_1X_3 + 0.79X_2X_3 - 13.50X_1^2 + 1.96X_2^2 + 7.31X_3^2$ 。对该方程的回归分析与方差分析结果见表 4~5。

由表 4 可知，以 Y_1 对模型进行显著性检验，回归模型的 $F = 91.53 > 0.0001$ ，表明该模型回归显著（ $P < 0.05$ ），存在一定的失拟因素；并且该模型 $R^2 = 0.9916$ ， $R^2_{\text{Adj}} = 0.9807$ ，说明该模型与试验拟合良好，各自变量与响应值之间线性关系良好，可以用于制备微囊处方工艺的预测。各自变量对 Y_1 的贡献是 $X_2 > X_1 > X_3$ （ $P < 0.01$ ）。 X_1 、 X_2 、 X_3 对模型的影响为极显著（ $P < 0.01$ ）；交互项 X_1X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y_1 的贡献为极显著（ $P < 0.01$ ）； X_1X_3 对模型的影响为显著（ $P < 0.05$ ）。

由表 5 可知，以 Y_2 对模型进行显著性检验，回归模型的 $F = 103.93 > 0.0001$ ，表明该模型回归显著（ $P < 0.05$ ）；并且该模型 $R^2 = 0.9926$ ， $R^2_{\text{Adj}} = 0.9830$ ，说明该模型与试验拟合良好，各自变量与响应值之间线性关系良好，可以用于制备微囊处方工艺的预测。各自变量对 Y_2 的贡献是 $X_2 > X_1 > X_3$ （ $P < 0.01$ ）。 X_1 、 X_2 、 X_3 对模型的影响为极显著（ $P < 0.01$ ）；交互项 X_1^2 、 X_3^2 对 Y_2 的贡献为极显著（ $P < 0.01$ ）； X_1X_2 、 X_1X_3 对模型的影响为显著（ $P < 0.05$ ）。

借助 Design-Expert 8.0.6 对 Y_1 、 Y_2 回归方程所作出的响应曲面图见图 1、2，因子及其交互作

表 4 载药量作为因变量的回归和方差结果

Tab 4 Regression and variance results for drug load as a dependent variable

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	220.14	9	24.26	91.53	< 0.0001
X_1	32.08	1	32.08	120.05	< 0.0001
X_2	133.82	1	133.82	500.80	< 0.0001
X_3	5.88	1	5.88	22.01	0.0022
X_1X_2	4.39	1	4.39	16.42	0.0049
X_1X_3	1.92	1	1.92	7.18	0.0316
X_2X_3	0.30	1	0.30	1.11	0.3268
X_1^2	35.00	1	35.00	130.99	< 0.0001
X_2^2	3.66	1	3.66	13.68	0.0077
X_3^2	5.11	1	5.11	19.13	0.0033
残差	1.87	7	0.27		
失拟差	1.78	3	0.59	27.63	0.0039
纯误差	0.086	4	0.022		
总差	222.01	16			
$R^2 = 0.9916$ $R^2_{Adj} = 0.9807$					

用对响应值的影响结果可通过该组图直观反应出来。用响应面法对回归模型进行分析, 寻找最优响应结果为: 转速 $550 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 45°C , pH 3.9, 此时对应的是模型的最大值点, 其载药量为 24.46%、包封率为 83.97%。在此优化条件下, 制备 3 批黄芩苷微囊, 其载药量分别是 22.67%、23.13%、22.59%, 平均载药量为 $(22.80 \pm 0.33)\%$, 包封率分别是 81.95%、82.80%、82.47%, 平均包封率为 $(82.40 \pm 0.45)\%$, 与预测值偏差小于 5%,

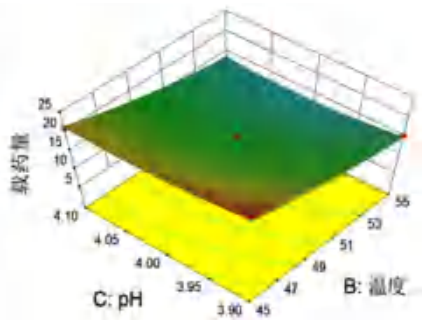
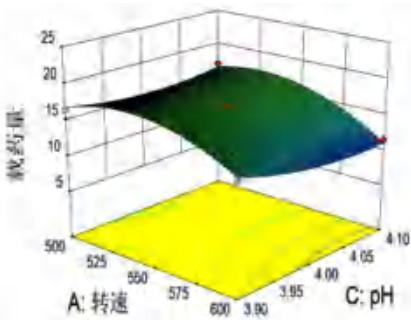
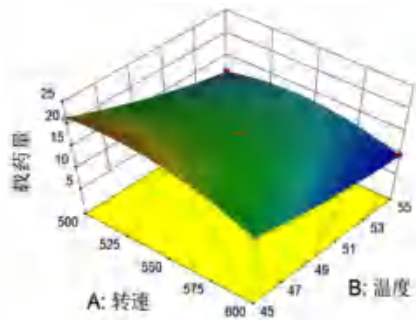


图 1 转速 (A)、温度 (B) 和 pH (C) 对黄芩苷微囊载药量影响的三维响应面图

Fig 1 Three-dimensional response surface view of the effect of rotational speed (A), temperature (B) and pH (C) on the drug load of the baicalin microcapsules

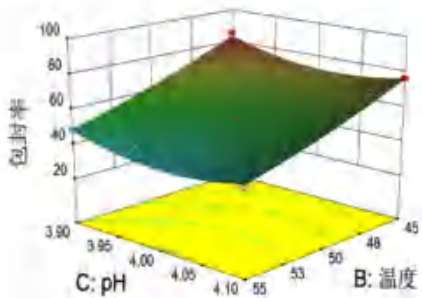
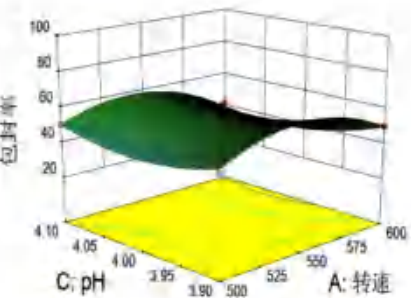
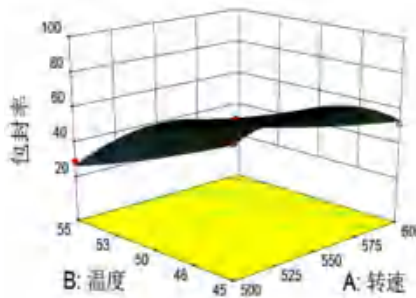


图 2 转速 (A)、温度 (B) 和 pH (C) 对黄芩苷微囊包封率影响的三维响应面图

Fig 2 Three-dimensional response surface map of the effects of rotational speed (A), temperature (B) and pH (C) on the encapsulation efficiency of baicalin microcapsules

表 5 包封率作为因变量的回归和方差结果

Tab 5 Regression and variance results of encapsulation rate as dependent variable

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	3378.17	9	375.35	103.93	< 0.0001
X_1	82.69	1	82.69	22.90	0.0020
X_2	2219.11	1	2219.11	614.43	< 0.0001
X_3	66.70	1	66.70	18.47	0.0036
X_1X_2	28.14	1	28.14	7.79	0.0269
X_1X_3	21.95	1	21.95	6.08	0.0431
X_2X_3	2.48	1	2.48	0.69	0.4346
X_1^2	767.45	1	767.45	212.49	< 0.0001
X_2^2	16.25	1	16.25	4.50	0.0716
X_3^2	219.14	1	219.14	60.68	0.0001
残差	25.28	7	3.61		
失拟差	25.27	3	8.42	4869.88	< 0.0001
纯误差	6.920×10^{-3}	4	1.730×10^{-3}		
总差	3043.45	16			
$R^2 = 0.9926$ $R^2_{Adj} = 0.9830$					

说明此预测模型用于指导黄芩苷微囊的制备工艺, 具有一定的应用价值。

3.3 微囊形态及粒径分布

光学显微镜下呈类球形, 颗粒光滑、圆整、独立分散, 结果见图 3。取 100 g 微囊采用不同目数的筛按从粗到细的顺序, 进行筛分。对筛分后的微囊进行称量, 以各粒径范围内微囊质量比绘制粒径分布图, 由图 4 可看出, 微囊的粒径分

布集中程度较好,基本呈正态分布,70%以上分布在 90 ~ 150 μm (100 ~ 140 目)。

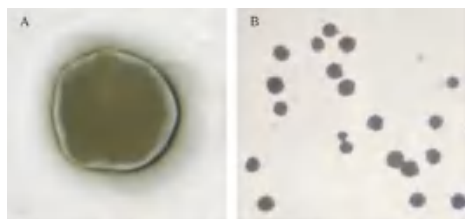


图 3 黄芩苷微囊显微形态 (A. $\times 1000$; B. $\times 100$)

Fig 3 Microscopic morphology of baicalin microcapsules (A. $\times 1000$; B. $\times 100$)

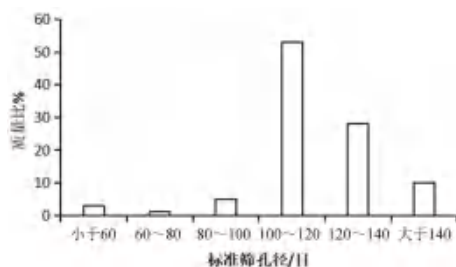


图 4 黄芩苷微囊粒径分布图

Fig 4 Particle size distribution of baicalin microcapsules

3.4 微囊的体外释药特征

由图 5 可以看出制成微囊后黄芩苷在 5 h 内释放缓慢,速度不及普通制剂的 30%,而且没有突释现象,具有一定的缓释效果。

3.5 微囊片的制备

3.5.1 填充剂的种类 预胶化淀粉压制片剂时,压制不成形,乳糖和微晶纤维素作填充剂时,片剂压制成型且外观光洁。所以处方选定乳糖和微晶纤维素为填充剂。

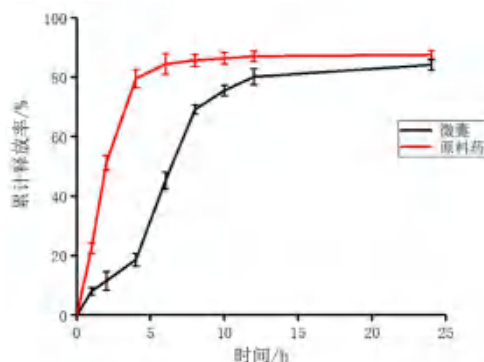


图 5 黄芩苷微囊的体外累计释放曲线 ($n = 3$)

Fig 5 In vitro cumulative release profile of baicalin microcapsules ($n = 3$)

3.5.2 崩解剂的种类 低取代羟丙纤维素作为崩解剂时可压性差,外观花斑明显;交联聚维酮可压性好,外观光洁,因此选用交联聚维酮为崩解剂。

3.5.3 单因素试验 以微晶纤维素、乳糖为填充剂,硬脂酸镁为润滑剂,交联聚维酮为崩解剂时,片剂压制成型,但崩解十分迅速,不能达到理想的结果,是由于微晶纤维素也可作为崩解剂,因此选择将微晶纤维素替代交联聚维酮作为崩解剂,确定辅料后,通过单因素考察微晶纤维素与乳糖的比例,以硬度、崩解时间、外观为考察指标,结果见表 6,片剂应具有适宜硬度,4 批黄芩苷微囊片的平均硬度为 40 ~ 60 N,硬度符合规定,1、2 组的片剂压制出来带有斑点,不合格,3 组外观合格,与 4 组相比,4 组硬度更好,因此确定片剂处方为黄芩苷微囊 50 mg,乳糖 855 mg 和微晶纤维素 345 mg。

表 6 黄芩苷微囊片的单因素试验结果

Tab 6 Single factor test for Baicalin microcapsule tablets

组号	黄芩苷微囊 /mg	乳糖 /mg	微晶纤维素 /mg	硬度 /N	崩解 /min	外观
1	50	600	600	45 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1	表面带有斑点,有细粉
2	50	720	480	57 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	表面带有斑点,有细粉
3	50	800	400	41 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1	表面光滑圆整,无粉尘
4	50	855	345	49 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	表面光滑圆整,无粉尘

3.5.4 释放度及释放曲线的测定 由图 6 看出在第 5 h 末黄芩苷微囊片基本可以释放 40%,第 12 h 释放量约为 80%,24 h 释放达 87.2%。由此可见,微囊片剂突释现象不明显,具备良好的缓释性能,且可以完全释放。

拟合方法和相关系数见表 7。由结果可知,黄芩苷微囊片在释放介质中的释放机制接近一级释药模型。

4 讨论

单凝聚法所制得的黄芩苷微囊,包封率及载药量较高,显微镜下观察,粒径圆整,分散性

表 7 释药模型及相关系数

Tab 7 Drug release model and correlation coefficient

拟合方法	方程	相关系数
零级方程	$Q = 4.02t + 17.55$	0.7246
一级方程	$\lg Q = 0.127t + 100.84$	0.9900
Higuchi 方程	$Q = 22.59t^{1/2} - 5.78$	0.7426

好,有文献报道,在制备微囊过程中,加入甲醛作为交联剂^[10],但本研究发现甲醛作为交联剂时,微囊分散性差,有粘连,且甲醛需要在碱性条件下才能使微囊固化完全,而黄芩苷在碱性环境下不稳定。因此该试验中选择使用戊二醛为交

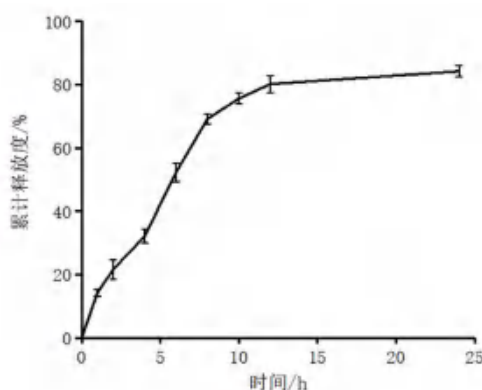


图 6 黄芩苷微囊片的体外累计释放曲线 ($n=3$)

Fig 6 In vitro cumulative release profile of baicalin microcapsule tablets ($n=3$)

联剂。微囊制备过程中,为保证明胶与黄芩苷的充分混合,采用超声加搅拌方法,避免药物未完全与明胶混合,导致包封率低;将含药明胶滴入液体石蜡时,以线状滴入,若以滴状会导致微囊粒径大且不均匀;测定微囊含量时,干燥时间不宜过长,以免微囊结块;微囊的粒径与制备方法存在很大关联,一般来说,搅拌速度越快,微囊粒径越小,且载药量越低。

片剂常用的制备方法有湿法制粒压片和粉末直接压片两种,试验过程中湿法制粒压片需经过制粒、干燥、整粒等环节。通过预试验发现采用湿法制粒时,干燥后微囊并不成粒,仍是粉末,压制不成型,因此本研究采用粉末直接压片法,不仅避免上述了湿法制粒压片的缺点,还提高了生产效率。通过预试验发现,以微晶纤维素为填充剂,交联聚维酮为崩解剂,硬脂酸镁为润滑剂,片剂能压制成型,但放到水里后片剂立刻崩解,不能达到理想的效果,原因是当微晶纤维素占片剂含量超过 20% 时能起到崩解作用^[11-12],而片剂中也加了其他崩解剂,因此将微晶纤维素作为崩解剂,乳糖作为填充剂,采用粉末直接压片,所得到的片剂表面光滑,具有较好的成型性。压片机压片,各参数应自行调节,通过调节填充量来控制片重,调节片厚来调节片剂硬度,片剂的硬度会影响崩解时限和脆碎度,片剂过硬则难以崩解,过软则不成型。

黄芩苷具有抗菌、抗炎、促进胰岛素分泌,

降低血糖,调节内分泌等作用。将黄芩苷研发成为一种口服药物具有重大意义;微囊已广泛应用于药物递送系统的设计和开发。随着新型高分子材料的高速发展、微囊制备技术的日益成熟,适用于微囊制备技术的药物也日趋增多,本试验以黄芩苷为原料,首次制备了黄芩苷微囊片使其具有缓释作用。在后续工作中,需要进行片剂的药效学和药物代谢动力学研究以及稳定性考察,为中药剂型的发展提供思路与方法,也可对该片剂进行糖包衣,使片剂更好入口的同时起到防潮作用,并使片剂更加美观。

参考文献

- [1] Tang C, Han R, Wu JL, et al. Effects of baicalin capsules combined with α -lipoic acid on nerve conduction velocity, oxidative stress and inflammatory injury in patients with diabetic peripheral neuropathy [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13: 2774-2783.
- [2] 朱亚南, 杨七妹, 张硕, 等. 黄芩苷与黄芩素药理作用及机制研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31 (4): 921-925.
- [3] 文学平, 刘德俊, 裴忆雪, 等. 黄芩苷抗急性痛风性关节炎的试验研究 [J]. *中药材*, 2017, 40 (8): 1952-1955.
- [4] 干婷婷, 江昌照, 陈杭, 等. 微囊在口服药物制剂中的应用研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2022, 57 (11): 874-880.
- [5] 董玉洁, 蒋沅岐, 陈金鹏, 等. 中药缓控释制剂的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52 (8): 2465-2472.
- [6] 方瑜, 向柏, 潘振华, 等. 可分剂量甲磺酸二氢麦角碱缓释微囊片的制备及体外释放机制的研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2010, 27 (3): 231-235.
- [7] 张芑, 杨晓艳. 盐酸小檗碱微囊口腔崩解片的制备与质量评价 [J]. *中南药学*, 2015, 13 (2): 150-154.
- [8] Jin ZX, Li ZB, Wang CY. A urea microcapsule preparation and a preparation method there of: 104758273 [P]. 2015-07-08.
- [9] 岳红坤, 周冉, 王景翔, 等. 黄芩苷缓释微囊的制备方法及其稳定性的研究 [J]. *井冈山大学学报 (自然科学版)*, 2013, 34 (6): 88-92.
- [10] 崔明宇, 王艳, 孙志伟, 等. 黄芩苷微囊的制备及体外评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (11): 33-35.
- [11] 滕亚然, 黄仁嵩, 等. 人参超微粉片剂制剂工艺研究 [J]. *亚太传统医药*, 2022, 18 (2): 70-74.
- [12] Kader A, Jalil R. Formulation factors affecting drug release from poly (lactic acid) (PLA) microcapsule tablets [J]. *Drug Der Ind Pharm*, 1999, 25: 141-151.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-11-06)

磷脂包覆技术制备布地奈德吸入气雾剂及体外性质评价

胡慧^{1, 2, 3}, 陈晶晶³, 王琴³, 王晓飞^{3*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 海门 226113; 3. 上海欧米尼医药科技有限公司, 上海 201203)

摘要: **目的** 制备混悬型布地奈德吸入气雾剂, 并对气雾剂进行体外评价。**方法** 采用高压均质工艺结合喷雾干燥技术制备氢化磷脂 (HSPC) 包覆的布地奈德微粉颗粒, 然后分析颗粒的粒径分布、形貌、结构、晶型、相变温度。观察用该微粉颗粒制备的气雾剂混悬状态、并评价递送剂量均一性和空气动力学粒径分布 (APSD)。**结果** 高压均质 60 次结合喷雾干燥获得较小的微粉颗粒, X_{50} 为 $1.70\ \mu\text{m}$, X_{90} 为 $3.19\ \mu\text{m}$; SEM、XRD、FT-IR 和 DSC 结果表明磷脂布地奈德颗粒呈现细颗粒聚集而成的粗糙球状, 该制备技术没有明显改变布地奈德的结构和晶型; 气雾剂微细粒子百分比 (FPF) 达到 48.39%, 递送剂量都在标准限制范围内, 在振摇后静置的 1 min 内, 未出现絮凝、沉降现象。**结论** 高压均质工艺结合喷雾干燥技术及 HSPC 的包覆作用可制备肺部沉积量高、混悬效果佳、递送剂量均一的混悬型布地奈德吸入气雾剂。

关键词: 布地奈德; 吸入气雾剂; 氢化磷脂; 高压均质; 喷雾干燥

中图分类号: R94, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)06-1459-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.010

Preparation of budesonide inhalation aerosol by phospholipid coating and its in vitro property evaluation

HU Hui^{1, 2, 3}, CHEN Jing-jing³, WANG Qin³, WANG Xiao-fei^{3*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Haimen Jiangsu 226113; 3. Shanghai Omni Pharmaceutical Co., Ltd, Shanghai 201203)

Abstract: **Objective** To prepare budesonide inhalation aerosol, and evaluate it in vitro. **Methods** Budesonide microparticles coated with hydrogenated phospholipid (HSPC) were prepared by high-pressure homogenization process combined with spray drying technology. The size, morphology, structure, crystalline, and phase-transition temperature of the microparticles were analyzed. The suspension effect of the aerosol prepared with the microparticles was observed. The delivery dose uniformity and aerodynamic particle size distribution (APSD) were evaluated. **Results** Small microparticles were obtained by 60 times of high pressure homogenization combined with spray drying. X_{50} reached $1.70\ \mu\text{m}$, and X_{90} reached $3.19\ \mu\text{m}$. SEM, XRD, FT-IR and DSC showed that the phospholipid budesonide particles were coarse spheroids formed by the aggregation of fine particles, and the preparation technique did not change the structure and crystalline of budesonide much. The FPF reached 48.39%, and the delivery doses were all within standard limits; no flocculation and sedimentation appeared after the aerosol was kept stationary for 1 min following shaking. **Conclusion** High pressure homogenization technology combined with spray drying and the coating of HSPC can prepare suspended budesonide aerosol with high pulmonary deposition, good suspension and uniform delivery dose.

Key words: budesonide; inhalation aerosol; hydrogenated phospholipid; high-pressure homogenization; spray drying

吸入给药是目前治疗哮喘的最佳途径, 以较高的浓度直接递送药物至治疗部位, 起效迅速, 药用剂量远低于全身给药, 避免了全身给药可能带来的不良反应^[1-2]。吸入制剂主要包括吸入气雾

作者简介: 胡慧, 女, 在读硕士研究生, 主要从事吸入制剂研究, email: hhu1184807736@163.com *通信作者: 王晓飞, 男, 高级工程师, 主要从事吸入制剂等复杂制剂的研究与开发, email: xfwang@omni-pharma.com

剂、吸入粉雾剂、吸入用液体制剂等。吸入气雾剂携带方便、生产和使用成本较低,其将抛射剂作为雾化动力,雾化效果不依赖于患者的吸气流速^[3]。布地奈德是具有高度选择性的吸入型糖皮质激素,具有抗炎、解痉、平喘的作用,以其高效性和安全性成为临床上用于治疗支气管哮喘的首选药物之一^[4-5]。

对于气雾剂,空气动力学粒径分布(aerodynamic particle size distribution, APSD)是决定药物能否到达肺部的关键因素,空气动力学粒径在 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 的药物最适于肺部给药^[6]。用气流粉碎等直接微粉化方式降低药物粒径可提高肺部沉积,但只有原料药和抛射剂的混悬型气雾剂存在诸多共性问题,如絮凝速度快、沉降速度快、黏壁严重、递送剂量均一性差等。添加一定量的助悬剂可提高其递送剂量均一性,如磷脂,可在颗粒表面提供一种低表面能的疏水涂层,从而减少颗粒团聚程度,已被用于物理稳定剂和悬浮剂^[7]。

高压均质是一种可有效减少颗粒和液滴大小的方法,将颗粒或液滴处理成微米或纳米尺寸,以稳定的分散体或乳液用于进一步处理,可通过喷雾干燥获得高质量的颗粒^[8]。本实验采用高压均质工艺结合喷雾干燥技术得到氢化大豆磷脂(HSPC)包覆的布地奈德颗粒,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

HELOS/BF 激光粒度仪(德国 Sympatec 公司); model 0964 新一代药用撞击器(NGI)(英国 Coplay Scientific); LC-2010M 高效液相色谱仪(岛津国际贸易有限公司); DFM-2000 流速计(Coepley-China); AB204-S 分析天平、PL601-S 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); T18 高速分散机(艾卡仪器设备有限公司); IQ7000 纯水仪(默克密理博贸易有限公司); B290 喷雾干燥仪(瑞士 BUCHI); 2016 气雾剂灌装机(瑞士 PAMASOL); Nano 高压均质机(诺泽流体科技有限公司); Helios 5UX 扫描电镜、IR3-01 红外光谱仪(美国 Thermo Scientific); DSC8000 差示扫描量热分析仪(美国 PerkinElmer); X-Max^N 能量色散 X 射线光谱仪(英国 Oxford); D/Max-2500PC X 射线衍射仪(日本 Rigaku)。观察混悬状态时,罐体选用透明的聚对苯二甲酸类材料(PET)(香港 MERXIN)瓶;进行 APSD 和递送剂量均一性实验时,罐体为 14 mL 铝罐(泛卡医药科技有限公司,批号:PC21F091),阀门(英国 Bepak,批号:BK0707990)为通用包材。

1.2 试药

布地奈德原料药(湖北葛店人福药业有限责任公司,批号:BD190301,纯度>99%);氢化磷脂(日本精化株式会社,批号:C00257,HPLC 纯度>97%);无水氯化钙(上海泰坦科技股份有限公司,批号:PD504983,纯度>96%);抛射剂 HFA134a(中化近代环保化工有限公司,批号:YY-0221011);甲醇、乙腈(色谱纯,上海星可高纯溶剂有限公司);水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 磷脂包覆的布地奈德微粉颗粒及气雾剂的制备

HSPC 和无水氯化钙(摩尔比为 2:1)加入到纯化水中,高速分散 10 min,得到磷脂乳液;再加入质量比为 1% 的布地奈德原料药(原料药与 HSPC 的质量比为 5:1)得到布地奈德混悬液,高速分散 10 min,再对混悬液进行高压均质,压力为 30 000 psi,分别在均质 0、20、40、60 次时取样。对不同均质次数的混悬液进行喷雾干燥得到磷脂包覆的布地奈德微粉颗粒,设置入口温度 120℃,抽气速率 $30 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$,雾化流量计高度 45 mm,进料速率 $2.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。同时对 HSPC-无水氯化钙以同样的工艺进行喷雾干燥,实验中各微粉颗粒样品编号见表 1。最后以 HFA134a 为抛射剂,采用两步法灌装方式对布地奈德原料药和喷干后的磷脂包覆布地奈德微粉颗粒进行罐装,标示量分别为 200 μg / 揆, 100 揆/ 瓶。

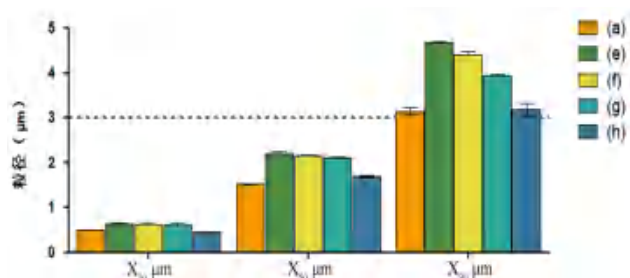
表 1 样品信息

Tab 1 Sample information

编号	样品名称
a	布地奈德原料药
b	HSPC
c	无水氯化钙
d	喷干后的 HSPC-无水氯化钙混合微粉颗粒
e	喷干后的布地奈德微粉颗粒: 高压均质 0 次
f	喷干后的布地奈德微粉颗粒: 高压均质 20 次
g	喷干后的布地奈德微粉颗粒: 高压均质 40 次
h	喷干后的布地奈德微粉颗粒: 高压均质 60 次

2.2 粒度分布

采用激光衍射法检测布地奈德原料药和各喷干后微粉颗粒的粒度分布,采用 R1 镜头,检测压力为 2.0 bar,进样速度为 $40 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。检测结果如图 1 所示,对布地奈德混悬液直接喷干得到的布地奈德微粉颗粒(e)相对于布地奈德原料药(a)的粒径有明显的增长, X_{50} 从 $1.53 \mu\text{m}$ 增长到 $2.21 \mu\text{m}$, X_{90} 从 $3.15 \mu\text{m}$ 增长到 $4.68 \mu\text{m}$,这是由于 HSPC 的包覆使得颗粒整体粒径增大。随着高压均质次数的增多,得到的微粉颗粒粒径在逐渐降低,高压均质 60 次微粉颗粒(h)的 X_{50} ($1.70 \mu\text{m}$) 及 X_{90} ($3.19 \mu\text{m}$) 已接近原料药的粒径。

图1 不同布地奈德微粉颗粒的粒径分布 ($n=3$)Fig 1 Particle size distribution of different budesonide microparticles ($n=3$)图2 不同布地奈德微粉颗粒的电镜扫描图 ($\times 40\,000$)Fig 2 Electron microscope scanning of different budesonide microparticles ($\times 40\,000$)

2.4 结构

采用红外光谱 (FT-IR) 检测各样品: 采用 KBr 压片, 在 $400 \sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内进行扫描。如图 3A 所示, e、f、g、h 在波长 3492 cm^{-1} 、 2956 cm^{-1} 、 2933 cm^{-1} 、 1723 cm^{-1} 、 1667 cm^{-1} 、 1098 cm^{-1} 存在明显的特征峰, 与原料药峰形、峰位一致, 表明高压均质结合喷雾干燥以及磷脂包覆作用未明显改变布地奈德颗粒结构。在 d 及 e、f、g、h 中无水氯化钙 1614 cm^{-1} 的特征峰消失, 原因是磷脂中的磷酸基与钙离子相互作用, 形成了复合物^[9]。

2.5 晶型

通过粉末 X 射线衍射技术 (PXRD) 检测样品的晶体性质, 探究原料药在高压均质和喷雾干燥过程中晶型是否发生变化。用 CuK 靶射线扫描, 在 $3^\circ \sim 50^\circ$, 扫描速度 10 min^{-1} , 扫描步长 0.02° , 管压为 40 kV , 管电流为 100 mA 进行扫描, 分析其晶体变化。如图 3B 所示, 喷干后的 4 份布地奈德微粉颗粒 (编号为 e、f、g、h) 在 2θ 为 6.1° 、 10.1° 、 11.4° 、 12.0° 、 13.8° 、 14.5° 、 15.4° 、 16.0° 、 16.9° 、 18.5° 、 21.1° 、 21.4° 、 22.8° 、 23.2° 时出现明显的衍射峰, 与布地奈德原料药的峰位一致, 表现出较高结晶性, 说明高压均质结合喷雾干燥以及磷脂包覆作用未明显改变布地奈德的晶型。喷干后的 HSPC-无水氯化钙混合微粉颗粒 d 在 5.4° 、 21.5° 出现衍射峰, 对布地奈德的衍射峰影响较小。

2.6 相变温度

样品中存在磷脂, 提高磷脂相变温度可提高气雾剂稳定性^[9], 通过差示扫描量热法 (DSC) 检测相变温度。参数: 温度 $35 \sim 270^\circ\text{C}$, 以 $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$

2.3 形貌

颗粒的形貌可能直接影响气雾剂的特性, 故采用扫描电镜 (SEM) 观察微粉颗粒形貌, 在 1 kV 波束加速电压下, 对各样品的形态进行成像。如图 2 所示, 布地奈德原料药 (a) 呈不规则状, 布地奈德混悬液直接喷干得到的布地奈德微粉颗粒 (e) 出现了明显的颗粒聚集现象, 经高压均质结合喷雾干燥得到的布地奈德微粉颗粒, 表现为多颗粒聚集成的球状团块, 均质 60 次微粉颗粒中球状团块更小, 形成球状团块的单个颗粒也更小。

的速率从 30°C 升温至 270°C , 在氮气保护下, 将 10 mg 左右样品分别置于铝制盘中。不同微粉颗粒的 DSC 曲线见图 3C, 喷干后的 4 份布地奈德微粉颗粒 DSC 曲线 (e、f、g、h) 与布地奈德原料药 (a) DSC 曲线都只有一个吸热峰。4 个喷雾干燥后的布地奈德微粉颗粒的吸热峰温度较低, 约为 249°C , 原料药约 260°C , 这可能与粒径减小及高温下 HSPC 对布地奈德的助熔作用有关。HSPC 中 125°C 有明显的磷脂吸热相变峰, 而加入无水氯化钙后喷雾干燥所得的 d 及 e~h 中磷脂相变峰消失, 与 FT-IR 表现出的特性一致。磷脂中的阴离子磷酸基与钙离子结合, 可显著提高磷脂的相变温度^[9]。

2.7 体外评价

2.7.1 方法学考察

① 色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 ($4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相: 乙腈-水 ($55:45$, V/V); 流速 $1.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 240 nm ; 柱温 30°C ; 进样体积 $20\text{ }\mu\text{L}$ ^[10]。

② 布地奈德对照品溶液配制: 精密称取布地奈德对照品 20 mg , 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。继续移取 2 mL 布地奈德溶液, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 $4\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

③ 空白气雾剂溶液: 称取氢化磷脂和氯化钙的混合微粉 9.7 mg (摩尔比为 $2:1$) 于铝罐中, 抓封, 灌入抛射剂 HFA134a 9.2 g , 制备成空白吸入气雾剂。取空白气雾剂 1 罐, 振摇 5 s , 弃去前 5 揆, 组装适配器、DUSA 管, 设置气体流速为 $28.3\text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\pm 2\%$), 将吸入装置插入适配器

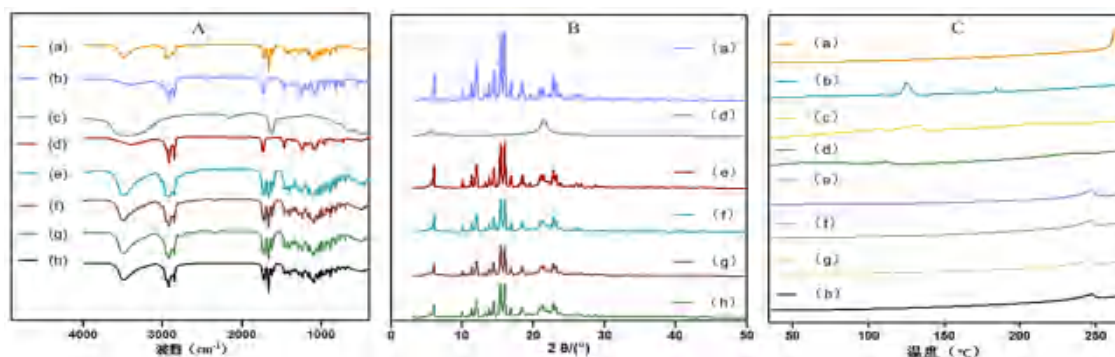


图3 不同微粉颗粒的红外光谱图(A)、X射线衍射图(B)及DSC曲线图(C)

Fig 3 FT-IR spectra of different microparticles (A), XRD patterns (B), and DSC curves (C)

内,立即喷射1次,抽气5 s,取下吸入装置。用甲醇清洗回收滤纸、适配器和DUSA管至50 mL量瓶中,稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm PTFE膜过滤,即得空白气雾剂溶液。

④ 供试品溶液:取空白气雾剂1罐,振摇5 s,弃去前5揆,组装适配器、DUSA管,设置气体流速为28.3 L·min⁻¹(±2%),将吸入装置插入适配器内,立即喷射1次,抽气5 s,取下吸入装置。向DUSA管内精密加入对照品溶液1 mL,待挥干,用甲醇清洗回收滤纸、适配器和DUSA管至50 mL量瓶中,稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm PTFE膜过滤,即得供试品溶液。

⑤ 专属性考察:取布地奈德对照品溶液(4.00 μg·mL⁻¹)、空白气雾剂溶液、供试品溶液,进样测定。如图4所示,空白气雾剂溶液色谱图中无色谱峰与主峰重叠,且供试品溶液中与其他相邻峰的分度度不低于1.5。

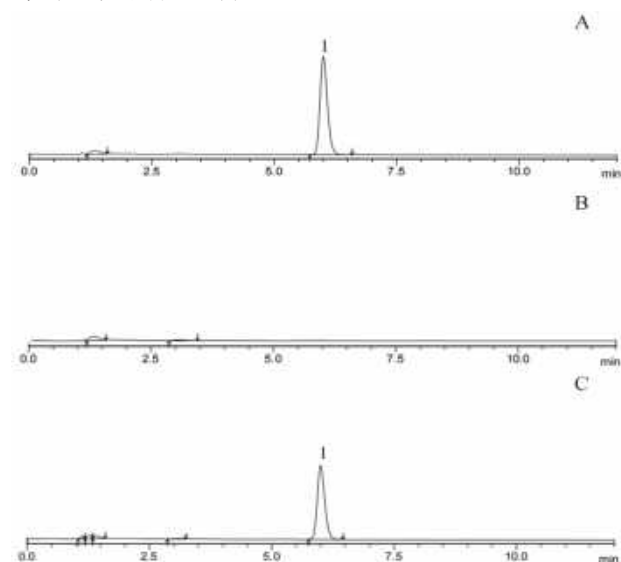


图4 布地奈德的色谱图

Fig 4 Chromatogram of budesonide

A. 对照品溶液(reference solution); B. 空白气雾剂溶液(blank aerosol solution); C. 供试品溶液(test solution); 1. 布地奈德(budesonide)

⑥ 线性关系考察:制备系列质量浓度为0.40、1.00、2.01、3.01、4.01、6.02、10.03 μg·mL⁻¹的布地奈德工作液,分别进样测定。对布地奈德峰面积和质量浓度进行线性回归,得到回归方程为 $Y = 2.513 \times 10^4 X + 551.8$, $r = 1.000$,布地奈德质量浓度在0.40 ~ 10.03 μg·mL⁻¹与峰面积线性关系良好。

⑦ 重复性考察:将布地奈德对照品溶液、甲醇、空白气雾剂一起添加到单位剂量取样装置(DUSA)管中,按递送剂量均一性分析测定条件,制备6份工作液,其浓度水平为供试品浓度的100%[以每揆出驱动器(英国Bespak,批号:BK0553598)含布地奈德170 μg为100%],进样测定,测得含量的RSD值为0.50%,重复性试验结果符合要求。

⑧ 回收率考察:将布地奈德对照品溶液、甲醇、空白气雾剂一起添加到DUSA管中,按递送剂量均一性分析测定条件,制备3个浓度水平的工作液,且每个浓度水平制备3份工作液。这3个浓度水平分别为供试品溶液浓度的60%、100%、140%,分别注入液相色谱仪。结果各浓度水平的平均回收率分别为100.9%、99.9%、99.6%,RSD值均小于2.0%,回收试验结果符合要求。

2.7.2 混悬状态 用透明的PET瓶作为罐体,制备a-气雾剂和h-气雾剂,将气雾剂振摇5 s后静置,观察静置3、10、30、60 s的混悬状态。结果如图5所示,a-气雾剂在3 s时已发生了絮凝现象,10 s絮凝更为明显,60 s时沉降明显;而h-气雾剂从开始静置至60 s,都能保持很好的混悬状态,无絮凝和沉降现象。

2.7.3 递送剂量均一性 采用DUSA管法评价递送剂量均一性,即检测多次测定的递送剂量与平均值的差异程度。取气雾剂1罐,振摇5 s,弃去前5揆,组装适配器、DUSA管,设置气体流速为28.3 L·min⁻¹(±2%),将吸入装置插入适配器内,静置3 s后喷射(静置10 s及60 s后喷射同)1次,抽气5 s,取下吸入装置。用甲醇清洗



图 5 a-气雾剂和 h-气雾剂静置不同时间后的混悬状态

Fig 5 Suspension effect of the a-aerosol and h-aerosol after standing for different time

A ~ D. 静置 3、10、30、60 s 后的对比图 (Comparison pictures after standing for 3, 10, 30, 60 s)

滤纸、适配器及 DUSA 管内部, 合并清洗液并稀释至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 经 0.45 μm PTFE 膜过滤, 取续滤液作为递送剂量均一性的供试品溶液。用 HPLC 依次测定第 1、2、3、50、51、52、53、98、99、100 揆的递送剂量。

如图 6A 所示, 静置 3 s 后喷射的 a-气雾剂前、中、后 10 揆药物相对平均值百分比都在中国药典规定值 75%~125%, 但静置 10、60 s 后气雾剂前、中、后多揆药物的相对平均值百分比明显超出了规定值, 递送剂量均一性差。如图 6B 所示, 静置 3、10、60 s 后的 h-气雾剂前、中、后 10 揆药物相对平均值百分比都在规定值范围内, 静置 3 s 后的相对平均值百分比在 94%~106%, 且 RSD 值为 3.4%, 体现出良好的递送剂量均一性。

2.7.4 空气动力学粒径分布 吸入气雾剂的 APSD 决定了药物颗粒在呼吸道的沉降部位, 是吸入气雾剂最为重要的质量特性。根据《中国药典》2020 年版四部通则 <0951> 检测, 将新一代撞击器 (NGI) 的出口与真空泵相连, 调节气体流量使 L 型连接管进口处的气体流速为 30 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\pm 2\%$)。开启真空泵, 振摇吸入装置 5 s 后立即喷射 1 次; 取下吸入装置振摇 5 s, 重新插入吸嘴适配器内, 喷射第 2 次, 直到完成 10 揆。在最后一次喷射后, 取下吸入装置, 关闭真空泵。用甲醇清洗回收喉管至 100 mL 量瓶中, 分别用甲醇清洗驱动器、适配器、第 4 收集层、第 5 收集层至相应的 50 mL 量瓶中, 清洗回收第 1、2、3、6 及 moc 收集层至 25 mL 量瓶中, 清洗回收第 7 收集层至 10 mL 量瓶中, 继续用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。moc 收集层经 0.45 μm PTFE 膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。用 HPLC 进行含量检测, 按外标法以峰面积计算各分布层的药物沉积量, 计算相关评价参数, 如

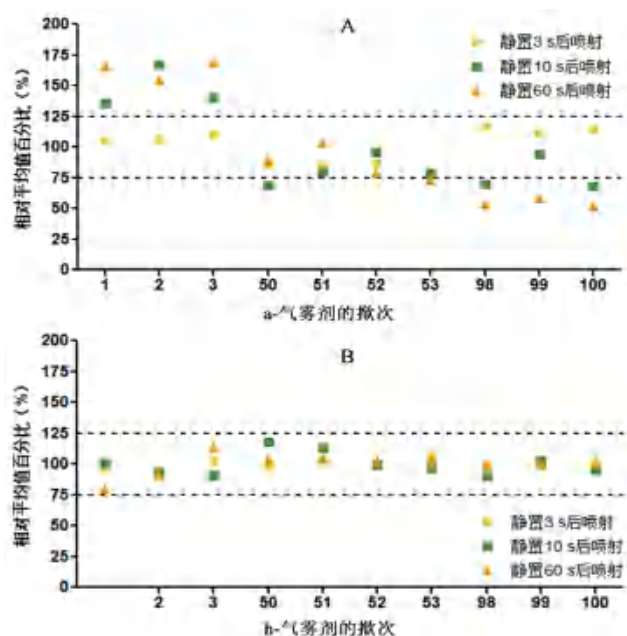


图 6 a-气雾剂 (A) 和 h-气雾剂 (B) 静置 3、10、60 s 后的递送剂量均一性

Fig 6 Delivery dose uniformity of a-aerosol (A) and h-aerosol (B) after standing for 3, 10 and 60 s

微细粒子百分比 (FPF)、质量中位空气动力学直径 (MMAD) 及几何标准偏差 (GSD)。

颗粒的粒径对 FPF 值有明显影响, 粒径相对越小, FPF 值越高, 能使药物更多地覆盖在肺部中央及外周气道, 所以选择高压均质 60 次并喷干获得的布地奈德微粉颗粒 h 制备布地奈德气雾剂 (h-气雾剂), 布地奈德原料药 a 制备的气雾剂 (a-气雾剂) 进行 APSD 实验数据的对比。如表 2 所示, a-气雾剂和 h-气雾剂都获得高 FPF 值, 分别为 51.91%、48.39% ($P < 0.05$); h-气雾剂的 MMAD 值比 a-气雾剂稍大, 分别为 3.09 μm 和 2.66 μm ($P < 0.05$), 随着粒径增大, 对应的 FPF 值会降低。两种气雾剂的 GSD 接近一致, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。如图 7 所示, 两种气雾剂在 NGI 各层级中的分布基本一致。

表 2 不同气雾剂的 FPF、MMAD 及 GSD 结果 ($n = 3$)

Tab 2 FPF, MMAD and GSD of different budesonide aerosols ($n = 3$)

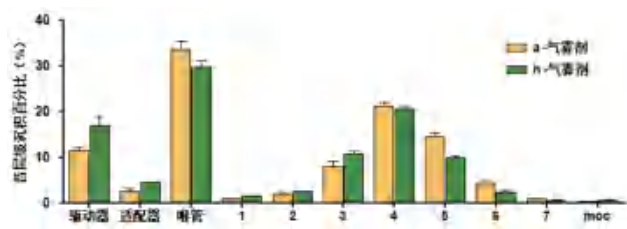
样品名称	FPF/%	MMAD/ μm	GSD
a-气雾剂	51.91 $\pm$ 0.02	2.66 $\pm$ 0.10	1.68 $\pm$ 0.03
h-气雾剂	48.39 $\pm$ 0.01*	3.09 $\pm$ 0.02*	1.67 $\pm$ 0.01

注: 与 a-气雾剂相比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with a-aerosol, * $P < 0.05$.

3 结论

APSD 和递送剂量均一性是吸入气雾剂的关键质量属性, 本研究通过高压均质技术、喷雾干燥技术及磷脂包覆技术将磷脂包覆在布地奈德原

图 7 不同布地奈德气雾剂在 NGI 中的沉积数据 ($n=3$)Fig 7 Deposition data of different budesonide aerosols in NGI ($n=3$)

料药表面, 获得了肺部沉积量高、递送剂量均一性好的布地奈德吸入气雾剂, 为这类气雾剂的研发提供了可行的途径。

磷脂作为肺表面活性剂的主要成分, 已被证明可以改善颗粒向肺周围的迁移, 特别是对于水溶性较差的药物^[11-13]。HSPC 是对磷脂加以氢化, 将磷脂中的不饱和键转化为饱和键。HSPC 的熔点升高, 保持固体的形状, 可塑性增强, 也避免了磷脂中不饱和团的易氧化的问题, 稳定性、乳化性、渗透性、分散性比未氢化的磷脂更有优势^[14]。磷脂中的阴离子磷酸基与钙离子结合, 可显著提高磷脂的相变温度, 使制剂更稳定。低剂量的吸入性氯化钙对人体是安全的^[15]。

2019 年在中国获批上市的用于治疗慢阻肺的三联药物——布地格福吸入气雾剂, 该气雾剂使用一种磷脂二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、全氟溴辛烷、氯化钙等作为辅料^[12]。鉴于 DSPC、全氟溴辛烷等辅料成本高昂, 本实验采用易得且成本相对低廉的 HSPC 作为助悬剂包覆药物颗粒, 不使用全氟溴辛烷, 具有很好的应用价值。

振摇后和喷射之间的延迟时间对递送剂量均一性有重要影响, 时间越长递药量的偏差越大^[16]。良好的混悬状态可提高吸入气雾剂延迟喷射后的递送剂量均一性, 减少患者因操作延迟而带来的不利影响。有文献对上市 pMDI 产品进行评估, 摇晃后至驱动的时间延迟时, 递送剂量发生倍数变化, 摇晃后至驱动之间延迟 60 s 时, 递送剂量超过了目标剂量的 3 倍^[17]。同样的延迟时间, 本研究中磷脂包覆的布地奈德颗粒所制备的气雾剂能保持良好的递送剂量均一性。

由于本研究处方中使用了无水氯化钙, 具有较强的吸湿性, 在制备、储存过程中应当严格控制水分的引入, 在低湿的条件下进行操作^[18-19]。

参考文献

[1] Li JF, Li JX, Ji J, et al. Research on the impact of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic on the global trade economy based on big data analysis [J]. J Organ End User Com, 2021, 33 (6): 1-18.

[2] Conti DS, Bharatwaj B, Brewer D, et al. Propellant-based inhalers for the non-invasive delivery of genes via oral inhalation [J]. J Control Release, 2012, 157 (3): 406-417.

[3] 周新. 吸入气雾剂临床应用现状与研究进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36 (3): 3.

[4] 杨苗, 孙亚军, 赵永生, 等. 布地奈德联合孟鲁司特钠对支气管哮喘患儿细胞因子、免疫功能影响探析 [J]. 世界复合医学, 2019, 5 (7): 16-18.

[5] 崔培聪. 布地奈德雾化吸入对小儿肺炎治疗机制分析 [J]. 人人健康, 2020, 520 (11): 278.

[6] Carvalho TC, Rd WR, Peters JI. Influence of particle size on regional lung deposition—what evidence is there? [J]. Int J Pharmaceut, 2011, 406 (1): 1-10.

[7] Myrdal PB, Sheth P, Stein SW. Advances in metered dose inhaler technology: formulation development [J]. AAPS PharmSciTech, 2014, 15 (2): 434-455.

[8] Xu LM, Hu TT, Pu Y, et al. Preparation of high-performance ultrafine budesonide particles for pulmonary drug delivery [J]. Chem Eng J, 2014, 252: 281-287.

[9] Wauthoz N, Amighi K. Phospholipids in pulmonary drug delivery [J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2015, 116 (9): 1114-1128.

[10] USP 43-NF 38 [S]. 2020: 604.

[11] Park CW, Li XJ, Vogt FG, et al. Advanced spray-dried design physicochemical characterization, and aerosol dispersion performance of vancomycin and clarithromycin multifunctional controlled release particles for targeted respiratory delivery as dry powder inhalation aerosols [J]. Int J Pharmaceut, 2013, 455 (1-2): 374-392.

[12] 游一中. 用于压力定量吸入气雾剂的 Aerosphere™ 创新共悬浮递送技术 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42 (6): 477-480.

[13] 万锋. 喷雾干燥技术在新型制剂设计与生产中的应用 [J]. 药学进展, 2019, 43 (3): 174-180.

[14] 王哲. 氢化大豆卵磷脂脂质体膜的制备及其润滑性能的研究 [D]. 大连: 大连海事大学, 2016.

[15] Vehring R, Hartman MS, Lechuga-Ballesteros D, et al. Compositions, methods and systems for respiratory delivery of two or more active agents: US9415009B2 [P]. 2016-08-16.

[16] Doty A, Schroeder J, Vang K, et al. Drug delivery from an innovative LAMA/LABA co-suspension delivery technology fixed-dose combination MDI: evidence of consistency, robustness, and reliability [J]. AAPS PharmSciTech, 2018 (19): 837-844.

[17] Hatley RH, Parker J, Pritchard JN, et al. Variability in delivered dose from pressurized metered-dose inhaler formulations due to a delay between shake and fire [J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2017, 30 (1): 71-79.

[18] 魏农农, 侯曙光, 金方. 吸入气雾剂中水分的摄入及其对产品性能的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43 (11): 949-953.

[19] Murata S, Izumi T, Ito H. Effect of the moisture content in aerosol on the spray performance of stimerin D hydrofluoroalkane preparations [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2012, 60 (5): 593-597.

(收稿日期: 2023-02-12; 修回日期: 2023-04-07)

去氧胆酸的合成工艺研究

刘会强, 宣博鑫, 苏睿, 王皓宇, 吴成军*, 孙铁民* (沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 对去氧胆酸的合成工艺进行研究, 对关键异构体杂质进行控制, 保证工艺稳定。**方法** 参照相关文献和原研专利所报道路线, 设计了以对甲基苯甲酰基保护甾体结构 A 环中的 3 位羟基, 经 6 步反应得到去氧胆酸的合成路线。**结果** 通过 MS、 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 对去氧胆酸进行了结构确证, 经优化反应条件, 获得了去氧胆酸, 总收率可达 18.7%。**结论** 得到质量稳定、可控的去氧胆酸的可工业化的生产方法。

关键词: 去氧胆酸; 合成工艺; 工业化

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1465-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.011

Synthesis of deoxycholic acid

LIU Hui-qiang, XUAN Bo-xin, SU Rui, WANG Hao-yu, WU Cheng-jun*, SUN Tie-min* (School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016)

Abstract: **Objective** To determine deoxycholic acid, and control the impurities of key isomers, ensure the stability of the process. **Methods** We referred to the route reported in related literatures and original patent, designed a synthetic route of deoxycholic acid, to protect the 3-hydroxyl group in the A ring of steroid structure with *p*-methylbenzoyl. Successfull sythesis was done through 6 steps. **Results** The structure of deoxycholic acid was confirmed by MS, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. After optimizing the reaction conditions, deoxycholic acid was obtained with an overall yield of 18.7%. **Conclusion** Industrialized production of deoxycholic acid with stable and controllable quality is achieved.

Key words: deoxycholic acid; synthesis technology; industrialization

去氧胆酸 (deoxycholic acid) 又名脱氧胆酸, 化学名为 $3\alpha, 12\alpha$ -二羟基- 5β -胆烷酸, 是主要存在于胆汁中的一种游离胆汁酸, 能破坏和溶解细胞膜, 使小范围局部皮下脂肪溶解减少。由凯瑟拉生物制药公司开发为去氧胆酸注射液, 用于改善与成人皮下脂肪相关的中度至重度轮廓突出或面部过于丰满^[1], 俗称“双下巴”。去氧胆酸注射液于 2015 年 4 月 29 日由 FDA 批准在美国上市, 在中国、欧洲和日本暂未上市, 但国内多家制药研究机构正在对该品种进行开发, 其中南京诺瑞特医药科技有限公司正在进行 III 期临床试验。

商业化的去氧胆酸主要来源于动物肝脏, 但其中可含有未知的细菌和毒素, 风险较高, 从药品安全角度考虑, FDA 仅批准非动物源的去氧胆酸用于注射剂开发。因此, 去氧胆酸的合成工艺

研发对于去氧胆酸的商品化至关重要。在查阅相关文献、原研专利的基础上, 通过比较不同路线的优势和缺点, 本研究选择以 9-羟基雄烯二酮 (9-OHAD) 为起始物料合成去氧胆酸, 通过考察相关反应条件, 确定各步骤的关键工艺参数, 对手性异构体分别进行控制, 确保工艺稳定, 产品质量可控。

文献报道去氧胆酸的主流合成路线主要有两种:

第一种是以胆酸为起始物料 (见图 1), 经沙瑞特氧化反应, 将 7 位的羟基选择性氧化为羰基, 然后再通过黄鸣龙反应, 将羰基还原为羟基, 生成去氧胆酸^[2]。该路线步骤较少, 但由于市售的胆酸大部分来源于动物肝脏, 可能含有未知的细菌毒素, 从而可能导致过敏等症状。因此, 不能

作者简介: 刘会强, 男, 硕士, 主要从事药物合成工艺研究, email: liuhuiqiang1991@163.com * 通信作者: 吴成军, 男, 副教授, 主要从事抗结核药物研究和药物合成工艺研究, email: chengjun871@163.com; 孙铁民, 男, 教授, 主要从事抗结核药物研究和药物合成工艺研究, email: suntiemin@126.com

作为起始物料进行注册申报。

第二种路线是以植物提取甾醇经发酵所得的 9-OHAD (见图 2)、氢化可的松以及可的松为原

料, 通过半合成制备去氧胆酸^[3]。该方法解决了以胆酸为起始物料带来的生物安全性问题, 且原料广泛商业化使用, 货源充足, 质量稳定可靠。

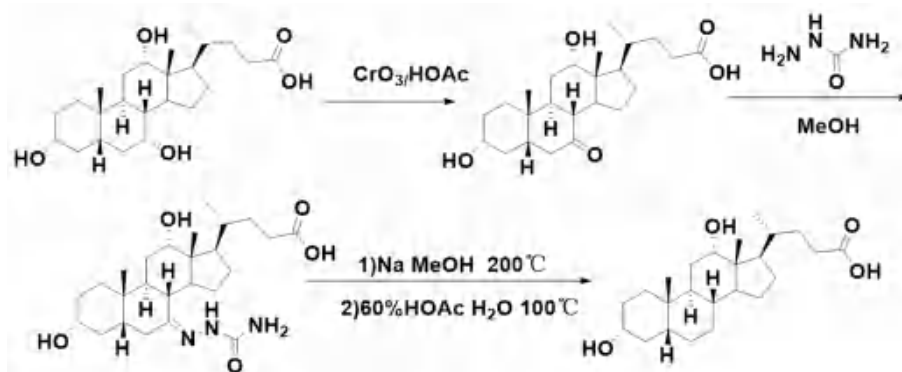


图 1 以胆酸为起始物料合成去氧胆酸的路线

Fig 1 Synthesis route of deoxycholic acid from cholic acid as starting material

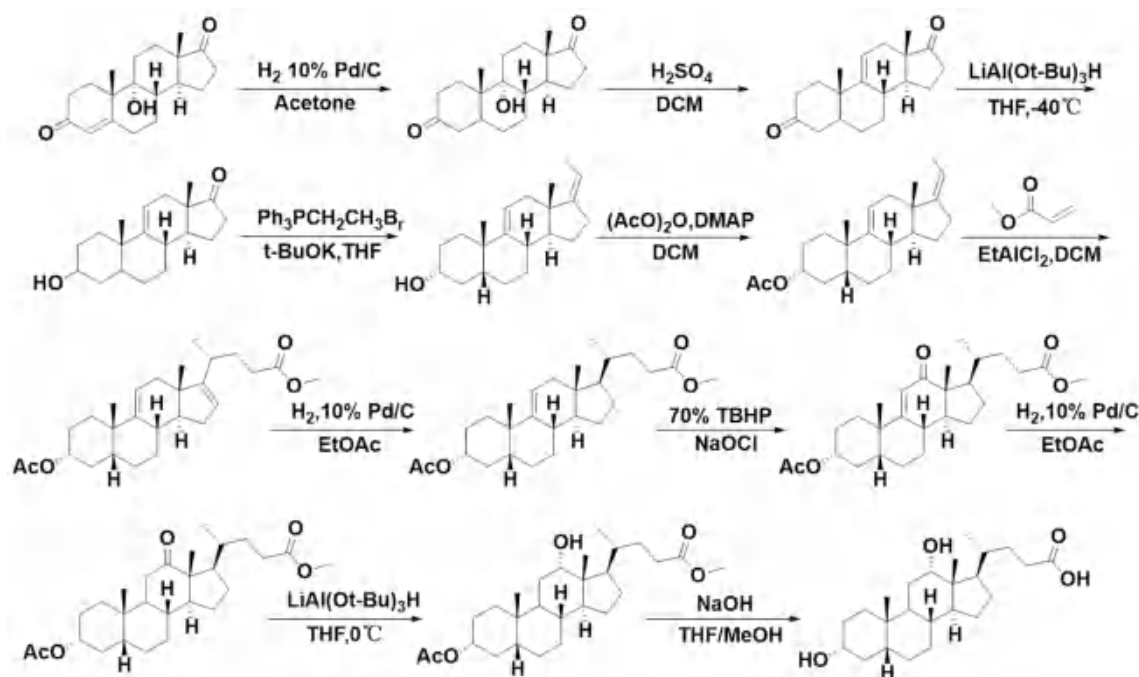


图 2 以 9-羟基雄烯二酮为起始物料合成去氧胆酸的路线

Fig 2 Synthesis route of deoxycholic acid from 9-hydroxy androstenedione

通过调研国内专利发现, 南京诺瑞特公司在原研专利路线的基础上以苯甲酰基保护 3 位羟基^[4]。为规避专利和摸索更好的制备方法, 课题组尝试使用乙酰基、苯甲酰基和对甲基苯甲酰基对羟基进行保护, 并进行后续衍生制备去氧胆酸, 最终选择以对甲基苯甲酰基为保护基进行去氧胆酸的工艺开发研究, 其优点如下:

①由于去氧胆酸主体为甾环结构, 没有紫外吸收, 需要使用 ELSD 或 CAD 检测器对各个中间体进行检测, 相比较于乙酰基, 使用苯甲酰基和对甲基苯甲酰基可以在甾体结构中引入共轭基团苯环, 便于反应中控检测及分析方法的开发。

②在工艺研究过程中发现, 以苯甲酰基保护的中间体 8 为油状物, 其他中间体为白色固体, 而对甲基苯甲酰基保护的中间体 7 为油状物, 中间体 8 及其他中间体则为性状较好的白色固体, 杂质去除效果更好, 所得中间体纯度也较高。由于中间体 6 反应至中间体 8 引入两个手性中心, 在中间体 8 为固体的情况下, 使用乙酸乙酯对中间体 8 进行纯化, 可以有效降低异构体杂质的含量, 有利于实现对后续中间体及成品中手性异构体杂质的控制, 保证后续步骤工艺稳定, 产品质量可控。

因此, 选择对甲基苯甲酰基保护羟基制备去氧胆酸, 赵诚等^[5]对本工艺 9-OHAD 到 6 进行

深入研究,本文在已有研究的基础上,对 7 到去氧胆酸进行深度的产业化研究,对关键中间体 8 中的手性杂质进行了研究,并开发了精制方法对

其进行控制;确定了中间体 10 的关键工艺参数,最终得到了适合工业化生产的工艺,具体的合成路线如图 3 所示。

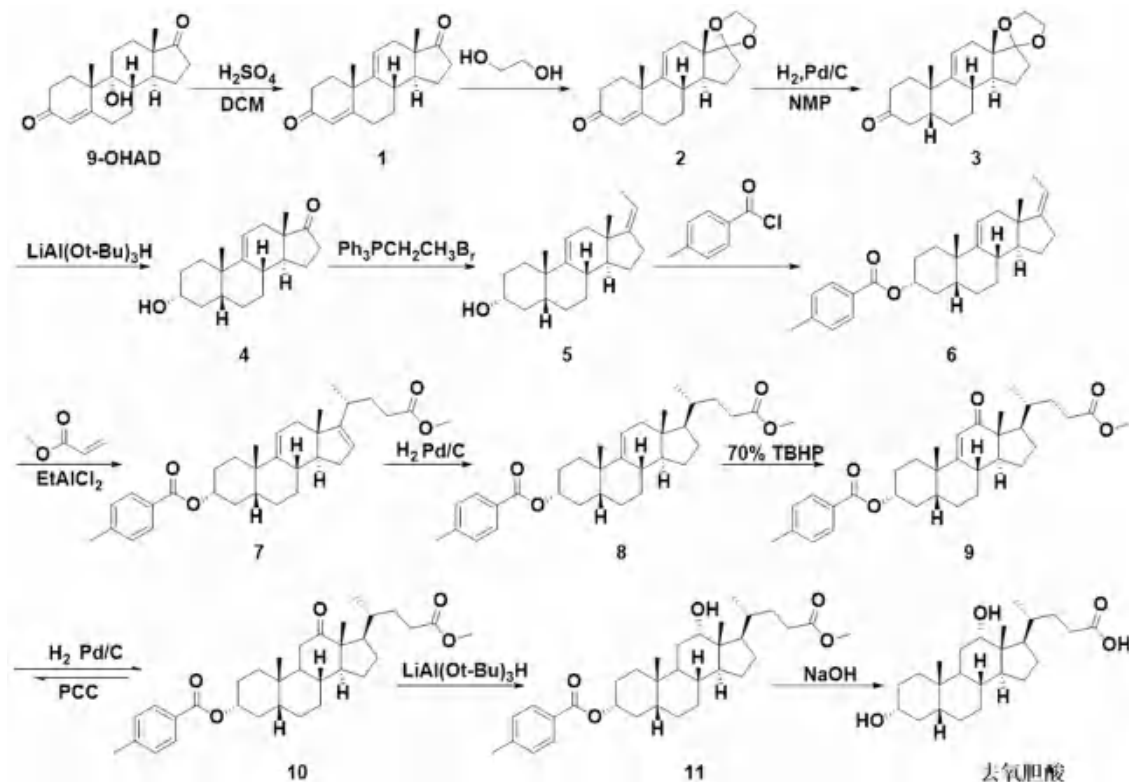


图 3 改进后的去氧胆酸合成路线

Fig 3 Improved synthetic route of deoxycholic acid

1 材料

化学试剂均为化学纯或分析纯,化合物 6 (纯度 $\geq 99\%$, 吉林汇康制药有限公司);丙烯酸甲酯 (纯度 $\geq 99\%$, 梯希爱上海化成工业发展有限公司);乙基二氯化铝 ($1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 研峰科技北京有限公司);三叔丁氧基氢化铝锂 (纯度 $\geq 98\%$, 萨恩化学技术上海有限公司);10% 钯碳 (陕西瑞科新材料股份有限公司);Agilent 1260-6120B 质谱仪 (美国安捷伦科技有限公司);BRUCKER AVANCE400 核磁共振波谱仪 (德国布鲁克科技有限公司)。

2 实验部分

2.1 化合物 7 的合成

向 20 L 反应釜中加入二氯甲烷 13 kg, 搅拌加入 1 kg (2.39 mol) 化合物 6 和 514 g (5.97 mol) 丙烯酸甲酯, 氮气保护, 反应液降温至 $-5 \sim 5^\circ\text{C}$, 滴加 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二氯乙基铝 4.1 kg (7.17 mol), 控温 $-5 \sim 5^\circ\text{C}$, 滴毕, 搅拌 30 min, 高低温一体机加热升温至 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 搅拌反应 44 h。

TLC 监测化合物 6 基本反应完全 (正庚烷-乙酸乙酯 = 5 : 1, 254 nm UV 显色)。向 50 L 反

应釜中加入纯化水 20 L, 降温至 $0 \sim 10^\circ\text{C}$ 预冷, 控温 20°C 以下将反应液滴入纯化水中。

反应液滴毕, 搅拌 15 min 后, 静置分液, 有机相用 5 L 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸洗涤 2 次, 再用 5 L 的 10% 氯化钠溶液洗涤 2 次, 合并氯化钠水相, 二氯甲烷 1 L 萃取, 合并有机相进行减压浓缩, 四氢呋喃 (THF) 2 L $\times 2$ 进行溶剂替换, 最后补加 THF 至 7 L 直接进行氢化反应。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , CDCl_3) δ : 7.91 (d, 2H, $J = 8.0 \text{ Hz}$), 7.19 (d, 2H, $J = 8.0 \text{ Hz}$), 5.42 ~ 5.41 (m, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.98 ~ 4.96 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.37 ~ 2.25 (m, 5H), 2.21 ~ 1.93 (m, 6H), 1.86 ~ 1.72 (m, 11H), 1.63 ~ 1.52 (m, 5H), 1.36 ~ 1.15 (m, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.05 (d, 3H, $J = 6.84 \text{ Hz}$), 0.67 (s, 3H)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz , CDCl_3) δ : 174.35, 166.12, 157.54, 143.17, 141.61, 129.55, 128.90, 128.16, 121.59, 119.07, 75.08, 67.92, 53.91, 51.42, 45.63, 41.93, 38.95, 37.21, 35.44, 34.82, 33.98, 32.27, 31.96, 31.89,

31.60, 29.64, 27.98, 26.71, 26.65, 25.61, 22.31, 21.61, 15.77。

2.2 化合物 8 的合成

向氢化反应釜中加入化合物 7 的 THF 溶液和 10% 钨碳 122.0 g (含水量 55%), 氮气置换 4 次, 再用氢气置换 4 次后补压至 1.4 MPa, 维持压力 1.2 ~ 1.4 MPa, 25 ~ 40 °C 搅拌 16 h 左右停止反应。

反应液过滤, 滤液减压浓缩至干, 加入乙酸乙酯 1 L 打浆 2 h, 过滤, 干燥得粗品 965.4 g, 粗品再用乙酸乙酯精制, 得化合物 8 白色固体 862.6 g, 两步总收率为 70.3%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.93 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.22 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.36 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.40 ~ 2.28 (m, 4H), 2.28 ~ 2.20 (m, 1H), 2.13 ~ 2.05 (m, 3H), 2.02 ~ 1.63 (m, 11H), 1.46 ~ 1.28 (m, 6H), 1.24 ~ 1.10 (m, 6H), 0.94 (d, 3H, $J = 6.36$ Hz), 0.60 (s, 3H)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.71, 166.18, 143.21, 129.56, 128.93, 128.21, 119.53, 75.17, 56.07, 53.26, 51.49, 42.02, 41.85, 40.93, 38.63, 36.52, 35.47, 35.24, 33.97, 31.05, 30.99, 29.66, 28.29, 28.00, 26.90, 26.81, 25.31, 21.65, 17.96, 11.67。

2.3 化合物 9 的合成

向 20 L 反应釜中分别加入乙酸乙酯 8 L, 中间体 8 800 g (1.58 mol), 升温至 50 ~ 55 °C 搅拌溶解后加入乙腈 1.6 L 和碘化铜 210.6 g (1.11 mol)。控温 50 ~ 55 °C, 分批加入 70% 的叔丁基过氧化氢 (TBHP) 共计 813.6 g (6.32 mol), 先向反应液中快速滴加 70% TBHP 243.9 g (1.90 mol), 然后每隔 1 h 再补加 70% 的 TBHP 81.4 g (0.63 mol), 共补加 7 次。补加完毕, 维持 50 ~ 55 °C 搅拌反应 16 h。

TLC 监测中间体 8 基本反应完全 (正庚烷 - 乙酸乙酯 = 15 : 1, 254 nm UV 显色), 反应液降温至 20 ~ 25 °C, 向反应液中缓慢加入 15% 的亚硫酸钠溶液 3.2 L, 并控温 30 °C 以下搅拌反应 15 min。布氏漏斗铺硅藻土进行过滤, 滤饼用乙酸乙酯 1.6 L 洗涤 2 次, 滤液转移至 20 L 反应釜中, 再用 15% 亚硫酸钠溶液 3.2 L 洗涤 2 次。

洗涤完毕, 20 ~ 25 °C 下, 向有机相中分批加入氯铬酸吡啶 (PCC) 340.6 g (1.58 mol), 平均分为 5 批, 每次间隔 1 h 进行加料, 加毕, 搅拌反应 16 h。

TLC 监测该反应基本完全 (正庚烷 - 乙酸乙酯 = 4 : 1, 254 nm UV 显色), 布氏漏斗铺硅藻土过滤, 滤饼用乙酸乙酯 1.6 L 洗涤 2 次, 滤液

转移至 20 L 反应釜中, 分别用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 洗涤 2 次, 再用 15% 的亚硫酸钠溶液洗涤 3 次, 洗涤完毕有机相减压浓缩。

浓缩完毕, 残余物用二氯甲烷 1.6 L 溶解, 硅胶 4.0 kg 湿法上样, 二氯甲烷为洗脱液进行柱层析, 收集目标点并进行减压浓缩, 浓缩残余物用正庚烷 5.6 L 打浆 2 h, 过滤, 干燥化合物 9 白色固体 486.5 g, 收率: 59.2%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.91 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.23 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.77 (s, 1H), 5.00 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.46 ~ 2.26 (m, 6H), 2.18 ~ 2.07 (m, 2H), 2.03 ~ 1.70 (m, 10H), 1.54 ~ 1.24 (m, 11H), 1.04 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz), 0.94 (s, 3H)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 205.29, 174.73, 166.15, 164.18, 143.43, 129.59, 128.99, 127.88, 123.75, 74.09, 53.52, 53.11, 51.50, 47.30, 41.91, 40.04, 37.87, 35.31, 35.15, 34.18, 31.50, 30.67, 29.80, 27.84, 27.40, 26.58, 26.23, 24.24, 21.65, 19.53, 10.77。

2.4 化合物 10 的合成

向 20 L 氢化反应釜中分别加入 14.4 L 乙酸乙酯, 480 g (0.92 mol) 化合物 9, 30 ~ 35 °C 搅拌溶解, 加入 10% 钨碳 240.0 g (含水 55%) 搅拌均匀, 氮气置换 3 次, 再用氢气置换 3 次, 氢气加压至 1.2 ~ 1.4 MPa, 50 °C 搅拌反应 8 h, 过滤, 收集滤液。

返工: 滤液中加入 PCC 79.5 g (0.37 mol), 搅拌反应 10 h, TLC 监测杂质 9-1B 和 11-1 (结构见图 4) 反应完全 (正庚烷 - 乙酸乙酯 = 4 : 1, 磷钼酸显色), 过滤, 滤液分别用 15% 亚硫酸钠溶液 7 L 洗涤两次, 再用纯化水洗涤 4 次, 有机相转移至氢化反应釜中, 直接进行第二次氢化。

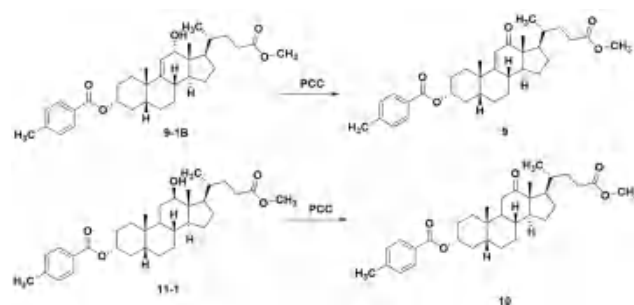


图 4 中间体 10 副产物返工处理路线

Fig 4 rework treatment route of by-products of intermediate 10

向反应釜中加入 10% 钨碳 96.0 g (含水 55%), 氮气置换 3 次, 再用氢气置换 3 次, 氢气加压至 1.2 ~ 1.4 MPa, 50 °C 反应 4 h, 过滤, 滤液减压浓缩至干, 加入正庚烷 2.88 L 打浆 2 h, 过滤, 50 °C 鼓风

干燥得化合物 **10** 白色固体 281.2 g, 收率: 58.3%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.92 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.24 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 4.96 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.52 (t, 1H, $J = 12.0$ Hz), 2.45 ~ 2.37 (m, 4H), 2.31 ~ 2.23 (m, 1H), 2.10 ~ 1.53 (m, 15H), 1.44 ~ 1.29 (m, 6H), 1.22 ~ 1.04 (m, 8H), 0.87 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 214.87, 174.69, 166.17, 143.39, 129.57, 129.00, 127.97, 74.04, 58.70, 57.55, 51.51, 46.47, 44.13, 41.41, 38.17, 35.68, 35.64, 35.43, 35.02, 32.27, 31.31, 30.53, 27.54, 26.97, 26.51, 26.03, 24.36, 22.78, 21.66, 18.61。

2.5 化合物 **11** 的合成

向 5 L 反应瓶中分别加入 THF 2.8 L 和 280.0 g (0.54 mol) 化合物 **10**, 室温搅拌溶清, 氮气保护下, 体系降温至 $-5 \sim 5^\circ\text{C}$ 。缓慢滴加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{LiAl}(\text{Ot-Bu})_3\text{H}$ 1080 mL (1.08 mol), 滴毕, 维持 $-5 \sim 5^\circ\text{C}$ 搅拌反应 40 h。

TLC 监测化合物 **11** 反应完全 (正庚烷-乙酸乙酯 = 4 : 1, 254 nm UV 显色), 向反应体系中缓慢滴加 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 267 mL, 控温 30°C 以下, 滴毕, 搅拌 15 min, 静置分液。有机相分别用 5% 碳酸氢钠溶液 1.1 L 洗涤一次, 再用饱和氯化钠溶液 1.1 L 洗涤两次, 有机相减压浓缩至干, 用正庚烷 1.1 L 打浆 2 h, 过滤, 干燥, 得中间体 **11** 248.2 g, 收率: 88.3%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.94 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.24 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 4.96 (m, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.42 ~ 2.35 (m, 4H), 2.29 ~ 2.21 (m, 1H), 2.06 ~ 1.82 (m, 7H), 1.76 ~ 1.29 (m, 15H), 1.21 ~ 1.10 (m, 3H), 1.01 ~ 0.97 (m, 6H), 0.71 (s, 3H)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.71, 166.25, 143.29, 129.59, 128.97, 128.13, 74.62, 73.18, 51.53, 48.35, 47.37, 46.51, 41.94, 36.02, 35.08, 34.95, 34.19, 33.74, 32.32, 31.04, 30.92, 28.80, 27.45, 27.00, 26.69, 26.04, 23.61, 23.18, 21.65, 17.37。

2.6 去氧胆酸粗品的合成

向 5 L 反应瓶中分别加入 THF 1.5 L, 无水甲醇 1.5 L, 中间体 **11** 245.0 g (0.47 mol), $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 搅拌溶解, 降温至 $10 \sim 15^\circ\text{C}$, 滴加 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液, 并控制温度不超过 25°C , 滴加完毕后, 保持 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 搅拌反应 20 h。

TLC 监测中间体 **11** 反应完毕 (正庚烷-乙酸乙酯 = 4 : 1, 254 nm UV 显色), 反应液减压浓缩去除溶剂, 浓缩完毕, 加入纯化水 3.0 L, 二氯甲烷 1.5 L 萃取 2 次, 水相用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液调节 pH 至 1 ~ 2, 析出大量白色固体, 搅拌 1 h 过滤, 纯化水洗涤滤饼至中性, 50°C 干燥后用甲叔醚 1.5 L 打浆 6 h, 过滤、干燥得去氧胆酸粗品 163.4 g, 收率: 89.1%。

2.7 去氧胆酸粗品的精制

向 5 L 反应瓶中分别加入纯化水 2.9 L, 去氧胆酸粗品 160.0 g (0.41 mol), 搅拌滴加氢氧化钠 17.9 g (0.45 mol) 与 400 mL 纯化水配制的溶液, 滴毕, 体系澄清, 再用二氯甲烷 1.6 L 萃取两次, 水相中加入活性炭 0.80 g, 50°C 搅拌 30 min, 过滤, 水相降温至 $20 \sim 25^\circ\text{C}$, 滴加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液, 调节 pH 为 1 ~ 2, 析出大量白色固体, 搅拌 2 h 后过滤、纯化水洗涤滤饼至中性, 50°C 干燥得去氧胆酸精制品 153.1 g, 熔点: $173 \sim 174^\circ\text{C}$, 收率: 95.7%。ESI-MS m/z : 391.2 $[\text{M}-1]^-$; HR-MS: Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$ 392.2927, found 392.2929; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.92 (s, 1H), 4.47 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 4.21 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 3.79 (m, 1H), 2.26 ~ 2.19 (m, 1H), 2.13 ~ 2.05 (m, 1H), 1.84 ~ 1.45 (m, 11H), 1.37 ~ 1.16 (m, 11H), 1.07 ~ 0.851 (m, 9H), 0.60 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 175.40, 71.46, 70.41, 47.91, 46.61, 46.45, 42.07, 36.75, 36.11, 35.62, 35.44, 34.27, 33.38, 31.27, 31.20, 30.70, 29.06, 27.65, 27.45, 26.57, 23.97, 23.54, 17.36, 12.89。

2.8 杂质 **8-2** (结构见图 5) 的制备

取中间体 **8** 精制母液减压浓缩, 得 12.5 g 黄色固体, 进行液相制备分离, 得无色油状物 0.13 g。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.94 ~ 7.96 (d, 2H), 7.22 ~ 7.29 (d, 2H), 5.47 ~ 5.48 (d, 1H), 4.99 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.27 ~ 2.42 (m, 6H), 2.00 ~ 2.16 (m, 3H), 1.54 ~ 1.88 (m, 12H), 1.14 ~ 1.47 (m, 7H), 1.11 (s, 3H), 0.85 ~ 0.87 (d, 3H), 0.73 (s, 3H)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.54, 166.26, 143.24, 140.26, 129.57, 128.94, 128.24, 120.02, 75.27, 52.47, 51.51, 51.15, 41.92, 41.75, 38.82, 36.91, 35.60, 35.53, 34.01, 33.57, 32.49, 32.40, 29.58, 28.01, 27.51, 27.23, 26.88, 24.99, 22.88, 21.65, 16.64。LC-MS: 524.4 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 。

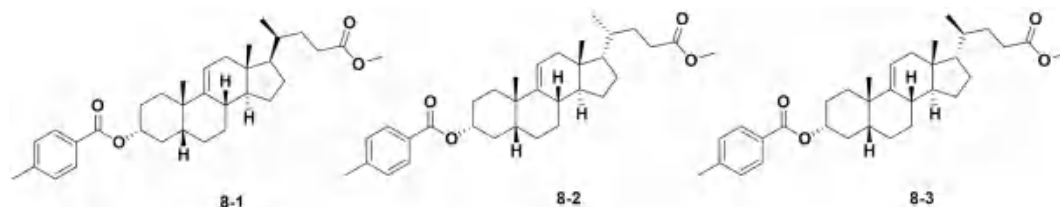


图 5 中间体 8 的杂质

Fig 5 Impurities of intermediate 8

2.9 杂质 9-1B (见图 4) 的制备

向 100 mL 反应瓶中分别加入中间体 9 (5.0 g, 1.0 eq)、THF 50 mL, 搅拌溶解, 冰水浴降温至 0 ~ 5 °C。向反应瓶内分批加入氢化铝锂 (0.36 g, 1.0 eq), 加料完毕后升温至 20 ~ 25 °C 保温搅拌 2 h, TLC 监测中间体 9 基本反应完全 (正庚烷 - 乙酸乙酯 = 4 : 1)。

反应液减压浓缩, 加入硅胶 15.0 g 拌样进行柱层析, 正庚烷 - 乙酸乙酯 = 10 : 1 进行洗脱, 收集目标杂质洗脱液, 减压浓缩得白色固体 3.41 g。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.94 ~ 7.92 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.28 ~ 7.22 (m, 2H), 5.22 (s, 1H), 5.01 ~ 4.96 (m, 1H), 4.15 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.41 ~ 2.37 (m, 4H), 2.33 ~ 2.25 (m, 1H), 2.18 ~ 1.24 (m, 22H), 1.14 ~ 1.10 (m, 6H), 0.64 (s, 3H)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.80, 166.21, 143.31, 143.15, 129.56, 128.96, 128.12, 125.23, 77.55, 74.91, 57.21, 51.77, 51.52, 46.11, 41.83, 38.54, 36.17, 35.32, 33.98, 32.95, 31.79, 30.17, 29.64, 27.93, 26.63, 25.76, 24.39, 21.65, 20.03, 7.10。

2.10 杂质 11-1 的制备

向 100 mL 反应瓶中分别加入化合物 10 (5.0 g, 1.0 eq) 和 THF 50 mL 室温搅拌溶解, 氮气保护下, 体系降温至 -5 ~ 5 °C。缓慢滴加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{LiAl}(\text{Ot-Bu})_3\text{H}$ (19.2 mL, 2.0 eq), 滴毕, 维持 20 ~ 30 °C 搅拌反应 40 h。

TLC 监测化合物 11 反应完全 (正庚烷 - 乙酸乙酯 = 4 : 1, 254 nm UV 显色), 向反应体系中缓慢滴加 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 5 mL, 控温 30 °C 以下, 滴毕后搅拌 15 min, 静置分液。有机相分别用 5% 碳酸氢钠溶液 20 mL 洗涤一次, 再用饱和氯化钠溶液 20 mL 洗涤一次, 有机相减压浓缩至干后进行柱层析, 正庚烷 - 乙酸乙酯 = 10 : 1 进行洗脱, 收集目标点, 减压浓缩得白色固体 1.2 g。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.96 ~ 7.93 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.28 ~ 7.23 (m, 2H), 4.97 (s, 1H), 3.50 ~ 3.46 (m, 1H),

2.42 ~ 2.37 (m, 4H), 2.33 ~ 2.25 (m, 1H), 1.98 ~ 1.86 (m, 6H), 1.78 ~ 1.46 (m, 11H), 1.39 ~ 0.96 (m, 14H), 0.75 (s, 3H)。

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.82, 166.20, 143.33, 129.56, 128.98, 128.13, 79.54, 74.55, 57.41, 54.50, 51.53, 48.00, 41.66, 39.35, 35.05, 34.58, 34.52, 32.71, 32.37, 32.21, 31.24, 29.40, 27.00, 26.74, 25.92, 23.92, 23.61, 23.23, 21.66, 21.05, 7.92。

3 结果与讨论

本工艺以定制生产的中间体 6 作为起始物料进行研究, 通过查询相关文献^[6-8], 对关键步骤相应的关键工艺参数进行考察。

由于中间体 7 为油状物, 难以通过重结晶进行纯化, 所以将中间体 7 中的杂质合并并在中间体 8 中进行研究控制, 其中对残留风险较高的异构体杂质 8-1、8-2 和 8-3 进行研究。由于杂质 8-1 和杂质 8-3 极性接近, HPLC 在同一位置出峰, LC-MS 结果与杂质 8-2 相同, 因此, 推测了杂质 8-1 和杂质 8-3, 为杂质 8-2 的光学异构体。杂质 8-2 可能是中间体 8 在还原过程中的产生对映体, 而杂质 8-1 和杂质 8-3 则是在制备中间体 7 时产生少量的异构体, 经还原产生杂质 8-1 和杂质 8-3。

在研究过程中筛选了不同的反应条件如温度、氢化压力、催化剂当量等, 所得中间体 8 中的异构体杂质含量基本一致, 为控制中间体 8 中的手性异构体杂质和其他有关物质, 对中间体 8 精制方法进行研究, 分别使用异丙醇、丙酮、乙酸乙酯和甲基叔丁基醚对中间体 8 进行精制, 分别采用升温至回流溶解, 降至室温析晶 2 h 后过滤等方法, 精制结果如表 1 所示。

表 1 中间体 8 不同溶剂精制 HPLC 测定结果

Tab 1 HPLC results of refining intermediate 8 with different solvents

精制溶剂	主峰/%	8-2/%	8-1/8-3/%	收率/%
粗品	93.87	0.44	1.30	/
异丙醇	97.95	0.34	1.10	88.0
丙酮	97.95	/	0.24	66.9
乙酸乙酯	98.26	/	0.25	86.6
甲叔醚	97.54	/	0.26	87.2

根据 HPLC 结果, 最终选择精制效果更好, 廉价易得的乙酸乙酯为精制溶剂, 可有效降低异构体及其他有关物质的含量, 并制定了中间体 **8** 的内控标准, 将手性杂质 **8-2** 控制在含量 $< 0.1\%$; 由于杂质 **8-1** 和杂质 **8-3** 在同一位置出峰, 将其总量控制 $< 0.5\%$, 总杂 $< 2.0\%$, 以保证后续中间体和成品的质量稳定可控。

中间体 **9** 在钨碳催化作用下, 氢化得到化合物 **10**。如图 4 所示, 在氢化反应过程中, 会产生羰基还原的副产物杂质 **9-1B** 和过度还原杂质 **11-1**, 为提高中间体 **9** 的转化率, 氢化反应处理完毕后, 使用 PCC 氧化进行返工处理, 将 **9-1B** 转化为中间体 **9**, 而 **11-1** 则转化为中间体 **10**, 将反应液再次进行氢化还原, 直至达到理想转化率。

由于副产物杂质 **9-1B** 和 **11-1** 含量较大且不可避免, 在氢化反应完成后, 需要使用 PCC 将杂质 **9-1B** 氧化为中间体 **9**, 杂质 **11-1** 氧化为中间体 **10**, 反应液再次氢化, 使反应转化率达到最高。在前期研究中需要进行 2 ~ 3 次返工处理, 通过调整氢化温度、压力和催化剂用量, 尝试对中间体 **10** 制备过程中产生的副产物 **9-1B** 和 **11-1** 进行控制研究。结果表明, 温度是该步骤的关键参数, 温度过低, 中间体 **9** 反应不完全, 且羰基还原的副产物 **9-1B** 较大; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应结果相近。因此, 选择将温度控制在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行氢化反应, 经过一次返工处理, 中间体 **10** 粗品纯度可达 $85\% \sim 90\%$, 缩短了生产周期, 降低了生产成本 (见表 2)。

表 2 中间体 **10** 氢化温度考察结果 (1.0 Mpa)

Tab 2 Hydrogenation temperature investigation of intermediate **10** (1.0 Mpa)

温度 / $^{\circ}\text{C}$	中间体 9 /%	中间体 10 /%	9-1B /%	11-1 /%
40	4.30	40.62	40.21	11.90
50	0.30	50.58	30.07	14.49
60	0.70	59.21	12.58	23.39
70	0.65	58.39	11.34	25.67

经过不断的改进优化, 该工艺路线中间体质量和收率稳定, 并进行了 3 批百克级放大, 均得到符合药典标准的去氧胆酸原料药 (见表 3), 为

去氧胆酸的工业化化生产指明了方向。

表 3 3 批合成的去氧胆酸结果

Tab 3 Three batches of data of synthetic deoxycholic acid

批次	原料中间体 6 /kg	去氧胆酸 /g	收率 /%	纯度 /%
1	1	153.1	18.3	99.8
2	1	156.5	18.7	99.8
3	1	149.8	17.9	99.9

4 结论

本文在参考相关文献专利的基础上对去氧胆酸的制备工艺进行系统研究, 以定制合成的化合物 **6** 为起始物料, 经 6 步反应制得去氧胆酸, 总收率为 $15\% \sim 20\%$ 。反应引入了 3 个手性中心, 对手性异构体进行了研究和控制, 确定了关键工艺参数, 并经过多个批次的放大生产得到合格的去氧胆酸产品, 说明整个工艺稳定、可操作性强, 适合工业化生产。

参考文献

- [1] 贝丁菲德尔, 桑多瓦尔, 约尔格森, 等. 使用脱氧胆酸和其盐对堆积脂肪的治疗: CN108366975A [P]. 2016-11-04.
- [2] Gallagher TF, Long WP. Partial oxidation of cholic acid [J]. J Biol Chem, 1943, 147 (1): 131-134.
- [3] 罗伯特·莫里亚蒂, 纳撒尼尔·戴维纳, 罗伊·小斯瓦尔英根, 等. 合成胆汁酸组合物、方法和制剂: CN106146594A [P]. 2008-06-18.
- [4] 林成刚, 桂力, 陈盼, 等. 一种制备去氧胆酸的方法: CN106146593A [P]. 2015-04-14.
- [5] 赵诚, 郝耀宗, 甄志彬, 等. 去氧胆酸的合成工艺研究 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47 (2): 118-131.
- [6] Batcho AD, Berger DE, Uskokovic MR, et al. C-20 Stereospecific introduction of a steroid side chain [J]. J Am Chem Soc, 1981, 103 (5): 1293-1295.
- [7] Katona BW, Rath NP, Anant S, et al. Enantiomeric deoxycholic acid: total synthesis, characterization, and preliminary toxicity toward colon cancer cell lines [J]. J Org Chem, 2007, 72 (24): 9298-9307.
- [8] Houston TA, Tanaka Y, Koreeda M. Stereoselective construction of 22-oxygenated steroid side chains by dimethylaluminum chloride-mediated ene reactions of aldehydes [J]. J Org Chem, 1993, 58 (16): 4287-4292.

(收稿日期: 2023-02-14; 修回日期: 2023-04-11)

高良姜素通过抑制 JAK2-STAT3 磷酸化减轻小鼠内皮炎症改善动脉粥样硬化

陈杨¹, 喻霞¹, 赵紫玄¹, 陈磊^{2, 3}, 李鑫^{2, 3}, 许时丽¹, 李荣^{1*} (1. 南华大学药物药理研究所和附属第二医院, 南华大学衡阳医学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 中南大学湘雅二医院血管外科, 长沙 410011; 3. 中南大学血管病研究所, 长沙 410011)

摘要: **目的** 探讨高良姜素 (Gal) 对内皮炎症和动脉粥样硬化 (AS) 发生发展的拮抗作用及可能的作用机制。 **方法** 将 APOE^{-/-} 小鼠随机分为溶媒组和 Gal 组。喂食 12 周高脂饲料, 在第 8 周 Gal 组灌胃 80 mg/(kg·d) 的 Gal 进行干预, 检测低密度脂蛋白、总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白的水平, 油红 O 染色法检测斑块面积, qPCR 法检测主动脉弓及其内膜处 ICAM1、CD62e 的 mRNA 表达。人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中加入肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Gal、STAT3 激动剂 (Colivelin) 处理, CCK8 实验检测细胞活力, qPCR 法和 Western blot 检测 ICAM1、VCAM1、CD62e 的 mRNA 和蛋白表达以及 p-STAT3、p-JAK2 的蛋白表达, 内皮细胞黏附试验检测 THP-1 细胞黏附于 HUVECs 相对密度。 **结果** 与溶媒组相比, Gal 显著减少小鼠主动脉大体及其根部粥样斑块形成, 减低小鼠血浆中低密度脂蛋白、总胆固醇和三酰甘油水平, 升高高密度脂蛋白水平; Gal 使小鼠主动脉弓部及其内膜的 ICAM1 和 CD62e 的 mRNA 表达减低。50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gal 对 HUVECs 无毒性; TNF- α 均可使 HUVECs 中 ICAM1、CD62e、VCAM1 的 mRNA 和蛋白表达以及 p-STAT3、p-JAK2 蛋白表达升高; TNF- α 可使黏附于 HUVECs 的 THP-1 细胞个数增加。Gal 加入后可显著降低 ICAM1、CD62e、VCAM1 的 mRNA 和蛋白表达以及 p-STAT3、p-JAK2 蛋白表达; Gal 使得黏附于 HUVECs 的 THP-1 细胞个数减少。与 TNF- α + Gal 组相比, Colivelin 增加 ICAM1 和 VCAM1 的蛋白表达。 **结论** Gal 通过抑制 JAK2-STAT3 磷酸化减轻小鼠内皮炎症改善动脉粥样硬化。

关键词: 高良姜素; 动脉粥样硬化; 内皮炎症; 信号转录及转录激活因子 3

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1472-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.012

Galangin alleviates the endothelial inflammation and attenuates atherosclerosis via inhibiting JAK2-STAT3 phosphorylation in mice

CHEN Yang¹, YU Xia¹, ZHZO Zi-xuan¹, CHEN Lei^{2, 3}, LI Xin^{2, 3}, XU Shi-li¹, LI Rong^{1*} (1. *Institute of Pharmacy & Pharmacology, Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang Hunan 421001*; 2. *Department of Vascular Surgery, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011*; 3. *Institute of Vascular Disease, Central South University, Changsha 410011*)

Abstract: Objective To determine the inhibition of galangin (Gal) on the endothelial inflammation and atherosclerosis (AS) formation and related mechanism. **Methods** APOE^{-/-} mice were randomly divided into a vehicle group and a Gal group. High-fat diet was fed for 12 weeks. The mice in the Gal group were treated with 80 mg/(kg·d) Gal by gavage from the 8th week. The levels of LDL-C, total cholesterol, triglycerides and HDL-C were detected. The area of plaque was detected by oil Red O

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (No.2022JJ50159); 湖南省药学会医院药学研究基金项目 (No.2020YXH005); 衡阳市科技计划项目 (No.2020jh042775); 中南大学前沿交叉项目 (No. 2023QYJC040)。

作者简介: 陈杨, 男, 硕士研究生, 主要从事中药单体高良姜素药理作用及作用机制研究, email: cyang1614@163.com *通信作者: 李荣, 女, 副教授, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学与临床药理学研究, email: 2523657886@qq.com

staining. The mRNA expressions of *ICAM1* and *CD62e* were detected by qPCR in the aortic arch and its intima. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with tumor necrosis factor- α (TNF- α), Gal and STAT3 agonist (Colivelin). The cell viability was detected by CCK8 assay. The mRNA and protein expressions of ICAM1, VCAM1 and CD62e as well as the protein expressions of p-STAT3 and p-JAK2 were detected by qPCR and Western blot. The relative density of THP-1 cells adhering to HUVECs was detected by the endothelial cell adhesion test. **Results** Compared with the vehicle group, Gal significantly reduced the formation of atherosclerotic plaque in the aorta and its root, decreased the levels of low-density lipoprotein, total cholesterol and triglyceride, and increased the level of high-density lipoprotein in the plasma of mice. Gal at 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ showed no toxicity to HUVECs. The mRNA expression of *ICAM1* and *CD62e* was decreased in the aortic arch and its intima of mice. The mRNA and protein expression of ICAM1, CD62e, VCAM1 and the protein expression of p-STAT3 and p-JAK2 in HUVECs were significantly increased in the TNF- α groups. TNF- α increased the number of THP-1 monocytes adhering to HUVECs. After adding Gal, The mRNA and protein expression of ICAM1, CD62e and VCAM1 as well as the protein expression of p-STAT3 and p-JAK2 was significantly increased. Compared with the TNF- α + Gal group, the protein expression of ICAM1 and VCAM1 was increased by colivelin. **Conclusion** Galangin may alleviate the endothelial inflammation and attenuate the atherosclerosis via inhibiting JAK2-STAT3 phosphorylation in mice.

Key words: galangin; atherosclerosis; endothelial inflammation; signal transcription and transcriptional activator 3

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是造成心血管疾病致死的重要因素^[1], 它是一种动脉壁的慢性炎症疾病^[1-5]。AS 的发生发展伴随着内膜损伤、脂质聚集、氧化应激、炎症反应、血管平滑肌迁移增生等^[2-3]。

近年来研究发现黄酮类中药单体在预防、治疗 AS 中起到了重要作用。高良姜素 (galangin, Gal) 是从高良姜中提取的一类黄酮类化合物。Gal 具有强大的抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抑菌作用^[6-11]。Aladaileh 等^[10]报道了 Gal 可抑制炎症、细胞凋亡和由氧化修饰低密度脂蛋白诱导的内皮细胞的内皮间质转化。此外, 它还可以通过抑制细胞凋亡和炎症来预防糖尿病大鼠的心脏损伤^[12]。研究还发现 Gal 可通过调节 Janus 相关激酶 (Janus kinase, JAK) / 信号转导器和转录激活器 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路来抑制人类癌症^[13-14]。JAK2/STAT3 信号通路对细胞凋亡和增殖起着关键的作用, 并且参与 AS 形成和促进血管细胞炎症^[14]。然而, 至今尚未见相关研究阐明 Gal 对 AS 的影响及其作用是否与 JAK2/STAT3 信号通路有关。基于此, 本项目旨在阐明 Gal 对内皮炎症和 AS 的影响以及具体机制, 以期 AS 的临床治疗提供新的药物和靶点。

1 材料

1.1 实验动物和细胞

C57BL/6J 遗传背景的载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 雄性, SPF 级, 8 周龄, 体质量 (22 $\pm$ 2) g, 所有小鼠饲养于南华大学实验动物中心 (SPF 级)。人脐静脉内皮细胞 (HUVECs, ScienCell 公司), 人急性单核白血病细胞 (THP-1, ATCC 公司)。本实验通过南华大学附属第二医院伦理委员会批准。

1.2 试剂

羟甲基纤维素钠 (CMC-Na)、Gal (纯度: 99%, 细胞实验用)、油红 O 粉末 (Sigma-Aldrich 公司); 总胆固醇试剂盒、三酰甘油试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒 (南京建成生物工程有限公司); Gal (纯度: 98%, 上海源叶生物技术有限公司, 动物实验用); RNA 提取试剂盒、反转录试剂预混液试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司); 内皮细胞培养基 (ScienCell 公司); 青霉素链霉素、RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 蛋白 (R&D 公司); 钙黄绿素 (Invitrogen 公司); 血管细胞黏附分子-1 (VCAM1)

抗体、E-选择素 (CD62e) 抗体 (Abcam 公司); 细胞间黏附分子-1 (ICAM1) 抗体、p-JAK2 抗体 (Abclonal 公司); p-STAT3 抗体 (CST 公司); 超敏化学发光试剂 (US Everbright® Inc 公司); 蛋白酶抑制剂 (Keygen Biotech 公司); 聚乙二醇和聚乙烯醇水溶性混合物 (OCT)、磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS)、二喹啉甲酸 (BCA)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE)、磷酸化酶抑制剂 (Sharp 公司)。高脂饲料 (HFD, Research Diets 公司); 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF, Millipore 公司); Colivelin (陶术生物公司)。CCK8 试剂盒 (GLP BIO 公司)。

1.3 仪器

超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), 倒置显微镜 (Nikon 公司), 离心机 (Sangon Biotech 公司), 超速冷冻离心机、细胞培养箱、超低温冰箱、组织匀浆机 (Thermo Fisher Scientific 公司), 酶标仪、电泳仪、转膜仪、超声波仪器 (Bio-Rad 公司), C300 型凝胶成像系统 (Azure Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 高良姜的配制

动物实验用的 Gal 溶于 0.05% CMC-Na, 超声溶解为乳白色的溶液。细胞实验用的 Gal 用二甲亚砜溶解。

2.2 动物实验设计及取材

14 只 APOE^{-/-} 鼠随机分成溶媒组和高良姜素组 (Gal 组), 每组 7 只, 全部喂养 12 周 HFD。溶媒组在第 8 周每日给予 0.05% CMC-Na (100 μL) 灌胃, Gal 组给予 80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Gal 灌胃干预。喂养 3 个月取材, 腹腔注射水合氯醛麻醉小鼠, 处死, 取血, 快速分离心脏以及整条大动脉: ① 在小鼠心脏平行主动脉瓣切去主动脉根部, 使用 OCT 包埋, 冰冻切片机快速切取 4 μm 左右的含主动脉瓣膜的切片, 保存于 -20°C , 用于主动脉瓣膜的油红 O 染色; ② 将主动脉弓部切取下来, 冻存于 -80°C , 用于提取 RNA; ③ 胸主动脉以及胸主动脉以下部分大动脉全长浸泡于 4% 多聚甲醛中, 24 h 后进行油红 O 染色。所有动物实验遵循南华大学实验动物伦理委员会的相关规定。

2.3 血浆脂质检测

血浆中脂质水平使用酶比色法检测试剂盒进行测量, 总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇根据试剂盒说明书进行操作检测。

2.4 内膜 RNA 提取

参考 Haemming^[15] 的文献从主动脉中分离出内膜 RNA。用 PBS 仔细冲洗主动脉, RNA 提取试剂进行内膜剥离并且冲洗 10 s, 停顿 10 s, 再冲洗 10 s, 收集在 EP 管中, 并在液氮中快速冷冻。

2.5 油红 O 染色

首先配制油红 O 储存液, 按照 0.5 g 油红 O 粉末: 100 mL 异丙醇的比例将油红 O 粉末溶于异丙醇中, 震荡溶解 30 min。配制油红 O 工作液, 按照 300 mL 油红 O 储存液: 200 mL 纯水的比例混合均匀, 用定性滤纸过滤后备用。将取材好的大动脉放置在包埋盒中, 用显微剪刀剪开大动脉, 固定大动脉, 将组织浸泡于配制好的油红 O 工作液中, 摇床震荡 2 ~ 3 h, 回收油红 O 工作液, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 70% 乙醇浸泡分化 (4 ~ 5 s), 直至脂质斑块呈红色而周围组织呈白色, 浸泡在 PBS 中, 置于黑色底板上, 使用数码相机进行拍摄。使用 Lab-Tek 组织切片机切取 OCT 包埋的主动脉根部的冰冻切片, 切片解冻, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 纯水洗涤 2 min, 60% 异丙醇浸泡 2 min, 将切片浸泡于配制好的油红 O 工作液中 20 ~ 30 min, 自来水洗涤, 苏木精染色 3 min 左右, 自来水洗涤, 0.01% 碳酸锂返蓝 5 s, 自来水水洗, 水溶性封片剂封片。使用显微镜进行拍摄, Image-Pro Plus 软件 (Media Cybernetics) 测量染色面积。

2.6 细胞培养及处理

内皮细胞培养基培养 HUVECs, 含 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素双抗混合液的 1640 培养基培养 THP-1, 置于 37°C 、5% CO_2 、相对湿度为 90% 的培养箱中。所有实验使用的细胞均传代少于 6 次, 细胞融合度到 80% ~ 90% 后使用 STAT3 激动剂 (Colivelin, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Gal (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 1 h, 再加入 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 处理 HUVECs 12 h, 弃去上清液, 用于后续实验。

2.7 内皮细胞黏附试验^[16]

收集 THP-1 细胞, 无血清 1640 培养基洗涤 2 遍后重悬制备单细胞悬液, 加入钙黄绿素至其终浓度为 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 吹打混匀, 包裹锡箔纸, 放入培养箱孵育 30 min。加入含血清 1640 培养基, 打匀, 离心, 含血清 1640 培养基洗涤 3 遍后重悬 THP-1 细胞悬液, 加入加样槽。期间使用排枪吸弃培养于 96 孔板中的 HUVECs 的原培养基, 使用取含血清的 1640 培养基洗涤一遍, 排枪吸干培养基, 之后每孔加入 200 μL 混匀的 THP-1 细胞, 37°C 孵育 1 h。无血清 1640 培养基洗涤 4 遍, 荧光显微镜捕捉图像。每个视图中荧光个数表示附

着在 HUVECs 上的 THP-1 细胞数量,并对随机获得的图像进行量化。

2.8 蛋白质印迹法实验

RIPA 裂解液前 5 min 加入蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂,收集 HUVECs 样本加入 RIPA 裂解液裂解 30 min,离心 ($12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min),取上清,BCA 法测定蛋白浓度:100℃使蛋白变性,10% SDS-PAGE 凝胶电泳后,将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,膜与一抗 4℃ 孵育过夜,二抗常温孵育 1 h,膜滴加超敏化学发光试剂曝光,Image J 软件对条带灰度值进行统计与分析。

2.9 实时荧光定量 PCR

使用组织匀浆机对主动脉弓组织进行匀浆, RNA 提取试剂盒提取小鼠主动脉弓、主动脉弓内膜和 HUVECs 细胞总 RNA,通过反转录试剂盒获得 cDNA,并且根据荧光定量 PCR 试剂盒说明进行实时荧光定量 PCR。以 *human-GAPDH*, *mouse-β-actin* 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达量。*human-GAPDH* 引物序列为:上游 5'-AGGTC-CACCACTGACACGTT-3',下游 5'-CTGCACCAC-CAACTGCTTAG-3';*human-VCAM1* 引物序列为:上游 5'-GCTGCTCAGATTGGAGACTCA-3',下游 5'-CGCTCAGAGGGGCTGTCTATC-3';*human-ICAM1* 引物序列为:上游 5'-TCTGTGTC-CCCCTCAAAGTC-3',下游 5'-GGGGTCTCTAT-GCCCAACAA-3';*human-CD62e* 引物序列为:上游 5'-AATCCAGCCAATGGGTTCG-3',下游 5'-GCTC-CCATTAGTTCAAATCCTTCT-3';*mouse-β-actin* 引物序列为:上游 5'-GAAATCGTGCGTGACATCAAAG-3',下游 5'-TGTAGTTTCATGGATGCCACAG-3';*mouse-VCAM1* 引物序列为:上游 5'-GTTCCAGC-GAGGGTCTACC-3',下游 5'-AACTCTTGGCAAA-

CATTAGGTGT-3';*mouse-ICAM1* 引物序列为:上游 5'-GTGATGCTCAGGTATCCATCCA-3',下游 5'-CA-CAGTTCTCAAAGCACAGCG-3';*mouse-CD62e* 引物序列为:上游 5'-ATGCCTCGCGCTTCTCTC-3',下游 5'-GTAGTCCCGCTGACAGTATGC-3'。

2.10 CCK-8 法检测细胞毒性

将 HUVECs 细胞接种到 96 孔板中培养过夜,每组 100 μL (8×10^3 个),每组 6 个复孔,第 2 日吸出原培养基,加入含不同浓度 Gal (0、25、50、100 μmol · L⁻¹) 的培养基 100 μL 培养 12 h。每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,避光培养 2 h。用酶标仪在 450 nm 波长处测定每孔的吸光度值 (*A*),用空白培养基来校正。细胞存活率 (%) = $[(A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

2.11 统计学方法

计量资料采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两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。所有数据均采用 GraphPad 8.0 (GraphPad Software, Inc) 统计软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 小鼠动脉粥样硬化斑块面积

主动脉根部油红 O 染色显示,溶媒组小鼠有大量脂质堆积于主动脉窦处,主动脉根部处相对斑块面积占比为 10.7%,而在 Gal 组小鼠主动脉根部相对斑块面积占比为 4.8%,减少约 45.15% (见图 1A)。主动脉大体油红 O 染色显示,溶媒组小鼠管腔狭窄明显,大量脂质堆积于管壁,脂质在血管内皮沉积,脂质斑块被染为红色,小鼠主动脉相对斑块面积占比为 10.1%,而在 Gal 组小鼠胸腹降主动脉斑块面积占比为 2.83%,减少约 71.56% (见图 1B)。表明 Gal 对 AS 小鼠斑块的发生发展具有明显的抑制作用。

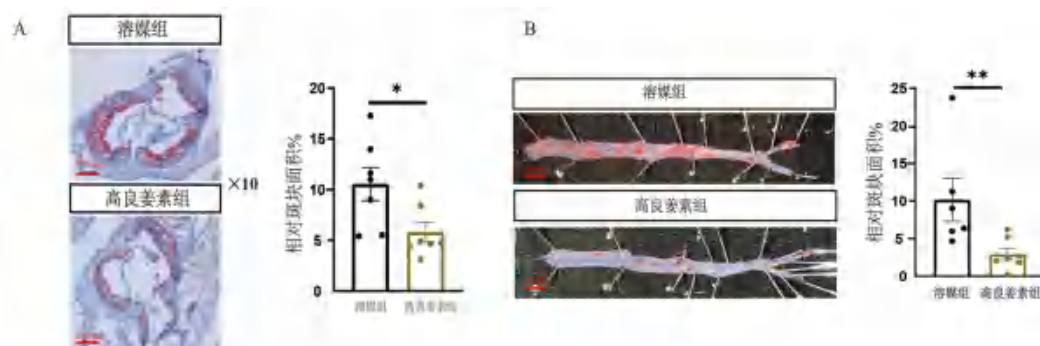


图 1 小鼠主动脉根部 (A) 和主动脉大体 (B) 的油红 O 染色结果

Fig 1 Oil red O staining of the aortic root (A) and whole aorta (B) in mice

注:与溶媒组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

3.2 小鼠血浆中血脂的水平

与溶媒组小鼠相比, Gal 组小鼠血浆低密度脂蛋白水平降低了 20.00%, 以总胆固醇水平降低

更为明显, 降低了 43.99%, 三酰甘油水平降低了 23.68%, 高密度脂蛋白水平上升了 30.30% (见图 2)。表明 Gal 能够改善 AS 小鼠的血脂水平。

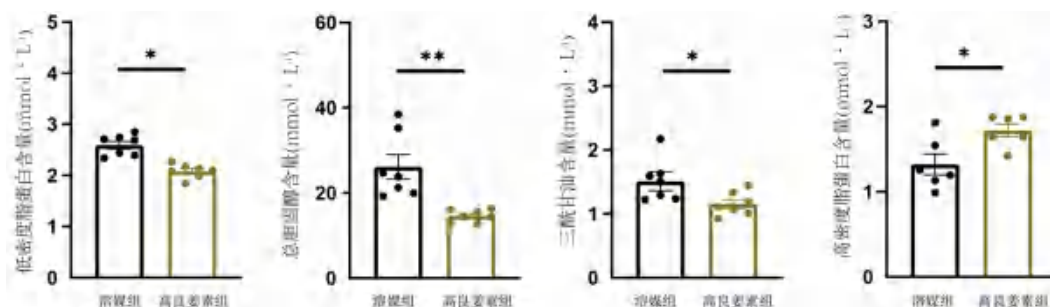


图 2 高良姜素对小鼠血脂水平影响

Fig 2 Effect of Gal on blood lipid levels in mice

注: 与溶媒组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

3.3 小鼠主动脉弓部与主动脉弓部内膜炎症分子 mRNA 的表达水平

与溶媒组小鼠相比, Gal 组小鼠主动脉弓部的 *ICAM1* 与 *CD62e* 基因 mRNA 水平均明显下降, 分别下降了 28.17% 与 33.39% (见图 3A); Gal 组小鼠主动脉弓内膜的 *ICAM1* 与 *CD62e* 基因 mRNA 水平均明显下降, 分别下降了 44.00% 与 33.29% (见图 3B)。表明 Gal 能够降低 AS 小鼠主动脉弓部及其内膜中 *ICAM1* 与 *CD62e* 等炎症分子的表达。

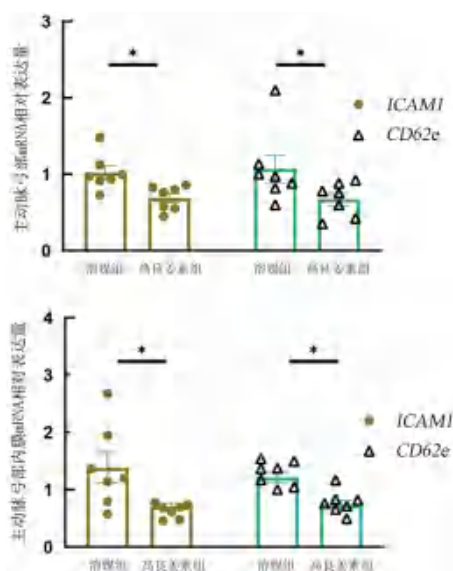


图 3 主动脉弓部与主动脉弓部内膜 *ICAM1* 和 *CD62e* 的 mRNA 的表达

Fig 3 mRNA expression of *ICAM1* and *CD62e* in the aortic arch and the aortic intima

注: 与溶媒组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the solvent group, * $P < 0.05$ 。

3.4 Gal 对 HUVECs 活性的影响

不同浓度 Gal 处理 HUVECs 12 h 的细胞存活率

结果见图 4。与对照组相比, HUVECs 的存活率随着 Gal 的浓度增大逐渐降低, Gal 处理 HUVECs 12 h 的 IC_{50} 值为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gal 对 HUVECs 的细胞活性没有影响, 并没有对细胞产生毒性。因此, 选择 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gal 进行后续实验。

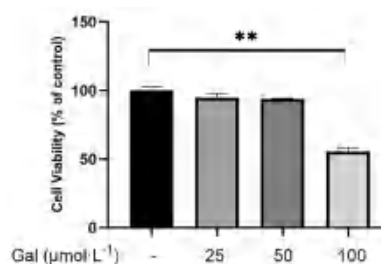


图 4 高良姜素影响 HUVECs 活性

Fig 4 Effect of Gal on cell viability of HUVECs

注: 与 control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

3.5 HUVECs 中炎症分子 mRNA 与蛋白的表达水平以及内皮细胞黏附实验

与空白对照组对比, $\text{TNF-}\alpha$ 组 HUVECs 炎症分子 (*VCAM1*、*ICAM1*、*CD62e*) 的 mRNA 与蛋白水平表达显著升高; 与 $\text{TNF-}\alpha$ 组对比, $\text{TNF-}\alpha$ + Gal 组细胞炎症分子的 mRNA 与蛋白水平表达显著下降 (见图 5A、B)。

内皮细胞黏附试验: 与空白对照组对比, $\text{TNF-}\alpha$ 组 THP-1 细胞黏附在 HUVECs 上数量显著增加。与 $\text{TNF-}\alpha$ 组对比, $\text{TNF-}\alpha$ + Gal 组 THP-1 细胞黏附在 HUVECs 数量显著减少 (见图 5C)。表明 Gal 能够降低炎症状态下 HUVECs 的炎症分子的表达, 以及减弱 HUVECs 黏附 THP-1 单核细胞的能力。

3.6 HUVECs 中 p-STAT3 与 p-JKA2 蛋白的表达水平

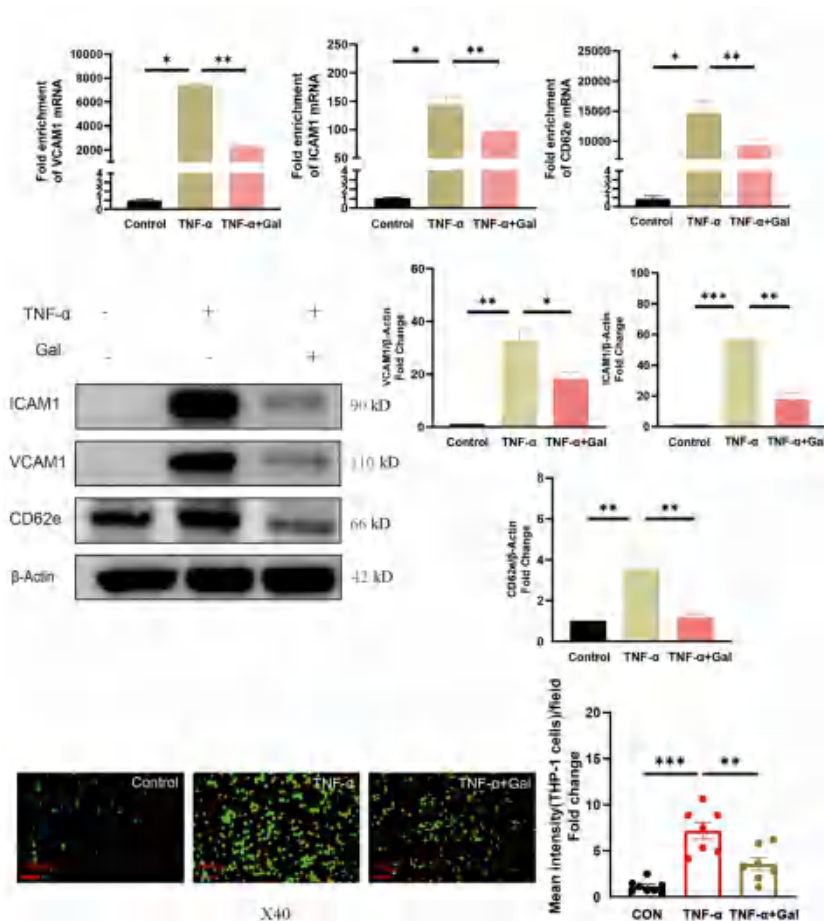


图 5 HUVECs 中炎症分子 mRNA 与蛋白水平表达以及内皮黏附实验

Fig 5 mRNA and protein expression of inflammatory molecules and endothelial adhesion assay in HUVECs

注：与 TNF-α 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the TNF-α group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

与空白对照组对比，TNF-α 组 HUVECs 细胞 p-STAT3 和 p-JAK2 蛋白水平表达显著升高；与 TNF-α 组对比，TNF-α + Gal 组 p-STAT3 和 p-JAK2 蛋白水平表达下降（见图 6）。表明 TNF-α 分子促使 HUVECs 中 p-STAT3 和 p-JAK2 蛋白水平升高，Gal 能够降低炎症状态下 HUVECs 的 p-STAT3 与 p-JAK2 的蛋白水平的表达。

3.7 Colivelin 作用下 HUVECs 中 VCAM1、ICAM1 和 p-STAT3 蛋白的表达水平

与空白对照组对比，TNF-α 组 ICAM1、VCAM1 和 p-STAT3 蛋白水平表达升高；与 TNF-α 组相比，TNF-α + Gal 组 ICAM1、VCAM1 和 p-STAT3 蛋白水平表达下降；而与 TNF-α + Gal 组相比，TNF-α + Gal + Colivelin 组 ICAM1、VCAM1 和 p-STAT3 蛋白水平表达升高（见图 7）。表明 Colivelin 能促使 HUVECs 中 p-STAT3 的蛋白水平升高，并且促进炎症分子（VCAM1、ICAM1）的产生，拮抗 Gal 改善内皮炎症。

4 讨论

AS 被认为是造成大多数心血管疾病和脑血管疾病的关键因素^[17-18]。Gal 是一种天然来源的黄酮类化合物，在各种疾病模型中具有抗氧化、保护细胞和抗炎作用^[9, 12]。在本研究中验证了 Gal 在 TNF-α 刺激的 HUVEC 的内皮炎症和 HFD 诱导的 AS 模型中的抗炎作用。并首次证实 APOE^{-/-}小鼠喂食 12 周 HFD 并在第 8 周开始给药 Gal 后，AS 斑块的形成、脂质代谢和主要的促炎症途径明显减少，为预防与治疗 AS 提供了一种新的思路。

内皮炎症是 AS 的早期表征，它由包括 TNF-α 在内的多种因素引发。TNF-α 已被证实可在 AS 的炎症级联期间上调黏附分子的表达，激活内皮细胞，以及重塑血管^[18-19]。本文研究显示，TNF-α 诱导的 HUVECs 增强了 VCAM1、ICAM1、CD62e 的表达。因此，我们推断阻断 VCAM1、ICAM1、CD62e 的表达可能延缓 AS 的发展进程。

Gal 是一种从中药材中提取的天然化合物，得益于其具备的多种药理活性^[20-22]和对不同类型正常细胞的低毒性，近年来已成为研究热点。以

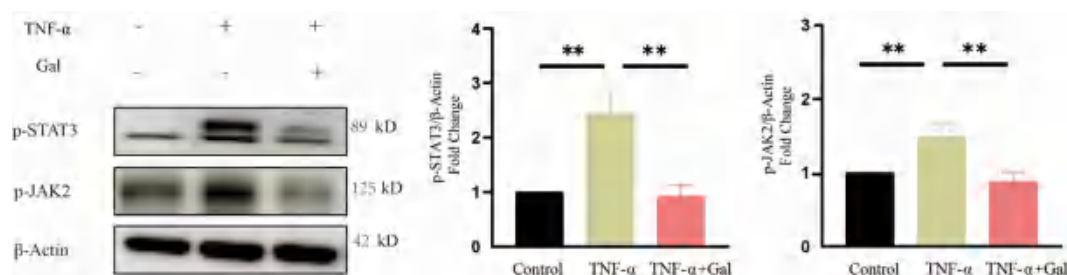


图 6 HUVECs 中 p-STAT3 和 p-JAK2 蛋白的表达

Fig 6 Proteins expression of p-STAT3 and p-JAK2 in HUVECs

注: 与 TNF- α 组比较, $^{**}P < 0.01$ 。

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

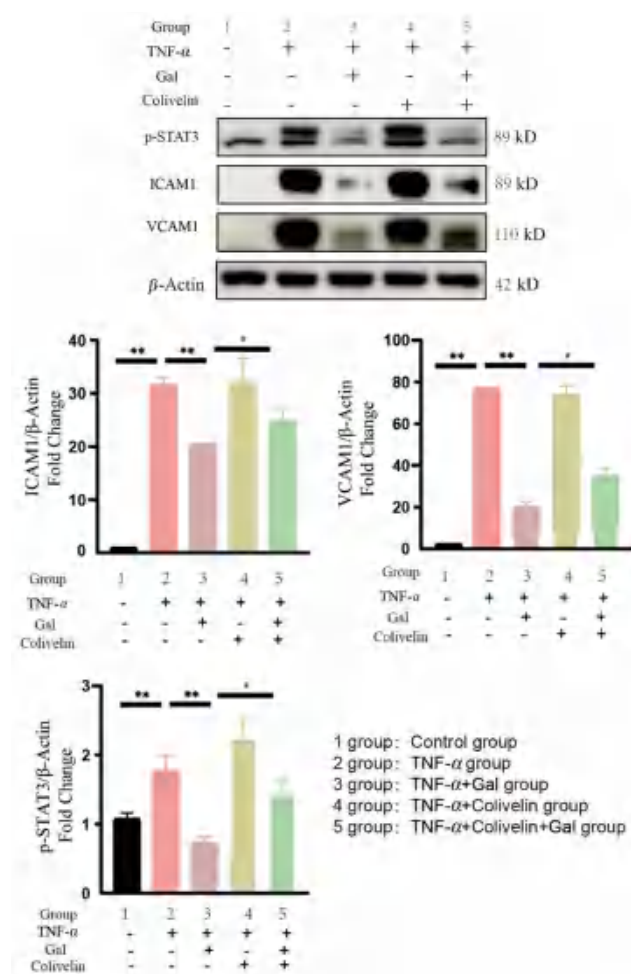


图 7 高良姜素, TNF- α 与 Colivelin 处理 HUVECs 后 ICAM1, VCAM1 和 p-STAT3 的蛋白表达

Fig 7 Protein expression of ICAM1, VCAM1 and p-STAT3 after the treatment of HUVECs with Gal, TNF- α and Colivelin

注: 与 TNF- α 组比较, $^{**}P < 0.01$; 与 TNF- α + Gal 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the TNF- α group, $^{**}P < 0.01$; compared with the TNF- α + Gal group, $^{\#}P < 0.05$.

往研究表明, Gal 通过减少肿瘤坏死因子受体-1、磷酸化核因子 κ B 和 VCAM1 的上调来预防高血压大鼠的炎症^[23]。Gal 通过抑制 NF- κ B 的活性和诱导型 NOS、VCAM1 的表达, 缓解了过敏性哮喘

模型中的气道炎症^[24]。本文研究结果表明, Gal 在体内实验和体外实验都能显著减少 VCAM1、ICAM1 和 CD62e 的表达。

Gal 能抑制 AS 的形成, 并抑制内皮炎症细胞因子的表达。为进一步探讨其分子机制, 我们探讨 Gal 在 JAK2-STAT3 信号传导中的作用, 该信号传导途径参与了 AS 的过程, 特别是在内皮细胞功能障碍、巨噬细胞极化、炎症等过程中^[25], 如 Uridine 通过调节 JAK2/STAT3 信号通路有效地缓解了 AS 大鼠的病理症状^[26]。本文研究结果表明 Gal 减弱了 HUVECs 细胞在 TNF- α 刺激下 p-STAT3 和 p-JAK2 的表达。同时, Colivelin 作为 STAT3 分子的激动剂, 促进 STAT3 的磷酸化, 本研究发现在 TNF- α 与 Gal 同时刺激下, Colivelin 升高了 HUVECs、VCAM1、ICAM1、p-STAT3 的表达, 这表明 Gal 可通过下调 JAK2-STAT3 信号通路来抑制 AS 的进展和减轻炎症。然而 Gal 通过下调 JAK2-STAT3 信号通路在 AS 发展过程中的主导作用仍未得到验证, 这需要将来的工作来阐明 Gal 在 AS 发展过程中的主导因素以及 Gal 是否通过影响其他因素等来缓解 AS。

综上所述, 本研究的结果首次阐明了 Gal 可以通过抑制 JAK2-STAT3 信号分子磷酸化来减轻内皮炎症, 改善高脂饮食引起的 AS, 并证实 Gal 在减轻 HUVECs 损伤方面的有益作用, 为 Gal 的临床应用提供了实验依据, 为抗 AS 药物的发现提供了新的靶点和策略。

参考文献

- [1] Semachew A. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990—2019 [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76 (25): 2982-3021.
- [2] Gupta M, Blumenthal C, Chatterjee S, et al. Novel emerging therapies in atherosclerosis targeting lipid metabolism [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2020, 29 (6):

- 611-622.
- [3] 王敏, 李瑾. 炎性细胞在动脉粥样硬化中作用的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30 (3): 265-270.
- [4] Zhu YH, Xian XM, Wang ZZ, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. Biomolecules, 2018, 8 (3): 80-91.
- [5] 支晨曦, 谢忠成, 李靓, 等. 中国动脉粥样硬化近三年基础研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30 (9): 744-752.
- [6] Liang LI, Xie W, Jiang ZS, et al. The progress of the national preclinical research of atherosclerosis in the recent three years [J]. Chin J Arterioscler, 2015, 23 (11): 11182-11189.
- [7] Huang H, Chen AY, Ye X, et al. Galangin, a flavonoid from lesser galangal, induced apoptosis via p53-Dependent pathway in ovarian cancer cells [J]. Molecules, 2020, 25 (7): 1579-1596.
- [8] Patil S, Ujalambk V, Rathore A, et al. Galangin loaded galactosylated pluronic F68 polymeric micelles for liver targeting [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108691-108699.
- [9] Tang X, Xu C, Yagiz Y, et al. Phytochemical profiles, and antimicrobial and antioxidant activities of greater galangal [*Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.] flowers [J]. Food Chem, 2018, 255: 300-308.
- [10] Aladaileh S, Abukhalil M, Saghir S, et al. Galangin activates Nrf2 signaling and attenuates oxidative damage, inflammation, and apoptosis in a rat model of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity [J]. Biomolecules, 2019, 9 (8): 346-365.
- [11] Sivakumar A, Anuradh C. Effect of galangin supplementation on oxidative damage and inflammatory changes in fructose-fed rat liver [J]. Chem Biol Interact, 2011, 193 (2): 141-148.
- [12] Abukhalil M, Althunibat O, Aladaileh S, et al. Galangin attenuates diabetic cardiomyopathy through modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111410-111420.
- [13] Liang X, Wang P, Yang C, et al. Galangin inhibits gastric cancer growth through enhancing STAT3 mediated ROS production [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 646628-646641.
- [14] Shuo Y, Gong LS, Li NF, et al. Galangin (GG) combined with cisplatin (DDP) to suppress human lung cancer by inhibition of STAT3-regulated NF- κ B and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 213-224.
- [15] Haemming S, Yang D, Sun X, et al. Long noncoding RNA SNHG12 integrates a DNA-PK-mediated DNA damage response and vascular senescence [J]. Sci Transl Med, 2020, 12 (531): 1868-1882.
- [16] Yang DF, Yang Z, Chen L, et al. Dihydromyricetin increases endothelial nitric oxide production and inhibits atherosclerosis through microRNA-21 in apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24 (10): 5911-5925.
- [17] Sun L, He X, Zhang T, et al. Knockdown of Inc-KCNC3-3: 1 alleviates the development of atherosclerosis via downregulation of JAK1/STAT3 signaling pathway [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 701058-701068.
- [18] Liu Y, Tie L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF- α -induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2019, 19 (1): 279-288.
- [19] Ragab S, Safan M, Obeido O, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and their relation to premature atherosclerosis in β -thalassemia children [J]. Hematology, 2015, 20 (4): 228-238.
- [20] Tomar A, Vasisth S, Khan S, et al. Galangin ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity in vivo by modulation of oxidative stress, apoptosis and inflammation through interplay of MAPK signaling cascade [J]. Phytomedicine, 2017, 34: 154-161.
- [21] Wang Y, Zhang T, Yang Q, et al. Galangin attenuates IL-1 β -induced catabolism in mouse chondrocytes and ameliorates murine osteoarthritis [J]. Am J Transl Res, 2021, 13 (8): 8742-8753.
- [22] Lu H, Yao H, Zou R, et al. Galangin suppresses renal inflammation via the inhibition of NF- κ B, PI3K/AKT and NLRP3 in uric acid treated NRK-52E tubular epithelial cells [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3018357-3018367.
- [23] Chaihongsa N, Maneesa P, Sangartit W, et al. Galangin alleviates vascular dysfunction and remodelling through modulation of the TNF-R1, p-NF- κ B and VCAM-1 pathway in hypertensive rats [J]. Life Sci, 2021, 285: 119965-119985.
- [24] Zha W, Qian Y, Shen Y, et al. Galangin abrogates ovalbumin-induced airway inflammation via negative regulation of NF- κ B [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 767689-767704.
- [25] Meng B, Li Y, Ding Y, et al. Myeloid-derived growth factor inhibits inflammation and alleviates endothelial injury and atherosclerosis in mice [J]. Sci Adv, 2021, 7 (21): 6903-6919.
- [26] Wang T, Xie L, Bi H, et al. Urantide alleviates the symptoms of atherosclerotic rats in vivo and in vitro models through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 902: 174037-174045.

(收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-03-06)

麦冬须根发酵制备鲁斯可皂苷元的菌种筛选及工艺优化

石璐, 谢鑫荣, 刘秀峰*, 余伯阳* (中国药科大学, 南京 211198)

摘要: **目的** 优选麦冬须根发酵菌种及发酵工艺。**方法** 筛选优势发酵菌种, 并采用正交试验设计, 对固水比、温度、接种量及发酵时间进行考察, 确定生产鲁斯可皂苷元的最佳发酵工艺。采用 HPLC 测定鲁斯可皂苷元含量。**结果** 食醋曲精 (主要成分为黑曲霉) 发酵效果最佳, 最佳发酵工艺为固水比 1:1、温度 28℃、接种量 0.5%、发酵时间 14 d, 该工艺下每千克麦冬须根发酵可产生 229.6 mg 鲁斯可皂苷元。**结论** 黑曲霉发酵麦冬须根的鲁斯可皂苷元得率高, 工艺操作方便, 具有良好的生产应用前景。

关键词: 麦冬须根; 鲁斯可皂苷元; 黑曲霉; 固体发酵

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1480-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.013

Optimization of bacteria strain and fermentation for fibrous roots of *Ophiopogon japonicus* to prepare ruscogenin

SHI Lu, XIE Xin-rong, LIU Xiu-feng*, YU Bo-yang* (China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: **Objective** To optimize the bacteria strain and fermentation conditions of fibrous roots of *Ophiopogon japonicus*. **Methods** Dominant strains were screened. Orthogonal experiment was used to determine the best fermentation to produce ruscogenin. The experimental design involved the four variables: solid-liquid ratio, temperature, inoculum amount and fermentation time. The content of ruscogenin was determined by HPLC. **Results** The Vinegar koji (basis is *Aspergillus niger*) had the best fermentation effect. The optimal conditions included fermentation on solid-liquid ratio at 1:1, temperature at 28℃, inoculum concentration at 0.5% and fermentation for 14 d. The yield of ruscogenin in the optimal conditions was 229.6 mg · kg⁻¹. **Conclusion** The ruscogenin in fibrous roots of *Ophiopogon japonicus* fermented by *Aspergillus niger* has high yield and convenient operation, which has good prospects for mass production and application.

Key words: fibrous root of *Ophiopogon japonicus*; ruscogenin; *Aspergillus niger*; solid fermentation

麦冬是一味历史悠久的传统中药, 2020 年版《中国药典》(一部) 规定正品为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Linn.F.) Ker-Gawl. 的干燥块根, 其采摘时会产生大量废弃不用的须根, 造成极大的资源浪费。麦冬中的主要活性成分为黄酮、甾体皂苷、生物碱、酸类^[1], 皂苷类物质最主要的苷元之一是鲁斯可皂苷元 (ruscogenin), 其含量较高, 常作为中药研究中指标物的麦冬皂苷 D 便是麦冬中以鲁斯可皂苷元为基本骨架的皂苷类物质的典型代表。鲁斯可皂苷元具有抗炎^[2-3]、抗血栓^[4]、

抗肿瘤^[5]、降血糖^[6]等多种药理活性, 具有良好的药用前景。近年研究显示麦冬须根的活性成分含量种类与块根相似, 部分物质如可溶性糖、总皂苷的含量显著高于块根^[7-10]。

微生物发酵在中药学中有大量应用, 淡豆豉^[11]、神曲^[12]、发酵人参^[13]等均是典型的发酵产物。近年来许多研究报道了利用发酵提高中药材中苷类物质含量的技术^[14], 证明利用微生物发酵降解苷类物质产生游离苷元的技术是可行的。目前有关鲁斯可皂苷元制备新工艺的研究十分有

作者简介: 石璐, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究, email: 625799895@qq.com * **通信作者:** 刘秀峰, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药生物技术研究, email: xf.liu@cpu.edu.cn; 余伯阳, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然药物资源与生物技术研究, email: boyangyu@yahoo.com.cn

限,大多集中在对传统酸水解法进行优化上,但酸水解法具有工艺复杂、污染大等不足^[15-16],故建立一种绿色环保、低成本的制备工艺具有极大的应用价值。发酵法操作简便、污染小、成本低,以麦冬须根作为发酵底物可提高麦冬资源利用率,但利用微生物发酵麦冬须根制备鲁斯可皂苷元的方法尚未见报道,亟待开展有关研究。

本研究以麦冬须根为发酵底物、食品发酵常用真菌作为发酵菌种,采用固体发酵的方式,通过正交试验设计探讨麦冬须根固体发酵制备鲁斯可皂苷元的最佳发酵条件,为通过发酵中药材制备鲁斯可皂苷元的研究提供参考。

1 材料

1.1 菌种与试药

发酵菌种信息见表1。浙麦冬须根(产自杭州,中国药科大学江苏省中药可追溯与标准化研究中心),经中国药科大学余伯阳教授鉴定为百合

科沿阶草属植物麦冬的干燥须根。磷酸氢二钾(分析纯,批号:171125,西陇科学股份有限公司),氯化钾(分析纯,批号:20180312,上海凌峰化学试剂有限公司),七水合硫酸亚铁(分析纯,批号:20180105,上海沪试实验室器材股份有限公司),无水硫酸镁(分析纯,中国药科大学江苏省中药可追溯与标准化研究中心),氯化铵(分析纯,批号:1902181,西陇科学股份有限公司),葡萄糖(分析纯,批号:20210926,上海沪试实验室器材股份有限公司),超纯水(自制)。鲁斯可皂苷元对照品(纯度:98.86%,批号:20071305,成都普菲德生物技术有限公司);甲醇(色谱级,批号:0211191203,上海星可高纯溶剂有限公司);乙腈(色谱级,批号:22045384,美国TEDIA试剂公司);甲酸(色谱级,批号:C11119020,上海麦克林生化科技有限公司);二氯甲烷(分析级,批号:20220922,无锡市亚盛化工有限公司)。

表1 实验发酵菌种列表

Tab 1 List of fermentative strains in experiment

商品名	生产公司	主要菌种
甜酒曲	安琪酵母股份有限公司	根霉菌 (<i>Rhizopus</i>)
食醋曲精	山东和众康源生物科技有限公司	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
酿酒酵母	山东和众康源生物科技有限公司	根霉菌 (<i>Rhizopus</i>)、酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
腐乳曲	山东和众康源生物科技有限公司	毛霉菌 (<i>Mucor</i>)
酱油曲精	山东和众康源生物科技有限公司	米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)
生香酵母	山东和众康源生物科技有限公司	鲁氏酵母 (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)、蒙奇球拟酵母 (<i>Torulopsis mogii</i>)、植质乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)
黑曲精	济宁玉园生物科技有限公司	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)、甘薯曲霉 (<i>Aspergillus batatae</i>)

1.2 仪器

多功能粉碎机(永康市红太阳机电有限公司);Direct-Q5 纯水/超纯水一体机(美国密理博MILLIPORE公司);十万分之一分析天平(德国赛多利斯公司);SB-5200DTD型超声清洗机(南京以马内利仪器设备公司);高压蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司);烘干箱(上海精宏实验设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 发酵法制备鲁斯可皂苷元

2.1.1 菌种活化及固体发酵培养基的制备 取磷酸氢二钾 1.00 g、氯化钾 0.50 g、七水合硫酸亚铁 0.01 g、无水硫酸镁 0.25 g、氯化铵 1.25 g、葡萄糖 30.00 g、超纯水 1000 mL 配制液体菌种活化培养基,分装于 250 mL 锥形瓶中,每瓶 50 mL,115 °C、30 min 高压蒸汽灭菌备用。按要求精密称取发酵菌种适量,加入液体培养基中,于恒温

摇床培养箱中(30 °C、200 r·min⁻¹)培养 24 h。将发酵液以 8000 r·min⁻¹ 离心 20 min,去除上清液,沉淀物即为活化菌种。

将麦冬须根粉碎并过 10 目筛,称定 10.00 g 粉末置于 250 mL 锥形瓶中,加超纯水调整固水比=1:2,121 °C、20 min 高压蒸汽灭菌,得固体发酵培养基。

2.1.2 发酵样品供试液的制备 按照“2.1.1”项下方法,精密称取适量发酵菌种进行活化培养。将活化菌种分别接种于固体发酵培养基中,以不加菌种的固体发酵培养基作为空白对照组,于恒温培养箱中静置培养,每组设立 3 个平行对照。调节发酵培养基浸出液 pH 至中性,烘干,加入 75 mL 二氯甲烷超声 45 min,重复 3 次,过滤后合并滤液,蒸发干燥,用 5 mL 甲醇复溶,过 0.45 μm 微孔滤膜,得供试液。

2.2 色谱条件

采用 ZORBAX Extend-C18 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL; 测鲁斯可皂苷元的流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (33:67), 检测波长 205 nm, 柱温 30℃; 测麦冬皂苷 D 的流动相为水-乙腈 (52:48), 检测波长 201 nm, 柱温 35℃。色谱图见图 1。

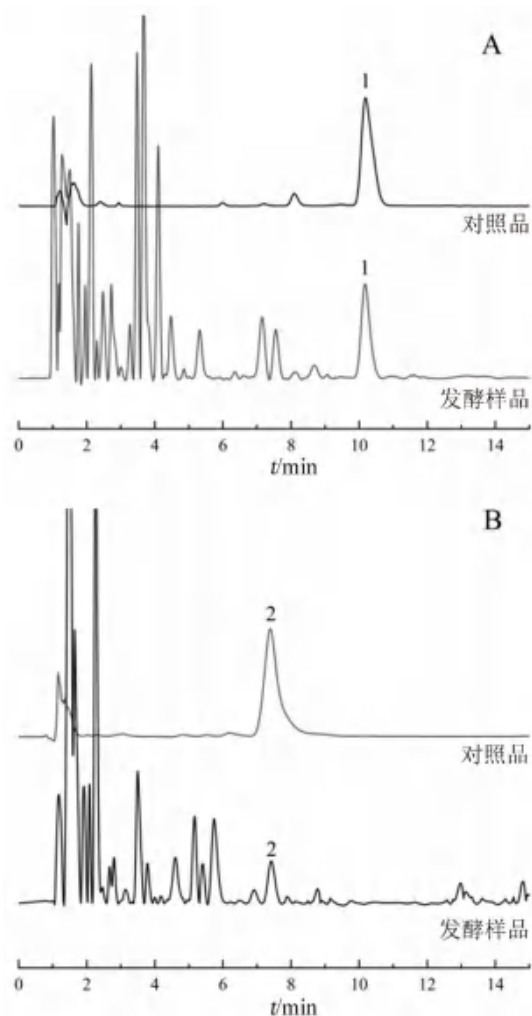


图 1 对照品及发酵产品的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of reference substance and fermentation product

A. 鲁斯可皂苷元对照品及发酵样品 (reference substance of ruscogenin and fermentation product); B. 麦冬皂苷 D 对照品及发酵样品 (reference substance of ophiopogonin D and fermentation product); 1. 鲁斯可皂苷元 (ruscogenin); 2. 麦冬皂苷 D (ophiopogonin D)

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密称取适量鲁斯可皂苷元对照品, 配制 1 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 鲁斯可皂苷元对照品溶液, 用甲醇定容至 1 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 进样检测, 以鲁斯可皂苷元的质量浓度为纵坐标, 峰面积为横坐标, 求得回归方程为 $Y = 6056.978X + 2.673$, $R^2 = 0.9987$, 表明鲁斯可皂苷

元在 0 ~ 0.5 mg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。

以相同方法配制浓度梯度为 0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg·mL⁻¹ 的麦冬皂苷 D 对照品溶液, 进样检测, 以麦冬皂苷 D 的质量浓度为纵坐标, 峰面积为横坐标, 求得回归方程为 $Y = 2323.5X + 5.4828$, $R^2 = 0.9969$, 表明麦冬皂苷 D 在 0 ~ 2.0 mg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。

2.3.2 精密度试验 取 1.0 mg·mL⁻¹ 鲁斯可皂苷元对照品溶液, 连续进样 6 次, 测得鲁斯可皂苷元的峰面积的 RSD 值为 0.71%, 表明方法精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一发酵产物供试液, 按“2.2”项下条件分别在 0、6、12、18、24 h 时进样, 测得鲁斯可皂苷元的峰面积的 RSD 值为 1.7%, 表明在试验条件下供试液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重现性试验 取“2.1”项下的同批发酵产物 6 份, 制备供试液, 按“2.2”项下条件进样检测, 测得鲁斯可皂苷元的峰面积的 RSD 值为 2.2%, 表明方法重现性良好。

2.3.5 加样回收试验 取“2.1”项下的同批发酵产物 6 份, 制备供试液, 每份加入等量的鲁斯可皂苷元对照品溶液, 按“2.2”项下条件进样, 测定鲁斯可皂苷元的峰面积, 计算得出平均加样回收率为 90.59%, RSD 值为 3.8%, 符合分析方法验证要求。

2.4 两相酸水解法制备鲁斯可皂苷元

称取 10 g 粉碎后过 10 目筛的麦冬须根粉末加入圆底烧杯, 加入 85% 乙醇 150 mL, 加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 过滤, 合并滤液, 减压蒸发至无醇味, 加入 0.4 mol·L⁻¹ 盐酸 100 mL 与二氯甲烷 60 mL, 105℃ 加热水解 3 h, 冷却, 等体积二氯甲烷萃取酸水相 3 次, 合并有机相并水洗至 pH 接近 7, 蒸发干燥, 加 5 mL 甲醇溶解, 即为酸水解法供试液, 按“2.2”项下条件进样检测, 重复 3 次, 每次设立 3 个平行对照。计算得出每 10 g 麦冬须根的水解产物中鲁斯可皂苷元含量分别为 2.288 mg、3.355 mg、2.476 mg。

2.5 发酵菌种筛选

按照“2.1”项下方法及“2.2”项下色谱条件, 测定并计算甜酒曲、食醋曲精、黑曲精、酿酒酵母、腐乳曲、酱油曲精、生香酵母 7 种食品发酵菌种各自发酵生产鲁斯可皂苷元的能力, 结果如图 2 所示。与不加菌种的空白对照组对比, 菌种发酵组的发酵产物中鲁斯可皂苷元含量均有所上升, 其中食醋曲精发酵产量最高, 与空白组比

较, 差异具有统计学意义。经过食醋曲精发酵后, 每 10 g 麦冬须根中含有鲁斯可皂苷元 0.629 mg。因此, 本试验选择食醋曲精作为发酵菌种。

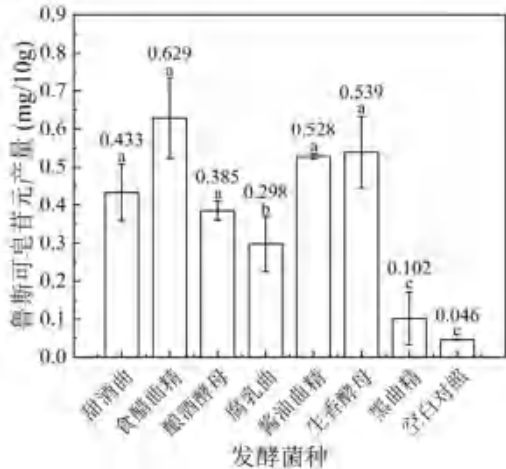


图 2 发酵菌种对鲁斯可皂苷元产量的影响 ($n = 3$)

Fig 2 Influence of fermentative strains on ruscogenin yield ($n = 3$)

注: 图中不同字母代表差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in fig showed significant difference ($P < 0.05$).

2.6 发酵条件单因素考察

按“2.1”项下方法, 选取食醋曲精作为发酵菌种, 以固水比 = 1 : 2、发酵温度 35 °C、接种量 1%、发酵时间 7 d 为基础发酵条件。考察固水比 (1 : 2、1 : 4、1 : 6、1 : 8、1 : 10)、发酵温度 (20、28、35 °C)、接种量 (0.2%、0.5%、1%、2%)、发酵时间 (1、7、14、21、28 d) 对发酵产物中鲁斯可皂苷元含量的影响, 结果见图 3, 最佳固水比为 1 : 2, 最佳发酵温度为 28 °C, 接种量为 0.2% ~ 2% 时对鲁斯可皂苷元产量影响不大, 最佳发酵时间为 7 d。

2.7 发酵条件优化正交试验设计

在单因素考察的基础上, 选取固水比、发酵温度、接种量、发酵时间四个变量, 四因素四水平正交试验设计见表 2, 试验结果及方差分析见表 3、4。

通过方差分析结果可以看出, 各因素对试验结果的影响为 $D > A > B > C$, 即发酵时间的影响最大。结合表 3 可知, 食醋曲精发酵麦冬须

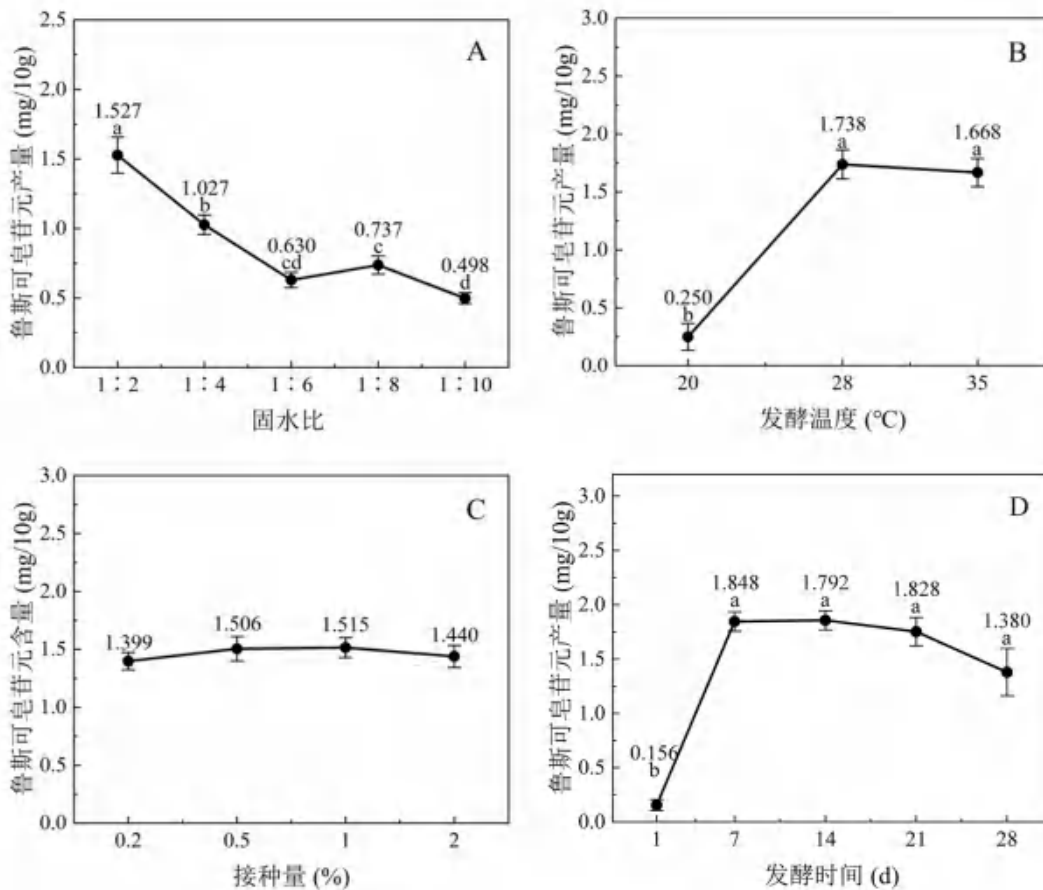


图 3 固水比 (A)、发酵温度 (B)、接种量 (C) 及发酵时间 (D) 对鲁斯可皂苷元含量的影响

Fig 3 Effect of solid-water ratio (A), fermentation temperature (B), inoculum concentration (C), fermentation time (D) on ruscogenin content

注: 图中不同字母代表差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in fig showed significant difference ($P < 0.05$).

表 2 因素与水平表

Tab 2 Factors and levels

编号	固水比 A	温度 B/℃	接种量 C/%	发酵时间 D/d
1	1 : 0.5	25	0.50	3
2	1 : 1	28	0.75	7
3	1 : 1.5	32	1.00	10
4	1 : 2	36	1.50	14

表 3 发酵条件优化正交试验设计结果

Tab 3 Fermentation conditions optimization of orthogonal experimental design

序号	因素				鲁斯可皂苷元含量 (mg/10 g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.615±0.070
2	1	2	2	2	0.768±0.166
3	1	3	3	3	0.580±0.024
4	1	4	4	4	0.802±0.254
5	2	1	2	3	1.338±0.347
6	2	2	1	4	2.134±0.626
7	2	3	4	1	0.467±0.073
8	2	4	3	2	1.331±0.209
9	3	1	3	4	1.249±0.138
10	3	2	4	3	1.015±0.455
11	3	3	1	2	0.506±0.145
12	3	4	2	1	0.549±0.026
13	4	1	4	2	1.269±0.115
14	4	2	3	1	0.477±0.062
15	4	3	2	4	0.951±0.262
16	4	4	1	3	1.503±0.123
K_1	0.668	1.061	1.200	0.500	
K_2	1.274	1.063	0.859	0.967	
K_3	0.828	0.678	0.879	1.050	
K_4	1.059	1.049	0.912	1.334	
R	0.606	0.385	0.341	0.834	

表 4 正交试验设计方差分析

Tab 4 Variance analysis of orthogonal experimental design

方差来源	Ⅲ型平方和	d_f	均方	F	P
A	0.799	3	0.266	3.341	0.174
B	0.434	3	0.145	1.815	0.318
C	0.307	3	0.102	1.282	0.422
D	1.439	3	0.480	6.019	0.087
误差	0.239	3	0.080		

根制备鲁斯可皂苷元的最佳发酵条件是：固水比 1 : 1、温度 28℃、接种量 0.5%、发酵时间 14 d，该条件下每 10 g 麦冬须根可发酵产生鲁斯可皂苷元 2.134 mg。使用该发酵条件进行验证试验，设立 3 个平行对照，测得每 10 g 麦冬须根可发酵产生鲁斯可皂苷元 2.296 mg。

2.8 发酵前后鲁斯可皂苷元与麦冬皂苷 D 含量变化对比

取空白对照组及最优工艺发酵组（即正交试验 6 号组）的供试品溶液各 3 份，按照“2.2”项下色谱条件进样测定，结果如图 4，两种物质发酵前后含量的差异具有统计学意义。

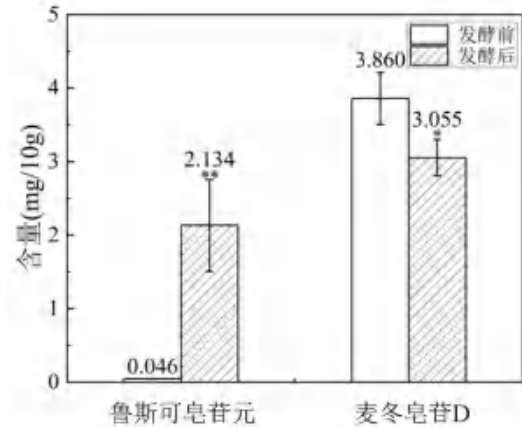


图 4 发酵前后麦冬须根内鲁斯可皂苷元与麦冬皂苷 D 的含量变化 (n = 3)

Fig 4 Changes of ruscogenin and ophiopogonin D content in fibrous roots of *Ophiopogon japonicus* before and after solid state fermentation (n = 3)

注：与发酵前该物质含量比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the content before the fermentation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

鲁斯可皂苷元具有多种药理活性，开发利用前景大，化学合成法制备较为困难，现代工业常以麦冬为原料、采用酸水解的方法制备鲁斯可皂苷元，但酸水解法具有工艺较复杂、环境污染大、可能破坏苷元结构等^[15-16]不足。与酸水解法相比，微生物发酵具有反应条件温和、毒副产物少、操作简便、成本低廉等优势，在药物开发与利用方面有着极大的潜力。本研究中通过菌种筛选，在 7 种食品发酵真菌中筛选出食醋曲精（主要含黑曲霉）作为发酵的优势菌种。麦冬皂苷中的配基多以 α -L-鼠李糖苷键和 β -D-葡萄糖苷键与苷元结合^[17-19]，现有研究表明黑曲霉中的柚苷酶具有 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶的活性^[20]，因此，黑曲霉是一种较为理想的发酵菌种。

本研究以麦冬须根作为发酵底物、黑曲霉作为发酵菌种，通过单因素考察证实了黑曲霉发酵麦冬须根制备鲁斯可皂苷元的可行性，又通过正交试验设计，对固水比、温度、接种量、发酵时间 4 个因素进行考察，确定了发酵的最佳工艺。使用两相酸水解法每千克麦冬须根可水解产生约 200 ~ 300 mg 鲁斯可皂苷元，最高产量 333.5 mg、平均产量 270.6 mg。最佳发酵工艺下每千克

麦冬须根发酵可产生 229.6 mg 鲁斯可皂苷元, 为两相酸水解法最高水解产量的 68.85%、平均产量的 84.85%。酸水解法需用有机溶剂对药材进行回流提取, 在回流提取及水解过程中持续加热保持高温, 操作复杂、耗能较大, 水解时使用大量酸溶液会对环境造成污染, 且产物得率不稳定性大; 而发酵法的固体培养基制作方法简单, 发酵过程使用价格低廉的食品发酵菌种、无需额外的危化品试剂, 因此比酸水解法更安全、环保, 具有一定的应用价值。但是该最佳发酵工艺中的发酵时间较长, 结合发酵时间的单因素考察结果, 说明发酵时间仍有优化空间; 且本研究中未对鲁斯可皂苷元的提取工艺进行优化, 产量尚有提高潜力。

麦冬皂苷 D 是麦冬中的主要甾体皂苷之一, 以鲁斯可皂苷元为骨架, 本研究测量了发酵前后的鲁斯可皂苷元与麦冬皂苷 D 的含量, 结果显示麦冬须根发酵过程中存在苷到苷元的转化, 可能是因为黑曲霉中柚苷酶等生物酶的作用, 使皂苷中的糖苷键断裂, 生成了游离苷元。

本试验首次将黑曲霉发酵应用在麦冬须根的资源开发中, 提高了麦冬药材的利用率, 为麦冬须根的开发利用以及鲁斯可皂苷元的制备提供了新思路, 为麦冬须根资源的合理利用和新产品开发奠定了基础。

参考文献

- [1] 张莲婷. 麦冬药材资源品质评价 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [2] Lu H, Tzeng T, Liou S, et al. Ruscogenin ameliorates diabetic nephropathy by its anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in streptozotocin-induced diabetic rat [J]. BMC Complement Altern M, 2014, 14 (1): 110.
- [3] Gulcin E, Rumeysa IT, Ali S, et al. Potent therapeutic effects of ruscogenin on gastric ulcer established by acetic acid [J]. Asian J Surg, 2019, 43 (2): 405-416.
- [4] Kou J, Tian Y, Tang Y, et al. Antithrombotic activities of aqueous extract from radix *Ophiopogon japonicus* and its two constituents [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29 (6): 1267-1270.
- [5] Hua H, Zhu Y, Song Y. Ruscogenin suppressed the hepatocellular carcinoma metastasis via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 115.
- [6] 李明玉, 林春雨, 吴志强, 等. 鲁斯可皂苷元在制备降糖药物中的应用: 202010136054.6 [P]. 2020-05-19.
- [7] 周芳美, 潘佩蕾, 陈宜涛, 等. 麦冬须根主要活性成分研究 [J]. 中药材, 2008, 31 (9): 1307-1309.
- [8] 何佳奇, 孙彩华, 蔡伟, 等. 浙麦冬须根中总黄酮和总皂苷的含量测定 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30 (8): 1880-1882.
- [9] 吴帆, 黄士文, 罗立明, 等. 浙麦冬块根与须根主要成分比较 [J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24 (2): 215-222.
- [10] 金虹, 王化东, 何礼, 等. 川产麦冬及其须根组织学与麦冬皂苷量的对比研究 [J]. 中草药, 2014, 45 (7): 1002-1005.
- [11] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 164.
- [12] 刘双, 杨静, 江振作, 等. 中药“神曲”发酵工艺及质量标准研究进展 [J]. 天津中医药, 2015, 32 (5): 318-320.
- [13] Lee JH, Lee JH, Jin JS. Fermentation of traditional medicine: present and future [J]. Oriental Pharm Exp M, 2012, 12 (3): 163-165.
- [14] 马宗敏, 段绪红, 秦梦, 等. 微生物发酵技术在中药苷类生物转化中的应用进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19 (5): 858-864.
- [15] 曹青云, 李琦, 王敏, 等. 鲁斯可皂苷元制备方法研究 [J]. 中国药业, 2017, 26 (4): 6-8.
- [16] 张春霞. 鲁斯可皂苷元的制备工艺 [D]. 成都: 成都理工大学, 2016.
- [17] Watanabe Y, Sanada S, Tada A, et al. Studies on the constituents of ophiopogonis tuber. IV. On the structures of ophiopogonin A, B', C, C', and D' [J]. Chem Pharm Bull, 1977, 25 (11): 3049-3055.
- [18] Tada A, Kobayashi M, Shoji J. Studies on the constituents of ophiopogonis tuber. Iii. on the structure of ophiopogonin D [J]. Chem Pharm Bull, 1973, 21 (2): 308-311.
- [19] Tada A, Kobayashi M, Shoji J. Studies on the constituents of ophiopogonis tuber. ii. on the structure of ophiopogonin B [J]. Chem Pharm Bull, 1972, 20 (8): 1729-1734.
- [20] Ribeiro MH. Naringinases: occurrence, characteristics, and applications [J]. Appl Microbiol Biot, 2011, 90 (6): 1883-1895.

(收稿日期: 2023-02-26; 修回日期: 2023-03-29)

金银花表面微生物的分离、鉴定及抑菌活性研究

周娜¹, 任广喜¹, 姜丹¹, 李婷¹, 申小营¹, 华国栋^{2*}, 刘春生^{1*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

摘要: **目的** 研究金银花的表面微生物的组成和抑菌功能, 一方面为金银花药材表面可能存在的污染菌提供参考, 另一方面对其功能菌进行深入挖掘。 **方法** 以河南封丘、山东平邑、河北巨鹿三个地区的金银花药材为研究对象, 利用微生物培养技术, 分离并鉴定其种属, 并在此基础上检测其抑菌活性。 **结果** 金银花表面菌群丰富, 分离得到表面微生物 53 株, 分布于 5 门 7 纲 8 目 12 科 15 属; 群落组成显示, 存在镰刀菌属、链格孢属、裂褶菌属、青霉属等污染菌; 在抑菌拮抗实验中得到一株真菌, 鉴定为非洲哈茨木霉, 其能够抑制枯草芽孢杆菌。 **结论** 金银花表面既存在污染菌, 同时也存在功能菌, 为防治真菌的污染和反向挖掘微生物的功能提供理论依据。

关键词: 金银花; 表面微生物; 分离鉴定; 抑菌功能

中图分类号: R379.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1486-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.014

Isolation, identification and antibacterial activity of surface microorganisms of *Lonicera Japonica* Flos

ZHOU Na¹, REN Guang-xi¹, JIANG Dan¹, LI Ting¹, SHEN Xiao-ying¹, HUA Guo-dong^{2*}, LIU Chun-sheng^{1*} (1. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488*; 2. *Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700*)

Abstract: Objective To determine the composition and antibacterial function of surface microorganism in *Lonicera Japonica* Flos, provide reference for possible contaminating bacteria on the surface of *Lonicera Japonica* Flos, and explore the functional microorganisms. **Methods** *Lonicera Japonica* Flos medicinal materials from Fengqiu in Henan, Pingyi in Shandong, and Julu in Hebei were selected as the research objects. Microbial isolation and identification were conducted with microbiological cultivation technology, and their antibacterial activity was measured. **Results** It showed that the surface microorganism of *Lonicera Japonica* Flos was rich. We isolated 53 strains of surface microorganisms, belonging to 5 phyla, 7 classes, 8 orders, 12 families, and 15 genera. The community composition showed the existence of contaminating bacteria such as *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, and *Penicillium*. In addition, one fungus was detected in the antibacterial antagonistic experiment, identified as *Trichoderma afroharzianum*, which inhibited *Bacillus subtilis*. **Conclusion** Both contaminating and functional microorganisms exist on the surface of *Lonicera Japonica* Flos, providing theoretical basis for preventing fungal contamination and reversely exploring microbial functions.

Key words: *Lonicera Japonica* Flos; surface microorganism; isolation and identification; antibacterial function

基金项目: 北京中医药大学横向课题项目 (No.2020110031010303)。

作者简介: 周娜, 女, 硕士研究生, 主要从事药用植物与分子生药学研究, email: 2385767764@qq.com * **通信作者:** 华国栋, 男, 主任药师, 主要从事临床中药与中药质量研究, email: zhaojhuagd@126.com; 刘春生, 男, 教授, 主要从事药用植物与分子生药学研究, email: max_liucs@263.net

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花; 性味甘, 寒, 归肺、心、胃经, 具有清热解毒、疏散风热的功效^[1]。现代化学检测出其含有诸多化学成分, 其中具有生物活性的化合物主要有绿原酸、异绿原酸、环烯醚萜苷类、三萜皂苷类等, 这些药效成分具有抗菌、抗病毒、抗炎、降血脂、免疫调节等药理活性^[2-3], 在临床中的应用极为广泛。出于对临床用药的安全性考虑, 研究主要集中在药材贮藏过程中出现的表面真菌污染情况。在药材的采收、加工、运输、贮藏过程中, 由于环境条件和药材本身适合某些菌的生长和繁殖, 例如黄曲霉菌, 会导致药材发霉变质, 对人体危害巨大。但是, 对于一些陈久者良的药材来说, 其表面菌的存在与其药效有着紧密的联系, 例如陈皮^[4]。此外, 众多研究均表明微生物发酵技术在中药提质、增效、扩用及减毒等方面效果显著^[5-9]。因此, 无论是从用药的安全性, 还是有效性上来说, 对表面菌的研究都是不可或缺的。在金银花微生物层面, 研究表明, 从金银花花部位分离出来的内生菌数量和多样性上均较少, 李慧玲等^[10]从湛江金银花中分离得到了 3 属 6 株内生真菌, 李瑾^[11]从河南金银花中分离鉴定出无孢菌科和链格孢属共 2 属 4 株内生真菌; 但是过往对金银花表面菌群的研究较少, 且未报道过对其表面微生物的功能研究。

采用传统的微生物分离方法对药材的微生物分离、鉴定可以得到微生物菌属, 并获知药材表面微生物组成情况, 同时, 还可进一步探究分离出来的微生物的作用。相关研究表明, 从中药中分离得到的一些真菌具有药理作用, 如抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗高血糖、抗寄生虫等^[12]。金银花为临床常用中药, 能够清散解毒、消除肿毒, 若能从金银花中挖掘出对人类致病菌——大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌具有抑菌作用的菌株, 将为微生物防病治疗储备资源。

因此, 本研究从金银花的表面菌着手, 分析其组成情况, 明确其表面污染情况, 并筛选其抑菌活性, 为更好地指导人们贮藏中药材以及开发微生物作用奠定基础。

1 材料

金银花药材收集自河南封丘、山东平邑、河北巨鹿, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为金银花。供试菌种为大肠埃希菌 (BNCC133264)、金黄色葡萄球菌 (ATCC6538P)、枯草芽孢杆菌 (ATCC6633)。

LS-B35 型立式压力蒸汽灭菌器 (江阴滨江医疗设备厂); SW-CJ-1D 型洁净工作台 (江苏苏州苏洁净化设备厂); JY-SP3 型水平电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); PowerPac Basic Power Supply 型基础电泳仪、GelDoc 2000 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 移液器 (德国 Eppendorf 公司); MM400 型混合冷冻球磨仪、Veriti 96 型梯度 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); GL-88B 型旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (批号: 20210726)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (批号: 20211223) (北京索莱宝科技有限公司), 2×Rapid Taq Master Mix (南京诺唯赞医疗科技有限公司, 批号: 7E542H1), 琼脂糖 (批号: 0100060621)、50×TAEbuffer (批号: 4038072021) (北京兰博利德商贸有限公司), 乙酸乙酯 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号: C13830576), 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, PDA 培养基 (按照 1 L 培养基中马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 ~ 20 g 进行配制)、LB 培养基 [按照 1 L 培养基中胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 (NaCl) 10 g, 琼脂 15 ~ 20 g 进行配制]。

2 方法与结果

2.1 金银花表面菌的分离与鉴定

分别取各产地金银花约 0.2 g, 先用无菌水冲洗掉表面的灰尘, 随后放置于 50 mL 无菌离心管中, 加入 10 mL 的无菌水涡旋均质 3 min, 在此基础上稀释至 1/10、1/100, 结束后吸取 200 μL 水洗液至 PDA 和 LB 培养基中, 无菌涂布器涂布均匀。只加入无菌水的为对照组, 每组实验重复 3 次。接种后的 PDA 平板密封黑暗 28℃ 培养 5 ~ 7 d, LB 平板放置于 37℃ 培养箱进行培养 1 ~ 3 d。细菌采用平板划线法进行纯化, 取单菌落重复纯化 3 ~ 5 次, 真菌采用菌丝尖端纯化法进行纯化, 直至成单一菌落。最后均采用甘油冻存法进行菌种保藏。

2.2 表面菌的分子鉴定

以真菌 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 反应在 PCR 扩增仪上进行, 采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGC TACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 反应。真菌和细菌 PCR 体系均为: 去离子水 11 μL, 上下游引物各 1 μL, DNA 模板 2 μL, 2×Rapid Taq

Master Mix 15 μ L。真菌 PCR 反应参数：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，95 $^{\circ}$ C 变性 15 s，55 $^{\circ}$ C 退火 5 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min，循环数为 35 次，72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min，4 $^{\circ}$ C 停止。细菌 PCR 反应参数：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，95 $^{\circ}$ C 变性 15 s，55 $^{\circ}$ C 退火 15 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，循环数为 35 次，72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min，4 $^{\circ}$ C 停止。反应结束后取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，得到条带清晰、明亮、单一，送交于上海生工有限公司进行双向测序。将样品测序结果的序列在 Congting-Express 软件拼接，并在 NCBI 官网上进行同源序列比对。部分比对结果及其分类学结果见表 1~2。分类学结果显示，三个产地金银花表面菌分离得到了 5 门 7 纲 8 目 12 科 15 属表面菌，其中从封丘金银花中分离到了 8 属 26 株菌，分别是镰刀菌属、木霉属、链格孢属、弯孢属、短芽孢杆菌属、泛菌属、微小杆菌属、芽孢杆菌属。从平邑金银花分离得到 7 属 19 株菌，分别是链格孢属、裂褶菌属、青霉属、栓菌属、耙齿菌属、微球菌属、芽孢杆菌属。从巨鹿金银花分离得到 5 属 8 株菌，分别是耙齿菌属、曲霉属、*Bhargavaea*、短芽孢杆菌属、芽孢杆菌属。

2.3 抑菌活性菌初筛

挑选表面细菌接种至 50 mL 的 LB 液体发酵

表 1 金银花部分表面菌同源信息

Tab 1 Homologous information of surface microorganisms in

Lonicera Japonica Flos

菌种编号	高相似度菌株	登录号	相似度
SFB1	<i>Bacillus subtilis</i>	OP550049.1	99.85
SFB3	<i>Brevibacterium</i>	KU986707.1	100
SFB4	<i>Bacillus cereus</i>	MH985214.1	99.77
SFB5	<i>Bacillus safensis</i>	CP084677.1	100
SFB6	<i>Bacillus sp.</i>	GQ199765.1	100
SPB2	<i>Bacillus velezensis</i>	OP554433.1	100
SPB3	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria)</i>	OP550119.1	100
SJB2	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria)</i>	OP550119.1	100
SJB4	<i>Bacillus sp. EnB-alf8</i>	KP792633.1	100
SJB5	<i>Bacillus halotolerans</i>	CP054584.1	100
SJB6	<i>Bacillus subtilis</i>	OP550049.1	100
SF2	<i>Trichoderma harzianum</i>	KY425721.1	99.04
SF3	<i>Fusarium verticillioides</i>	OM956054.1	99.46
SF4	<i>Curvularia spicifera</i>	MF401577.1	100
SF5	<i>Alternaria sp.</i>	MK640595.1	99.83
SP7	<i>Trametes hirsuta</i>	MT534041.1	100
SP8	<i>Schizophyllum commune</i>	MT647523.1	100
SP9	<i>Irpex lacteus</i>	MK050599.2	100
SP10	<i>Penicillium oxalicum</i>	MT597864.1	100
SJ1	<i>Aspergillus qingxianii</i>	MT322250.1	100
SJ2	<i>Aspergillus flavus</i>	OK663515.1	100
SJ3	<i>Irpex lacteus</i>	MK050599.2	100

表 2 金银花表面微生物的分类结果

Tab 2 Classification of the surface microorganisms

门	纲	目	科	属	株数		
					封丘	平邑	巨鹿
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	镰刀菌（ <i>Fusarium</i> ）	4	0	0
			Hypocreaceae	木霉属（ <i>Trichoderma</i> ）	1	0	0
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	链格孢属（ <i>Alternaria</i> ）	1	1	0
				弯孢属（ <i>Curvularia</i> ）	4	0	0
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	曲霉属（ <i>Aspergillus</i> ）	0	0	2
				青霉属（ <i>Penicillium</i> ）	0	1	0
Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Coriolaceae	耙齿菌属（ <i>Irpex</i> ）	0	2	1
				栓菌属（ <i>Trametes</i> ）	0	2	0
		Agaricales	Schizophyllaceae	裂褶菌属（ <i>Schizophyllum</i> ）	0	4	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	泛菌属（ <i>Pantoea</i> ）	3	0	0
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	短芽孢杆菌属（ <i>Brevibacillus</i> ）	1	0	1
			Exiguobacteraceae	微小杆菌属（ <i>Exiguobacterium</i> ）	1	0	0
			Bacillaceae	芽孢杆菌属（ <i>Bacillus</i> ）	11	8	3
			Planococcaceae	<i>Bhargavaea</i>	0	0	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	微球菌属（ <i>Micrococcus</i> ）	0	1	0

培养基中，在 200 $r \cdot \min^{-1}$ 、37 $^{\circ}$ C 条件下振荡培养 72 h。取表面真菌接种在 PDA 培养基中，28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 5~7 d。初筛时表面细菌对抗病原细菌采用改良的滤纸片法^[13]，表面真菌对抗病原细菌采用改良的菌块法^[14]。病原细菌大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均在 37 $^{\circ}$ C、200 $r \cdot \min^{-1}$ 条件下，LB 液体培养基中培养 12 h，以 1% 添加至 LB 固体培养基中，混合均匀，倒

入培养皿中用作测试板。取圆形无菌吸水性纸片放置在测试板上，取 10 μ L 表面细菌发酵液滴在厚纸片上（直径 6 mm）；用 5 mL 吸头对测试板打孔，随后对表面真菌打孔，取菌饼，将其放入测试板对应孔内。均将测试板放在 37 $^{\circ}$ C 正置培养 12 h，结果仅有一株表面真菌（SF2）对枯草芽孢杆菌有抑菌活性（见图 1A）。

2.4 抑菌活性菌复筛

取 SF2 菌块,接种在 200 mL PDB 培养基中,28 ℃、180 r·min⁻¹ 摇瓶培养 7 d,发酵产物经乙酸乙酯萃取 3 次,旋蒸后用 5 mL 乙酸乙酯复溶,测试板用 5 mL 吸头打孔,加入 200 μL 上述菌液乙酸乙酯萃取物。将测试板放在 37 ℃正置培养 12 h,观察其抑菌结果(见图 1B)。



图 1 SF2 对枯草芽孢杆菌的抑菌效果

Fig 1 Bacteriostatic effect of SF2 on *Bacillus subtilis*

2.5 SF2 真菌的鉴定

SF2 通过 ITS-rDNA 测序,鉴定为木霉属,为了进一步确定其种,参考孙瑞艳^[15]的方法扩增 ITS1、2 和 5.8S rDNA,选用通用引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3');扩增 *tef1-α* 序列,选取 *tef1-α* 引物 Ef728 (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') 和 *Tef1αR* (5'-GCCATCCTTGGGAGATACCAGC-3')。将两个基因序列进行联合建树,见图 2F, SF2-1 (ITS 序列) 与木霉属、哈茨木霉、非洲哈茨木霉聚为一支, SF2-2 (*Tef1-α* 序列) 与非洲哈茨木霉聚为一支。另外结合其外观性状:放在 28 ℃下培养箱中培养后,气生菌丝生长迅速,呈絮状,但产孢相对较晚,培养 3 d 左右,产孢区形成于菌落外缘,呈黄绿色,培养前期未见色素产生,后期会产生橘黄色色素;显微镜下菌丝透明,分枝呈直角,多对生;分生孢子梗分枝有规律地间隔分布,成对且大量再分枝;孢子为浅绿色椭圆形,符合张广志等^[16]对 *T.afroharzianum* 的描述。故将 SF2 鉴定为 *T.afroharzianum*。

3 讨论

中药材在加工、运输、贮藏中极易受到真菌污染,贮藏和加工不当容易滋生真菌或细菌繁殖,使药材发霉变质,甚至进一步产生真菌毒素,危害使用者的安全,尤其是一些药食同源的药材,如西洋参、人参、薏苡仁、酸枣仁、金银花,其药用成分、营养成分较多,极易受到污染^[17-18]。真菌污染不仅会使药材品质变坏,其产生的真菌毒素甚至会影响人类健康。本研究仅通过传统培养分离、鉴定其表面菌,发现其表面菌群落较为丰富。三个地区金银花分离鉴定得到 53 株表面菌,分布于 15 个种属,其中从封丘产地中分离得到了镰刀菌属、链格孢属,从平邑产地分离得到了链格孢属、青霉属、裂褶菌属,从巨

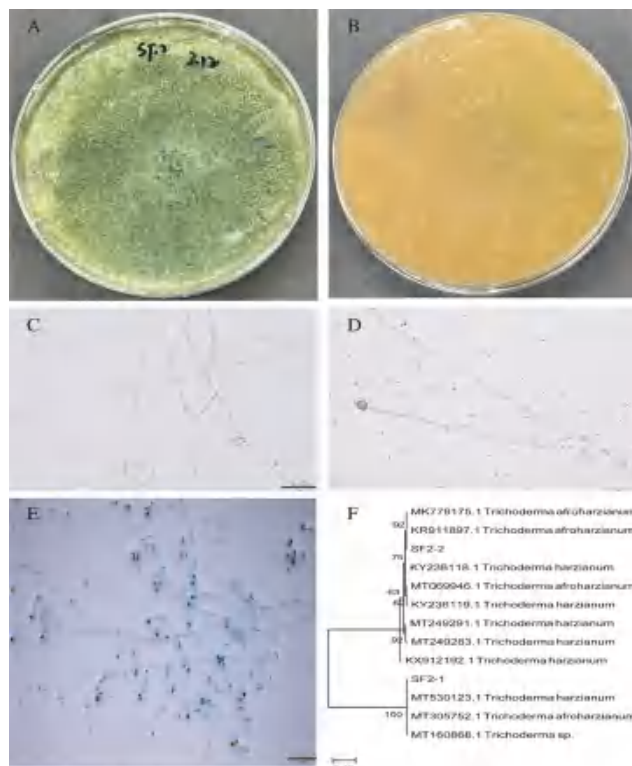


图 2 SF2 的鉴定

Fig 2 Identification of SF2

A. SF2 在 PDA 培养基上菌落正面图 (positive colony map of SF2 on PDA medium); B. SF2 在 PDA 培养基上反面菌落图 (negative colony map of SF2 on PDA medium); C、D、E. 为 SF2 的菌丝、分生孢子梗图 (hyphal and conidial stem map of SF2); F. SF2 两种引物联合的 NJ 树 (SF2-1 为 ITS 序列扩增结果; SF2-2 为 *Tef1-α* 序列扩增结果) [NJ tree of SF2 combined with two primers (SF2-1 was the result of ITS sequence amplification, and SF2-2 was the result of *Tef1-α* sequence amplification)]

鹿产地分离得到了曲霉属等污染真菌;且三个地区均检测出含有较多的枯草芽孢杆菌。过往研究表明,药材中常见的污染菌包括链格孢霉属、毛霉属、枝孢霉属等,最常见的污染菌是曲霉、青霉、镰刀菌,其中产毒真菌主要集中于这三种真菌^[19]。如黄曲霉会产生黄曲霉毒素 B1、B2,寄生曲霉会产生黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2;青霉菌能产生赭曲霉毒素 A、桔青霉素;镰刀菌能产生玉米赤霉烯酮、单端孢霉烯族毒素、串珠镰刀菌素和伏马毒素等^[20]。枯草芽孢杆菌是本研究分离得到的优势菌属,也是饮片分离得到的最常见的耐热菌株,该属的菌株部分可致病^[21],另外部分芽孢杆菌也能产生抗菌物质来抵御病原菌入侵^[22]。道玉婕^[17]在研究金银花表面菌的污染情况时,发现金银花存在镰刀菌属、曲霉属、裂褶菌属等污染菌。这些表面菌无论是对金银花本身有害、有益或是机会菌,稳定金银花表面的有益菌群,尽可能地控制有害菌的繁殖与蔓延,防

止金银花上某一有害菌或机会菌群大量繁殖,对于控制金银花贮藏过程中的霉变尤为重要。Liu 等^[23]在研究发霉金银花上的真菌群落组成时发现,曲霉属、镰刀菌属、黄单胞菌属、蓝状菌属等相对丰度较高。或许可通过金银花发霉后的群落组成,提前预防该类病原菌的侵袭,保证金银花贮藏过程中的质量。

另外,通过对金银花的表面菌群抑菌活性的筛选,发现了一株木霉属真菌可拮抗枯草芽孢杆菌。木霉菌属真菌门,半知菌亚门,丝孢纲,丝孢目,丛梗孢科,木霉属,广泛存在于不同环境条件下的土壤中。大多数木霉菌可产生多种对植物病原真菌、细菌及昆虫具有拮抗作用的生物活性物质,此外还能促进植物生长并提高植物抗逆性,因此在农业生产中应用广泛。廉华等^[24]筛选出两株对向日葵菌核病菌有较好拮抗作用木霉菌属,分别是非洲哈茨木霉 *T.afroharzianum* 838 和棘孢木霉 *T.asperellum* 573。华丽霞等^[25]探究了三种木霉属真菌的防病促生的微生物效应,结果表明绿木霉 T23、哈茨木霉 T22、G30 在植物病原真菌拮抗、解磷效果方面各具特点及优势。以往对木霉属真菌的研究大多局限在植物抗病和促生长上面^[26-27],且主要集中在哈茨木霉的研究上。本研究从金银花表面菌群中筛选得到一株拮抗枯草芽孢杆菌病原细菌的木霉菌属,并鉴定为非洲哈茨木霉,可抑制人类致病细菌。

本研究通过分离鉴定金银花的表面菌群,分析其种属组成,发现其存在常见污染菌,另外筛选得到了一株可拮抗枯草芽孢杆菌病原细菌的非洲哈茨木霉,为抑制枯草芽孢杆菌提供了新的菌种资源,后续也需对其抑菌化学成分进一步解析,以明确其抑菌机制。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 445-1902.
- [2] 朱文卿,任汉书,郑媛媛,等.金银花的功能性成分及其生物活性研究进展[J].食品工业科技,2021,42(13): 412-426.
- [3] 肖蕾,包白雪,郁阳,等.金银花化学成分及抗菌消炎活性研究[J].中南药学,2022,20(8): 1773-1780.
- [4] 杨放晴.广陈皮陈化微生物演变及黄酮类成分变化研究[D].成都:成都中医药大学,2021.
- [5] 王曦,许晓燕,郑林用,等.乳酸菌发酵黄芩的抗疲劳保健功能研究[J].时珍国医国药,2011,22(6): 1422-1424.
- [6] 刘洋,金顺义,常娟,等.复合益生菌发酵中草药前后活性成分变化[J].安徽农业科学,2017,45(34): 123-125.
- [7] 侯美如,刘宇,王岩,等.解淀粉芽孢杆菌固态发酵

- 黄芩培养基的研究[J].中国兽医学,2016,46(10): 1328-1334.
- [8] 谢炎福,杜苗苗,张优仪.红曲霉与红花双向发酵体系的初步研究[J].湖北农业科学,2015,54(11): 2718-2722.
- [9] 辛燕花,张铁丹,张建华,等.灵芝-何首乌双向液体发酵菌质抗氧化活性研究[J].食用菌学报,2018,25(3): 63-71.
- [10] 李慧玲,于莉.湛江金银花内生真菌多样性研究[J].广东农业科学,2014,41(21): 75-78,82.
- [11] 李瑾.金银花内生真菌的分离鉴定和抗菌性研究[D].郑州:河南工业大学,2010.
- [12] 张国荣,翟丽霞,王燕萍,等.药用植物内生菌次级代谢产物药理作用研究进展[J].中国药房,2021,32(7): 880-884.
- [13] 王慧芳,程叶新,白金虎,等.艾灰黄酮超声提取工艺的优化及其抑菌活性[J].中成药,2021,43(9): 2286-2292.
- [14] 孙奎,苏印泉.无花果内生真菌的抑菌活性研究[J].菌物研究,2010,8(2): 103-106.
- [15] 孙瑞艳.中国南方地区木霉菌资源收集、鉴定与生防功能评价研究[D].上海:上海交通大学,2013.
- [16] 张广志,杨合同,张新建,等.木霉现有种类名录[J].菌物学报,2014,33(6): 1210-1230.
- [17] 道玉婕.五种保健类中药材表面真菌鉴定研究[D].北京:北京协和医学院,2022.
- [18] 单利楠,王玉丹,豆小文,等.四种大宗常用中药饮片中心黄曲霉毒素污染状况分布比较研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(10): 3718-3725.
- [19] 秦筱茂,郭顺星.药材霉菌及霉菌毒素污染现状分析[J].中国中药杂志,2011,36(24): 3397-3401.
- [20] 刘洪美.巴戟天中多农药残留检测及防霉变储藏规范研究[D].北京:北京协和医学院,2016.
- [21] 邓海英,龚勇祥,李连凤,等.中药饮片微生物污染现状及典型菌鉴定研究进展[J].中草药,2019,50(9): 2242-2250,2256.
- [22] 卢昱茜,万继武,王博,等.枯草芽孢杆菌抗菌活性物质及其对水产动物抗病力影响的研究进展[J].饲料研究,2022,45(22): 125-128.
- [23] Liu ZY, Zhao Y, Wang LN, et al. Investigation and analysis of the fungal community structure in moldy *Lonicera japonica* Flos through ITS2 sequencing [J]. E3S Web of Conferences, 2021, 233: 02031.
- [24] 廉华,陈玉蓉,李梅,等.木霉菌对向日葵幼苗生理特性及菌核病防治效果的影响[J].干旱地区农业研究,2023,41(1): 169-177.
- [25] 华丽霞,何炼,蒋秋平,等.三个木霉菌株防病促生效应[J].微生物学通报,2023,50(3): 1123-1135.
- [26] 扈进冬,杨在东,吴远征,等.哈茨木霉拌种对冬小麦生长、土传病害及根际真菌群落的影响[J].植物保护,2021,47(5): 35-40.
- [27] 李松鹏,崔琳琳,程家森,等.两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究[J].植物病理学报,2018,48(1): 98-107.

(收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-03-30)

磷酸氯喹柔性脂质体的制备及其离体皮肤渗透特性研究

彭汐涯^{1, 3, 4}, 种思茹^{3, 4, 5}, 李娇^{1, 3, 4}, 桂双英¹, 杨瑞^{6*}, 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, 沈阳 110016; 3. 江苏艾迪纳米生物医药有限公司, 江苏 南通 226100; 4. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 5. 江西中医药大学, 南昌 330000; 6. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034)

摘要: **目的** 制备磷酸氯喹柔性脂质体, 并考察其离体皮肤渗透特性。**方法** 采用逆向蒸发法制备以吐温 80 为边缘活化剂的磷酸氯喹柔性脂质体, 通过动态光散射技术和微柱离心法考察其粒径、PDI、Zeta 电位、包封率。以常规脂质体和溶液为参比制剂, 采用 Franz 扩散池考察柔性脂质体离体皮肤渗透与滞留特性。**结果** 磷酸氯喹柔性脂质体粒径为 (78.59 ± 1.11) nm, PDI 为 (0.278 ± 0.004) , Zeta 电位为 (0.394 ± 0.027) mV, 包封率为 $(95.13 \pm 1.09)\%$ 。与常规脂质体和溶液相比, 磷酸氯喹柔性脂质体 24 h 的累积渗透量更高。**结论** 磷酸氯喹柔性脂质体具有较好的皮肤渗透特性。

关键词: 磷酸氯喹; 柔性脂质体; 皮肤渗透

中图分类号: R94, R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1491-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.015

Preparation of chloroquine phosphate flexible liposomes and their ex vivo skin permeation properties

PENG Xi-ya^{1, 3, 4}, CHONG Si-ru^{3, 4, 5}, LI Jiao^{1, 3, 4}, GUI Shuang-ying¹, YANG Rui^{6*}, WANG Shu-jun^{2*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. 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. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000; 6. Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034)

Abstract: Objective To prepare chloroquine phosphate flexible liposomes and to determine their ex vivo skin permeation properties. **Methods** The flexible liposomes of chloroquine phosphate were prepared by reverse phase evaporation with Tween 80 as the edge activator. The particle size, PDI, Zeta potential and encapsulation efficiency were determined by the dynamic light scattering (DLS) technique and minicolumn centrifugation method. Conventional liposomes and solution were used as reference preparations, Franz diffusion cells were used to determine the ex vivo skin permeation and deposition properties. **Results** The particle size was (78.59 ± 1.11) nm, PDI was (0.278 ± 0.004) , Zeta potential was (0.394 ± 0.027) mV and the encapsulation efficiency was $(95.13 \pm 1.09)\%$. Compared with conventional liposomes and solution, the cumulative permeation of chloroquine phosphate flexible liposomes at 24 h was higher. **Conclusion** Chloroquine phosphate flexible liposomes have desirable skin permeation properties.

Key words: chloroquine phosphate; flexible liposome; skin permeation

疣是由人类乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染皮肤黏膜引发的一种皮肤良性病变, 多发于儿童及青少年^[1]。现有治疗药物主要有鬼臼毒素、咪喹莫特、三氯乙酸、干扰素

作者简介: 彭汐涯, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物新剂型研究, email: 2574343887@qq.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, 主要从事药物新剂型与药物动力学研究, email: 1252116911@qq.com

等^[2]。这些药物治疗的重点是去除疣体,而不是根除 HPV 病毒。并且刺激性大,容易留下皮肤创伤,患者顺应性较差,易反复^[3]。磷酸氯喹(chloroquine phosphate, CQ)具有广泛的抗病毒作用,临床上可用来治疗 HPV 感染所致的尖锐湿疣、皮肤疣等疾病,可以根除残留在邻近上皮细胞和黏膜中的潜伏的 HPV,且刺激性更小^[4]。但其水溶性差,难以渗透皮肤,限制了其应用。

脂质体(liposome, Lip)作为载体,具有生物相容性好,毒副作用以及皮肤刺激性小,同时可以增加局部含药量等优点^[5-6]。柔性脂质体(flexible liposomes, FL)作为新一代脂质体,由磷脂和边缘活化剂(乙醇、胆酸盐、去氧胆酸盐、吐温类等)组成。边缘活化剂为 FL 提供高柔性膜,与具有刚性膜的传统脂质体相比,这种脂质体可以增强皮肤的穿透性^[7]。本研究以吐温 80 作为边缘活化剂,制备了一种磷酸氯喹柔性脂质体(CQ-FL),并对其表征以及离体皮肤性能进行研究,旨在为提高其临床疗效提供参考。

1 材料

1.1 仪器

YRE-2000E 旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司);200W/FJ200-SH 型数显高速分散均质机(上海标本模型厂);DF-101S 型集热式磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);TDZ4K 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);SCIENCETZ-E 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);ST3100 型 pH 计(奥豪斯仪器常州有限公司);UV-2550 型紫外分光光度计、LC-20AT 型岛津高效液相色谱仪(日本岛津公司);Nano-ZS90 纳米粒度及电位分析仪(英国马尔文公司)。

1.2 试药

磷酸氯喹原料药(批号:2206005,纯度:99.1%,重庆西南制药二厂有限责任公司),磷酸氯喹对照品(批号:KF2D-2DL2,纯度:98.3%,中国食品药品检定研究院),大豆磷脂(批号:579010-1170091-13/903-910B,德国利宝益公司),吐温 80(批号:C12824399)、三乙胺(批号:C13683716)、G50 葡聚糖凝胶(批号:C12585657)、胆固醇(批号:C12398357)(上海麦克林生化科技有限公司);甲醇(批号:6508CCQ03)、乙醚(批号:20210506)、磷酸(批号:10015418)、柠檬酸(批号:20201202)、柠檬酸钠(批号:20120706)、氢氧化钠(批号:20200925)(国药集团化学试剂有限公司);甲醇、三

乙胺为色谱纯,水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠,体质量 180 ~ 220 g[辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号:SCXK(辽)2020-0001]。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 空白脂质体 采用 pH 梯度法制备:分别称取大豆磷脂和胆固醇(4.8:1),加入乙醚超声溶解,加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.6)均质,直至形成稳定的 W/O 型乳剂。于旋转蒸发仪 37 °C 下真空旋转蒸发除去有机溶剂,达到胶态后继续旋转蒸发 30 min 将茄形瓶上的凝胶脱落,即得到脂质体混悬液。用 400 W 冰浴探头超声 10 min(工作 3 s,间歇 3 s),用氢氧化钠溶液调 pH 值至 6.5,40 °C 水浴中孵育 10 min,即得空白脂质体。

2.1.2 磷酸氯喹脂质体(CQ-LIP) 称取 CQ(药脂比 1:53.3)加入探头超声后的脂质体中,其余均按照“2.1.1”项下方法制得 CQ-LIP。

2.1.3 空白 FL 称取适量边缘活化剂吐温 80,其余均按照“2.1.1”项下方法制得空白 FL。

2.1.4 CQ-FL 称取 CQ(药脂比 1:53.3)加入探头超声后的脂质体中,其余均按照“2.1.3”项下方法制得 CQ-FL。

2.2 CQ 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为迪马 Diamonsil C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 A(含 0.4% 三乙胺的甲醇溶液):B(水)=70:30,检测波长:343 nm,柱温:35 °C,流速:1 mL·min⁻¹,进样体积:20 μL。

2.2.2 溶液的配制 精密称取 CQ 对照品 20.1 mg 于 100 mL 量瓶中,以流动相溶解,制成 201 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。取适量 CQ-LIP、CQ-FL 加入适量流动相,涡旋 1 min,超声 30 min,加流动相定容至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,得供试品溶液。取适量空白脂质体、空白 FL,其余同供试品溶液制备方法,得空白制剂供试品溶液。

2.2.3 方法学考察 分别取适量对照品储备液、供试品溶液、空白制剂供试品溶液 20 μL,按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定,结果见图 1。以进样浓度(C)为横坐标,药物的峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,得标准曲线方程为 $Y = 2.28 \times 10^4 C - 3.79 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。结果表明,CQ 在 0.80 ~ 72.36 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良

好。仪器精密度和日间精密度的峰面积 RSD 为 0.18% 和 0.68%，供试品稳定性和对照品稳定性试验峰面

积 RSD 为 0.74% 和 0.58%，重复性试验峰面积 RSD 为 1.4%，平均加样回收率为 99.85%， RSD 为 1.3%。

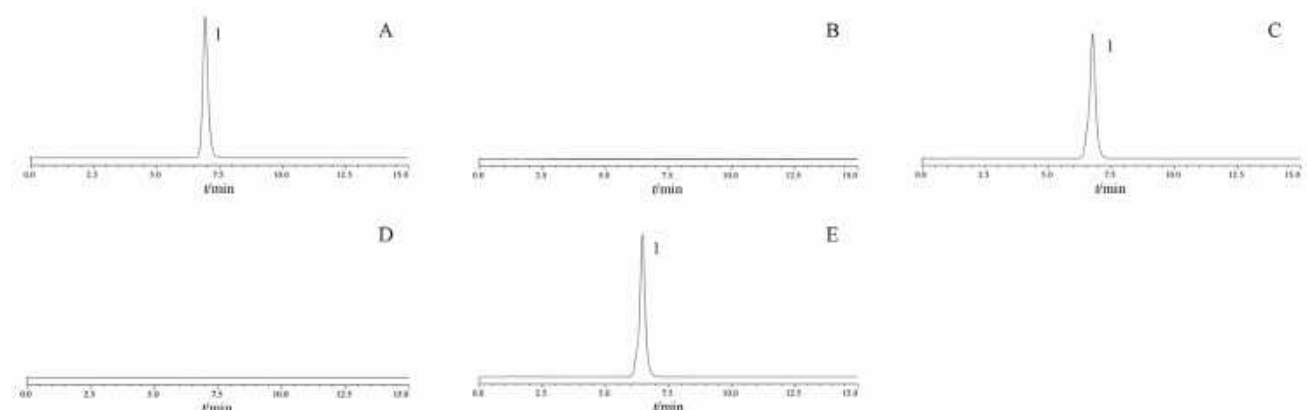


图 1 专属性试验色谱图

Fig 1 Chromatogram of specific test

A. 对照品 (reference); B. 空白脂质体 (blank liposome); C. CQ-LIP; D. 空白 FL (blank FL); E. CQ-FL; 1. 磷酸氯喹 (chloroquine phosphate)

2.3 脂质体包封率的测定

2.3.1 测定方法 采用微柱离心法测定包封率^[8]。精密量取 0.2 mL 磷酸氯喹脂质体加于葡聚糖 G-50 柱顶端，2000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 3 min，加洗脱液 0.2 mL 后 2000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 3 min，收集 1~4 管洗脱液于 5 mL 量瓶中，用甲醇破乳超声溶解，并定容至刻度，按照“2.1”项下色谱条件测定峰面积，计算药物的总浓度为 C_0 。再精密量取 0.2 mL 脂质体于 5 mL 量瓶中，再次用甲醇破乳超声溶解并定容至刻度，按照“2.1”项下色谱条件测定峰面积，计算药物的浓度为 C_1 。计算脂质体包封率 (EE)， $EE (\%) = (C_0/C_1) \times 100\%$ 。结果 3 批 CQ-LIP 和 CQ-FL 的平均包封率分别为 $(83.14 \pm 2.15) \%$ 、 $(95.13 \pm 1.09) \%$ 。

2.3.2 磷酸氯喹脂质体洗脱曲线的绘制 分别精密量取 0.2 mL CQ-LIP 以及 CQ-FL 加于葡聚糖 G-50 柱顶端，2000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 3 min，加洗脱液 0.2 mL 后 2000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 3 min，收集洗脱液于 5 mL 量瓶中，用甲醇破乳超声溶解，并定容至刻度，在 343 nm 下测定吸光度，绘制 CQ-LIP 以及 CQ-FL 的洗脱曲线。由图 2 可知，CQ-LIP 以及 CQ-FL 都能与游离药物在该分离条件下可以很好地分离。所以最佳的条件是前 1~4 管为脂质体部分，7~14 管为游离药物部分。

2.3.3 柱回收率的测定 分别精密量取 0.2 mL 空白脂质体和空白柔性脂质体上样，按“2.3.2”项下方法，收集前 4 管洗脱液定容至 5 mL 量瓶，在 500 nm 下测定吸光度 ($A_{后}$)，平行 3 次。再分别取 0.2 mL 空白脂质体和空白柔性脂质体用洗脱液稀释至

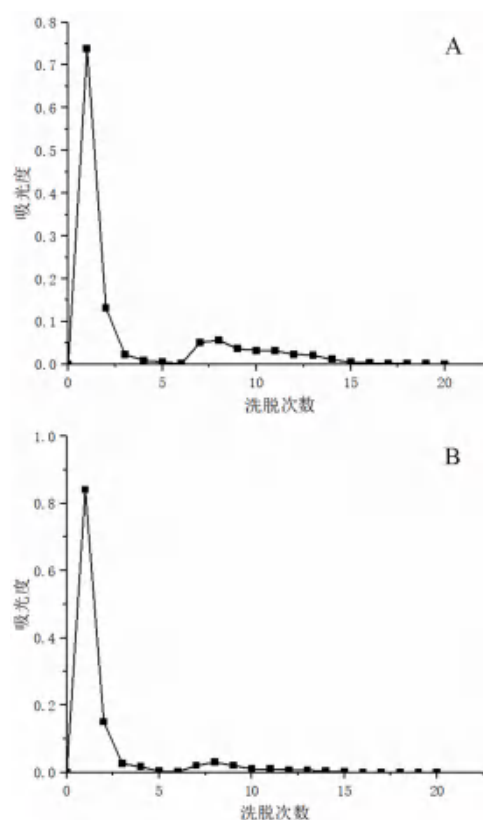


图 2 CQ-LIP (A) 和 CQ-FL (B) 洗脱曲线

Fig 2 Elution curve of CQ-LIP (A) and CQ-FL (B)

5 mL。在 500 nm 下测定吸光度 ($A_{前}$)，根据公式计算脂质体的柱回收率，柱回收率 ($\%$) = $A_{后}/A_{前} \times 100\%$ ，结果空白脂质体和空白柔性脂质体的柱回收率分别为 $(98.1 \pm 1.1) \%$ 、 $(98.5 \pm 0.7) \%$ 。 RSD 分别为 1.1%、0.71%。可见常规脂质体和柔性脂质体前 4 管都可以被完全洗脱，满足测定条件。

2.4 泄漏率测定

将磷酸氯喹脂质体放置 4℃ 冰箱保存一周, 计算泄漏率, 平行测定三次, 泄漏率 (%) = $(W_{包} - W_{贮}) / W_{包} \times 100\%$, 其中 $W_{包}$, $W_{贮}$ 分别为制备时的包封量和储存一定时间后的包封量。结果表明 CQ-LIP 和 CQ-FL 泄漏率分别为 $(0.3 \pm 0.1)\%$ 和 $(0.2 \pm 0.1)\%$, 泄漏率较低, 说明两种脂质体稳定性良好。

2.5 Zeta 电位与粒径测定

通过 Nano-ZS90 纳米粒度及电位分析仪对 CQ-LIP 和 CQ-FL 粒径和 Zeta 电位进行测定, 每个样品平行测 3 次。CQ-LIP 粒径为 (88.69 ± 0.78) nm, PDI 为 (0.339 ± 0.035) , Zeta 电位为 (0.281 ± 0.012) mV, CQ-FL 粒径为 (78.59 ± 1.11) nm, PDI 为 (0.278 ± 0.004) , Zeta 电位为 (0.394 ± 0.027) mV。图 3 结果表明, CQ-FL 和 CQ-LIP 的粒径都在 80 nm 左右, 利于透皮吸收。CQ-FL 的 PDI 更小, 粒径更均匀。

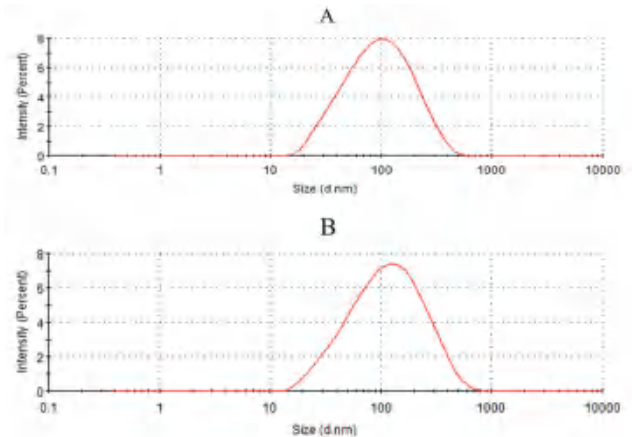


图 3 CQ-FL (A) 和 CQ-LIP (B) 的粒径分布图
Fig 3 Particle size diagram of CQ-FL (A) and CQ-LIP (B)

2.6 离体皮肤透皮实验

2.6.1 离体皮肤的处理 将 SD 大鼠背部皮肤使用脱毛膏脱毛, 去除皮下脂肪, 用生理盐水洗净于 -20℃ 冷冻, 以备第二日使用。

2.6.2 体外透皮实验 采用 Franz 扩散池, 将鼠皮固定, 接收池中加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液。分别取 CQ 溶液 (CQ-DS)、CQ-FL、CQ-LIP (含相同 CQ) 置于供给池中, 37℃ 水浴恒温, 搅拌, 分别于 1、2、3、5、7、9、12、24 h 从接收池中取样 1 mL 同时补加等温等量释放介质。将取出的样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 照“2.2”项下方法进行定量分析, 并计算 CQ 的累积透过量 Q_n [9]。

$$Q_n = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

式中 C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_i 为第 i 个取样点测得的药物质量

浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); A 为扩散池的有效透皮渗透面积; V 为接收液体积; V_i 为取样体积。

结果见表 1、表 2 及图 4, 可知 CQ-DS、CQ-LIP、CQ-FL 的 CQ 24 h 累积透过量分别为 140.12、803.13、1013.75 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。与 CQ-DS 相比, CQ-FL 透皮吸收量更高, 约为 CQ-DS 的 7 倍。将累积透过量 (Q_n) 与时间 (t) 按零级方程、一级方程、Higuchi 方程拟合, 由表 2 结果可知, CQ-FL 和 CQ-LIP 体外透皮模型拟合符合一级方程, 说明其有明显的缓释作用, CQ-DS 符合零级方程, 说明皮肤对 CQ 透皮存在限制。

表 1 CQ 渗透动力学参数

Tab 1 Osmotic kinetic parameters of CQ			
制剂	$Q-t$ 方程	$Q_{24} / (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	$Q_0 / (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$
CQ-DS	$Q = 5.93t + 1.16$	140.12	75.23
CQ-LIP	$Q = 37.00t + 59.71$	803.13	102.98
CQ-FL	$Q = 56.98t + 78.99$	1013.75	253.49

表 2 体外透皮量 - 时间模型拟合方程

Tab 2 Fitting equation and correlation coefficients for the in vitro transdermal amount in different preparations			
制剂	模型	模型拟合方程	R^2
CQ-DS	零级方程	$Q = 5.9301t + 1.1561$	0.9985
	一级方程	$Q = -17375.6068(1 - e^{0.0003t})$	0.9981
	Higuchi 方程	$Q = 34.7173t^{1/2} - 260.9556$	0.9540
CQ-LIP	零级方程	$Q = 36.9970t + 59.7137$	0.8128
	一级方程	$Q = 1090.6547(1 - e^{-0.0633t})$	0.9203
	Higuchi 方程	$Q = 232.6429t^{1/2} - 241.9175$	0.9202
CQ-FL	零级方程	$Q = 56.9808t + 78.9926$	0.7549
	一级方程	$Q = 1246.8402(1 - e^{-0.0837t})$	0.9194
	Higuchi 方程	$Q = 292.2057t^{1/2} - 260.9556$	0.8939

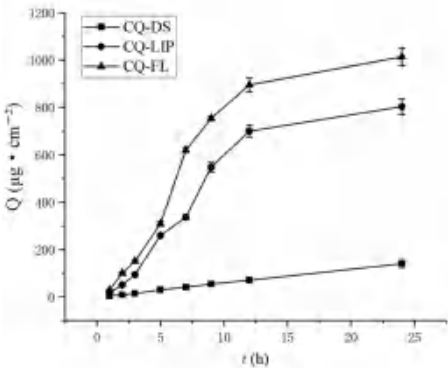


图 4 不同制剂的透皮吸收实验 ($n = 3$)
Fig 4 Transdermal absorption of different preparations ($n = 3$)

2.6.3 皮肤滞留量 在透皮吸收实验结束时, 用温生理盐水将皮肤冲洗干净, 晾干后将其剪碎加纯水至 10 mL, 均质 5 min, 静置 3 min, 重复 3 次。取出 1 mL 加入 1 mL 甲醇, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 涡旋 5 min 后离心 5 min, 取上清液经 0.45 μm 的

微孔滤膜过滤,照“2.2”项下方法测定 CQ 含量, CQ-DS、CQ-LIP、CQ-FL 的 CQ 皮肤滞留量 (Q_s) 分别为 75.23、102.98、253.49 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (见表 1)。结果表明, CQ-FL 的皮肤滞留量最多,说明将 CQ 制成柔性脂质体可以增加 CQ 在皮肤中的滞留量,有利于其发挥治疗作用。

3 讨论

磷酸氯喹脂质体的制备方法主要有薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醚注入法、pH 梯度法等。前期实验比较发现,逆向蒸发法结合 pH 梯度法包封率较好,所以本研究选用该方法制备磷酸氯喹脂质体。pH 梯度法是一种主动载药方法, CQ 为水溶性药物,通过 pH 梯度法能实现主动载药,并且包封率较高^[10]。杜春阳等^[11]采用 pH 梯度主动载药法制备 F7 热敏脂质体,包封率可达 95.0%。包封率是脂质体质量评价的重要指标,常用的测定方法有超速离心法、超滤离心法、葡聚糖凝胶微柱离心法和透析与反透析法等^[12]。笔者比较了超速离心法和葡聚糖凝胶微柱离心法,发现超速离心法的回收率不合格,故采取葡聚糖凝胶微柱离心法进行包封率的测定。CQ-FL 的 PDI 更小,包封率更大,说明添加了边缘活化剂可以使得脂质体分散更均匀,包封率也得到提升。

CQ 是水溶性药物,难以渗透和滞留皮肤,为了增加其渗透性,将其制备成 FL。本实验采用 pH 梯度法成功制备较高包封率的 CQ-FL,工艺简单,质量可控。在透皮实验中, CQ-FL 较 CQ-LIP 具有较高的累积透过量,结果表明, CQ-FL 透皮效果优于 CQ-LIP,表明 FL 可以提高透皮效果。因为脂质体是磷脂双分子层结构,生物相容性好,而更易渗透至皮肤,延长其在皮肤的滞留时间。FL 具有良好的变形能力,能与表皮中的脂质层融合,从而改变了表皮的脂质结构,在一定程度上降低了屏障作用,使得 FL 能够通过脂质的间隙进入皮肤到深处^[13]。CQ-FL 在皮肤中的蓄积量较 CQ-LIP 大,是由于 CQ-FL 有较强的亲水性和渗透性,能通过水合作用,使得角质细胞间结构改变,脂质双层中疏水性尾部排列紊乱,皮肤角质层膨胀至疏松多孔状态,从而使 CQ 更易

透过皮肤。

后续试验将对 CQ-FL 的抗 HPV 病毒作用进行深入系统研究,进一步完善磷酸氯喹脂质体治疗皮肤疣的药效和作用机制,为磷酸氯喹经皮制剂的开发、临床应用提供参考。

参考文献

- [1] 申琳,皮红英.皮肤疣治疗研究进展[J].临床误诊误治, 2016, 29 (5): 113-116.
- [2] 杜娟,徐金华.干扰素与尖锐湿疣的复发与防治[J].皮肤科学通报, 2021, 38 (6): 504-509.
- [3] 中华医学会皮肤性病学分会,中国医师协会皮肤科医师分会,中国康复医学会皮肤性病委员会.中国尖锐湿疣临床诊疗指南(2021 完整版)[J].中国皮肤性病学杂志, 2021, 35 (4): 359-374.
- [4] 广州康健医学科技有限公司,广州凯普生物科技有限公司.磷酸氯喹在制备防治高危型 HPV 感染及宫颈癌前病变与宫颈癌的药物中的应用: CN114848642A [P]. 2022-08-05.
- [5] Alavi M, Hamidi M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles [J]. Drug Metab Pers Ther, 2019, 34 (1): 1-6.
- [6] Li MY, Du CY, Guo N, et al. Composition design and medical application of liposomes [J]. Eur J Med Chem, 2019 (164): 640-653.
- [7] Chang Y, Dai XX, Yang SF, et al. Coarse-grained molecular dynamics simulations of the effect of edge activators on the skin permeation behavior of transfersomes [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 183: 110462.
- [8] 刘黎瑶,张蕊,张守庆,等.微柱离心-HPLC 测定胰岛素脂质体的包封率[J].中国药理学杂志, 2022, 57 (3): 214-219.
- [9] 喻海林,何文,郭威希.脂质体及脂质体凝胶对尼美舒利透皮吸收的比较研究[J].中国药师, 2022, 25 (1): 59-63.
- [10] 王荷逸,黄思凡,王邦国,等.水溶性药物脂质体制备方法的研究进展[J].中国药理学杂志, 2020, 55 (23): 1935-1938.
- [11] 杜春阳,赵龙,郭娜,等.新型嘌呤衍生物 F7 热敏脂质体的制备和评价研究[J].国际药学研究杂志, 2018, 45 (9): 714-722.
- [12] 张艺,杭太俊,宋敏.载药脂质体包封率测定方法的研究进展[J].中国药科大学学报, 2021, 52 (2): 245-252.
- [13] 王维,黄巧玲.柔性脂质体在经皮给药系统中的研究进展[J].中国现代应用药学, 2021, 38 (4): 495-502.

(收稿日期: 2022-12-12; 修回日期: 2023-03-07)

雷公藤内酯酮对来那度胺原发耐药 RPMI-8226 细胞增殖及凋亡的影响

王家敏^{1, 2, 3}, 汪玉洁³, 唐欣欣^{2, 3}, 戴敏^{1*}, 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 226126)

摘要: **目的** 探讨雷公藤内酯酮对来那度胺原发耐药 RPMI-8226 细胞增殖及凋亡的影响。**方法** MTS 比色法检测来那度胺和雷公藤内酯酮对不同多发性骨髓瘤细胞增殖能力的影响; 流式细胞术检测雷公藤内酯酮对 RPMI-8226 细胞周期与凋亡的影响; Western blot 法检测雷公藤内酯酮对 RPMI-8226 细胞内 IKAROS 家族锌指蛋白 1 (IKZF1) 和 IKAROS 家族锌指蛋白 3 (IKZF3) 表达的影响; RT-qPCR 法检测雷公藤内酯酮对 RPMI-8226 细胞内 *IKZF1*、*IKZF3* 基因转录水平的影响。**结果** 来那度胺对不同多发性骨髓瘤细胞增殖的作用强度不同, 而雷公藤内酯酮对不同多发性骨髓瘤细胞增殖均有强效抑制作用, 同时可促进来那度胺非敏感的 RPMI-8226 细胞凋亡, 而对细胞周期变化基本无影响。相较于来那度胺, 雷公藤内酯酮可剂量依赖性下调 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 蛋白的表达, 进一步 RT-qPCR 检测显示, 雷公藤内酯酮可降低 RPMI-8226 细胞 *IKZF1* 和 *IKZF3* 基因的转录水平。**结论** 雷公藤内酯酮可促进来那度胺原发耐药 RPMI-8226 细胞的凋亡, 并且可通过降低来那度胺原发耐药 RPMI-8226 细胞内 *IKZF1* 和 *IKZF3* 基因的转录水平来下调相关蛋白的表达, 实现对细胞的增殖抑制作用。

关键词: 雷公藤内酯酮; 来那度胺耐药; 多发性骨髓瘤; RPMI-8226 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1496-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.016

Effect of triptonide on the proliferation and apoptosis of primary lenalidomide-resistant RPMI-8226 cells

WANG Jia-min^{1, 2, 3}, WANG Yu-jie³, TANG Xin-xin^{2, 3}, DAI min^{1*}, GAO An-hui^{2, 3*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. Biopolar Hongye (Nantong) Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226126)

Abstract: Objective To explore the effect of triptonide on the proliferation and apoptosis of primary lenalidomide-resistant RPMI-8226 cells. **Methods** MTS colorimetric assay was used to detect the effect of lenalidomide and triptonide on the proliferation of different multiple myeloma cells. Flow cytometry was used to detect the effect of triptonide on RPMI-8226 cell cycle and apoptosis. Western blot assay was applied to detect the effect of triptonide concentrations on the expression of IKAROS Family Zinc Finger 1 (IKZF1) and IKAROS Family Zinc Finger 3 (IKZF3) in RPMI-8226 cells. The effect of triptonide on the transcriptional level of *IKZF1* and *IKZF3* in RPMI-8226 cells was detected by RT-qPCR assay. **Results** The effect of lenalidomide on the proliferation of different types of multiple myeloma cells varied. Triptonide strongly inhibited the proliferation of different multiple myeloma cells, and also induced primary lenalidomide-resistant RPMI-8226 cells apoptosis but had no effect on the cell cycle. Compared to lenalidomide, triptonide inhibited the expression of IKZF1

作者简介:王家敏, 女, 硕士研究生, 主要从事药理研究, email: jiaminw04@163.com *通信作者: 戴敏, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药及有效成分药效学研究, email: daiminliao@163.com; 高安慧, 女, 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

and IKZF3 proteins in a dose-dependent manner. RT-qPCR assay showed that triptonide inhibited the transcriptional levels of *IKZF1* and *IKZF3*. **Conclusion** Triptonide may induce primary lenalidomide-resistant RPMI-8226 cell apoptosis and reduce the expression of related proteins by inhibiting the transcriptional level of *IKZF1* and *IKZF3* genes in primary lenalidomide-resistant RPMI-8226 cells, therefor inhibiting the proliferation of RPMI-8226 cells.

Key words: triptonide; lenalidomide-resistant; multiple myeloma; RPMI-8226 cell; proliferation; apoptosis

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是发病率居全球第二的恶性血液肿瘤, 临床主要表现为骨痛、肝脾淋巴结肿大和肾功能损伤等^[1]。免疫调节剂来那度胺 (lenalidomide, LENA) 为临床治疗 MM 的一线药物^[2], 但部分患者初次使用即对 LENA 不敏感, 且长期使用 LENA 后患者也会出现耐药问题, 这些现象常伴随着 LENA 对肿瘤细胞增殖起关键作用的 IKZF1 和 IKZF3 等底物蛋白降解能力的下降, 从而降低药物的治疗效果^[3-4]。因此, 对于 LENA 不敏感和耐药的 MM 患者来说, 聚焦度胺类免疫调节剂的底物蛋白, 研究开发更有效的药物十分必要。

雷公藤为卫矛科植物雷公藤的根, 具有祛风除湿、通络止痛和活血消肿等功效。雷公藤内酯酮 (triptonide, TPN), 是雷公藤的有效成分之一, 具有抗肿瘤、避孕和免疫抑制等药理活性^[5], 其中 TPN 对多种肿瘤抑制效果显著, 包括肺癌^[6]、前列腺癌^[7]和白血病^[8]等, 但尚未见 TPN 对 MM 细胞作用的报道。本课题组前期研究发现 TPN 对人 MM 细胞增殖具有优异的抑制作用, 并且在 LENA 非敏感细胞株上仍旧保持了强效的增殖抑制活性。因此本实验将探讨 TPN 对 MM 细胞增殖抑制的作用强度及潜在的可能机制, 为 TPN 治疗 MM 提供依据。

1 材料

1.1 细胞株

多发性骨髓瘤细胞株 MM.1S 和 RPMI-8226 来源于美国模式培养物研究所 (ATCC)。

1.2 试剂

LENA (上海皓鸿生物医药科技有限公司, 货号: 1024678, 纯度: 99.80%), TPN (MCE 公司, 货号: HY-32736, 纯度: 99.73%), RPMI 1640 培养基、CellTiter 96 AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (Gibco 公司, 货号分别为 C11875500BT、G3581), 胎牛血清 (Hyclone 公司, 货号: F8318), 硫酸链霉素、青霉素 G 钠盐 (梯希爱公司, 货号分别为 S0585、P1770), IKZF1 抗体、IKZF3 抗体 (CST 公司, 货号分别为 14859S、15103S), β -Ac-

tin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司, 货号: sc-47778), ECL 显影液 (Thermo Scientific 公司, 货号: 34580), 细胞周期阻滞检测试剂盒 (碧云天公司, 货号: C1052), Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (翌圣生物公司, 货号: 40305ES60), RNA 提取试剂盒、逆转录反应试剂盒、qPCR 反应试剂盒 (Vazyme 公司, 货号分别为 R701、R333、Q511-03)。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱、荧光定量 PCR 扩增仪 (Thermo Scientific), Victor Nivo 3S 多功能酶标仪 (PerkinElmer), 高速冷冻离心机 (Scilogex), 电泳仪、凝胶成像仪 (Bio-Rad), 流式细胞分析仪 (Beckman)。

2 方法

2.1 溶液配制

取 LENA 及 TPN 粉末于 DMSO 中溶解, 配制为 10 mmol · L⁻¹ 的母液, 分装置于 -80 °C 冰箱中备用。使用时用完全培养基稀释至所需浓度, 现配现用。

2.2 细胞培养

将 MM.1S 及 RPMI-8226 细胞培养于含 10% 胎牛血清, 0.1% 青-链霉素混合液 (1 × 10⁵ U · mL⁻¹ 青霉素和 100 mg · mL⁻¹ 链霉素) 的 RPMI 1640 培养基中, 并置于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中。根据细胞生长情况, 每 3 ~ 4 日传代 1 次, 取对数生长期且状态良好的细胞用于实验。

2.3 MTS 法检测细胞增殖

取对数生长期 MM 细胞, 分别以 3 × 10⁴ 个/孔 (MM.1S 细胞) 和 8 × 10³ 个/孔 (RPMI-8226 细胞) 接种于 96 孔板中, 加入用完全培养基稀释的不同浓度的 LENA 及 TPN (2000、400、80、16、3.2、0.64、0.128 和 0.0256 nmol · L⁻¹) 至终体积为 100 μ L, 培养 72 h, 加入 MTS 试剂, 混匀后用酶标仪在 490 nm 和 690 nm 波长处检测吸光度。以 OD₄₉₀ - OD₆₉₀ 作为各组吸光值, 以给药孔的吸光值 (OD_{sample}) 与 DMSO 对照孔的吸光值 (OD_{DMSO}) 的比值计算抑制率, 计算公式如下:

抑制率 (%) = $[1 - (OD_{\text{sample}}/OD_{\text{DMSO}})] \times 100\%$
采用 GraphPad Prism 8.4.3 计算 IC_{50} 。

2.4 流式细胞术检测 TPN 对 RPMI-8226 细胞周期的影响

取对数生长期 RPMI-8226 细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于 12 孔板中, 加入用完全培养基稀释的不同浓度 TPN (80、40、20 和 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至终体积为 1 mL, 培养 24 h 后收集细胞, 加入 1 mL 75% 乙醇固定过夜, 收集固定后的细胞加入 0.5 mL 含 RNaseA 的碘化丙啶 (PI) 染色液, 37°C 避光水浴 30 min, 用流式细胞仪在 488 nm 波长处激发, 在 610 ~ 620 nm 处检测红色荧光进行分析。

2.5 流式细胞术检测 TPN 对 RPMI-8226 细胞凋亡的影响

取对数生长期 RPMI-8226 细胞, 以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 加入用完全培养基稀释的不同浓度 TPN (80、40、20 和 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至终体积为 2 mL, 培养 72 h 后收集细胞, 加入凋亡检测试剂 (Annexin V/PI 双染) 室温避光反应 15 min, 用流式细胞仪在 488 nm 波长处激发, 在 610 ~ 620 nm 处检测红色荧光, 520 ~ 530 nm 处检测绿色荧光进行分析。

2.6 Western blot 法检测 TPN 对 RPMI-8226 细胞 IKZF1 和 IKZF3 蛋白水平的影响

取对数生长期 RPMI-8226 细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于 12 孔板中, 加入用完全培养基稀释的不同浓度 TPN (80、40、20 和 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至终体积为 1 mL, 培养 24 h 后收集细胞, 加入 $2 \times$ Loading buffer 冰上裂解 30 min 后, 金属浴 95°C 煮 15 min。样品冷却后进行 SDS-PAGE 电泳, 转至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, 加入 IKZF1、IKZF3 和 β -Actin 一抗 4°C 孵育过夜, 清洗 $10 \text{ min} \times 3$ 次后加入相应二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 1 h, 清洗 $10 \text{ min} \times 3$ 次后加入 ECL 显影液, 置于凝胶成像仪进行曝光。采用 Image Lab 6.0.1 对结果进行灰度扫描, 计算各组别目的蛋白的相对表达量。

2.7 RT-qPCR 检测 TPN 对 RPMI-8226 细胞 IKZF1 和 IKZF3 mRNA 表达的影响

取对数生长期 RPMI-8226 细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于 12 孔板中, 加入用完全培养基稀释的不同浓度 TPN (80、40、20 和 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至终体积为 1 mL, 培养 24 h 后收集细胞, 使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 反应条件: 55°C 反应 15 min, 85°C 5 s 使反转录酶失活。进行 RT-qPCR 分析, 反应条件: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火延伸

30 s, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 RT-qPCR primer sequences	
引物	序列 (5'-3')
IKZF1	上游 GAATGGGCGTGCCTGTGAAATGAA
	下游 TGGCGACGTTACTTGCTAGTCTGT
IKZF3	上游 ACTGCACACAGGGGAAAAAC
	下游 TTGTGCTCCTCAAGGGAAC
GAPDH	上游 GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	下游 ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

2.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.4.3 对数据进行统计分析, 结果以均值 $\pm$ 标准差表示, 两组以上数据采用方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 LENA 和 TPN 对 MM.1S 和 RPMI-8226 细胞增殖的影响

LENA 对 MM.1S 细胞具有较强的增殖抑制作用 [$IC_{50} = (1645.00 \pm 149.14) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$], 而对 RPMI-8226 细胞增殖抑制作用较弱 ($IC_{50} > 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); TPN 对 MM.1S [$IC_{50} = (6.72 \pm 0.02) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$] 和 RPMI-8226 [$IC_{50} = (13.37 \pm 0.32) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$] 细胞均具有较强的增殖抑制作用, 活性优于 LENA。

3.2 TPN 对 RPMI-8226 细胞周期的影响

TPN 作用于 RPMI-8226 细胞 24 h 后, 通过流式细胞术检测不同浓度的 TPN (10、20、40 和 $80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 RPMI-8226 细胞周期的影响, 结果如图 1 所示, 随着 TPN 处理浓度增加, 与 DMSO 组 (23.84%) 相比, G_2/M 期细胞逐渐减少, 分别为 17.73%、12.86%、5.28% 和 1.09%; 与 DMSO 组 (23.38%) 相比, S 期细胞整体呈逐渐减少趋势, 分别为 24.20%、27.77%、15.43% 和 8.93%; 与 DMSO 组 (42.76%) 相比, G_0/G_1 期细胞逐渐减少, 分别为 49.55%、45.72%、37.41% 和 23.73%; 同时, 与 DMSO 组 (10.02%) 相比, Sub- G_1 期细胞逐渐增加, 分别为 8.52%、13.66%、41.88% 和 66.26%, 即随着 TPN 浓度的增加, G_2/M 期、S 期和 G_0/G_1 期均出现减少现象, 同时伴随着 Sub- G_1 期细胞增加的现象, 提示 TPN 可能具有较强的促凋亡作用。

3.3 TPN 对 RPMI-8226 细胞凋亡的影响

如图 2 所示, 与 DMSO 组相比, 10、20、40 和 $80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TPN 诱导细胞凋亡总凋亡率明显升高, 说明 TPN 具有较强的促进 RPMI-8226 细胞凋亡的作用, 且具有浓度依赖性。

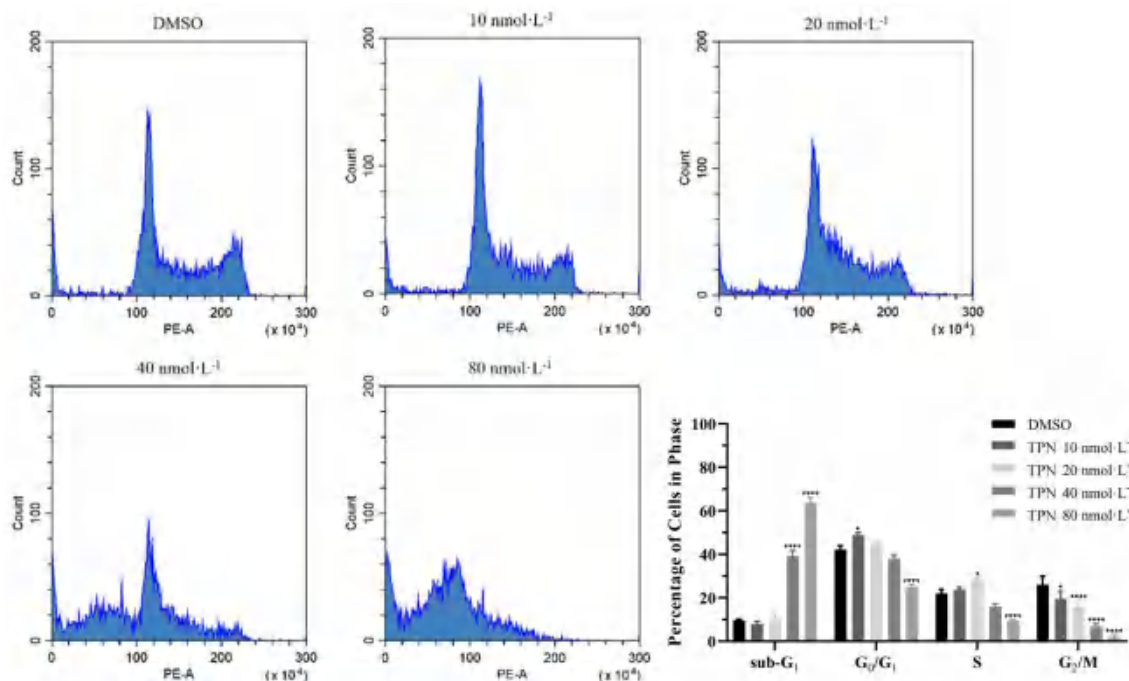


图 1 TPN 对 RPMI-8226 细胞周期的影响

Fig 1 Effect of triptonide on RPMI-8226 cell cycle

注 (Note): 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ (Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$).

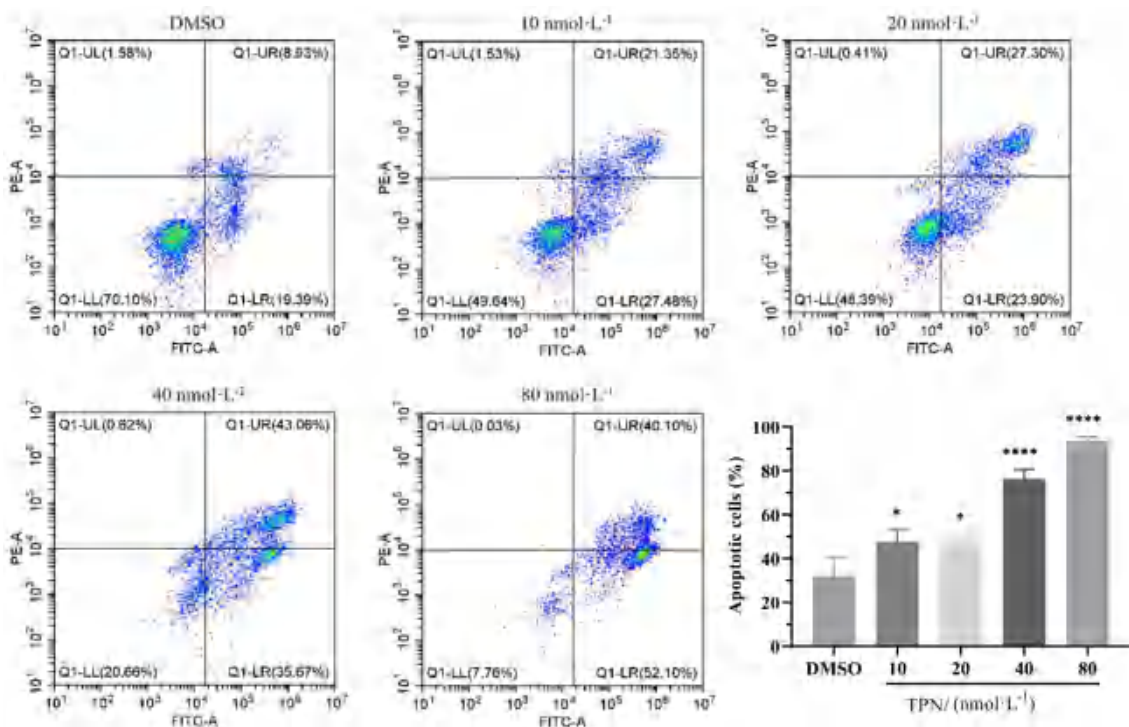


图 2 TPN 对 RPMI-8226 细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of triptonide on RPMI-8226 apoptosis

注 (Note): 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ (Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$).

3.4 LENA 和 TPN 对 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 蛋白表达的影响

如图 3A 所示, 在 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, LENA 在 MM.1S 细胞上可下调 IKZF1、IKZF3 蛋白表达作用, 在 RPMI-8226 细胞上基本无下调

相关蛋白能力。TPN 作用后的 RPMI-8226 细胞, 与 DMSO 组相比, 随着 TPN 浓度增加, 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 的表达量逐渐降低, 说明 TPN 可以下调 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 蛋白的表达, 见图 3B。

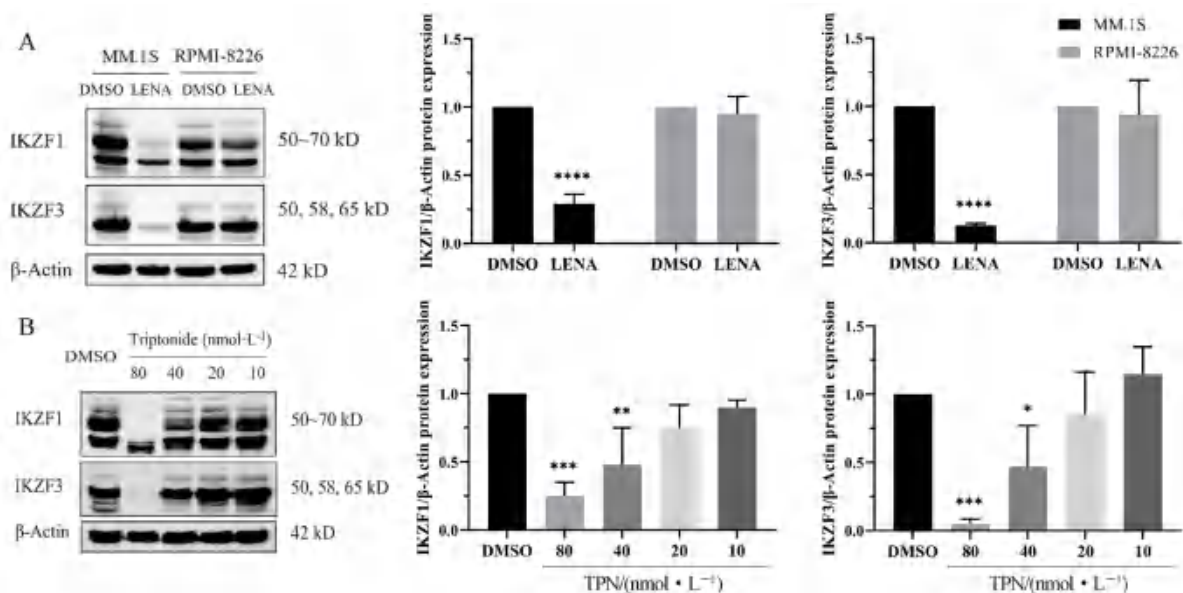


图3 LENA (A) 和 TPN (B) 对 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of lenalidomide (A) and triptonide (B) on the expression of IKZF1 and IKZF3 protein in RPMI-8226

注 (Note): 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

3.5 TPN 对 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 基因转录水平的影响

如图 4 所示, 40、80 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPN 能显著减少 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 基因转录水平, 且随 TPN 作用浓度增加, mRNA 表达量逐渐降低, 说明 TPN 可减少人多发性骨髓瘤 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 基因转录水平。

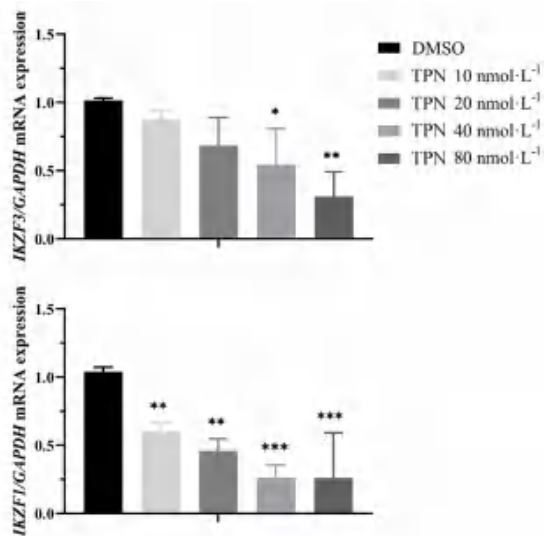


图4 TPN 对 RPMI-8226 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 基因转录水平的影响

Fig 4 Effect of triptonide on the expression of IKZF1 and IKZF3 mRNA in RPMI-8226

注 (Note): 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

4 讨论

MM 在中国的发病率约为十万之一, 好发于

老年人群且易复发, 目前仍无法治愈。LENA 作为第二代免疫调节剂, 具有直接抑制肿瘤细胞增殖、调节免疫细胞因子和抗血管生成等的作用, 其主要通过降解 IKZF1 和 IKZF3 等蛋白而发挥治疗作用^[3]。但在临床实际应用过程中, LENA 的使用会受耐药的限制, 一部分 MM 患者对 LENA 的初始应答较低, 即原发性耐药, 另外长期使用 LENA 后也会出现耐药问题导致 LENA 活性减弱, 即获得性耐药。研究显示度胺类药物耐药的原因与其对 IKZF1 和 IKZF3 等底物蛋白的降解能力变弱有关^[9]。本文选取了敏感细胞株 MM.1S 和非敏感细胞株 RPMI-8226 作为研究对象^[10], 验证了 LENA 在敏感细胞株和非敏感细胞株上的表型, 结果显示 LENA 在 MM.1S 细胞上具有一定增殖抑制活性, 可下调细胞内 IKZF1 和 IKZF3 蛋白水平, 而 LENA 在 RPMI-8226 细胞上基本无增殖抑制活性与下调 IKZF1 和 IKZF3 蛋白水平的能力。由此可见, LENA 对 IKZF1 和 IKZF3 的蛋白降解能力下调与其对 MM 细胞的增殖抑制活性减弱有关, 因此寻找新的降低 IKZF1 和 IKZF3 等蛋白水平的药物成为对抗度胺类药物耐药的新方向。

TPN 可作为 NK- κ B 信号通路抑制剂发挥抗白血病^[8]和免疫调节^[11]的作用, 但尚未研究其对 MM 的抑制能力。本文发现 TPN 对 LENA 敏感和非敏感 MM 细胞增殖均有优异抑制效果, 且这一作用强于 LENA。为进一步探讨 TPN 抑制非敏感 MM 细胞增殖的作用, 本研究通过流式细胞

术检测其对 RPMI-8226 细胞周期及凋亡的影响,发现随着 TPN 处理浓度增加, RPMI-8226 细胞早期凋亡和晚期凋亡细胞总数增加,而未表现出明显周期阻滞作用,表明 TPN 通过促进细胞凋亡而起到抑制 MM 细胞增殖的作用。IKZF1 和 IKZF3 是含锌指结构的 Ikaros 家族转录因子,通过激活 IRF4 的转录,进而激活 c-Myc 形成一个转录网络,参与 MM 细胞的生存和增殖,而度胺类化合物通过降解 IKZF1 和 IKZF3 蛋白可发挥抑制 MM 细胞增殖的作用,但这一降解作用在非敏感 MM 细胞中被减弱^[4, 12]。鉴于 IKZF1 和 IKZF3 的表达与 MM 细胞增殖有关,且 IKZF1 和 IKZF3 的不完全降解是 MM 细胞对 LENA 耐药的原因,本研究通过 Western blot 法检测了 TPN 处理后细胞内 IKZF1 和 IKZF3 的表达,发现 TPN 可下调 RPMI-8226 细胞 IKZF1 和 IKZF3 蛋白的表达,通过 RT-qPCR 法验证,发现这一作用是通过减少 *IKZF1* 和 *IKZF3* 基因的转录水平而实现的。

综上所述,本研究发现 TPN 可促进 MM 的细胞凋亡,并通过影响人 MM 细胞内 *IKZF1* 和 *IKZF3* 基因转录来影响相关蛋白的表达,发挥抑制多发性骨髓瘤细胞增殖的作用,这一结果为进一步拓展 TPN 在抗 MM 方面的实际应用提供依据。除此之外,TPN 的类似物,雷公藤的主要成分之一雷公藤内酯醇已有研究报道其可通过内质网应激途径诱导 RPMI-8226 细胞凋亡^[13],我们也研究比较过雷公藤内酯醇与 TPN 抗 MM 的作用差异,发现雷公藤内酯醇也可抑制 MM 细胞内 IKZF1 和 IKZF3 的蛋白表达且作用略强于 TPN,但同时其他研究表明雷公藤的肝毒性与肾毒性主要是由雷公藤甲素而不是 TPN 带来的^[14],因此相较于雷公藤内酯醇,TPN 更适合临床安全使用。但从成药性角度来说,TPN 水溶性较低,代谢吸收较差^[7],可通过结构修饰或剂型改良以更好发挥其药理效应。

参考文献

- [1] Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2017, 3: 17046.
- [2] Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, et al. Diagnosis and management of multiple myeloma a review [J]. JAMA, 2022, 327 (5): 464-477.
- [3] Kronke J, Udeshi ND, Narla A, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells [J]. Science, 2014, 343 (6168): 301-305.
- [4] Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide [J]. Leukemia, 2012, 26 (11): 2326-2335.
- [5] 李慧杰,洪坤,李晓强,等.雷公藤内酯酮的药理活性及其机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (6): 234-240.
- [6] Zhang ML, Tan SJ, Yu D, et al. Triptonide inhibits lung cancer cell tumorigenicity by selectively attenuating the Shh-Gli1 signaling pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 365: 1-8.
- [7] Dong FL, Yang P, Wang R, et al. Triptonide acts as a novel antiproliferative cancer agent mainly through inhibition of mTOR signaling pathway [J]. Prostate, 2019, 79 (11): 1284-1293.
- [8] 李慧杰,洪坤,李晓强,等.雷公藤内酯酮对 SHI-1 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (3): 72-77.
- [9] Kronke J, Kuchenbauer F, Kull M, et al. IKZF1 expression is a prognostic marker in newly diagnosed standard-risk multiple myeloma treated with lenalidomide and intensive chemotherapy: a study of the German Myeloma Study Group (DSMM) [J]. Leukemia, 2017, 31 (6): 1363-1367.
- [10] Millrine D, Kishimoto T. A brighter side to thalidomide: its potential use in immunological disorders [J]. Trends Mol Med, 2017, 23 (4): 348-361.
- [11] Ling YJ, Ding TY, Dong FL, et al. Intravenous administration of triptonide attenuates CFA-induced pain hypersensitivity by inhibiting DRG AKT signaling pathway in mice [J]. J Pain Res, 2020, 13: 3195-3206.
- [12] Krönke J, Hurst SN, Ebert BL. Lenalidomide induces degradation of IKZF1 and IKZF3 [J]. Oncoimmunology, 2014, 3 (7): e941742.
- [13] 徐成波,郑瑞玘,廖斌,等.雷公藤内酯醇通过 CHOP/BCL-2 内质网应激途径诱导人多发性骨髓瘤细胞凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38 (7): 1274-1282.
- [14] Li XX, Du FY, Liu HX, et al. Investigation of the active components in Tripterygium wilfordii leading to its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162: 238-243.

(收稿日期: 2022-12-16; 修回日期: 2023-03-28)

注射用丹参多酚酸对缺氧所致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究

陈璐¹, 聂永伟², 张燕欣^{3, 4}, 姚宇晴¹, 万梅绪^{3, 4}, 李德坤^{3, 4*}, 鞠爱春^{3, 4*} (1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 南开大学医学院, 天津 300071; 3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410; 4. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410)

摘要: **目的** 探讨注射用丹参多酚酸 (SAFI) 对氧糖剥夺损伤人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的保护作用及其机制。**方法** 采用氧糖剥夺 (OGD) 方法构建体外 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤模型, 通过 CCK-8 法检测缺氧 6、8、10 h 后 SH-SY5Y 细胞的存活率, 评估细胞损伤程度; 采用 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 染色比较各组细胞的增殖能力; 采用 Western blot 法和免疫荧光标记法检测丝裂原活化蛋白激酶的激酶 (MEK1/2)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2) 表达水平的变化。**结果** SH-SY5Y 细胞缺氧 6、8、10 h 后, 细胞存活率分别为 (64.76±0.10)%、(62.94±6.06)%、(60.90±1.33)%; 与模型组相比给予 SAFI 后细胞生存率明显升高。EdU 染色结果显示, 与正常组比较, 模型组 SH-SY5Y 细胞中 EdU 阳性细胞数减少 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 给予 SAFI 后 SH-SY5Y 细胞中 EdU 阳性细胞数明显增加 ($P < 0.001$)。Western blot 和免疫荧光实验结果显示, 与模型组相比, 给予 SAFI 后 SH-SY5Y 细胞内 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白磷酸化水平明显升高 ($P < 0.01$)。**结论** 注射用丹参多酚酸对人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 缺氧损伤具有保护作用, 其机制可能与激活 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路, 调节 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白磷酸化水平相关。

关键词: 注射用丹参多酚酸; 丝裂原活化蛋白激酶的激酶; 细胞外信号调节激酶; 细胞增殖; 神经保护

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1502-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.017

Protective effect of salvianolic acid for injection on hypoxia-induced injury of SH-SY5Y cells and related mechanism

CHEN Lu¹, NIE Yong-wei², ZHANG Yan-xin^{3, 4}, YAO Yu-qing¹, WAN Mei-xu^{3, 4}, LI De-kun^{3, 4*}, JU Ai-chun^{3, 4*} (1. Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200; 2. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071; 3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410; 4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410)

Abstract: Objective To determine the protective effect of salvianolic acid for injection (SAFI) on human neuroblastoma SH-SY5Y cells injured by oxygen-glucose deprivation and related mechanism.

Methods The hypoxia injury model of SH-SY5Y cells in vitro was established by oxygen and glucose deprivation (OGD) method. The survival rate of SH-SY5Y cells after the hypoxia for 6, 8 and 10 h was detected by CCK-8 method to evaluate the degree of cell injury. The proliferation ability of cells in each group was compared with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining. The expression levels of mitogen-activated protein kinase (MEK1/2) and extracellular regulated protein kinase (ERK1/2) were detected by

基金项目: 天津市科技重大专项与工程“注射用丹参多酚酸临床再评价研究”(No.18ZXXYSY00120)。

作者简介: 陈璐, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药生产与质量控制, email: 13624832432@163.com ***通信作者:** 李德坤, 男, 高级工程师, 硕士, 主要从事中药工艺、质量控制、中药药理及药物警戒研究, email: lidekun@tasly.com; 鞠爱春, 男, 正高级工程师, 硕士, 主要从事中药注射剂工艺及质量控制研究, email: juach@tasly.com

Western blot and immunofluorescence labeling. **Results** The cell survival rates of SH-SY5Y cells were $(64.76 \pm 0.10)\%$, $(62.94 \pm 6.06)\%$ and $(60.90 \pm 1.33)\%$ after the hypoxia for 6, 8 and 10 h, respectively. Compared with the model group, the cell survival rate was significantly increased after the SAFI treatment. Compared with the normal group, EdU staining showed that the number of EdU positive cells in SH-SY5Y cells in the model group decreased ($P < 0.001$). Compared with the model group, the number of EdU positive cells in SH-SY5Y cells increased significantly after the SAFI treatment ($P < 0.001$). Compared with the model group, Western blot and immunofluorescence showed that the phosphorylation levels of MEK1/2 and ERK1/2 proteins in SH-SY5Y cells were significantly increased after the SAFI treatment ($P < 0.01$). **Conclusion** SAFI can protect against hypoxia injury of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, whose mechanism may be related to the activation of Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways and the regulation of MEK1/2 and ERK1/2 protein phosphorylation levels.

Key words: salvianolic acid for injection; mitogen-activated protein kinase kinase; extracellular signal-regulated kinase; cell proliferation; neuroprotection

脑血管疾病以高发病率、高致残率、高死亡率和复发率为特点, 给人们的健康和生活造成严重的危害和影响, 已经成为世界各国都需要面对的重要公共卫生问题^[1-2]。脑缺血是由于脑血管阻塞或爆裂导致局部脑组织缺血性坏死, 随着研究的不断深入, 目前针对脑缺血的主要病理机制集中在能量衰竭、细胞内离子稳态失衡、神经炎症和神经细胞凋亡等方面, 各种致病因素相互关联, 最终导致大脑生理机能发生障碍。在脑缺血应激状态下, 神经细胞随着缺血时间的延长开始凋亡, 导致炎症反应增加, 使病情进一步加重, 因此可通过保护和修复神经细胞来减轻脑缺血损伤^[3]。

WNK2 激酶是主要在大脑神经元中显著表达的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[4-5], 参与调控 Ras/Raf/ 丝裂原活化蛋白激酶的激酶 (MEK1/2) / 细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 信号通路, 该信号通路还可被细胞因子、神经递质和生长因子等多种刺激所激活, 参与调节细胞的生理功能, 与中枢神经系统疾病的发病机制和病理过程密切相关^[6]。在脑缺血缺氧过程中该信号通路被激活, 上游 MEK1/2 刺激使下游 ERK1/2 活化并进入细胞核, 促进相关转录因子的磷酸化, 进而调控基因的表达, 通过影响细胞周期机制来调节细胞增殖、分化和凋亡等^[7]。

注射用丹参多酚酸 (SAFI) 是提纯丹参中水溶性酚酸类有效成分而制成的冻干粉针剂^[8], 在临床上用于轻中度脑梗死的治疗, 具有明确的抗脑缺血损伤作用, 通过发挥抗炎、抗氧化应激、神经营养和保护、促进神经再生等药理作用, 使

神经功能缺损症状得到明显改善, 其中神经保护的作用机制主要有改善血流动力学、抑制氧化应激和保护血脑屏障^[9]。

目前, 关于 SAFI 与 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路的关系尚不明确, 本研究在既往研究基础上进一步探讨 SAFI 通过促进细胞增殖发挥脑保护的作用机制, 为其更好地应用于临床脑血管疾病的治疗提供依据。

1 材料

1.1 仪器

CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); 缺氧小室 (美国 Billups-Rothenberg 公司); 细胞计数仪 (美国 Invitrogen 公司); Infinite M200 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); CKX53 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); ST16R 台式高速冷冻离心机 (美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 试剂

SAFI (天津天士力之骄药业有限公司, 每只装 130 mg, 含丹酚酸 100 mg, 批号: 20200609); DMEM/F12 无糖培养基 (Procell); 胎牛血清 (HYCLONE); DMEM/F12 高糖培养基、0.25% 胰蛋白酶、青霉素、链霉素溶液、磷酸缓冲盐溶液 (PBS), (Gibco); CCK-8 试剂 (日本同仁); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (Thermo); WNK463 (TargetMol, 批号: 140692); EdU-647 细胞增殖检测试剂盒 (碧云天); ERK1/2 Polyclonal 抗体、MEK1/2 Polyclonal 抗体 (Proteintech); Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)、Phospho-MEK1 (Ser298) (Cell Signaling Technology)。

2 方法

2.1 细胞培养

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自于武汉普诺赛生命科技有限公司, 用含 15% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM/F12 高糖培养基培养, 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养使细胞贴壁生长, 隔日换液, 每 3~4 日进行一次传代, 以满足实验需要。

2.2 CCK-8 法检测 SAFI 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

SH-SY5Y 细胞设置正常组和不同浓度 SAFI 给药组, 正常组仅做换液处理, 不同浓度 SAFI 给药组则将 DMEM/F12 高糖培养基配制的含相应浓度的 SAFI 药液加入细胞中, 每组均设置空白孔和复孔, 正常培养 24 h 后, 弃去原培养液并用 PBS 清洗, 每孔加入 DMEM/F12 高糖培养基稀释的 CCK-8 液体 100 μL, 避光孵育 1.5 h, 450 nm 波长下测定吸光度值, 计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = [(给药组吸光度值 - 空白孔吸光度值) / (正常组吸光度值 - 空白孔吸光度值)] × 100%。

2.3 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞的保护作用

2.3.1 氧糖剥夺模型 (OGD) 的建立

对数期的 SH-SY5Y 细胞以 1×10^5 个 · mL⁻¹ 接种至 96 孔板或培养皿中, 细胞贴壁生长到合适密度时进行后续实验。弃去原培养液并用 PBS 清洗, 以排除葡萄糖和胎牛血清对实验结果的影响, 更换为只含 1% 双抗不含血清 DMEM/F12 的无糖培养基, 于 92%N₂、5%CO₂ 和 3%O₂ 培养小室中构建缺氧模型。

2.3.2 分组及给药

SH-SY5Y 细胞随机分为正常组 (Control)、模型组 (Model) 和 SAFI (0.013、0.026、0.052 mg · mL⁻¹) 组。正常组仅做换液处理, 模型组更换为 DMEM/F12 无糖培养基, SAFI 给药组则将无糖 DMEM/F12 培养基配制的含相应浓度的 SAFI 药液加入细胞中。

2.3.3 CCK-8 法检测 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞活力的影响

分别缺氧 6、8、10 h 后通过 CCK-8 法检测并计算各组细胞的存活率, 细胞存活率 (%) = [(用药组吸光度值 - 空白孔吸光度值) / (正常组吸光度值 - 空白孔吸光度值)] × 100%。

2.3.4 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞形态的影响

进行缺氧 6 h 处理后在倒置显微镜下观察形态变化并拍照记录。

2.4 EdU 染色法检测 SAFI 对 SH-SY5Y 细胞的增殖能力的影响

已贴壁于 24 孔板的 SH-SY5Y 细胞进行缺氧

6 h 处理, 并按照 EdU-647 细胞增殖检测试剂盒说明书步骤进行实验操作, 荧光显微镜下观察并采集图像, 计算, EdU 阳性细胞率 (%) = (阳性细胞数 / 总细胞数) × 100%。

2.5 Western blot 检测 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞中 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平的影响

设置正常组、模型组、WNK463 组和 SAFI (0.013、0.026 和 0.052 mg · mL⁻¹) 组, 通过前期筛选出的最佳时间条件进行实验, 模型组和各给药组进行缺氧 6 h 处理。提取细胞蛋白并采用 BCA 法测定浓度, 变性处理的蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至聚偏二氟乙烯膜上, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 1 h, 分别加入对应一抗 4℃ 孵育过夜。次日用洗膜缓冲液 (TBST) 清洗, 加入二抗室温摇床孵育 1 h, ECL 法显影成像。运用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达量。

2.6 免疫荧光法检测 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞中 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平的影响

设置正常组、模型组、SAFI (0.026、0.052 mg · mL⁻¹) 组和 WNK463 组, 按照以下步骤进行实验。将已爬好细胞的玻片用 PBS 洗 3 次; 4% 多聚甲醛固定液常温固定 15 min, PBS 清洗 3 次; 0.1% Triton X-100 室温通透 10 min, PBS 清洗 3 次; 滴加适量山羊血清将样片完全覆没在室温下封闭 1 h; 滴加稀释后的一抗 4℃ 孵育过夜; 次日用 PBST 清洗样片, 滴加荧光素标记的二抗, 室温避光孵育 1 h; 用 PBST 清洗样片, 滴加 100 μL 的 DAPI 室温避光孵育 5 min, 再次清洗样片; 最后滴加封片剂进行封片, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析并做图, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SAFI 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

以正常组 SH-SY5Y 细胞活力为 100% 计, 0.005 ~ 0.08 mg · mL⁻¹ 的 SAFI 作用于 SH-SY5Y 细胞后, 细胞活力均在 100% 左右 (见表 1), 说明 0.005 ~ 0.08 mg · mL⁻¹ 内的 SAFI 对正常 SH-SY5Y 细胞无抑制作用。

表 1 SAFI 对正常 SH-SY5Y 细胞活力的影响

Tab 1 Effect of SAFI on viability of normal SH-SY5Y cells

分组	存活率 /%
正常组	100
SAFI 0.0025 mg · mL ⁻¹	97.81 ± 2.71
SAFI 0.005 mg · mL ⁻¹	99.23 ± 2.18
SAFI 0.01 mg · mL ⁻¹	101.24 ± 3.52
SAFI 0.02 mg · mL ⁻¹	100.69 ± 1.13
SAFI 0.04 mg · mL ⁻¹	99.90 ± 1.41
SAFI 0.08 mg · mL ⁻¹	105.42 ± 0.98**
SAFI 0.16 mg · mL ⁻¹	92.69 ± 1.69
SAFI 0.32 mg · mL ⁻¹	88.79 ± 2.85

注：与正常组相比，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ** $P < 0.01$ 。

3.2 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞活力的影响

以正常组 SH-SY5Y 细胞活力为 100% 计，缺氧 6、8、10 h 后模型组细胞存活率在 60% 左右，且随造模时间延长，存活率降低，认为造模稳定。与模型组相比，各给药组细胞存活率随着 SAFI 浓度增大而明显升高，说明 SAFI 可改善 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤程度，且随着剂量增加效果更好，结果见表 2。

3.3 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞形态的影响

正常组 SH-SY5Y 细胞具有树枝状细胞质突起，呈现放射状不规则多边形。模型组细胞胞体则出现突起变短皱缩现象，部分细胞呈现球形，与正常组相比细胞密度有所减少。与模型组相比，不同浓度 SAFI 给药组的细胞突起增多，皱缩现象明显改善（见图 1）。

3.4 SAFI 对 SH-SY5Y 细胞增殖能力的影响

与正常组比较，模型组 SH-SY5Y 细胞中 EdU 阳性细胞数明显降低（ $P < 0.001$ ），与模型组比较，SAFI（0.013、0.026 和 0.052 mg · mL⁻¹）组和 WNK463 组 SH-SY5Y 细胞中 EdU 阳性细胞数明显增加（ $P < 0.001$ ，见图 2）。

3.5 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞中 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平的影响

正常组、模型组、WNK463 组和 SAFI（0.013、0.026 和 0.052 mg · mL⁻¹）组细胞内 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达无明显变化。与正常组相比，模型组 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达减少（ $P < 0.001$ ）；与模型组相比，WNK463 组 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达量升高，SAFI（0.013、0.026 和 0.052 mg · mL⁻¹）组中 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达量随着 SAFI 剂量增加而升高（ $P < 0.01$ ）。故认为 SAFI 是通过调节 SH-SY5Y 细胞内 MEK1/2 和 ERK1/2 磷酸化水平，进而发挥减轻缺血性神经

表 2 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞活力的影响

Tab 2 Effect of SAFI on viability of SH-SY5Y cells injured by hypoxia

分组	存活率 /%		
	缺氧 6 h	缺氧 8 h	缺氧 10 h
模型组	64.76 ± 0.10	62.94 ± 6.06	60.90 ± 1.33
SAFI 0.013 mg · mL ⁻¹	84.47 ± 3.33***	72.82 ± 6.56*	62.94 ± 10.60
SAFI 0.026 mg · mL ⁻¹	88.87 ± 2.36***	73.16 ± 0.87*	67.83 ± 5.29
SAFI 0.052 mg · mL ⁻¹	91.34 ± 1.90***	79.28 ± 2.55**	74.42 ± 0.40*

注：与模型组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

损伤的作用（见图 3）。

3.6 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞中 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平的影响

正常组、模型组、SAFI（0.026 和 0.052 mg · mL⁻¹）组和 WNK463 组细胞内 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达无明显差异。与正常组比较，模型组 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达量明显下降；与模型组比较，SAFI（0.026、0.052 mg · mL⁻¹）组和 WNK463 组中的 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达量明显升高。不同浓度 SAFI 处理大鼠 SH-SY5Y 细胞免疫荧光结果与 Western blot 检测结果趋于一致，说明 SAFI 可以通过上调神经细胞中 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白的表达水平，发挥神经保护作用（见图 4）。

4 讨论

血管在颈部或大脑中形成凝块被阻塞，造成血流量减少、脑组织血氧供应不足所致损伤称之为脑缺血，应尽早通过药物溶栓或手术机械手段使血流恢复，以改善缺血区的病理损伤，然而在治疗的同时也给组织以及神经系统造成了一定损害^[10]。现代医学研究发现，相关中药单体及其复方所含有有效成分的化学结构类型复杂多样，可通过不同的药理作用机制，多靶点、多途径参与脑缺血的病理过程。SAFI 是以丹参为原料，应用现代工艺提取分离水溶性酚酸类成分研制而成的中药注射剂，能通过抑制细胞凋亡、促进细胞存活和增殖，从而发挥改善缺血性脑损伤的作用，临床治疗效果显著^[11-13]。

细胞增殖情况能较好地反映给药对细胞的影响，检测方法目前主要分为代谢活性检测（二甲氧喹磺比色法、四唑单钠盐法、噻唑蓝比色法、CCK-8 法等）、DNA 合成检测（胸腺嘧啶核苷掺入法、5-溴脱氧尿嘧啶核苷法和 EdU 法）、细胞增殖相关抗原检测等^[14]。本实验中 CCK-8 检测结果显示，氧糖剥夺导致细胞损伤，活力降低，



图 1 各组 SH-SY5Y 细胞形态变化 (×100)

Fig 1 Morphological changes of SH-SY5Y cells in each group (×100)

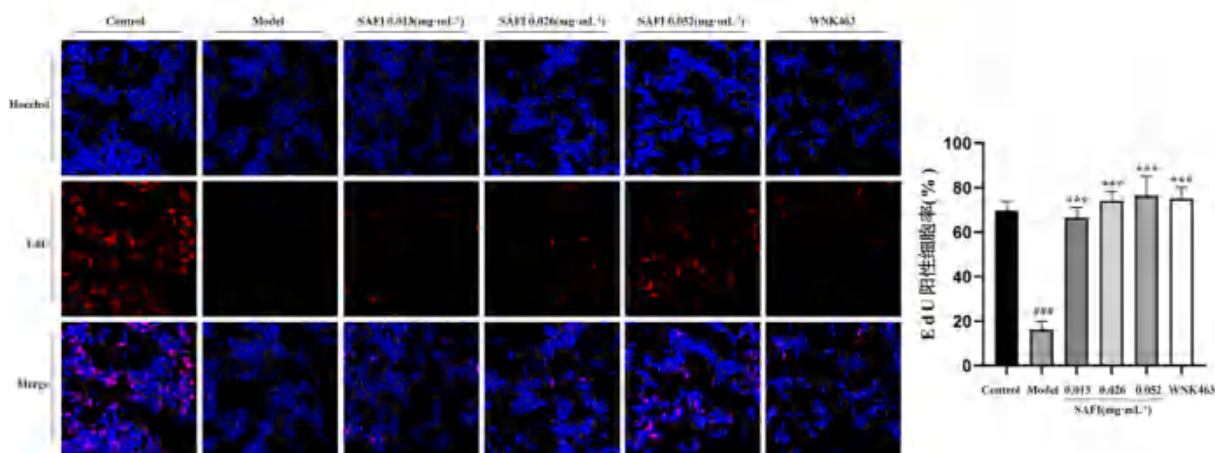


图 2 SAFI 对 SH-SY5Y 细胞增殖能力的影响

Fig 2 Effect of SAFI on the proliferation of SH-SY5Y cells

注: 与正常组相比, $^{###}P < 0.001$; 与模型组相比, $^{***}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, $^{###}P < 0.001$; compared with the model group, $^{***}P < 0.001$ 。

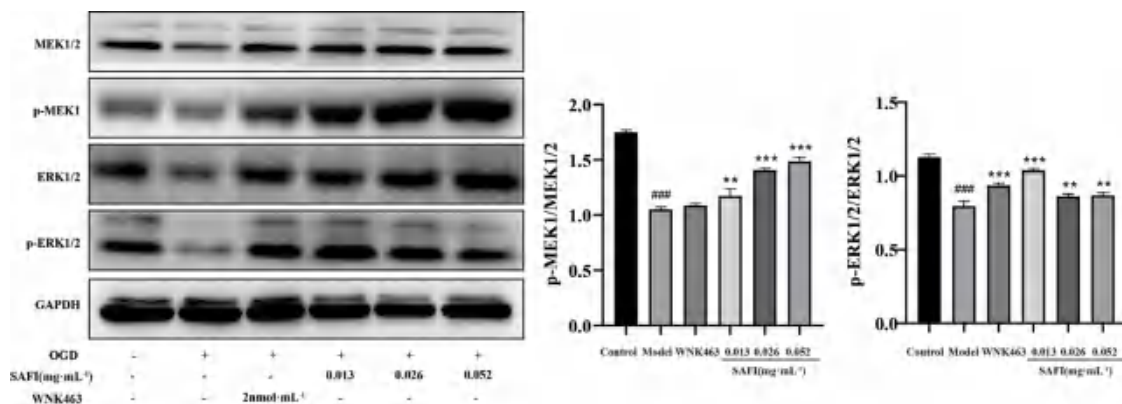


图 3 SAFI 对缺氧损伤 SH-SY5Y 细胞中 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平的影响

Fig 3 Effect of SAFI on the expression and phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 in SH-SY5Y cells after hypoxia injury

注: 与正常组相比, $^{###}P < 0.001$; 与模型组相比, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

与模型组相比, SAFI 各剂量组细胞的存活率升高。EdU 染色结果表明, OGD 后 SH-SY5Y 神经细胞的增殖能力下降, EdU 阳性细胞数减少, 用含 SAFI 培养基处理后, SH-SY5Y 神经细胞的增殖能力升高, EdU 阳性细胞数增多。因此推测 SAFI 可能通过促进 SH-SY5Y 神经细胞增殖, 改善其缺氧损伤程度。

ERK 蛋白是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族中的重要成分, 主要以化学结构高度同源

的 ERK1 和 ERK2 两种形式出现, 在细胞外的生长因子、细胞因子和神经递质等多种刺激下, 磷酸化 ERK1/2 从胞浆进入细胞核, 激活转录因子调节相关基因转录, 使蛋白表达或活性改变, 进而参与细胞增殖、分化、代谢和调亡等过程^[15]。WNK463 是 WNK2 激酶的特异性抑制剂^[16-18], 研究^[19-20]发现在脑缺血早期, Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路可受到各种物质刺激进而被激活, WNK2 作为上游因子之一可通过激活该条信号通路调节

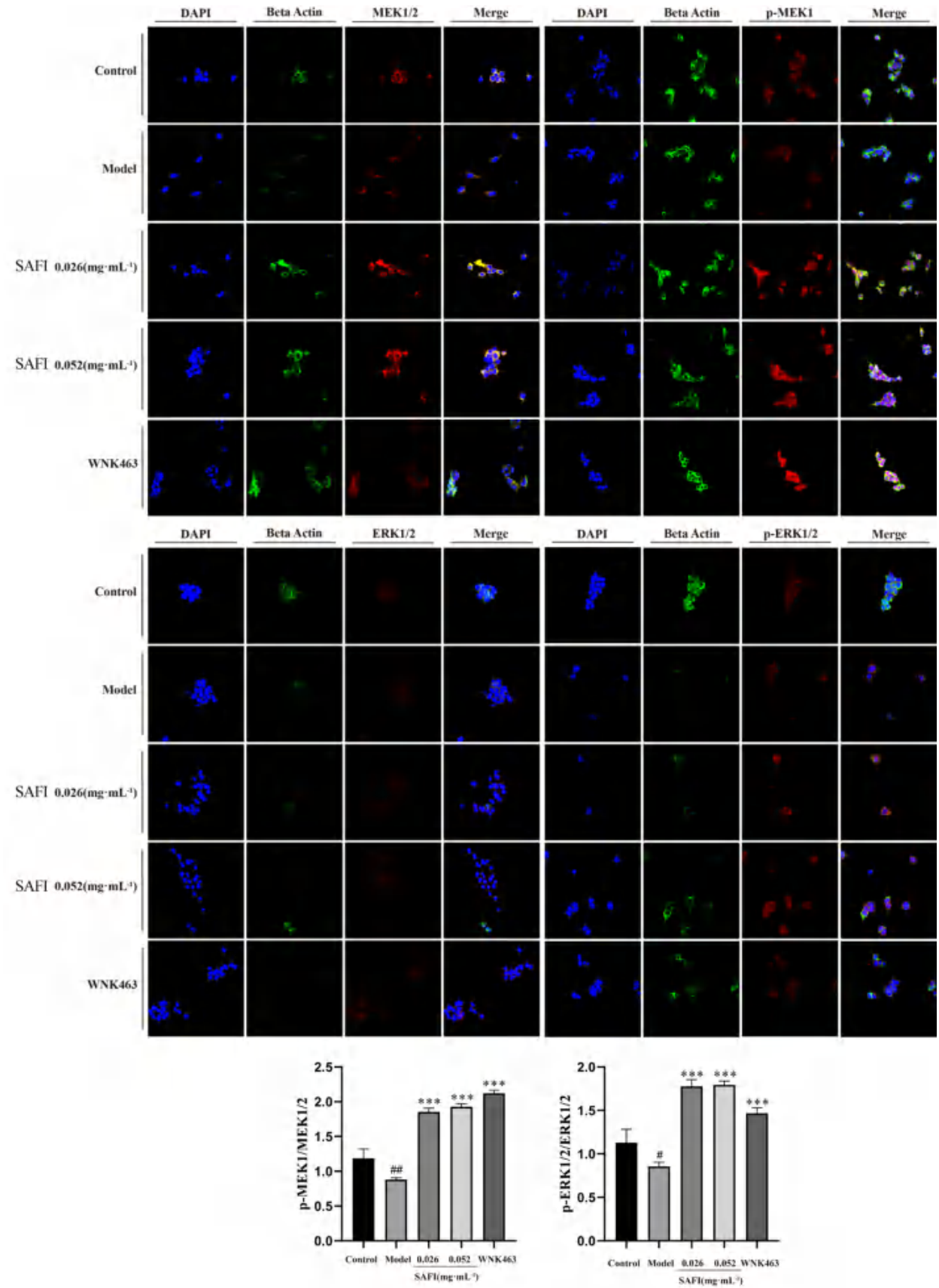


图 4 SAFI 对 SH-SY5Y 细胞中 MEK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平变化的影响

Fig 4 Effect of SAFI on MEK1/2 and ERK1/2 protein expression and phosphorylation level in SH-SY5Y cells

注：与正常组相比，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组相比，^{***} $P < 0.001$ 。

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

神经细胞的多种生理功能, 以此减轻缺血性损伤进而保护脑神经。Western blot 和免疫荧光法实验对 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达的检测分析表明, 缺氧损伤时, p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平降低, 不同浓度 SAFI 给药组 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平升高。因此推测 SAFI 可能通过作用于 WNK2 激酶靶点, 激活 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路, 调节 p-MEK1 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平促进细胞增殖, 进而修复脑损伤发挥脑保护的药理作用。

在中枢神经系统中 ERK1/2 与神经细胞功能调节和发育相关, 被保护性因子激活的 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路, 通过减轻细胞钙超载改善缺血后脑损伤^[21]。不同的刺激和多种复杂的病理因素使得 ERK 蛋白具有“双重”作用, 大脑内信号通路网络复杂多样, 各类转导途径互相影响产生级联效应, 共同调节细胞的生物学功能, 具体药理作用机制和与其他信号通路之间的相互作用还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Xu M, Wu R, Liang Y, et al. Protective effect and mechanism of Qishiwei Zhenzhu pills on cerebral ischemia-reperfusion injury via blood-brain barrier and metabolomics [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110723.
- [2] Broussalis E, Trinka E, Killer M, et al. Foundation review: current therapies in ischemic stroke. Part B. Future candidates in stroke therapy and experimental studies [J]. Drug Discov Today, 2012, 17 (13/14): 671-684.
- [3] 张艾嘉, 王爽, 王萍, 等. 缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (5): 227-240.
- [4] McCormick JA, Ellison DH. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions [J]. Physiol Rev, 2011, 91 (1): 177-219.
- [5] Moniz S, Verissimo F, Matos P, et al. Protein kinase WNK2 inhibits cell proliferation by negatively modulating the activation of MEK1/ERK1/2 [J]. Oncogene, 2007, 26 (41): 6071-6081.
- [6] 李小娟, 张智博. MEK/ERK 信号通路与脑缺血再灌注损伤 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13 (9): 1793-1796.
- [7] 王大芳, 孙莉萍. ERK 通路与脑损伤的关系 [J]. 河北联合大学学报 (医学版), 2013, 15 (4): 486-488.
- [8] 岳洪水, 张磊, 李海燕. 一测多评法在注射用丹参多酚酸质量控制中的研究 [J]. 中南药学, 2019, 17 (12): 2149-2153.
- [9] 顾文, 王荔. 注射用丹参多酚酸对神经系统疾病药理作用的研究进展 [J]. 药物评价与研究, 2020, 43 (6): 1183-1188.
- [10] Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS. Ischemia-reperfusion injury in stroke [J]. Interv Neurol, 2013, 1 (3/4): 185-199.
- [11] 于潇, 王贵阳, 侯宇东, 等. 中药抗脑缺血再灌注损伤的作用及其机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52 (5): 1471-1484.
- [12] 曹自为, 张嵘, 李蒙, 等. 丹参多酚酸通过 SIRT1/HMGB1 路径改善大鼠脑缺血/再灌注损伤的机制研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2021, 38 (1): 4-8.
- [13] 刘文杰, 袁庆, 张彤, 等. 注射用丹参多酚酸对周细胞增殖与迁移和凋亡的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (1): 27-30.
- [14] 谭亚琦, 何焱玲. 细胞增殖的检测方法 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45 (12): 6-8, 5.
- [15] 许瑾, 齐艳, 孙支唐. ERK 蛋白在神经退行性疾病中的研究 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2022, 30 (2): 125-128.
- [16] Amarnath JN, Fulbabu SM, Parimal K. A comparative study of structural and conformational properties of WNK kinase isoforms bound to an inhibitor: insights from molecular dynamic simulations [J]. J Biomol Struct Dyn, 2020, 40 (3): 1400-1415.
- [17] Amarnath JN, Parimal K. Investigating specificity of the anti-hypertensive inhibitor WNK463 against With-No-Lysine kinase family isoforms via multiscale simulations [J]. J Biomol Struct Dyn, 2020, 38 (5): 1306-1321.
- [18] Yamada K, Park HM, Rigel DF, et al. Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12 (11): 896-903.
- [19] Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke [J]. J Neurosci Res, 2008, 86 (8): 1659-1669.
- [20] Zhu XW, Lee H, Raina AK, et al. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease [J]. Neuro-Signals, 2002, 11 (5): 270-281.
- [21] 严洪新, 徐恩. 细胞外信号调节激酶与缺血性脑卒中 [J]. 现代医学, 2010, 38 (4): 427-430.

(收稿日期: 2023-02-15; 修回日期: 2023-03-23)

基于网络药理学和体外实验研究橙皮苷抗轮状病毒的作用机制

周玉晶¹, 钱余培¹, 袁月¹, 杨思雁¹, 宋丽军^{1, 2*} (1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808; 2. 广东医科大学天然药物研发重点实验室, 广东 湛江 524023)

摘要: **目的** 基于网络药理学和体外实验揭示橙皮苷抗轮状病毒(RV)的作用及机制。**方法** 采用RV感染Caco-2、MA104两种不同细胞株评价橙皮苷的抗RV吸附、直接抑制RV以及抗RV生物合成作用;利用TCMSP、GeneCards、SwissTarget Prediction、OMIM以及DisGeNET获取橙皮苷和RV的潜在靶点,得到橙皮苷-RV交集靶点后进行STRING分析,导入Cytoscape后得到抗RV的关键靶点,然后进行KEGG富集分析并构建靶点-通路图;利用AutoDock Vina进行分子对接,预测橙皮苷与关键作用靶点的结合度;RT-qPCR法检测PIK3CA、Akt1 mRNA的表达;Western blot检测细胞中PI3K、Akt蛋白表达水平。**结果** 细胞实验结果显示,橙皮苷具有抗RV生物合成作用,无抗RV吸附和直接抑制RV作用。通过网络药理学分析,最终获得橙皮苷的潜在靶点361个,RV相关靶点445个,共同靶点38个。从蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络中鉴定橙皮苷抗RV的核心靶点为CASP3、EGFR、FN1、PIK3CA等。分子对接结果显示橙皮苷和关键靶标有较好的结合能力。RT-qPCR表明橙皮苷各药物组浓度均可上调PIK3CA、Akt1 mRNA的表达。Western blot结果表明橙皮苷显著上调细胞p-PI3K、p-Akt蛋白的表达,而PI3K和Akt蛋白表达量无明显变化。**结论** 通过网络药理学分析、分子对接验证和实验研究,表明橙皮苷不仅具有抗RV生物合成作用,而且可能通过调控PI3K/Akt信号通路发挥抗RV的作用。

关键词: 橙皮苷; 轮状病毒; 网络药理学; 分子对接; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1509-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.018

Anti-rotavirus mechanism of hesperidin based on network pharmacology and in vitro experiments

ZHOU Yu-jing¹, QIAN Yu-pei¹, YUAN Yue¹, YANG Si-yan¹, SONG Li-jun^{1, 2*} (1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan Guangdong 523808; 2. Guangdong Key Laboratory of Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong 524023)

Abstract: Objective To determine the action and mechanism of hesperidin against rotavirus (RV) based on network pharmacology and in vitro experiments. **Methods** Two cell lines, RV-infected Caco-2 and MA104, were used to evaluate the inhibition of RV attachment, direct inhibition of RV and inhibition of RV replication effects of hesperidin. TCMSP, GeneCards, SwissTarget Prediction, OMIM and DisGeNET were used to obtain the potential targets of hesperidin and RV, and hesperidin-RV crossover targets were analyzed by STRING and imported into Cytoscape to obtain the key targets against RV. KEGG enrichment analysis was performed and the target-pathway map was established. Molecular docking was performed with AutoDock Vina to predict the binding of hesperidin to the key targets of action. The expression of PIK3CA and Akt1 mRNA was detected by RT-qPCR. The expression levels of PI3K and Akt proteins in the cells were detected by Western blot. **Results** The cellular assay showed that hesperidin had anti-RV replication effect without anti-RV adsorption

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No.81473401, No.81973548);湛江市科技项目(No.2021B01139);广东省高校创新团队项目(No.2022KCXTD011);广东医科大学学科重点项目(No.4SG22009G)。

作者简介: 周玉晶,女,硕士,主要从事中药药理研究, email: zyj_yjs927@163.com *通信作者: 宋丽军,女,教授,主要从事中药药理研究, email: songlijun6981@126.com

and direct inhibition of RV. The network pharmacological analysis revealed 361 potential targets of hesperidin, 445 RV-related targets and 38 common targets. The core targets of hesperidin against RV were identified from the protein-protein interaction (PPI) network (CASP3, EGFR, FN1, and PIK3CA). The molecular docking showed that hesperidin and key targets had good binding ability. RT-qPCR showed that hesperidin upregulated the expression of *PIK3CA* and *Akt1* mRNA at all concentrations. Western blot showed that hesperidin significantly upregulated the expression of p-PI3K and p-Akt protein, while the expression of PI3K and Akt protein did not change obviously.

Conclusion Based on network pharmacology, molecular docking validation and experimental studies, hesperidin not only has anti-RV replication effect, but also exerts anti-RV effect through regulating PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: hesperidin; rotavirus; network pharmacology; molecular docking; PI3K/Akt signaling pathway

轮状病毒 (rotavirus, RV) 属于呼肠孤病毒家族, 是婴幼儿腹泻的重要病原体, 全球每年有超过两亿 5 岁以下的儿童感染 RV, 死亡人数超过 20 万^[1-2]。目前, 已有两种 RV 疫苗 (Rotarix 和 Rotateq) 在全球范围内应用, 但 RV 病毒株变异较快, 其预防作用有限^[3]。目前临床上尚无针对 RV 的特殊治疗药物, 主要采用补液、补充电解质和营养支持来预防或纠正严重的脱水和代谢紊乱等症状^[4]。因此, 亟需发现治疗 RV 的有效药物。

橙皮苷是一种二氢黄酮类衍生物, 具有二氢黄酮类氧葡萄糖苷结构。有研究表明橙皮苷具有抗单纯性疱疹性病毒、骨髓灰质炎、抗水疱性口炎病毒等作用^[5], 也有研究橙皮苷抗 RV 作用的报道^[6-7], 但其研究较浅, 仅采用了 RV 感染 MA104 一种细胞模型, 缺乏相关的机制研究。

近年来, 随着系统生物学、生物信息学以及高通量组织学的迅速发展, 网络药理学越来越多地用于药物作用及机制研究^[8-9]。本研究拟采用 RV 感染 Caco-2、MA104 两种细胞模型分析橙皮苷抗 RV 作用, 并利用网络药理学预测橙皮苷抗 RV 可能的作用靶点和作用通路, 结合分子对接法验证其结果的可靠性, 最后采用 RT-qPCR、Western blot 进行验证, 为全面分析橙皮苷抗 RV 的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 橙皮苷体外抗 RV 实验

1.1.1 试药 橙皮苷 (纯度: 99.8%, 上海源叶生物科技有限公司), 利巴韦林注射液 (山东鲁欣药业有限公司), 胎牛血清、高糖培养基 (美国 GIBCO 公司), 胰酶 (Solarbio 公司), 二甲基亚砜 (DMSO)、PCR 引物 (生工生物工程股份有限公司), TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司), SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR、Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR II (KitAikerui 公司),

β -Actin、PI3K、p-PI3K、p-Akt (Cell Signaling 公司), Akt (Proteintech 公司), HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗 (碧云天公司)。

1.1.2 细胞与病毒 MA104 细胞系购自中山大学细胞库、Caco-2 细胞系购自武汉大学细胞库、RV-Wa 病毒株由本实验室保存。

1.1.3 仪器 恒温箱 (Thermo Scientific 公司), 高压灭菌锅 (日本 Sany 公司), 洁净操作台 SIK-202 型 (安徽蚌埠净化设备厂), 倒置光学显微镜 CKX41 (日本 OLYMPUS 公司), 酶联免疫检测仪 DG3022A (Gene Company Limited 公司), 核酸蛋白测定仪 (德国 Eppendorf 公司), 二氧化碳孵育箱 (美国 Thermo 公司), Azure C300 化学发光成像系统 (美国 Azure Biosystems 公司)。

1.1.4 RV 的培养、扩增与滴度测定 接种病毒后的 MA104 细胞置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中常规培养, 直至在显微镜下观察到细胞出现的细胞病变效应 (CPE) 达到+++时, 取出细胞培养瓶置于-20℃冰箱过夜。反复冻融 3 次后收集于离心管中, 离心并分装, 标记后-80℃保存。

将 RV 病毒液分别稀释成 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 系列浓度, 分别感染 MA104 细胞, 当显微镜下观察到最低稀释度的 RV 病毒液的孔内不再出现 CPE 时, 记录下每一个稀释度出现 CPE 的孔数。按照 Reed and Muench 方法计算出病毒的 TCID₅₀。

1.1.5 橙皮苷药物毒性测定 Caco-2、MA104 细胞以 8×10⁴ 个·mL⁻¹ 的细胞密度孵育至细胞长成单层, 加入不同浓度的橙皮苷 (3.125 ~ 800 μmol·L⁻¹), 培养 48 h 后在酶标仪上检测 490 nm 波长下每孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞的存活率。细胞存活率 (%) = 药物组平均 A 值 / 正常对照组平均 A 值 × 100%。

1.1.6 橙皮苷抗 RV 作用 ① 抗 RV 吸附作用:

用不同浓度橙皮苷预处理细胞 2 h, 然后用 RV 病毒液感染细胞, 孵育 2 h, 将病毒吸出, 加入细胞维持液, 37℃、5%CO₂ 孵育 48 h。② 直接抑制 RV 作用: 橙皮苷药液与 RV 病毒液等体积混合作用 2 h, 加入到细胞中孵育 2 h, 再加入细胞维持液, 37℃、5%CO₂ 孵育 48 h。③ 抗 RV 生物合成作用: RV 病毒液感染细胞 2 h, 将病毒液吸出, 加入橙皮苷药液, 病毒对照组只加入细胞维持液。37℃、5%CO₂ 孵育 48 h。

通过多功能酶标仪进行 MTT 检测, 计算病毒抑制率。计算半数有效浓度 (EC_{50})、半数毒性浓度 (TC_{50}) 以及治疗指数 (TI)。重复实验 3 次。病毒抑制率 (%) = (药物组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) / (正常细胞对照组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) × 100%, $TI = TC_{50}/EC_{50}$ 。

1.1.7 统计分析 采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析, t 检验比较两组对照实验, 单因素方差分析法比较多个样本的均值。实验结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.2 网络药理学

1.2.1 橙皮苷相关靶点的获取 通过 TCMSP^[10] (<https://tcmispw.com/tcmisp.php>)、PharmMapper^[11] (<https://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>) 及 SwissTargetPrediction^[12] (<https://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库检索橙皮苷的作用靶点。利用 UniProt^[13] (<https://www.uniprot.org/>) 数据库将靶点名称标准化。将所有收集到的靶点进行去重, 并在 Cytoscape^[14] (<https://cytoscape.org/>) 软件中进行可视化处理, 构建 PPI 网络图。

1.2.2 RV 潜在靶点的收集 使用 OMIM^[15] (<http://omim.org/>)、DisGeNET^[16] (<https://www.disgenet.org/>) 和 GeneCards^[17] (<https://www.genecards.org/>) 数据库查找 RV 相关基因, 合并去重, 导入到 STRING^[18] (<https://cn.string-db.org/>) 数据库中, 获得 RV 潜在靶点。

1.2.3 橙皮苷治疗 RV 的交集靶点 (即潜在治疗靶点) 的筛选 通过 Venny2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 获得橙皮苷与 RV 的交集基因, 将其导入 STRING 数据库, 生成一个靶点间相互作用关系, 然后再导入 Cytoscape 数据库中进行可视化分析。

1.2.4 橙皮苷潜在靶标的 KEGG 富集分析 对交集基因及一系列相关通路进行 KEGG 富集分析, 在微生物平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 中构建富集分析气泡图, 并在 Cytoscape 软件中构建目标通路图。

1.2.5 “靶点 - 通路”网络的构建 通过文献挖掘, 对 KEGG 通路进行分析, 并利用 Cytoscape 软件构建“靶点 - 通路”网络, 获得橙皮苷抗 RV 的相关通路、靶点。

1.3 分子对接验证

为进一步阐明所选蛋白的生物活性, 将橙皮苷与关键靶点进行分子对接。目的蛋白的晶体结构来自于 PDB^[19] (<https://www.rcsb.org/>) 数据库。利用 PyMOL^[20] 和 AutoDock^[21] 软件去水, 删除活性中心的原始配体, 并使目标氢化。从 PubChem^[22] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>) 数据库中下载 2D 结构, 并使用 Chemdraw 绘制最小化橙皮苷的能量, 然后将其加载到 AutoDock 软件中, 以找到活动的口袋与橙皮苷对接后的结合能。

1.4 RT-qPCR 检测细胞中 PIK3CA、Akt1 mRNA 的表达

MA104 细胞的总 RNA 用 TRIzol 提取, 测定 RNA 浓度。随后使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR。以 GAPDH 为内参, 各组基因相对表达量的计算方法采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物序列如表 1 所示。

1.5 Western blot 检测细胞中 PI3K、Akt 蛋白的表达水平

提取细胞的总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度。以 12% SDS-PAGE 凝胶上样后并进行电泳、转膜、封闭。与一抗 β -Actin (1:1000)、PI3K (1:1000)、p-PI3K (1:1000)、Akt (1:5000)、p-Akt (1:1000) 在 4℃ 孵育过夜; 次日用 TBST 洗涤 3 次, 二抗室温孵育 1 h; 随后, 用 TBST 洗涤 3 次后, 进行显影定影并使用 Image J 软件测量灰度值。

2 结果

2.1 橙皮苷体外抗 RV 实验

2.1.1 病毒培养与扩增 如图 1 所示, 正常的 MA104 细胞在显微镜下观察为短梭形或不规则圆形, 细胞轮廓明显, 细胞间排列紧密。当 RV 感染 MA104 细胞后, 镜下观察到细胞发生空泡化, 感染末期, 细胞涨破死亡, 大量细胞飘浮在培养基中。当 CPE 为 +++~++++ 时收集病毒, 此时的病毒活性强。

2.1.2 病毒滴度测定 根据 Reed-Muench 公式计算得出 RV 的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-4.4}/100 \mu\text{L}$ 。

2.1.3 橙皮苷对不同细胞药物毒性测定 橙皮苷对 Caco-2、MA104 的细胞毒性作用如图 2 所示。结果表明, 橙皮苷在浓度 $3.125 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 均未出现细胞毒性, 细胞存活率达到 95%。

2.1.4 橙皮苷在不同细胞模型上的抗 RV 作用 一般

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

基因名称	正向引物	反向引物
<i>GAPDH</i>	CATGACCACAGTCCACGCCATC	GATGACCTTGCCACAGCCTTG
<i>PIK3CA</i>	CGGTGACTGTGTGGGACTTATTGAG	ATGTAGAGTGTGGCTGTTGAAGTGC
<i>Akt1</i>	CATCACACCCTGACCAAGACG	CCGCTCTCCATCCCTCCAAG

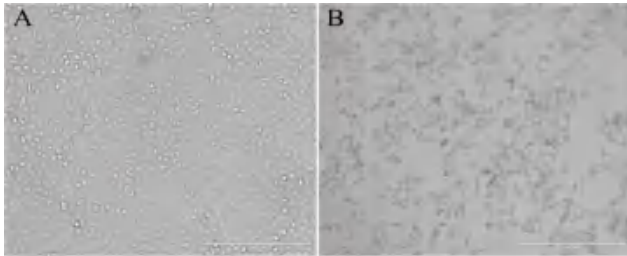


图 1 RV-Wa 株感染 MA104 细胞的病变情况

Fig 1 Lesions of MA104 cells infected with RV-Wa strain

A. 正常 MA104 细胞 (normal MA104 cells); B. Wa 株感染后的 MA104 细胞 (MA104 cells after infection with Wa strain)

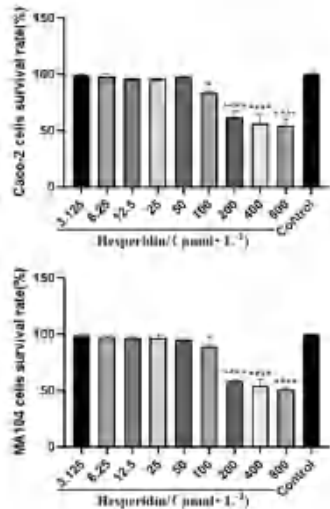


图 2 橙皮苷对 Caco-2、MA104 细胞的毒性

Fig 2 Toxicity of hesperidin to Caco-2 and MA104 cells

注 (Note): 与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{****}P < 0.0001$ (Compared with the control group, $^*P < 0.05$, $^{****}P < 0.0001$).

认为 TI 值 ≥ 2 , 证明药物有抗病毒活性, TI 值 ≥ 4 , 其抗病毒成分有深入研究价值^[23]。结果见图 3。

由图 3A 可知, 橙皮苷各药物浓度组病毒抑制率较低, 与利巴韦林阳性药物组相比, 差异无统计学意义, 表明橙皮苷无抗 RV 吸附作用。

由图 3B 可知, 橙皮苷各药物组病毒抑制率远低于利巴韦林阳性药物组, 差异有统计学意义, 表明橙皮苷无直接抑制 RV 作用。

由图 3C 可知, 在 RV 感染的 Caco-2 细胞模型上, 当橙皮苷药物浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 病毒抑制率最高, 达到了 59.48%, TI 为 15.92; 在 RV 感染的 MA104 细胞模型上, 各药物组病毒抑制率均高于利巴韦林阳性药物组, TI 为 14.64, 表明橙皮苷具有抗 RV 生物合成作用。

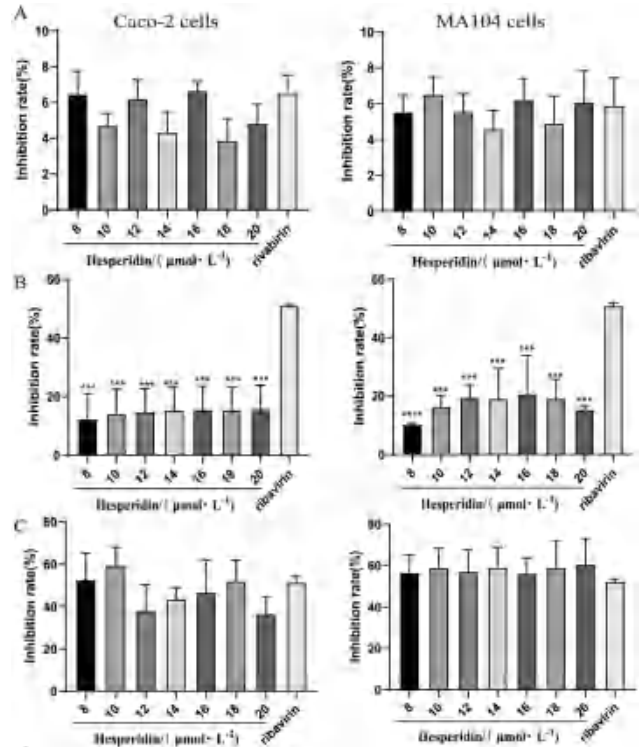


图 3 橙皮苷的抗 RV 作用

Fig 3 Anti-RV effect of hesperidin

A. 抗 RV 吸附 (inhibition of RV attachment); B. 直接抑制 RV (direct inhibition of RV); C. 抗 RV 生物合成 (inhibition of RV replication)

注 (Note): 与利巴韦林药物组比较, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ (Compared with the ribavirin group, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$).

2.2 网络药理学结果

在 TCMSP 数据库中搜索橙皮苷, 将对应靶点输入 UniProt 数据库, 并使用 Swiss Target Prediction 和 PharmMapper 数据库对靶点信息进行补充, 删除去重, 共筛选出 361 个药物靶点。

使用 GeneCards、OMIM 和 DisGeNET 数据库以 “Rotavirus” 为关键词进行检索, 去重后共获得疾病靶点 445 个。

利用 Venny2.1 软件, 将橙皮苷靶点与 RV 靶点相交, 得到 38 个交集靶点, 可能为橙皮苷治疗 RV 的潜在关键靶点。利用 Metascape 对橙皮苷的相应靶点进行 KEGG 富集分析, 结果显示, 这 38 个关键靶点参与了 120 个通路。共同的靶点主要富集在 TNF、PI3K-Akt、IL-17、FOXO、Toll 样受体等信号通路上。为了进一步说明关键 KEGG 通路 with 相应靶点之间的关系, 根据 P 值构建了 “靶点 - 通路” 图, 如图 4 所示。

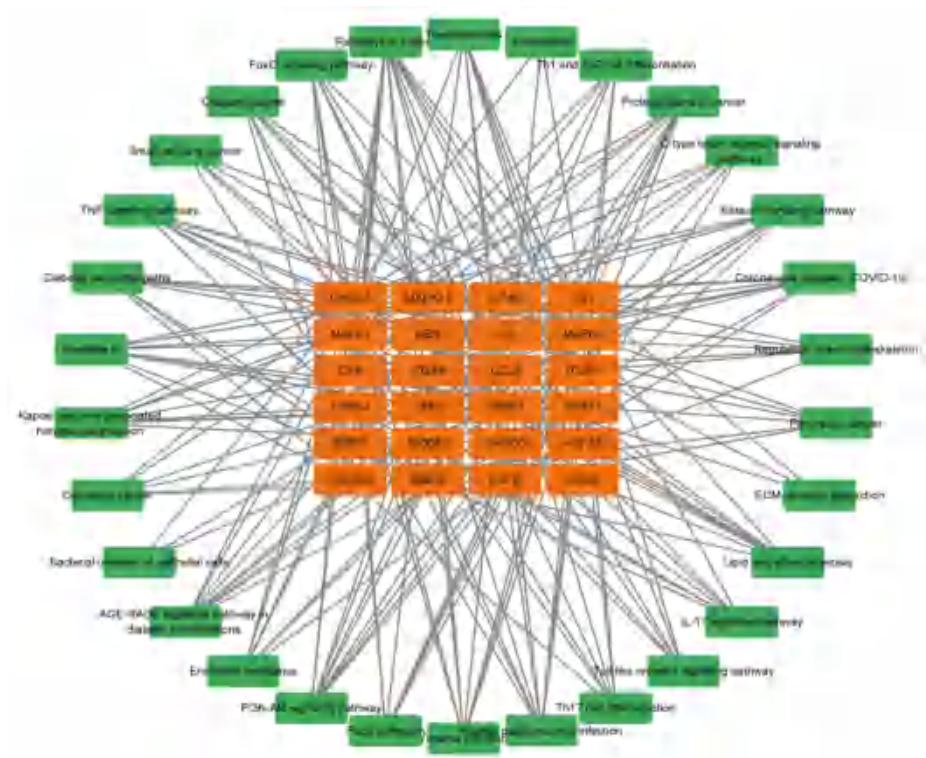


图 4 橙皮苷靶点 - 通路图

Fig 4 Hesperidin target-pathway network

注：橙皮苷 -RV 的靶基因用橙色节点表示，通路用绿色节点表示。

Note: The target genes of hesperidine-RV are shown as an orange nodes, and the pathways are marked with green nodes.

2.3 分子对接

利用 AutoDock 软件，将 5 个核心靶蛋白与橙皮苷行分子对接，结合能均小于 $-45.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，

结果见图 5、表 2，表明橙皮苷与靶蛋白结合性好，其中，橙皮苷与 PIK3CA 结合能力最强，可能是橙皮苷治疗 RV 的关键靶点。

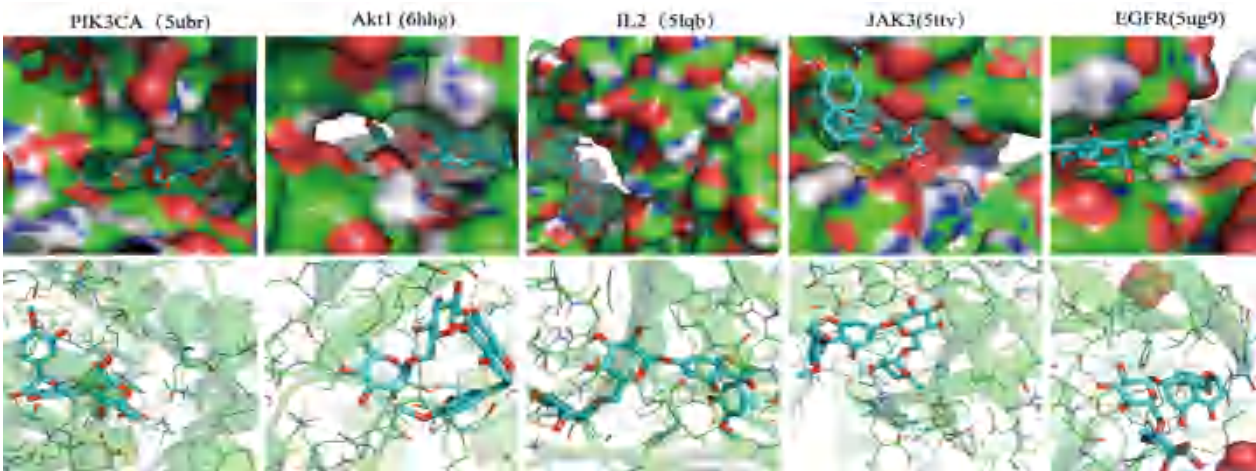


图 5 橙皮苷靶点 - 靶蛋白分子对接结果示意图

Fig 5 Molecular docking diagram of hesperidin target-target protein

2.4 RT-qPCR 检测细胞中 *PIK3CA*、*Akt1* mRNA 的表达

根据网络药理学及分子对接结果，选择度值比较高的靶点进行实验验证，结果如图 6 所示，*PIK3CA* 和 *Akt1* 的 mRNA 表达在感染 RV 后显著下降，各浓度橙皮苷均可上调 *PIK3CA* 及 *Akt1*

mRNA 的表达。

2.5 Western blot 检测细胞中 PI3K、Akt 蛋白的表达水平

与对照组比较，RV 干预后，p-PI3K、p-Akt 蛋白表达量均下降，经橙皮苷处理后，各浓度橙皮苷能上调其蛋白表达量，而蛋白 PI3K、Akt 无

表 2 橙皮苷与关键靶点对接结果

Tab 2 Docking results of hesperidin with key targets

靶点	结合能 / (kJ · mol ⁻¹)
PIK3CA	-45.6
Akt1	-40.6
IL2	-39.7
JAK3	-38.1
EGFR	-36.8

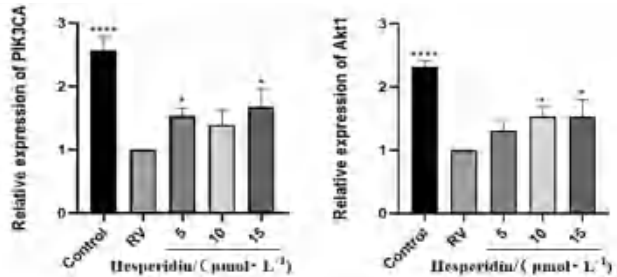


图 6 橙皮苷对 *PIK3CA*、*Akt1* 基因的作用

Fig 6 Effect of hesperidin on *PIK3CA* and *Akt1* genes

注 (Note): 与模型组比较, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ (Compared with the model group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$).

明显的变化,表明其作用可能与 PI3K/Akt 通路的磷酸化程度改变有关,结果见图 7。

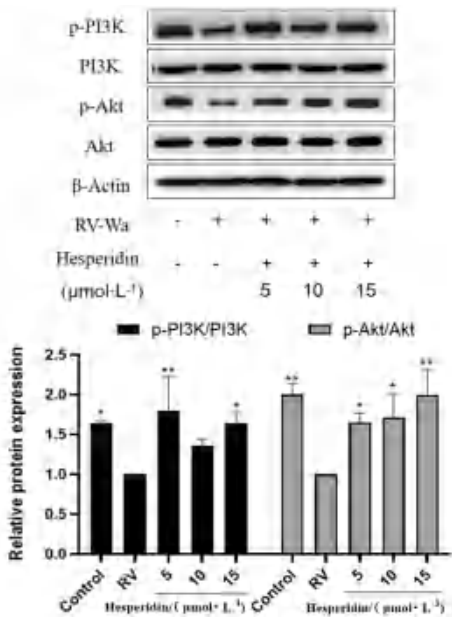


图 7 橙皮苷对 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of hesperidin on the protein expression of PI3K/Akt signaling pathway

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

3 讨论

RV 是婴幼儿腹泻的主要病原体,其发病机制的研究尚不深入,也没有针对该病的有效药物^[24],因此,筛选发现新的抗 RV 药物具有重要的意义。

3.1 细胞及 RV 毒株的选择

目前 RV 体外感染的经典模型是 Caco-2 和 MA104 易感细胞, Caco-2 细胞在结构和功能上与人肠上皮细胞相似,可形成单层细胞,同时 RV 对 MA104 细胞表现极易感, RV 复制水平高^[25-26]。Wa 株是 RV 研究中常见的病毒株^[27],具有很强的毒力和良好的稳定性^[28],故本实验采用了 RV-Wa 株感染 Caco-2、MA104 两种细胞模型进行研究。MTT 结果显示,橙皮苷具有抗 RV 生物合成作用,无抗 RV 吸附和直接抑制 RV 作用。

3.2 橙皮苷抗 RV 作用机制分析

本研究利用网络药理学方法,共收集到橙皮苷与 RV 的共同靶点 38 个,对其进行度值筛选,筛选出 PIK3CA、CASP3、EGFR、FN1、IL2 等关键靶点,这些靶点参与多个生物过程,如炎症、免疫反应以及细胞增殖和凋亡。KEGG 富集分析表明橙皮苷的抗 RV 作用可能与 TNF、PI3K/Akt、IL-17、FOXO、Toll 样受体等多条信号通路有关。分子对接结果显示橙皮苷与 5 个潜在靶点均有较强的结合能力,其中与 PIK3CA 结合能最高,可能为关键作用靶点。在网络药理学分析中, PI3K/Akt 信号通路是除了癌症相关通路以外涉及作用最显著且靶点较多的生物途径,在控制多种致癌过程中起着关键作用,包括细胞增殖、生长、凋亡、糖代谢及炎症反应等,一些细胞因子激活 PI3K 后活化 Akt 参与一系列的生物调控^[29]。研究表明,很多病毒都会通过激活 PI3K-Akt 信号通路来促进其复制。如柯萨奇病毒 B3 (CVB3) 感染导致姜黄素抑制的 PI3K 和 Akt 磷酸化,用 LY294002 治疗心肌细胞后可明显抑制 CVB3 诱导的 PI3K 和 Akt 磷酸化,从而减轻炎症反应^[30]。目前,有关该信号通路在 RV 感染过程中的研究也有相关报道^[31]。然而,橙皮苷抗 RV 作用是否与该通路有关还需要进一步的研究。因此,本实验选取了 PI3K/Akt 信号通路,从 RT-qPCR 和 Western blot 两方面进行研究。结果表明,橙皮苷各浓度组均可上调 *PIK3CA*、*Akt1* 基因的表达,并且显著上调细胞 p-PI3K、p-Akt 蛋白量的表达,故推测其抗 RV 作用可能与 PI3K/Akt 信号通路的抑制有关。

PI3K/Akt 信号通路在网络药理学分析中占据重要地位,但本研究中预测的大多数通路仍需要实验验证。其余信号通路虽然在多数枢纽靶标中没有富集,但也可能为 RV 感染及发病机制的深入研究提供新的见解。

参考文献

- [1] Huang HH, Liao D, Liang LP, et al. Genistein inhibits rotavirus replication and upregulates AQP4 expression in rota-

- virus-infected Caco-2 cells [J]. Arch Virol, 2015, 160 (6): 1421-1433.
- [2] Aliabadi N, Antoni S, Mwenda JM, et al. Global impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus hospitalisations among children under 5 years of age, 2008-16: findings from the Global Rotavirus Surveillance Network [J]. Lancet Glob Health, 2019, 7 (7): e893-e903.
- [3] Santos VS, Marques DP, Martins-Filho PR, et al. Effectiveness of rotavirus vaccines against rotavirus infection and hospitalization in Latin America: systematic review and meta-analysis [J]. Infect Dis Poverty, 2016, 5 (1): 83.
- [4] Posovszky C, Buderus S, Classen M, et al. Acute infectious gastroenteritis in infancy and childhood [J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117 (37): 615-624.
- [5] 张保顺. 橙皮苷衍生物的合成及其药理作用的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [6] Lipson SM, Ozen FS, Louis S, et al. Comparison of α -glucosyl hesperidin of citrus fruits and epigallocatechin gallate of green tea on the loss of rotavirus infectivity in cell culture [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 359.
- [7] Bae EA, Han MJ, Lee M, et al. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (9): 1122-1124.
- [8] 李斌杰, 康帅, 刘晓萌, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨泄浊解毒方治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58 (1): 48-56.
- [9] Zhang YF, Wei JQ, Kong LW, et al. Network pharmacology, molecular docking and bioinformatics reveal the mechanism of Tripterygii Wilfordii against osteosarcoma [J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101 (52): e32389.
- [10] Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [11] Liu XF, Ouyang S, Yu B, et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38 (Web Server issue): W609-W614.
- [12] Gfeller D, Michielin O, Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. Bioinformatics, 2013, 29 (23): 3073-3079.
- [13] UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (D1): D506-D515.
- [14] Otasek D, Morris JH, Bouças J, et al. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis [J]. Genome Biol, 2019, 20 (1): 185.
- [15] Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43 (Database issue): D789-D798.
- [16] Piñero J, Bravo À, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (D1): D833-D839.
- [17] Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator [J]. Database (Oxford), 2010, 2010: baq020.
- [18] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49 (D1): D605-D612.
- [19] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28 (1): 235-242.
- [20] Xie Y, Zhou KN, Wang Y, et al. Revealing the mechanism of Astragali Radix against cancer-related fatigue by network pharmacology and molecular docking [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 7075920.
- [21] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31 (2): 455-461.
- [22] Kim S, Chen J, Cheng TJ, et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49 (D1): D1388-D1395.
- [23] 陈亚乔, 侯林, 崔清华, 等. 海藻不同方法提取物体外抗病毒活性研究 [J]. 西部中医药, 2018, 31 (3): 5-8.
- [24] Song LJ, Zhu XM, Zhou YJ, et al. Establishment of a rotavirus-infected zebrafish model and its application in drug screening [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 145: 112398.
- [25] Hagbom M, De Faria FM, Winberg ME, et al. Neurotrophic factors protect the intestinal barrier from rotavirus insult in mice [J]. mBio, 2020, 11 (1): e02834-19.
- [26] Laucirica DR, Triantis V, Schoemaker R, et al. Milk oligosaccharides inhibit human rotavirus infectivity in MA104 cells [J]. J Nutr, 2017, 147 (9): 1709-1714.
- [27] Guo YS, Candellero-Rueda RA, Saif LJ, et al. Infection of porcine small intestinal enteroids with human and pig rotavirus A strains reveals contrasting roles for histo-blood group antigens and terminal sialic acids [J]. PLoS Pathog, 2021, 17 (1): e1009237.
- [28] Munlela B, João ED, Donato CM, et al. Whole genome characterization and evolutionary analysis of G1P[8]rotavirus strains during the pre- and post-vaccine periods in Mozambique (2012–2017) [J]. Pathogens, 2020, 9 (12): 1026.
- [29] 陈玉文, 李诗琪, 黄小鹏, 等. 基于 IL-6/STAT3、PI3K/Akt 通路探讨汉黄芩素对 LPS 诱导下 THP1 巨噬细胞炎症反应的影响 [J]. 中药材, 2022, 45 (7): 1721-1725.
- [30] Song YX, Ge W, Cai HB, et al. Curcumin protects mice from coxsackievirus B3-induced myocarditis by inhibiting the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/nuclear factor- κ B pathway [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2013, 18 (6): 560-569.
- [31] Zhou Y, Geng PP, Liu YL, et al. Rotavirus-encoded virus-like small RNA triggers autophagy by targeting IGF1R via the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864 (1): 60-68.

(收稿日期: 2023-02-13; 修回日期: 2023-04-17)

滑膜炎固体制剂的溶出度评价

李花花, 黄嘉怡, 彭紫薇, 宋扬, 袁子雨, 窦敏航, 杜守颖*, 白洁* (北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 通过体外溶出度试验评价滑膜炎胶囊剂和片剂的体外溶出特性和成分溶出差异。**方法** 采用小杯法溶出, 通过 HPLC 法测定滑膜炎固体制剂中丹参素、新绿原酸、丹酚酸 B 等 8 个指标性成分的溶出, 并通过相似因子法及指纹图谱进行不同固体制剂溶出的相似性评价。**结果** 各制剂中指标性成分的溶出均较为完全, 但溶出速率存在差异; 从剂型角度分析溶出速率胶囊剂>片剂。相似因子法分析结果显示不同剂型之间的溶出度存在差异。各制剂溶出样品的指纹图谱整体性分析显示, 不同厂家的片剂溶出样品的指纹图谱较为相似, 胶囊剂与片剂之间也较为相似。**结论** 滑膜炎固体制剂各成分的体外溶出较好, 不同剂型指标性成分的溶出特性存在一定差异, 但各制剂之间的溶出从复方组分整体性上较为相似。

关键词: 滑膜炎固体制剂; 溶出度; 相似因子

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1516-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.019

Evaluation of dissolution of synovitis solid formulations

LI Hua-hua, HUANG Jia-yi, PENG Zi-wei, SONG Yang, YUAN Zi-yu, DOU Min-hang, DU Shou-ying*, BAI Jie* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: **Objective** To evaluate the dissolution characteristics and composition dissolution differences of synovitis capsules and tablets by in vitro dissolution test. **Methods** Small cup method was used for the dissolution of eight indicator components, such as salvianorin, neochlorogenic acid and salvianolic acid B. The solid formulations of synovitis was determined by HPLC, and the similarity of the dissolution of different solid formulations was evaluated by the similarity factor method and fingerprinting. **Results** The dissolution of the index components in all formulations was complete, but the dissolution rates varied. The dissolution rates of capsules were higher than those of tablets from the perspective of dosage forms. The similarity factor analysis showed that the dissolution rates of the different dosage forms varied. The holistic analysis of fingerprints of the dissolved samples of each formulation showed that the fingerprints of dissolved tablets from different manufacturers were more similar, and between capsules and tablets were also similar. **Conclusion** The in vitro dissolution of each component of synovitis solid formulations is good, with difference in the dissolution characteristics of the indicator components of different dosage forms. The dissolution between the formulations is similar in terms of the overall nature of compound components.

Key words: synovitis solid preparation; dissolution; similarity factor

滑膜炎方是国内首个以滑膜为针对性治疗部位的骨关节病创新中药方, 全方由夏枯草、女贞子、枸骨叶、黄芪、防己、薏苡仁、土茯苓、丝

瓜络、泽兰、丹参、当归、川牛膝、豨莶草 13 味药组成, 具有清热利湿、活血通络的功效, 用于湿热闭阻、瘀血阻络所致的痹病, 急、慢性滑

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81603306); 中央高校基本科研专项 (No.2020-JYB-ZDGG-031)。

作者简介: 李花花, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术方面的研究, email: lihuahua20160907@163.com *通信作者: 杜守颖, 女, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术方面的研究, email: dushouying@263.net; 白洁, 女, 副教授, 主要从事中药新剂型与新技术方面的研究, email: baijie22811@163.com

膜炎及膝关节术后的治疗^[1-2]。其包括滑膜炎颗粒/胶囊/片三个不同剂型。药材来源及不同剂型的生产工艺、成型辅料等差异,造成制剂内容的介质、形态不同,且不同剂型有其适宜性,多种因素影响下,不同剂型的体外溶出行为会有差异,并最终表现为临床疗效差异,因此有必要研究不同剂型滑膜炎制剂的溶出性差异^[3-4]。

颗粒剂没有溶出的过程,故本文仅观察胶囊剂和包衣片剂的溶出差异。通过建立滑膜炎胶囊/片的体外溶出度试验方法,探讨不同剂型滑膜炎固体制剂的体外溶出特性。在中药或者其复方制剂的溶出度研究中,多采用相似因子法进行不同固体制剂溶出的相似性评价,对比其溶出行为的差异性。滑膜炎方的药味组成众多,其所含成分较为复杂,在溶出度研究中选取的指标性成分外,滑膜炎制剂中还存在多个未进行溶出对比分析甚至未定性的药物成分。指纹图谱技术可整体性表征中药或其复方制剂的化学组成信息。本研究在前期研究的基础上,明确了滑膜炎制剂中包括鸟苷、丹参素、原儿茶醛、新绿原酸、特女贞苷等在内的 17 个特征成分。在多批次制剂指纹图谱的基础上,结合化学模式识别技术,选取了含量相对较高且制剂中存有较大差异的丹参素钠、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 作为指标性成分,分别从指标性成分的溶出行为及制剂各组分整体特征上对于滑膜炎制剂的溶出性进行研究,为滑膜炎制剂的质量评价研究和临床应用选择提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津市精拓仪器科技有限公司); Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪[包括 DAD 检测器, CM7.2 色谱工作站, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

1.2 试药

滑膜炎胶囊(公司 A, 批号: 2010271, 规格: 0.5 g/粒); 滑膜炎片(公司 B, 批号: 200632, 规格: 0.5 g/片; 公司 C, 批号: 20200702, 规格: 0.6 g/片; 公司 D, 批号: 201102, 规格: 0.6 g/片)。对照品丹参素钠(批号: 110855-201925, 含量: 98.9%)、原儿茶醛(批号: 110810-201909, 含量: 99.6%)、绿原酸(批号: 110753-202018, 含量: 96.1%)、咖啡酸(批号: 110885-201703, 含量: 99.7%)、迷迭香酸(批号: 111871-202007, 含量: 98.1%)、丹酚酸 B(批号: 111562-201917, 含量: 96.6%)(中国食品药品检定研究院); 新绿

原酸(批号: P20A11L121936)、隐绿原酸(批号: P16A10U95423 (HPLC $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司)。乙腈、磷酸(Fisher, 色谱级); 水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

含量测定: Xselect HSS T3 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱程序见表 1, 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长为 280 nm (丹参素钠、原儿茶醛)、287 nm (丹酚酸 B)、327 nm (新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样体积 30 μ L。

指纹图谱: 检测波长为 287nm, 其余条件同上述溶出样品含量测定色谱条件。

表 1 洗脱程序

Tab 1 Elution procedure

时间/min	乙腈
0 ~ 3	2%
3 ~ 12	2% ~ 10%
12 ~ 19	10% ~ 12%
19 ~ 28	12% ~ 14%
28 ~ 36	14% ~ 17%
36 ~ 42	17% ~ 19%
42 ~ 72	19% ~ 23%
72 ~ 82	23% ~ 25%
82 ~ 100	25% ~ 35%

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取丹参素钠、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 对照品适量, 加 75% 甲醇配制成含丹参素钠 0.2234 mg $\cdot$ mL⁻¹、新绿原酸 0.0339 mg $\cdot$ mL⁻¹、原儿茶醛 0.0306 mg $\cdot$ mL⁻¹、绿原酸 0.0289 mg $\cdot$ mL⁻¹、隐绿原酸 0.0464 mg $\cdot$ mL⁻¹、咖啡酸 0.0493 mg $\cdot$ mL⁻¹、迷迭香酸 0.0329 mg $\cdot$ mL⁻¹、丹酚酸 B 0.0360 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 含量测定供试品溶液的制备 参考《中国药典》(2020 年版)滑膜炎胶囊/片项下方法, 滑膜炎胶囊取内容物, 精密称定 0.5 g[滑膜炎片除去薄膜衣, 研细, 精密称定 0.5 g(公司 B)/0.6 g(公司 C; 公司 D)], 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 20 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 75% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 移取 10 mL 溶液至离心管中, 10 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μ m 滤膜, 即得。

2.2.3 溶出测定供试品溶液的制备 按《中国药典》(2020 年版)四部溶出度与释放度测定法——

杯法测定^[3]：采用经煮沸脱气后的水作溶出介质。浆叶底部距溶出杯底部 (15 ± 2) mm。分别量取 200 mL 水置于溶出杯，温度 (37 ± 0.5) °C，转速 $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，在同等生药量下，取胶囊剂 3 粒或片剂 3 片分别投入 6 个溶出杯中，于设定的时间点 5、10、15、20、30、60、120、180 min 分别取样 1 mL（同时立即补充空白介质 1 mL），立即用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，即得。此外，此供试品溶液同时用于溶出样品的指纹图谱的测定。

2.3 溶出测定方法学考察

2.3.1 线性关系 分别精密称取丹参素钠、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 对照品适量，按“2.2.1”项下方法分别配制成含丹参素钠 $2.0694 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、新绿原酸 $1.9533 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、原儿茶醛 $1.9890 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $1.8797 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、隐绿原酸 $1.9306 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、咖啡酸 $2.0528 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、迷迭香酸 $2.2279 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丹酚酸 B $1.9533 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。精密量取适量于 10 mL 量瓶中，逐步稀释后，分别得到各成分的系列对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样，以成分峰面积对进样浓度进行线性回归，结果如表 2 所示。

表 2 线性关系考察

Tab 2 Linear relationship examination

化合物	回归方程	r	线性范围 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
丹参素	$y = 126.44x + 0.0615$	0.9998	0.0008 ~ 0.4139
新绿原酸	$y = 543.39x - 0.0196$	0.9999	0.0009 ~ 0.0551
原儿茶醛	$y = 794.71x - 0.1310$	0.9997	0.0008 ~ 0.6421
绿原酸	$y = 561.13x - 0.0190$	0.9999	0.0008 ~ 0.0470
隐绿原酸	$y = 349.23x - 0.0046$	0.9997	0.0008 ~ 0.0772
咖啡酸	$y = 931.55x + 0.0076$	0.9999	0.0008 ~ 0.0821
迷迭香酸	$y = 514.36x + 0.1274$	0.9999	0.0008 ~ 0.4556
丹酚酸 B	$y = 225.37x + 0.0968$	0.9999	0.0008 ~ 0.3907

2.3.2 专属性 分别取空白溶出介质、滑膜炎各制剂溶出样品，进样测定，与混合对照品色谱图对照，结果空白溶出介质和样品中其他成分对待测成分无干扰，说明该方法的专属性良好，见图 1。

2.3.3 精密度、重复性、稳定性 ① 精密度：取滑膜炎制剂溶出样品连续进样 6 次；② 重复性：取滑膜炎制剂溶出样品 6 份分别进样；③ 稳定性：取滑膜炎制剂溶出样品，分别在样品制备完成 0、2、4、6、12、24 h 进样分析。结果以成分峰面积计算， RSD 均小于 3%，表明仪器的精密度、方法重复性均良好，样品在 24 h 内稳定。

2.4 溶出样品指纹图谱方法学考察

① 精密度：分别取不同滑膜炎制剂溶出样品连续进样 6 次。② 重复性：分别取同一批次不同

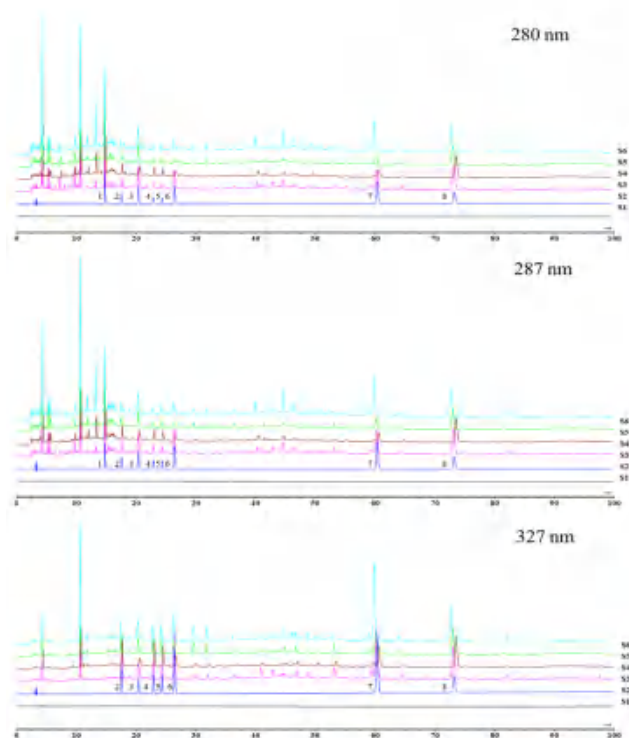


图 1 280 nm、287 nm、327 nm 下溶出样品、混合对照品溶液及空白溶出介质的图谱比较

Fig 1 Comparison of the plots of dissolved samples, mixed control solutions and blank dissolution media at 280 nm, 287 nm and 327 nm

S1. 空白溶出介质 (blank dissolution media); S2. 混合对照品溶液 (mixed control solutions); S3 ~ S6. 样品 (sample); 1. 丹参素 (salicin); 2. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 3. 原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde); 4. 绿原酸 (chlorogenic acid); 5. 隐绿原酸 (cryptophyllogenic acid); 6. 咖啡酸 (caffeic acid); 7. 迷迭香酸 (rosmarinic acid); 8. 丹酚酸 B (salvianolic acid B)

滑膜炎制剂溶出样品 6 份进样分析。③ 稳定性：分别取不同滑膜炎制剂溶出样品，于制样后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析。以上所有样品均按“2.1”项下色谱条件测定，分别对比指纹图谱方法的精密度、重复性、稳定性结果相似度，各结果相似度均大于 0.900，表明仪器的精密度、方法重复性均良好，样品在 24 h 内稳定。

2.5 溶出行为研究

分别将“2.2.2”项下各制剂的溶出样品按“2.1”项下色谱条件进样测定，按如下公式计算各制剂的指标性成分的累积溶出量和累积溶出百分率，累积溶出百分率-时间绘制溶出曲线^[5-6]，结果见表 3、图 2。

$$\text{累积溶出量} (Q_n) = 200 \times C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1$$

$$\text{累积溶出百分率} (\%) = Q_n / M_n \times 100\%$$

Q_n 为第 n 点测得的药物质量浓度； C_i 为第 i ($i \leq n - 1$) 个取样点测得的溶出液中药物质量浓度； M_n 是制剂中含有的药物含量。

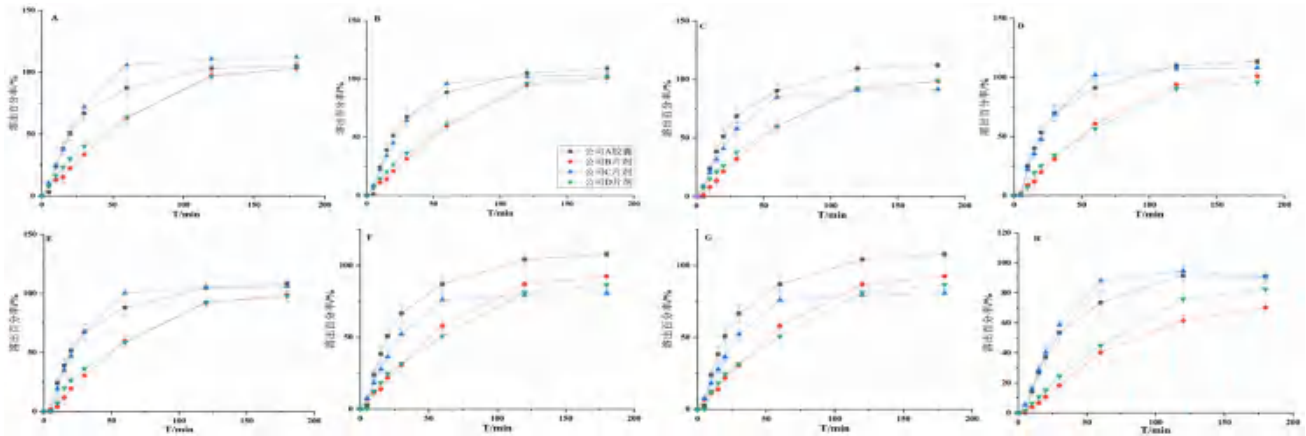


图 2 不同剂型滑膜炎固体制剂中各成分的溶出曲线 ($n = 6$)

Fig 2 Dissolution curves of each component in different dosage forms of synovitis solid formulations ($n = 6$)

A. 丹参素 (salicin); B. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); C. 原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde); D. 绿原酸 (chlorogenic acid); E. 隐绿原酸 (cryptophyllogenic acid); F. 咖啡酸 (caffeic acid); G. 迷迭香酸 (rosmarinic acid); H. 丹酚酸 B (salvianolic acid B)

表 3 各制剂的指标性成分累积溶出量

Tab 3 Cumulative dissolution of indicator components for each formulation

制剂	丹参素	新绿原酸	原儿茶醛	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	迷迭香酸	丹酚酸 B
公司 A 胶囊 (mg/3 粒)	5.43±0.12	0.43±0.01	0.53±0.01	0.44±0.01	0.64±0.01	0.83±0.02	2.45±0.12	4.86±0.19
公司 B 片剂 (mg/3 片)	3.37±0.09	0.41±0.01	0.24±0.00	0.51±0.01	0.64±0.02	0.18±0.00	0.79±0.04	4.04±0.15
公司 C 片剂 (mg/3 片)	5.57±0.14	0.30±0.01	0.49±0.01	0.36±0.00	0.57±0.00	0.25±0.01	1.07±0.04	4.09±0.09
公司 D 片剂 (mg/3 片)	7.51±0.34	0.30±0.01	0.56±0.03	0.34±0.01	0.50±0.03	0.41±0.02	3.11±0.11	4.93±0.21

结果 8 个指标性成分在样品中均有检出, 除公司 C 片剂的丹参素溶出百分率最高外, 其他 7 个成分都是胶囊剂最高。综合溶出百分率排序为胶囊剂>公司 C 片剂>公司 D 片剂>公司 B 片剂, 说明相较于片剂, 胶囊剂各指标性成分溶出更完全。

各成分在 180 min 内释放均较为完全。此外, 前 60 min 各制剂的溶出度差异较大, 前 30 min 尤为明显, 这与各制剂的崩解时限相关。各制剂中除了个别成分之外, 比如胶囊剂中的原儿茶醛、隐绿原酸和丹酚酸 B, 公司 C 片剂中的绿原酸和隐绿原酸, 公司 D 片剂中的隐绿原酸和咖啡酸, 其余成分可在 5 min 内开始溶出。

2.6 相似因子法评价溶出曲线

采用 f_1 法和 f_2 法评价 4 种滑膜炎制剂溶出曲

线的相似及差异性^[7-8], 将 4 种滑膜炎制剂的溶出曲线进行两两比较, 计算制剂中 8 个指标性成分溶出曲线的 f_1 、 f_2 值, 结果见表 4, 计算公式如下:

$$f_1 = \{[\sum_{i=1}^n |R_i - T_i|] / [\sum_{i=1}^n R_i]\} \times 100$$

$$f_2 = 50 \lg \{[1 + 1/n \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2]^{-0.5} \times 100\}$$

n 为取样时间点个数, R_i 为参比样品在 t 时刻的溶出度值, T_i 为试验样品在 t 时刻的溶出度值。一般情况下, $f_1 \leq 15$ 或 $f_2 \geq 50$ 时, 受试样品与参比样品溶出行为相似, 可认为两条溶出曲线具有相似性。结果公司 A 胶囊与公司 C 片剂的溶出曲线在除咖啡酸之外的 7 个指标性成分之间具有相似性; 公司 B 片剂与公司 D 片剂的溶出曲线在所有指标性成分之间具有相似性; 其他制剂的溶出曲线两两之间不具有相似性。

表 4 4 种滑膜炎制剂中 8 个指标性成分溶出曲线的 f_1 、 f_2 值

Tab 4 f_1 and f_2 values of the dissolution curves of the eight indicator ingredients in the 4 synovitis formulations

参比制剂	试验试剂	丹参素		新绿原酸		原儿茶醛		绿原酸		隐绿原酸		咖啡酸		迷迭香酸		丹酚酸 B	
		f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2	f_1	f_2
公司 A 胶囊	公司 B 片剂	46.39	33.51	51.25	31.39	51.14	30.93	53.24	29.48	54.35	30.11	50.35	31.70	61.17	27.99	61.69	32.32
	公司 C 片剂	12.53	54.97	11.62	63.48	16.59	56.32	8.87	64.77	9.64	62.62	22.83	49.68	13.29	60.70	15.42	59.38
	公司 D 片剂	36.66	38.43	43.20	34.92	43.99	34.45	49.31	31.04	45.21	33.69	49.03	31.66	55.46	30.16	51.42	36.28
公司 C 片剂	公司 B 片剂	48.30	29.31	46.84	32.40	44.69	37.34	52.86	29.40	54.27	29.50	34.64	43.72	56.74	31.82	66.04	27.72
	公司 D 片剂	39.62	32.58	38.96	35.67	31.55	42.54	48.89	30.41	45.11	32.30	36.96	42.60	48.48	34.25	56.42	30.81
公司 D 片剂	公司 B 片剂	14.51	64.57	13.22	69.43	19.21	62.95	15.94	68.89	18.03	65.54	16.66	68.09	16.02	73.72	22.07	70.05

2.7 指纹图谱的整体性分析

在滑膜炎制剂指纹图谱中, 共指认 20 个特征

峰, 各制剂 180 min 溶出样品的指纹图谱见图 3, 选取丹参素钠、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、

隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 作为指标性成分，对各制剂溶出样品的指纹图谱进行相似度比较，并评价不同滑膜炎制剂溶出的相似性。

滑膜炎各制剂中的成分在 180 min 内释放均较为完全，因此，将 180 min 溶出样品的指纹图谱以“.cdf”格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A)，进行全谱峰匹配，计算相似度。不同厂家的滑膜炎片溶出样品的指纹图谱相似度比较，结果见表 5。不同厂家的片剂溶出样品指纹图谱较为相似。不同剂型滑膜炎固体制剂溶出样品的指纹图谱相似度比较，结果见表 6。胶囊剂与片剂溶出样品的指纹图谱较为相似，说明不同剂型滑膜炎固体制剂溶出样品的指纹图谱差异较小。

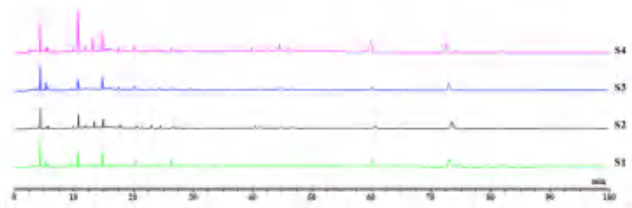


图 3 滑膜炎制剂 180 min 溶出样品的指纹图谱

Fig 3 Fingerprints of 180 min dissolved samples of each formulation
S1. 公司 A 胶囊剂 (company A capsule); S2. 公司 B 片剂 (company B tablet); S3. 公司 C 片剂 (company C tablet); S4. 公司 D 片剂 (company D tablet)

表 5 滑膜炎片 (不同厂家) 溶出样品的指纹图谱相似度比较

Tab 5 Similarity of fingerprint profiles of dissolved samples of synovitis tablets (different manufacturers)

	公司 B 片剂	公司 C 片剂	公司 D 片剂	对照图谱
公司 B 片剂	1.00	0.935	0.870	0.906
公司 C 片剂	0.935	1.00	0.847	0.883
公司 D 片剂	0.870	0.847	1.00	0.974
对照图谱	0.906	0.883	0.974	1.00

表 6 滑膜炎制剂 (不同剂型) 溶出样品指纹图谱相似度比较

Tab 6 Fingerprint similarity of dissolved samples of synovitis formulations (different dosage forms)

	胶囊剂	片剂
胶囊剂	1.00	0.923
片剂	0.923	1.00

3 讨论

各制剂中指标性成分的溶出程度和溶出速率会影响制剂药效的发挥和维持^[9]，从其溶出曲线中可以看出滑膜炎不同制剂之间各指标性成分溶出时间及速率是存在差异的，在剂型上溶出百分率和溶出速率为胶囊剂优于片剂。首先，不同成分在溶出介质中的溶解度不同，会导致制剂中成分溶出时间上的区别；其次，不同剂型制备工艺和药物辅料的差异，胶囊剂的辅料主要为可做囊壳的明胶，其溶解后药物溶出较为迅速；而片剂用到稀释剂、黏合剂等多种辅料，制备时受机械压力冲击压片，质地坚

硬，其包衣溶解后药物溶出较胶囊缓慢。

综合滑膜炎制剂的主要药味及含量差异性后，选取了 8 个指标性成分进行溶出性分析。先通过相似因子法从指标性成分的基础上对比研究不同滑膜炎制剂溶出行为的差异性，显示相同剂型的不同厂家及不同剂型之间的溶出行为皆存在差异，但剂型间的差异性更大。然而，中药制剂的药效是包含主要成分在内的所有药物组分来整体起作用的^[10-11]，滑膜炎制剂的研究亦是如此。故研究中进一步结合了溶出样品指纹图谱相似性评价的方式，从溶出化学成分整体特征上对滑膜炎制剂的溶出进行研究，可以看出不同制剂整体溶出基本无差异。对于滑膜炎固体制剂溶出行为的差异性和整体组分特征上的相似性都提示在应用时不同剂型、不同厂家滑膜炎固体制剂的溶出吸收可能会导致其在体内生物利用度的差异，进而关系到疗效发挥时间的差异，也为不同制剂的选择提供一定参考^[12-13]。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 1768-1770.
[2] 姜范成, 鄢长余, 刘斯亮, 等. HPLC 法测定滑膜炎制剂中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量 [J]. 中国药物评价, 2020, 37 (2): 111-114.
[3] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 132.
[4] 国家药品监督管理局. 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则 [EB/OL]. (2015-02-05) [2022-03-20]. <https://www.nmpa.gov.cn/directorg/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtg-gtg/2015020512000/100.html>.
[5] 易必新, 兰文. 不同厂家盐酸特拉唑嗪片剂及胶囊剂溶出度的比较 [J]. 中国药师, 2015, 18 (10): 1813-1817.
[6] 刘鑫洋, 秦杰琛, 董艳萍, 等. 非布司他片有区分力溶出度检测法的建立及溶出曲线相似性评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53 (1): 119-124.
[7] 戴领, 申宝德, 吕青远, 等. 基于生物效价-多成分整合的中药固体制剂体外溶出度研究 [J]. 中草药, 2013, 44 (19): 2666-2671.
[8] 朱应成, 徐斌, 刘亮镜, 等. 基于多指标成分同时测定的十七味大活血胶囊溶出行为比较研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28 (11): 93-97.
[9] 李娟, 费路华. 不同氢溴酸右美沙芬口服固体制剂的溶出度考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (20): 2059-2062.
[10] 王雅琪, 焦姣姣, 伍振峰, 等. 基于“整体观”的中药制剂质量过程控制体系探讨 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (1): 197-203.
[11] 杨冰, 封亮, 贾晓斌. 基于“组分结构”特征的中药制剂质量评价策略 [J]. 中草药, 2019, 50 (17): 4003-4007.
[12] 赵悦清, 柳文洁, 程泽能. 口服固体制剂的体外溶出试验及体内外相关性研究进展 [J]. 中国药房, 2018, 29 (12): 1718-1723.
[13] 罗密, 裴奇, 宋翠珠, 等. 口服固体制剂体内外模型研究进展 [J]. 中南药学, 2012, 10 (10): 757-760.

(收稿日期: 2022-10-20; 修回日期: 2023-02-28)

综述

基于铁死亡机制的多模式联合治疗肿瘤的 纳米递药系统的研究进展

阚玉萍¹, 李士壮¹, 王雪莹², 苏慧¹, 阎雪莹^{1*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150000; 2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150000)

摘要: 铁死亡是一种新型的铁依赖性非凋亡性细胞死亡, 其显著特点是细胞内脂质活性氧生成与降解平衡失调。研究表明, 大部分的肿瘤病变与铁死亡有着密切的关联, 铁死亡是调节肿瘤治疗的重要枢纽。由于肿瘤异质性和某些特定条件的限制, 单一的诱导铁死亡策略以及化学疗法并不能得到预期的治疗效果。最近的几项研究将铁死亡与多种治疗模式联合应用取得了突破性的进展, 先进的纳米技术为铁供应和药物传递开辟了新的途径, 尤其是在控制药物的稳定性、生物分布、细胞靶向性和药物释放动力学等方面取得了很大进展。本文对基于铁死亡机制联合化疗、光学疗法、免疫疗法等多模式治疗肿瘤的纳米递药技术最新研究进展进行了综述。

关键词: 铁死亡; 肿瘤; 纳米技术; 多模式联合治疗

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1521-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.020

Research progress in nano drug delivery system for multimodal therapy for tumor based on ferroptosis mechanism

KAN Yu-ping¹, LI Shi-zhuang¹, WANG Xue-ying², SU Hui¹, YAN Xue-ying^{1*} (1. *Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000*; 2. *The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000*)

Abstract: Ferroptosis is a new type of iron-dependent non-apoptotic cell death, characterized by the imbalance of intracellular lipid reactive oxygen species production and degradation. Studies have shown that most tumor lesions are closely related to ferroptosis, which is an important hub for regulating cancer treatment. Due to the limitation of tumor heterogeneity and certain specific conditions, ferroptosis alone and chemotherapy fail to obtain the desired therapeutic effect. Recent studies have made breakthroughs in the combined application of ferroptosis and multiple treatment modalities. Moreover, advanced nanotechnology has opened up new avenues for iron supply and drug delivery, especially in controlling drug stability, biodistribution, cell targeting, and drug release kinetics. This paper reviewed the latest research progress in nano-drug delivery based on ferroptosis mechanism combined with chemotherapy, optical therapy, immunotherapy and other multimodal therapy for tumor.

Key words: ferroptosis; tumor; nanotechnology; multimodal therapy

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (No. LH2020H096); 黑龙江省自然科学基金项目 (No. LH2021H102); 黑龙江中医药管理局资助项目 (No. ZHY2020-112)。

作者简介: 阚玉萍, 女, 在读硕士研究生, 主要从事缓控释靶向制剂研究, email: 596702511@qq.com * **通信作者:** 阎雪莹, 女, 硕士研究生导师, 教授, 主要从事缓控释靶向制剂研究, email: yanxueyingwzyx@sina.com

癌症是全球第二大死因^[1]。目前,针对癌症的治疗主要以化疗、放疗和免疫治疗为主。但是化疗的副作用和反复用药导致的耐药性^[2],放疗后出现的辐射毒性^[3],免疫疗法潜在的炎症毒性^[4]和自身免疫抑制^[5]等极大地限制了在临床上的应用,因此,亟需开发新颖有效的新型肿瘤治疗策略以弥补传统肿瘤治疗的不足。铁死亡是一种铁依赖性的调节细胞死亡形式^[6],其特征是活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导脂质过氧化物的积累。研究表明,纳米技术与铁死亡的联合具有独特的优势,如更好的肿瘤杀伤效果^[7]、更加精确的肿瘤靶向性、优异的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)响应能力、良好的生物相容性和较长的循环时间等^[8]。这些优势为开发新制剂以改善肿瘤的治疗效果提供了可能。

研究发现一些癌基因和肿瘤抑制因子的变化都对肿瘤细胞的铁死亡调节有重要影响,例如肿瘤蛋白 p53 通过抑制 SLC7A11 的表达作为其肿瘤抑制活性的一部分来促进铁死亡^[9];肿瘤抑制因子 BRCA1 相关蛋白 1 (BAP1) 通过去泛素化的方式降低 SLC7A11 启动子上的 H2Aub 占用来抑制 SLC7A11 表达^[10]。在索拉非尼(sorafenib, SRF)存在下,肝癌细胞中的视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)的缺乏,能够增加线粒体 ROS 的产生促进氧化应激,因此,缺乏 Rb 会使肝癌细胞对铁死亡的诱导敏感^[11]。肾透明细胞癌由于其独特的代谢状态而容易受到铁死亡的影

响^[12]。目前的传统观点认为,铁死亡的诱导与 System Xc⁻ 的调节有关。最近的研究表明,铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) 抑制铁死亡是通过非线粒体辅酶 Q10 抗氧化系统实现的^[13-14],独立于经典的基于谷胱甘肽(glutathione, GSH)的谷胱甘肽过氧化酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 途径。因此,铁死亡是与代谢、氧化还原生物学和肿瘤密切相关的纽带。

目前,美国食品和药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已经批准了一些铁死亡药物如索拉非尼、柳氮磺胺吡啶、青蒿素用于临床治疗^[15]。此外,经 FDA 批准应用于临床的两种纳米颗粒纳米氧化铁和超小硅纳米颗粒已被证实能够通过增加铁蓄积和 ROS 选择性地杀死肿瘤细胞,表明现有纳米颗粒可能具有治疗肿瘤的潜力。本文对基于铁死亡机制联合化疗、光学疗法、免疫疗法多模式治疗肿瘤的纳米递药技术的最新研究进展进行综述。

1 铁死亡概述

铁死亡以一种铁依赖性的、非凋亡的形式调节细胞死亡,由脂质过氧化引起,由集成的氧化和抗氧化系统控制^[16],涉及多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFAs)、铁、氨基酸代谢、GSH 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)等众多生物代谢过程。主要作用机制包括铁代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、p53、KRAS 介导的铁死亡等(见图 1)。

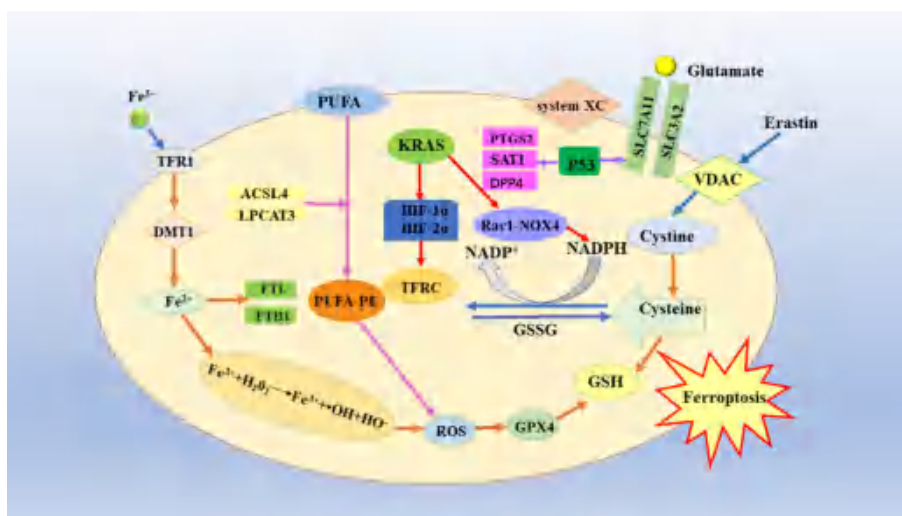


图 1 铁死亡信号通路示意图

Fig 1 Signaling pathway of ferroptosis

2 铁死亡的分子机制

2.1 铁代谢

铁离子超载可以通过芬顿反应催化形成具有

代谢毒性的 ROS 和过氧化磷脂,从而导致铁死亡。目前,有研究表明当肿瘤细胞吸收过量 Fe^{3+} 时,可通过细胞膜上的转铁蛋白受体(transferrin

receptor 1, TFR1) 进入核内体, 之后通过二价金属离子转运体 (divalent metal transporter 1, DMT1) 转化为 Fe^{2+} [17]。而生成的 Fe^{2+} 可与 H_2O_2 发生芬顿反应产生大量 ROS 和 $\cdot\text{OH}$, 从而诱发铁死亡。

2.2 脂质代谢

脂质过氧化物是铁过载期间铁死亡的最终执行者 [18], 而 PUFA 是脂质过氧化的主要靶标之一。游离 PUFA 是合成脂质信号转导培养基的底物, 但必须酯化成膜磷脂并被氧化以传递铁死亡信号。长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (long-chain acyl-CoA synthetase 4, ACSL4) 已被证明是铁死亡敏感性的关键因素 [19-21], ACSL4 能够将辅酶 A (coenzyme A, CoA) 添加到长链脂肪酸中, 促进 PUFA 转化为磷脂。在 ACSL4 活化后, 溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (recombinant lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 通过将酰基插入溶血磷脂中, 利用磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺诱导脂质过氧化。

2.3 氨基酸代谢

System Xc^- 由功能亚基 SLC7A11 和调节亚基 SLC3A2 组成, 是一种氨基酸反转运蛋白 [22-23]。对 System Xc^- 的抑制能够引起细胞内 GSH 的消耗, 产生更高水平的过氧化脂质, 诱导铁死亡。而 GPX4 作为 GSH 过氧化物酶的成员, 是铁死亡通路中的一个关键调控因子。GPX4 的失活将导致细胞过氧化物清除障碍, ROS 大量积累, 最终导致细胞铁死亡的发生。

2.4 铁死亡分子机制的其他相关信号通路

2.4.1 $p53$ 介导的铁死亡 $p53$ 是一种公认的肿瘤抑制基因, 能够诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡 [24], 介导的代谢调节也会抑制肿瘤。 $p53$ 既可以抑制 SLC7A11 转录, 也可通过调控 PTGS2、SAT1、DPP4 基因的表达来调节肿瘤细胞对铁死亡的敏感性。

2.4.2 KRAS 介导的铁死亡 KRAS 可以通过调控 HIF-1 α 和 HIF-2 α 靶基因来调节线粒体代谢或转铁蛋白受体以调节线粒体呼吸和 ROS 生成。此外, KRAS 还可以激活 Rac1-NOX4 信号传导以改变 NADPH 氧化酶活性。

2.4.3 电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 介导的铁死亡 VDAC 是位于线粒体外膜的离子通道, 介导和控制线粒体和细胞质之间的分子和离子交换 [25-26]。改变 VDAC 的通透性, 能够产生 ROS, 导致线粒体代谢紊乱和氧化性死亡 [27]。在氧化应激条件下, 转硫途径将硫原子从甲硫氨酸转移到丝氨酸, 产生半胱氨酸。然后半胱氨酸作为合成 GSH 的底物, 帮助谷胱甘肽过氧

化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 维持氧化还原稳态并防止氧化损伤。因此, 调控该途径可以抑制铁死亡的发生。有研究发现 Erastin 诱导 VDAC 开放介导的线粒体铁摄取可能加速铁死亡 [28-29]。

3 纳米递药系统用于铁死亡机制的多模式联合治疗

越来越多的研究表明, 相比于单一的铁死亡治疗策略, 将化疗、光学疗法、免疫疗法与基于铁死亡机制的多模式联合治疗具有更为明显的优势, 如协同效果更好, 单一剂量减少使毒副作用更少等。近些年, 随着对铁死亡机制的深入研究, 纳米材料靶向铁死亡的抗肿瘤治疗已经取得了良好进展。然而, 目前对基于铁死亡的多模式联合治疗肿瘤的纳米递药系统的最新研究进展概括总结较少, 亟需补充 (见图 2)。因此, 本文对这一领域的研究热点和发展趋势以及基于联合治疗的优势和局限性进行了系统性综述。

3.1 化疗促进铁死亡的纳米递药系统

迄今为止, 化疗仍然是治疗各种恶性肿瘤最有效和最常用的方式之一。装载于纳米递药系统中的化疗药物可以显著提高药物的递送效率和肿瘤杀伤效果, 然而单药装载的治疗效果并不理想。因此, 化疗联合其他疗法已成为肿瘤治疗的一个趋势。

阿霉素 (也称多柔比星, DOX) 是常用的抗肿瘤化疗药物之一, 已被证明能够下调 GPX4 [30] 的表达, 并且间接产生 H_2O_2 以放大芬顿反应。然而, 肿瘤细胞中 H_2O_2 不足和高 GSH 限制了芬顿反应依赖性铁死亡的效率。为此, Yang 等 [31] 将 Fe^{3+} 通过薄膜水化法加载到不饱和脂质 (Lipo) 的内部并与三硫键连接的 DOX 二聚体前药 (DSSSD) 形成 GSH 敏感的 LipoDSSSD。在肿瘤细胞中, 释放的 Fe^{3+} 与过表达的 GSH 反应 (三硫键裂解也会消耗 GSH), 导致 GSH 耗竭并使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 形成的 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 可以直接催化 Lipo 的氧化, 诱导芬顿反应非依赖性铁死亡, 与此同时, Fe^{2+} 可以进一步与 DOX 反应, 产生的 H_2O_2 通过芬顿反应产生 $\cdot\text{OH}$, 诱导芬顿反应依赖性铁死亡, 有效地解决了肿瘤细胞中 H_2O_2 不足和高 GSH 的问题。此外, 体内和体外实验均证实了 LipoDSSSD 不仅发挥了高效的化疗-铁死亡协同抗肿瘤效果, 也减轻了由脂质体积累引起的毒性。这种集铁死亡和化疗双重治疗于一体的纳米药物可能在未来应用于临床, 对肿瘤治疗有益。类似的, Xue 等 [32] 开发了一种肿瘤靶向无定形碳酸钙 (ACC) 包载 Fe^{2+} 和 DOX



图2 基于铁死亡机制的多模式联合治疗

Fig 2 Multimodal therapy based on ferroptosis mechanism

的纳米制剂 ACC@DOX.Fe^{2+} -CaSi-PAMAM-FA/mPEG, 这种纳米制剂可被肿瘤微环境特异性激活释放 Fe^{2+} 和 DOX, 通过互补的铁死亡和凋亡机制诱导肿瘤细胞死亡。除此之外, 简单的合成步骤, 酸性环境下的快速降解, pH 敏感性释放药物等优势对于开发具有改善肿瘤特异性, 增强抗肿瘤功效和降低健康风险的铁死亡途径靶向纳米治疗药物具有临床意义。

除了 DOX 外, 顺铂 (cisplatin, Pt) 也是一种常用的与铁死亡联合应用的抗肿瘤药物。然而, 铂类药物由于其严重的不良反应和耐药性而受到限制。为此, Cheng 等^[33] 构建了 Pt-FMO 纳米平台。首先由乙酰丙酮铁和乙酰丙酮锰合成 FMO 纳米颗粒, 并通过聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 对 FMO 进行改性以增加稳定性, 最后通过酰胺键与 FMO 表面共轭, 形成 Pt-FMO。其中低细胞毒性的顺铂能够被 GSH 激活, 在细胞内产生高毒性顺铂, 并能够上调细胞内的 H_2O_2 , 而 FMO 释放的 $\text{Mn}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 催化芬顿反应, 可转化为剧毒的 $\cdot\text{OH}$, 进一步有效促进肿瘤细胞的铁死亡。而体内抗肿瘤实验结果表明 Pt-FMO 在顺铂含量仅为 8.89% 的剂量下, 能够达到与顺铂相似的治疗效果。这种纳米平台的设计不仅促进了细胞铁死亡和凋亡的高效联合, 而且消除了由凋亡途径介导的传统顺铂治疗的严重副作用和耐药性。而 FMO 有效的 MRI 成像能力, 也为设计新型高效的纳米诊疗药物实现多模式的联合治疗提供了新策略。

此外, 多种天然药物成分, 例如, 没食子酸^[34]、紫菜素^[35]、青蒿琥酯等, 也被发现可以通过与铁死亡联合治疗, 多途径、多靶点抑制

肿瘤细胞生长。如青蒿琥酯可以通过促进对铁的富集, 增加细胞内游离铁的水平而引发肿瘤细胞的铁死亡。一项已经完成的 I 期临床试验 (NCT00764036) 显示, 对于乳腺癌转移患者, 口服青蒿琥酯 $200 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 具有较高的安全性和良好的耐受性。此外, 青蒿琥酯在结直肠癌患者中的药代动力学 (NCT02633098) 和有效性 (NCT03093129) 也正在进行临床试验。但在试验中观察到的青蒿素的最小毒性曲线是否能使它的促铁死亡活性得到开发仍有待确定。

3.2 光学疗法促进铁死亡的纳米递药系统

光学疗法包括光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 和光动力疗法 (photo dynamic therapy, PDT)。PTT 可以通过调节照射条件来诱导细胞凋亡, 已被证明是一种有前途的治疗方法^[36-38], 具有无创、高特异性和可控性等诸多优点。PTT 的基本原理是光热剂吸收光辐射, 产生热能, 从而消融肿瘤细胞并使肿瘤消退。目前, 各种类型的无机和有机光热剂已被投入研究^[39]。主要包括金纳米颗粒 (GNP)^[40]、金纳米星 (AuNSs)^[41]、单壁碳纳米管 (SWCNTs)^[42]、石墨烯和碳点 (CD) 等无机光热剂; 以及吲哚菁绿 (ICG); 聚多巴胺 (PDA) 等有机光热剂。光热剂通常被设计成纳米平台或者作为纳米载体来加载药物、抗原或佐剂, 显示出与其他治疗方式联合治疗的潜力。Tang 等^[43] 利用近红外染料 SQ890 作为铁螯合剂和光热转换器, 用 GSH 敏感聚合物 (PLGA-SS-mPEG) 封装, 构建了 SQ890@Fe NPs。该纳米制剂能够在肿瘤细胞中高 GSH 的作用下, 激活 SQ890-Fe 的光热效应, 使 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+} ,

触发芬顿反应, 诱导铁死亡。铁死亡和 PTT 两种机制相互促进, 提高了肿瘤治疗的疗效和安全性, 为肿瘤联合治疗提供了新的方向。

PDT 的作用基础是光动力效应, 是在分子氧存在下通过光照射局部激活光敏剂 (photosensitizer, PS)。PS 活化后, 触发几种光化学途径, 产生 ROS, 这些 ROS 负责诱导细胞损伤和细胞死亡。然而, 有限的光穿透能力和高耗氧量限制了其治疗效果, 为此, Wang 等^[44]开发了一种具有高肿瘤特异性和生物相容性的缺氧响应性蛋白纳米反应器 BCF_e@SRF。该纳米制剂首先通过形成酰胺键连接牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA) 和二氢卟吩 (Ce6), 随后采用偶氮苯 (azobenzene, Azo) 共价交联 BSA-Ce6 和铁蛋白 (ferritin, Ft), 在疏水相互作用下同时将 SRF 封装在纳米结构中。BCF_e@SRF 在缺氧环境下降解, 释放 BSA-Ce6 用于触发 PDT, 同时释放铁蛋白用于铁催化的芬顿反应, 在肿瘤中产生更多的 ROS, 而 ROS 的增加使 SRF 诱导的 GSH 和 GPX4 还原破坏了肿瘤细胞的抗氧化防御系统, 间接促进脂质过氧化物积累, 从而进一步增加肿瘤部位内的氧化应激。此外, 在体外抗肿瘤实验中, 缺氧状态下的 BCF_e@SRF + 激光组具有最好的治疗效果, 肿瘤抑制率达 88.4%。这种 BCF_e@SRF 的设计不仅可以作为协同 PDT 和铁死亡治疗的有希望的候选者, 也为 ROS 依赖性治疗纳米平台的设计提供新的方向。

尽管 PTT 和 PDT 已广泛应用于肿瘤治疗, 但其高氧化或高热往往会触发应激防御系统而促进肿瘤细胞的存活, 从而严重限制肿瘤的治疗效果。为此, Tao 等^[45]开发了 brusatol/silica@MnO₂/Ce6@PDA-PEG-FA 纳米平台, 将 Nrf2 抑制剂 brusatol 掺入 SiO₂ 纳米平台, 并加载 Ce6, 最后涂层聚乙二醇-叶酸 (PEG-FA) 官能化的 PDA 形成。其中, MnO₂ 促进产生的 ROS, 不仅直接增强 Ce6 介导的 PDT, 而且能通过攻击热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 来增强 PDA 介导的 PTT, 与此同时, brusatol 在高氧化和高热作用下能有效抑制 Nrf2 防御通路的活化, 引起 GPX4 和 FTH 失活, 从而多靶点、多模式诱导肿瘤细胞铁死亡。

3.3 免疫疗法促进铁死亡的纳米递药系统

大量研究表明, 铁死亡可以增强肿瘤的免疫原性并与免疫细胞相互作用, 肿瘤抗原暴露于铁死亡诱导的肿瘤细胞中, 能够有效提高 TME 的免疫原性, 促进免疫细胞的活化和成熟。同时, 免疫细胞释放包括 TNF- α 和 IFN- γ 在内的免疫刺激细胞因

子, 下调 SLC7A11 和 SLC3A2 的表达, 减少半胱氨酸的吸收, 导致肿瘤细胞中的脂质过氧化和铁积累。因此, 通过基于铁积累的组策略诱导铁死亡可以刺激和激活自然和适应性免疫反应, 释放免疫刺激因子以诱导肿瘤细胞中的铁死亡。

Jiang 等^[46]开发的纳米材料 Fe₃O₄-SAS @ PLT, 由负载有柳氮磺吡啶 (sulfasalazine, SAS) 的铁磁 NPs (Fe₃O₄) 组成, 并伪装有血小板 (platelet, PLT) 膜, 通过抑制 System Xc⁻ 系统触发铁死亡。而 Fe₃O₄-SAS @ PLT 纳米材料可以有效地将巨噬细胞从免疫抑制 M2 表型重新极化为抗肿瘤 M1 表型, 同时与抗 PD-L1 的联合治疗具有良好的协同作用。同样, 另一项研究也报道了肿瘤靶向零价铁纳米颗粒 (ZVI-NP) 可以促进 TME 内 M2 巨噬细胞向 M1 巨噬细胞的转化, 并减弱 TME 中 PD-L1 的表达^[47]。这些研究同时证明了铁死亡可促进抗肿瘤免疫。

最近, Xie 等^[48]构建了 PFG MPNs 光热治疗诊断平台, 封装 Fe³⁺ 和外泌体抑制剂 GW4869, 其光热效应增加了免疫原性细胞死亡, 缓解了树突状细胞 (DC) 成熟时的外泌体沉默。而 GW4869 介导的 PD-L1 的外泌体抑制使 T 细胞活化并增强铁死亡。PTT 与抗外泌体 PD-L1 增强铁死亡的这种新型协同作用在 B16F10 肿瘤中引起了有效的抗肿瘤免疫力和对淋巴结转移性肿瘤的免疫反应^[49-50]。综上所述, 这种铁死亡与免疫反应之间的相关性, 提供了一种有效诱导肿瘤铁死亡的新方法, 这可能是未来改善肿瘤治疗的新策略之一。

3.4 多种治疗策略联合促进铁死亡的纳米递药系统

由于某些特定条件的限制及肿瘤异质性等原因, 单一的诱导铁死亡策略或联合其他单一疗法并不能得到预期的治疗效果。最近的几项研究将铁死亡与两种或多种治疗模式联合应用取得了突破性的进展。

Liang 等^[7]采用水热法合成了由二硫键桥接的 Fe 和 Cu 双离子的 FCS MOFs, 并通过疏水相互作用加载到 FCS MOFs 的孔中, 首次构建了新型 TME 激活的金属有机框架 FCSP@DOX MOFs。FCSP@DOX MOFs 通过 EPR 效应在肿瘤部位积累, 并在过表达的 GSH 的 TME 中崩解, 不仅抑制 GPX4 表达诱导铁死亡, 还同时释放 Fe³⁺、Cu²⁺ 和 DOX。双离子释放催化过表达的 H₂O₂ 发生芬顿反应, 而 DOX 可以通过阻断拓扑异构酶 II 来实现化疗, 还可以产生 H₂O₂ 进一步放大铁死亡治疗效果。该系统在 TME 中特异性激活, 实现了基于铁死亡的化学动力学/光热/化疗的协同治疗效果。此外, MOFs 良好的柔韧性和 TME 响应性, 可装载铁用

于多模式联合治疗诱导肿瘤细胞死亡。例如,用胡椒龙胺 (piperlongumine, PL) 包封了与转铁蛋白 (transferrin, Tf) 结合的含铁 MOF, 通过铁死亡 / 焦亡显著增强了肿瘤抑制率, 且在异种移植的小鼠模型中表现出了理想的抗肿瘤效果^[51]。而包载了单宁酸和 Fe^{2+} 的 MOF 纳米制剂显示出了优异的 pH 值触发释放性能及增强的铁死亡效应^[52]。

虽然基于铁死亡发展的多模式联合治疗已经表现出了明显的优势, 但仍然容易引发脱靶毒性。为此, Xu 等^[53] 报告了一种双重治疗前体药物 $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{-PVP@DOXjade}$ 。该纳米制剂首先将 Ti_3C_2 用聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 进行表面功能化, 然后将 DOX 和铁螯合剂地拉罗司 (ExJade®) 加载到该纳米构造体上。DOXjade 的铁螯合和化疗功能优先在肿瘤部位被光激活, 从而减少脱靶毒性, 同时产生强大的光热效应。同样, 对于抗肿瘤机制的研究揭示了多模式治疗下铁耗竭诱导的转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 蛋白下调和细胞凋亡, 在体外和

体内均实现了敏感的肿瘤 pH 响应性铁死亡 / PTT / 化疗的多模式抗肿瘤作用。这项研究代表了肿瘤精准治疗领域有前途的铁螯合光治疗模式^[53]。

而在最近的研究中, Wang 等^[54] 报告了一种近红外触发和 ROS 增强纳米平台在肝细胞癌中增强索拉非尼 (sorafenib, SOR/SRF) 的化学 / PDT / PTT 协同治疗的纳米平台 $\text{MnO}_2\text{-SOR-Ce6@PDA-PEG-FA}$ (MSCPF), MSCPF 可产生过量的 ROS 从而缓解肿瘤缺氧, 而 ROS 的产生也进一步加强了 Ce6 介导的 PDT 和 PDA 介导的 PTT, 细胞和动物实验都证明了 MSCPF 可以通过 GPX4 和 SLC7A11 的失活抑制 P-gp 表达并诱导铁死亡, 最终增强了肝细胞癌治疗中铁死亡 / 化学 / PDT / PTT 协同治疗效果。在这项工作中构建的 MSCPF 不仅显示出作为提高肝细胞癌治疗效率和降低耐药性的多功能纳米平台的巨大潜力, 也为其他抗肿瘤药物的加载, 协同 PTT / PDT 治疗其他类型的肿瘤提供新的思路。

综上, 不同治疗策略联合促进铁死亡的纳米递药系统汇总情况见表 1。

表 1 不同治疗策略联合促进铁死亡的纳米递药系统

Tab 1 Different treatment strategies combined to promote ferroptosis nano drug delivery system

联合策略		纳米递药系统	优势	参考文献
化疗		LipoDSSSD	① 增加了肿瘤细胞中的 H_2O_2 ; ② 消耗了肿瘤细胞中的高 GSH	[31]
		ACC@DOX. Fe^{2+} -CaSi-PAMAM-FA/mPEG	① 合成步骤简单; ② TME 下快速降解; ③ pH 敏感性释放药物	[32]
		Pt-FMO	① 增加了细胞铁死亡和凋亡的高效联合; ② 消除了由凋亡途径介导的传统顺铂疗法严重的不良反应和耐药性	[33]
	光学疗法	PTT	SQ890@Fe NPs	① 能够在肿瘤细胞中高 GSH 的作用下, 激活 SQ890-Fe 的光热效应; ② 芬顿反应速率的增加, 可以增强 $\cdot\text{OH}$ 和 LPO 的形成
	PDT	BCFe@SRF	① 具有适当的粒径分布、稳定的分散性、优异的 ROS 生成性能、可控的药物释放能力、肿瘤积累能力和突出的生物相容性; ② 通过多种途径促进了细胞内 ROS 积累, 在体外和体内均表现出非常突出的抗肿瘤效果	[44]
	PTT/PDT	brusatol/silica@ MnO_2 /Ce6@PDA-PEG-FA	① MnO_2 促进产生的 ROS, 不仅直接增强 Ce6 介导的 PDT, 而且通过攻击 HSP 来增强 PDA 介导的 PTT; ② brusatol 在高氧化和高热作用下能有效抑制 Nrf2 防御通路的活化, 引起 GPX4 和 FTH 失活, 从而多靶点、多模式诱导肿瘤细胞铁死亡	[45]
免疫疗法		Fe_3O_4 -SAS@PLT	① 可以有效地将巨噬细胞从免疫抑制 M2 表型重新极化为抗肿瘤 M1 表型; ② 产生的免疫原性较轻, 可提高非炎症肿瘤对癌症免疫治疗的反应率; ③ 介导的铁死亡可以诱导肿瘤特异性免疫应答	[46]
		PFG MPNs	① 能够使 T 细胞活化并增强铁死亡; ② 在 B16F10 肿瘤中引起了有效的抗肿瘤免疫力和对淋巴结转移性肿瘤的免疫反应	[48]
其他		FCSP@DOX MOFs	① 不仅抑制 GPX4 表达诱导铁死亡, 同时还释放 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 DOX; ② 包载的 DOX 可以通过阻断拓扑异构酶 II 来实现化疗, 还可以产生 H_2O_2 进一步放大铁死亡治疗效果; ③ 在 TME 中特异性激活, 实现了基于铁死亡的化学动力学 / 光热 / 化疗的协同治疗效果	[7]
		Ti_3C_2 -PVP@DOXjade	① 减少脱靶毒性, 产生强大的光热效应; ② 在体外和体内均实现了敏感的肿瘤 pH 响应性铁死亡 / PTT / 化疗的多模式抗肿瘤作用	[53]
		MnO_2 -SOR-Ce6@PDA-PEG-FA (MSCPF)	① 可产生过量的 ROS 从而缓解肿瘤缺氧, 而 ROS 的产生也进一步加强了 Ce6 介导的 PDT 和 PDA 介导的 PTT; ② 通过 GPX4 和 SLC7A11 的失活抑制 P-gp 表达并诱导铁死亡	[54]

4 总结与展望

铁死亡作为癌症治疗的新靶点,在肿瘤治疗中受到了越来越多的关注。纳米递药技术的快速发展使其在提高药物治疗效率和实现靶向递送、降低全身毒性等方面具有巨大的潜力。各种纳米颗粒制剂,如量子点、脂质体、聚合物纳米颗粒、碳纳米管、金属纳米颗粒或树枝状聚合物等已经在临床前和临床中得到了研究,用于药物或基因递送、光热疗法、免疫治疗等。通过纳米载体负载铁死亡诱导剂可以有效降低递药系统毒性,克服肿瘤细胞的耐药性,抑制肿瘤细胞的分化,并显著提高针对肿瘤细胞的铁死亡作用。本文主要对基于铁死亡机制联合化疗、光学疗法,免疫疗法多模式治疗肿瘤的纳米递药技术最新研究进展进行了综述。尽管基于铁死亡疗法的联合应用已经取得了诸多成果及研究进展,但是目前针对铁死亡与化疗、光学疗法、免疫疗法等的联合治疗仍然存在很多的不足。首先,多模式联合治疗策略的作用机制尚不明确,仍需进一步研究;其次,这些纳米递药系统的复杂性是否能够实现大批量工业化生产有待进一步评估。此外,针对这种多模式的联合治疗,无法精确计算出多种疗法之间的协同效应,多种药物或方法联合是否会导致药物毒性和副作用的叠加尚不明确。最后,实现此类药物的临床转化仍需对其长期疗效和体内降解性等因素进行有效评估。综上所述,尽管基于铁死亡机制的多模式联合治疗肿瘤的纳米递药系统仍处于起步阶段,针对各种肿瘤的作用机制也尚不明确,但是其潜在应用前景巨大,因此,仍然需要更多的研究来深入探索这种多模式的联合治疗。

参考文献

- [1] Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (9): 3233.
- [2] Wei G, Wang Y, Yang G, et al. Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (13): 6370-6392.
- [3] Alfouzan AF. Radiation therapy in head and neck cancer [J]. *Saudi Med J*, 2021, 42 (3): 247-254.
- [4] Dougan M, Luoma AM, Dougan SK, et al. Understanding and treating the inflammatory adverse events of cancer immunotherapy [J]. *Cell*, 2021, 184 (6): 1575-1588.
- [5] Kennedy LB, Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70 (2): 86-104.
- [6] Zhang C, Liu X, Jin S, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21 (1): 47.
- [7] Liang Y, Zhang L, Peng C, et al. Tumor microenvironments self-activated nanoscale metal-organic frameworks for ferroptosis based cancer chemodynamic/photothermal/chemotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (10): 3231-3243.
- [8] Liu YM, Chen YH, JIN YC, et al. Iron based nanotherapeutics for ferroptosis-induced cancer therapy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (21): 11323-11333.
- [9] Lei G, Mao C, Yan Y, et al. Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies [J]. *Protein Cell*, 2021, 12 (11): 836-857.
- [10] Zhang Y, Shi J, Liu X, et al. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20 (10): 1181-1192.
- [11] Louandre C, Marcq I, Bouhlal H, et al. The retinoblastoma (Rb) protein regulates ferroptosis induced by sorafenib in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356 (2 Pt B): 971-977.
- [12] Zou Y, Palte MJ, Deik AA, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1617.
- [13] Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575 (7784): 688-692.
- [14] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor [J]. *Nature*, 2019, 575 (7784): 693-698.
- [15] 季鹏, 张雅洁, 潘浩. 铁死亡纳米制剂在肿瘤治疗应用中的研究进展 [J]. *药学进展*, 2022, 46 (4): 303-309.
- [16] Chen X, Li J, Kang R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation [J]. *Autophagy*, 2021, 17 (9): 2054-2081.
- [17] 刘宏伟, 邵莹莹, 陈倩. 铁死亡调控机制及其在肝细胞癌中的研究进展 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (4): 607-612.
- [18] Xiong R, He R, Liu B, et al. Ferroptosis: a new promising target for lung cancer therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8457521.
- [19] Cheng J, Fan YQ, Liu BH, et al. ACSL4 suppresses glioma cells proliferation via activating ferroptosis [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43 (1): 147-158.
- [20] Fan Z, Cai L, Wang S, et al. Baicalin prevents myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ACSL4 mediated ferroptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 628988.
- [21] Sha R, Xu Y, Yuan C, et al. Predictive and prognostic impact of ferroptosis-related genes ACSL4 and GPX4 on breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. *EBioMedicine*, 2021, 71: 103560.
- [22] Wang W, Green M, Choi JE, et al. CD8⁺ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy [J]. *Nature*, 2019, 569 (7755): 270-274.
- [23] Wang L, Liu Y, Du T, et al. ATF3 promotes erastin-induced ferroptosis by suppressing system Xc [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27 (2): 662-675.
- [24] Liu Y, Gu W. p53 in ferroptosis regulation: the new

- weapon for the old guardian [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29 (5): 895-910.
- [25] Becker T, Wagner R. Mitochondrial outer membrane channels: emerging diversity in transport processes [J]. *Bioessays*, 2018, 40 (7): e1800013.
- [26] Mazure NM. VDAC in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2017, 1858 (8): 665-673.
- [27] Maldonado EN. VDAC-tubulin, an anti-warburg pro-oxidant switch [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 4.
- [28] Wang H, Liu C, Zhao Y, et al. Mitochondria regulation in ferroptosis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99 (1): 1510-1558.
- [29] Su L, Zhang J, Gomez H, et al. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury [J]. *Autophagy*, 2023, 19 (2): 401-414.
- [30] Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, et al. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity [J]. *JCI Insight*, 2020, 5 (9): e132747.
- [31] Yang Y, Zuo S, Li L, et al. Iron-doxorubicin prodrug loaded liposome nanogenerator programs multimodal ferroptosis for efficient cancer therapy [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2021, 16 (6): 784-793.
- [32] Xue CC, Li MH, Zhao Y, et al. Tumor microenvironment-activatable Fe-doxorubicin preloaded amorphous CaCO_3 nanoformulation triggers ferroptosis in target tumor cells [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (18): eaax1346.
- [33] Cheng J, Zhu Y, Xing X, et al. Manganese-deposited iron oxide promotes tumor-responsive ferroptosis that synergizes the apoptosis of cisplatin [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (11): 5418-5429.
- [34] Zhang P, Hou Y, Zeng J, et al. Coordinatively unsaturated Fe^{3+} based activatable probes for enhanced MRI and therapy of tumors [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58 (32): 11088-11096.
- [35] Feng W, Shi W, Liu S, et al. Fe (III)-Shikonin supramolecular nanomedicine for combined therapy of tumor via ferroptosis and necroptosis [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11 (2): e2101926.
- [36] Dong T, Jiang J, Zhang H, et al. PFP@PLGA/ $\text{Cu}_{12}\text{Sb}_4\text{S}_{13}$ -mediated PTT ablates hepatocellular carcinoma by inhibiting the RAS/MAPK/MT-CO1 signaling pathway [J]. *Nano Converge*, 2021, 8 (1): 1-57.
- [37] Yue Y, Zhao X. Melanin-like nanomedicine in photothermal therapy applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (1): 399.
- [38] Jiang Z, Li T, Cheng H, et al. Nanomedicine potentiates mild photothermal therapy for tumor ablation [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2021, 16 (6): 738-761.
- [39] Estelrich J, Busquets MA. Iron oxide nanoparticles in photothermal therapy [J]. *Molecules*, 2018, 23 (7): 1567.
- [40] Wang H, Ouyang W, Zhang X, et al. Bacteria-induced aggregation of bioorthogonal gold nanoparticles for SERS imaging and enhanced photothermal ablation of Gram-positive bacteria [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7 (30): 4630-4637.
- [41] Li RT, Chen M, Yang ZC, et al. AIE-based gold nano-star-berberine dimer nanocomposites for PDT and PTT combination therapy toward breast cancer [J]. *Nanoscale*, 2022, 14 (27): 9818-9831.
- [42] Jain Singhai N, Ramteke S. CNTs mediated CD44 targeting; a paradigm shift in drug delivery for breast cancer [J]. *Genes Dis*, 2020, 7 (2): 205-216.
- [43] Tang L, Ling M, Syeda MZ, et al. A smart nanoplatform for enhanced photo-ferrotherapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 1022-1330.
- [44] Wang X, Wu M, Zhang X, et al. Hypoxia-responsive nanoreactors based on self-enhanced photodynamic sensitization and triggered ferroptosis for cancer synergistic therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19 (1): 204.
- [45] Tao W, Wang N, Ruan J, et al. Enhanced ROS-boosted phototherapy against pancreatic cancer via Nrf2-mediated stress-defense pathway suppression and ferroptosis induction [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14 (5): 6404-6416.
- [46] Jiang Q, Wang K, Zhang X, et al. Platelet membrane-camouflaged magnetic nanoparticles for ferroptosis-enhanced cancer immunotherapy [J]. *Small*, 2020, 16 (22): e2001704.
- [47] Hsieh CH, Hsieh HC, Shih FS, et al. An innovative NRF2 nano-modulator induces lung cancer ferroptosis and elicits an immunostimulatory tumor microenvironment [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (14): 7072-7091.
- [48] Xie L, Li J, Wang G, et al. Phototheranostic metal-phenolic networks with antiexosomal PD-L1 enhanced ferroptosis for synergistic immunotherapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144 (2): 787-797.
- [49] Liu P, Shi X, Peng Y, et al. Anti-PD-L1 DNzyme loaded photothermal $\text{Mn}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ hybrid metal-phenolic networks for cyclically amplified tumor ferroptosis-immunotherapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11 (8): e2102315.
- [50] Wang G, Xie L, Li B, et al. A nanounit strategy reverses immune suppression of exosomal PD-L1 and is associated with enhanced ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 573.
- [51] Xu R, Yang J, Qian Y, et al. Ferroptosis/pyroptosis dual-inductive combinational anti-cancer therapy achieved by transferrin decorated nanoMOF [J]. *Nanoscale Horiz*, 2021, 6 (4): 348-356.
- [52] Li Z, Wu X, Wang W, et al. Fe (II) and tannic acid-cloaked MOF as carrier of artemisinin for supply of ferrous ions to enhance treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2021, 16 (1): 37.
- [53] Xu Y, Wang Y, An J, et al. 2D-ultrathin MXene/DOX-jade platform for iron chelation chemo-photothermal therapy [J]. *Bioact Mater*, 2022, 14: 76-85.
- [54] Wang C, Cheng X, Peng H, et al. NIR-triggered and ROS-boosted nanoplatform for enhanced chemo/PDT/PTT synergistic therapy of sorafenib in hepatocellular carcinoma [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2022, 17 (1): 859-892.

(收稿日期: 2022-11-29; 修回日期: 2023-04-18)

石蒜科生物碱成分的生物合成及其分类研究进展

孙小情^{1,2}, 王贞妮^{1,2} (1. 哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心, 哈尔滨 150076; 2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 哈尔滨 150076)

摘要: 石蒜科生物碱具有很好的药用价值, 目前, 其主要获取方式以植物提取为主, 然而植物获取存在植物培育周期长、人工生物碱含量低等难题, 本论文对石蒜科生物碱类的化合物按其生物发生谱系和环型进行分类, 对生物合成途径进行了系统的整理和分类, 并且总结了石蒜科生物碱参与生物合成的关键合成酶, 旨在为今后石蒜科生物碱可持续性研究提供参考。

关键词: 石蒜科生物碱; 生物合成; 关键酶

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1529-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.021

Research progress in classification and biosynthesis of alkaloids from amaryllidaceae

SUN Xiao-qing^{1,2}, WANG Zhen-ni^{1,2} (1. Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076; 2. National Engineering Center for Anti-cancer Natural Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076)

Abstract: Amaryllidaceae alkaloids (AAs) have significant medicinal value. At present, the main way to obtain AAs is via plant extraction. However, plant extraction involves many difficulties, such as long plant cultivation cycle and low content of artificial alkaloids. In this paper, the compounds of AAs are classified according to their biogenetic lineage and ring type, and their biosynthetic pathways and key synthetases involved in the biosynthesis are systematically summarized, so as to provide a conclusive reference for the sustainable research of amaryllidaceae alkaloids in the future.

Key words: amaryllidaceae alkaloid; biosynthesis; key enzyme

石蒜科植物约 85 属 1300 多种, 在世界各地温带地区均有分布, 以石蒜、黄花石蒜、君子兰、仙茅为主, 主要含有生物碱、蜕皮甾酮、脂肪酸、淀粉等成分^[1]。石蒜是我国传统的出口药材之一, 其有效成分具有多种生理活性和药理效应。石蒜科生物碱 (amaryllidaceae alkaloids, AAs) 主要包括石蒜碱 (lycorine)、高石蒜碱 (homolycorine)、加兰他敏 (galanthamine)、伪石蒜碱 (pseudolycorine)、小星蒜碱 (hippeastrine)、网球花定 (haemanthidine) 等^[2-4]。石蒜科植物很早就被用作药用植物, 石蒜具有解毒、祛痰、利尿、催吐等功效, 主治痈疮恶核、咽喉肿痛、水肿等。现代人们对 AAs 成分进行了广泛的药理活性研究, 认为其具有抗中枢神经系统疾病、抗心血管系统疾病、抗肿瘤、抗菌、抗病毒等作用^[5-8]。进一步加深对 AAs 生物

合成途径的研究, 可在一定程度上扩大其生产规模, 满足临床需求。因此, 这就需要更加深入地研究 AAs 的生物合成, 以期进一步开发出生物碱含量更高或改善生物碱成分的新的生物技术培育方法等^[9-10]。本文将对 AAs 的生物合成途径、生物合成过程的关键酶及生物碱类型进行相关总结, 并对其研究面临的挑战和机遇进行探讨。

1 AAs 生物合成途径及合成酶

1.1 AAs 生物合成途径

放射性标记实验表明, AAs 的生物合成都有一个共同的生化途径和一个关键的中间体, 其合成途径见图 1, 大致由两个阶段组成。第一阶段: 起始底物经一系列生化反应 (涉及氧化、还原、羟基化、甲基化、苯酚偶联和氧化桥形成等反应) 合成代谢中间体 norbelladine; 第二阶段:

norbelladine 是所有 AAs 的前体, 可以经过不同的生物化学反应, 生成 norbelladine 和 cherylline 型等生物碱; 而绝大部分 norbelladine 被 *O*-甲基化形成 AAs 的通用直接前体 4'-*O*-methylnorbelladine, 且 4'-*O*-methylnorbelladine 经环化, 得到不同的 AAs 基本骨架, 从而得到多种 AAs。

Norbelladine 是由 3, 4-二羟基苯甲醛 (3, 4-DHBA) 和酪胺结合而成, 这两种前体分别来自苯丙氨酸和酪氨酸, 而苯丙氨酸和酪氨酸分别来自芳香族氨基酸 *L*-酪氨酸和 *L*-苯丙氨酸。负责酪胺生物合成的酶是酪氨酸脱羧酶 (TYDC); 负责 3, 4-DHBA 生物合成的酶有苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、肉桂酸 4-羟化酶 (C4H)、香豆酸 3-羟化酶 (C3H) 和 4-羟基苯甲醛合酶 (HBS) 等。4'-*O*-methylnorbelladine 作为 AAs 的通用直接前体, 可以通过选择性苯酚-苯酚氧化偶联, 环化形成邻位-对位、对位-对位、或对位-邻位的 C-C 偶联, 从而生成各种结构类型的 AAs。对位-邻位偶联生成 galanthamine 类型的 AAs; 而邻位-对位苯酚偶联产生 lycorine 和 homolycorine 类型的 AAs; 对-对位苯酚的偶联反应生成了文殊兰 (crinine)、水仙环素 (narciclasine)、多花水仙碱 (tazettine) 和蒙他宁 (montanine) 类型的 AAs。

1.2 AAs 生物合成关键酶研究

关键酶基因在进一步阐述生物合成过程和代谢调控机制的过程中, 有着不可或缺的地位。近年来, 有学者采用不同组织部位以及诱导剂处理后的石蒜属植物, 进行差异转录组的测序, 从而分离并鉴定出了 AAs 生物合成途径可能的关键酶基因; 然后确定 AAs 生物合成途径以及相关酶的催化反应机制; 再加入外源诱导剂处理后确定 AAs 关键酶基因受诱导表达方式。然而, 生物合成途径的编码基因和相应的酶在很大程度上仍未被探索。

1.2.1 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 关键酶基因 PAL 是苯丙烷生物合成的第一酶, 即苯丙氨酸脱氨为反式肉桂酸是由 PAL 完成的。由于该途径能间接影响 AAs 的前体 norbelladine 的产量, 从而影响 AAs 的合成。PAL 是石蒜类物质推测 PAL 可能在一些重要次生代谢物的生物合成中起着重要作用的酶。Xue 等^[11] 采用简并寡核苷酸引物 PCR (DOP-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增的方法, 从石蒜中克隆了一个 2326 bp 的全长 *PAL2* 基因, 该 cDNA 包含一个 2124 bp 的编码区, 编码

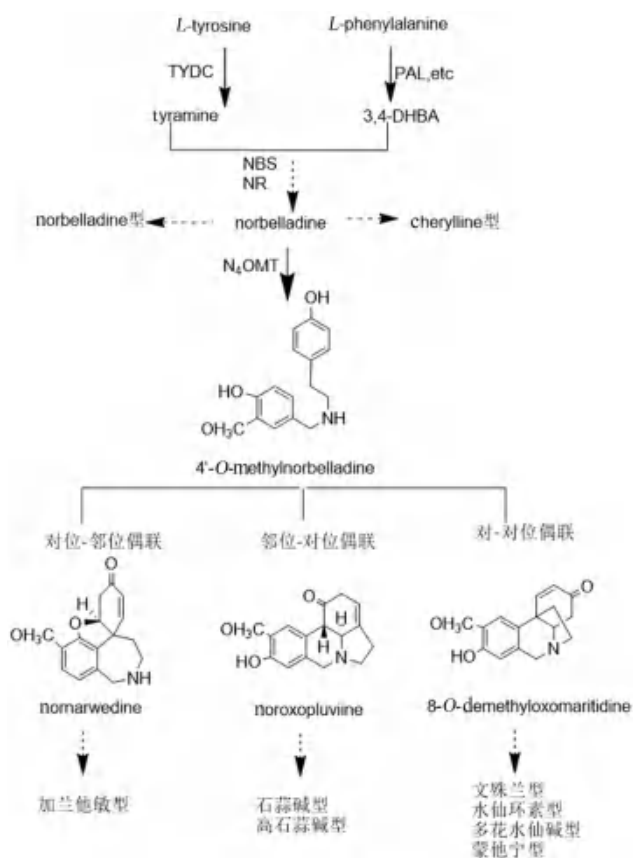


图 1 石蒜科生物碱合成途径

Fig 1 Synthetic pathways of amaryllidaceae alkaloids

707 个氨基酸。

1.2.2 NBS 关键酶基因 Singh 等^[12] 利用已有的野生水仙数据库, 对去甲乌药碱合酶 (norcocalurine synthase, NCS) 同源基因进行了转录挖掘搜索, 从而确定了一个候选基因序列, 命名为 norbelladine 合成酶 (norbelladine synthetase, NBS)。研究证实, NpNBS 属于 PR10/Bet v1 蛋白的一个独特分支, NpNBS 在 AAs 代谢中起着至关重要的作用。NpNBS 的原核表达重组蛋白具有体外催化 4-DHBA 和酪胺 (tyramine) 缩合生成 norbelladine 的作用。高分辨串联质谱检测表明, NpNBS cDNA 在大肠埃希菌中表达产生了一种能将酪胺和 3, 4-DHBA 缩合成降孤挺花定的重组酶, 它催化了 AAs 生物合成的第一步, 这将有助于建立代谢工程和合成生物学平台来生产 AAs。

1.2.3 N4OMT 关键酶基因 所有石蒜科生物碱都被认为是降孤挺花定 4'-*O*-甲基转移酶催化 norbelladine 生成 4'-*O*-methylnorbelladine, N4OMT 是迄今为止唯一与石蒜科生物碱生物合成相关的有效基因。Kilgore 等^[13] 对 pseudonarcissus 进行了 norbelladine 4'-*O*-甲基转移酶活性检测, 从而发现了生物合成基因 N4OMT。

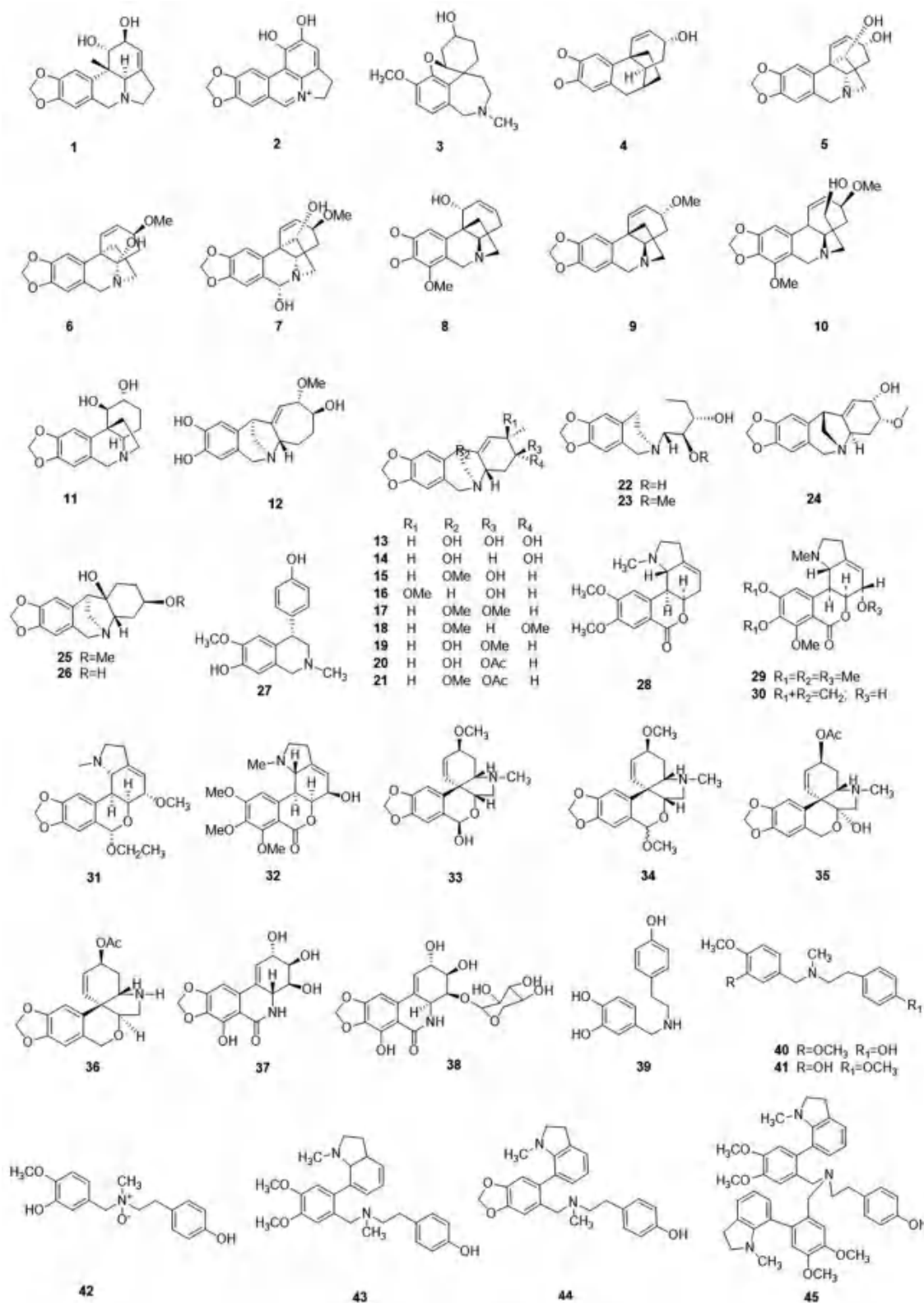


图4 化合物 1 ~ 45 的结构式

Fig 4 Chemical structures of compounds 1 ~ 45

合物 1, 结构式见图 4) 中最具代表性的化合物, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎和调控脂质合成等药理作用^[20]。目前发现的石蒜碱型的生物碱分子中都含有四环加兰他烷骨架, 即吡咯 [d, e] 菲啶环。

对其活性有重要贡献的结构参数包括分子的平面性、烯炔或二噁英环、羟基基团以及氮和氨基上的正电荷^[21]。石蒜碱对预后不佳的肿瘤显示出良好的活性, 主要表现为石蒜碱在体内和体外对多

种肿瘤和各种耐药肿瘤细胞在低浓度下有着高度的特异性和耐受性,且临床上表现出细胞抑制作用而不是细胞毒性作用^[22]。新发现的石蒜碱类生物碱不断扩大大了石蒜碱的各种治疗应用,例如化合物 2 [(+)-1-hydroxy-ungereimine] 对脑膜瘤、星形细胞瘤、CHG-5 等细胞株的细胞毒作用很强。

2.2 加兰他敏 (galanthamine) 型生物碱

CYP96T1 通过催化对邻苯酚偶联产物 *N*-demethylnarwedine 的形成,将 4'-*O*-methylnorbelladine 转化为 *N*-demethylnarwedine,从而得到加兰他敏型生物碱。加兰他敏 (化合物 3) 由保加利亚化学家 D. Paskov 于 1956 年首次从 *galanthus nivalis* 球茎中分离出来^[23],目前已被 FDA 批准用于治疗轻度至中度血管性痴呆和阿尔茨海默病。Naguy 等^[24]证实使用加兰他敏可以治疗血管性痴呆、孤独症谱系障碍 (ASD) 和戒烟。Jamali^[25]也表明加兰他敏在缓解尼古丁戒断症状方面具有类似 varenicline (一种含有部分尼古丁激动作用用于缓解烟瘾症状的药物) 的功效。

2.3 文殊兰 (crinine) 型生物碱

AAs 生物合成过程中 noroxomaritidine 的对映体决定了衍生物是 crinine 型还是 hemanthamine 型。该类生物碱的结构特点是:生物碱分子中含有 1, 2, 3, 4-四氮-1H, 8H-7, 5 亚乙基菲啶骨架。代表的天然产物有化合物 4 ~ 11 (结构式见图 4)。研究表明,部分 crinine 型生物碱具有较强的抗肿瘤活性和广谱抗菌活性^[26],且道具有细胞毒性和诱导凋亡性质^[27]。目前,crinine 型生物碱的抗肿瘤作用报道相对多,主要是通过抑制肿瘤细胞增殖诱导肿瘤细胞凋亡^[28]。Luchetti 等^[29]从 *Zephyranthes robustus* 中分离出相当数量的 crinine 型生物碱。Endo 等^[30]从石蒜中分离得到一个新的 crinine 型生物碱 crijaponine A, 分别对 HeLa 和 HL-60 细胞株进行了细胞毒性实验,并进行了乙酰胆碱酯酶抑制活性的测定。结果显示,crijaponine A 对两种细胞系均无活性 ($IC_{50} > 60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),却有一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性 ($IC_{50} > 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.4 蒙他宁 (montanine) 型生物碱

在生物合成方面, montanine 型生物碱可以很容易地从具有 haemanthamine 骨架的生物碱中获得^[31]。这类生物碱的骨架具有共同的五元桥杂环,含有 4, 5-亚甲基吗吩烷啶结构。Pagliosa 等^[32]于 1955 年从海曼藻属的一个种中分离出第一个 montanine 型的 AA。截至 2020 年,仅分离了

14 个 montanine 型生物碱,即化合物 13 ~ 26^[33] (结构式见图 4)。与其他结构类型的 AAs 相比, montanine 型生物碱主要存在于低浓度的植物中,但其中一些生物碱对不同的肿瘤细胞株具有体外细胞毒活性^[34]。某些 montanine 型生物碱还具有抗焦虑、抗抑郁和免疫调节特性^[35]。

2.5 Cherylline 型生物碱

Cherylline 骨架被认为起源于 norbelladine 骨架 11 位的羟基化,随后与双氧苯酚基的环化衍生而来。在生物合成 cherylline 型生物碱方面,Chan 等^[36]将双标记 norbelladine 前体 *O*-甲基 [1'-3H, 1-14C] 加入到 *crinum powellii* 中生物合成 cherylline 型生物碱,与之前 Shaffer 和 Miller^[37-38]已经证明 *O*-甲基 [1'-3H]norbelladine 完整地结合在 cherylline 型生物碱中的结果一致。Cherylline 型生物碱 (化合物 27) 首次是从 *Crinum jagus* (金莲花) 中发现的。

2.6 高石蒜碱 (homolycorine) 型生物碱

石蒜科生物碱的通用直接前体 4'-*O*-methylnorbelladine, 通过邻位-对位苯酚偶联产生 homolycorine 型的生物碱。Homolycorine 型生物碱 (化合物 28) 的特点是具有连续的环系,依次包括芳基、吡喃、己基和吡咯烷环基。Giordani 等^[39]报道了一个新的 homolycorine 型生物碱 2 α , 7-dimethoxy-homolycorine (化合物 29) 和罕见的 homolycorine 型生物碱 candimine (化合物 30), 还发现了 *Hippeastrum morelianum* (羊栖菜) 是 homolycorine 类生物碱的重要来源。Huang 等^[40]从石蒜科 *Lycoris radiata* (石蒜) 中分离得到一个新的 homolycorine 型生物碱,命名为 2 α -甲氧基-6-*O*-乙基丙氨酸 (2 α -methoxy-6-*O*-ethyloduline) (化合物 31), 发现对甲型流感病毒有较弱的抗病毒活性, IC_{50} 值为 $2.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, CC_{50} 值为 $14.37 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Shitara 等^[41]从石蒜科 *Zephyranthes candida* 中发现了一种新的 homolycorine 型生物碱,命名为 2-hydroxy-albomaculine (化合物 32)。

2.7 前多花水仙碱 (pretazettine) 型生物碱

AAs 的通用直接前体 4'-*O*-methylnorbelladine, 通过对位-对位苯酚的偶联等一系列反应生成了前多花水仙碱型生物碱,其具体途径未见详细报道。石蒜科的 pretazettine 型生物碱 (化合物 33) 的特点是具有苯并吡喃并 [3, 4-*c*] 吡啶亚基的环系。Pretazettine 具有多种病毒的逆转录酶的抑制、抗白血病、抗肺癌等作用,特别因其良好的抗肿瘤活性而备受越来越多学者的研究^[42]。Tazettine

是一种来自 pretazettine 的提取人工制品。Jonquailine (化合物 34), 一种新的 pretazettine 型生物碱, 且具有抗肿瘤活性, 但对抗耐药肿瘤细胞的作用机制尚未阐明^[43]。通过 DFT-NMR 计算, 确定了 scillitazettine 和 scilli-*N*-desmethylpretazettine (化合物 35 ~ 36) 的相对构型, 并通过实验和理论计算的 ECD 谱比较, 确定了它们的绝对构型^[44]。

2.8 水仙环素 (narciclasine) 型生物碱

AAs 的通用直接前体 4'-*O*-methylnorbelladine, 通过对位-对位苯酚的偶联等一系列反应生成了 narciclasine, 其具体途径未见详细报道。Narciclasine 型生物碱 (化合物 37) 是一类具有 lycorici-dine 环系的化合物, 首次从水仙鳞茎中提取得到结晶, 研究发现它对小鼠肉瘤细胞有抗有丝分裂活性, 且具有较好的抗癌、抗肿瘤、调节植物生长发育等生物活性^[45]。Narciclasine-4-*O*- β -D-xylopyranosid (化合物 38) 是一种从 *Zephyranthes Minuta* 全株中分离得到的一种乳白色针状结晶物, 经 HR-ESI-QTOF-MS 确定其分子式为 $C_{19}H_{21}NO_{11}$ 的新化合物 narciclasine 糖苷, 且实验结果表明 narciclasine 糖苷化合物对 KB 和 SiHA 细胞没有抑制作用^[46]。

2.9 Norbelladine 型生物碱

Norbelladine 是由酪胺和 3, 4-DHBA 通过 Mannich 反应缩合而成。Norbelladine 型生物碱 (化合物 39) 以 *N*-(3, 4-dioxybenzyl)-4-oxyphenethylamine 为环系, 大多数化合物对乙酰胆碱酯酶 (hBuChE) 表现出高选择性的抑制模式, IC_{50} 值均小于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[47]。Girard 等^[48]合成了一系列 *O*-甲基化去甲降孤挺花定型生物碱, 并评估了它们对 DENV 和人类免疫缺陷病毒的抗病毒特性。Norbelladine 型生物碱 6-*O*-demethylbelladine (化合物 40) 和 4'-*O*-demethylbelladine (化合物 41) 对乙酰胆碱酯酶有微弱的抑制作用, IC_{50} 值分别为 $(223.2 \pm 23.6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(606.8 \pm 74.2) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。4'-*O*, *N*-dimethylnorbelladine *N*-oxide (化合物 42), 在 $1 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下对人结肠癌细胞系 HCT116 有细胞毒活性^[49]。Mamun 等^[50]分离出 3 个新的 Norbelladine 型的 AAs: Carltonine A ~ C (化合物 43 ~ 45), 并采用 1D NMR、2D NMR 和 HR-MS 等波谱方法确定了它们的结构。

2.10 其他

除上述类型外, 其他类型如 mesembrine 型生物碱具有独特的生物合成途径, 不需要 norbella-

dine 作为关键中间体, 通常可从 Aizoaceae 植物中提取, 也可从石蒜科的几种植物中提取^[51-52]。Plicamine 型生物碱在自然界中很少见, 仅能从特定的石蒜科物种中提取微量, 比如从 *Zephyranthes* 中提取。Plicamine 型生物碱被单独作为一类, 是因为它们是 AAs 的稀有、含氮的成员, 具有独特的生物合成谱系^[53]。Seco-Plicamine 型生物碱在自然界中很罕见, Zhan 等^[54]从 *Zephyranthes candida* (葱莲) 中分离到的 2 个新的 Seco-Plicamine 型生物碱, 且证明了其中的 *N*-isopen-tyl-11, 12-seco-5, 6-dihydro-plicamine 具有体外抗炎活性, IC_{50} 值在 $7.5 \sim 23.55 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 总结

AAs 具有独特的结构和丰富的药理活性, 主要包括抗中枢神经系统疾病、抗肿瘤、抗炎、抗感染及抗心血管系统疾病等多种生物活性, 特别是在抗肿瘤方面研究成果显著, 一直以来都是国内外药物研发人员在创新药物研究与开发方面关注的重点。

AAs 的生物合成途径是一个受多基因调控的、非常复杂的动态变化过程。随着分子生物学和代谢组学的发展, AAs 生物合成途径的基本框架和相关酶的研究已取得了一定的进展, 但还有许多细节不清楚, 其生物合成途径仍有许多问题亟待解决。在石蒜科各类生物碱的生物合成中, 从降孤挺花定、4'-*O*-甲基降孤挺花定和苯酚偶联步骤获得的核心骨架构成 AAs 多样性的基础等已被广泛研究, 但不同酶催化的反应是复杂的, 如 C-C 和 C-O 键的形成、*O*-和 *N*-甲基化、去甲基化、羟化、氧化和还原, 产生数百种结构相关的 AAs。到目前为止, 这些酶中只有几种是已知的, 各步骤具体酶促反应尚不完全清楚, 需要进一步研究。可通过对石蒜科中具代表性的植物进行不同组织部位和诱导剂处理下的差异转录组测序, 分离和鉴定可能参与石蒜科各类生物碱生物合成途径关键酶基因, 从而确认生物合成途径和相关酶催化反应机制。同时, 也可以结合外源诱导剂处理, 明确关键酶基因的受诱导表达模式。

总而言之, AAs 类化合物具有显著的生物活性, 但是其生物合成机制尚不完全清楚, 仍有大量的生物碱合成酶尚未被开发, 对生物碱合成酶的基因进行分析有利于进一步阐明 AAs 类化合物的生物合成途径, 也对生物合成的分子调控具有重要意义。

参考文献

- [1] Hotchandani T, Desgagne-Penix I. Heterocyclic amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and pharmacological applications [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17 (4): 418-427.
- [2] 于海洋. 中药石蒜生物碱类抗肿瘤活性研究 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33 (9): 728.
- [3] 陈旂湛, 张锦文, 赵阳, 等. 石蒜科含氮化合物及其生物活性研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2013, 9 (12): 73-76.
- [4] 曲丹. 基于系统药理学的石蒜生物碱抗阿尔茨海默症研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2016.
- [5] Jin Z, Yao G. Amaryllidaceae and scelletium alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2019, 36 (10): 1462-1488.
- [6] Kornienko A, Evidente A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners [J]. *Chem Rev*, 2008, 108 (6): 1982-2014.
- [7] Hartwell JL. Plants used against cancer. A survey [J]. *Lloydia*, 1971, 34 (2): 204-255.
- [8] Masi M, Di LR, Cimmino A, et al. Advances in the chemical and biological characterization of amaryllidaceae alkaloids and natural analogues isolated in the last decade [J]. *Molecules*, 2020, 25 (23): 5621.
- [9] 李清清, 刘志斋, 张洁, 等. 中药药用活性成分的生物合成研究进展 [J]. *中成药*, 2022, 44 (11): 3603-3608.
- [10] Farinon M, Clarimundo VS, Pedrazza GP, et al. Disease modifying anti-rheumatic activity of the alkaloid montanine on experimental arthritis and fibroblast-like synoviocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 799: 180-187.
- [11] Xue F, Liu Z, Yu Y, et al. Codon-Optimized rhodotorula glutinis PAL expressed in escherichia coli with enhanced activities [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 8: 610506.
- [12] Singh A, Massicotte MA, Garand A, et al. Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in amaryllidaceae alkaloid biosynthesis [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18 (1): 338.
- [13] Kilgore MB, Kutchan TM. The amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15 (3): 317-337.
- [14] Li W, Qiao C, Pang J, et al. The versatile O-methyltransferase LrOMT catalyzes multiple O-methylation reactions in amaryllidaceae alkaloids biosynthesis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 141: 680-692.
- [15] Ka S, Koirala M, Méridol N, et al. Biosynthesis and biological activities of newly discovered amaryllidaceae alkaloids [J]. *Molecules*, 2020, 25 (21): 4901.
- [16] Berkov S, Osorio E, Viladomat F, et al. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of amaryllidaceae alkaloids [J]. *Alkaloids Chem Biol*, 2020, 83: 113-185.
- [17] 陈茂杨, 顾志良. 石蒜碱药理作用的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37 (4): 469-472.
- [18] Martinez-Peinado N, Cortes-Serra N, Torras-Claveria L, et al. Amaryllidaceae alkaloids with anti-trypanosoma cruzi activity [J]. *Parasit Vectors*, 2020, 13 (1): 299.
- [19] Radim H, Martina S, Karel K, et al. The effect of amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic jurkat cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21 (4): 479-490.
- [20] Tewari D, Stankiewicz AM, Mocan A, et al. Ethnopharmacological approaches for dementia therapy and significance of natural products and herbal drugs [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 3.
- [21] 季宇彬, 辛国松, 曲中原, 等. 石蒜属植物生物碱类化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47 (1): 157-164.
- [22] 邵莹莹, 尹双双, 刘宏伟, 等. 石蒜碱抗肿瘤的作用机制研究进展 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (9): 1455-1459.
- [23] 秦昆明, 李笑, 徐昭, 等. 石蒜碱及其衍生物的药理作用研究情况 [J]. *北京联合大学学报 (自然科学版)*, 2003, 23 (1): 6-9.
- [24] Naguy A, Husain K, Alamiri B. Galantamine beyond Alzheimer's disease—a fact or artefact [J]. *CNS Spectr*, 2022, 27 (3): 268-271.
- [25] Jamali Q. Galantamine as a treatment option for nicotine addiction [J]. *J Smok Cessat*, 2021, 2021: 9975811.
- [26] 薛沁冰. 文殊兰叶片中挥发类抗肿瘤化学成分的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2018.
- [27] 陈建荣, 杨扬, 杨月. 文殊兰抗肿瘤研究进展 [J]. *医学综述*, 2010, 16 (22): 3423-3425.
- [28] 高亚茹. 海洋天然产物 Serinolamide A 的首次全合成及石蒜科生物碱 Crinane、Augustamine 和 Noraugustamine 的不对称全合成研究 [D]. 西安: 西北大学, 2015.
- [29] Luchetti G, Johnston R, Mathieu V, et al. Bulbispermine: a crinine-type amaryllidaceae alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells [J]. *Chem Med Chem*, 2012, 7 (5): 815-822.
- [30] Endo Y, Sugiura Y, Funasaki M, et al. Two new alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *Japonicum* [J]. *J Nat Med*, 2019, 73 (3): 648-652.
- [31] da Silva AF, de Andrade JP, Bevilacqua LR, et al. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *hippeastrum vittatum* [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006, 85 (1): 148-154.
- [32] Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, et al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17 (8-9): 698-701.
- [33] Maafi N, Pidaný F, Maříková J, et al. Derivatives of montanine-type alkaloids and their implication for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, biological activity and in silico study [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 51: 128374.
- [34] Ka S, Merindol N, Sow AA, et al. Amaryllidaceae alkaloid cherylline inhibits the replication of dengue and zika viruses [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65 (9): e0039821.

- [35] Reis A, Magne K, Massot S, et al. Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of monotanine production in *rhodophiala bifida* plant [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 8471.
- [36] Chan, Amigo JL. Biosynthesis of cherylline using a doubly labeled norbelladine-type precursors [D]. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1973.
- [37] Shaffer RD. Synthetic and biosynthetic approaches to cherylline and related compounds. unpublished [D]. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1972.
- [38] Miller JA. Biosynthetic studies on tazettine and ambelline [D]. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1966.
- [39] Giordani RB, de Andrade JP, Verli H, et al. Alkaloids from *hippeastrum morelianum* lem. (amaryllidaceae) [J]. *Magn Reson Chem*, 2011, 49 (10): 668-672.
- [40] Huang SD, Zhang Y, He HP, et al. A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *lycoris radiata* [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11 (4): 406-410.
- [41] Shitara N, Hirasawa Y, Hasumi S, et al. Four new Amaryllidaceae alkaloids from *zephyranthes candida* [J]. *J Nat Med*, 2014, 68 (3): 610-614.
- [42] Al MA, Maříková J, Hulcová D, et al. Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *narcissus pseudonarcissus* cv. carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (5): 800.
- [43] Bastida J, Lavilla R, Viladomat F. Chemical and biological aspects of *narcissus* alkaloids [J]. *Alkaloids Chem Biol*, 2006, 63: 87-179.
- [44] Masi M, Cala A, Tabanca N, et al. Alkaloids with Activity against the Zika virus vector *aedes aegypti*-crinsarnine and sarniensinol, two new crinine and mesembrine type alkaloids isolated from the south african plant *nerine sarniensis* [J]. *Molecules*, 2016, 21 (11): 1432.
- [45] Breiterová K, Koutová D, Maříková J, et al. Amaryllidaceae alkaloids of different structural types from *narcissus* L. cv. professor einstein and their cytotoxic activity [J]. *Plants* (Basel), 2020, 9 (2): 37.
- [46] Chen MX, Huo JM, Hu J, et al. Amaryllidaceae alkaloids from *crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities [J]. *Fitoterapia*, 2018, 130: 48-53.
- [47] Presley CC, Krai P, Dalal S, et al. New potentially bioactive alkaloids from *crinum erubescens* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24 (21): 5418-5422.
- [48] Girard MP, Karimzadegan V, Héneault M, et al. Chemical synthesis and biological activities of amaryllidaceae alkaloid norbelladine derivatives and precursors [J]. *Molecules*, 2022, 27 (17): 5621.
- [49] N' Tamon AD, Okpekon AT, Bony NF, et al. Streamlined targeting of amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *crinum scillifolium* using spectrometric and taxonomically-informed scoring metabolite annotations [J]. *Phytochemistry*, 2020, 179: 112485.
- [50] Mamun AA, Pidaný F, Hulcová D, et al. Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: synthesis, biological activity evaluation, and docking studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (15): 8308.
- [51] Xue F, Liu Z, Yu Y, et al. Codon-optimized rhodotorula glutinis PAL expressed in *escherichia coli* with enhanced activities [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 8: 610506.
- [52] Masi M, Van D, Tabanca N, et al. Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *nerine sarniensis* an indigenous south african amaryllidaceae with larvicidal and adulticidal activities against *aedes aegypti* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 116: 34-38.
- [53] Ma W, Wang S, Wang Y, et al. Antiproliferative amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *hymenocallis littoralis* (Jacq.) salisb [J]. *Phytochemistry*, 2022, 197: 113112.
- [54] Zhan G, Zhou J, Liu J, et al. Acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from the whole plants of *zephyranthes carinata* [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80 (9): 2462-2471.

(收稿日期: 2022-12-27; 修回日期: 2023-02-05)

常用抗病毒蛋白酶抑制剂药物相互作用研究进展

张艳¹, 王丹¹, 成蕾², 徐永寿³, 吴新玉², 邓艳², 唐富山^{1*}, 叶林虎^{1, 2*} (1. 遵义医科大学药学院临床药学教研室, 贵州 遵义 563006; 2. 毕节市第一人民医院药剂科, 贵州 毕节 551700; 3. 贵阳市第四人民医院, 贵阳 550000)

摘要: 病毒对人类健康造成严重危害, 且病毒性疾病常伴随感染性和非感染性并发症, 抗病毒药物常需要与其他药物联合使用。蛋白酶抑制剂作为一类重要的抗病毒药物被广泛使用, 但药动学相对复杂。常用抗病毒蛋白酶抑制剂与多种临床药物联用存在潜在药物相互作用。本文综述了常用抗病毒蛋白酶抑制剂的潜在药物相互作用及机制, 以期为临床安全、合理用药提供参考。

关键词: 抗病毒药物; 蛋白酶抑制剂; 药动学; 药物相互作用

中图分类号: R977.3, R978 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1537-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.022

Research progress in drug interactions of commonly used antiviral protease inhibitors

ZHANG Yan¹, WANG Dan¹, CHENG Lei², XU Yong-shou³, WU Xin-yu², DENG Yan², TANG Fu-shan^{1*}, YE Lin-hu^{1, 2*} (1. Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563006; 2. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Bijie, Bijie Guizhou 551700; 3. The Fourth People's Hospital of Guiyang, Guiyang 550000)

Abstract: Viruses cause serious harm to human health, and viral diseases are often accompanied by infectious and non-infectious complications. Antiviral drugs are often used together with other drugs. As an important type of antiviral drug with relatively complex pharmacokinetics, protease inhibitors have been widely used. There were potential drug interactions between commonly used antiviral protease inhibitors and many clinical drugs. This paper focused on the potential drug interactions and mechanism of commonly used antiviral protease inhibitors to provide a reference for safe and rational drug use.

Key words: antiviral drug; protease inhibitor; pharmacokinetics; drug interaction

病毒严重危害人类健康, 抗病毒药物的开发策略集中于靶向病毒本身或宿主细胞因子两方面。靶向抗病毒药物包括阻断病毒附着宿主细胞、阻断病毒进入细胞的阻断剂; 抑制病毒进入宿主细胞内脱壳以及抑制病毒进入细胞内进行生物合成的聚合酶抑制剂; 蛋白酶抑制剂 (protease inhibitors, PIs)、核苷和核苷酸逆转录酶抑制剂以及整合酶抑制剂^[1]。目前抗病毒药物种类繁多, 但大多数都是用于抗人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染, 临床治疗获

得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 而研发的。

病毒的蛋白酶是一类水解蛋白质肽链结构的酶, 也是病毒进行生物合成所必需的酶, 其功能是将前体蛋白剪切修饰得到成熟的活性蛋白, 从而发挥正常的生理功能。蛋白酶在病毒的生命周期中发挥着至关重要的作用, 且不同病毒的蛋白酶具有一定程度的相似性, 因此, 病毒蛋白酶成为广谱抗病毒药物研发中的理想靶点^[2]。美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的

基金项目: 毕节市应急计划项目 (毕科合字 [2020] 01 号); 毕节市联合基金项目 (毕科联合字 sy [2022] 10 号); 毕节市个体化用药人才团队项目。

作者简介: 张艳, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 1418034078@qq.com *通信作者: 唐富山, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物药剂学方面的研究, email: fstang@vip.163.com; 叶林虎, 男, 博士, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事医院药学方面的研究, email: yelinhu@126.com

抗病毒药物大多数是肽模拟物和大环化合物,它们与靶向蛋白酶的活性部位结合,从而发挥抗病毒作用^[3]。抗 AIDS 和丙型肝炎病毒的 PIs 是抗病毒药物研发中最具创新性的来源^[2],抗病毒药物中至少有一半用于治疗 AIDS。FDA 批准用于 AIDS 的 PIs 包括沙奎那韦、茚地那韦、利托那韦、奈非那韦、安普那韦、福沙那韦、洛匹那韦、阿扎那韦、替拉那韦、达芦那韦及复方制剂^[4]。

新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染(corona virus disease 2019, COVID-19)爆发后,部分抗 AIDS 的 PIs 也被临床用于治疗冠状病毒感染,如洛匹那韦/利托那韦及新药奈玛特韦/利托那韦用于 COVID-19 治疗。病毒蛋白酶是临床研究抗病毒药物的重要靶点、热点,抗病毒 PIs 类药物的深入研发将为抗病毒战役作出新贡献。然而,PIs 的安全性也是一个值得关注的问题,Demessine 等^[5]在对

HIV 感染者的研究中发现,16.8% 的患者在一年内至少发生过一次药物-药物相互作用(drug-drug interaction, DDI),接受 PIs 治疗的患者风险更高。病毒感染性疾病常伴随感染性和非感染性并发症^[6-7],在抗病毒治疗过程中通常需要与其他药物联合使用,联合用药过程中可能会引起 DDI。因此,本文对常用抗病毒 PIs 的潜在药物相互作用及机制进行综述,以期临床安全、合理用药提供参考。

1 细胞色素 P450 酶介导的药物相互作用

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 作为膜结合血红蛋白,在内、外源性物质及药物的代谢中起着重要作用,人体中大约 80% 的临床药物的代谢由 CYP450 介导^[8]。抑制或诱导 CYP450 都可能发生药物相互作用,导致严重药物不良反应或治疗失败。PIs 主要由 CYP450 代谢,尤其是 CYP3A4 同工酶,同时作为 CYP3A4 的底物和抑制剂,与多种上市药物存在相互作用^[9-34](见表 1)。

表 1 CYP450 酶介导的药物相互作用

Tab 1 Drug interaction mediated by the cytochrome P450 enzyme

PIs	合并用药	药物相互作用	作用机制
利托那韦	其他 PIs	提高其他 PIs 的生物利用度	抑制 CYP3A4 ^[9]
	氯吡格雷	抑制氯吡格雷活性代谢物产生	抑制 CYP3A4 ^[11]
	托拉塞米	降低托拉塞米的暴露	诱导 CYP2C9 ^[12]
	华法林	增加华法林的代谢	诱导 CYP1A2、2C9 和 2C19 ^[12]
沙奎那韦	麦角胺	产生麦角生物碱急性中毒	抑制 CYP3A4 ^[14]
	氧化白藜芦醇	沙奎那韦的首过代谢增加	氧化白藜芦醇诱导 CYP3A ^[15]
茚地那韦	圣约翰草	茚地那韦的暴露降低	圣约翰草激活 PXR 诱导 CYP3A4 的表达 ^[16]
	葫芦素 E	短期高剂量给药增加茚地那韦的暴露 长期给药后降低茚地那韦的暴露	葫芦素 E 短期高剂量使用抑制 CYP3A ^[17] 葫芦素 E 长期使用诱导 CYP3A ^[17]
	羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂	降低羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂的代谢	抑制 CYP3A4 ^[18]
	辛伐他汀	增加辛伐他汀的浓度	抑制 CYP3A4 ^[19]
奈非那韦	华法林	增加华法林的需求量	诱导 CYP2C9 ^[20]
	地拉韦啉	安普那韦清除率降低 单次给药增加地拉韦啉的 AUC 和 C _{max} 连续 7 d 多次给药降低地拉韦啉的 AUC 和 C _{max}	地拉韦啉抑制 CYP3A4 ^[24] 安普那韦单次给药抑制 CYP3A4 ^[24] 安普那韦长期给药诱导 CYP3A4 ^[24]
洛匹那韦/利托那韦	圣约翰草	安普那韦的稳态血药浓度降低	圣约翰草诱导 CYP3A4 ^[25]
	氯吡格雷	减少氯吡格雷活性代谢物形成	抑制 CYP3A4 ^[12]
	伏立康唑	减慢 CYP2C19 弱代谢型患者伏立康唑的代谢	抑制 CYP3A4 ^[28]
	大麻二酚	洛匹那韦/利托那韦的血药浓度增加	大麻二酚抑制 CYP2C8 和 CYP3A4 ^[29]
达芦那韦	苯妥英	洛匹那韦/利托那韦的暴露降低	苯妥英诱导 CYP3A4、CYP1A2 ^[29]
	利多卡因、美托洛尔、环孢素	升高利多卡因、美托洛尔、环孢素的血药浓度	抑制 CYP3A 和 CYP2D6 ^[31]
	替卡格雷	增加替卡格雷的暴露	抑制 CYP3A4 和 CYP2D6 ^[34]
奈玛特韦/利托那韦	辛伐他汀	增加辛伐他汀的暴露	抑制 CYP3A4 和 CYP2D6 ^[34]

1.1 利托那韦

利托那韦最初用于治疗 AIDS,但由于耐受性差而停止单独作为治疗剂使用。作为 CYP3A4 的

强抑制剂,小剂量(100 ~ 200 mg)利托那韦常与其他 PIs 联用,以提高联用药物的疗效^[9]。例如,复方制剂洛匹那韦/利托那韦的抗病毒作用主要

来源于洛匹那韦, 利托那韦以提高洛匹那韦生物利用度的方式发挥协同抗病毒作用^[10]。AIDS 患者常伴随心血管并发症, PIs 常与抗血小板药物联合使用, 常用抗血小板药氯吡格雷通过 CYP3A4、CYP2C19 和 CYP2B6 等同工酶转化为活性代谢物, 利托那韦对 CYP3A4 的强抑制作用可抑制氯吡格雷活性代谢物的产生, 增加动脉粥样硬化血栓事件的风险^[11]。此外, 利托那韦对 CYP2B6、CYP2C19、CYP2C9 和 CYP1A2 表现出诱导作用; 托拉塞米主要由 CYP2C9 代谢, 利托那韦可以减少托拉塞米暴露; 华法林主要由 CYP2C9 代谢, 但 CYP1A2 和 CYP2C19 也是参与 R-华法林代谢的主要酶, 长期使用利托那韦可诱导华法林代谢, 需增加华法林剂量以维持有效治疗浓度^[12]。

1.2 沙奎那韦

沙奎那韦是首个 FDA 批准治疗 AIDS 的 PIs, 其生物利用度很低的原因之一是 CYP3A4 的首过代谢, 常与利托那韦合用提高其生物利用度。尽管沙奎那韦与其他 PIs 相比对 CYP3A 的抑制水平较低^[13], 但与主要由 CYP3A 代谢的药物合用都必须谨慎。沙奎那韦/利托那韦与麦角胺共同给药会导致麦角生物碱急性中毒, 导致严重的血管痉挛, 这是利托那韦和沙奎那韦抑制 CYP3A4 的结果^[14]。氧化白藜芦醇是 CYP3A 的诱导剂, 可增加沙奎那韦的首过代谢, 使其峰浓度 (peak concentration, $C_{\max}$) 显著降低^[15], 可能导致抗病毒治疗失败。

1.3 茚地那韦

茚地那韦主要由 CYP3A 代谢, 对 CYP3A 有影响的食品、药品或膳食补充剂与其联用可能影响其药动学。圣约翰草可通过激活孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR) 诱导 CYP3A4 的表达, 从而减少茚地那韦的暴露^[16]。Lu 等^[17]的实验研究结果表明, 葫芦素 E 短期高剂量给药显著增加茚地那韦的 $C_{\max}$ 和药时曲线下面积 (area under curve, AUC), 但长期给药后显著降低茚地那韦的 $C_{\max}$ 和 AUC, 这是因为葫芦素 E 短期高剂量使用可抑制 CYP3A 和 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp), 而长期使用诱导 CYP3A 和 P-gp。此外, 茚地那韦也是 CYP3A4 的抑制剂, 可通过抑制 CYP3A4 的活性导致羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂 (如阿托伐他汀、西立伐他汀、洛伐他汀或辛伐他汀) 的代谢减慢, 增加肌病的风险^[18]。

1.4 奈非那韦

奈非那韦可被 CYP3A4、CYP2C19、CYP2C9

和 CYP2D6 代谢, 其中 CYP3A4 约占代谢的 50%。奈非那韦及其主要代谢物是 CYP3A4 的强抑制剂, 辛伐他汀主要经 CYP3A4 代谢, 奈非那韦可通过抑制 CYP3A4 显著增加辛伐他汀的浓度, 增加横纹肌溶解的风险, 如果短期内不可避免地需要使用奈非那韦治疗, 在此期间应暂停辛伐他汀治疗^[19]。Fulco 等^[20]的病例研究表明, 奈非那韦对 CYP2C9 有诱导作用, 可使华法林的每周剂量需求高出 50%。CYP450 还受生理、病理和环境等因素的影响。妊娠对某些药物代谢酶的诱导使许多抗逆转录病毒药物的暴露减少, 尤其是 PIs^[21]。妊娠晚期 CYP3A4 和 CYP2D6 活性的增加使奈非那韦的血药浓度显著降低, 于妊娠晚期增加奈非那韦的使用量有益于无法获得新型 PIs 的患者和对利托那韦增强的 PIs 不耐受的患者^[22]。

1.5 福沙那韦和安普那韦

福沙那韦是安普那韦的前药, 口服后在肠黏膜中迅速转化为活性药物安普那韦; 安普那韦主要经 CYP3A4 代谢, 妊娠使其血药浓度降低, 但对复方制剂安普那韦/利托那韦中安普那韦的影响并不显著, 可能没必要调整剂量^[23]。Tran 等^[24]在健康志愿者中研究了地拉韦啉与安普那韦间的药动学相互作用, 结果显示, 地拉韦啉可通过抑制 CYP3A4 降低安普那韦清除率, 使单剂量安普那韦的 AUC 增加 4 倍; 而安普那韦对地拉韦啉药动学的影响存在复杂的时间依赖性, 单剂量安普那韦可增加地拉韦啉的 AUC 和 $C_{\max}$, 而连续 7 d 多次服用安普那韦却显著降低地拉韦啉的 AUC 和 $C_{\max}$ 。Mannel 等^[25]的研究显示, 圣约翰草对 CYP3A4 和 P-gp 的诱导使非核苷类逆转录酶抑制剂和 PIs 的稳态血药浓度降低, 增加耐药及治疗失败的风险, 应避免安普那韦与圣约翰草合用。

1.6 洛匹那韦

洛匹那韦常与利托那韦联用, COVID-19 疫情的爆发使其成为“老药新用”的热点。COVID-19 患者合并心血管疾病为所有合并症之首, 应密切关注抗病毒药物与抗凝药物之间的相互作用^[26-27]。洛匹那韦/利托那韦可通过抑制 CYP3A4 导致氯吡格雷浓度增加, 但活性代谢物形成减少, 显著降低了氯吡格雷对血小板聚集的抑制作用^[12]。此外, 洛匹那韦/利托那韦在 SARS-CoV-2 合并真菌感染的患者中可能与伏立康唑联用。伏立康唑主要由 CYP2C19 代谢, 而对于 CYP2C19 弱代谢型患者, 则主要由 CYP3A4 代谢, 洛匹那韦/利托那韦对 CYP3A4 的抑制使此类患者伏立康唑的代谢减慢, 从而增加不

良反应的发生率和严重程度^[28]。抗癫痫药大麻二酚作为 CYP2C8 和 CYP3A4 的抑制剂,可能导致洛匹那韦/利托那韦的血药浓度增加;苯妥英作为 CYP3A4、CYP1A2 和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferases, UGTs)的诱导剂,可使洛匹那韦/利托那韦的血药浓度降低 30%,COVID-19 合并癫痫患者可能需要将洛匹那韦/利托那韦剂量增加约 50% 才能达到治疗浓度^[29]。

1.7 达芦那韦

达芦那韦主要由 CYP3A4 代谢,常与 CYP3A4 的抑制剂利托那韦或考比司他联用,从而提高其血药浓度^[30]。达芦那韦是 CYP3A 和 CYP2D6 的抑制剂,能升高抗心律失常药(如利多卡因)、 β 受体阻滞剂(如美托洛尔)和免疫抑制剂(如环孢素)等药物的血药浓度^[31]。

1.8 奈玛特韦

奈玛特韦是一种新型口服抗病毒药物,靶向 SARS-CoV-2 的 3CL 蛋白酶,利托那韦能抑制 CYP3A 介导的奈玛特韦代谢,有助于升高奈玛特韦的血药浓度,从而帮助阻止 SARS-CoV-2 进行复制,促进药物发挥作用,奈玛特韦/利托那韦片可用于治疗成人伴有进展为重症高风险因素的轻至中度 COVID-19 患者^[32]。COVID-19 患者普遍存在凝血机制异常,肺栓塞等危重疾病^[33],因此,抗凝治疗是中、重度 COVID-19 治疗方案中非常重

要的环节(有抗凝禁忌证除外)。奈玛特韦/利托那韦对 CYP3A4 和 CYP2D6 有抑制作用,能增加替卡格雷的暴露,导致出血风险增加,应避免联合使用;与辛伐他汀联用可增加肌病和肝毒性风险,建议在其首次给药 12 h 前停用辛伐他汀,末次给药 5 d 后可恢复辛伐他汀给药^[34]。临床治疗中如需同时使用奈玛特韦片/利托那韦和抗血栓药,必须考虑药物相互作用问题,确保患者的用药安全。

2 转运体介导的药物相互作用

转运体是位于细胞膜上的一类转运蛋白,可影响药物的吸收、分布和排泄,被认为是药物处置和效应/毒性的决定因素。三磷酸腺苷结合盒(ATP-binding cassette, ABC)家族中的 P-gp、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)和多药耐药相关蛋白(multidrug resistance proteins, MRPs)以及溶质载体(solute carrier, SLC)家族中的有机阴离子转运多肽(organic anion-transporting polypeptides, OATPs)、有机阴离子转运体(organic anion transporters, OATs)、有机阳离子转运体(organic cation transporters, OCTs)和多药及毒性化合物外排转运蛋白(multidrug and toxin extrusion proteins, MATEs)等与药物相互作用有关^[35]。PIs 的药物相互作用机制也与药物转运体的抑制或诱导有关(见表 2)。

表 2 转运体介导的药物相互作用

Tab 2 Drug interactions mediated by transporters

PIs	合并用药	药物相互作用	作用机制
利托那韦	地高辛	抑制地高辛的转运	抑制肠道 P-gp ^[37]
	拉米夫定	增加拉米夫定的暴露	抑制 OCT1 和 OCT2 ^[46]
沙奎那韦	地高辛	抑制地高辛的转运	抑制肠道 P-gp ^[37]
茚地那韦	依克立达	茚地那韦的 AUC 增加	依克立达抑制肠道 P-gp ^[38]
	拉米夫定	增加拉米夫定的浓度	抑制 MATE1 ^[45]
奈非那韦	阿霉素、秋水仙碱、紫杉醇、伊马替尼	逆转阿霉素、秋水仙碱、紫杉醇和伊马替尼的耐药性	抑制 P-gp ^[40]
洛匹那韦	薄荷脑	洛匹那韦的生物利用度增加	薄荷脑抑制肠道 P-gp ^[39]
	瑞舒伐他汀	增加瑞舒伐他汀的 AUC	抑制 BCRP、OATP1B1 和 1B3 ^[42]
	地高辛	抑制地高辛的转运	抑制肠道 P-gp ^[37]
阿扎那韦	地高辛	抑制地高辛的转运	抑制肠道 P-gp ^[37]
	瑞舒伐他汀	增加瑞舒伐他汀的 AUC	抑制 BCRP、OATP1B1 和 1B3 ^[42]
达芦那韦	地高辛	抑制地高辛的转运	抑制肠道 P-gp ^[37]
	瑞舒伐他汀	增加瑞舒伐他汀的 AUC	抑制 BCRP 和 OATP1B1 ^[42]

2.1 P-糖蛋白介导的药物相互作用

P-gp 是机体的一种外排泵,可显著影响许多药物的分布和生物利用度,是药物相互作用的重要因素^[36]。阿扎那韦、达芦那韦、洛匹那韦、利托那韦和沙奎那韦能抑制人肠道中 P-gp 介导的

高辛转运^[37]。P-gp 的外排活动限制了茚地那韦的吸收,P-gp 的抑制剂依克立达能显著增加茚地那韦的 AUC,有助于其吸收^[38];薄荷脑可通过抑制肠道 P-gp 而促进洛匹那韦的吸收,提高洛匹那韦生物利用度^[39]。P-gp 过度表达引起的多药耐药

是慢性粒细胞白血病治疗的严重障碍, 奈非那韦可抑制 K562/ADR 细胞 P-gp 功能, 降低细胞内三磷酸腺苷 (ATP) 含量, 促进细胞凋亡, 从而逆转阿霉素、秋水仙碱、紫杉醇和伊马替尼的耐药性^[40]。Kim 等^[41]对 *P-gp* 基因敲除小鼠的研究显示, 与对照组相比, *P-gp* 基因敲除小鼠表现出奈非那韦 (40 倍)、茛地那韦、沙奎那韦 (8 ~ 10 倍) 脑内蓄积的增加, 说明血脑屏障中 P-gp 的外排作用是限制 PIs 进入脑内的重要因素。

2.2 其他转运体介导的药物相互作用

除 P-gp 外, PIs 的药物相互作用还可能由 BCRP、OATPs 和 OCTs 等转运体介导。阿扎那韦、达芦那韦、洛匹那韦与瑞舒伐他汀联用的药物相互作用主要由肠道 BCRP 和肝脏 OATP1B1 的抑制驱动, 对 OATP1B3 和 OAT3 的影响较小^[42]。Dixit 等^[43]的研究表明, 临床常规剂量的奈非那韦可诱导 OATP1B1 和 OATP1B3 的 mRNA 表达。Fasinu 等^[44]的研究发现, 抗 HIV 的草药苏合兰能有效抑制 OATP1B1 和 OATP1B3 对底物的摄取, 当苏合兰需要与其他抗病毒药物联用时, 应避免选择上述转运体底物。茛地那韦抑制 MATE1 介导拉米夫定的外排活动^[45], 增加拉米夫定血药浓度和组织积累。利托那韦可通过抑制 OCT1 和 OCT2 降低肾脏或肝脏的外排作用, 增加底物在肾脏的保留, 拉米夫定与利托那韦联用可增加拉米夫定的暴露^[46]。

3 基于其他机制的药物相互作用

PIs 的药物相互作用不仅与药物代谢酶或转运

体介导的药动学变化有关, 还可能与药效学相互作用或理化因素改变引起的相互作用有关 (见表 3)。洛匹那韦 / 利托那韦与抗精神病药物齐拉西酮、喹硫平、氟哌啶醇、阿立哌唑和曲唑酮都有 Q-T 间期延长的作用, 洛匹那韦 / 利托那韦不应与齐拉西酮、喹硫平、氟哌啶醇共同给药, 与阿立哌唑或曲唑酮共同给药时应谨慎, 注意调整剂量并监测不良反应, 避免严重心律失常^[47]。心肌细胞 2 型 Ryanodine 受体 (type 2 ryanodine receptor, RyR2) 对心动周期至关重要, 人类免疫缺陷病毒 - 反式转录激活因子 (HIV-transactivator of transcription, HIV-Tat) 可加剧阿扎那韦和利托那韦对 RyR2 的作用, 从而引起心律失常和心源性猝死^[48]。PIs 引起胰岛素抵抗是通过增加调节脂质合成相关基因表达的固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1) 来实现的; 还可能与诱导内质网应激, 抑制葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter type 4, GLUT4) 有关, 茛地那韦、利托那韦和安普那韦可抑制 GLUT4, 进而导致糖尿病^[49]。奥美拉唑引起的胃内 pH 升高可增加奈非那韦的溶解度和溶解速率^[50]; 苹果酸、柠檬酸和琥珀酸的 pH 调节作用可增加沙奎那韦在溶解过程中的释放, 且苹果酸和柠檬酸有效抑制了沙奎那韦的重结晶, 提高沙奎那韦生物利用度^[51]。此外, 沙奎那韦联合糖皮质激素可抑制糖皮质激素受体 α (glucocorticoid receptor α , GR α) 和核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor kappa B α , I κ B α) 的减少, 改善糖皮质激素抵抗, 在很大程度上解决了全身炎症问题^[52]。

表 3 基于其他机制的药物相互作用

Tab 3 Drug interaction based on other mechanisms

蛋白酶抑制剂	合并用药	药物相互作用	作用机制
洛匹那韦 / 利托那韦	齐拉西酮、喹硫平、氟哌啶醇、阿立哌唑、曲唑酮	严重心律失常	洛匹那韦 / 利托那韦与齐拉西酮、喹硫平、氟哌啶醇、阿立哌唑、曲唑酮都有 Q-T 间期延长的作用 ^[47]
阿扎那韦	HIV-Tat	心律失常和心源性猝死	HIV-Tat 加剧阿扎那韦对 RyR2 的作用 ^[48]
利托那韦	HIV-Tat	心律失常和心源性猝死	HIV-Tat 加剧利托那韦对 RyR2 的作用 ^[48]
	胰岛素	胰岛素抵抗	抑制 GLUT4 ^[49]
茛地那韦	胰岛素	胰岛素抵抗	抑制 GLUT4 ^[49]
安普那韦	胰岛素	胰岛素抵抗	抑制 GLUT4 ^[49]
奈非那韦	奥美拉唑	奈非那韦的溶解度和溶解速率增加	奥美拉唑引起胃内 pH 升高 ^[50]
沙奎那韦	苹果酸、柠檬酸、琥珀酸	沙奎那韦的生物利用度增加	苹果酸、柠檬酸和琥珀酸调节 pH ^[51]
	糖皮质激素	改善糖皮质激素抵抗	抑制 GR α 和 I κ B α 的减少 ^[52]

4 结语

PIs 主要通过影响 CYP450 活性引起药动学相互作用, 尤其是 CYP3A4 亚型酶; PIs 常被认为是 CYP450 的抑制剂, 但也有少量研究表明其对部分 CYP450 具有诱导作用。此外, P-gp、BCRP、

OATPs 和 OCTs 等途径介导的药动学相互作用; 药物通过影响疾病相关药物靶点产生的药效学相互作用; 理化因素改变引起的相互作用也是 PIs 类药物相互作用的发生机制。药物相互作用是一把双刃剑, 可能导致严重不良反应, 但也可利用

药物相互作用改善相应的药动学过程, 提高临床治疗效果。因此, 科学预测 PIs 的潜在药物相互作用, 有利于促进临床安全、合理用药, 提高治疗质量。

参考文献

- [1] Kausar S, Said Khan F, Rehman MIMU, et al. A review: mechanism of action of antiviral drugs [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2021, 35: 20587384211002621.
- [2] Agbowuro AA, Huston WM, Gamble AB, et al. Proteases and protease inhibitors in infectious diseases [J]. *Med Res Rev*, 2018, 38 (4): 1295-1331.
- [3] Chang KO, Kim Y, Lovell S, et al. Antiviral drug discovery: norovirus proteases and development of inhibitors [J]. *Viruses*, 2019, 11 (2): 197.
- [4] Okafor SN, Angsantikul P, Ahmed H. Discovery of novel hiv protease inhibitors using modern computational techniques [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (20): 12149.
- [5] Demessine L, Peyro-Saint-Paul L, Gardner EM, et al. Risk and cost associated with drug-drug interactions among aging hiv patients receiving combined antiretroviral therapy in france [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2019, 6 (3): ofz051.
- [6] Barón RMA, Rodríguez RJS, Lanseros TJ, et al. Complicaciones infecciosas en los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana [J]. *Med Clin (Barc)*, 2022, 13 (57): 3337-3344.
- [7] Soler GA, Soto CMJ, Corrales CM, et al. Complicaciones no infecciosas del paciente con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana [J]. *Med Clin (Barc)*, 2022, 13 (57): 3337-3344.
- [8] Zhao M, Ma J, Li M, et al. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (23): 12808.
- [9] Velozo CT, Cabral LM, Pinto EC, et al. Lopinavir/ritonavir: a review of analytical methodologies for the drug substances, pharmaceutical formulations and biological matrices [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2022, 52 (8): 1846-1862.
- [10] Dash PK, Boix V. Fixed-dose darunavir/cobicistat in pregnancy of HIV-infected women, pharmacokinetic concerns [J]. *AIDS*, 2021, 35 (8): 1301-1303.
- [11] Marsousi N, Daali Y, Fontana P, et al. Impact of boosted antiretroviral therapy on the pharmacokinetics and efficacy of clopidogrel and prasugrel active metabolites [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2018, 57 (10): 1347-1354.
- [12] Agarwal S, Agarwal SK. Lopinavir-ritonavir in sars-cov-2 infection and drug-drug interactions with cardioactive medications [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2021, 35 (3): 427-440.
- [13] 陈鑫. 细胞色素 P450A4 酶的研究进展 [J]. *医学食疗与健康*, 2019 (16): 202, 206.
- [14] Iardino A, Garner O, Lorusso G, et al. Headache in an HIV-positive patient: dangerous interaction [J]. *BMJ Case Rep*, 2018, 2018: bcr2018225130.
- [15] 张敬茹, 孙宁, 于小桐, 等. HPLC-MS/MS 法定量研究氧化白藜芦醇对沙奎那韦在大鼠体内药动学的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38 (6): 584-589, 594.
- [16] Nicolussi S, Drewe J, Butterweck V, et al. Clinical relevance of St. John's wort drug interactions revisited [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (6): 1212-1226.
- [17] Lu J, Zhang Y, Sun M, et al. Comprehensive assessment of cucurbitacin e related hepatotoxicity and drug-drug interactions involving cyp3a and p-glycoprotein [J]. *Phytomedicine*, 2017, 26: 1-10.
- [18] Plosker GL, Noble S. Indinavir: a review of its use in the management of HIV infection [J]. *Drugs*, 1999, 58 (6): 1165-1203.
- [19] Methaneethorn J, Kunyamee P, Jindasri W, et al. Pharmacokinetic modeling of simvastatin, nelfinavir and their interaction in humans [J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014, 2014: 5715-5718.
- [20] Fulco PP, Zingone MM, Higginson RT. Possible antiretroviral therapy-warfarin drug interaction [J]. *Pharmacotherapy*, 2008, 28 (7): 945-949.
- [21] Ke AB, Greupink R, Abduljalil K. Drug dosing in pregnant women: challenges and opportunities in using physiologically based pharmacokinetic modeling and simulations [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2018, 7 (2): 103-110.
- [22] Eke AC, McCormack SA, Best BM, et al. Pharmacokinetics of increased nelfinavir plasma concentrations in women during pregnancy and postpartum [J]. *J Clin Pharmacol*, 2019, 59 (3): 386-393.
- [23] Eke AC, Wang J, Amin K, et al. Fosamprenavir with ritonavir pharmacokinetics during pregnancy [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64 (4): e02260-19.
- [24] Tran JQ, Petersen C, Garrett M, et al. Pharmacokinetic interaction between amprenavir and delavirdine: evidence of induced clearance by amprenavir [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72 (6): 615-626.
- [25] Mannel M. Drug interactions with St John's wort: mechanisms and clinical implications [J]. *Drug Saf*, 2004, 27 (11): 773-797.
- [26] 韩丽珠, 边原, 童荣生, 等. 新型冠状病毒肺炎合并心血管疾病患者的药学监护策略 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (4): 591-597.
- [27] 张贝, 陈俊, 曾芳, 等. 妊娠及产褥期新型冠状病毒肺炎合并静脉血栓栓塞症患者的合理用药及药学服务 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (9): 1464-1468.
- [28] 宋文彬, 李兴德, 张阳, 等. 基于 CYP3A4 和 CYP2C19 酶活性探究伏立康唑与 COVID-19 潜在抗病毒药物间的相互作用 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (8): 1733-1737.
- [29] Karaźniewicz-Łada M, Głowska AK, Mikulska AA, et al.

- Pharmacokinetic drug-drug interactions among antiepileptic drugs, including cbd, drugs used to treat covid-19 and nutrients [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (17): 9582.
- [30] Momper JD, Wang J, Stek A, et al. Pharmacokinetics of darunavir and cobicistat in pregnant and postpartum women with HIV [J]. *AIDS*, 2021, 35 (8): 1191-1199.
- [31] 赵紫楠, 郭思瑞, 金鹏飞, 等. 蛋白酶抑制剂达芦那韦的研究进展 [J]. *中国合理用药探索*, 2020, 17 (6): 1-4.
- [32] 陈洋洋, 陈伟. 抗新型冠状病毒新药奈玛特韦片/利托那韦片的药理作用机制和临床研究分析 [J]. *江苏大学学报 (医学版)*, 2022, 32 (6): 537-541, 545.
- [33] 何罗宜, 陆庆元, 刘晶晶, 等. 新型冠状病毒肺炎并肺栓塞之诊治研究新进展 [J]. *广东医学*, 2022, 43 (10): 1196-1199.
- [34] Abraham S, Nohria A, Neilan TG, et al. Cardiovascular drug interactions with nirmatrelvir/ritonavir in patients with COVID-19: jacc review topic of the week [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 80 (20): 1912-1924.
- [35] Liu X. Transporter-mediated drug-drug interactions and their significance [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 241-291.
- [36] Gallo P, De Vincentis A, Pedone C, et al. Drug-drug interactions involving CYP3A4 and P-glycoprotein in hospitalized elderly patients [J]. *Eur J Intern Med*, 2019, 65: 51-57.
- [37] Huličiak M, Vokřál I, Holas O, et al. Evaluation of the potency of anti-HIV and anti-HCV drugs to inhibit P-glycoprotein mediated efflux of digoxin in Caco-2 cell line and human precision-cut intestinal slices [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15 (2): 242.
- [38] Suzuki K, Taniyama K, Aoyama T, et al. Evaluation of the role of P-glycoprotein (P-gp)-mediated efflux in the intestinal absorption of common substrates with elacridar, a P-gp inhibitor, in rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, 2020, 45 (3): 385-392.
- [39] Fayed ND, Arafa MF, Essa EA, et al. Lopinavir-menthol co-crystals for enhanced dissolution rate and intestinal absorption [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 74: 103587.
- [40] Liu W, Meng Q, Sun Y, et al. Targeting P-glycoprotein: nelfinavir reverses adriamycin resistance in k562/adr cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51 (4): 1616-1631.
- [41] Kim RB, Fromm MF, Wandel C, et al. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101 (2): 289-294.
- [42] Elsby R, Coghlan H, Edgerton J, et al. Mechanistic in vitro studies indicate that the clinical drug-drug interactions between protease inhibitors and rosuvastatin are driven by inhibition of intestinal BCRP and hepatic OATP1B1 with minimal contribution from OATP1B3, NTCP and OAT3 [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2023, 11 (2): e01060.
- [43] Dixit V, Hariparsad N, Li F, et al. Cytochrome p450 enzymes and transporters induced by anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors in human hepatocytes: implications for predicting clinical drug interactions [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35 (10): 1853-1859.
- [44] Fasinu PS, Gutmann H, Schiller H, et al. The potential of sutherlandia frutescens for herb-drug interaction [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41 (2): 488-497.
- [45] Li Q, Ye Z, Zhu P, et al. Indinavir alters the pharmacokinetics of lamivudine partially via inhibition of multidrug and toxin extrusion protein 1 (mate1) [J]. *Pharm Res*, 2018, 35 (1): 14.
- [46] Kosloski MP, Oberoi R, Wang S, et al. Drug-drug interactions of glecaprevir and pibrentasvir coadministered with human immunodeficiency virus antiretrovirals [J]. *J Infect Dis*, 2020, 221 (2): 223-231.
- [47] Ghasemiyeh P, Mortazavi N, Karimzadeh I, et al. Psychiatric adverse drug reactions and potential anti-COVID-19 drug interactions with psychotropic medications [J]. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20 (3): 66-77.
- [48] Alomar FA, Tian C, Bidasee SR, et al. Hiv-tat exacerbates the actions of atazanavir, efavirenz, and ritonavir on cardiac ryanodine receptor (ryr2) [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24 (1): 274.
- [49] Nascimento ALCS, Fernandes RP, Quijia C, et al. Pharmacokinetic parameters of HIV-1 protease inhibitors [J]. *Chem Med Chem*, 2020, 15 (12): 1018-1029.
- [50] Kambayashi A, Dressman JB. Predicting the changes in oral absorption of weak base drugs under elevated gastric ph using an in vitro-in silico-in vivo approach: case examples-dipyridamole, prasugrel, and nelfinavir [J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108 (1): 584-591.
- [51] He S, Østergaard J, Ashna M, et al. Microenvironmental ph modifying films for buccal delivery of saquinavir: effects of organic acids on ph and drug release in vitro [J]. *Int J Pharm*, 2020, 585: 119567.
- [52] Zhang G, Zhang X, Huang H, et al. Saquinavir plus methylprednisolone ameliorates experimental acute lung injury [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51 (10): e7579.

(收稿日期: 2023-01-02; 修回日期: 2023-03-08)

调控 T 细胞代谢在肿瘤免疫治疗中的研究进展

褚欣宇, 尹莉芳, 秦超* (中国药科大学药学院药剂系, 南京 211198)

摘要: T 细胞在抗肿瘤治疗中扮演着重要角色, 但当 T 细胞浸润肿瘤时, 它会受到肿瘤微环境 (TME) 中各种免疫抑制信号和各种代谢产物的影响, 导致其免疫功能失效。阐明 T 细胞在 TME 作用下的代谢重编程对改善肿瘤免疫治疗、寻找新的治疗策略至关重要。本文从 T 细胞代谢特征出发, 介绍了 TME 中多种影响 T 细胞代谢的因素, 并总结了各种针对代谢途径的免疫治疗策略。

关键词: T 细胞代谢; 肿瘤微环境; 肿瘤免疫治疗

中图分类号: R730.51

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1544-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.023

Progress in regulating T cell metabolism in tumor immunotherapy

CHU Xin-yu, YIN Li-fang, QIN Chao* (*Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

Abstract: T cells play an important role in anti-tumor therapy. However, when T cells infiltrate into tumor microenvironment, they are affected by various immunosuppressive signals and metabolites, leading to their immune dysfunction. It is very important to clarify the metabolic reprogramming of T cells under the tumor microenvironment to improve tumor immunotherapy and search for new therapeutic strategies. Based on the metabolism characteristics of T cell, this article introduced the factors affecting T cell metabolism in tumor microenvironment, and summarized various immunotherapy strategies targeting the metabolic pathways.

Key words: T cell metabolism; tumor microenvironment; tumor immunotherapy

新陈代谢是细胞的关键特征, 代谢反应控制着细胞的增殖、分化及效应功能的正常发挥。T 淋巴细胞, 也称 T 细胞, 是免疫系统最重要的免疫细胞, 可通过多种途径诱导肿瘤细胞发生凋亡, 抑制肿瘤的发生、发展^[1]。但在肿瘤的发展过程中, T 细胞会受肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 的影响, 发生广泛的代谢重编程, 这种重编程会抑制 T 细胞发挥抗肿瘤作用从而促进肿瘤进展^[2]。因此清楚地了解 T 细胞代谢特征及其在 TME 影响下的代谢重编程, 有助于从代谢途径中寻找抗肿瘤的有效靶标, 以开发新的抗肿瘤策略。

1 T 细胞代谢特征

在免疫细胞中, T 细胞代谢一直是热门的研究领域。T 细胞在增殖、分化的过程中会发生明显的代谢变化, 即氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 和糖酵解相互转换的代谢重塑现象^[3]。静止期的 T 细胞, 其代谢需求低, 低水平

的 OXPHOS 就可以满足其生长生存需求, 当遇到抗原时, 静止期 T 细胞被激活, T 细胞增殖、分化。静止期的抗原特异性 T 细胞数量很少, 因此快速增殖以产生足够数量的效应细胞尤为重要, T 细胞代谢需求也随之显著增加。与快速增殖的肿瘤细胞相似, T 细胞的代谢方式由低水平的 OXPHOS 转化为高水平的有氧糖酵解和谷氨酰胺代谢^[4]。在 T 细胞活化的过程中, 其细胞膜上的 T 细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR) 和白细胞分化抗原 28 (cluster differentiation 28, CD28) 诱导丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 激活, 葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter-1, GLUT-1) 表达增加, 活化的 T 细胞较未活化状态的葡萄糖摄取量高了 18 倍^[5]。蛋白激酶 B 控制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的激活, 调控原癌基因 *c-Myc*, 增加糖酵解酶的表达并上调谷氨酰胺水解作用, 用于细胞合成氨基酸、脂质和核酸。如果

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81871477)。

作者简介: 褚欣宇, 男, 硕士研究生, 主要从事纳米给药系统研究, email: 326726002@qq.com *通信作者: 秦超, 男, 副教授, 主要从事口服固体制剂、缓控释制剂、智能纳米微粒给药系统及产业化研究, email: nada77@163.com

T 细胞活化后未能上调代谢途径, 其表现为低反应表型, 在这种状态下, 即使是完全的抗原刺激也不能诱导 T 细胞反应, 由此可见, 代谢对 T 细胞免疫活性有着十分重要的意义^[6]。

在免疫反应后期, 绝大部分 T 细胞会发生凋亡, 部分 T 细胞分化为记忆 T 细胞, 它们的代谢方式也会由糖酵解转化为 OXPHOS。记忆 T 细胞的形成导致了比静止期 T 细胞更大的线粒体储备, 被称为备用呼吸能力 (spare respiratory capacity, SRC)^[7]。这种能量优势使得记忆 T 细胞较静止期 T 细胞具有更快速的抗原响应能力。记忆 T 细胞可以通过 Akt 依赖的方式切换到糖酵解, 与未激活的 T 细胞相比, 具有更高的糖酵解通量, 并引发糖酵解酶 (如 GAPDH) 上调^[8]。此外, 有研究表明, 记忆 CD8⁺ T 细胞利用细胞固有的脂肪氧化来支持发育所需的能量。肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 缺陷的 CD8⁺ T 细胞表现出脂肪酸代谢基因的抑制, 脂质氧化缺陷使其在免疫反应后期无法形成记忆 T 细胞^[9]。由此可见, 记忆 T 细胞较静止期 T 细胞有更多的代谢需求以满足其对抗原的快速响应。

2 TME 对 T 细胞功能的影响

T 细胞浸润到 TME 后, 会受到免疫抑制信号和各种代谢产物的影响。这些信号以免疫检查点和代谢检查点的方式影响 T 细胞功能, 促进肿瘤细胞免疫逃逸。

2.1 乳酸对 T 细胞的影响

Warburg 等^[10]发现即使在有氧条件下, 肿瘤组织依然主要通过糖酵解的代谢方式获取能量, 这就是著名的“Warburg 效应”。由于较高的有氧糖酵解速率, 大量乳酸从肿瘤细胞中输出, 导致 TME 中乳酸堆积。乳酸作为糖酵解产物会反馈抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路, 从而抑制 T 细胞糖酵解, 研究表明 20 mmol · L⁻¹ 以上的乳酸浓度会导致 T 细胞凋亡, 在一些肿瘤 (如黑色素瘤) 组织中乳酸浓度能达到 30 ~ 40 mmol · L⁻¹, 这也是肿瘤组织中 T 细胞比例较小的原因^[11]。乳酸处理细胞毒性 T 细胞后, JNK、c-Jun、p38 和 NFAT 磷酸化受阻, 导致细胞毒性 T 细胞功能受到抑制。同时, 乳酸还会阻止 T 细胞释放白细胞介素 -2 (IL-2) 和干扰素 (interferon, IFN) 等细胞因子, 从而显著减弱细胞毒性 T 细胞的杀伤效果^[12]。

2.2 低糖对 T 细胞的影响

肿瘤细胞与被激活的 T 细胞都利用有氧糖酵解获取能量, 葡萄糖是糖酵解的关键底物, 肿瘤细胞会通过竞争葡萄糖摄取来抑制 T 细胞功能。研究表明, 当环境中葡萄糖含量有限时, T 细胞会

通过降低 Akt 活性来减少其糖酵解通量^[13]。低糖环境还可以通过激活 B 淋巴细胞瘤 -2 家族蛋白诱导 T 细胞凋亡^[14]。Chang 等^[15]发现, 肿瘤通过竞争性摄取葡萄糖抑制肿瘤浸润 T 细胞的功能, 即使在足够的肿瘤抗原供 T 细胞识别的情况下仍然如此。肿瘤对微环境中葡萄糖的大量摄取会通过影响 T 细胞的代谢模式抑制 T 细胞的 mTOR 活性、糖酵解能力和 IFN- γ 的产生, 从而显著减弱 T 细胞的杀伤效果^[16]。此外, 依赖脂肪酸氧化获取能量的调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 在低糖环境下得以存活, 并对肿瘤特异性 T 效应细胞发挥免疫抑制作用^[17]。因此, 低糖是促进免疫抑制的重要原因之一。

2.3 低氨基酸对 T 细胞的影响

由于肿瘤组织快速增殖, TME 呈现出低氨基酸的特征, 尤其是谷氨酰胺 (glutamine, Gln)、精氨酸 (arginine, Arg) 和色氨酸 (tryptophan, Trp) 等, 均低于人体正常环境水平。Gln 是 T 细胞增殖活化最重要的营养物质, 其作用仅次于葡萄糖。T 细胞对 Gln 的外部供应有绝对需求, 并且其他氨基酸不能代替 Gln^[18]。Yaqoob 等^[19]研究发现, T 细胞激活过程中关键因子 IL-2 的产生、利用以及 IL-2 受体表达, 均与细胞外 Gln 浓度成正相关。

髓系抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 能够上调 I 型精氨酸酶 (arginase 1, ARG1) 和诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthases, iNOS) 介导的 Arg 消耗, 从而引起免疫抑制, 低 Arg 会诱导 CD3 ζ 链的丢失, 抑制 T 细胞的增殖和细胞因子的产生^[20]。iNOS 介导 L-精氨酸代谢产生过亚硝酸基能够使 T 细胞的 TCR 中许多酪氨酸残基发生硝化反应, 削弱 TCR 对于主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 的识别, 诱导免疫抑制^[21]。

由于肿瘤细胞和调节性免疫细胞表达的色氨酸代谢酶吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO) 增加, TME 中的 Trp 水平也较低。低水平 Trp 以及 Trp 代谢产物犬尿氨酸会使得 T 细胞变得无能并诱导 T 细胞凋亡^[22]。在 Treg 细胞中, 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4) 的表达促进 IDO1 的表达, IDO1 的表达又反过来促进了 CTLA-4 的表达, 两者相互促进导致了免疫逃逸^[23]。

2.4 缺氧微环境对 T 细胞的影响

肿瘤组织血管分布紊乱、结构异常导致血流量小、供氧不足, 同时快速增殖的肿瘤细胞需要消耗大量氧气以满足代谢, 氧供给和氧消耗之间的

不平衡导致了肿瘤缺氧。在缺氧条件下，缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 在多种类型的肿瘤中有着不同程度的表达，在乳腺、结肠、前列腺的癌前病变中过度表达^[24]。HIF-1 α 可以通过诱导肿瘤细胞表达 PD-L1 抑制 T 细胞功能^[25]，也可以通过诱导 Treg 细胞叉头蛋白转录因子 3 (forkhead box P3, FoxP3) 的表达增强 Treg 细胞的免疫抑制^[26]。HIF-1 α 通过调节糖酵解有关的酶和基因表达，导致肿瘤细胞糖酵解增加，乳酸增多，从而抑制 T 细胞增殖和功能^[27]。

2.5 TME 中其他细胞对 T 细胞的影响

TME 中除了肿瘤细胞和 T 细胞外，还存在多种细胞，它们以不同的方式影响着 T 细胞功能。TME 的酸性微环境会诱导巨噬细胞产生 ARG1，从而降低微环境中的 Arg 水平，产生 T 细胞抑制^[28]。此外，巨噬细胞还会释放 IL-10、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等免疫抑制因子，抑制 T 细胞的免疫应答^[29]。与正常成纤维细胞相比，肿瘤组织中的成纤维细胞具有较快的增殖能力，与 T 细胞竞争葡萄糖从而降低其肿瘤杀伤效果^[30]。MDSCs 可通过产生 ARG1、iNOS、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 以及消耗胱氨酸和半胱氨酸等途径抑制 T 细胞的激活和 T 细胞介导的抗肿瘤免疫^[31]。

3 针对代谢途径的免疫疗法

现代免疫治疗的主要目标是产生具有更强肿瘤杀伤性的效应 T 细胞及重新暴露于肿瘤抗原时具有更强的效应分化活力和可塑性的记忆 T 细胞，从而产生长期的抗肿瘤功能。由于代谢驱动 T 细胞分化，调控 T 细胞代谢有望增强其免疫功能，发挥长久的抗肿瘤作用。

3.1 嵌合抗原受体 T 细胞疗法直接调控 T 细胞代谢

嵌合抗原受体 T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞疗法是通过提取患者体内正常的 T 细胞，并将经基因工程编辑的嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 与 T 细胞整合培养，降低 T 细胞对代谢抑制物的敏感性，将培养成熟的 CAR-T 细胞输送回患者体内可以特异性攻击肿瘤，从而达到治疗目的。敲除 CAR-T 细胞中内源性 TGF- β 受体 II 可以降低 TGF- β 对 T 细胞代谢的影响，同时减少诱导的 Treg 转化，并证实其在细胞系来源的异种移植模型和患者来源的异种移植实体瘤模型中都有更好的肿瘤消除效果^[32]。在体外用 PI3K 抑制剂处理 CAR-T 细胞会导致分化程度较低的细胞在鼠的体内持久性和抗肿瘤活性得到改善，同时 PI3K 抑制作用使 T 细胞更多地分化为记忆 T 细胞，并且不会抑制 CAR-T 细胞增殖^[33]。此

外，针对 TME 中不同免疫抑制因素，可以设计多种 CAR-T 细胞用于抗肿瘤 (见表 1)。

表 1 肿瘤代谢相关的免疫抑制因素及提高 CAR-T 细胞代谢适应性的策略

Tab 1 Immunosuppressive factors related to tumor metabolism and strategies to improve the metabolic adaptability of CAR-T cells

抑制因素	提高 CAR-T 细胞代谢适应性
缺氧	选择适当的共刺激域 ^[34] 构建缺氧诱导型 CAR-T ^[35]
酸中毒	抑制乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) ^[36]
免疫抑制细胞	用 CAR-T 细胞靶向巨噬细胞 ^[37]
巨噬细胞	巨噬细胞表型转变 ^[38]
MDSCs	将 CAR-T 细胞与降低 MDSCs 含量的药物结合 ^[39-40] 靶向 MDSCs 的 CAR-T 细胞 ^[41-42]
免疫抑制细胞因子	嵌合不敏感受体 ^[43-44]
TGF- β 、IL-4、IDO	通过基因编辑破坏抑制性细胞因子受体 ^[45] 改造 CAR-T 细胞释放免疫促进细胞因子 ^[46-47] 联合抑制剂 ^[48]

3.2 基于肿瘤糖代谢调控 T 细胞代谢

肿瘤有氧糖酵解产生的大量乳酸塑造了免疫抑制酸性微环境，抑制糖酵解减少微环境乳酸堆积有望改善酸性微环境对 T 细胞的抑制作用。糖酵解的整个过程可以分为消耗能量的准备阶段和释放能量的放能阶段，有许多方法可以破坏糖酵解。最直接的方法是阻断葡萄糖转运蛋白，这将阻止葡萄糖进入肿瘤细胞，并导致糖酵解途径完全中断。根皮素、WZB117、Fasentin 等 GLUT 抑制剂在临床前模型中显示出抗肿瘤作用^[49]。另一种方法是靶向糖酵解过程中的关键酶，如己糖激酶 (hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase, PFK)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 等。酶抑制剂在临床前和临床上有了可观的疗效 (见表 2)。最后一种方法是抑制乳酸运出细胞，减弱微环境酸化，使肿瘤细胞酸中毒。单羧酸转运体 (monocarboxylate transports, MCTs) 家族包括了参与乳酸和其他单羧酸盐转运的质膜蛋白。其中 MCT4 通常被认为介导乳酸外流，多种肿瘤细胞高表达 MCT4，如乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤等。越来越多的研究表明抑制 MCT4 的表达和功能可以抑制肿瘤生长，改善 TME。Li 等^[50]制备了中空介孔有机二氧化硅纳米制剂用于递送 siRNA 沉默 MCT4 的表达，结果表明抑制 MCT4 的表达可减少乳酸的外流，细胞外乳酸浓度降低使肿瘤相关巨噬细胞表型极化为 M1 型，显著去除了免疫抑制微环境，恢复了 CD8⁺ T 细胞活性。

表 2 肿瘤糖酵解酶抑制剂及其机制

Tab 2 Tumor glycolytic enzyme inhibitors and their mechanisms		
靶点	药物	机制
HK	2-脱氧-D-葡萄糖	葡萄糖类似物, 竞争抑制 HK2 的活性 ^[51]
	3-溴丙酮酸	乳糖类似物, 将 HK2 中巯基烷基化而直接抑制 HK2 的活性 ^[52]
	氯尼达明	抑制 HK2 与线粒体结合 ^[53]
PFK	克霉唑	PFK1 与肌动蛋白丝解离 ^[54]
	3PO	特异性抑制 PFKFB3 ^[55]
PK	紫草素	特异性抑制 PKM2 ^[56]
	二甲双胍	激活 AMPK 下调 PKM2 ^[57]
LDH	FX11	乳酸脱氢酶 A (LDHA) 选择性抑制剂 ^[58]
	草氨酸钠	丙酮酸类似物, 竞争性结合 LDHA 而抑制其催化活性 ^[59]

3.3 基于肿瘤氨基酸代谢调控 T 细胞代谢

3.3.1 Gln 肿瘤细胞对 Gln 的依赖使 Gln 水解是一个有吸引力的肿瘤治疗靶点, 使用谷氨酰胺类似物治疗肿瘤的临床试验在几十年前就开始了, 但由于缺乏疗效或者有严重的毒性, 这些试验都被迫终止^[60]。这些化合物缺乏治疗窗口, 可能是由于它们的相对非特异性可能会使一整套利用 Gln 的酶受到影响。目前临床上针对 Gln 水解的研究主要集中在抑制谷氨酰胺酶。减少 Gln 水解或许可以调节 TME 中 Gln 含量, 减弱由于 Gln 缺乏对 T 细胞的损伤。Varghese 等^[61]研究发现谷氨酰胺酶抑制剂 CB-839 在过继 T 细胞治疗小鼠模型中可以激活黑色素瘤抗原特异性 T 细胞并增强它们的肿瘤杀伤活性。Xie 等^[62]设计构建了肿瘤细胞膜包裹的介孔二氧化硅纳米颗粒 CTTPA-G 用于共递送 I 型 AIE 光敏剂和 Gln 拮抗剂。Gln 拮抗剂可以抑制肿瘤 Gln 代谢, 逆转肿瘤缺氧和营养缺乏状态。经 CTTPA-G 处理后, 原发肿瘤的增殖被有效抑制, 同时 CTTPA-G 表现出类似于“癌症疫苗”的作用, 启动强大的抗肿瘤免疫应答, 协同抑制肿瘤增殖, 达到抑制肿瘤转移和诱导长时间免疫记忆的效果。

3.3.2 Trp 在 TME 中, 肿瘤细胞、间质细胞、树突状细胞和巨噬细胞中均高表达 IDO1, IDO1 可催化 Trp 代谢从而减少 TME 中 Trp 含量, 导致 Trp 耗竭并且生成免疫抑制的代谢产物。如犬尿氨酸被 T 细胞摄取后, 通过芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) 抑制 T 细胞浸润并诱导 PD-1 表达, 从而促进肿瘤进展^[63]。Zhang 等^[64]利用沸石咪唑骨架材料实现 IDO1 siRNA 和米托蒽醌共递送, 用含有 $\alpha\beta 1$ 整联蛋白的胶质瘤相关巨噬细胞膜赋予载体靶向性, 制备了可使肿瘤归巢的免疫纳米制剂从而增强 T 细胞免疫活性。目前, 研究发现 IDO 抑制剂中的两种 1-甲基-色氨酸 (1-methyl-tryptophan, 1-MT)^[65] 和

INCB024360^[66] 可以通过诱导 T 细胞增殖而在小鼠肿瘤模型中显示出抗肿瘤活性。

3.3.3 Arg 针对于 TME 中低水平 Arg 对 T 细胞的抑制, 有实验表明通过外源性补充 Arg 可以激活 T 细胞线粒体代谢, 具有良好的抗肿瘤作用, 保护 T 细胞免于衰竭, 促进 T 细胞增殖和活化^[67]。Zhang 等^[68]设计了一种多泡脂质体实现 Arg 的高效包封与缓释, 同时利用 shRNA 敲除 CAT-2 蛋白, 减少肿瘤对 Arg 的摄取。递送的 Arg 中和了酸性 TME, 同时为抗肿瘤免疫细胞提供了合适的生存环境和充足的营养。结果表明这种策略促进了 CD8⁺ T 细胞的浸润和活化, 抑制了黑色素瘤的生长, 延长了小鼠生存期。Arg 在 Arg 的催化下转化为尿素和鸟氨酸并进一步生成多胺, 导致了 Arg 的耗竭并产生免疫抑制。用 ARG1 抑制剂如 CB-1158 治疗可增加 CD8⁺ T 细胞在 TME 中的浸润, 刺激炎症细胞因子的产生^[69]。

4 展望

浸润到 TME 中的 T 细胞在各种免疫抑制信号和代谢产物的作用下, 发生广泛的代谢重编程, 严重影响其抗肿瘤免疫作用, 产生免疫抑制。基于此, 调控 T 细胞代谢或许可以成为肿瘤免疫治疗的靶点。目前大多数研究主要集中在以肿瘤代谢为靶点, 利用代谢抑制剂影响肿瘤细胞, 改变免疫抑制, 从而调控 T 细胞代谢, 促进其效应功能的发挥。由于肿瘤细胞代谢途径众多, 多种代谢旁路的代偿, 这种间接调控 T 代谢功能的效果不佳。CAR-T 细胞疗法作为可以直接调控 T 细胞代谢的方法, 也存在着细胞因子释放综合征、神经毒性等副作用。深入研究肿瘤各种代谢途径及 TME 中相关抑制信号与 T 细胞免疫之间作用, 并着眼于研究直接针对 T 细胞的药物, 有助于开发出高效的免疫增强药物。

参考文献

- [1] Wei J, Zheng WT, Chapman NM, et al. T cell metabolism in homeostasis and cancer immunity [J]. Curr Opin Biotechnol, 2021, 68: 240-250.
- [2] Xiang H, Yang RJ, Tu JX, et al. Metabolic reprogramming of immune cells in pancreatic cancer progression [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 157: 113992.
- [3] Soriano-Baguet L, Brenner D. Metabolism and epigenetics at the heart of T cell function [J]. Trends Immunol, 2023, 44 (3): 231-244.
- [4] Li F, Liu HL, Zhang D, et al. Metabolic plasticity and regulation of T cell exhaustion [J]. Immunology, 2022, 167 (4): 482-494.
- [5] Macintyre A, Gerriets V, Nichols A, et al. The glucose transporter GLUT1 is selectively essential for CD4 T cell activation

- and effector function [J]. *Cell Metabolism*, 2014, 20 (1): 61-72.
- [6] Steifensand F, Gallwas J, Bauerschmitz G, et al. Inhibition of metabolism as a therapeutic option for tamoxifen-resistant breast cancer cells [J]. *Cells*, 2021, 10 (9): 2398.
 - [7] Windt GJWVD, Everts B, Chang CH, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8⁺ T cell memory development [J]. *Immunity*, 2012, 36 (1): 68-78.
 - [8] Gubser PM, Bantug GR, Razik L, et al. Rapid effector function of memory CD8⁺ T cells requires an immediate-early glycolytic switch [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14 (10): 1064.
 - [9] Endo Y, Kanno T, Nakajima T. Fatty acid metabolism in T-cell function and differentiation [J]. *Int Immunol*, 2022, 34 (11): 579-587.
 - [10] Warburg O, Wind F, Negelein EI. The metabolism of tumors in the body [J]. *J Gen Physiol*, 1927, 8 (6): 519-530.
 - [11] Brand A, Singer K, Koehl GE, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells [J]. *Cell Metab*, 2016, 24 (5): 657-671.
 - [12] Mendler AN, Hu B, Prinz PU, et al. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131 (3): 633-640.
 - [13] Heiden MGV, Plas DR, Rathmell JC, et al. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21 (17): 5899-5912.
 - [14] Buchakjian MR, Kornbluth S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11 (10): 715-727.
 - [15] Chang CH, Qiu J, O' Sullivan D, et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression [J]. *Cell*, 2015, 162 (6): 1229-1241.
 - [16] Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells [J]. *Blood*, 2007, 109 (9): 3812-3819.
 - [17] Pacella I, Piconese S. Immunometabolic checkpoints of treg dynamics: adaptation to microenvironmental opportunities and challenges [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1889.
 - [18] Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 619-634.
 - [19] Yaqoob P, Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes [J]. *Nutrition*, 1997, 13 (7-8): 646-651.
 - [20] Rodriguez PC, Zez AH, Culotta KS, et al. Regulation of T cell receptor CD3 ζ chain expression by l-arginine [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (24): 21123-21129.
 - [21] Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (7): 828-835.
 - [22] Liu XH, Zhai XY. Role of tryptophan metabolism in cancers and therapeutic implications [J]. *Biochimie*, 2021, 182: 131-139.
 - [23] Zhai LJ, Ladomersky E, Lenzen A, et al. IDO1 in cancer: a gemini of immune checkpoints [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15: 447-457.
 - [24] Ma Z, Wang LZ, Cheng JT, et al. Targeting hypoxia-inducible factor-1-mediated metastasis for cancer therapy [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2021, 34 (18): 1484-1497.
 - [25] Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, et al. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2014, 74 (3): 665-674.
 - [26] 孙艳丽, 陈飞, 陈武. 缺氧诱导因子-1 α 及 Foxp3 在结直肠癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23 (5): 770-773.
 - [27] Zheng ZY, Xu T, Liu ZY, et al. Cryptolepine suppresses breast adenocarcinoma via inhibition of HIF-1 mediated glycolysis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113319.
 - [28] Cline GW, Eisenbarth SC, Chu NQ, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid [J]. *Nature*, 2014, 513: 559-563.
 - [29] Eubank TD, Roda JM, Liu HW, et al. Opposing roles for HIF-1 α and HIF-2 α in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes [J]. *Blood*, 2010, 117 (1): 323-332.
 - [30] Chang CH, Jing Q, O' Sullivan D, et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression [J]. *Cell*, 2015, 162 (6): 1229-1241.
 - [31] 郑重. 髓系抑制性细胞与肿瘤免疫逃逸 [J]. *现代免疫学*, 2007, 27 (4): 349-351.
 - [32] Tang N, Cheng C, Zhang XY, et al. TGF- β inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors [J]. *JCI Insight*, 2020, 5 (4): e133977.
 - [33] Zheng WT, O' hear CE, Alli R, et al. PI3K orchestration of the in vivo persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. *Leukemia*, 2018, 32 (5): 1157-1167.
 - [34] Teixeira A, Labiano S, Garasa S, et al. Mitochondrial morphological and functional reprogramming following CD137 (4-1BB) costimulation [J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6 (7): 798-811.
 - [35] Cui J, Zhang Q, Song Q, et al. Targeting hypoxia downstream signaling protein, CAIX, for CAR T-cell therapy against glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21 (11): 1436-1446.
 - [36] Hermans D, Gautam S, García-Caaveras J, et al. Lactate dehydrogenase inhibition synergizes with IL-21 to promote CD8⁺ T cell stemness and antitumor immunity [J]. *Proc of the Natl Acad Sci*, 2020, 117 (11): 201920413.
 - [37] Ruella M, Klichinsky M, Kenderian SS, et al. Overcoming the immunosuppressive tumor microenvironment of hodgkin lymphoma using chimeric antigen receptor T cells [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7 (10): 1154-1167.
 - [38] Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38 (8): 947-953.
 - [39] Di SM, Zhou M, Pan ZY, et al. Combined adjuvant of poly I: C improves antitumor effects of CAR-T cells [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 241.
 - [40] Fultang L, Panetti S, Ng M, et al. MDSC targeting with Gemtuzumab ozogamicin restores T cell immunity and immunotherapy against cancers [J]. *EBioMedicine*, 2019, 47: 235-246.
 - [41] Parihar R, Rivas C, Huynh M, et al. NK cells expressing a chimeric activating receptor eliminate MDSCs and rescue impaired CAR-T cell activity against solid tumors [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7 (3): 363-375.
 - [42] Kuhn NF, Purdon TJ, Van Leeuwen DG, et al. CD40 li-

- gand-modified chimeric antigen receptor T cells enhance antitumor function by eliciting an endogenous antitumor response [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35 (3): 473-488.
- [43] Zhang Q, Helfand BT, Carneiro BA, et al. Efficacy against human prostate cancer by prostate-specific membrane antigen-specific, Transforming growth factor-beta insensitive genetically targeted CD8⁺ T-cells derived from patients with metastatic castrate-resistant disease [J]. *Eur Urol*, 2018, 73 (5): 648-652.
- [44] Kloss CC, Lee J, Zhang A, et al. Dominant-negative TGF-beta receptor enhances PSMA-targeted human CAR T cell proliferation and augments prostate cancer eradication [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (7): 1855-1866.
- [45] Tang N, Cheng C, Zhang XY, et al. TGF-beta inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors [J]. *JCI Insight*, 2020, 5 (4): e133977.
- [46] Liu Y, Di SM, Shi BZ, et al. Armored inducible expression of IL-12 enhances antitumor activity of glypican-3-targeted chimeric antigen receptor-engineered T cells in hepatocellular carcinoma [J]. *J Immunol*, 2019, 203 (1): 198-207.
- [47] Chmielewski M, Abken H. CAR T cells releasing IL-18 convert to T-Bet (high) FoxO1 (low) effectors that exhibit augmented activity against advanced solid tumors [J]. *Cell Rep*, 2017, 21 (11): 3205-3219.
- [48] Ninomiya S, Narala N, Huye L, et al. Tumor indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs [J]. *Blood*, 2015, 125 (25): 3905-3916.
- [49] Akins NS, Nielson TC, Le HV. Inhibition of glycolysis and glutaminolysis: an emerging drug discovery approach to combat cancer [J]. *Curr Top Med Chem*, 2018, 18 (6): 494-504.
- [50] Li K, Lin CC, He Y, et al. Engineering of cascade-responsive nanoplatform to inhibit lactate efflux for enhanced tumor chemo-immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2020, 14 (10): 14164-14180.
- [51] Afonso J, Gonçalves C, Costa M, et al. Glucose metabolism reprogramming in bladder cancer: hexokinase 2 (HK2) as prognostic biomarker and target for bladder cancer therapy [J]. *Cancers*, 2023, 15 (3): 982.
- [52] Deng Y, Song PY, Chen XH, et al. 3-bromopyruvate-conjugated nanoplatform-induced pro-death autophagy for enhanced photodynamic therapy against hypoxic tumor [J]. *ACS Nano*, 2020, 14 (8): 9711-9727.
- [53] Wu C, Jiao QS, Wang CL, et al. Nanofibrillar peptide hydrogels for self-delivery of lonidamine and synergistic photodynamic therapy [J]. *Acta Biomater*, 2023, 155: 139-153.
- [54] Coelho RG, Calaca Ide C, Celestrini Dde M, et al. Clotrimazole disrupts glycolysis in human breast cancer without affecting non-tumoral tissues [J]. *Mol Genet Metab*, 2011, 103 (4): 394-398.
- [55] Emini VB, Perrotta P, Van WP, et al. Small molecule 3PO inhibits glycolysis but does not bind to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) [J]. *FEBS LETT*, 2020, 594 (18): 3067-3075.
- [56] Li J, Zhao M, Sun M, et al. Multifunctional nanoparticles boost cancer immunotherapy based on modulating the immunosuppressive tumor microenvironment [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12 (45): 50734-50747.
- [57] Liu MH, Zhang Z, Wang H, et al. Activation of AMPK by metformin promotes renal cancer cell proliferation under glucose deprivation through its interaction with PKM2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15 (3): 617-627.
- [58] Wu H, Wang YQ, Ying MF, et al. Lactate dehydrogenases amplify reactive oxygen species in cancer cells in response to oxidative stimuli [J]. *Signal Transduct Tar*, 2021, 6 (1): 242.
- [59] 何大伟, 何敖林, 周明慧, 等. 草氨酸钠对胆管癌细胞自噬与凋亡的影响 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40 (5): 403-408.
- [60] O'dwyer PJ, Alonso MT, Leyland-Jones B. Acivicin: a new glutamine antagonist in clinical trials [J]. *J Clin Oncol*, 1984, 2 (9): 1064-1071.
- [61] Varghese S, Pramanik S, Williams LJ, et al. The glutaminase inhibitor CB-839 (telaglenastat) enhances the antimelanoma activity of T-cell-mediated immunotherapies [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20 (3): 500-511.
- [62] Xie W, Chen B, Wen HF, et al. Biomimetic nanoplatform loading type I aggregation-induced emission photosensitizer and glutamine blockade to regulate nutrient partitioning for enhancing antitumor immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2022, 16 (7): 10742-10753.
- [63] Amobi-Mccloud A, Muthuswamy R, Battaglia S, et al. IDO1 expression in ovarian cancer induces PD-1 in T cells via aryl hydrocarbon receptor activation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 678999.
- [64] Zhang J, Chen C, Li A, et al. Immunostimulant hydrogel for the inhibition of malignant glioma relapse post-resection [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16 (5): 538-548.
- [65] Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism [J]. *Immunity*, 2002, 16: 769-777.
- [66] Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells [J]. *Immunity*, 2016, 44 (2): 380-390.
- [67] Satoh Y, Kotani H, Iida Y, et al. Supplementation of l-arginine boosts the therapeutic efficacy of anticancer chemioimmunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111 (7): 2248-2258.
- [68] Zhang JL, Wang SJ, Guo XM, et al. Arginine supplementation targeting tumor-killing immune cells reconstructs the tumor microenvironment and enhances the antitumor immune response [J]. *ACS Nano*, 2022, 16 (8): 12964-12978.
- [69] Steggerda SM, Bennett MK, Chen J, et al. Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment [J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5 (1): 1-18.

(收稿日期: 2023-02-02; 修回日期: 2023-04-14)

中药抑制脉络膜新生血管的研究进展

陈美琪¹, 杨嘉玮^{1, 2}, 王国平³, 朱思泉^{1, 4*} (1.成都中医药大学眼科学院, 成都 610084; 2.中医药眼病防治与视功能保护四川省重点实验室, 成都 610084; 3.成都中医大银海眼科医院, 成都 610084; 4.首都医科大学附属北京安贞医院, 北京 100029)

摘要: 脉络膜新生血管可见于多种眼底病, 会造成眼底渗出及出血, 可致盲。目前临床上治疗的主流方式是抗血管内皮生长因子 (VEGF), 但其价格昂贵且不能根治。我国中医药事业在治疗脉络膜新生血管相关疾病方面积累了宝贵经验, 本文就抑制脉络膜新生血管的中药组方代表及中药单体展开综述。

关键词: 脉络膜新生血管; 中医药; 中药单体; 实验研究

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1550-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.024

Research advances of traditional Chinese medicine for choroidal neovascularization

CHEN Mei-qi¹, YANG Jia-wei^{1, 2}, WANG Guo-ping³, ZHU Si-quan^{1, 4*} (1. Eye School of Chengdu University of TCM, Chengdu 610084; 2. Key Laboratory of Sichuan Province Ophthalmopathy Prevention & Cure and Visual Function Protection with TCM Laboratory, Chengdu 610084; 3. Ineye Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610084; 4. Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029)

Abstract: Choroidal neovascularization can be seen in many fundus diseases, and may lead to fundus exudation, bleeding, and blindness. At present, anti-VEGF is the primary clinical treatment, yet it is high in price and cannot be cured radically. Chinese medicine has accumulated valuable experiences in the treatment of choroidal neovascularization. This paper reviewed representative Chinese herbal formulas and Chinese herb monomers for choroidal neovascularization.

Key words: choroidal neovascularization; traditional Chinese medicine; Chinese herb monomer; experiment research

脉络膜新生血管 (CNV) 好发于黄斑区, 可致严重的视力丧失, 预后不佳^[1]。其常见于年龄相关性黄斑变性 (AMD)、中心性浆液性脉络膜视网膜病变 (CSC)、病理性近视 (PM) 等眼底病。流行病学调查结果显示, 到 2040 年全球 AMD 患者预计可达 3 亿人^[2], 成为第三大致盲性眼病。随着人口老龄化加速, 我国的 AMD 患者已超过 600 万^[3], 严重威胁社会经济与公共卫生。而 CNV 发病机制尚不明确, 目前研究表明与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和抑制因子间的平衡破坏^[4]、氧化应激^[5]、炎症反应及

各种炎症因子的释放^[6-7]等有关。临床上抑制 CNV 有玻璃体腔注射抗 VEGF 药物^[8]、激光光凝术、光动力疗法 (PDT) 等, 但都存在一定局限性^[9]。联合中医药治疗眼部疾病, 具有经济效益高、缩短病程、降低复发率等优势^[10-12], 而从中草药中提取的活性成分——中药单体, 同时具备了化学药物与中药的特点。本文综述了抑制 CNV 的中药组方及中药单体, 意在为临床用药的研发筛选奠定理论根基、提供全新思路。

1 中药组方抑制 CNV

祖国医学根据 CNV 的临床表现视其为“暴

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.52073181)。

作者简介: 陈美琪, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中西医结合防治眼科疾病的临床研究, email: 1065585516@qq.com * 通信作者: 朱思泉, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事白内障防治方面的研究, email: siquanzhu@qq.com

盲”“视瞻有色”“视瞻昏渺”，其病机以肝、脾、肾亏虚为本，瘀、痰、湿为标^[13]。目络通畅、气血充实是视瞻的基础，目中络脉瘀阻、气血津液失调、阻碍气机，导致痰瘀互结、气滞痰凝，故目络失养、视瞻障碍。本虚标实之证，治疗上以补益肝肾为主，施以化瘀、豁痰、益气、通络等法贯穿。临床上针对 CNV 已有多种中药组方辨证施治。

王静文等^[14]选取归芍地黄汤联合康柏西普治疗 PM 继发性 CNV，发现联合治疗可以减轻 CNV 引起的黄斑水肿（CME），改善视网膜循环，增强对 CNV 的治疗作用。一项随机、双盲、多中心临床试验^[15]予止血祛瘀明目片联合雷珠

单抗注射治疗 144 例湿性年龄相关性黄斑变性（nAMD）患者，发现止血祛瘀明目片有利于改善 CNV 引起的眼内炎症反应及出血、渗出，无明显的全身及眼部不良事件。另有研究发现和血明目片联合雷珠单抗治疗 nAMD 患者的眼底出血、改善视力、CME 作用更强，但是在抑制新生血管生长及渗漏方面优势不明显^[16]。

此外，临床上亦有凉血化瘀方^[17]、健脾化浊方^[18]等联合抗 VEGF 药物治疗 CNV 相关疾病的方案，有着不错的临床疗效，减轻了患者的经济负担。明睛颗粒（凉血化瘀方成药）联合抗 VEGF 治疗 nAMD 的临床试验也即将开展^[19]。近年来中药组方治疗 CNV 相关疾病总结见表 1。

表 1 中药组方抑制 CNV 的观察指标及机制研究
Tab 1 Observation index and mechanism research of formula traditional Chinese medicine for CNV

中药组方	组成	观察指标变化	机制
归芍地黄汤 ^[14]	生地黄、熟地黄、山药、丹皮、泽泻、茯苓、山茱萸、当归、白芍、生蒲黄、墨旱莲	1、3、6 月最佳矫正视力（BCVA）、黄斑中央视网膜厚度（CMT）改善优于对照组，抗 VEGF 次数减少	调节基质金属蛋白酶（MMP）-2、MMP-9 表达，降低 VEGF 水平，增加色素上皮衍生因子（PEDF）表达，促使 CNV 消退
止血祛瘀明目片 ^[15, 20]	三七、丹参、赤芍、黄芩、百合、大黄、墨旱莲、地黄、牡丹皮、女贞子、益母草、毛冬青	24 周联合用药组显著减少视网膜出血、改善视网膜中央厚度（CRT）、荧光素眼底血管造影（FFA）渗漏，减轻患者经济负担	下调 CD4 ⁺ T 细胞中 C-X3-C 趋化因子受体（CX3CR1）的表达，调节免疫应答
和血明目片 ^[16, 21]	蒲黄、丹参、地黄、墨旱莲、菊花、黄芩（炒炭）、决明子、车前子、茺蔚子、女贞子、夏枯草、龙胆、郁金、木贼、赤芍、牡丹皮、山楂、当归、川芎	联合治疗提高视力，减轻 CME，减少出血面积效果更佳，组间差异明显	尚未明确，可能调控与 MMP-9、白细胞介素 -6（IL-6）、IL-1 β 等炎症因子有关
凉血化瘀方 ^[17, 22]	生蒲黄、姜黄、女贞子、当归、川芎、丹参、大蓟、小蓟、茜草、生黄芪、生侧柏叶、枸杞子、川牛膝、三七	观察组较对照组视力提高，CRT 稳定维持期更久，平均抗 VEGF 注射次数更少	减少 VEGF 表达，诱导巨噬细胞向 II 型转化，上调 PEDF 表达
健脾化浊方 ^[18]	太子参、茯苓、薏苡仁、昆布、生蒲黄、炒蒲黄、三七粉、郁金、石决明	与对照组比较，给药组 BCVA 改善更有效，CMT 减少更多，注射次数更少，但在视网膜下大出血及消退息肉方面两组间无差异	尚未明确

2 中药单体抑制 CNV 的机制

2.1 丹参酮 II A

丹参酮 II A 是从丹参中提取的一种二萜醌类脂溶性活性成分，具有抗炎、抗血管生成、抗氧化的作用。Alzhrani 等^[23]发现丹参酮 II A 降低了氯化钴（CoCl₂）诱导缺氧条件下人视网膜色素上皮细胞株 -19（ARPE-19）的 VEGF 和缺氧诱导因子 1 α （HIF-1 α ）水平。同样郝雪莲等^[24]在 532 nm 倍频 Ng: YAG 激光诱导棕色挪威（BN）大鼠 CNV 的动物模型中，发现丹参酮 II A 磺酸钠注射液可减少 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白的表达。目前认为缺氧是引起 CNV 的重要因素，低氧环境诱发

的 HIF-1 信号通路可进一步诱导血管生成、细胞自噬、炎症反应等改变。而缺血、缺氧、炎症等状态下促使 VEGF 表达升高，进而促进病理性新生血管的产生。故丹参酮 II A 减少 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白的表达，抑制 CNV 生长与形成。

2.2 姜黄素

姜黄素（curcumin）是从姜科植物姜黄、莪术、郁金中提取的一种脂溶性酚类物质，具有抗氧化、抗新生血管生成、抗炎、抗肿瘤等作用。姜黄素在眼科应用广泛，尤其是眼部新生血管类疾病，如角膜新生血管、视网膜新生血管、CNV 等。CNV 的生成与血管基质的降解、内皮细胞的增殖

与移行、细胞外基质的降解息息相关。以往文献报道证明,其机制与蛋白激酶 B (AKT) 通路、活性氧 (ROS) 通路有关^[25-26]。陈水龄等^[27]发现姜黄素可以抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 细胞迁移、侵袭及管腔形成,以及姜黄素配制溶液 [400 mg/(kg·d)] 灌胃的 CNV 大鼠 AKT、磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT)、HIF-1 α 、VEGF 较模型组降低^[28]。曹黎等^[29]发现姜黄素能抑制氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的 ROS 形成,减轻细胞内氧化应激反应,减少细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 的生成。ox-LDL 会干扰 MMP 间的动态平衡,上调 MMP-9 表达且提高其活性,下调基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 表达,破坏血管壁基底膜及 Bruch 膜,促进 CNV 形成。故姜黄素可以通过减少 ox-LDL 的产生^[30],减轻血管炎症反应^[31];此外,姜黄素还能通过抑制 Wnt/ β -蛋白信号通路作用于 CNV^[32]。

2.3 川芎嗪

川芎嗪别名四甲基吡嗪,是从伞形科藁本植物川芎根茎提取的一种生物碱。川芎嗪具有改善血液循环、抗血栓、修复缺血再灌注、镇痛、解毒等作用。Zou 等^[33]发现川芎嗪可减小 CNV 病灶大小、抑制 FFA 荧光素渗漏,并且明显抑制 HUVECs 的生长。此外,川芎嗪可以降低 VEGF 水平^[34],降低单核细胞趋化因子 1 (MCP-1)、ICAM-1 表达,减少 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤^[35],减轻氧化应激、抑制内皮细胞凋亡^[36]。

2.4 人参皂苷 Rg₃

人参皂苷 Rg₃ 是提取自五加科草本植物人参的一种二醇四环三萜类皂苷,现代医学已证明人参皂苷 Rg₃ 具有抗炎、抗血管形成、抗肿瘤、保护神经等药理活性。褚文丽等^[37]通过 CCK-8 法发现人参皂苷 Rg₃ 对 VEGF 诱导的猴脉络膜视网膜内皮细胞 (RF/6A) 增殖、管腔形成有抑制作用,高剂量组人参皂苷 Rg₃ 能够下调肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、核因子- κ B (NF- κ B)、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达。卢悦等^[38]发现人参皂苷 Rg₃ 给药 (100.0 μ mol·L⁻¹) 可以明显抑制 HUVECs 生长增殖、小管生成及 VEGF 表达,减少 CNV 渗漏面积。炎症与 CNV 关系密切,巨噬细胞、中性粒细胞等激活后释放 TNF- α 、IL-6 和 ICAM 等多种炎症介质。TNF- α 表达增多可以上调 ICAM、VEGF,亦可激活 NF- κ B 信号通路介导的系列炎症反应,促进血管新生。因此,人参皂苷 Rg₃ 可以通过减轻炎症反应、下调 VEGF 作用于 CNV,此外,还可以影响血管内皮糖酵解^[39],降

低自发性高血压大鼠 (SHR) 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、TNF- α 、IL-6 水平^[40]。

2.5 三七总皂苷

三七总皂苷是从三七中提取的活性成分,其包含数种单体皂苷,如三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 等。三七总皂苷具有抗血管生成、抗血管粥样硬化、降血压、防止血栓形成、抗炎等作用。既往研究表明, PEDF 可以抑制异常的新生血管,其表达缺乏可诱发 CNV^[41]。Lu 等^[42]发现人参皂苷 Rb₁ (10 nmol·L⁻¹) 可以增加 PEDF 蛋白表达,降低在内皮细胞中高表达的 miR-33a RNA 的水平,并且通过过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR- γ) 信号通路发挥抗血管生成作用。彭芬等^[43]通过玻璃体腔注射 1 μ L 三七总皂苷研究在氧诱导的新生小鼠视网膜病变模型 (OIR),发现其 VEGF 蛋白表达显著下降。除此之外,三七总皂苷还可以降低血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1),调控 MMP-9、MMP-1^[44],下调 TNF- α 、IL-6、IL-1 β ^[45]。

2.6 柚皮素

柚皮素是一种提取自芸香科植物的二氢黄酮类化合物,具有广泛的药理活性,如抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化等^[46]。诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 与环氧合酶-2 (COX-2) 可以激活 NF- κ B 信号通路。iNOS 活性增高可以诱导 VEGF 表达,COX-2 亦是 VEGF 上游因子之一,可调控血管新生。吉洁等^[47-48]发现柚皮素磷脂复合物 (NPC) 腹腔注射 CNV 大鼠,可以下调 VEGF、MMP-2、MMP-9、iNOS、COX-2、NF- κ B 的表达,且作用强于柚皮素组,NPC 在抑制 CNV 形成上显示出更高的生物活性;之后又通过串联质谱标签 (TMT) 技术分析其蛋白质组学和生物信息学,发现差异蛋白功能主要表现在抗氧化活性、转录调节、催化活性等方面,为 NPC 抑制 CNV 的机制提供理论基础。

2.7 黄芩苷

黄芩苷是黄芩干燥根茎中含量极高的一种黄酮类成分,属双子叶唇形科植物,具有抗炎、抗抑郁、抗动脉粥样硬化、治疗糖尿病及其并发症等作用^[49]。有研究表明,当胃内给药黄芩苷时可穿透血眼屏障到达眼睛,可治疗眼科相关疾病如糖尿病视网膜病变^[50]。血小板衍生生长因子 (PDGF) 可以增加细胞外基质积聚,在炎症反应中发挥趋化作用,同时具有血管活性效应。Yang 等^[51]发现 5 nmol 黄芩苷抑制小鼠 CNV 面积作用较贝伐单抗组更强,并且显著下调 PDGF、VEGF、MMP-2 的表达。木蝴蝶,同属黄酮类

化合物, 含有木蝴蝶苷 B、野黄芩素、黄芩苷等。研究发现木蝴蝶苷 B 可以抑制 VEGF 诱导的 HUVECs 增殖^[52], 郑金华^[53]发现木蝴蝶提取物可以减少 CNV 的面积以及 VEGF 的表达。

2.8 白藜芦醇

白藜芦醇是一种多酚类化合物, 可提取自虎杖、藜芦、决明子等中药, 具有抗肿瘤、保护心血管、抗炎、免疫调节等药理作用^[54]。白藜芦醇在眼科疾病的应用也十分广泛, 对白内障^[55]、AMD^[56]、青光眼^[57]、糖尿病视网膜病变^[58]具有一定的防治作用。张惠明等^[59]发现白藜芦醇可以抑制 CNV 小鼠血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 磷酸化来控制 CNV 生长。作为 AMD 的危险因素之一, 香烟烟雾可上调 VEGF, 促进 CNV 形成。而白藜芦醇可以抑制香烟烟雾成分——对苯二酚对视网膜色素上皮细胞 (RPE) 的氧化应激以及 ROS 的产生^[60-61], 减少 RPE 细胞释放 MCP-1、IL-8^[62], 改善炎症反应。

Courtat 等^[63]发现 omega-3 (ω 3) 脂肪酸和反式白藜芦醇组成的 Resvega 营养制剂下调 VEGF, 并多效调控血管生成的关键因子, 如磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN)、程序性细胞死亡因子 10 (PDCD10)、信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 等。

2.9 其他

另有一些中药单体也会影响 CNV 的生长发育。槲皮素可以治疗小鼠 AMD^[64], 保护视网膜, 通过调控整合素抑制 CNV 形成^[65]。雷公藤甲素 (TP) 可以减少 VEGF、ICAM-1、TNF- α 表达^[66], 抑制血管内皮细胞增殖和迁移, 从而抑制 CNV 形成^[67]。最新研究阐明, 雷公藤甲素负载聚乙二醇化的纳米脂质体作为一种新型给药系统增强了雷公藤甲素抑制 CNV 的作用^[68]。而甘草查尔酮 A 可能是通过 PI3K/AKT 通路抑制内皮-间充质转化而发挥 CNV 抑制作用的^[69]。有关中药单体抗 CNV 的作用及机制研究见表 2。

表 2 中药单体抑制 CNV 的观察指标及机制研究

Tab 2 Observation index and mechanism research of Chinese herb monomers for CNV

中药单体	来源	观察指标变化	机制
丹参酮 II A ^[23-24]	丹参	丹参酮 II A 使 ARPE-19 细胞 VEGF、HIF-1 α 水平呈剂量依赖性下降; 丹参酮组的小鼠 CNV 荧光素渗漏平均光密度较模型组降低 ($P < 0.05$)	减少 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白的表达, 抑制新生血管内皮细胞增殖和迁移
姜黄素 ^[25-32, 70]	姜黄、莪术根、郁金	与模型组比较, 姜黄素 (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 使 AKT、HIF-1 α 、p-AKT 和 VEGF 表达显著降低 ($P < 0.05$); 姜黄素高剂量组 [400 mg/(kg $\cdot$ d)] 小鼠 CNV 荧光素渗漏平均光密度 (149.22 $\pm$ 6.45) 较模型组 (182.12 $\pm$ 6.59) 显著降低, 其 CRT、AKT、p-AKT、HIF-1 α 、VEGF 因子表达显著减少 ($P < 0.05$)	通过阻碍 NF- κ B 和 HIF-1 α 信号通路的激活, 抑制 F4/80 阳性巨噬细胞和 GR-1 阳性粒细胞浸润, 降低 TNF- α 、ICAM-1、VEGF 及 MCP-1 表达; 抑制 AKT 通路、下调 p-AKT; 抑制 ox-LDL 诱导 ROS 产生; 通过控制 Wnt/ β 蛋白信号通路激活抑制 TNF- α 、IL-1、IL-6 表达
川芎嗪 ^[33-36]	川芎	川芎嗪 (300、100、30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 使 HUVECs 减少率分别为 53.7%、35.8% 和 22.9% ($P < 0.05$), 川芎嗪组 (40 mg $\cdot$ kg $^{-1}$) 小鼠 FFA 的 CNV 病变大小 (1.77 $\pm$ 0.10) mm ² 较对照组 (2.69 $\pm$ 0.24) mm ² 降低 ($P < 0.05$), 且川芎嗪组渗漏点减少的大鼠数量 ($\leq 75\%$) 显著增加 ($P < 0.05$)	降低 VEGF 水平及 MCP-1、ICAM-1 表达, 减少 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤, 减轻氧化应激、抑制内皮细胞凋亡
人参皂苷 Rg ₃ ^[37-38]	人参	对照组及人参皂苷 Rg ₃ 组 (100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) HUVECs 小管形成数目为 (72.5 $\pm$ 5.56) 个、(11.33 $\pm$ 3.71) 个 ($P < 0.01$), VEGF 蛋白表达人参皂苷 Rg ₃ 组为 (0.14 $\pm$ 0.01) 低于对照组 (0.46 $\pm$ 0.01) ($P < 0.01$); CNV 中央厚度人参皂苷 Rg ₃ 高剂量组 (32.79 $\pm$ 2.28) μm 、中剂量组 (41.93 $\pm$ 4.68) μm , 均低于模型组 (56.90 $\pm$ 1.03) μm , 荧光素渗漏平均光密度高剂量组 (90.52 $\pm$ 3.31)、中剂量组 (103.56 $\pm$ 10.97) 均较模型组 (143.56 $\pm$ 11.75) 降低 ($P < 0.05$)	抑制 HUVECs 增殖、迁移和小管形成, 降低 TNF- α /NF- κ B、HIF-1 α /VEGF 信号通路的激活, 影响血管内皮糖酵解、抑制血管生成
三七总皂苷 ^[42-43]	三七	人参皂苷 Rb ₁ (10 nmol $\cdot$ L $^{-1}$) 处理 HUVECs 随时间依赖性增加 PEDF 蛋白的表达, 处理 4 h 后降低 50% 的 miR-33a 的水平	增加 PEDF 表达、降低 miR-33a 的水平, 下调 VEGF
柚皮素 ^[47-48]	枳壳、胡柚皮、橘子	对照组 FFA 渗透范围占总光凝数的 93.75%, NPC 低、中、高组分别为 74.47%、62.5%、54.68%, 光凝 4 周后 CNV 形成率差异均有统计学意义; 干预后大鼠 CNV 面积对照组为 (34.32 $\pm$ 1.73), NPC 低、中、高组分别为 (18.17 $\pm$ 1.35)、(15.34 $\pm$ 1.37)、(13.47 $\pm$ 1.22) ($P < 0.05$), 三组 iNOS、COX-2、VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平较对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)	下调 COX-2、iNOS 活性, 抑制 NF- κ B 通路激活, 降低 VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达, 抑制新生血管的形成

续表 1

中药单体	来源	观察指标变化	机制
黄芩苷 ^[51-53]	黄芩、木蝴蝶	黄芩苷 1.25 nmol · μL ⁻¹ 治疗大鼠 CNV 病变的渗漏与对照组相比明显减少, FFA 渗漏评分 (1.4±0.52) 较对照组 (2.6±0.52) 有所下降, 黄芩苷组 CNV 面积减少 (0.03±0.02) mm ² , 而对照组 CNV 面积增加 (0.06±0.02) mm ² , 黄芩苷显著减弱了 CNV 诱导的 VEGF、PDGF 和 MMP-2 上调	下调 VEGF、PDGF、MMP-2 的表达
白藜芦醇 ^[59-63]	虎杖、藜芦、决明子	与对照组相比, RSV 组 FFA 渗漏、CNV 体积与面积分别减少了 41%、45% 和 58% (P < 0.05), RSV 小鼠的 CNV 病变切片中磷酸化 VEGFR2 的表达更弱 (P < 0.05)	抑制内皮细胞迁移及阻断 VEGFR2 磷酸化来控制 CNV 生长; 下调 VEGF, 改善氧化应激, 减少 ROS、MCP-1、IL-8 产生, 改善炎症反应
槲皮素 ^[65]	丹皮、菊花、刺五加、车前子	槲皮素 (50 μmol · L ⁻¹) 抑制 HUVECs 增生及迁移, 槲皮素 [20 mg/(kg · d)] FFA 检查 CNV 渗漏面积较模型组更低 (P = 0.00)。槲皮素干预 24 h 整合素 α5 和整合素 β3 蛋白较模型组降低 (P < 0.05)	抑制整合素 α5 和整合素 β3 蛋白高表达, 减少与细胞外基质连接
雷公藤甲素 ^[66-68]	雷公藤	与对照组视网膜下纤维化区域和视网膜下纤维化率相比, 游离 TP 组、TP 负载聚乙二醇化的纳米脂质体组显著减少 (P < 0.05)	减少 VEGF、ICAM-1、TNF-α 表达, 抑制 M2 巨噬细胞极化和 TGF-β1 诱导的上皮间质转化 (EMT)/内皮间质转化 (EndMT), 抑制 CNV 引起的视网膜下纤维化
甘草查尔酮 A ^[69]	甘草	与对照组相比, 甘草查尔酮 A 组 (5、10 mg · kg ⁻¹) 3 级激光病变的百分比显著下降, CNV 面积更少, p-PI3K、p-AKT 显著降低	通过 PI3K/AKT 通路抑制内皮-间充质转化抑制 CNV

3 结语

针对 CNV 相关眼科疾病, 中药组方联合抗 VEGF 的治疗方案显示出优势^[18, 71]。但中药组方含有多重中药, 涉及多靶点、多通路, 作用机制难以阐明, 不利于中药国际化及标准化。中药单体较中药复方成分单一, 有明确的化学药物结构, 较传统药物开发周期更短、更高效^[72], 为特异性治疗 CNV 药物提供更多选择。但目前单体研究多停留在细胞、动物实验阶段, 亦存在一些单体成药性差、生物利用度较低、直接作用靶点尚未确定等局限。因此, 未来中医药治疗 CNV 相关疾病需要结合氧化应激、血管新生、炎症反应等角度深入研究其作用机制, 利用现代计算机模拟分子-对接技术, 探索单体分子结合位点及活性产生的原因, 通过靶向纳米制剂研究提高中药单体生物学效应, 开展多中心、大规模中药组方及单体的临床试验, 以评估其适用剂型与剂量、疗效、安全性与稳定性, 并联合抗 VEGF 治疗以期获得长远的治疗目标及更高的经济效应, 为临床治疗 CNV 相关疾病开辟更广阔的道路。

参考文献

[1] Atmaca L, Aysun I, Pelin A. Laser treatment in 341 patients with exudative age-related macular degeneration [J]. Int J Ophthalmol Engl Ed, 2011, 4 (1): 73-77.
[2] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration [J]. Lancet (London, England), 2018,

392 (10153): 1147-1159.
[3] 孙子雯, 汤垌, 陈晨, 等. 年龄相关性黄斑变性的发病机制与抗氧化治疗 [J]. 国际眼科杂志, 2020, 20 (3): 468-471.
[4] Van Bergen T, Etienne I, Cunningham F, et al. The role of placental growth factor (PlGF) and its receptor system in retinal vascular diseases [J]. Prog Retinal Eye Res, 2019, 69: 116-136.
[5] Cui KX, Liu J, Huang LL, et al. Andrographolide attenuates choroidal neovascularization by inhibiting the HIF-1α/VEGF signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 530 (1): 60-66.
[6] Yang Y, Liu F, Tang M, et al. Macrophage polarization in experimental and clinical choroidal neovascularization [J]. Sci Rep, 2016, 6: 30933.
[7] Kim J, Kim JH, Do JY, et al. Key role of microglial matrix metalloproteinases in choroidal neovascularization [J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 638098.
[8] Richard F, Glenn J, David S, et al. Consensus nomenclature for reporting neovascular age-related macular degeneration data: consensus on neovascular age-related macular degeneration nomenclature study group [J]. Ophthalmology, 2020, 127 (5): 616-636.
[9] Ishikawa M, Jin D, Sawada Y, et al. Future therapies of wet age-related macular degeneration [J]. J Ophthalmol, 2015, 2015: 138070.
[10] 宿晓娟. 理气化痰通络法联合抗 VEGF 治疗息肉样脉络膜血管病变的临床疗效观察 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
[11] 苏墨霖. 中西医结合治疗前葡萄膜炎临床疗效分析 [J]. 基层医学论坛, 2020, 24 (8): 1134-1136.

- [12] Long P, Yan WM, Liu JW, et al. Therapeutic effect of traditional Chinese medicine on a rat model of branch retinal vein occlusion [J]. *J Ophthalmol*, 2019, 2019: 9521379.
- [13] 罗晓燕, 徐朝阳. 中药治疗近视的理法方药初探 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2019, 29 (5): 384-387.
- [14] 王静文, 黄燕灵, 徐朝阳, 等. 归芍地黄汤加减联合康柏西普治疗病理性近视继发脉络膜新生血管 32 例 [J]. *福建中医药*, 2022, 53 (2): 12-14.
- [15] Jin M, Dai H, Zhang X, et al. A traditional Chinese patent medicine ZQMT for neovascular age-related macular degeneration: a multicenter randomized clinical trial [J]. *Curr Mol Med*, 2018, 18 (9): 622-629.
- [16] 武静, 杨林青, 郝丽莎. 和血明目片治疗湿性年龄相关性黄斑变性的临床观察 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2020, 30 (8): 554-557.
- [17] 江伟. 凉血化瘀方治疗湿性老年性黄斑变性回顾性临床研究及作用机制探讨 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2012.
- [18] 范文娜. 健脾化浊方联合抗 VEGF 3 + PRN 治疗息肉状脉络膜血管病变的临床研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [19] Li Y, Liang L, Snelling T, et al. Mingjing granule, a traditional Chinese medicine in the treatment of neovascular age-related macular degeneration: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2021, 22 (1): 69.
- [20] Yang L, Meng H, Luo D, et al. Inhibition of experimental age-related macular degeneration by ZQMT in mice [J]. *Curr Mol Med*, 2019, 19 (6): 434-442.
- [21] 席玉婕, 高锦成, 郭非非, 等. 基于网络稳健性的和血明目片潜在适应证预测 [J]. *世界中医药*, 2022, 17 (7): 912-920.
- [22] 唐由之, 王慧娟, 冯俊. 凉血化瘀方对实验性脉络膜新生血管 VEGF 与 PEDF 表达的影响 [J]. *眼科新进展*, 2009, 29 (12): 881-885.
- [23] Alzhrani RM, Alhadidi Q, Bachu RD, et al. Tanshinone II A inhibits VEGF secretion and HIF-1 α expression in cultured human retinal pigment epithelial cells under hypoxia [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42 (12): 1667-1673.
- [24] 郝雪莲, 亢泽峰, 陈水龄, 等. 丹参酮 II A 对 BN 大鼠脉络膜新生血管 HIF-1 α 和 VEGF 表达的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2020, 30 (3): 166-170, 184.
- [25] Seong H, Ryu JY, Jeong JY, et al. Resveratrol suppresses vascular endothelial growth factor secretion via inhibition of CXC-chemokine receptor 4 expression in ARPE-19 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (1): 1479-1484.
- [26] Ma JF, Von Kalle M, Plautz Q, et al. Relaxin promotes in vitro tumour growth, invasion and angiogenesis of human Saos-2 osteosarcoma cells by AKT/VEGF pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17 (10): 1345-1350.
- [27] 陈水龄, 亢泽峰, 褚文丽, 等. 姜黄素通过 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路在体外抑制脉络膜新生血管的机制 [J]. *国际眼科杂志*, 2022, 22 (4): 541-548.
- [28] 陈水龄. 姜黄素抑制实验性脉络膜新生血管的机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [29] 曹黎, 张冬颖, 刘剑. 姜黄素对氧化性低密度脂蛋白诱导的内皮细胞迁移能力的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40 (11): 1470-1475.
- [30] Mahfouz MM, Zhou SQ, Kummerow FA. Curcumin prevents the oxidation and lipid modification of LDL and its inhibition of prostacyclin generation by endothelial cells in culture [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 2009, 90 (1-2): 13-20.
- [31] 黄颖, 陈运贞, 王周碧. 不同类型氧化型脂蛋白对血管内皮细胞、单核细胞 NF κ B 和 PPARs 的作用 [J]. *重庆医科大学学报*, 2003, 28 (5): 576-579.
- [32] Vallée A. Curcumin and Wnt/ β -catenin signaling in exudative age-related macular degeneration (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49 (6): 79.
- [33] Zou YH, Jiang W, Chiou GC. Effect of tetramethylpyrazine on rat experimental choroidal neovascularization in vivo and endothelial cell cultures in vitro [J]. *Curr Eye Res*, 2007, 32 (1): 71-75.
- [34] 王乾, 刘岩, 林慧, 等. 盐酸川芎嗪对 NPDR 患者视力血管内皮功能的影响 [J]. *河北医学*, 2019, 25 (8): 1273-1276.
- [35] 王国峰, 陆峰, 赵霞, 等. 川芎嗪对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2012, 14 (3): 306-309.
- [36] 杨春昆, 潘清泉, 吉奎, 等. 川芎嗪对心血管的保护机制综述 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48 (6): 1446-1454.
- [37] 褚文丽. 人参皂苷 Rg₃ 干预实验性脉络膜新生血管形成的作用研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [38] 卢悦, 蔡玲, 朱晨, 等. 人参皂苷 Rg₃ 对脉络膜新生血管的抑制作用 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37 (10): 922-925.
- [39] 薛黎萍, 胡敏, 李亚娣, 等. 人参皂苷 Rg₁ 调控丙酮酸激酶 M2 影响视网膜毛细血管内皮细胞糖酵解和血管形成 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57 (10): 1559-1564.
- [40] Jiang YC, Li M, Lu ZY, et al. Ginsenoside Rg₃ induces ginsenoside Rb₁-comparable cardioprotective effects independent of reducing blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14 (5): 4977-4985.
- [41] 崔平, 叶存喜, 李军会, 等. 大鼠脉络膜新生血管色素上皮衍生因子、血管内皮生长因子、血管生成素-2 的表达 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32 (4): 775-777.
- [42] Lu HX, Zhou XN, Kwok HH, et al. Ginsenoside-Rb₁-mediated anti-angiogenesis via regulating PEDF and miR-33a through the activation of PPAR- γ pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 783.
- [43] 彭芬, 李翠洁, 吴素英, 等. 三七总皂苷通过长链非编码 RNA 对氧诱导视网膜病变小鼠新生血管的抑制作用 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2019, 40 (4): 529-533.
- [44] 康玲玲, 高瑞敏. 三七皂苷 R₁ 对心房颤动大鼠心肌炎症相关因子和金属基质蛋白酶表达的影响 [J]. *中山大学*

- 学报(医学版), 2019, 40(6): 921-929.
- [45] 蔡曾晓瑞, 胡相卡, 桂留铭, 等. 三七总皂苷对磷酸钠所致视网膜损伤的保护作用及机制研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版): 2023, 41(1): 113-119.
- [46] 王锐, 王明月, 王向涛, 等. 柚皮素纳米制剂的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(9): 1923-1929.
- [47] 吉洁, 徐新荣, 周春刚, 等. 柚皮素磷脂复合物对实验性脉络膜新生血管 NF- κ B/iNOS 通路的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2020, 30(2): 94-100.
- [48] 吉洁, 徐新荣, 王富强, 等. 基于 TMT 技术的柚皮素磷脂复合物抑制大鼠脉络膜新生血管形成的蛋白质组学研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2021, 31(1): 5-10.
- [49] 吴缠婷, 周良良, 邹婉清, 等. 黄芩苷的药理特性及其作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 63-67.
- [50] 帅天姣, 王彤彤, 谢伟, 等. 黄芩苷调节 IL-33/ST2 信号通路对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜新生血管生成的影响[J]. 眼科新进展, 2022, 42(9): 685-689.
- [51] Yang SJ, Jo HH, Kim JG, et al. Baicalin attenuates laser-induced choroidal neovascularization[J]. Curr Eye Res, 2014, 39(7): 745-751.
- [52] 赵欣. 环糊精包合木蝴蝶苷 B 滴眼液抑制角膜新生血管的机制和药代动力学研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- [53] 郑金华. 木蝴蝶提取物对大鼠实验性脉络膜新生血管的抑制作用[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(6): 843-845.
- [54] 王鹤樵, 张婷, 任金妹, 等. 白藜芦醇局部应用制剂研究进展[J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1238-1242.
- [55] Zheng TY, Lu Y. SIRT1 protects human lens epithelial cells against oxidative stress by inhibiting p53-dependent apoptosis[J]. Curr Eye Res, 2016, 41(8): 1068-1075.
- [56] Mauerer A, Barchitta M, Mazzone MG, et al. Resveratrol modulates SIRT1 and DNMT Functions and restores LINE-1 methylation levels in ARPE-19 cells under oxidative stress and inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 2118.
- [57] Luo JY, He T, Yang JY, et al. SIRT1 is required for the neuroprotection of resveratrol on retinal ganglion cells after retinal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2020, 258(2): 335-344.
- [58] Mohammad G, Abdelaziz GM, Siddiquei MM, et al. Cross-talk between Sirtuin 1 and the proinflammatory mediator high-mobility group Box-1 in the regulation of blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy[J]. Curr Eye Res, 2019, 44(10): 1133-1143.
- [59] Zhang HM, Li XH, Chen MJZ, et al. Intravitreal injection of resveratrol inhibits laser-induced murine choroidal neovascularization[J]. Int J Ophthalmol, 2020, 13(6): 886-892.
- [60] Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly(ADP-ribose) polymerase-LKB1 pathway[J]. Mol Pharmacol, 2009, 76(4): 884-895.
- [61] Leonard SS, Xia C, Jiang BH, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(4): 1017-1026.
- [62] Bhattarai N, Korhonen E, Toppila M, et al. Resveratrol alleviates hydroquinone-induced oxidative stress in ARPE-19 cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2066.
- [63] Courtaut F, Aires V, Acar N, et al. RESVEGA, a nutraceutical Omega-3/resveratrol supplementation, reduces angiogenesis in a preclinical mouse model of choroidal neovascularization[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11023.
- [64] 陈婷妍, 周洋. 基于 Nrf2/Keap1/ARE 通路研究槲皮素对小鼠年龄相关性黄斑变性的保护作用[J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(7): 1132-1138.
- [65] 岳岩坤, 王海伟, 邓禹, 等. 槲皮素通过整合素信号通路调控视网膜脉络膜新生血管生成的机制研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(8): 602-607.
- [66] Lai KB, Gong YJ, Zhao WB, et al. Triptolide attenuates laser-induced choroidal neovascularization via M2 macrophage in a mouse model[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110312.
- [67] Li Z, Zhou KW, Chen F, et al. Celastrol inhibits laser-induced choroidal neovascularization by decreasing VEGF induced proliferation and migration[J]. Int J Ophthalmol, 2022, 15(8): 1221-1230.
- [68] Lai K, Li Y, Gong Y, et al. Triptolide-nanoliposome-APRPG, a novel sustained-release drug delivery system targeting vascular endothelial cells, enhances the inhibitory effects of triptolide on laser-induced choroidal neovascularization[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110737.
- [69] Zhang Y, Zhou SQ, Xie MM, et al. Licochalcone A alleviates laser-induced choroidal neovascularization by inhibiting the endothelial-mesenchymal transition via PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Eye Res, 2023, 226: 109335.
- [70] Xie P, Zhang WW, Yuan ST, et al. Suppression of experimental choroidal neovascularization by curcumin in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e53329.
- [71] 赵芳. 剔络化瘀法联合抗-VEGF PRN 治疗息肉样脉络膜血管病变的临床研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [72] Zhang JR, Ouyang X, Hou C, et al. Natural ingredients from Chinese materia medica for pulmonary hypertension[J]. Chin J Nat Med, 2021, 19(11): 801-814.

(收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-04-19)

维生素 B₁ 在中枢认知功能中的作用研究进展

张佳怡, 郝琨*, 刘李* (中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 南京 211100)

摘要: 维生素 B₁, 又称为硫胺素, 是影响脑能量代谢的关键物质。硫胺素的代谢物焦磷酸硫胺素是糖酵解、三羧酸循环及磷酸戊糖旁路的三种关键酶(丙酮酸脱氢酶复合体、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体和转酮醇酶)的辅因子。脑内硫胺素水平以及硫胺素依赖酶的活性和表达会影响脑内能量代谢, 进而影响中枢神经系统的认知功能。补充硫胺素对中枢神经认知功能异常有改善作用。本文对近年来相关的研究进展进行综述, 以阐明脑内硫胺素缺乏及硫胺素依赖酶的功能与表达的损伤对中枢认知功能的影响, 为脑能量代谢障碍的相关研究提供参考。

关键词: 维生素 B₁; 硫胺素; 丙酮酸脱氢酶复合体; α -酮戊二酸脱氢酶复合体; 转酮醇酶; 认知功能障碍

中图分类号: R749.16

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1557-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.025

Research progress in the role of vitamin B₁ in central cognitive function

ZHANG Jia-yi, HAO Kun*, LIU Li* (Key Laboratory of Drug Metabolism & Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 211100)

Abstract: Vitamin B₁, also known as thiamine, is a key substance that affects the brain energy metabolism. Thiamine pyrophosphate, the metabolite of thiamine, is the cofactor of pyruvate dehydrogenase complex, α -ketoglutarate dehydrogenase complex and transketolase, the three key enzymes of glycolysis, tricarboxylic acid cycle and pentose phosphate bypass. The level of thiamine and the activity of thiamine-dependent enzymes affect the energy metabolism in the brain, and then further influence the cognitive function of the central nervous system. Thiamine supplementation can improve the cognitive function of the central nervous system. This article reviewed the recent research progress to clarify the effect of thiamine and thiamine-dependent enzymes on the central cognitive function to provide reference for the study of brain energy metabolism disorders.

Key words: vitamin B₁; thiamine; pyruvate dehydrogenase complex; α -ketoglutarate dehydrogenase complex; transketolase; cognitive dysfunction

维生素 B₁, 也称为硫胺素, 是一种水溶性维生素。人与动物体内不能合成硫胺素, 只能从食物中摄取。硫胺素主要通过硫胺素转运体 (THTRs, 在人体内主要为 THTR1/2) 和有机阳离子转运体 (OCTs, 在人体内主要为 OCT1 ~ 3) 介导的主动转运途径从小肠上端吸收^[1], 再经门静脉主要由 OCT1/3 摄取进入肝脏代谢后随血流分布到各组织^[2]。游离硫胺素转运入细胞后, 在胞浆内被硫胺素焦磷酸激酶转化为二磷酸硫胺素, 也称焦磷酸硫

胺素 (TPP)。它是硫胺素的活性形式, 是体内参与葡萄糖代谢中糖酵解、三羧酸循环及磷酸戊糖旁路的三种关键酶 [丙酮酸脱氢酶复合体 (PDHC)、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体 (KGDHC) 和转酮醇酶 (TKT)] 的辅因子, 在葡萄糖代谢中起重要作用^[3]。大部分 TPP 由二磷酸硫胺素转运体转运进入线粒体参与葡萄糖代谢, 小部分 TPP 可转化为三磷酸硫胺素, 后者为神经突触蛋白磷酸化反应提供磷酸基团。TPP 也可被硫胺素二磷酸酶分解为一

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82173884)。

作者简介: 张佳怡, 女, 硕士研究生, 主要从事药物代谢动力学研究, email: 1390954904@qq.com *通信作者: 刘李, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物代谢动力学以及药物代谢酶与转运体的研究, email: liulee@cpu.edu.cn; 郝琨, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事药物代谢动力学研究, email: haokun@cpu.edu.cn

磷酸硫胺素, 在人脑脊液中一磷酸硫胺素大约占总硫胺素的 60%, 但是在大脑皮层和全血中 TPP 占总硫胺素的比重更高, 超过 80%^[4]。一磷酸硫胺素可进一步被硫胺素一磷酸酶分解为游离硫胺素。硫胺素主要经肾排泄, 由 OCT2 摄取进入肾细胞并经多药及毒物外排转运蛋白外排至肾小管, 肾小管中部分硫胺素被 THTR1/2 重摄取进入血液循环^[1, 5]。硫胺素可以通过被动扩散和主动转运两种方式进入脑内, 但越来越多的证据表明主动转运是硫胺素摄取进入脑内的主要方式, 介导硫胺素摄取进入脑内的转运体主要包括 THTR1/2 和 OCT1/3^[1, 6]。在硫胺素缺乏以及硫胺素依赖酶功能和表达损伤的情况下, 三羧酸循环不能顺利进行, 所以不能生成大量三磷酸腺苷 (ATP)。而如果完全依靠葡萄糖氧化产生 ATP 作为能源, 大脑细胞代谢就会发生障碍, 并引起脑组织中乳酸堆积和酸中毒, 干扰神经递质的合成、释放和摄取, 导致中枢神经系统功能障碍, 如认知功能下降等^[7]。硫胺素缺乏以及硫胺素依赖酶功能和表达损伤也与神经系统疾病如韦尼克 - 科尔萨科夫综合征^[8]、阿尔茨海默病 (AD)、帕金森病 (PD) 和亨廷顿病等相关, 所有这些疾病都表现为行为、认知和神经病学缺陷^[9]。这提示脑内硫胺素水平以及硫胺素依赖酶的功能和表达与中枢认知功能存在密切的联系。本文对近年来相关的研究进展进行综述, 以阐明硫胺素缺乏和硫胺素依赖酶的功能与表达的损伤与中枢认知功能障碍的联系, 为脑能量代谢障碍的相关研究提供参考。

1 硫胺素依赖酶

硫胺素依赖酶在新陈代谢中起着重要的作用, 有时甚至是限速作用。例如, TKT 在磷酸戊糖途径中起重要作用, PDHC 将糖酵解与三羧酸循环联系起来, KGDHC 是三羧酸循环中的限速酶 (见图 1)。因此, 硫胺素缺乏以及硫胺素依赖酶的功能与表达受损会抑制葡萄糖代谢过程。

1.1 PDHC

PDHC 是一种存在于线粒体基质中的多酶复合物, 主要由丙酮酸脱氢酶 (PDH)、二氢硫辛酰乙酰转移酶和二氢硫辛酰脱氢酶构成^[10]。PDHC 的辅酶有 TPP、硫辛酸、辅酶 A (CoA)、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 以及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺)。PDHC 作为机体糖代谢途径的关键酶, 催化丙酮酸不可逆脱羧, 生成乙酰 CoA 和还原型 NAD⁺ (NADH), 乙酰 CoA 进入三羧酸循环, 释放能量。PDHC 催化生成的乙酰 CoA 不仅是三羧酸循环过程中的重要原料, 同时也是合成



图 1 TPP 作为辅因子参与葡萄糖代谢的过程

Fig 1 TPP participates in glucose metabolism as a cofactor

注 (Note): CoA. 辅酶 A (coenzyme A); FAD. 黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide); NAD⁺. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide)。

酮体、胆固醇和脂肪酸的重要原料。因此 PDHC 在机体中扮演着重要的角色。

PDHC 的活性调控方式有三种。第一种是共价修饰, PDHC 的活性受到丙酮酸脱氢酶激酶和丙酮酸脱氢酶磷酸酶的共同调节^[11]。丙酮酸脱氢酶激酶作用于 PDHC 使其磷酸化而失活, 丙酮酸脱氢酶磷酸酶作用于磷酸化的 PDHC, 使其磷酸基水解而恢复活性。第二种是产物抑制, PDHC 催化生成的乙酰 CoA 和 NADH 也可以负反馈调节该酶的活性, 当乙酰 CoA 和 NADH 过剩时, 就会作用于 PDHC, 使其活性降低^[12]。第三种是核苷酸调控, 比如 ATP 对 PDHC 有抑制作用, 而一磷酸腺苷 (AMP) 对 PDHC 有激活作用。此外, Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 对 PDHC 都有激活作用。总而言之, 在机体有高能量需求时, PDHC 保持活性, 在低能量需求时, PDHC 降低活性。

1.2 KGDHC

KGDHC 是三羧酸循环中的一个关键酶, 结构与 PDHC 类似, 由三种不同的酶组成: α -酮戊二酸脱氢酶、二氢硫辛酰琥珀酰转移酶和二氢硫辛酰脱氢酶。KGDHC 参与糖代谢的过程, 催化 α -酮戊二酸不可逆脱羧, 生成琥珀酰 CoA 和 NADH^[13]。其辅因子有 TPP、硫辛酸、FAD、CoA 以及 NAD⁺。TPP 作为 KGDHC 的辅酶, 其含量会影响该酶活性。三羧酸循环是机体获取能量的主要方式, 也是糖类、脂类和蛋白质等物质代谢与转化的枢纽。因此, KGDHC 作为三羧酸循环的限速酶, 在机体中发挥着重要的作用。

KGDHC 的活性受高能磷酸化合物、琥珀酰 CoA、NADH 和 Ca²⁺ 等的调节。二磷酸腺苷 (ADP) 以及 Ca²⁺ 过剩时会作用于 KGDHC 使其

被激活, 而 ATP、琥珀酰 CoA 和 NADH 过剩时则会抑制 KGDHC 的活性^[13-14]。

1.3 TKT

TKT 是磷酸戊糖途径非氧化分支中的一种重要酶, 广泛存在于动物、植物以及微生物中^[15]。TKT 有两个功能相同的活性位点, 其中每个活性位点由一个 TPP 分子和一个 Ca^{2+} 匹配^[16]。TKT 将二碳单位从供体酮体 (5-磷酸木酮糖) 转移到受体醛糖 (5-磷酸核糖或 4-磷酸赤藓糖) 中, 生成产物醛糖 (3-磷酸甘油醛) 和酮糖 (7-磷酸景天糖或 6-磷酸果糖)。这个反应的最终结果是从戊糖形成 3-磷酸甘油醛和 6-磷酸果糖^[17]。随后, 产物分子可以通过糖酵解途径进一步代谢。磷酸戊糖途径为生物提供 NADPH, 同时提供磷酸核糖参与核酸的生物合成。NADPH 能维持谷胱甘肽的还原状态, 对维持红细胞的功能及完整性起重要作用。TKT 将磷酸戊糖途径与糖酵解联系起来, 使细胞能够根据其环境适应各种能量需求。当细胞处于应激状态时, 这些途径的相互连接也可以提供能量代谢的代偿性转变^[18]。因此 TKT 在大脑糖代谢中扮演着重要的角色。

1.4 其他

除了上述酶之外, 还有支链 α -酮酸脱氢酶, 在硫胺素不足时, 支链氨基酸分解代谢受损, 导致血脂异常等代谢功能障碍^[19]。2-羟酰基辅酶 A 裂解酶也依赖于硫胺素, 其活性会影响脂肪酸代谢^[20]。

神经系统所需要的能量大部分来自于葡萄糖代谢产生的 ATP, 尽管许多器官利用硫胺素, 但大脑特别容易受到硫胺素缺乏的影响, 导致氧化

代谢损伤、兴奋性毒性、脑损伤和炎症反应^[21]。

2 影响体内硫胺素水平的相关因素

实现硫胺素充足需要定期食用、适当的吸收和摄取、游离硫胺素磷酸化成活性形式 TPP 以及足够的储存能力, 这些过程都受到复杂的因素影响, 如个人的饮食习惯、身体健康状态和药物使用等^[22]。

① 饮食习惯: 一般情况下, 纯粹的饮食引起的硫胺素缺乏很少见, 因为常见的食物 (如面粉、鱼、猪肉、坚果和豆类等) 中富含硫胺素^[23]。然而经常食用过度加工、高热量的食物就会造成体内硫胺素缺乏。虽然食物中硫胺素含量足够, 但食物中的过量糖、氢化脂肪和化学添加剂会直接影响硫胺素代谢并且增加机体对硫胺素的需求^[22]。此外, 经常饮酒会损伤肠黏膜, 限制硫胺素的吸收^[24], 同时酒精中的乙醇也会阻止膳食硫胺素转化为活性硫胺素^[25]。烟草中的尼古丁^[26]以及咖啡、茶、能量饮料中的咖啡酸、绿原酸和单宁酸都限制了硫胺素的吸收, 且这些饮料中添加的糖和香精会增加机体对硫胺素的需求^[22]。

② 特殊人群: 硫胺素缺乏也可能发生在其他特殊人群中。例如, 肥胖个体、孕妇、老年人以及患有糖尿病、精神分裂症、亨廷顿病、AD 和 PD 等的人群中^[22]。

③ 药物: 体内硫胺素水平的另一个常见的威胁是药物作用。表 1 中每类药物中都有几种药物被证明可以改变硫胺素代谢。总而言之, 在特殊人群中, 或是在不良饮食习惯以及药物作用的影响下, 不易维持体内足够的硫胺素水平。

表 1 影响硫胺素水平的药物
Tab 1 Medications that affect the level of thiamine

类型	药物	作用机制
抗心律失常药	地高辛 ^[27]	抑制 (心脏细胞) 硫胺素的摄取
抗癫痫 (惊厥) 药	苯妥英 ^[28]	抑制硫胺素和一磷酸硫胺素的摄取且抑制 TPP 去磷酸化为一磷酸硫胺素
	丙戊酸 ^[29]	抑制 KGDHC 的活性
抗感染药	甲硝唑 ^[30]	代谢物为硫胺素的拮抗剂
	甲氧苄啶 ^[31]	抑制 THTR1/2
抗精神病药	氟哌啶醇、氯丙嗪、奋乃静、三氟拉嗪、氯氮平等 ^[32]	抑制 PDHC 活性
口服降糖药	二甲双胍 ^[33]	抑制 THTR2
质子泵抑制剂	奥美拉唑 ^[34]	抑制丙酮酸脱羧酶和 TKT 的活性
利尿剂	呋塞米 ^[27, 35]	在心脏细胞中抑制硫胺素摄取并增加硫胺素的尿排泄

3 硫胺素及硫胺素依赖酶对中枢认知功能的影响

硫胺素是葡萄糖、脂质和氨基酸代谢所必需的维生素。硫胺素不足会影响糖代谢过程中的 PDHC、KGDHC 和 TKT 的活性, 使线粒体呼吸紊乱, 诱发假性缺氧^[36]。与缺血性缺氧相反, 假性缺氧虽然有

足够的氧气, 但无法有效利用线粒体。这迫使有氧代谢减少而无氧代谢增加, 并显著减少能量输出。一个葡萄糖通过氧化磷酸化途径可以产生 38 个 ATP 分子, 然而通过无氧酵解途径仅产生 2 个 ATP 分子^[37]。ATP 输出不足会进一步损害氧化能力, 引

发一系列有害级联反应,增加血管反应性、炎症、细胞凋亡,最终导致器官功能障碍或衰竭^[38]。硫胺素缺乏状态下的神经系统毒性是多样的。代谢紊乱会破坏神经元的能量供应并增加氧化应激,由此产生的氧化状态和乳酸积聚引起血脑屏障异常^[39]。硫胺素缺乏时也会发生神经传递的功能变化,对谷氨酸能和 γ -氨基丁酸能系统的影响最显著,导致中枢认知功能障碍^[40]。磷酸戊糖途径紊乱导致神经元髓鞘形成减少和随后的信号传导障碍^[41]。

硫胺素缺乏的早期临床表现为成人和青少年的周围神经病变以及婴儿的烦躁易怒。虚弱无力、眼球震颤、眼肌麻痹、共济失调和认知障碍伴随疾病的进展,患者会一直处于健忘和短期记忆丧失的状态。神经系统症状通常治疗后迅速逆转,但在病情严重或治疗不及时的情况下会看到持久影响。硫胺素缺乏及硫胺素依赖酶活性和表达的受损,也是其他一些疾病神经损伤的标志之一。下面对这些神经系统疾病进行概述(见表2)。

3.1 AD

AD是最常见的与年龄相关的神经退行性疾病。淀粉样斑块和神经纤维缠结是其神经病理学特征,临床表现为进行性认知障碍^[42]。据报道硫胺素稳态在AD中被破坏,AD患者的血液和大脑中TPP水平降低^[43],葡萄糖代谢降低,糖代谢途径中的三种关键酶(PDHC、KGDHC和TKT)的活性在AD中也降低^[44]。此外,AD患者大脑中许多硫胺素依赖过程减少^[3]。在AD和硫胺素缺乏症中,大脑葡萄糖代谢降低和氧化应激增加始终存在;TPP水平的降低与大脑葡萄糖代谢降低密切相关^[45]。微阵列分析还显示早期AD患者中PDH基因表达下调,进一步支持PDH活性不足是AD发病的早期事件^[46]。即使是大脑葡萄糖代谢的轻微降低也会在数秒内损害判断、记忆和其他更高级的大脑功能。大脑糖代谢更严重和更长时间的损伤会导致更严重的大脑损伤,如永久性痴呆^[47]。这些结果表明硫胺素缺乏和硫胺素依赖酶活性受损在AD脑葡萄糖代谢减退中具有重要作用。

3.2 WE

WE是一种由硫胺素缺乏引起常见的神经系统疾病,其典型的临床表现为精神状态改变、共济失调、眼球震颤和眼肌麻痹,发病初期给予大剂量硫胺素即可逆转。然而如果诊断和治疗不及时,就会进展为韦尼克-科尔萨科夫综合征,该病常表现为谵妄、永久性记忆丧失甚至死亡^[48]。

据估计,80%的酗酒者表现出一定程度的硫胺素缺乏症^[49]。长期饮酒也会加速使硫胺素缺乏进展为WE和韦尼克-科尔萨科夫综合征,通过抑制硫胺素的吸收、储存和代谢活化过程^[50-51]。患有WE的酗酒患者会出现脑部结构损伤,例如丘脑、乳头体和海马体的萎缩,这些结构与记忆过程有关^[52]。由于TPP是PDHC的活性辅因子,因此,在WE中,硫胺素缺乏与神经元PDHC的功能直接相关。Abdul-Muneer等^[53]对硫胺素缺乏诱导的WE小鼠的研究结果表明,TPP水平的降低激活了大脑中丙酮酸脱氢酶激酶,抑制了丙酮酸脱氢酶磷酸酶,从而使得PDH磷酸化。磷酸化的PDH失去功能导致线粒体有氧呼吸减少,葡萄糖代谢降低。Butterworth等^[54]的研究结果表明,临床诊断为韦尼克-科尔萨科夫综合征脑病的酗酒患者的尸检小脑蚓部样本中PDHC、KGDHC、TKT的活性显著降低。

3.3 PD

PD是一种黑质多巴胺能神经元选择性缺失的神经退行性疾病,常见于老年人当中。PD的临床特征是震颤、强直、运动缓慢和姿势失衡等运动障碍,还有痴呆等认知障碍。痴呆可发生在大量PD患者中,患病率接近30%。PD患者中最常见的三种认知障碍是执行功能缺陷、记忆缺陷和视觉空间缺陷^[55]。有研究表明,硫胺素缺乏可能参与PD的发病过程,如与正常人相比,PD患者脑脊液中的游离硫胺素水平较低,而TPP和一磷酸硫胺素等硫胺素衍生物水平无显著差异,接受左旋多巴治疗的PD患者脑脊液中TPP和总硫胺素水平比未接受该药物治疗的患者更高^[56]。Häglin等^[57]对PD患者血浆中的硫胺素水平与认知能力的相关性进行探究,发现男性PD患者的血浆硫胺素和磷酸盐水平降低,并且与轻度认知障碍有显著相关性,表明硫胺素缺乏或者磷酸盐耗竭可能会增加认知障碍的风险。尽管硫胺素缺乏可能不是PD的主要原因,但它确实会加剧PD的症状。同时,PD患者小脑中KGDHC活性也下降,导致线粒体呼吸链功能障碍^[58]。Mizuno等^[59]发现KGDHC的免疫反应性在PD患者黑质的神经元中降低,并且这种降低与该酶变性的严重程度相关。综上所述,硫胺素缺乏和KGDHC活性损伤可能参与PD的病理过程。

3.4 癫痫

癫痫是一种反复发作的大脑功能短暂异常的慢性神经系统疾病,是大脑神经元过度兴奋和超

同步的结果,具有反复性和短暂性的特点^[60],临床表现为抽搐阵挛,意识丧失并伴有认知障碍和精神疾病等,有大发作、小发作、精神运动性发作、局限性发作和混合性发作等类型。Fattal-Valevski 等^[61-62]发现,重度硫胺素缺乏可能导致婴儿癫痫,并且幸存下来的婴儿都有严重的后遗症,如认知和运动功能障碍以及癫痫发作。Fouarge 等^[63]发现酒精性癫痫患者也会出现硫胺素缺乏。因为长期饮酒减少了硫胺素在肠道的吸收,在组织的转运和激活,并且增加了机体对硫胺素的需求。Vielhaber 等^[64-65]发现在癫痫患者和啮齿动物癫痫模型中,葡萄糖代谢受损。McDonald 等^[65]在毛果芸香碱诱导的小鼠癫痫模型中发现,PDHC 和 KGDHC 的活性分别下降 33% 和 55%。此外,一项关于线粒体癫痫的研究发现,在癫痫患者中由于 PDHC 功能损伤而患病的占 41%^[66]。综上所述,大脑能量不足可能导致癫痫发作,因为大脑膜电位的稳定以及神经信号传导需要大量的能量。

4 硫胺素增补与认知功能改善

大量文献报道,补充硫胺素可以改善中枢认知功能(见表 2)。① AD: Tapias 等^[67]发现硫胺素的衍生物苯磷硫胺有效地改善了 AD 小鼠的认知功能障碍。苯磷硫胺治疗可以增加 AD 小鼠中枢和外周的硫胺素水平,改善记忆障碍,减少神经元死亡,减轻氧化损伤和炎症反应。Gibson 等^[68]的临床试验结果表明,口服苯磷硫胺在改善轻度 AD 患者的认知功能上是安全且有效的。在 AD 患者中使用苯磷硫胺可以提高全血的硫胺素水平,延缓认知功能减退进程,抑制糖基化终产物的增

加。② WE: WE 早期补充硫胺素可以快速改善症状。如果在疾病发作的前 48 ~ 72 h 内用足够剂量的硫胺素治疗^[69],WE 很容易逆转。如果硫胺素治疗不及时,80% ~ 85% 的 WE 患者会发展为韦尼克-科尔萨科夫综合征^[70]。Nishimoto 等^[70]的研究表明,WE 患者推荐的治疗方案是静脉注射高剂量硫胺素(≥ 500 mg),每日 3 次,最初持续 2 ~ 3 d,并根据临床反应给予额外治疗剂量,结果 73% 的患者(8/11)在治疗后症状消退或改善。③ PD: PD 是由大脑黑质中多巴胺能神经元的选择性缺失引起的。在大鼠纹状体内给予三磷酸硫胺素或 TPP 已被证明可诱导多巴胺释放^[71]。此外,肌肉注射大剂量硫胺素可有效改善 PD 患者的运动和认知功能异常^[72-73]。因此,硫胺素可能通过诱导多巴胺释放和改善与 PD 相关的症状在 PD 治疗中发挥作用。④ 癫痫: Karabulut 等^[74]发现在戊四氮(PTZ)点燃诱导的大鼠癫痫模型中,硫胺素预处理有效地抑制了癫痫发生。 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的硫胺素对抑制 PTZ 诱导的大鼠癫痫的发作更有效。并且,硫胺素预处理可以减轻 PTZ 诱导的癫痫大鼠的认知功能障碍,增强记忆力。Mesdaghinia 等^[75]研究表明,长期腹腔注射硫胺素($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日一次,持续 14 d)会增加 PTZ 诱导的癫痫小鼠的强直性癫痫发作和阵挛性癫痫发作阈值。硫胺素($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和地西泮($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)合用也显著增加了小鼠癫痫发作阈值,增强了地西泮在无效剂量($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)下的抗癫痫作用。因此,硫胺素可能会加强经典抗癫痫药物对癫痫发作的抑制作用,将硫胺素与经典抗癫痫药物合用,可以减少经典药物的所需剂量。

表 2 与硫胺素缺乏及硫胺素依赖酶损伤相关的神经系统疾病

Tab 2 Neurological diseases associated with thiamine deficiency and thiamine-dependent enzymes damage

疾病	硫胺素水平	酶的活性与表达	葡萄糖代谢	临床症状	补充硫胺素对疾病是否有益
AD	降低 ^[43]	PDH 表达下降, PDHC、KGDHC、TKT 活性下降 ^[3, 44, 46]	降低 ^[45]	记忆障碍、视空间技能损害、执行功能障碍及人格和行为改变等全面性痴呆	是 ^[64-65]
WE	降低 ^[50-51, 53]	PDHC、KGDHC、TKT 活性下降 ^[54]	降低 ^[53]	精神状态改变、共济失调、眼球震颤和眼肌麻痹	是 ^[66-67]
PD	降低 ^[56-57]	KGDHC 活性下降 ^[58-59]	降低 ^[73]	认知障碍甚至痴呆,以及静止性震颤等运动障碍	是 ^[72-73]
癫痫	降低 ^[61-63]	PDHC、KGDHC 活性下降 ^[65-66]	降低 ^[64-65]	意识丧失,抽搐并伴有认知障碍、精神疾病等	是 ^[74-75]

硫胺素治疗通常是安全的。几乎没有关于口服硫胺素产生不良反应的报道,而静脉注射给药可能会引起注射部位反应(注射部位周围的一系列症状,包括静脉炎、肿胀、红斑、瘙痒和疼痛等症状),但发生率较低。McLaughlin 等^[76]对 2595 例患者的 8606 剂硫胺素静脉给药(包括

7605 剂 100 mg、433 剂 200 mg、549 剂 250 mg 和 19 剂 500 mg)进行了安全性评估,发现静脉推注硫胺素不会发生全身性过敏反应,且注射部位反应的发生率较低(约 0.3%)。静脉推注硫胺素 250 mg 及以下的剂量都是安全的,安全剂量可能高达 500 mg。Aldhaefi 等^[77]对 69 例患者静脉

推注 500 mg 硫胺素共 463 剂次的安全性进行了评估,发现静脉推注 500 mg 硫胺素并未导致全身性过敏反应,且注射部位反应发生率较低 (0.86%)。所以,静脉推注 500 mg 硫胺素是安全的。另外,硫胺素的长期治疗也是安全的。Gibson 等^[68]对 70 例 AD 患者口服苯磷硫胺的安全性进行了评价,发现在患者口服苯磷硫胺的 12 个月内 (每日两次,每次 300 mg),苯磷硫胺未引起任何不良反应。Costantini 等^[73]在探究硫胺素治疗 PD 的过程中,发现 PD 患者肌肉注射硫胺素持续时间长达 831 d (每周两次,每次 100 mg),未发现任何不良事件。综上所述,硫胺素治疗通常是安全的。

5 结语

大量研究显示硫胺素缺乏或硫胺素依赖酶活性损伤会导致多种中枢神经系统功能异常,造成认知障碍,记忆力受损。脑能量代谢损伤被认为是这些疾病的重要特征,硫胺素缺乏及其依赖酶受损在某些中枢神经系统功能障碍的发生和发展过程中发挥着关键性作用,补充外源性硫胺素对改善因硫胺素缺乏导致的中枢神经系统功能障碍具有重要意义。

参考文献

- [1] Koepsell H. Organic cation transporters in health and disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2020, 72 (1): 253-319.
- [2] Chen LG, Shu Y, Liang XM, et al. OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (27): 9983-9988.
- [3] Gibson GE, Hirsch JA, Cirio RT, et al. Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's disease. Lessons from diabetes [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2013, 55: 17-25.
- [4] Gangolf M, Czerniecki J, Radermecker M, et al. Thiamine status in humans and content of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (10): e13616.
- [5] Larkin JR, Zhang F, Godfrey L, et al. Glucose-induced down regulation of thiamine transporters in the kidney proximal tubular epithelium produces thiamine insufficiency in diabetes [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (12): e53175.
- [6] Ortigoza Escobar JD, Pérez Dueñas B. Treatable inborn errors of metabolism due to membrane vitamin transporters deficiency [J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2016, 23 (4): 341-350.
- [7] Chandrakumar A, Bhardwaj A, 't Jong GW. Review of thiamine deficiency disorders: wernicke encephalopathy and Korsakoff psychosis [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2018, 30 (2): 153-162.
- [8] Inaba H, Kishimoto T, Oishi S, et al. Vitamin B₁-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke-Korsakoff syndrome [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80 (12): 2425-2436.
- [9] Liu DX, Ke ZJ, Luo J. Thiamine deficiency and neurodegeneration: the interplay among oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54 (7): 5440-5448.
- [10] Smolle M, Prior AE, Brown AE, et al. A new level of architectural complexity in the human pyruvate dehydrogenase complex [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (28): 19772-19780.
- [11] Yu XK, Hiromasa Y, Tsen H, et al. Structures of the human pyruvate dehydrogenase complex cores: a highly conserved catalytic center with flexible N-terminal domains [J]. *Structure*, 2008, 16 (1): 104-114.
- [12] 陈伟才, 欧文斌. 丙酮酸脱氢酶活性缺失与疾病发生的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2017, 37 (5): 751-760.
- [13] Gibson GE, Blass JP, Beal MF, et al. The alpha-ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration [J]. *Mol Neurobiol*, 2005, 31 (1-3): 43-63.
- [14] 李文霞, 柯尊记. 维生素 B₁ 缺乏与老年性痴呆 [J]. *生命科学*, 2013, 25 (2): 184-190.
- [15] Kochetov GA, Solovjeva ON. Structure and functioning mechanism of transketolase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844 (9): 1608-1618.
- [16] Kochetov GA, Philippov PP. Calcium: cofactor of transketolase from baker's yeast [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970, 38 (5): 930-933.
- [17] Zhao J, Zhong CJ. A review on research progress of transketolase [J]. *Neurosci Bull*, 2009, 25 (2): 94-99.
- [18] Alexander-Kaufman K, Harper C. Transketolase: observations in alcohol-related brain damage research [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41 (4): 717-720.
- [19] Gar C, Rottenkolber M, Prehn C, et al. Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2018, 55 (1): 21-32.
- [20] Casteels M, Snickers M, Fraccascia P, et al. The role of 2-hydroxyacyl-CoA lyase, a thiamin pyrophosphate-dependent enzyme, in the peroxisomal metabolism of 3-methyl-branched fatty acids and 2-hydroxy straight-chain fatty acids [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35 (Pt 5): 876-880.
- [21] Hazell AS, Butterworth RF. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation [J]. *Alcohol Alcohol*, 2009, 44 (2): 141-147.
- [22] Marrs C, Lonsdale D. Hiding in plain sight: modern thiamine deficiency [J]. *Cells*, 2021, 10 (10): 2595.
- [23] Gibson GE, Hirsch JA, Fonzetti P, et al. Vitamin B₁ (thi-

- amine) and dementia [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1367 (1): 21-30.
- [24] Engen PA, Green SJ, Voigt RM, et al. The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota [J]. *Alcohol Res*, 2015, 37 (2): 223-236.
- [25] Laforenza U, Patrini C, Gastaldi G, et al. Effects of acute and chronic ethanol administration on thiamine metabolizing enzymes in some brain areas and in other organs of the rat [J]. *Alcohol Alcohol*, 1990, 25 (6): 591-603.
- [26] Srinivasan P, Thrower EC, Loganathan G, et al. Chronic nicotine exposure in vivo and in vitro inhibits vitamin B₁ (thiamine) uptake by pancreatic acinar cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12): e0143575.
- [27] Zangen A, Botzer D, Zangen R, et al. Furosemide and digoxin inhibit thiamine uptake in cardiac cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 361 (1): 151-155.
- [28] Patrini C, Perucca E, Reggiani C, et al. Effects of phenytoin on the in vivo kinetics of thiamine and its phosphoesters in rat nervous tissues [J]. *Brain Res*, 1993, 628 (1-2): 179-186.
- [29] Luder AS, Parks JK, Frerman F, et al. Inactivation of beef brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by valproic acid and valproic acid metabolites. Possible mechanism of anticonvulsant and toxic actions [J]. *J Clin Invest*, 1990, 86 (5): 1574-1581.
- [30] Alston TA, Abeles RH. Enzymatic conversion of the antibiotic metronidazole to an analog of thiamine [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 257 (2): 357-362.
- [31] Giacomini MM, Hao J, Liang XM, et al. Interaction of 2, 4-diaminopyrimidine-containing drugs including fedratinib and trimethoprim with thiamine transporters [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45 (1): 76-85.
- [32] Sacks W, Esser AH, Sacks S. Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) by antipsychotic drugs [J]. *Biol Psychiatry*, 1991, 29 (2): 176-182.
- [33] Liang X, Chien HC, Yee SW, et al. Metformin is a substrate and inhibitor of the human thiamine transporter, THTR-2 (SLC19A3) [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12 (12): 4301-4310.
- [34] Nixon PF, Diefenbach RJ, Duggleby RG. Inhibition of transketolase and pyruvate decarboxylase by omeprazole [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44 (1): 177-179.
- [35] Suter PM, Haller J, Hany A, et al. Diuretic use: a risk for subclinical thiamine deficiency in elderly patients [J]. *J Nutr Health Aging*, 2000, 4 (2): 69-71.
- [36] Sweet RL, Zastre JA. HIF1- α -mediated gene expression induced by vitamin B₁ deficiency [J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 2013, 83 (3): 188-197.
- [37] Rich PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31 (Pt 6): 1095-1105.
- [38] McGettrick AF, O'Neill LAJ. The role of HIF in immunity and inflammation [J]. *Cell Metab*, 2020, 32 (4): 524-536.
- [39] Beauchesne E, Desjardins P, Butterworth RF, et al. Up-regulation of caveolin-1 and blood-brain barrier breakdown are attenuated by N-acetylcysteine in thiamine deficiency [J]. *Neurochem Int*, 2010, 57 (7): 830-837.
- [40] de Freitas-Silva DM, Resende Lde S, Pereira SR, et al. Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 211 (1): 33-40.
- [41] Trostler N, Guggenheim K, Havivi E, et al. Effect of thiamine deficiency in pregnant and lactating rats on the brain of their offspring [J]. *Nutr Metab*, 1977, 21 (5): 294-304.
- [42] Ramamoorthy K, Yoshimura R, Al-Juburi S, et al. Alzheimer's disease is associated with disruption in thiamine transport physiology: a potential role for neuroinflammation [J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 171: 105799.
- [43] Mastrogicola F, Bettendorff L, Grisar T, et al. Brain thiamine, its phosphate esters, and its metabolizing enzymes in Alzheimer's disease [J]. *Ann Neurol*, 1996, 39 (5): 585-591.
- [44] Héroux M, Raghavendra Rao VL, Lavoie J, et al. Alterations of thiamine phosphorylation and of thiamine-dependent enzymes in Alzheimer's disease [J]. *Metab Brain Dis*, 1996, 11 (1): 81-88.
- [45] Sang SM, Pan XL, Chen ZC, et al. Thiamine diphosphate reduction strongly correlates with brain glucose hypometabolism in Alzheimer's disease, whereas amyloid deposition does not [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2018, 10 (1): 26.
- [46] Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, et al. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (7): 2173-2178.
- [47] Plum F, Posner JB. The diagnosis of stupor and coma [J]. *Brain Nerve*, 2015, 67 (3): 344-345.
- [48] Arts NJ, Walvoort SJ, Kessels RP. Korsakoff's syndrome: a critical review [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2017, 13: 2875-2890.
- [49] Kopelman MD, Thomson AD, Guerrini I, et al. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment [J]. *Alcohol Alcohol*, 2009, 44 (2): 148-154.
- [50] Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease [J]. *Alcohol Res Health*, 2003, 27 (3): 220-231.
- [51] Martin PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease [J]. *Alcohol Res Health*, 2003, 27 (2): 134-142.
- [52] Sullivan EV, Pfefferbaum A. Neuroimaging of the Wernicke-Korsakoff syndrome [J]. *Alcohol Alcohol*, 2009, 44 (2): 155-165.

- [53] Abdul-Muneer PM, Alikunju S, Schuetz H, et al. Impairment of thiamine transport at the GUT-BBB-AXIS contributes to Wernicke's encephalopathy [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (7): 5937-5950.
- [54] Butterworth RF, Kril JJ, Harper CG. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1993, 17 (5): 1084-1088.
- [55] Hanagasi HA, Tufekcioglu Z, Emre M. Dementia in Parkinson's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 374: 26-31.
- [56] Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Hernández A, et al. Cerebrospinal fluid levels of thiamine in patients with Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 271 (1): 33-36.
- [57] Håglin L, Domellöf M, Bäckman L, et al. Low plasma thiamine and phosphate in male patients with Parkinson's disease is associated with mild cognitive impairment [J]. *Clin Nutr ESPEN*, 2020, 37: 93-99.
- [58] Gibson GE, Kingsbury AE, Xu H, et al. Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2003, 43 (2): 129-135.
- [59] Mizuno Y, Matuda S, Yoshino H, et al. An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 1994, 35 (2): 204-210.
- [60] Ahin B, Zdemir E, Takran AE, et al. Investigation of anti-epileptic mechanisms of 5HT1A receptor with pentylenetetrazole induced epilepsy model in rats [J]. *Cumhur Med J*, 2019, 41: 490-499.
- [61] Fattal-Valevski A, Bloch-Mimouni A, Kivity S, et al. Epilepsy in children with infantile thiamine deficiency [J]. *Neurology*, 2009, 73 (11): 828-833.
- [62] Mimouni-Bloch A, Goldberg-Stern H, Strausberg R, et al. Thiamine deficiency in infancy: long-term follow-up [J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 51 (3): 311-316.
- [63] Fouarge E, Maquet P. Neurological consequences of alcoholism [J]. *Rev Med Liege*, 2019, 74 (5-6): 310-313.
- [64] Vielhaber S, Von Oertzen JH, Kudin AF, et al. Correlation of hippocampal glucose oxidation capacity and interictal FDG-PET in temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2003, 44 (2): 193-199.
- [65] McDonald TS, Carrasco-Pozo C, Hodson MP, et al. Alterations in cytosolic and mitochondrial [U-¹³C] glucose metabolism in a chronic epilepsy mouse model [J]. *eNeuro*, 2017, 4 (1). doi: 10.15231; ENEURO.0341-16.2017.
- [66] Canafoglia L, Franceschetti S, Antozzi C, et al. Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders [J]. *Neurology*, 2001, 56 (10): 1340-1346.
- [67] Tapias V, Jainuddin S, Ahuja M, et al. Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy [J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27 (16): 2874-2892.
- [68] Gibson GE, Luchsinger JA, Cirio R, et al. Benfotiamine and cognitive decline in Alzheimer's disease: results of a randomized placebo-controlled phase II a clinical trial [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 78 (3): 989-1010.
- [69] Thomson AD, Cook CC, Touquet R, et al. The Royal College of Physicians report on alcohol: guidelines for managing Wernicke's encephalopathy in the accident and Emergency Department [J]. *Alcohol Alcohol*, 2002, 37 (6): 513-521.
- [70] Nishimoto A, Usery J, Winton JC, et al. High-dose parenteral thiamine in treatment of Wernicke's encephalopathy: case series and review of the literature [J]. *In Vivo*, 2017, 31 (1): 121-124.
- [71] Yamashita H, Zhang YX, Nakamura S. The effects of thiamine and its phosphate esters on dopamine release in the rat striatum [J]. *Neurosci Lett*, 1993, 158 (2): 229-231.
- [72] Costantini A, Pala MI, Compagnoni L, et al. High-dose thiamine as initial treatment for Parkinson's disease [J]. *BMJ Case Rep*, 2013, 2013: bcr2013009289.
- [73] Costantini A, Pala MI, Grossi E, et al. Long-term treatment with high-dose thiamine in Parkinson disease: an open-label pilot study [J]. *J Altern Complement Med*, 2015, 21 (12): 740-747.
- [74] Karabulut S, Filiz AK, Akkaya R. Thiamine alleviates cognitive impairment and epileptogenesis by relieving brain inflammation in PTZ-induced kindling rat model [J]. *Neurol Res*, 2022, 44 (10): 902-909.
- [75] Mesdaghinia A, Alinejad M, Abed A, et al. Anticonvulsant effects of thiamine on pentylenetetrazole-induced seizure in mice [J]. *Nutr Neurosci*, 2019, 22 (3): 165-173.
- [76] McLaughlin K, Joyal K, Lee S, et al. Safety of intravenous push thiamine administration at a tertiary academic medical center [J]. *J Am Pharm Assoc*, 2020, 60 (4): 598-601.
- [77] Aldhaeefi M, McLaughlin K, Goodberlet M, et al. Evaluation of the safety of 500 mg intravenous push thiamine at a tertiary academic medical center [J]. *Sci Prog*, 2022, 105 (2): 368504221096539.

(收稿日期: 2023-02-14; 修回日期: 2023-05-16)

转运体基因多态性与霉酚酸类药物暴露和不良反应相关性的研究进展

吕建琼^{1, 2}, 宋沧桑^{1, 2*}, 毛盼盼¹, 王国徽¹ (1. 昆明市第一人民医院药学部, 昆明 650000; 2. 大理大学药学院, 云南 大理 671000)

摘要: 霉酚酸 (MPA) 类药物是一类广泛应用于器官移植免疫排斥反应预防和自身免疫性疾病治疗的脱氧核糖 (或核糖) 核酸合成抑制剂, 其治疗窗窄, 呈非线性药代动力学特征, 个体差异显著, 具有明显且重要的肠肝循环过程。基因多态性是 MPA 代谢差异的重要影响因素之一。MPA 肠肝循环涉及多种转运体, 因此, 除代谢酶外, 相关转运体基因多态性也与 MPA 代谢紧密相关。目前转运体基因多态性与 MPA 暴露和不良反应的相关性研究逐渐成为新的热点。本文旨在综述转运体基因 (*ABCB1*、*ABCC2*、*ABCG2*、*SLCO1B1* 和 *SLCO1B3*) 多态性对 MPA 体内暴露和相关不良反应的影响, 为 MPA 个体化用药和减少不良反应提供参考。

关键词: 霉酚酸类药物; 转运体; 基因多态性; 药物暴露; 不良反应

中图分类号: R979.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1565-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.026

Association between transporter gene polymorphism and mycophenolic acids exposure and related adverse reactions

LYU Jian-qiong^{1, 2}, SONG Cang-sang^{1, 2*}, MAO Pan-pan¹, WANG Guo-hui¹ (1. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650000; 2. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000)

Abstract: Mycophenolic acids (MPA), a class of inhibitors of deoxyribonucleic acid or ribonucleic acid synthesis, have been widely used in the prevention of allograft rejection after organ transplantation and the treatment of autoimmune diseases. MPA was found to have a narrow therapeutic window, nonlinear pharmacokinetic characteristics, strong individual difference and a distinct and vital enterohepatic circulation. Gene polymorphism is an important factor in MPA metabolism. MPA enterohepatic circulation involves many transporters. In addition to metabolic enzymes, gene polymorphism of transporters was also closely associated with MPA metabolism. Currently, the association of transporters gene polymorphism and MPA exposure and its adverse reactions became a new hotspot. We reviewed the effects of transporter genes (*ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *SLCO1B1*, and *SLCO1B3*) polymorphism on MPA exposure and related adverse reactions, to provide reference for individualized administration of MPA and reduction of adverse reactions.

Key words: mycophenolic acid; transporter; gene polymorphism; drug exposure; adverse reaction

霉酚酸 (mycophenolic acids, MPA) 类药物是一类脱氧核糖 (或核糖) 核酸合成抑制剂, 临床常用于器官移植和自身免疫性疾病的治疗^[1-2]。MPA 药代动力学 (pharmacokinetics, PKs) 过程

复杂, 治疗窗窄, 具有显著的个体差异和肠肝循环 (enterohepatic circulation, EHC) 过程, MPA 代谢差异可归因于生理特征 (如年龄、性别和种族等)、既往病史、免疫抑制方案、EHC 和遗传

基金项目: 云南省卫生健康委员会医学领军人才培养计划项目 (No. L-2018012)。

作者简介: 吕建琼, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: 599416562@qq.com * **通信作者:** 宋沧桑, 女, 教授, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药理学和药物基因组学研究, email: songcs163@163.com

等因素^[3-4],其中遗传多态性是造成该差异的重要原因之一。通过基因导向的个体化剂量预测逐渐成为免疫抑制剂的研究重点^[1],有研究指出,除代谢酶基因多态性外,转运体基因多态性也是MPA个体差异的重要影响因素^[5-6]。当前国内外转运体基因多态性与MPA药代动力学和不良反应的相关研究有所更新,但研究结论间尚存在争议。因此,笔者通过查阅文献归纳分析并总结了转运体基因多态性对MPA类药物暴露和不良反应影响的相关研究,旨在为MPA个体化用药和减少不良反应提供参考。

1 MPA药代动力学过程及转运体的重要性

MPA代谢过程中涉及葡萄糖醛基转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGTs)代谢和转运蛋白转运。具有药理活性的MPA主要经UGTs代谢为无活性的葡萄糖醛酸葡萄糖苷(MPA-glucuronide, MPAG)和有活性的酰基葡萄糖醛酸葡萄糖苷。MPA EHC过程涉及多种转运体,部分MPAG由有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptides, OATPs)摄取至肝细胞表面,再经多药耐药蛋白2(multidrug resistance protein 2,

MRP2)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)及P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)等转运体转运至胆汁,最终在肠道菌群作用下重新水解为MPA后重吸收入血,再次发挥免疫抑制作用,该过程对MPA血药浓度-时间曲线下面积(area under the curve, AUC)的贡献约为40%^[7-8]。因此,转运体对MPA EHC和体内暴露水平具有重要意义,编码ABC和OATPs转运体基因的多态性表达可能影响其活性,从而影响MPA EHC,导致个体间MPA暴露和不良反应的差异。

MPA类药物相关转运体各编码基因位点不同种族突变频率见表1。目前转运体基因多态性研究主要集中于肾移植领域,其中多个位点如*ABCB1*(1236 C > T、2677G > T/A、3435C > T)、*ABCC2*(-24C > T、3972C > T)、*SLCO1B1* 388A > G和*SLCO1B3* 334T > G等在中国人群中突变频率均较高,探讨它们的多态性与MPA暴露和其所致不良反应的关系,有待成为MPA个体差异研究的重要方向。

表1 按种族划分的转运体(ABC、SLCOs)基因的相关突变等位基因频率

Tab 1 Relevant variant allele frequencies of transporters (ABC, SLCOs) genes of MPA by ethnicity

基因	单倍型	位点	rs号	氨基酸改变	研究人群	突变等位基因频率					参考文献
						中国人	亚洲人	白种人	非洲人	混合人种	
<i>ABCB1</i>		c.1236C > T	rs1128503	同义突变	KT、GN、LT	0.64	0.627	0.34	0.136	0.235 ~ 0.39	[9-11]
		c.2677G > T/A	rs2032582	丙氨酸→丝氨酸	KT、LT	0.43	0.398	0.30	0.02	0.449	[10-11]
		c.3435C > T	rs1045642	同义突变	KT、LT	0.46	0.398	0.43	0.149	0.474	[10-11]
<i>ABCC2</i>		c.-24C > T	rs717620	非编码区突变	KT、LN	0.17 ~ 0.28	0.174 ~ 0.22	0.232	0.041	0.18	[12-18]
		c.1249G > A	rs2273697	缬氨酸→异亮氨酸	KT、LN	0.05 ~ 0.13	0.078	0.168	0.216	0.192	[12-13, 15, 17-18]
		c.3972C > T	rs3740066	同义突变	KT、LN	0.18 ~ 0.31	0.21	0.321	0.275	0.348	[12-15, 17-18]
<i>ABCG2</i>		c.421C > A	rs2231142	谷氨酰胺→赖氨酸	KT、HV	0.21 ~ 0.34	0.29	0.094	0.013	0.10	[16-18]
<i>SLCO1B1</i>	*1B	c.388A > G	rs2306283	天冬酰胺→天冬氨酸	KT、LT	0.70 ~ 0.75	0.75	0.365	0.816	0.45	[11-12, 17-18]
	*5	c.521T > C	rs4149056	缬氨酸→丙氨酸	KT、LT	0.12	0.0821	0.157	0.0085	0.17 ~ 0.308	[1, 11-12, 17-18]
<i>SLCO1B3</i>		c.334T > G	rs4149117	丝氨酸→丙氨酸	KT、HV	0.70 ~ 0.82	0.65 ~ 0.921	0.86	0.35	0.81 ~ 0.962	[1, 5, 16-19]
		c.699G > A	rs7311358	蛋氨酸→异亮氨酸	KT、LN	0.679	0.71	0.86	0.35	0.825	[5, 13, 18-19]

注(Notes): KT. 肾移植(kidney transplantation); LT. 肺移植(lung transplantation); LN. 狼疮肾炎(lupus nephritis); GN. 肾小球肾炎(glomerulonephritis); HV. 健康志愿者(healthy volunteer); 部分位点不同种族突变等位基因频率参考来源: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。

2 ABC转运体基因多态性

人体大多数外排转运蛋白主要是ATP结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白超家族的成员,ABC转运蛋白超家族包括7个亚家族(ABCA ~ ABCG),至少由49个成员组成^[20]。ABC转运体可广泛转运内、外源性物质和药物,参与药物相互作用,同时其也是耐药性的关键调节因素,可预测药物不良反应的风险以及化疗的

疗效,ABC转运体基因多态性对药物的处置过程产生重要影响^[21-22]。研究显示,目前与MPA药代动力学相关的ABC转运体编码基因主要有*ABCB1*、*ABCC2*和*ABCG2*。

2.1 *ABCB1*

*ABCB1*位于7q21.12染色体上,全长约210 kb,由29个外显子组成,主要编码P-gp;作为外排转运体,*ABCB1*在肠道、肾脏和肝脏中高度表

达,有利于药物或外源性物质转运,是在功能、底物和遗传变异影响方面研究最广泛的转运体^[21]。Wang 等^[23]在动物实验中指出 MPA 是 *ABCB1* 的底物之一,*ABCB1* 多态性可能会影响 MPA 的体内分布。*ABCB1* 1236C > T、2677G > T/A 和 3435C > T 是对 MPA PKs 产生影响的 3 个常见基因位点。

目前报道 *ABCB1* 基因多态性与 MPA 药代动力学和不良反应的相关研究较少。Yang 等^[17]通过在中国成人肾移植受者中建立了 MPA 和 MPAG 的群体药代动力学模型,发现代谢酶和转运蛋白基因(*ABCB1*、*ABCC2*、*ABCG2*、*SLCO1B1*、*SLCO1B3*)的遗传多态性对吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil, MMF)的药代动力学均无明显影响,还提出 MMF 的剂量调整应基于白蛋白水平和移植后时间。在肾小球肾炎患者中也未发现 *ABCB1* (1236C > T 和 3435C > T) 多态性与 MPA 药代动力学相关^[9]。但 Riglet 等^[24]首次于肾移植受者中发现 *ABCB1* 3435C > T 基因多态性影响外周血单个核细胞内游离 MPA 的清除,与 CC 型和 CT 型相比,*ABCB1* 3435TT 型受者中具有较低的 MPA 清除率,该研究指出 MPA 外排出细胞依赖于 *ABCB1* 转运体。邵琨等^[10]研究表明,*ABCB1* 1236TT 型肾移植受者的 MPA *AUC* 显著高于 CC + CT 型 ($P = 0.032$)。Bouamar 等^[19]在 338 名肾移植受者中研究发现,*ABCB1* 1236C > T、2677G > T/A 和 3435C > T 多态性与 MPA *AUC*_{0~12h} 和 MMF 所致腹泻、白细胞减少不良反应均无相关性,*ABCB1* 单倍型均与腹泻的发生无关,但发现 MMF 联用他克莫司(tacrolimus, Tac)时腹泻的发生风险是联用环孢素(cyclosporin A, CsA)组的 1.8 倍。Grinyó 等^[25]还发现 *ABCB1* 2677G > T/A 突变与肾移植受者急性排斥反应的发生相关,2677TT 型更易发生急性排斥反应 ($P = 0.003$)。

ABCB1 基因多态性与 MPA 暴露和不良反应的相关研究结果存在争议,仍需扩大样本量,进一步在不同种族和免疫抑制方案中探讨 *ABCB1* 基因多态性与 MPA 类药物暴露及其所致不良反应(腹泻和白细胞减少)的关系。

2.2 *ABCC2*

ABCC2 基因位于染色体 10q24.2 上,负责编码 MRP2,主要在肝脏、肠道和肾脏等具有较高的表达,参与多种药物及内源性物质的转运。研究表明 MPA 是 MRP2 和 MRP4 的底物,MRP2 是参与 MPAG 肾脏排泄的主要转运蛋白^[26]。目前研究最广泛的位点分别是位于 *ABCC2* 5' 非编码区的 -24C > T、外显子 11 1249 G > A 和外显

子 28 3972 C > T/G。

Liu 等^[27]研究表明,白蛋白水平和移植后时间均与儿童和成人肾移植受者的游离 MPA 浓度差异显著相关,而仅在成人受者中发现 *ABCC2* 多态性是影响游离 MPA 浓度的独立因素,这些分别可解释两组人群 32.4%、56.9% 的药代动力学差异,两组影响因素的不同可能与不同年龄的转运蛋白表达水平差异有关,在儿童中转运蛋白的表达似乎低于成年人。Lloberas 等^[28]探讨 55 例肾移植受者 *ABCC2* -24C > T 基因突变对 MPA 暴露的影响,结果表明 -24T 等位基因与 MPA *AUC*_{0~12h} 降低显著相关 ($P = 0.023$),其中在移植术后第 3 个月的 MMF 联用 Tac 或西罗莫司治疗的受者中也同样发现该现象,但联用 CsA 组中未发现该多态性的影响,这表明 CsA 对 MPA EHC 的抑制作用可能掩盖了 *ABCC2* 多态性对 MPA 药代动力学的影响,CsA 可抑制 MRP2 外排转运 MPAG^[29-30],故当 MPA 与 CsA 联用时,*ABCC2* 基因多态性和 MPA 药代动力学相关研究的解释将变得复杂;此外,还发现 *ABCC2* 3972C > T 基因突变与联用 Tac 或西罗莫司组移植后第一个月时的 MPA *AUC*_{0~12h} 降低相关。但 Picard 等^[31]得到相反结果,在联用 CsA 组发现 *ABCC2* -24C > T CT 型受者的 MPA 剂量标准化(dose-normalized, dn) *AUC*_{0~12h} 高于 CC 型和 TT 型 ($P = 0.0087$),而联用 Tac 或西罗莫司时,却未发现相关性。Sun 等^[32]研究表明,*ABCC2* -24CC 型肾移植受者的 dn MPA *AUC*_{6~12h} 显著升高 ($P < 0.05$)。Li 等^[33]在中国肾移植受者中,经临床因素(年龄、白蛋白和肌酐)调整后,应用隐性模型进行多元线性回归分析,指出 *ABCC2* -24C > T 多态性与 MPA 谷浓度与剂量之比(C_0/D)、 $\log(C_0/D)$ 具有相关性,TT 型受者的 MPA C_0/D 和 $\log(C_0/D)$ 均显著高于 CC + CT 型 ($P = 0.045$, $P = 0.019$),但 *ABCC2* 1249G > A 多态性对 MPA C_0/D 无显著影响;此外,发现代谢酶与转运体基因间存在相互作用,同时携带 *ABCC2* -24T 等位基因和 *UGT1A9* 1399T > C (或 *UGT1A8* 518C > G) C 等位基因患者的 MPA C_0/D 值均显著升高 ($P = 0.002$)。Božina 等^[30]研究发现,供体的 *ABCC2* 1249G > A 多态性可使 MPA 清除率增加、暴露减少。Yap 等^[13]在狼疮肾炎患者中发现,*ABCC2* 1249G > A GG 型患者的 MPA 暴露高于 GA 型 ($P = 0.003$)。对高加索肺移植受者的研究发现,*ABCC2* 3972C > T CT 型受者术后第 3 个月时的 MPA 血药浓度显著低于 CC 型或 TT

型 ($P = 0.037$), 未发现 $-24C > T$ 和 $1249G > A$ 多态性与 MPA 血药浓度相关^[11]。在 147 例肾移植受者中发现, $ABCC2$ $24C-1249G-3972C$ 野生型单倍型受者具有较高的 MPA $AUC_{0 \sim 12h}$ 、较低的 MPA 清除率^[34]。

在一项 95 例高加索肾移植受者中发现, $ABCC2$ $-24C > T$ 基因突变与术后一年腹泻的发生相关^[15]。此外, 在儿童心脏移植受者中也观察到该位点与 MMF 所致胃肠道不耐受性进而导致停药相关^[35]。Thishya 等^[36]研究表明, $ABCC2$ $-24C > T$ 和 $3972C > T$ 基因多态性与感染风险降低相关, $ABCC2$ $3972C > T$ 还与 2.06 倍全因死亡发生风险相关, $3972CC$ 型显示对不良事件的发生具有保护作用。

$ABCC2$ 基因多态性与 MPA 药代动力学和不良反应的相关性较为复杂, 可受免疫抑制方案、移植受者的年龄、供体基因多态性及转运体与代谢酶的相互作用等多因素的影响。此外 $ABCC2$ 单倍型的多态性研究将有助于研究个体间 MPA 暴露水平差异, 提示未来开展 $ABCC2$ 基因多态性研究时可能需综合考虑以上因素的影响。

2.3 $ABCG2$

$ABCG2$ 的编码基因位于染色体 4q22.1 上, 由 16 个外显子构成, 负责编码 BCRP 转运体。 $ABCG2$ 基因多态性将会导致蛋白表达水平及转运活性降低^[21], 目前报道与 MPA PKs 相关的是 $ABCG2$ $421C > A$, Miura 等^[6]研究表明, 在 80 例日本肾移植受者中, $ABCG2$ $421C > A$ $CA + AA$ 型受者的 MPA $AUC_{0 \sim 12h}/D$ 值显著高于 CC 型 ($P = 0.0295$), 该多态性导致 MPA 血浆浓度增加, MPA 胆道外排减少。但 Geng 等^[16]的研究与其相悖, 在中国健康志愿者和肾移植受者中未发现 $ABCG2$ $421C > A$ 对 MPA AUC 或 MPA $AUC_{0 \sim 12h}$ 有影响。Li 等^[33]也未发现该位点与 MPA C_0/D 值相关。杜迪等^[37]研究表明, $ABCG2$ $421C > A$ 基因多态性与肾移植术后 MMF 所致胃肠道不良反应相关, $421AA$ 型受者发生风险更高。上述研究结果提示了 $ABCG2$ 基因多态性对 MPA EHC 的影响, 未来仍需开展更多的研究加以探讨和验证。

3 SLCOs 基因多态性

OATPs 是溶质载体 (solute carrier, SLC) 超家族的一员, 包含 12 个家族成员, 具有广泛的底物特异性, 是介导摄取多种内源性物质、代谢物和药物等的摄取转运蛋白, 在维持体内平衡中发挥重要作用^[38]。OATP1B1 和 OATP1B3 分别由 $SLCO1B1$

和 $SLCO1B3$ 编码, 均位于 12 号染色体上, MPAG 已被证实为 $SLCO1B1$ 和 $SLCO1B3$ 的底物之一^[31], $SLCO1B1$ 和 $SLCO1B3$ 参与了 MPAG 的肝脏摄取过程, 两者的基因多态性可能显著影响 MPA EHC, 从而对 MPA 暴露和相关不良反应产生影响。

3.1 $SLCO1B1$

$SLCO1B1$ 基因全长 108.59 kb, 由 15 个外显子组成, 主要在肝细胞基底外侧膜上高度表达^[39]。 $SLCO1B1$ $338A > G$ 和 $521T > C$ 两位点被报道与 MPA 药代动力学和不良反应相关。Shu 等^[40]研究表明, $SLCO1B1$ $521T > C$ CC 型自身免疫性疾病患者 MPA C_0/D 值分别高于 TT 型 ($P = 0.001$) 和 TC 型 ($P < 0.001$)。但 Ruiz 等^[11]在肺移植受者中却发现 $SLCO1B1$ $521T > C$ 与 MPA C_0/D 或不良反应不相关。Bouamar 等^[19]在 338 例接受 MMF 联用 Tac (或西罗莫司) 或 CsA 治疗的肾移植受者中开展随机对照试验, 在两组中均未发现 $SLCO1B1$ $521T > C$ 与 MPA $AUC_{0 \sim 12h}$ 具有相关性。同样, Abderahmene 等^[41]进行分组探讨 $SLCO1B1$ $338A > G$ 和 $521T > C$ 与 MPA AUC 的关系, 也未发现显著性差异。王培乐等^[12]却发现, $SLCO1B1$ $521CC$ 型肾移植受者 MPA AUC/D 值显著高于 TT 型和 TC 型 ($P = 0.036$)。Sun 等^[32]指出, $SLCO1B1$ $521TC$ 型受者的 dn MPA $AUC_{6 \sim 12h}$ 显著低于 TT 型 ($P = 0.008$)。

Abderahmene 等^[41]将肾移植受者分为 MMF 联用 Tac 或 CsA 两组, 均发现 $SLCO1B1$ $388A > G$ G 等位基因与较低的急性排斥反应发生风险相关, 在 MMF 联用 Tac 组中发现 $SLCO1B1$ $388G$ 等位基因与较高的腹泻发生率相关 ($P = 0.04$), 在 MMF 联用 CsA 组发现 $SLCO1B1$ $521C$ 等位基因与白细胞减少发生率降低显著相关 ($P = 0.006$)。Michelon 等^[42]通过多元回归分析, 表明 $SLCO1B1$ $521T > C$ C ($*5$) 等位基因与 MPA 所致的不良反应风险降低 75% 相关 ($P = 0.002$), 但与经活检证实的急性排斥反应的发生无关。

3.2 $SLCO1B3$

$SLCO1B3$ 位于肝细胞基底膜上, 其基因多态性可改变蛋白质的表达和功能。 $SLCO1B3$ $334T > G$ 和 $699G > A$ 两位点存在连锁不平衡, 与 MPA 药代动力学和不良反应相关。Kagaya 等^[43]研究发现, 在移植前 ABO 血型不相容的严重肾功能不全患者中, MPA 主要经肝脏排泄至胆汁, $SLCO1B3$ $334T > G$ 基因多态性与 MPA 暴露显著相关, 经多因素分析后表明, 移植前患者的 $334T$ 等位基因 ($P = 0.003$)

是较高 $\text{dn MPA } AUC_{0\sim 12h}$ 的独立预测因素, 并指出 *SLCO1B3* 基因多态性可能对实现最优 MPA 暴露的剂量制订策略具有一定意义。这与 Picard 等^[31] 研究结果一致, 其报道称 *SLCO1B3* 334G 等位基因降低体外 OATP1B3 的活性, 与 334GG 型相比, 334T 等位基因携带者的 MPAG 到 MPA 的肠肝循环过程更多, 故其在肾移植受者中研究表明, 在 MMF 联用 Tac 或西罗莫司时, *SLCO1B3* 334GG 型的 $\text{dn MPA } AUC_{0\sim 12h}$ 显著低于 TT + TG 型 ($P = 0.0009$), 而在联用 CsA 时未发现相关, 推测 CsA 可能抑制转运蛋白的功能, 从而减弱该多态性的影响。但此前 Miura 等^[5] 在 87 例 MMF 联用 Tac 治疗的日本肾移植中却发现, *SLCO1B3* 334GG 型 (699AA 型) 受者的 $\text{MPA } AUC_{6\sim 12h}$ 高于 334TT 型 (或 699GG 型) ($P = 0.0497$), Sun 等^[32] 在 MMF 联用 Tac 的中国肾移植受者中得到一致结果。武多娇等^[44] 研究表明 *SLCO1B3* 334GG 型受者的 $\text{MPA } AUC_{0\sim 12h}$ 约为 TT 型的 1.5 倍 ($P = 0.052$)。Geng 等^[16] 在健康中国志愿者中研究表明, *SLCO1B3* 334GG 型人群的 $\text{MPA } AUC_{4\sim 12h}$ 比 334TT + TG 型高 30.4% ($P = 0.014$), 而在 MMF 联合 CsA 治疗的移植受者中未发现相关性。

Bouamar 等^[19] 研究表明, *SLCO1B3* 334T > G TT 型肾移植受者具有 54% 的腹泻发生率, 分别高于 GG 型 (22%, $P = 0.007$) 和 TG 型 (16%, $P = 0.006$)。但 Zhong 等^[45] 却发现, 334GG 型受者 MMF 所致的胃肠道不良反应的发生风险是 TT 型的 4.48 倍 ($P = 0.033$)。一项 Meta 分析结果显示, *SLCO1B3* 334T > G 多态性与 MPA 所致胃肠道不良反应相关^[46]。Michelon 等^[42] 未观察到 *SLCO1B3* 334T > G 基因多态性与 MPA 相关不良反应 (腹泻、白细胞减少等) 和急性排斥反应相关, 与 Woillard 等^[47] 在接受麦考酚钠肠溶片治疗的肾移植受者中的研究结果一致。Varnell 等^[48] 和 Shu 等^[40] 分别在青少年肾移植和自身免疫性疾病患者中开展研究, 发现 *SLCO1B3* 334T > G 基因多态性与 MPA 所致的白细胞减少无关。一项对 275 例肺移植受者的回顾性队列研究发现, *SLCO1B3* 334T/699G 等位基因携带者的生存率降低、急性排斥反应发生率升高^[49], 但仍需进一步研究以阐明该关联的潜在机制。据推测, 该关联性可能是次要的, 移植受者和健康志愿者中 *SLCO1B3* 334T/699G 等位基因携带者的 MPA EHC 减少^[5, 16], 故 MPA 暴露相应降低, 排斥反应发生率将有所升高。但 Schumacher 等^[50] 指出 *SLCO1B3* 基因多态性不能预测肾移植受者的排斥

反应或供体特异性抗体。

SLCO1B1 和 *SLCO1B3* 在 MPAG 的肝脏摄取过程中至关重要, 对 MPA EHC 过程具有显著影响, 上述结果提示 SLCOs 基因多态性对 MPA 药代动力学的影响表现出较大差异。值得注意的是, *SLCO1B3* 基因多态性对 MPA 暴露和其所致腹泻等胃肠道不良反应的影响有待进一步探讨。

4 讨论与展望

转运体基因多态性是 MPA 个体间药代动力学差异的重要影响因素。近年来许多学者就 MPA 相关转运体进行了研究, 但结果不尽相同, 可能的原因主要为: 种族和疾病类型不同; 免疫抑制方案中联用的钙调磷酸酶抑制剂不同; 药物相互作用; 转运体与转运体及转运体与代谢酶的相互作用; 供体基因型的不同; 遗传连锁不平衡状态。笔者主要分析了 ABC 和 OATPs 等与 MPA 类药物体内暴露和不良反应的常见相关转运体及其调控基因 (*ABCB1*、*ABCC2*、*ABCG2*、*SLCO1B1* 和 *SLCO1B3*), 结果表明, MPA 暴露及其相关不良反应与 ABC 和 OATPs 转运体基因多态性相关, 但研究结果不太一致, 有待进一步深入探讨, 未来的研究可能会发现影响 MPA 代谢的其他转运体多态性。

当前 MPA 血药浓度监测还未在各移植中心常规开展, 但其显著的个体代谢差异是 MPA 临床用药需关注和重视的问题; 再者依据血药浓度进行剂量调整具有明显的滞后性, 若能通过基因导向预测 MPA 暴露水平和相关不良反应的发生风险, 则可结合患者临床实际情况制订初始 MPA 给药方案, 或进行 MPA 类药物剂量调整, 以此实现 MPA 有效治疗范围, 达到优化患者给药方案、最大限度减少不良反应发生的目标。

参考文献

- [1] Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, et al. Personalized therapy for mycophenolate: consensus report by the international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology [J]. Ther Drug Monit, 2021, 43 (2): 150-200.
- [2] 石炳毅, 袁铭. 中国肾移植受者免疫抑制治疗指南 (2016 版) [J]. 器官移植, 2016, 7 (5): 327-331.
- [3] Kiang TKL, Ensom MHH. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid: an update [J]. Clin Pharmacokinet, 2018, 57 (5): 547-558.
- [4] 曹懿睿, 贾亦臣. 霉酚酸类药物在器官移植受者中的药代动力学研究进展 [J]. 器官移植, 2020, 11 (5): 635-645.

- [5] Miura M, Satoh S, Inoue K, et al. Influence of SLCO1B1, 1B3, 2B1 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007, 63 (12): 1161-1169.
- [6] Miura M, Kagaya H, Satoh S, et al. Influence of drug transporters and UGT polymorphisms on pharmacokinetics of phenolic glucuronide metabolite of mycophenolic acid in Japanese renal transplant recipients [J]. *Ther Drug Monit*, 2008, 30 (5): 559-564.
- [7] Colom H, Lloberas N, Andreu F, et al. Pharmacokinetic modeling of enterohepatic circulation of mycophenolic acid in renal transplant recipients [J]. *Kidney Int*, 2014, 85 (6): 1434-1443.
- [8] Bentata Y. Mycophenolates: the latest modern and potent immunosuppressive drugs in adult kidney transplantation: what we should know about them? [J]. *Artif Organs*, 2020, 44 (6): 561-576.
- [9] Joy MS, Boyette T, Hu YC, et al. Effects of uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B7 and 1A7 pharmacogenomics and patient clinical parameters on steady-state mycophenolic acid pharmacokinetics in glomerulonephritis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010, 66 (11): 1119-1130.
- [10] 邵琨, 王祥慧, 周佩军, 等. 霉酚酸酯药代动力学与多重耐药基因 1 多态性的相关性研究 [J]. *中华器官移植杂志*, 2009, 30 (2): 81-84.
- [11] Ruiz J, Herrero MJ, Bosó V, et al. Impact of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on immunosuppressive therapy in lung transplantation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (9): 20168-20182.
- [12] 王培乐, 张敏, 屈惟妙, 等. UGTs、ABCC2、SLCO1B1 和 IMPDH 基因多态性与肾移植患者霉酚酸酯代谢和不良反应的相关性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55 (10): 849-853.
- [13] Yap DYH, Tam CH, Yung S, et al. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of mycophenolic acid and its clinical correlations in maintenance immunosuppression for lupus nephritis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2020, 35 (5): 810-818.
- [14] Deng XY, Wang CX, Wang XD, et al. Genetic polymorphisms of UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7 and ABCC2 in Chinese renal transplant recipients and a comparison with other ethnic populations [J]. *Pharmazie*, 2013, 68 (4): 240-244.
- [15] Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, et al. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients [J]. *Transplantation*, 2006, 82 (8): 1074-1084.
- [16] Geng F, Jiao Z, Dao YJ, et al. The association of the UGT1A8, SLCO1B3 and ABCC2/ABCG2 genetic polymorphisms with the pharmacokinetics of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide metabolite in Chinese individuals [J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413 (7-8): 683-690.
- [17] Yang CL, Sheng CC, Liao GY, et al. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and transporters have no impact on mycophenolic acid pharmacokinetics in adult kidney transplant patients co-treated with tacrolimus: a population analysis [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, 46 (6): 1564-1575.
- [18] Barraclough KA, Lee KJ, Staatz CE. Pharmacogenetic influences on mycophenolate therapy [J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11 (3): 369-390.
- [19] Bouamar R, Hesselink DA, Van Schaik RH, et al. Mycophenolic acid-related diarrhea is not associated with polymorphisms in SLCO1B nor with ABCB1 in renal transplant recipients [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2012, 22 (6): 399-407.
- [20] Yiannakopoulou E. Pharmacogenomics of phase II metabolizing enzymes and drug transporters: clinical implications [J]. *Pharmacogenomics J*, 2013, 13 (2): 105-109.
- [21] Bruckmueller H, Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding? [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2021, 17 (4): 369-396.
- [22] Xiao QY, Zhou YT, Lauschke VM. Ethnogeographic and inter-individual variability of human ABC transporters [J]. *Hum Genet*, 2020, 139 (5): 623-646.
- [23] Wang J, Figurski M, Shaw LM, et al. The impact of P-glycoprotein and Mrp2 on mycophenolic acid levels in mice [J]. *Transpl Immunol*, 2008, 19 (3-4): 192-196.
- [24] Riglet F, Bertrand J, Barrail-Tran A, et al. Population pharmacokinetic model of plasma and cellular mycophenolic acid in kidney transplant patients from the CIMTRE study [J]. *Drugs R D*, 2020, 20 (4): 331-342.
- [25] Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B, et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation [J]. *Transpl Int*, 2008, 21 (9): 879-891.
- [26] El-Sheikh AAK, Koenderink JB, Wouterse AC, et al. Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus [J]. *Transl Res*, 2014, 164 (1): 46-56.
- [27] Liu Y, Zhang HX, Li J, et al. Pharmacokinetics of free and total mycophenolic acid in pediatric and adult renal transplant recipients: exploratory analysis of the effects of clinical factors and gene variants [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2022, 131 (1): 60-73.
- [28] Lloberas N, Torras J, Cruzado JM, et al. Influence of MRP2 on MPA pharmacokinetics in renal transplant recipients-results of the pharmacogenomic substudy within the Symphony Study [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26 (11): 3784-3793.
- [29] Picard N, Bergan S, Marquet P, et al. Pharmacogenetic biomarkers predictive of the pharmacokinetics and phar-

- macodynamics of immunosuppressive drugs [J]. *Ther Drug Monit*, 2016, 38: S57-S69.
- [30] Božina N, Lalić Z, Nađ-Škegro S, et al. Steady-state pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients: exploratory analysis of the effects of cyclosporine, recipients' and donors' ABCC2 gene variants, and their interactions [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2017, 73 (9): 1129-1140.
- [31] Picard N, Yee SW, Woillard JB, et al. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2010, 87 (1): 100-108.
- [32] Sun SS, Shao K, Lu JQ, et al. Influence of calcineurin inhibitors and genetic polymorphism of transporters on enterohepatic circulation and exposure of mycophenolic acid in Chinese adult renal allograft recipients [J]. *J Clin Pharmacol*, 2023, 63 (4): 410-420.
- [33] Li LQ, Chen DN, Li CJ, et al. Impact of UGT2B7 and ABCC2 genetic polymorphisms on mycophenolic acid metabolism in Chinese renal transplant recipients [J]. *Pharmacogenomics*, 2018, 19 (17): 1323-1334.
- [34] Brazeau D, Meaney CJ, Consiglio JD, et al. Association of ABCC2 haplotypes to mycophenolic acid pharmacokinetics in stable kidney transplant recipients [J]. *J Clin Pharmacol*, 2021, 61 (12): 1592-1605.
- [35] Ohmann EL, Burckart GJ, Brooks MM, et al. Genetic polymorphisms influence mycophenolate mofetil-related adverse events in pediatric heart transplant patients [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2010, 29 (5): 509-516.
- [36] Thishya K, Sreenu B, Raju SB, et al. Impact of pharmacogenetic determinants of tacrolimus and mycophenolate on adverse events in renal transplant patients [J]. *Curr Drug Metab*, 2021, 22 (5): 342-352.
- [37] 杜迪, 余爱荣, 钟建勋, 等. ABCG2 421C > A 基因多态性与肾移植患者术后吗替麦考酚酯所致不良反应的相关性研究 [J]. *中国药师*, 2018, 21 (8): 1396-1400.
- [38] Oswald S. Organic Anion transporting polypeptide (OATP) transporter expression, localization and function in the human intestine [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 195: 39-53.
- [39] Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63 (1): 157-181.
- [40] Shu Q, Fan QQ, Hua BZ, et al. Influence of SLCO1B1 521T > C, UGT2B7 802C > T and IMPDH1-106G > A genetic polymorphisms on mycophenolic acid levels and adverse reactions in Chinese autoimmune disease patients [J]. *Pharmacogenomics Pers Med*, 2021, 14: 713-722.
- [41] Abderahmene A, Ellouz A, Amor D, et al. The pharmacogenetics of mycophenolate mofetil in Tunisian renal transplant patients [J]. *Per Med*, 2022, 19 (5): 383-393.
- [42] Michelon H, König J, Durrbach A, et al. SLCO1B1 genetic polymorphism influences mycophenolic acid tolerance in renal transplant recipients [J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11 (12): 1703-1713.
- [43] Kagaya H, Niioka T, Saito M, et al. Effect of hepatic drug transporter polymorphisms on the pharmacokinetics of mycophenolic acid in patients with severe renal dysfunction before renal transplantation [J]. *Xenobiotica*, 2017, 47 (10): 916-922.
- [44] 武多娇, 许明, 王宣传, 等. 有机阴离子转运体 1B1 和 1B3 基因多态性对肾移植受者血麦考酚酯浓度的影响 [J]. *中华器官移植杂志*, 2011, 32 (7): 393-395.
- [45] Zhong JX, Yang K, Zhang M, et al. SLCO1B3 T334G polymorphisms and mycophenolate mofetil-related adverse reactions in kidney transplant recipients [J]. *Pharmacogenomics*, 2023, 24 (2): 83-91.
- [46] Na Takuathung M, Sakuludomkan W, Koonrungseesomboon N. The impact of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid: systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2021, 60 (10): 1291-1302.
- [47] Woillard JB, Picard N, Thierry A, et al. Associations between polymorphisms in target, metabolism, or transport proteins of mycophenolate sodium and therapeutic or adverse effects in kidney transplant patients [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2014, 24 (5): 256-262.
- [48] Varnell CD, Fukuda T, Kirby CL, et al. Mycophenolate mofetil-related leukopenia in children and young adults following kidney transplantation: influence of genes and drugs [J]. *Pediatr Transplant*, 2017, 21 (7): 1-9.
- [49] Tague LK, Byers DE, Hachem R, et al. Impact of SLCO1B3 polymorphisms on clinical outcomes in lung allograft recipients receiving mycophenolic acid [J]. *Pharmacogenomics J*, 2020, 20 (1): 69-79.
- [50] Schumacher L, Fang F, Kidwell KM, et al. SLCO1B3 polymorphisms and clinical outcomes in kidney transplant recipients receiving mycophenolate [J]. *Pharmacogenomics*, 2021, 22 (17): 1111-1120.

(收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-03-28)

铁死亡的分子调控机制及其在急慢性肝病中的进展

刘淼, 沈佳妍, 李盼盼, 张凯悦, 张议文, 王涛, 刘梦扬* (天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617)

摘要: 铁死亡是一种铁依赖性非凋亡的细胞死亡形式。铁代谢紊乱、氧化系统失衡和不饱和脂肪酸脂质过氧化积累是铁死亡的主要特征。铁死亡涉及多种疾病的生理及病理过程。近年来, 由于肝脏易发生氧化损伤且其是体内调节铁稳态的主要器官, 铁死亡在急慢性肝病的研究领域中迅速受到关注。本文对铁死亡的分子调控机制及其在急慢性肝病中的研究进展进行综述, 以期靶向铁死亡治疗急慢性肝病提供新的思路及研究方向。

关键词: 铁死亡; 急慢性肝病; 分子机制

中图分类号: R96, R575 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1572-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.027

Molecular mechanism of ferroptosis and its advances in acute and chronic liver diseases

LIU Miao, SHEN Jia-yan, LI Pan-pan, ZHANG Kai-yue, ZHANG Yi-wen, WANG Tao, LIU Meng-yang* (Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Ferroptosis is an iron dependent and non-apoptotic form of cell death. Iron metabolism disorder, oxidation system imbalance and accumulation of unsaturated fatty acid lipid peroxidation are the main characteristics of ferroptosis. Ferroptosis is involved in the physiological and pathological processes of many diseases. In recent years, so as the liver is prone to oxidative damage and is the main organ regulating iron homeostasis in the body, ferroptosis has attracted rapid attention in treating acute and chronic liver diseases. This paper reviewed the molecular regulation mechanism of ferroptosis and its research progress in acute and chronic liver diseases aiming to providing new research directions for the treatment of acute and chronic liver diseases by targeting ferroptosis.

Key words: ferroptosis; acute and chronic liver disease; molecular mechanism

肝脏作为人体主要的代谢器官, 在调节体内葡萄糖、氨基酸和脂质代谢中起着至关重要的作用。近年来, 随着人类生活环境的不断变化以及长期的不健康生活习惯, 全球肝病患者的数量逐年增加, 肝病已经成为世界范围内最主要的死亡原因之一^[1]。肝病大体上可以分为急性肝病和慢性肝病两大类。在大多数急性肝损伤条件下, 潜在刺激物的移除在一定程度上能够促进急性病理损伤的消退。而病毒感染、过度饮酒或高热量摄入等损伤因素的持续存在则会诱发慢性肝病的发生和发展。最近研究发现, 多种急慢性肝病中均

存在不同程度的铁代谢紊乱以及脂质过氧化物积累等铁死亡特征, 表明铁死亡与急慢性肝病的发生和发展有着密切的关系^[2]。因此, 本文着重阐述了目前铁死亡调控机制的研究进展, 并对当前铁死亡在急慢性肝病发病机制中的最新发现展开综述, 以期靶向铁死亡防治急慢性肝病提供参考和依据。

1 铁死亡及其调控机制

铁死亡是以铁依赖为特点的脂质过氧化物积累引起的一种新型细胞程序性死亡。在细胞形态上, 铁死亡主要特征是细胞体积缩小, 线粒体嵴

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82004062)。

作者简介: 刘淼, 女, 硕士研究生, 主要从事中药脂质代谢调控研究, email: 1091892645@qq.com *通信作者: 刘梦扬, 男, 副研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药脂质代谢调控研究, email: liumengyang0212@tjutcm.edu.cn

减少, 线粒体膜密度增加以及外膜破裂^[3]。在代谢途径上, 铁死亡的发生主要涉及硫醇依赖性氧化还原、细胞内铁代谢、甲戊二酸途径和线粒体呼吸、多不饱和脂肪酸过氧化等多个方面。当前研究表明, 铁死亡主要是受四个抗氧化系统的调节抑制, 包括还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) / 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) / 泛醌 (coenzyme Q10, CoQ10)、环 GTP 水解酶 1 (guanosine triphosphate cyclohydrolase 1, GCH1) / 四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4)、线粒体 GPX4 和二氢乳清酸脱氢酶 (dihydroorotate dehydrogenase, DHODH)^[4]。第一个系统能够促进 GPX4 在谷胱甘肽依赖性反应过程中催化脂质过氧化物的还原, 另外三个系统则主要是催化 CoQ10 的再生, 通过 CoQ10 充当脂质过氧化物自由基来协同 GPX4 抑制铁死亡的发生。目前, 针对这些铁死亡的主要调节靶点和通路, 已开发出多种铁死亡抑制剂和激动剂。

1.1 铁死亡的诱导因素

1.1.1 铁离子代谢紊乱

铁作为人体内必需的微量元素, 是 DNA 复制、线粒体呼吸和细胞信号传递等细胞生长过程的重要组成部分。铁代谢主要由肝脏调节, 血液中的 Fe^{3+} 通过与转铁蛋白 (transferrin, Tf) 结合, 随血液循环运输到肝细胞。随后, Tf 与转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfR1) 在肝细胞表面形成转铁蛋白结合铁复合物, 进而通过内吞作用进入细胞。在细胞内的酸性环境中, Fe^{3+} 会在溶酶体还原酶的作用下从 Tf 中被释放出来, 并进一步被还原为 Fe^{2+} 。 Fe^{2+} 通过溶酶体上二价金属离子转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 被运输入细胞质不稳定铁池。如果细胞内的铁不能被及时利用, 则主要以铁蛋白 (Ferritin) 的形式储存起来, 以保证细胞正常的游离铁离子水平。当外周组织对于铁的需求量增高时, 铁转运蛋白 (ferroportin, FPN) 能够携带胞内的铁穿过细胞基底膜将铁释放到胞外, 进入血液^[5]。而当血液中的 Fe^{3+} 超出 Tf 的转运能力时, 溶质载体家族 39 成员 14 (solute carrier family 39 member 14, SLC39A14) 则会将多余的非转铁蛋白结合铁 (non-transferrin bound iron, NTBI) 转运回肝细胞, 从而将过量的铁贮存在胞内铁蛋白中^[6]。

机体代谢过程中, 铁的输出、储存和输入之间的不平衡可能造成铁积累。当细胞内存在过量

的游离 Fe^{2+} 时, 它能够通过芬顿反应生成大量羟自由基。这些过量的自由基可以诱导 DNA、蛋白质和脂质损伤, 引发细胞毒性, 最终导致铁死亡的发生^[7]。研究发现, 细胞表面的转铁受体是调节体内铁离子水平的关键分子, 例如敲除 *TfR1* 可以明显阻断铁死亡诱导剂 Erastin 诱导的铁死亡, 而血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 能够通过补充铁来加速 Erastin 诱导的铁死亡^[8]。此外, 研究发现, 在 *TfR1* 敲除的小鼠肝细胞中, 胞外过多的铁也能通过 SLC39A14 介导将 NTBI 转运到肝细胞内, 导致过量铁积累而诱发铁死亡^[9]。

胞内铁的稳态及铁死亡的发生与铁代谢相关基因的调控密切相关。当胞内铁离子水平较低时, 细胞可以通过核受体共激活因子 4 (nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 介导铁蛋白转运到自噬体, 通过自噬溶酶体促进铁蛋白的降解和铁离子的释放, 恢复铁离子含量。因此, NCOA4 的耗竭能够减弱铁死亡的发生^[10]。此外, 铁代谢相关基因的水平会受到铁调节蛋白 (iron regulatory protein, IRP) / 铁反应元件 (iron response element, IRE) 系统的调控, 该系统通过上调 *TfR1* 和 *DMT1* 的基因表达, 下调 FPN 和铁蛋白的表达, 最终促进细胞内铁离子含量的上升^[9]。在机体内铁超负荷时, 机体铁稳态的关键调节因子——铁调素的表达水平会被骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) - SMAD 信号通路和炎症介导的白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) - 转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路所上调, 从而限制铁的吸收^[9]。还有研究发现, 热休克蛋白 B1 (heat shock protein B1, HSPB1) 作为参与调节细胞骨架组织的一种分子伴侣, 能够通过抑制 TfR1 的表达来进一步降低细胞内铁浓度, 因此过表达 HSPB1 可以显著抑制铁死亡的发生^[11]。最近研究发现, 新型 E3 泛素连接酶 (RNF217) 也可以通过介导 FPN 的降解来调节细胞内铁的稳态^[12]。综上, 胞内铁代谢相关基因的调节在铁稳态维持和铁死亡的发生中起着非常重要的作用。

1.1.2 氧化系统失衡

谷胱甘肽是由谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的一种维持细胞氧化还原稳态的重要抗氧化剂。谷胱甘肽在体内以 GSH 和氧化态 (GSSG) 两种形式存在, 两者的比值可以指示细胞氧化应激的程度。GSH 生物合成的限速底物是半胱氨酸, 但是由于半胱氨酸在体内极其不稳定, 细胞外部的半胱氨酸都以氧化

形式的胱氨酸存在。胞外胱氨酸向胞内的转运主要是由细胞表面的胱氨酸/谷氨酸反向转运体 (System X_c⁻) 所介导, 该系统主要由轻链溶质载体家族 7 成员 11 [solute carrier family 7 member 11, SLC7A11 (也称为 XCT)] 和重链溶质载体家族 3 成员 2 [solute carrier family 3 member 2, SLC3A2 (也称为 CD98 或 4F2)] 所组成, 其中 SLC7A11 起主要作用, 负责胱氨酸与谷氨酸的跨膜交换^[13]。进入胞内的胱氨酸通过 GSH 或硫氧还蛋白 1 (thioredoxin reductase 1, TXNRD1) 依赖的胱氨酸还原途径被还原成半胱氨酸, 促进 GSH 生成^[14]。当 System X_c⁻ 被抑制时, 蛋氨酸代谢与转硫途径结合也能提供部分半胱氨酸参与 GSH 的合成, 从而调节细胞内抗氧化物水平和铁死亡的发生^[15]。System X_c⁻ 系统抑制剂 Erastin 通过抑制细胞膜对胱氨酸的摄取, 降低细胞内 GSH 浓度, 进而导致谷胱甘肽过氧化物酶失活以及脂质过氧化产物的积累, 从而诱导细胞铁死亡^[16]。GPX4 作为一种硒蛋白能够将 GSH 转化为 GSSG, 并将具有细胞毒性的脂质过氧化物 (L-OOH) 还原为相应的醇 (L-OH), 减少脂质过氧化^[17]。抑制 GPX4 活性 (如铁死亡诱导剂 RSL3), 可明显诱导 L-OOH 在胞内的积累, 促使细胞铁死亡的发生^[18]。因此, GPX4 在铁死亡的发生中具有重要作用。由于 GPX4 本身的生物合成依赖于硒代半胱氨酸, 因此甲羟戊酸盐途径通过调节硒代半胱氨酸 tRNA 的成熟能够影响 GPX4 的合成, 从而调节铁死亡^[19]。此外, GSH 作为硒酶 GPX4 的辅助因子, 其胞内水平也会直接影响 GPX4 的功能, GSH 的过度耗竭会导致 GPX4 失活和脂质过氧化物的积累, 从而诱导细胞发生铁死亡^[20]。研究表明, 丁硫氨酸亚砷胺 (*L*-buthionine-sulfoximine, BSO) 可以通过抑制 GSH 的合成, 减弱 GPX4 活性, 进而增加胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的水平, 引发铁死亡^[21]。而激活氨基酸感受器 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 则能够明显提高机体 GPX4 水平, 从而抑制铁死亡^[22]。因此, 细胞内的氧化调节系统也对铁死亡的发生具有重要调节作用。

1.1.3 不饱和脂肪酸过氧化物的积累 脂肪酸为细胞脂质代谢的重要组成部分, 具有提高细胞能量供应、参与细胞膜生成等多种生物功能。多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 是细胞膜的组成部分之一, 能够调节炎症、免

疫、细胞生长等多种生物学功能。然而大部分 PUFA 需要经过合成、活化并整合到细胞膜磷脂中才能够通过脂质过氧化生成磷脂氢过氧化物 (phospholipid hydroperoxide, PLOOH)。这种发生于膜上 PUFA 的过氧化过程可以由酶促反应或非酶促的氧化反应所介导。其中酶促反应主要是由一类含非血红素铁的双加氧酶-脂氧合酶 (lipoxygenases, LOXs) 催化, 能够氧化含有 PUFA 的磷脂从而导致 L-OOH 积累^[20]。而非酶催化的脂质过氧化过程主要由芬顿反应来驱动, 通过铁和氧气催化链式反应生成羟自由基, 活跃的羟自由基进一步剥夺不饱和脂肪酸长链双键间的氢原子, 从而引发脂质过氧化, 导致 PLOOH 的大量产生, 引发铁死亡^[23]。研究发现, 外源给予细胞单不饱和脂肪酸 (monounsaturated fatty acid, MUFA) 可以竞争性取代磷脂 PUFA, 从而有效抑制 Erastin 诱导的铁死亡^[24]。因此, MUFA 的 L-OOH 不会引起铁死亡的发生, PUFA 才是铁死亡期间 L-OOH 的主要底物。此外, 过度积累的 L-OOH 还会分解生成丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) 等有毒次级分解产物, 它们能够联合细胞膜上持续的氧化反应产生的 PLOOH, 攻击蛋白质或 DNA, 最终造成细胞膜结构完整性和正常功能不可逆的破坏, 从而放大细胞损伤, 加剧细胞铁死亡^[25]。最近研究表明, 作为细胞能量状态传感器的 AMP 依赖性蛋白激酶 (adenosine mono phosphate activated protein kinase, AMPK) 可以通过介导乙酰辅酶 A 羧化酶的磷酸化和抑制 PUFA 的生物合成来调节铁死亡^[26]。目前发现多种 PUFA 与铁死亡发生密切相关, 其中花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 和肾上腺酸 (adrenic acid, AdA) 被认为是诱导铁死亡的主要 PUFA。长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (long-chain acyl-CoA synthetase 4, ACSL4) 和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 作为两种脂质代谢调节因子, ACSL4 催化包括 AA 在内的 PUFA 与辅酶 A 的连接, 而 LPCAT3 则能够促进这些产物的酯化和并入膜磷脂, 促进胞膜中氧化磷脂的积累来抑制 GPX4 活性, 进一步诱发铁死亡^[27]。此外, 有研究发现, ACSL4 的缺失能够有效减轻 GPX4 缺乏引起的铁死亡; 然而敲除 LPCAT3 并不能达到敲除 ACSL4 对铁死亡相等水平的抑制作用, 表明这两种脂代谢酶之间可能还存在某种代偿机制^[28]。

1.2 铁死亡的抑制系统

1.2.1 GSH/GPX4 系统 GSH/GPX4 是第一个被确定在铁死亡中起重要作用的途径。抑制 GSH 过度消耗可以有效减少脂质过氧化, 抑制铁死亡发生。谷氨酸-半胱氨酸连接酶不仅能够通过合成 GSH 来抵抗铁死亡, 还通过转化谷氨酸为 γ -谷氨酰肽从而限制其在细胞内的水平来减少谷氨酸应激, 进一步降低铁死亡的发生^[29]。GPX4 具有线粒体、核和细胞溶质三种异构体, 并且这三种异构体具有相同的 GPX4 基因表达, 其中细胞溶质的 GPX4 对胚胎发育和铁死亡预防至关重要^[30]。GPX4 的缺失会导致大量细胞死亡和细胞变性, 而补充抗氧化剂维生素 E 和铁死亡抑制剂则能够在一定程度上减轻 GPX4 缺失造成的影响^[31]。还有研究表明, 热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 作为一种进化保守且普遍表达的分子伴侣, 在维持细胞蛋白的功能和稳定性方面起着重要作用, 它也能够通过减少 GPX4 蛋白的降解来抑制铁死亡^[32]。

1.2.2 FSP1/CoQ10 系统 研究表明, FSP1 具有平行于 GSH-GPX4 轴的抗铁死亡作用。FSP1 可以抑制脂质过氧化物的积累并防止 GPX4 缺失引起的铁死亡^[33]。FSP1 的功能不依赖于细胞中 GSH 水平以及 GPX4 活力。一旦发生铁死亡, FSP1 可以通过 CoQ10 氧化还原酶途径防止脂质过氧化, 而阻断 FSP1 或过度消耗 CoQ10 可以显著增加细胞对铁死亡的敏感性^[34]。

1.2.3 GCH1/BH4/DHFR 系统 近年来有研究确定了另一种新的不依赖于 GPX4 的铁死亡抑制系统, 即 GCH1/BH4/DHFR 途径。在 CRISPRa 筛选

过程中发现, GCH1 作为一种与 GPX4 无关的铁蛋白抑制因子, 可以有效抑制铁死亡^[35]。亲脂性抗氧化剂 BH4 的生物合成依靠 GCH1。BH4 不仅能通过防止细胞脂质过氧化来抑制铁死亡, 还可以通过将苯丙氨酸转化为酪氨酸来促进 CoQ10 的合成, 参与上述 FSP1/CoQ10 途径。然而 BH4 的回收再利用还需要二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 的参与, 因此, 抑制 DHFR 的活性会显著加剧 GPX4 抑制剂介导的铁死亡^[36]。

1.2.4 线粒体 GPX4 和 DHODH 系统 线粒体作为真核细胞中氧化磷酸化的主要细胞器, 其代谢活动中过量产生的 ROS 能够氧化 PUFA 进而诱发脂质过氧化。DHODH 是一种含铁的黄素依赖性线粒体酶, 可催化嘧啶生物合成。Mao 等^[37]研究发现, DHODH 活性的丧失会导致线粒体中脂质过氧化物的积累, 并引发 GPX4 低表达细胞中铁死亡的发生。而在缺乏 DHODH 的情况下, 具有 GPX4 高表达的细胞依然能够继续阻断铁死亡活性。DHODH 只有定位于线粒体时才能发挥其抑制铁死亡的功能, 并且该功能依赖于其酶活性。进一步研究发现, DHODH 与线粒体 GPX4 作为线粒体局部防御系统, 能够将线粒体中的泛醌还原为二氢泛醌, 发挥自由基捕获抗氧化剂作用来阻断线粒体内膜的脂质过氧化, 进而抑制铁死亡。因此, 这一线粒体氧化防御系统与胞浆 GPX4 以及 FSP1 组成的细胞膜上铁死亡防御系统是两套具有不同调节特征的体系^[38]。

铁死亡的抑制剂和激动剂用于铁死亡的相关研究见表 1 和表 2。

表 1 铁死亡的主要抑制剂
Tab 1 Main inhibitor of ferroptosis

药物抑制剂	作用靶点	机制	参考文献
DFO, 铁调素	铁	减少不稳定铁, 抑制芬顿反应	[39-40]
Ferrostatin-1, Liproxstatin-1	脂质过氧化	抑制脂质过氧化	[39, 41]
维生素 E, CoQ10	多不饱和脂肪酸	抑制多不饱和脂肪酸氧化	[39, 42]
硒, 甲基硒代半胱氨酸, 亚硒酸钠	GPX4	补充 GPX4 丰度, 增强脂质过氧化物清除能力	[43-44]

表 2 铁死亡的主要诱导剂
Tab 2 Main inducer of ferroptosis

药物诱导剂	作用靶点	机制	参考文献
Erafin, Sorafenib	System X _c ⁻ 系统	阻断半胱氨酸输入, 诱导谷胱甘肽耗竭, GPX4 失活	[16, 45]
BSO, 顺铂	GSH	介导谷胱甘肽缺乏	[21, 46]
RSL3, ML162, ML210, JKE1674	GPX4	抑制 GPX4 生成, 引起脂质过氧化的积累	[9, 18]
FIN56	GPX4 和 CoQ10	增加 GPX4 降解, 抑制 CoQ10 生成	[42]
FINO2	脂质过氧化	氧化铁, 诱导脂质过氧化和间接灭活 GPX4	[42]

2 铁死亡与急慢性肝病

肝损伤是由多种因素导致的肝脏病理状态。急性肝损伤如果得不到及时治疗,很容易会发展成为慢性肝病。近年来越来越多的研究显示,铁死亡在多种急慢性肝病的发病中起着重要的作用,因此靶向铁死亡可能是治疗急慢性肝病的一种新的有效策略。

2.1 铁死亡与急性肝病

急性肝病多是由药物、酒精、缺血/再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)或病毒性肝炎引起的肝毒性造成的肝病。其中药物性肝损伤(drug induced liver injury, DILI)是造成急性肝病的主要原因,且临床表现从肝脏无症状到暴发性肝功能衰竭不等。DILI是对药物或其他生物制剂的不良反应,当个体暴露于有毒剂量的某些化合物时,由于遗传和环境因素的影响,药物可能对易感个体的肝脏造成损害。而对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是引起DILI的典型药物。肝组织暴露于过量APAP即可导致肝细胞死亡。进入体内的APAP主要由肝脏的细胞色素P450代谢转化,并主要由其代谢产物苯醌亚胺(*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine, NAPQI)引发肝毒性。过量的NAPQI产生和积累会导致肝脏GSH水平降低和线粒体蛋白加合物的形成。过量的线粒体蛋白质加合物能够通过诱导氧化应激反应,导致线粒体功能障碍从而造成肝细胞损伤^[47]。研究表明,铁死亡抑制剂Ferrostatin-1、铁螯合剂DFO和维生素E处理均能有效减弱APAP诱导的肝细胞损伤作用^[39]。研究发现,黄皮酰胺[(+)-clausenamide, (+)-CLA]不仅可以增加小鼠肝脏中GPX4的含量,还能特异性地与Kelch样ECH关联蛋白1(Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)的Cys-151残基反应,进而阻断转录因子核因子红系2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)的泛素化而增加NRF2的稳定性,即通过KEAP1-NRF2途径来减轻药物APAP诱导的肝损伤^[48]。沉默调节蛋白1(recombinant sirtuin 1, SIRT1)是细胞抗氧化损伤的有效保护剂,它能够通过靶向NRF2,调节HO-1的表达来减弱细胞氧化损伤。广谱丝氨酸蛋白酶抑制剂乌司他丁(urinastatin, UTI)在细胞和动物模型中均具有明显的抗炎和细胞保护作用。在APAP诱导的模型中,UTI能够通过调控SIRT1/NRF2/HO-1信号通路来抑制GSH的消耗并减弱脂质过氧化,从而改善DILI^[49]。除DILI外,肝脏IRI诱

导的急性肝病作为并发症会在肝移植、全身性休克、心力衰竭和败血症等多种疾病中发生。研究发现,铁死亡抑制剂Liproxstatin-1能够有效减轻肝脏IRI和肾脏IRI,表明铁死亡在IRI的发生中起着重要的促进作用^[41]。此外,临床相关研究发现,肝脏供体中血清铁蛋白水平升高与移植受者肝损伤风险的显著增加相关,且用Ferrostatin-1和DFO等化合物处理能有效阻止肝脏细胞铁死亡,从而预防肝脏IRI的发生^[50]。Wu等^[51]研究发现,泛素E3连接酶Huwe1(HECT, UBA and WWE domain containing 1)可作为一种新的肝脏缺血再灌注损伤的保护因子发挥肝保护作用,Huwe1能够特异性通过促进Trf1的泛素化和蛋白酶体降解来减少细胞内铁的积累,调节铁代谢,显著抑制铁死亡。因此,靶向铁死亡这一非凋亡途径可能有助于改善肝脏IRI引发的急性肝病。

2.2 铁死亡与慢性肝病

2.2.1 非酒精性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

NAFLD最近被命名为代谢功能障碍相关的脂肪肝病(metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD),是全球范围内常见的慢性肝病。NAFLD病理谱系范围从单纯性肝脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),其发展过程与肥胖和机体代谢密切相关。近年来研究发现铁代谢异常与NAFLD也有着密切的关系。NAFLD患者肝脏中普遍存在着铁离子含量过高的问题,而细胞铁离子过载引发的脂质过氧化正是造成NAFLD主要原因之一^[52]。研究显示,90%以上参与调查的NAFLD患者血清中表现出高水平的脂质过氧化标志物4-HNE和MDA^[53]。而补充维生素E可有效抑制NAFLD患者的肝脏脂质过氧化程度,并降低血清中转氨酶水平^[54]。Li等^[55]证明,在蛋氨酸/胆碱缺乏(methionine and choline deficiency, MCD)饮食诱导的NASH小鼠模型中,肝脏的AA酸代谢明显异常,并导致肝细胞发生铁死亡。额外给予RSL3会加重MCD饮食诱导NASH小鼠的血清转氨酶水平升高,同时加剧肝脂肪变性、炎症反应和肝细胞死亡。但给予MCD饮食的小鼠亚硒酸钠(GPX4激活剂)处理可以显著减轻NASH相关病理损伤^[44]。这表明促进肝脏GPX4活化能够有效保护肝脏免受脂质过氧化损伤,从而抑制铁死亡的发生,减轻饮食诱导的NASH。研究发现,从歧化松香植物中分离出来的天然三环二萜类树脂酸-脱氢松香

酸 (dehydroabiatic acid, DA) 具有抗肿瘤、抗衰老、抗炎等多种药理作用。在高脂饮食诱导的 NAFLD 模型中, DA 能够通过与 Keap1 结合来促进抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 等 NRF2 下游基因的转录活性, 进而减少 ROS 的积累, 抑制脂质过氧化造成的铁死亡, 改善 NAFLD^[56]。综上, 这些研究表明铁死亡相关分子可能也是 NAFLD 治疗的潜在有效治疗靶点。

2.2.2 酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD)

ALD 是由于长期过量饮酒造成的逐渐加重的一系列肝病, 包括酒精性脂肪变性、酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化, 最终可能会发展为肝癌。据统计, 目前全球酒精消费量和 ALD 的发病率仍在逐年攀升^[57]。研究发现, 乙醇暴露会诱发人类和实验动物的铁超负荷, 造成血清和肝铁水平、血清铁蛋白水平和转铁蛋白饱和度的升高^[58]。乙醇摄入会下调铁调素的 mRNA 和蛋白的表达水平, 并促进十二指肠中 DMT1 和 FPN 的表达, 导致铁吸收增加。此外, 乙醇还可以通过提高 TfR1 表达来促进铁吸收及转运, 造成肝脏中的铁积累。同时, 当过量乙醇摄入时, 血清中的 NTBI 水平显著升高, 肝脏中 DMT1 在 mRNA 和蛋白水平上表达增加, 加剧肝细胞内铁积累^[59]。因此, 过量摄入乙醇能够通过诱导肝脏铁的积累来进一步加重乙醇代谢引发的氧化应激, 导致 NADPH 积累增加, GSH 减少和 GPX4 活性的降低, 造成肝脏脂质过氧化, 并最终触发铁死亡进程, 加重 ALD^[60-61]。此外, 乙醇还能通过诱导脂肪特异 lipin-1 的过表达, 以不依赖 GPX4 的方式加重肝脏异常铁沉积和脂质过氧化, 从而加剧酒精性脂肪蓄积和肝胆损伤^[62]。而使用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 能够分别在体外和体内水平显著抑制乙醇诱导的脂质过氧化和肝细胞死亡^[61]。因此, ALD 病理进程与铁死亡的发生密切相关。另外, 肝脏与其他器官 (如肠) 之间的串扰也能通过调节铁死亡的发生来影响 ALD 的发展。Zhou 等^[60]研究发现, SIRT1 肠道特异性缺失会导致肝铁蛋白沉积减少, 增加肝脏 GSH 的含量, 从而减弱脂质过氧化, 抑制铁死亡, 最终起到改善 ALD 炎症、减轻肝损伤的作用。

2.2.3 肝纤维化 肝纤维化是指各种致病因子 (ALD、NAFLD、病毒性肝炎等) 持续作用引起的肝脏病理过程。细胞外基质的过度积累是肝纤维化形成的重要因素。而肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 的活化则是造成细胞外基质过

度合成, 引发肝纤维化的主要驱动因素。近年来研究发现, 纤维化与铁死亡之间存在密切的关系, 且有证据表明铁死亡在肝纤维化的进展和消退过程中具有双重作用。一方面, 在正常肝细胞的过度铁死亡会促进肝纤维化的发展。肝脏细胞铁过载会引发 HO-1 途径介导的肝细胞铁死亡, 从而导致肝损伤和纤维化。Wu 等^[63]研究发现代谢调节关键分子 - 成纤维细胞生长因子 21 (recombinant fibroblast growth factor 21, FGF21) 能够促进 HO-1 的泛素化降解, 从而通过激活 NRF2 通路, 抑制肝细胞铁死亡, 改善肝纤维化。而 Ferrostatin-1 处理则能够明显抑制高膳食铁喂养引发的小鼠肝纤维化^[64]。此外, Yu 等^[65]发现肝硬化患者血清和肝脏中的 Tf 蛋白水平明显减少, 肝脏特异性敲除 Tf 会导致小鼠血清铁含量降低, 而肝脏中铁离子积累增加引发细胞铁死亡, 进而导致肝纤维化; 研究还发现在 Tf 缺失条件下, 抑制金属离子转运蛋白 Slc39a14 表达可显著减少肝脏铁的积累, 减轻肝细胞铁死亡, 从而改善由高膳食铁饮食或四氯化碳诱导的肝纤维化。另一方面, 铁死亡也能够通过诱导 HSC 的死亡来减少 HSC 的活化, 进而对肝纤维化发挥抑制作用。研究表明, 多酚类化合物鞣花酸 (ellagic acid, EA) 能够通过破坏 SNARE 复合物的形成来促进 FPN 介导铁积累, 促进 HSC 发生 FPN 依赖性铁死亡, 从而改善四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化损伤^[66]。Huang 等^[67]研究发现异甘草素能够通过抑制 GPX4 表达, 促进 TfR 和 DMT1 的表达, 造成细胞内铁积累和 ROS 的大量产生, 从而诱导 HSC 铁死亡缓解肝纤维化。青蒿素甲醚和青蒿琥酯作为青蒿素的衍生物具有抗炎和免疫调节的作用, 是疟疾的一线治疗药物。研究发现, p53 在各种疾病相关的细胞铁死亡中起着至关重要的调控作用, 是诱导铁死亡的关键分子。近期研究表明青蒿素甲醚可以剂量和时间依赖性地促进 p53 的入核和表达, 促进 HSC 的铁死亡, 而敲低 p53 的表达水平会减弱青蒿甲醚的抗纤维化作用。作用机制上, 青蒿甲醚能够通过降低 GPX4 和 SLC7A11 表达, 并显著提高 HSC 中的铁和 ROS 水平, 从而促进 HSC 的铁死亡^[68]。此外, 还有证据表明, 青蒿琥酯也能够通过调节 HSC 中铁自噬介导的铁死亡来缓解肝纤维化^[69]。因此, 铁死亡在不同细胞类型中对肝纤维化的作用有所不同, 细胞特异性调控铁死亡对于肝纤维化的治疗具有重要的意义。

3 总结

急慢性肝病在世界范围内有着较高的发病率和死亡率。铁死亡作为一种新型细胞死亡形式，参与了多种肝脏生理病理过程。本文总结了当前铁死亡发生的诱导因素，以及针对铁死亡的细胞防御调控机制，并以此为基础综述了铁死亡在几类常见急慢性肝病中的作用及其潜在的分子调控机制（见表 3）。尽管调节铁死亡已被证实在急慢性肝病的治疗中具有重要作用，但目前仍无靶向铁死亡治疗相关肝病的调节药物进入临床试验，大部分已知药物和靶点仍处在临床前研究阶段。其主要原因除铁死亡完整调节机制尚未完全揭示

外，还与当前仍缺乏肝脏特异性的铁死亡标志物有关，且相关铁死亡调节剂在肝病的何种阶段发挥作用也不明确；此外，药物的细胞特异性和安全性等因素也是限制现有药物进入相关肝病临床试验的重要因素。尽管如此，鉴于铁死亡与急慢性肝病的密切关系，深入研究探讨铁死亡的分子调节机制将有助于铁死亡相关肝病发病机制的揭示和靶向铁死亡治疗急慢性肝病相关创新药物的临床前研发。相信随着研究的深入，必将筛选出合适的特异性铁死亡调节剂，为急慢性肝病的临床治疗提供新的有效药物和干预方法。

表 3 靶向铁死亡改善常见急慢性肝病的相关分子机制
Tab 3 Targeting ferroptosis to alleviate acute and chronic liver disease via regulating its associated pathway

类型	分类	通路 / 靶点	靶细胞	作用	参考文献
急性肝病	DILI	抗氧化通路	肝细胞	抑制脂质过氧化，抑制铁死亡	[39]
		KEAP1/NRF2	肝细胞	抑制氧化应激，抑制铁死亡	[48]
		SIRT1 / NRF2 / HO-1	肝细胞	抑制 GSH 的消耗并减弱脂质过氧化，抑制铁死亡	[49]
		铁	肝细胞	减少不稳定铁，抑制铁死亡	[39]
	IRI	抗氧化通路	肝细胞	抑制脂质过氧化，抑制铁死亡	[41, 50]
		铁	肝细胞	减少不稳定铁，抑制铁死亡	[50]
		Huwei1, TfR1	肝细胞	减少铁的积累，抑制铁死亡	[51]
慢性肝病	NAFLD	抗氧化通路	肝细胞	抑制脂质过氧化，抑制铁死亡	[54]
		GPX4	肝细胞	抑制 GPX4 活性，抑制铁死亡	[44]
		Keap1/NRF2/ARE	肝细胞	抑制 GSH 的消耗，消除 ROS 积累，减少 MDA 含量	[56]
	ALD	抗氧化通路	肝细胞	抑制脂质过氧化，抑制铁死亡	[61]
		SIRT1	肝细胞	增加肝脏 GSH 的含量，从而减弱脂质过氧化，抑制铁死亡	[60]
	肝纤维化	FGF21/HO-1/NRF2	肝细胞	减少铁积累，抑制铁死亡	[63]
		Tf, Slc39a14	肝细胞	减少铁积累，抑制铁死亡	[65]
		SNARE/ FPN	HSC	促进铁积累，促进铁死亡	[66]
		p53/ SLC7A11	HSC	抑制 System Xc ⁻ 系统，减少 GSH 含量，促进铁死亡	[68]
	NCOX4	HSC	促进铁蛋白的降解和铁离子的释放，ROS 积累，促进铁死亡	[69]	

参考文献

[1] Zheng M, Allington G, Vilarinho S. Genomic medicine for liver disease [J]. *Hepatology*, 2022, 76 (3): 860-868.

[2] Macías-Rodríguez RU, Inzaugarat ME, Ruiz-Margáin A, et al. Reclassifying hepatic cell death during liver damage: ferroptosis-a novel form of non-apoptotic cell death? [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (5): 1651.

[3] Tang DL, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31 (2): 107-125.

[4] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185 (14): 2401-2421.

[5] Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era [J]. *Haematologica*, 2020, 105 (2): 260-272.

[6] Silva AMN, Rangel M. The (bio) chemistry of non-transferrin-bound iron [J]. *Molecules*, 2022, 27 (6): 1784.

[7] Fernandez-Mendivil C, Luengo E, Trigo-Alonso P, et al. Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: implication of iron metabolism [J]. *Redox Biol*, 2021, 38: 101789.

[8] Feng HZ, Schorpp K, Jin J, et al. Transferrin receptor is a specific ferroptosis marker [J]. *Cell Rep*, 2020, 30 (10): 3411-3423.

[9] Chen JY, Li XP, Ge CD, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29 (3): 467-480.

[10] Zhou BR, Liu J, Kang R, et al. Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 66: 89-100.

[11] Sun X, Ou Z, Xie M, et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death [J]. *Oncogene*, 2015, 34 (45): 5617-5625.

[12] Jiang L, Wang JM, Wang K, et al. RNF217 regulates iron homeostasis through its E3 ubiquitin ligase activity by

- modulating ferroportin degradation [J]. *Blood*, 2021, 138 (8): 689-705.
- [13] Zheng JS, Conrad M. The metabolic underpinnings of ferroptosis [J]. *Cell Metab*, 2020, 32 (6): 920-937.
- [14] Yang L, Wang H, Yang X, et al. Auranofin mitigates systemic iron overload and induces ferroptosis via distinct mechanisms [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 138.
- [15] Belalcázar AD, Ball JG, Frost LM, et al. Transsulfuration is a significant source of sulfur for glutathione production in human mammary epithelial cells [J]. *ISRN Biochem*, 2014, 2013: 637897.
- [16] Liang C, Zhang XL, Yang MS, et al. Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2019, 31 (51): e1904197.
- [17] Chen JJ, Galluzzi L. Fighting resilient cancers with iron [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28 (2): 77-78.
- [18] Sui XB, Zhang RN, Liu SP, et al. RSL3 drives ferroptosis through GPX4 inactivation and ROS production in colorectal cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1371.
- [19] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18 (5): 280-296.
- [20] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22 (4): 266-282.
- [21] Homma T, Kobayashi S, Fujii J. Cysteine preservation confers resistance to glutathione-depleted cells against ferroptosis via CDGSH iron sulphur domain-containing proteins (CISDs) [J]. *Free Radic Res*, 2020, 54 (6): 397-407.
- [22] Zhang YL, Swanda RV, Nie L, et al. mTORC1 couples cysteine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 1589.
- [23] Yan B, Ai Y, Sun Q, et al. Membrane damage during ferroptosis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1 [J]. *Mol Cell*, 2021, 81 (2): 355-369.
- [24] Magtanong L, Ko PJ, To M, et al. Exogenous monounsaturated fatty acids promote a ferroptosis-resistant cell state [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26 (3): 420-432.
- [25] Dalleau S, Baradat M, Gueraud F, et al. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20 (12): 1615-1630.
- [26] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22 (2): 225-234.
- [27] Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, et al. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10 (7): 1604-1609.
- [28] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13 (1): 91-98.
- [29] Kang YP, Mockabee-Macias A, Jiang C, et al. Non-canonical glutamate-cysteine ligase activity protects against ferroptosis [J]. *Cell Metab*, 2021, 33 (1): 174-189.
- [30] Brigelius-Flohe R, Flohe L. Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33 (7): 498-516.
- [31] Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 144-152.
- [32] Wu ZM, Geng Y, Lu XJ, et al. Chaperone-mediated autophagy is involved in the execution of ferroptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (8): 2996-3005.
- [33] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor [J]. *Nature*, 2019, 575 (7784): 693-698.
- [34] Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575 (7784): 688-692.
- [35] Kraft VAN, Bezjian CT, Pfeiffer S, et al. GTP Cyclohydrolase 1/tetrahydrobiopterin counteract ferroptosis through lipid remodeling [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6 (1): 41-53.
- [36] Soula M, Weber RA, Zilka O, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16 (12): 1351-1360.
- [37] Mao C, Liu XG, Zhang YL, et al. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer [J]. *Nature*, 2021, 593 (7860): 586-590.
- [38] Wang FD, Min JX. DHODH tangoing with GPX4 on the ferroptotic stage [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 244.
- [39] Jaeschke H, Ramachandran A, Chao X, et al. Emerging and established modes of cell death during acetaminophen-induced liver injury [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93 (12): 3491-3502.
- [40] Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (12): 6493.
- [41] Friedmann AJP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16 (12): 1180-1191.
- [42] Gan B. Mitochondrial regulation of ferroptosis [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220 (9): e202105043.
- [43] Yao Y, Chen ZA, Zhang H, et al. Selenium-GPX4 axis protects follicular helper T cells from ferroptosis [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22 (9): 1127-1139.
- [44] Qi J, Kim JW, Zhou Z, et al. Ferroptosis affects the progression of nonalcoholic steatohepatitis via the modulation of lipid peroxidation-mediated cell death in mice [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190 (1): 68-81.

- [45] Yuan SY, Wei C, Liu GF, et al. Sorafenib attenuates liver fibrosis by triggering hepatic stellate cell ferroptosis via HIF-1 α /SLC7A11 pathway [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55 (1): e13158.
- [46] Han L, Li L, Wu G. Induction of ferroptosis by carnosic acid-mediated inactivation of Nrf2/HO-1 potentiates cisplatin responsiveness in OSCC cells [J]. *Mol Cell Probes*, 2022, 64: 101821.
- [47] Cai XP, Cai HQ, Wang J, et al. Molecular pathogenesis of acetaminophen-induced liver injury and its treatment options [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2022, 23 (4): 265-285.
- [48] Wang M, Liu CY, Wang T, et al. (+)-clausenamide protects against drug-induced liver injury by inhibiting hepatocyte ferroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (9): 781.
- [49] Wang C, Liu T, Tong YM, et al. Ulinastatin protects against acetaminophen-induced liver injury by alleviating ferroptosis via the SIRT1/NRF2/HO-1 pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13 (6): 6031-6042.
- [50] Yamada N, Karasawa T, Wakiya T, et al. Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplantation: potential role of ferroptosis [J]. *Am J Transplant*, 2020, 20 (6): 1606-1618.
- [51] Wu Y, Jiao HK, Yue YB, et al. Ubiquitin ligase E3 HUWE1/MULE targets transferrin receptor for degradation and suppresses ferroptosis in acute liver injury [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29 (9): 1705-1718.
- [52] Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2012, 55 (1): 77-85.
- [53] Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects [J]. *J Hepatol*, 2001, 35 (5): 568-574.
- [54] Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (18): 1675-1685.
- [55] Li XY, Wang TX, Huang XM, et al. Targeting ferroptosis alleviates methionine-choline deficient (MCD)-diet induced NASH by suppressing liver lipotoxicity [J]. *Liver Int*, 2020, 40 (6): 1378-1394.
- [56] Gao G, Xie ZS, Li EW, et al. Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2-ARE signaling pathway to reduce ferroptosis [J]. *J Nat Med*, 2021, 75 (3): 540-552.
- [57] Manthey J, Shield KD, Rylett M, et al. Global alcohol exposure between 1990 and 2017 and forecasts until 2030: a modelling study [J]. *The Lancet*, 2019, 393 (10190): 2493-2502.
- [58] Mueller S, Chen C, Mueller J, et al. Novel insights into alcoholic liver disease: iron overload, iron sensing and hemolysis [J]. *J Transl Int Med*, 2022, 10 (2): 92-124.
- [59] Li LX, Guo FF, Liu H, et al. Iron overload in alcoholic liver disease: underlying mechanisms, detrimental effects, and potential therapeutic targets [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79 (4): 201.
- [60] Zhou Z, Ye TJ, DeCaro E, et al. Intestinal SIRT1 deficiency protects mice from ethanol-induced liver injury by mitigating ferroptosis [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190 (1): 82-92.
- [61] Liu CY, Wang M, Yu HM, et al. Ferroptosis is involved in alcohol-induced cell death in vivo and in vitro [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84 (8): 1621-1628.
- [62] Zhou Z, Ye TJ, Bonavita G, et al. Adipose-specific lipin-1 overexpression renders hepatic ferroptosis and exacerbates alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Hepatol Commun*, 2019, 3 (5): 656-669.
- [63] Wu A, Feng B, Yu J, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102131.
- [64] Luo YL, Chen HJ, Liu H, et al. Protective effects of ferroptosis inhibition on high fat diet-induced liver and renal injury in mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13 (8): 2041-2049.
- [65] Yu YY, Jiang L, Wang H, et al. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis [J]. *Blood*, 2020, 136 (6): 726-739.
- [66] Li LH, Wang KP, Jia RJ, et al. Ferroportin-dependent ferroptosis induced by ellagic acid retards liver fibrosis by impairing the SNARE complexes formation [J]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102435.
- [67] Huang S, Wang YH, Xie SW, et al. Isoliquiritigenin alleviates liver fibrosis through caveolin-1-mediated hepatic stellate cells ferroptosis in zebrafish and mice [J]. *Phyto-medicine*, 2022, 101: 154117.
- [68] Wang L, Zhang ZL, Li MM, et al. P53-dependent induction of ferroptosis is required for artemether to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation [J]. *IUBMB Life*, 2019, 71 (1): 45-56.
- [69] Kong ZY, Liu R, Cheng YR. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2043-2053.

(收稿日期: 2022-12-02; 修回日期: 2023-03-28)

靶向 KRAS^{G12D} 抑制剂的研究现状

陈晓睿, 毛国梁* (东北石油大学, 黑龙江 大庆 163318)

摘要: *RAS* 作为第一个被发现的人类原癌基因, 其突变在近 30% 的人类肿瘤中出现。*RAS* 突变中占比最高的 KRAS^{G12D} 突变多发于恶性实体瘤, 但目前仍缺少有效抑制剂。已有的临床前抑制剂主要分为多肽和非多肽两类, 其中多肽类抑制剂存在透膜性及成药性差等问题, 而非多肽的小分子抑制剂当前取得的成果较为显著。随着 MRTX1133 的问世, 开发直接靶向 KRAS^{G12D} 的小分子抑制剂成为了可能。本文旨在通过总结 KRAS^{G12D} 抑制剂开发成果, 一窥 KRAS^{G12D} 抑制剂的开发历程及未来可能的发展方向。

关键词: KRAS^{G12D}; 抑制剂; 肿瘤; 多肽

中图分类号: R918, R979 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)06-1581-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.028

Research status of targeted KRAS^{G12D} inhibitors

CHEN Xiao-rui, MAO Guo-liang* (Northeast Petroleum University, Daqing Heilongjiang 163318)

Abstract: As the first discovered human oncogene, *RAS* mutation occurs in nearly 30% of human cancers. KRAS^{G12D} is most prevalent in malignant solid tumors and has the highest proportion of *RAS* mutation. However effective inhibitors are still lacking. Existing preclinical inhibitors are divided into polypeptides and non-polypeptides. Among them, polypeptide inhibitors have such problems as membrane permeability and poor drug formation, while non-polypeptide small molecule inhibitors have achieved more remarkable results. It is possible to develop small molecule inhibitors that directly target KRAS^{G12D} with the appearance of MRTX1133. This paper aims to elucidate the development history of KRAS^{G12D} inhibitors and its possible future direction by summarizing the achievements of KRAS^{G12D} inhibitors.

Key words: KRAS^{G12D}; inhibitor; tumour; polypeptide

RAS (Rat sarcoma) 作为第一个被确定的人类原癌基因, 是属于 *RAS* 超家族的小 GTP 酶^[1]。自 1982 年首次在人类细胞系中发现以来, 其功能和结构已基本确定^[2]。*RAS* 共有 *HRAS* (Harvey rat sarcoma viral oncogene)、*KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) 和 *NRAS* (Neuroblastoma *RAS* virus oncogene homologue) 3 个亚型, 编码 *HRAS*、*NRAS*、*KRAS4A* 和 *KRAS4B* 等 4 个蛋白, 分子量约 21 kD^[3]。在所有人类肿瘤中, *RAS* 突变约占 30%^[4-5], 其中 *KRAS* 占比最高, 约 85%。*KRAS* 突变主要发生在 G12、G13 和 Q61 位点, 以 G12 突变最常见。*KRAS* 突变为实体瘤, 据统计, 约 90% 的胰腺癌、45% 的结直肠癌和 23% 的肺癌均与 *KRAS* 突变有关^[4, 6-8]。因此, 开发靶向 *KRAS* 突变的药物

具有极高的研究价值。

KRAS 作为分子开关, 通过在鸟苷三磷酸 (GTP, guanosine triphosphate) 结合的活性状态和鸟苷二磷酸 (GDP, guanosine diphosphate) 结合的非活性状态之间过渡, 传输来自膜结合受体的信号以调节细胞过程^[9-11]。通常, *KRAS* 的循环受鸟苷酸交换因子 (guanylate exchange factors, GEFs) 和 GTP 酶激活蛋白 (gtpase activating proteins, GAPs) 的调节, 向下游通路传递信号, 在细胞增殖、分化和存活中起关键作用^[12]。突变 *KRAS* 多为活性状态, 持续激活下游信号通路, 导致肿瘤发生^[13]。长期以来, *KRAS* 被认为是“Undruggable”。主要有以下几点原因: ① *RAS* 与 GTP 有皮摩尔级亲和力, 而胞内 GTP 浓度达 0.5 mmol · L⁻¹,

作者简介: 陈晓睿, 男, 硕士研究生, 主要从事 KRAS^{G12D} 抑制剂的开发, email: Upcchem02chenxr@163.com * 通信作者: 毛国梁, 男, 教授, 主要从事聚烯烃催化剂的开发和有机发光小分子的研究, email: maoguoliang@nepu.edu.cn

故竞争性抑制剂开发难度大；② KRAS 蛋白表面平滑，空间结构近乎球形，缺乏小分子结合口袋；③ RAS 各个亚型的 D-domain 高度类似，靶向选择性差。这种情况持续到与 KRAS^{G12C} 突变体的特异性结合口袋（Switch II pocket）以及与突变半胱氨酸不可逆结合的化合物被披露为止^[14-16]。

自第一个共价靶向 KRAS^{G12C} 的小分子先导化合物被发现以来，诸如 AMG510（Sotorasib）、MRTX849（Adagrasib）、ARS1620 等众多共价抑制剂^[17-20] 和以 BI 2852、BI 3406 为代表的泛抑制剂^[21-22] 被先后开发出来，其中 AMG510 于 2021 年获 FDA 批准上市^[23]。而 G12 突变中占比最高的 G12D 亚型仍未有进入临床的候选药物，且 KRAS^{G12D} 突变在素有“癌王”之称的胰腺癌中高发，因此开发出特异靶向 KRAS^{G12D} 突变抑制剂极为迫切。

1 KRAS 简介

1.1 KRAS 蛋白结构

KRAS 蛋白由 188 ~ 189 个氨基酸构成，分为 G 结构域、膜靶向结构域和 C 端高变区^[24]。由前 165 个残基构成的膜靶向和 G 结构域的结构和氨基酸序列基本相同，后 25 个残基构成的高变区相似性则仅 8%。而 G 结构域又分为 P loop、Switch I 和 Switch II 区域（见图 1），Switch I、II 区域结构在蛋白激活/失活过程中发生变化，而 Switch II 正是开发 KRAS 抑制剂的关键区域。



图 1 KRAS 蛋白结构

Fig 1 Structure of KRAS protein

RAS 蛋白激活与失活态的构象差异主要在 Switch I、Switch II 区域，当蛋白结合 GTP 时，Thr 35 和 Gly 60 与 GTP 的 γ -磷酸形成氢键，当蛋白结合 GDP 时，两个 Switch 区域变得相对松弛，尤其是 Switch II 区域，构象柔性极大^[25]。

1.2 KRAS 下游信号通路

在正常细胞中，KRAS 通常处于失活态。当接收到受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinase, RTKs）传输的信号时，KRAS 在 GEFs 的作用下

激活，通过下游信号通路及多种效应因子调控细胞的增殖、存活等过程（见图 2）。

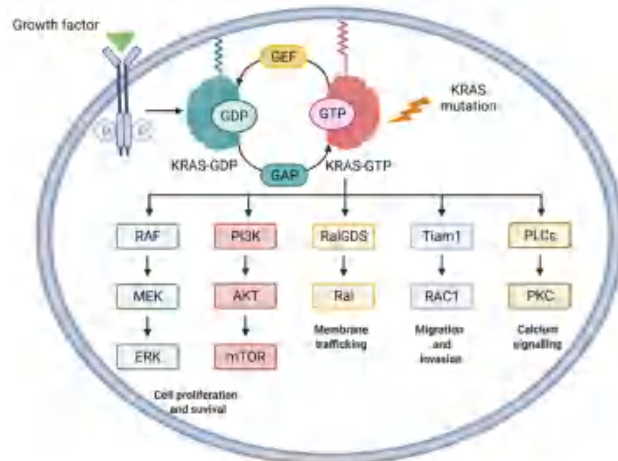


图 2 KRAS 下游信号通路^[10]

Fig 2 Downstream signaling pathway of KRAS^[10]

KRAS 下游有五条信号通路：RAF-MEK-ERK 通路、PI3K-AKT-mTOR 通路、RalGDS-Ral 通路、Tiam1-RAC1 通路、PLC γ -PKC 通路^[26]。

1.2.1 RAF-MEK-ERK 通路 丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）通路中，活化的 KRAS 将 RAF 募集到质膜上，使之二聚化。二聚化的 RAF 与 MEK 结合使其 Ser218/Ser222 磷酸化，再将信号传递给胞外信号调节激酶 ERK，使之磷酸化，从而调节肿瘤的增殖、分化^[27-28]。

1.2.2 PI3K-AKT-mTOR 通路 磷酸肌醇 3-激酶（PI3K）通路中 KRAS 结合 PI3K 的 P85 和 P110 亚基将其活化，催化 PIP2 转化为 PIP3。PIP3 结合 AKT 使其 Thr308 和 Ser473 残基磷酸化，磷酸化 AKT 进入细胞核，通过激活包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）在内的多个下游信号因子，调控细胞的增殖和代谢，并在一定程度上影响肿瘤耐药性^[29-30]。

1.2.3 RalGDS-Ral 通路 Ral 鸟嘌呤核苷酸解离刺激因子（Ral guanine nucleotide dissociation stimulators, RalGDS）是一种 GTP/GDP 交换因子^[31]，活化的 KRAS 通过 RalGDS 中的 RAS 结合域被递送至质膜上与 Ral 结合，导致 Ral 活化^[32]。活化的 Ral 通过影响下游的信号因子促进肿瘤细胞的迁移^[33]。

1.2.4 Tiam1-RAC1 通路 T 淋巴瘤侵袭和转移诱导蛋白 1（t lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1, Tiam1）于 1994 年首次在 T 淋巴瘤细胞中发现^[10]。其具有与活化 KRAS 相结合的结构域，并作为 RAC1 的相关效应子，在肿瘤的迁移和侵袭中发挥作用^[34-35]。

1.2.5 PLC ϵ -PKC 通路 磷脂酶 C ϵ (PLC ϵ) 是一种新的 RAS 效应子, 拥有一个与 GEFs 同源的类 GRF CDC25 结构域。PLC ϵ 能通过激活蛋白激酶 C (PKC) 的方式磷酸化一些钙信号通路蛋白质并调节其活性, 从而影响细胞的生物活性^[36-38]。

2 KRAS^{G12D} 抑制剂

2.1 多肽类抑制剂

多肽类抑制剂是分子量介于有机小分子和蛋白大分子之间的一类抑制剂, 具有生物活性强、用药剂量小、毒副作用低和疗效显著等突出特点, 当前针对 KRAS^{G12D} 的多肽类抑制剂主要有四种, 分别是 KRpep-2d、KS-58、KD2、MP-3995。

2.1.1 KRpep-2d KRpep-2d 由 Sakamoto 等^[39] 于 2017 年报道。通过筛选 T7 噬菌体的多肽库, 得到 3 个多肽段 KRpep-1、KRpep-2 和 KRpep-3。对 3 个多肽段进行表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 分析发现 KRpep-2 的结合亲和力和选择性最佳。故研究人员对 KRpep-2 进行优化, 得到了结合力更强的 KRpep-2d (见图 3)^[40]。酶活测试发现, 其 IC_{50} 较 KRpep-2 提升了约 6 倍。有研究利用肺癌细胞 A427 (G12D) 和 A549 (G12C) 对 KRpep-2d 的抑制活性和选择性进行评价, 通过观察 ERK1/2 磷酸化水平和 A427 细胞增殖的抑制情况, 表明 KRpep-2d 可选择性抑制 KRAS^{G12D}, 且 KRpep-2d 在 C 端和 N 端分别增加了一个精氨酸, 透膜性更佳, 但其仍未达到足以进行体内实验的程度。

Niida 等^[41] 对 KRpep-2d 进行了构效关系 (structure activity relationship, SAR) 研究, 发现其环状结构是保持活性的关键。对 KRpep-2d 进行 Ala 扫描后发现 Leu7、Ile9 和 Asp12 是影响 KRpep-2d 抑制活性的关键残基。此外, 加入二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol, DTT) 还原二硫键后其活性减弱, 这表明在胞内 Cys 之间的二硫键易裂解^[42], 故通过在两个 Cys 之间引入一个亚甲基, 以克服上述影响; 该研究还指出, 可通过替换除 Leu7、Ile9 和 Asp12 以外的氨基酸残基, 改善环肽的选择性。另外, C 端和 N 端的精氨酸修饰表现出了更好的透膜性, 但具体原因尚不明确^[39]。

2.1.2 KS-58 作为首个具有体内抗肿瘤活性的 KRAS^{G12D} 多肽抑制剂, KS-58 是在 KRpep-2d 的基础上衍生而来的^[40]。研究人员首先通过 KRpep-2d 与 KRAS^{G12D} 的共晶结构 (PDB: 5XCO) 预测了可取代的氨基酸, 并采用酰胺键取代二硫键; 在第 6 ~ 14 位残基引入非自然氨基酸; 通过酰胺键连接 N 端氨基和 C 端羧基进行主链环化等三种策略

合成了 35 个多肽。活性测试表明氨基酸取代策略是可行的, 并进一步考虑结合活性、亲脂性、水溶性等, 设计并合成了双环肽 KS-36 (见图 3)。结果显示, KS-36 与 KRAS^{G12D} 的结合力约为 KRpep-2d 的 30 倍, 但对 A427 (G12D) 肺癌细胞的抑制率低于 KRpep-2d。

KS-36 的细胞抑制率较低, 猜测是其透膜性影响了抑制活性。去除 CPP 区域使肽段分子量降低了约 50%, 有助于通过被动融合的方式提高透膜性。但 CPP 区域是保持多肽抑制活性的关键区域, 故通过连接 KRpep-2d 的 Tyr8 和 Cys15 的方式合成了 12 个双环肽, 弥补了 CPP 区域的功能缺失。通过对 A427 (G12D) 的细胞活性抑制实验得到了最佳结构 KS-58 (见图 3), 并在包括 PANC-1 异种移植小鼠的抗肿瘤活性在内的一系列测试中均表现良好。但未来还需持续关注药代动力学特性, 并提升半衰期和结合力。

2.1.3 KD2 突变 KRAS 多为激活态, Zhang 等^[43] 开发了可作用于 GTP-KRAS^{G12D} 的多肽抑制剂 KD2 (见图 4)。研究人员利用双突变 KRAS^{G12D/T33S} 进行反靶实验, 通过对高多样性 cDNA 库的筛选, 得到三类共 16 个环肽, 每类各挑出一个具有代表性的进行研究, 分别命名为 KD1、KD2 和 KD17^[43]。利用时间分辨荧光能量转移 (time-resolved-fluorescence energy transfer, TRFRET) 观察 RAS-RAF 复合物的形成, 发现三种环肽均能在微摩尔浓度水平阻止 KRAS^{G12D}-GppNHp 和 RAF1-RBD 形成, 且选择性良好。

对 KD2 和 KRAS^{G12D}-GppNHp 的共晶结构解析表明, KD2 占据了此前发现的 Switch II 沟槽区域^[44], 这个口袋在任何已知的非 GTP-KRAS 结构中都不可见, 猜测是 KD2 通过诱导 $\alpha 2$ 螺旋和 Switch II 的大幅移动而扩大了口袋。环肽通过不同结构域上的残基如 G60、D69、D92、Y96 和 Q99 等与 KRAS^{G12D} 相互作用, 而与目标氨基酸 Asp12 的连接则由 Thr10 通过一个水分子桥完成。在对环肽的化学修饰中发现 Thr10 的突变一定程度上提高了 KD2 的 IC_{50} , 表明其仍具备进一步改进的潜力。该研究另一重要发现是 KD2 同时占据了 SIIP 和 SIIG, 这表明同时靶向 GTP-KRAS^{G12D} 和 GDP-KRAS^{G12D} 是可行的。

2.1.4 MP-3995 对 KRpep-2d 的修饰提高了其抑制活性, KS-58 更成为了第一个具有体内抑癌活性的多肽 KRAS^{G12D} 抑制剂, 但有研究表明 KRpep-2d 依赖精氨酸透膜的机制限制了其治疗潜力。

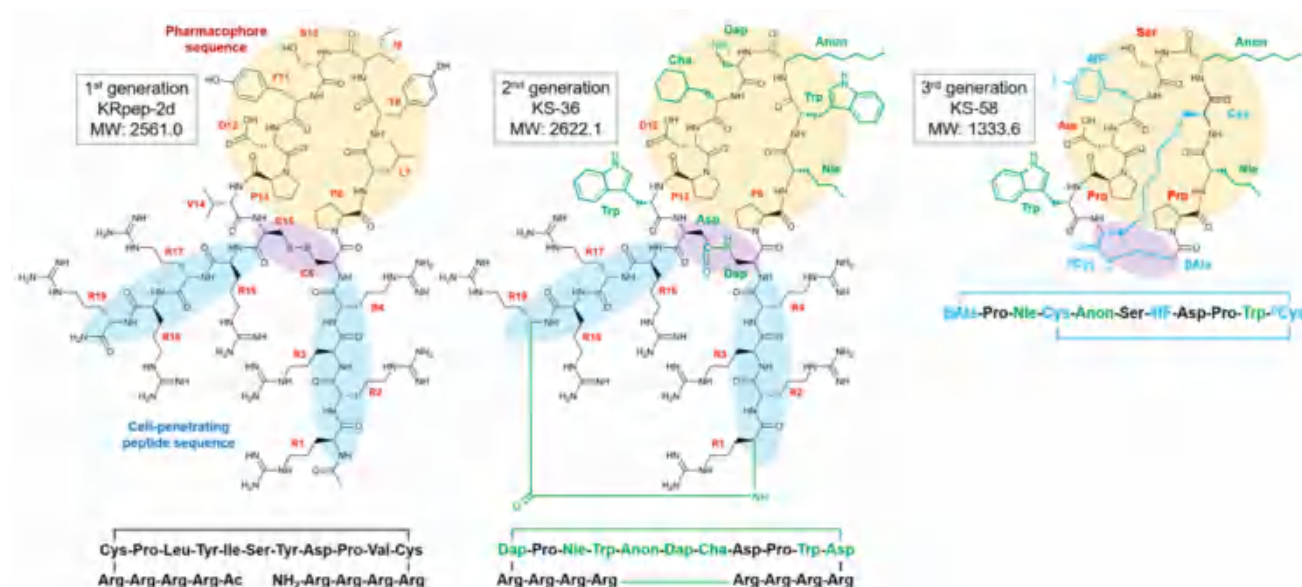


图 3 KRpep-2d, KS-36, KS-58 的化学结构

Fig 3 Chemical structures of KRpep-2d, KS-36, and KS-58

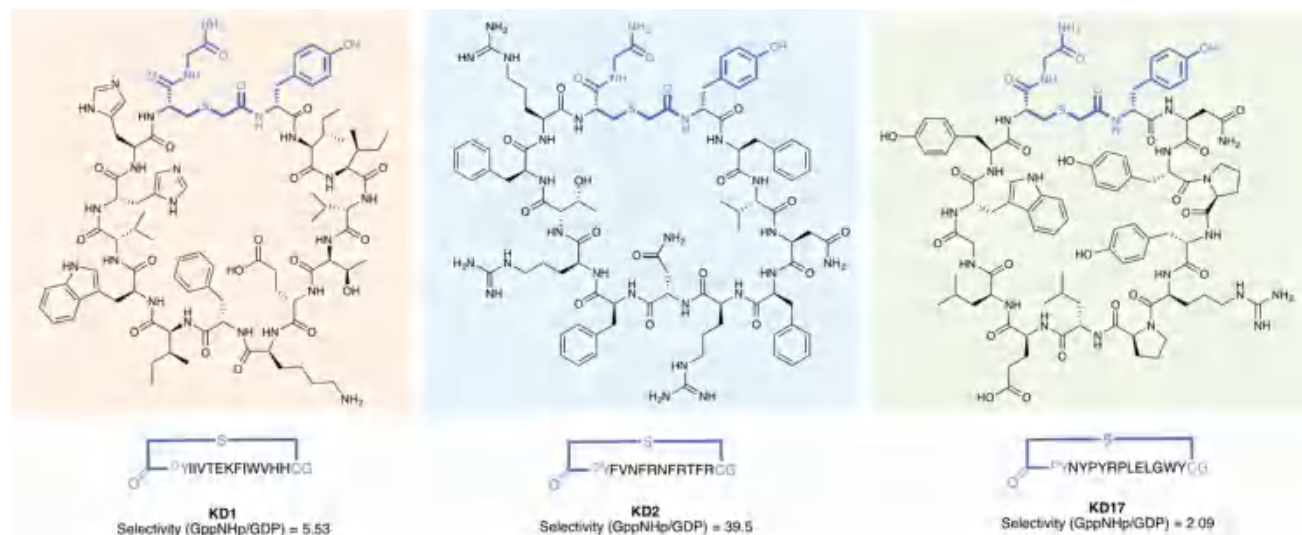


图 4 KD1, KD2, KD17 的化学结构

Fig 4 Chemical structures of KD1, KD2, and KD17

Lim 等^[45]在体外实验中发现净正电荷与组胺释放强相关,这可能导致肥大细胞发生脱颗粒反应,具有较大的潜在风险。Cys5 和 Cys15 之间二硫键在胞质内易还原,这一问题在引入亚甲基后得到解决^[41]。而使用缩硫醛替代二硫键得到的环肽 MP-6483 (见图 5),其 EC_{50} 为 $172 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,较 KRpep-2d 提高了 11 倍。通过修饰末端精氨酸,利用 *D*-Arg 取代 *L*-Arg,得到了 MP-4090 (见图 5),其胞内稳定性和活性更佳, EC_{50} 为 $140.7 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,且首次对 AsPC-1 细胞中 pERK 和 pAKT 有强烈抑制,但半衰期仍较短。在 Ser10 处引入 α -甲基,得到 MP-3995 (见图 5),抵消了 MP-4090 细胞效能的损失。结果显示,MP-4090 和 MP-3995 与 KRAS 特

异性结合,抑制了其与 RAF-RBD 的相互作用。后续研究也表明 MP-3995 能抑制 GTP/GDP 结合态,且在多个 KRAS 细胞系中也具有 p-ERK 和细胞增殖的抑制作用。但精氨酸透膜所可能导致的肥大细胞脱颗粒反应的问题仍未解决,未来对该类环肽的修饰需要在这方面做更多的努力。

2.2 非多肽类抑制剂

非多肽类抑制剂目前主要是小分子抑制剂,由于天冬氨酸难以共价靶向,当前已公布的小分子抑制剂均采用非共价的方式靶向目标蛋白,具体到已有的小分子中几乎都采用了盐桥策略进行目标氨基酸靶向,在此简要介绍各个化合物发现过程及相关表征实验。

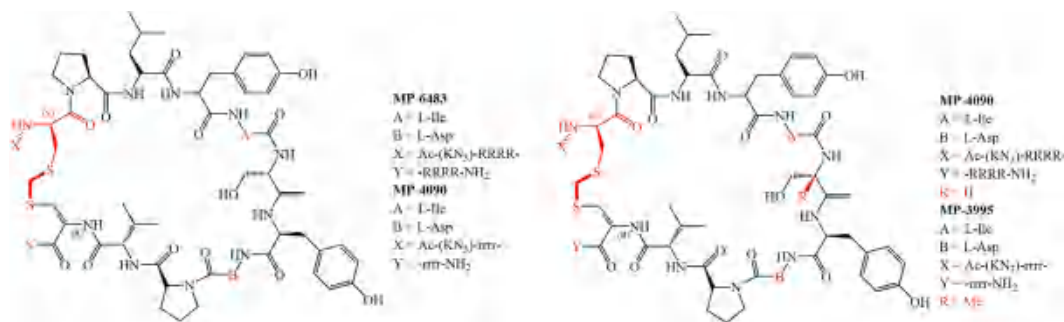


图 5 MP-6483, MP-4090, MP-3995 的化学结构

Fig 5 Chemical structures of MP-6483, MP-4090, and MP-3995

2.2.1 Compound 3144 Welsch 等^[46]通过分析 KRAS^{G12D} 的晶体结构 (PDB: 4DSN) 发现 Switch I 附近存在 3 个结合位点 D38、Y32 和 A59。通过小分子库筛选了一系列至少与 2 个位点产生相互作用的分子, 选定 Compound 3144 (见图 6a) 作为最佳候选抑制剂。对 Compound 3144 进行 ITC 和 MST 分析发现其与 KRAS^{G12D}-GppNHp 的亲和力大于 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞和 RAS 信号通路抑制实验表明其具有 RAS 信号抑制和 RAS 依赖性致死。体内实验也证实 Compound 3144 药代动力学特性良好, 使小鼠异种移植模型中肿瘤体积和 CD45⁺ 细胞减少。在 P53 缺失的 G12D 突变胰腺癌小鼠模型中, 给药后 pAKT 和 pERK1/2 均下降, 而 Caspase3 增加。这些结果表明 Compound 3144 能作为 RAS 突变胰腺癌的候选药物。虽存在一定的毒性和选择性, 但仍是一种有效的尝试。

2.2.2 KAL-21404358 Feng 等^[47]结合计算和生化分析了 KRAS^{G12D} 的晶体结构 (PDB: 4DSN), 在 C 端附近发现了 KRAS 独有的变构结合位点 P110, 并利用 Schrodinger 的 Glide docking 筛选了 350 万个分子, 最终得到了 KAL-21404358 (见图 6b)。测试发现 KAL-21404358 与 GppNHp-KRAS^{G12D} 和 GDP-KRAS^{G12D} 的 KD 值分别为 $88 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $146 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而在 4 个 KAL-21404358 结合缺陷突变体中均未结合, 这证明了 KAL-21404358 在 P110 位点的结合, 且具有选择性。之后研究人员还发现 KAL-21404358 破坏了 KRAS^{G12D} 与 BRAF 之间的作用。而对 KARS 下游 RAF-MEK-ERK 和 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的研究也证明其具有较弱的抑制。在后续的结构优化中, 通过将连接处亚甲基替换为羰基和羟乙基哌嗪替换为环胺使其结合力得到了一定提升, 但其活性和构效关系并未显著优化。

2.2.3 MRTX1133 Robert 先后发布了两项基于 KRAS^{G12C} 抑制剂 MRTX849^[18] 衍生的 KRAS^{G12D}

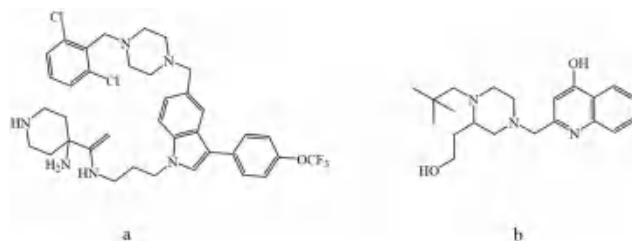


图 6 Compound 3144 和 KAL-21404358 的化学结构

Fig 6 Chemical structures of compound 3144 and KAL-21404358

抑制剂的相关专利^[48-49], 其中针对胰腺导管腺癌的专利最佳结构 IC_{50} 达到 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 具有极大的开发价值。2022 年初, Mirati 公司将化合物 MRTX1133 (见图 7b) 的研究成果发表^[50]: 通过骨架跃迁, 将 MRTX849 中的哌啶并嘧啶环替换为氟代吡啶并嘧啶环, 并去除丙烯酰基得到了化合物 5B (见图 7a), 其由哌嗪环上的质子胺与 Asp12 相互作用; 共晶结构 (PDB: 6UT0) 显示化合物 5B 与 MRTX849 的结合模式高度近似; 在对 Warhead 部分的修饰中发现化合物 15 达到了皮摩尔亲和力, 接下来继续对 C2 位置优化, 其中具有 2-氟代吡咯里西啶结构的化合物 25 IC_{50} 较化合物 15 提高了近 20 倍。而 C7 取代基深入结合位点, 通过对萘环的改造, 合成了 13 个不同结构。活性测试表明末端碳填充萘环 8 号位的疏水口袋能很好地提升活性。最终在萘环 3 号位引入氢键供体以及 8 号位引入炔基占据疏水口袋的情况下得到了 MRTX1133, 其很好地占据了 Switch II Pocket, 并且 KD 值达到了 $0.2 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在关于 MRTX1133 作用机制和抗肿瘤活性评估的文章中^[51], SPR 测试发现其对 GTP-KRAS^{G12D} 的活性为 GDP-KRAS^{G12D} 的 700 倍, 对 24/25 的 G12D 突变细胞系具有抑制作用, IC_{50} 达到纳摩尔级。在异种移植模型中对 KRAS 依赖的信号通路具有抑制作用, 并显著诱导肿瘤消退 ($\geq 30\%$)。基于 CRISPR 的筛选和药理研究阐明, 同时靶向 EGFR 或 PI3K α 等也可增强其抗肿瘤活性。

2.2.4 TH-Z835 基于 MRTX849 衍生的另一抑制剂 TH-Z835 (见图 7c) 也紧随 MRTX1133 发表^[52]。TH-Z835 在 Warhead 设计上采用了跟 MRTX1133 相同的杂双环嘌呤与 Asp12 形成盐桥, 但 TH-Z835 的活性要低许多, IC_{50} 为 $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过共晶结构 (PDB: 7EWB) 发现其可同时靶向 GDP/GTP 结合的 KRAS^{G12D}, 而在 SOS 催化的核苷酸交换实验中其也同时抑制了 mantGMPPNP/GPPNP 和 GPPNP/mantGMPPNP 的交换。在细胞实验中, TH-Z835 对 KRAS^{G12D} 突变胰腺癌细胞 (Panc-1 和 Panc 04.03) 的 pERK 和 pAKT 均表现出抑制作用, 体内实验也显著减小了肿瘤体积。另外, 与抗 PD-1 抗体的联合用药也表现出较好的协同效应。但其也存在明显的脱靶, 对 4 种非 G12D 突变细胞进行抗增殖作用检测发现, 其对 4 种细胞均表现出抗增殖作用, 小鼠模型实验中也表现出了体重减轻的表型副作用, 猜测是由于靶向了非 KRAS 的 Small GTPase。

2.2.5 KD-8 与 MRTX1133 和 TH-Z835 不同的是, KD-8 (见图 7d) 是通过化合物库筛选并修饰得到的^[53]。首先在 www.chem-space.com 网站构建 351 个能与 KRAS^{G12D} 的 Asp 相互作用的 Warhead, 再将 KRAS^{G12C} 抑制剂的噻吩并嘧啶核心与之结合得到一系列目标分子, 通过 Schrodinger 对 351 个化合物和突变蛋白进行对接^[53]。其中化合物 B (见图 7d) 由于易合成被选定为后续合成修饰的母体。通过对化合物 B 的修饰, 得到 23 个化合物, 以 ARS-1620 为阴性对照, 在 Panc-1、SW1990 及 CT26 细胞中测试了这些化合物的抗增殖活性。结果显示 KD-8 具有最佳的活性和选择性, 可在体外诱导肿瘤细胞的凋亡, ITC 测得其 KD 值为 $33 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Western blot 分析发现 KD-8 能显著降低 GTP-KRAS。在对下游信号影响实验中, pRAF 和 pERK 也表现出对 KD-8 剂量依赖性的下降。抗肿瘤实验结束后, KD-8 也并未对体内主要器官产生影响, 证明了其安全性好。

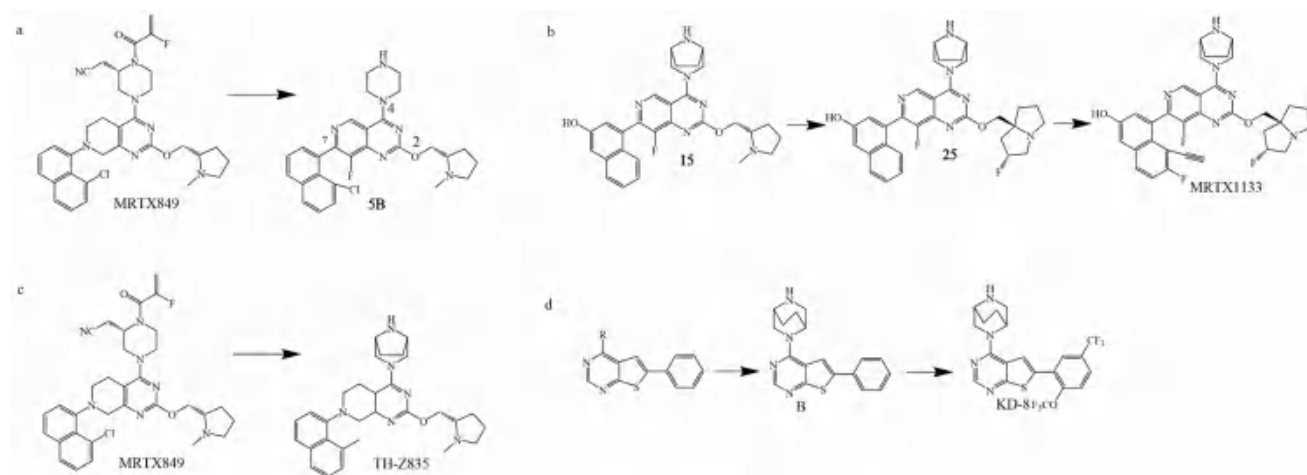


图 7 小分子化合物结构及优化过程

Fig 7 Chemical structure and optimization process of small molecule

3 讨论与展望

KRAS^{G12D} 作为占比最高的 KRAS 突变, 在多种恶性肿瘤中均有发现, 但至今仍未有一款有效的抑制剂成功上市, 因此开发一款高活性和高选择性的 KRAS^{G12D} 抑制剂显得极为迫切。

在近十年的研究中, 多肽类抑制剂率先取得了一定进展, 但受其结构和分子量的制约, 成效不明显。而在非多肽类抑制剂方面, MRTX1133 无疑是对 KRAS^{G12D} 小分子抑制剂开发能否成功最好的回应^[54]。MRTX1133 基于 KRAS^{G12C} 抑制剂衍生而来, 利用了盐桥的策略来实现与突变天冬氨酸的相互作用, 这一发现为基于 KRAS^{G12C} 抑制剂进行 KRAS^{G12D} 抑制剂的开发提供了思路。张永辉

课题组^[52]同期发表的 TH-Z835, 也验证了这一思路的可行性, 并首次证明其可同时靶向激活和失活态的 KRAS 突变蛋白。

除了以上策略, 近年来, 计算机虚拟筛选和结构分析相结合的新技术的发展也为新药研发提供了极大的助力, KD-8 的开发就是绝佳的例子, 此外还有一个计算机设计的 KRAS^{G12D} 抑制剂也曾被报道^[55]。另外, PROTAC 技术的应用也为药物研发提供了新的解法, 参照 LC-2^[56], 以 MRTX1133 为基础设计 PROTAC 似乎是可行的。当前已有的临床前抑制剂几乎都存在脱靶毒性, 因此提高选择性是未来必须解决的问题。或许共价 KRAS^{G12D} 抑制剂能够有望克服脱靶的问题^[57],

Shokat 小组早期曾对共价靶向 KRAS^{G12D} 进行过尝试, 不过未取得明显效果^[58]。针对天冬氨酸的共价, 环氧乙烷结构的开环加成或许是比较好的策略, 若能开发出一款共价 KRAS^{G12D} 抑制剂, 则很大程度上会解决活性和选择性问题, 这也是未来主要的研究方向。

参考文献

- [1] Goody RS, Muller MP, Rauh D. Mutant-specific targeting of ras g12c activity by covalently reacting small molecules [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26 (10): 1338-1348.
- [2] Cox AD, Der CJ. Ras history: the saga continues [J]. *Small GTPases*, 2010, 1 (1): 2-27.
- [3] Pylayeva-gupta Y, Grabocka E, Bar-sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11 (11): 761-774.
- [4] Cucurull M, Notario L, Sanchez-Cespedes M, et al. Targeting KRAS in lung cancer beyond KRAS G12C inhibitors: the immune regulatory role of KRAS and novel therapeutic strategies [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 793121.
- [5] Drosten M, Barbacid M. Targeting the MAPK pathway in KRAS-driven tumors [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37 (4): 543-550.
- [6] Kessler D, Gmachl M, Mantoulidis A, et al. Drugging an undruggable pocket on KRAS [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (32): 15823-15829.
- [7] Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (D1): D941-D947.
- [8] Thein KZ, Biter AB, Hong DS. Therapeutics targeting mutant KRAS [J]. *Annu Rev Med*, 2021, 72: 349-364.
- [9] Dias CP, Machado AL, Martins F, et al. Targeting the tumor microenvironment: an unexplored strategy for mutant KRAS tumors [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (12): 2010.
- [10] Fan GJ, Lou LL, Song ZD, et al. Targeting mutated GTPase KRAS in tumor therapies [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 226: 113816.
- [11] Johnson CW, Seo HS, Terrell EM, et al. Regulation of GTPase function by autophosphorylation [J]. *Mol Cell*, 2022, 82 (5): 950-968 e914.
- [12] Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (1): 11-22.
- [13] Peeters M, Kafatos G, Taylor A, et al. Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomised controlled trials [J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51 (13): 1704-1713.
- [14] Chen H, Smaill JB, Liu T, et al. Small-molecule inhibitors directly targeting KRAS as anticancer therapeutics [J]. *J Med Chem*, 2020, 63 (23): 14404-14424.
- [15] Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, et al. Drugging the undruggable RAS: mission possible? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13 (11): 828-851.
- [16] Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions [J]. *Nature*, 2013, 503 (7477): 548-551.
- [17] Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS (G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2019, 575 (7781): 217-223.
- [18] Fell JB, Fischer JP, Baer BR, et al. Identification of the clinical development candidate MRTX849, a covalent KRAS (G12C) inhibitor for the treatment of cancer [J]. *J Med Chem*, 2020, 63 (13): 6679-6693.
- [19] Janes MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent g12c-specific inhibitor [J]. *Cell*, 2018, 172 (3): 578-589 e517.
- [20] Lanman BA, Allen JR, Allen JG, et al. Discovery of a covalent inhibitor of KRAS (G12C) (AMG 510) for the treatment of solid tumors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63 (1): 52-65.
- [21] Hofmann MH, Gmachl M, Ramharter J, et al. BI-3406, a potent and selective SOS1-KRAS interaction inhibitor, is effective in KRAS-driven cancers through combined MEK inhibition [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11 (1): 142-157.
- [22] Tran TH, Alexander P, Dharmaiah S, et al. The small molecule BI-2852 induces a nonfunctional dimer of KRAS [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117 (7): 3363-3364.
- [23] FDA approves first KRAS inhibitor: sotorasib [J]. *Cancer Discovery*, 2021, 11 (8): OF4.
- [24] Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, et al. Dragging ras back in the ring [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25 (3): 272-281.
- [25] Brian EH, Dafna BS, Nicolas N. The structural basis for the transition from Ras-GTP [J]. *PNAS*, 2002, 99: 12138-12142.
- [26] Bhattacharya S, Socinski MA, Burns TF. KRAS mutant lung cancer: progress thus far on an elusive therapeutic target [J]. *Clin Transl Med*, 2015, 4 (1): 35.
- [27] Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2009, 283 (2): 125-134.
- [28] Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13 (12): 928-942.
- [29] Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170 (4): 605-635.
- [30] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, 168 (6): 960-976.
- [31] Yoshizawa R, Umeki N, Yanagawa M, et al. Single-molecule fluorescence imaging of RalGDS on cell surfaces during signal transduction from Ras to Ral [J]. *Biophys Physicobiol*, 2017, 14: 75-84.
- [32] Kenji M, Shosei K, Yoshiharu M, et al. Plasma mem-

- brane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation [J]. *Oncogene*, 1999, 18: 1303-1312.
- [33] Ferro E, Trabalzini L. RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all [J]. *Cell Signal*, 2010, 22 (12): 1804-1810.
- [34] Guo XJ, Wang M, Jiang JX, et al. Balanced Tiam1-rac1 and RhoA drives proliferation and invasion of pancreatic cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11 (3): 230-239.
- [35] Hofbauer SW, Krenn PW, Ganghammer S, et al. Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Blood*, 2014, 123 (14): 2181-2188.
- [36] Kelley G, Reks SE, Ondrako JM, et al. Phospholipase C (epsilon): a novel Ras effector [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (4): 743-754.
- [37] Song C, Hu CD, Masago M, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (4): 2752-2757.
- [38] Van Rossum DB, Patterson RL. PKC and PLA2: probing the complexities of the calcium network [J]. *Cell Calcium*, 2009, 45 (6): 535-545.
- [39] Sakamoto K, Kamada Y, Sameshima T, et al. K-Ras (G12D)-selective inhibitory peptides generated by random peptide T7 phage display technology [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484 (3): 605-611.
- [40] Sakamoto K, Masutani T, Hirokawa T. Generation of KS-58 as the first K-Ras (G12D)-inhibitory peptide presenting anti-cancer activity in vivo [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 21671.
- [41] Niida A, Sasaki S, Yonemori K, et al. Investigation of the structural requirements of K-Ras (G12D) selective inhibitory peptide KRpep-2d using alanine scans and cysteine bridging [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27 (12): 2757-2761.
- [42] Peng Q, Zhong ZL, Zhuo RX. Disulfide cross-linked polyethylenimines (PEI) prepared via thiolation of low molecular weight PEI as highly efficient gene vectors [J]. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 499-506.
- [43] Zhang ZY, Gao R, Hu Q, et al. GTP-state-selective cyclic peptide ligands of K-Ras (G12D) block its interaction with Raf [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6 (10): 1753-1761.
- [44] Gentile DR, Rathinaswamy MK, Jenkins ML, et al. Ras binder induces a modified switch-II pocket in GTP and GDP states [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24 (12): 1455-1466 e1414.
- [45] Lim S, Boyer N, Boo N, et al. Discovery of cell active macrocyclic peptides with on-target inhibition of KRAS signaling [J]. *Chem Sci*, 2021, 12 (48): 15975-15987.
- [46] Welsch ME, Kaplan A, Chambers JM, et al. Multivalent small-molecule pan-RAS inhibitors [J]. *Cell*, 2017, 168 (5): 878-889 e829.
- [47] Feng H, Zhang Y, Bos PH, et al. K-Ras (G12D) has a potential allosteric small molecule binding site [J]. *Biochemistry*, 2019, 58 (21): 2542-2554.
- [48] Kargbo RB. Targeting KRASG12D mutant for the potential treatment of pancreatic cancer [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2021, 12 (11): 1643-1645.
- [49] Kargbo RB. Targeting the KRASG12D mutant as potential therapy in cancer [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2021, 12 (8): 1212-1213.
- [50] Wang X, Allen S, Blake JF, et al. Identification of MRTX1133, a noncovalent, potent, and selective KRAS (G12D) inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2022, 65 (4): 3123-3133.
- [51] Hallin J, Bowcut V, Calinisan A, et al. Anti-tumor efficacy of a potent and selective non-covalent KRASG12D inhibitor [J]. *Nat Med*, 2022, 28 (10): 2171-2182.
- [52] Mao ZW, Xiao HY, Shen PP, et al. KRAS (G12D) can be targeted by potent inhibitors via formation of salt bridge [J]. *Cell Discov*, 2022, 8 (1): 5.
- [53] Li L, Liu J, Yang ZC, et al. Discovery of thieno[2, 3-d]pyrimidine-based KRASG12D inhibitors as potential anti-cancer agents via combinatorial virtual screening [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 233: 114243.
- [54] Zheng Q, Peacock DM, Shokat KM. Drugging the next undruggable KRAS allele-Gly12Asp [J]. *J Med Chem*, 2022, 65 (4): 3119-3122.
- [55] Kulkarni AM, Kumar V, Parate S, et al. Identification of new KRASG12D inhibitors through computer-aided drug discovery methods [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (3): 1309.
- [56] Bond MJ, Chu L, Nalawansa DA, et al. Targeted degradation of oncogenic KRAS (G12C) by VHL-recruiting PROTACs [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6 (8): 1367-1375.
- [57] Ostrem JML, Shokat KM. Targeting KRAS G12C with covalent inhibitors [J]. *Annu Rev Biochem*, 2022, 6 (1): 49-64.
- [58] McGregor LM, Jenkins ML, Kerwin C, et al. Expanding the scope of electrophiles capable of targeting K-Ras oncogenes [J]. *Biochemistry*, 2017, 56 (25): 3178-3183.

(收稿日期: 2022-12-30; 修回日期: 2023-02-21)

倍半萜内酯类天然产物抗肿瘤活性及机制研究进展

林金榕, 陈四保* (中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 恶性肿瘤是威胁人类生命健康主要因素之一。抗肿瘤药物的研发一直是热点和重点。天然产物历来是新药的重要来源, 倍半萜内酯类化合物是一大类具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多种显著生物活性的天然化合物, 特别是其抗肿瘤活性吸引了研究者的兴趣, 对该类化合物的研究进展较快。本文对 2015—2022 年倍半萜内酯类化合物抗肿瘤活性及机制的研究进行了归纳总结, 为探索倍半萜内酯类化合物抗肿瘤研究提供新的依据和思路。

关键词: 倍半萜内酯; 天然产物; 抗肿瘤活性; 作用机制

中图分类号: R96, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1589-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.029

Advance in antitumor activity and mechanism of natural sesquiterpene lactones

LIN Jin-rong, CHEN Si-bao* (*Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193*)

Abstract: Malignant tumor is a main threat to human life and health. The research and development of antitumor drugs has always been a hotspots. Natural products are important sources of new drugs. Sesquiterpene lactones include many natural compounds with anti-inflammatory, antibacterial, anti-tumor and other significant biological activities. Their anti-tumor activities have attracted the attention of researchers, and the research progress in these compounds is rapid. This paper summarized to the antitumor activities and mechanisms of sesquiterpene lactones from 2015 to 2022, provide new ideas for exploring anti-tumor studies of sesquiterpene lactones.

Key words: sesquiterpene lactone; natural product; anti-tumor activity; mechanism of action

恶性肿瘤是全球主要的公共卫生问题, 也是中国居民死亡的主要原因^[1]。尽管在研究和治疗肿瘤方面已取得了重大进展, 开发新的抗肿瘤药物仍然至关重要。天然产物是抗肿瘤新药开发的重要来源, 其中倍半萜内酯类天然产物由于其生物活性和抗肿瘤潜力而受到重视^[2]。

倍半萜内酯是一大类次生代谢产物, 绝大多数来源于菊科植物, 具有抗肿瘤、抗炎、抗菌等多种生物活性。倍半萜内酯类的化学结构以 15 个碳原子的骨架为基础, 由 3 个环状异戊二烯结构组成, 其中一个为五元 (γ) 内酯基团 (环酯)^[3]。根据其羧基骨架、取代基的类型和位置, 倍半萜内酯类可分为吉马内酯 (germacranolides)、愈创木内酯 (guaianolides)、伪愈创木内酯 (pseudo-

guaianolides)、桉烷内酯类 (eudesmanolides)、榄香烷内酯 (elemanolides) 等。近年来发现具有抗肿瘤活性的倍半萜内酯主要来源于青蒿素类、土木香内酯类、地胆草内酯类、鹅不食草内酯类、小白菊内酯类等。

本综述总结了 2015—2022 年倍半萜内酯类天然产物及其衍生物的抗肿瘤活性研究进展。

1 倍半萜内酯化合物

1.1 青蒿素类

青蒿素 (1) 是在菊科植物黄花蒿中发现的倍半萜内酯类化合物, 此外, 其衍生物双氢青蒿素 (2) 和青蒿琥酯 (3) 对多种肿瘤具有显著的抑制作用 (见图 1 和表 1)。

1.2 土木香内酯类

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81872769)。

作者简介: 林金榕, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 15062316822@163.com *通信作者: 陈四保, 男, 研究员, 主要从事天然药物化学研究, email: sbchen@implad.ac.cn

表 1 青蒿素及其衍生物的抗肿瘤活性

Tab 1 Anti-tumor activity of artemisinin derivatives

化合物	肿瘤	肿瘤细胞	模型	活性	作用机制	文献
1	胆囊癌	GBC-SD, NOZ	体外	G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡	p-ERK1/2↓, CDK4↓, cyclin D1↓, p16↑, [4] caspase 3↑, PARP↑, 活性氧 (ROS) ↑	
	非小细胞肺癌	A549, H1299	体外	G ₁ 期阻滞, 抑制迁移和侵袭	ROS↑, cyclin D1↓, Wnt/β-catenin↓	[5]
2	非小细胞肺癌	A549	体外	诱导凋亡, 诱导铁死亡	xCT↓, ROS↑	[6]
	食管癌	Eca-109, TE-1 EC	体外	诱导自噬, 抑制迁移	LC3↑, SQSTM↓; Akt/mTOR↓	[7]
	结肠癌	HCT116	体外	诱导凋亡	BAX↑, PARP↓, caspase-3↑, caspase-9↑, [8] MAPK*, JAK2↓, STAT3↓	
	上皮性卵巢癌	SKOV3	体外	诱导 G ₂ /M 期阻滞, 诱导自噬	NF-κB↓	[9]
3	非小细胞肺癌	A549, H1299	体外	G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭	cyclin D1↓, Wnt/β-catenin↓, STAT3↓, [10] Mcl-1↓, Survivin↓	
		NCI-H1975, NCI-H358	体外	抑制糖酵解	ERK/c-Myc↓	[11]
	膀胱癌	T24, EJ	体外	抑制迁移, 诱导凋亡, 诱导自噬	Bax↑, cl-caspase-3↑, cl-PARP↑, Bcl-2↓, [12] LC3B- II / I ↑, ROS↑, AMPK-mTOR- ULK1↑	
	胚胎横纹肌肉瘤	TE671, RD18	体外	诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭	ROS↑, MAPK*	[13]
	弥漫大 B 细胞淋巴瘤	U2932, SU-DHL4	体外	诱导凋亡, G ₀ /G ₁ 期阻滞, 诱导自噬, 诱导铁死亡	cl-caspase-3↑, cl-PARP↑, Cyclin D1↓, [14] LC3B- I / II ↑, p62↓, STAT3↓	

注 (Note): * 表示有影响 (*Shows impact)。

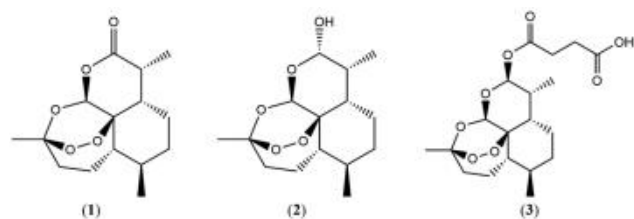


图 1 来源于黄花蒿的青蒿素及其衍生物的结构

Fig 1 Structure of artemisinin and artemisinin derivatives from *Artemisia annua* L.

在土木香 *Inula helenium* L. 中发现的具有抗肿瘤活性的倍半萜内酯类化合物主要有土木香内酯 (4)、异土木香内酯 (5)、木香烯内酯 (6) 和去氢木香内酯 (7), 其结构和作用机制见图 2 和表 2。

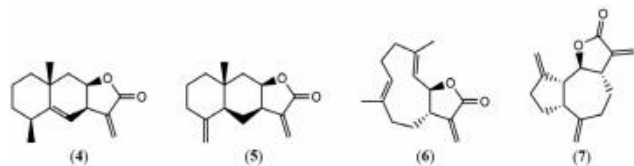


图 2 来源于土木香的倍半萜内酯类化合物的结构

Fig 2 Structure of sesquiterpene lactones from *Inula helenium* L.

1.3 地胆草内酯类

在地胆草 *Elephantopus scaber* L. 中发现的具有抗肿瘤活性的倍半萜内酯类化合物主要有去氧地胆草素 (8)、异去氧苦地胆素 (9)、地胆草种内酯 (10) 和衍生物 DETD-35 (11)、Elephantopinolide A (12)、Elephantopinolide F (13) 和 Elephantopinolide J (14)、SCP-7 (15), 其结构和作用机制见图 3 和表 3。

1.4 鹅不食草内酯类

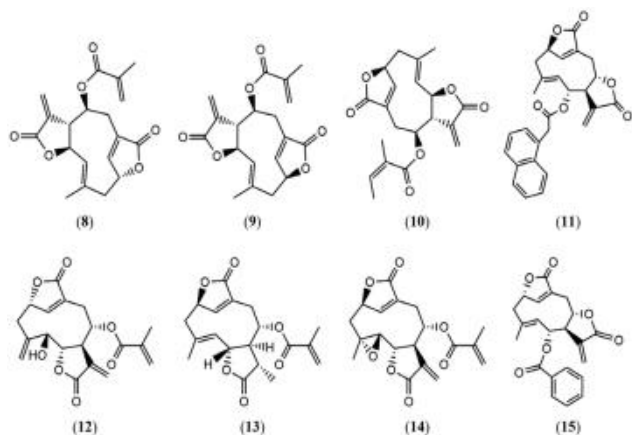


图 3 来源于地胆草的倍半萜内酯类化合物及其衍生物的结构

Fig 3 Structure of sesquiterpene lactones and their derivatives from *Elephantopus scaber* L.

在鹅不食草 *Centipeda minima* L. 中发现的具有抗肿瘤活性的倍半萜内酯类化合物主要有山金车酯 D (16) 和短叶老鹳草素 (17), 结构和作用机制见图 4 和表 4。

1.5 小白菊内酯类

在小白菊 *Tanacetum parthenium* L. 中发现的具有抗肿瘤活性的倍半萜内酯类化合物主要有小白菊内酯 (18)、二甲氨基小白菊内酯 (19)、乌心石内酯 (20)、Epoxymicheliolide (21) 和 Dimethylaminomicheliolide (22), 其结构和作用机制见图 5 和表 5。

1.6 其他来源的倍半萜内酯类天然产物

从旋覆花属植物 *Inula aucleriana* 中分离得到的化合物旋覆花内酯 Britannin (23) 对多数肿瘤细

表 2 来源于土木香的倍半萜内酯类化合物

Tab 2 Sesquiterpene lactones from *Inula helenium* L.

化合物	肿瘤	肿瘤细胞	模型	活性	作用机制	文献
4	食管腺癌	KYAE-1	体外	诱导 G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡	Nrf2↓ → ROS↑	[15]
	非小细胞肺癌	A549/T	体外	诱导凋亡	cl-PARP↑, cl-caspase-9↑, cl-caspase-3↑; STAT3↓, FUT4↓, P-GP↓	[16]
		NCI-H1299, Anip973	体外	诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭	Bcl-2↓, Bax↑, MMP-9↓, MMP-7↓, MMP-2↓, p38 MAPK↑, NF-κB↓	[17]
	结肠癌	HCT116	裸鼠	抑制肿瘤生长	MAPK-JNK/c-Jun↑	[18]
	三阴乳腺癌	MDA-MB-231	裸鼠	抑制肿瘤生长	TrxR1↓ → ROS↑, ATF4↑, CHOP↑, cl-caspase-3↑	[19]
	宫颈癌	Hela	体外	诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭, 诱导自噬	N-Cadherin↓, Vimentin↓, MMP-2↓, MMP-3↓, MMP-9↓, MMP-13↓; Beclin-1↑, LC3IB↑, Bcl-2↓, P62↓, BMI1↓; TrxR1↓ → ROS↑	[20-21]
5	结肠癌	HCT116, HCT-15	体外	诱导凋亡	ROS↑, JNK↑	[22]
	肝癌	Hep3B	体外	诱导凋亡	Caspase3↑, Caspase8↑, Caspase9↑, PARP↓, DR5↑, DR4↑, Fas↑, Bcl-2↓, Bax↑; ROS↑, MAPK↑	[23]
	胰腺癌	PANC-1	体外	抑制迁移和侵袭	EGF-PI3K-Skp2-Akt ↓, Caspase3↑, Bax↑	[24]
	乳腺癌	MDA-MB-231	体外	抑制迁移和侵袭	MMP-2↓, MMP-9↓, p38 MAPK/NF-κB↓	[25]
	结肠癌	HCT-116, SW620, HT-29	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡, 内质网应激	MDM2↓, CDC2↓, cyclin B1↓, p53↑, Bax↑, Bcl-2↓, cl-caspase-3↑, cl-PARP ↑; TrxR1↓ → ROS↑; p-eIF2α↑, ATF4↑, CHOP↑	[26]
6	胃癌	HGC-27	裸鼠	抑制肿瘤生长, 诱导凋亡, 诱导自噬	Ki-67↓, cl-caspase 3↑, Bak↑, Bax↑, cl-PARP↑; LC3B II ↑, p-AKT↓, p-GSK3β↓	[27]
	皮肤癌	A431	体外	诱导凋亡	Bax↑, Bcl-2↓, Bcl-xL↓, cl-caspase 3↑, cl-PARP↑, p21↑, JNK↑, p38↑; ERK↓, STAT3↓, NF-κB↓, Akt↓	[28]
	食管癌	Eca109	裸鼠	抑制肿瘤生长, 诱导自噬	cl-caspase 3↑, cl-caspase 9↑, cl-PARP↑, Bcl-2/Bax↓; PI3K/Akt/Bad↓, p62↓, LC3-II/LC3-I↑	[29]

注 (Note): * 表示有影响 (*Shows impact)。

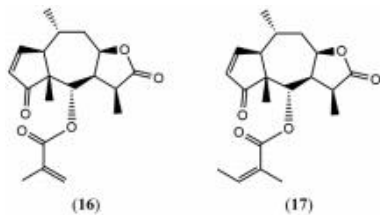


图 4 来源于鹅不食草的倍半萜内酯类化合物的结构
Fig 4 Structure of sesquiterpene lactones and their derivatives from *Centipeda minima* L.

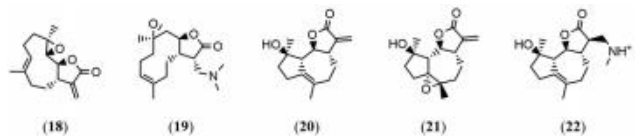


图 5 来源于小白菊的倍半萜内酯类化合物及其衍生物的结构
Fig 5 Structure of sesquiterpene lactones and their derivatives from *Tanacetum parthenium* L.

胞具有抑制作用, 此外来自中药白术 *Atractylodes macrocephala* 中的倍半萜内酯有白术内酯 I (24)、白术内酯 II (25); 来自泥胡菜 *Hemistepta lyrata* Bunge 的有 Hemistepsin A (26); 来自中药苍耳 *Xanthium strumarium* L. 的有叶黄制菌素 (27); 来自肿柄菊 *Tithonia diversifolia* A. Gray. 的有圆叶肿柄菊素 C tagitinin C (28); 来自于毒伞芹 *Thapsia gar-*

ganica L. 的有毒胡萝卜素 (29); 来自牛樟芝 *Antrodia cinnamomea* 的有 Antrocin (30); 来自于旋覆花属植物 *Inula oculis-christi* 的有天人菊内酯 (31)。

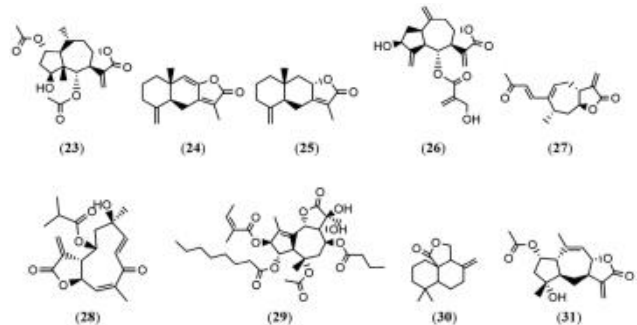


图 6 其他倍半萜内酯类化合物
Fig 6 Structure of sesquiterpene lactones from other origins

2 倍半萜内酯类化合物与抗肿瘤药物的联用

肿瘤耐药性是肿瘤治疗的一大障碍, 越来越多的研究表明, 将天然产物与抗肿瘤药物联用可以带来更好的治疗效果。在倍半萜内酯类化合物与抗肿瘤药物的联用中, 主要是与化疗、放疗和免疫治疗联用。

2.1 与化疗药物联合应用 (见表 7)

倍半萜内酯类化合物可与多种化疗药物联

表 3 地胆草的倍半萜内酯类化合物及其衍生物

Tab 3 Sesquiterpene lactones and their derivatives from *Elephantopus scaber* L.

化合物	肿瘤	肿瘤细胞株	模型	活性	作用机制	文献
8	宫颈癌	HeLa	体外	诱导凋亡	caspase-3↑, TrxR↓ → ROS↑	[30]
	白血病	K562	体外	诱导凋亡, 诱导自噬,	pro-caspase-8↑, pro-caspase-9↑, pro-caspase-3, and pro-	[31]
	结肠癌	HCT116		内质网应激, G ₂ /M 期	caspase-7↑, cl-caspase9↑, cl-PARP↑, Bax↑, Bim↑,	
	口腔表皮癌	KB		阻滞, 抑制迁移	Bad↑, Bcl-2↓, BclxL↓, Mcl-1↓, survivin↓, cIAP↓;	
	乳腺癌	T47D			ROS↑; ATF4↑, CHOP↑, GRP78↑, GADD 34↑,	
					XBP1↓; p21↑, p53↑, Cyclin B1↓, cdc2↓; MAPK*,	
					PI3K/Akt/m-TOR↓, STAT3↓, β-catenin↓; MMP-2↓,	
					MMP-9↓, uPA↓, uPAR↓	
	肺癌	A549	体外	抑制迁移和侵袭	MMP-2↓, MMP-9↓, TIMP-2↑, uPA↓, uPAR↓; MAPK*,	[32]
					NF-κB↓	
9	结肠癌	HCT116, RKO	体外	诱导凋亡	TrxR1↓ → ROS↑ → JNK↑	[33]
	乳腺癌	MDA-MB-231	体外	诱导凋亡, Sub-G ₁ 和 G ₂ /M 期阻滞, 抑制迁移	Bcl-xL↓, Bcl-2↓, MMP-9↓, cl-caspase7↑; ROS↑; NF-κB↓	[34]
10	膀胱癌	J82	体外	S 期和 G ₂ /M 期阻滞, 诱导坏死, 抑制迁移和侵袭	GSH↓ → ROS↑, p-RIP1↑, p-RIP3↑, p-MLKL↑, FAK/PI3K/Akt↓ → MMP-9↓	[35]
11	三阴乳腺癌	MDA - MB - 231	NOD/SCID 鼠	抑制肿瘤肺转移和生长	Ki67↓, VEGF↓, COX-2↓, caspase 3↑	[36]
	黑色素瘤	A375LM5IF4g/Luc	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭	Cdk1↑, CyclinB1↓, cl-caspase3↑, cl-PARP↑; N-cadherin↓, MMP2↓, vimentin↓, integrin-α4↓; ROS↑	[37]
		A375, A375-R	体外	诱导铁死亡	ROS↑, GPX4↓	[38]
12, 13	神经胶质瘤	U87	体外	诱导凋亡	GSTP1↓ → JNK/STAT3↑, Bcl-xL↓, Bax↑, cl-caspase-7↑; ROS↑	[39]
14	肝癌	HepG2, Hep3B	体外	诱导凋亡, 诱导自噬, G ₂ /M 期阻滞	caspase-3↑, FADD↑, cl-caspase-3↑, PARP↓, cl-PARP↑, Bcl-2↓, Bax↑; ROS↑, MMP↓, MAPK↑, p-AKT↓	[40]
15	非小细胞肺癌	A549, H1299, H460	体外	诱导凋亡	caspase-3↑, Bcl-2↓, Bax↑, cl-PARP↑; ROS↑	[41]
		A549	裸鼠	抑制肿瘤生长	Bax↑, Ki-67↓	

注 (Note): * 表示有影响 (*Shows impact)。

表 4 来源于鹅不食草的倍半萜内酯类化合物

Tab 4 Sesquiterpene lactones and their derivatives from *Centipeda minima* L.

化合物	肿瘤	肿瘤细胞株	模型	活性	作用机制	文献
16	鼻咽癌	CNE-2	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡	cyclin B1↓, cyclin D3↓, cdc2↓, cdk6↓; cl-PARP↑, cl-caspase 9↑, Bax↑, Bcl-2↓; PI3K/AKT↓, STAT3↓	[42]
	三阴乳腺癌	MDA-MB-231	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡, 抑制迁移	Akt/mTOR↓, STAT3↓	[43]
	黑色素瘤	B16F10	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡	p53↑, p21↑, Cdc2↑, Cyclin B1↑; IKK/IκBα/NF-κB p65↓	[44]
17	黑色素瘤	A375	裸鼠	抑制肿瘤生长	STAT3↓	[45]
			体外	诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭	cl-PARP↑, cl-caspase-3↑, cl-caspase-7↑, cl-caspase-8↑, cl-caspase-9↑, Bcl-xL↓, Mcl-1↓; MMP-9; JAK2/STAT3↓	
	乳腺癌	MCF-7	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡, 内质网应激, 抑制迁移	Xiap↓, cl-caspase-9↑, cl-PARP↑, Bcl-2↓, BAX↑, BAK↑; NOX2, NOX2↑ + NOX3↑ → ROS↑, BiP/GRP78↑, CHOP↑, ATF4↑; MAPK↑, STAT3↓; COX-2↓, MMP-2↓	[46]
	鼻咽癌	CNE-2	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡	cyclin B1↑↓, cyclin D3↓, cdc2↓, cdk6↑↓; cl-caspase-9↑, cl-PARP↑, Bax↑, Bcl-2↑↓; PI3K/AKT↓, STAT3↓	[47]
	结肠癌	CT26	体外	诱导凋亡, 诱导自噬	cl-caspase-8↑, cl-caspase-9↑, cl-caspase-3↑, Bax↑, Bcl-2↓; ROS↑, MMP↓; LC3-II ↑, Beclin1↑, Atg5↑; PI3K/AKT/mTOR↓	[48]

注 (Note): * 表示有影响 (*Shows impact)。

用, 对多种肿瘤细胞的增殖有抑制作用, 可达到增敏、增效的协同作用, 具体联用情况见表 7。

2.2 联合放疗

乌心石内酯可增强 X 线对宫颈癌 Hela 细胞的

表 5 来源于小白菊的倍半萜内酯类化合物及其衍生物

Tab 5 Sesquiterpene lactones and their derivatives from *Tanacetum parthenium* L.

化合物	肿瘤	肿瘤细胞株	模型	活性	作用机制	文献
18	原发性积液 淋巴瘤	BC3, BC1	体外	G ₀ /G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡	cl-PARP↑, p53↑, NF-κB↓	[49]
	胃癌	SGC-7901/DDP	体外	G ₀ /G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭	cyclin D1↓, p21↑; Bax↑, p53↑, Bcl-xL↓, Bcl-2↓, cl-caspase-9↑, cl-caspase-3↑; p-STAT3↓	[50]
	非小细胞 肺癌	H1975, PC-9	体外	诱导凋亡	EGFR↓, PI3K/AKT↓, MEK/ERK↓	[51]
	胰腺癌	H1975	裸鼠	抑制肿瘤生长	cl-caspase-3↑, p-EGFR↑, p-ERK↑, p-AKT↑	[52]
	胰腺癌	Panc-1, BxPC3	体外	G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡, 诱导自噬	cyclin D1↓, cl-PARP↑, cl-caspase-3↑	[52]
	宫颈癌	HeLa	体外	诱导凋亡	TrxRs↓ → ROS↑	[53]
19	原发性积液 淋巴瘤	BC3, BC1	NOD/SCID 小鼠	抑制腹水中的细胞增殖, 并延长小鼠的生存期		[49]
20	胃癌	AGS, N87	体外	诱导凋亡	Bax↑, XIAP↓; IL-6/STAT3↓, cyclinD1↑, Mcl-1↑, MMP2↑	[54]
	胶质瘤	AGS	裸鼠	抑制肿瘤生长	IL-6↓, p-STAT3↓, cyclinD1↑, Mcl-1↑, MMP2↑	[55]
	胶质瘤	U251MG	体外	抑制迁移和侵袭, 诱导凋亡	MMP-9↓, N-Cadherin↓, Vimentin↓; cl-caspase-9↑, cl-caspase-3↑, Bax↑, Bcl-2↓; COX-2↓, NF-κB↓	[56]
	肝癌	HepG2, Hepa 1-6	体外	内质网应激, 诱导凋亡	TrxR↓ → ROS↑, AIF↑, Cytochrome C↑, cl-caspase-9↑, Bax↑, Bcl-2↓; H ₂ O ₂ ↑	[56]
	肝癌	HepG2, Hepa 1-6	C57 鼠	抑制肿瘤生长	TrxR↓, ROS↑	[57]
21	肾癌	786-0, Caki-1	体外	G ₀ /G ₁ 期阻滞, 抑制迁移和侵袭, 诱导凋亡	cyclin B1↓, cyclin E1↓, CDK2↓, cyclin D1↓; cl-caspase-9↑, cl-caspase-3↑, cl-PARP↑, Bax/Bcl-2↑; COX-2↓, NF-κB↓	[57]
22	神经母细胞瘤	NGP, BE2	体外	Sub-G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡, 抑制有氧糖酵解	glucose↑, lactate↑, ATP↓, cl-PARP↑, PFKL↓	[58]
	肝癌	HepG2, Huh7	体外	G ₂ /M 期阻滞, 抑制迁移和侵袭, 诱导凋亡	cyclin B1↓, cyclin D↓, N-cadherin↓, E-cadherin↑, MMP-2↓, MMP-9↓; cl-caspase-9↑, cl-caspase-3↑, Bcl-2↓, Bax↑, Bak↑; PI3K/Akt↓, ROS↑	[59]
	胶质瘤	U87-MG, U251	体外	诱导凋亡, 诱导自噬	procaspase-3↓, Bcl-2↓, cl-caspase-3↑, Bax↑, LC3B-II↑, beclin-1↑, p62↑; ROS↑, Nrf-2/HO-1↑, TXNRD-1↑; Akt/mTOR↓, MAPK*	[60]

注 (Note): *表示有影响 (*Shows impact)。

抑制作用和凋亡诱导作用, 抑制 HeLa 细胞的硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 活性, 诱导活性氧 (ROS) 生成^[93]。Dimethylaminomicheliolide 可提高小鼠结直肠癌细胞 CT26 和胶质母细胞瘤细胞 GL261 对放疗的敏感, 诱导 ROS 生成、细胞凋亡和 DNA 双链断裂, 且可与抗 PD-L1 抗体 (α-PD-L1) 结合, 产生协同抗肿瘤效果^[94]。双氢青蒿素可通过抑制冷诱导 RNA 结合蛋白 (CIRBP) 的表达减少肺癌 A549 细胞的线粒体自噬和辐射抗性, 敲除 CIRBP 基因可抑制 A549R 细胞的线粒体自噬和辐射抗性, 与双青蒿素联用可进一步抑制 A549R 细胞的线粒体自噬和辐射抗性^[95]。Antrocin 与放疗联用可抑制前列腺癌 DAB2IP 基因敲除抗辐射细胞系 (LAPC4-KD 和 PC3-KD) 及 shControl 细胞系 (LAPC4-Con 和 PC3-Con) 的增殖并诱导其凋亡, 下调 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路, 调节细胞周期并诱导凋亡^[96]。

2.3 联合免疫治疗

青蒿素可增敏人慢性髓原白血病 K562 细胞和淋巴瘤 Raji 细胞以及小鼠淋巴瘤 YAC-1 细胞对 NK 细胞介导的细胞溶解^[97]。白术内酯 I 可显著促进人结直肠癌细胞 HCT116、SW837 和小鼠结直肠癌细胞 MC38、CT26 的肿瘤抗原呈递, 增强 CD8⁺ T 细胞的细胞毒性反应, 提高肿瘤对免疫疗法的反应^[98]。

3 倍半萜内酯类天然产物抗肿瘤活性的作用机制

倍半萜内酯类天然产物抗肿瘤活性的作用机制主要包括氧化应激、铁死亡、诱导凋亡、诱导自噬。

3.1 氧化应激

倍半萜内酯可通过抑制硫氧还蛋白还原酶 (TrxR1) 或核因子红细胞 2 相关因子 2 (Nrf2) 诱导 ROS 的产生。土木香内酯在胃癌细胞 BGC-823 和 SGC-7901 中, 通过抑制 TrxR1 的活性诱导 ROS 生成, 进而激活 MAPK 通路, 最终诱导

表 6 其他倍半萜内酯类化合物

Tab 6 Sesquiterpene lactones from other origins

化合物	肿瘤	肿瘤细胞株	模型	活性	作用机制	文献
23	结肠癌	HCT116	体外	抗血管生成, 诱导凋亡	PD-L1↓, mTOR/p70S6K/4EBP1↓ → HIF-1α↓, Ras/RAF/MEK/ERK↓ → Myc↓	[61]
	肝癌	HepG2	体外	诱导自噬, 诱导凋亡	cl-caspase-8↑, cl-caspase-9↑, cl-caspase-3↑; LC3 II↑, p62↑, ATG5↑, Beclin 1, ROS↑	[62]
24	结直肠癌	HCT116, COLO205	体外	诱导凋亡, 抑制侵袭	p-AMPK↑, cl-caspase-3↑, LC3 II↑, p-mTOR↓	[63]
		HCT116	裸鼠	抑制肿瘤生长	Bax↑, Bcl-2↓, Cyt-C↑, caspase-3↑; AKT/mTOR↓	[63]
25	前列腺癌	DU145, LNCaP	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡	p53↑, p21↑, cyclin B1↓, CDK1↓; Bax↑, Bcl-2↓; JAK2/STAT3*	[64]
26	前列腺癌	PC-3	体外	诱导自噬, 诱导凋亡	LC3B-II↑, Beclin-1↓, ROS↑	[65]
	肝癌	Huh7, HepG2	体外	Sub-G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡	cl-PARP↑; GSH/GSSG↓, ROS↑; STAT3↓	[66]
		Huh7	体外	G ₀ /G ₁ 期阻滞, 诱导凋亡, 抑制迁移	cyclin D1↓, cyclin E↓, CDK6↓, p21↑, p53↑; cl-PARP↑, cl-caspase-3↑, AMPK↑	[67]
27	肝癌	HepG2, Bel-7402, SMMC-7721	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡, 内质网应激	UPR↑	[68]
	结肠癌	HT-29	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导凋亡, 诱导自噬	ROS↑, XIAP↓	[69]
	宫颈癌	HeLa	体外	诱导凋亡	TrxR↓ → ROS↑	[70]
28	结直肠癌	HCT116	体外	G ₂ /M 期阻滞, 诱导铁死亡, 内质网应激	GSH↓, ROS↑, PERK-Nrf2-HO-1↑	[71]
29	前列腺癌	PC3	体外	诱导凋亡	caspase-3↑, caspase-9↑, p-Akt↓, p-mTOR↓, F-actin↓, cofilin-1↑, paxillin↓	[72]
	肾上腺皮	SW-13	体外	抑制迁移和侵袭, 诱导凋亡, 内质网应激	JNK↑	[73]
	质癌					
	食管癌	EC109, TE12	体外	诱导凋亡, 抑制迁移和侵袭	ROS↑, caspase-3↑, caspase-9↑, GSH↓, ERS↑, p-AMPK↑, DR5↑	[74]
30	乳腺癌	MDA-MB-231	体外	抑制迁移, 抑制细胞干性	β-catenin/Notch1/Akt↓	[75]
	膀胱癌	5637	体外	抑制迁移和侵袭, 诱导凋亡	FAK-paxillin↓, ERK-c-Fos-MMP2↓	[76]
31	胃癌	AGS, MKN45	体外	诱导凋亡	NF-κB↓, COX-2↓, MMP-9↓, TWIST-1↓, BCL-2↓, ROS↑	[77]

注 (Note): *表示有影响 (*Shows impact)。

表 7 加强化疗药物抗肿瘤活性的倍半萜内酯类化合物

Tab 7 Sesquiterpene lactones to enhance activity of chemotherapeutic drugs

化合物	化疗药物	肿瘤细胞	作用及机制	文献
1	顺铂	卵巢癌 A2780, HO8910	增敏, 下调 RAD51 的表达	[78]
2	阿霉素	宫颈癌 HeLa	增效, 诱导凋亡	[79]
	替莫唑胺	胶质瘤 U251	增敏, 诱导自噬	[80]
	5-氟尿嘧啶	结肠癌 HCT116 TP53 ^{-/-}	逆转耐药	[81]
3	阿糖胞苷	急性髓性白血病 MV4-11, ML-2, MOLM-13	协同作用	[82]
4	奥沙利铂	胰腺癌 MIA PaCa-2, PANC-1	增敏, 诱导自噬	[83]
6	伊马替尼	慢性髓性白血病 K562	增效, 诱导凋亡	[84]
7	阿霉素	肺癌 A549, H460	增强阿霉素活性	[85]
8	5-氟尿嘧啶	结肠癌 HCT116, LS174T	增效, 诱导凋亡	[86]
	索拉非尼	肝癌 Hep3B	协同作用, 诱导凋亡	[87]
	吉西他滨	胰腺癌 BxPC-3	增敏	[88]
	顺铂	黑色素瘤 B16	协同作用, 抑制肺转移	[89]
18	顺铂, 阿霉素	胃癌 SGC7901, SGC7901/	增敏	[90]
22	依托泊苷, 顺铂	神经母细胞瘤 NGP, BE2	协同作用	[58]
	顺铂	神经母细胞瘤 NGP, BE2	协同作用	
	吉西他滨, 紫杉醇, 阿霉素, 顺铂	肝癌 HepG2, Huh7	协同作用	[59]
23	长春新碱	急性淋巴细胞白血病	协同作用	[91]
25	5-氟尿嘧啶, 丝裂霉素, 顺铂, 阿霉素	结直肠癌 SW480, HCT116, Lovo, SW620	增敏	[92]
26	索拉非尼	肝癌 Huh7	增效	[66]

肿瘤细胞的凋亡^[99]。土木香内酯可通过 ROS 积累和内质网应激,抑制三阴乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞活性^[19]。此外,土木香内酯在食管腺癌细胞 KYAE-1 中,可下调 Nrf2 表达,诱导细胞内 ROS 积累,进而诱导细胞凋亡^[15]。

3.2 铁死亡

铁死亡是一种铁依赖性的调节性细胞死亡形式,是由细胞膜上的脂质过氧化物的毒性积累引发的。青蒿素和双氢青蒿素在非小细胞肺癌 A549 细胞中,可下调铁死亡的核心负调节器胱氨酸/谷氨酸转运体(xCT),上调铁死亡正向调节因子转铁蛋白受体(TFRC)的 mRNA 水平,诱导 A549 细胞铁死亡^[6]。去氧地胆草素及其衍生物 DETD-35 在黑色素瘤细胞 A375 和 A375-R 中,可重塑谷胱甘肽和初级代谢、脂质/氧脂质代谢并造成线粒体损伤,诱导黑色素瘤细胞的脂质 ROS 积累并触发铁死亡^[38]。

3.3 诱导凋亡

细胞凋亡是肿瘤细胞程序性死亡最重要的途径。大多数倍半萜内酯也是通过诱导肿瘤细胞凋亡达到抗肿瘤的目的。乌心石内酯上调肝癌细胞 HepG2 和 Hepa 1-6 中细胞凋亡诱导因子(AIF)和细胞色素 C 的表达,诱导凋亡^[56]。木香烃内酯在结肠癌细胞 HCT-15、HCT-116 和 DLD1 中,通过激活和诱导 p53 的稳定性,诱导凋亡。异木香内酯在食管鳞癌细胞 KYSE30 中,上调 PDCD4 的表达,下调 Bcl-xL 和 XIAP 的表达,诱导细胞凋亡^[54]。

3.4 细胞自噬

细胞自噬可介导细胞凋亡和细胞周期阻滞。例如,青蒿琥酯在膀胱癌细胞 T24 和 EJ 中可诱导自噬,随后激活细胞凋亡,且 AMPK-mTOR-ULK1 途径参与自噬和凋亡的过程^[12]。小白菊内酯在胰腺癌细胞 Panc-1 中,可诱导肿瘤细胞自噬,并显著上调 p62/SQSTM1、Beclin 1 和 LC3 II 的表达,最终诱导凋亡^[52]。青蒿素和双氢青蒿素在上皮性卵巢癌细胞 SKOV3 中,可阻滞细胞周期在 G₂/M 期,且诱导自噬^[9]。

4 小结

倍半萜内酯类天然产物抗肿瘤活性的作用机制主要包括氧化应激、铁死亡、诱导凋亡和细胞自噬。倍半萜内酯类主要通过抑制 PI3K/AKT/mTOR、NF- κ B、STAT3 和 Wnt/ β -Catenin 通路,激活 MAPK 通路,阻滞细胞周期,抑制迁移和侵袭,最终诱导细胞死亡。倍半萜内酯类化合物可增加细胞对化疗药物、放疗射线以及免疫疗法的敏感性,产生协同

作用,增强细胞毒性,诱导细胞凋亡。

倍半萜内酯类中以小白菊内酯为基础合成的 Dimethylaminomicheliolide 和以毒胡萝卜素为基础合成的 Mipsagargin 均已进入临床试验阶段,展示出巨大的潜力。倍半萜内酯类天然产物不仅可抑制耐药肿瘤细胞,在药物联用中还呈现增敏、增效的作用,但目前针对耐药性细胞和药物联用的研究仍有限,值得进一步研究。

参考文献

- [1] Xia CF, Dong XS, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J, 2022, 135 (5): 584-590.
- [2] Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, et al. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people [J]. IJMS, 2013, 14 (6): 12780-12805.
- [3] Cheikh IA, El-Baba C, Youssef A, et al. Lessons learned from the discovery and development of the sesquiterpene lactones in cancer therapy and prevention [J]. Expert Opin Drug Discov, 2022, 17 (12): 1377-1405.
- [4] Jia JG, Qin YY, Zhang LG, et al. Artemisinin inhibits gallbladder cancer cell lines through triggering cell cycle arrest and apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2016, 13 (5): 4461-4468.
- [5] Li XY, Gu SY, Sun DL, et al. The selectivity of artemisinin-based drugs on human lung normal and cancer cells [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 57: 86-94.
- [6] Zhang QT, Yi HM, Yao H, et al. Artemisinin derivatives inhibit non-small cell lung cancer cells through induction of ROS-dependent apoptosis/ferroptosis [J]. J Cancer, 2021, 12 (13): 4075-4085.
- [7] Chen X, He LY, Lai S, et al. Dihydroartemisinin inhibits the migration of esophageal cancer cells by inducing autophagy [J]. Oncol Lett, 2020, 20 (4): 94.
- [8] Wang DS, Zhong B, Li Y, et al. Dihydroartemisinin increases apoptosis of colon cancer cells through targeting Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling [J]. Oncol Lett, 2018, 15 (2): 1949-1954.
- [9] Li BN, Bu SX, Sun JY, et al. Artemisinin derivatives inhibit epithelial ovarian cancer cells via autophagy-mediated cell cycle arrest [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2018, 50 (12): 1227-1235.
- [10] Yan XH, Li PF, Zhan YH, et al. Dihydroartemisinin suppresses STAT3 signaling and Mcl-1 and survivin expression to potentiate ABT-263-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells harboring EGFR or RAS mutation [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 150: 72-85.
- [11] Zhang YX, Wang Y, Li YP, et al. Dihydroartemisinin and artesunate inhibit aerobic glycolysis via suppressing c-Myc signaling in non-small cell lung cancer [J]. Biochem Pharmacol, 2022, 198: 114941.
- [12] Zhou XJ, Chen Y, Wang FF, et al. Artesunate induces autophagy dependent apoptosis through upregulating ROS and activating AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells

- [J]. Chem Biol Interact, 2020, 331: 109273.
- [13] Beccafico S, Morozzi G, Marchetti MC, et al. Artesunate induces ROS-and p38 MAPK-mediated apoptosis and counteracts tumor growth in vivo in embryonal rhabdomyosarcoma cells [J]. Carcinogenesis, 2015, 36 (9): 1071-1083.
- [14] Chen YY, Wang FJ, Wu PQ, et al. Artesunate induces apoptosis, autophagy and ferroptosis in diffuse large B cell lymphoma cells by impairing STAT3 signaling [J]. Cell Signal, 2021, 88: 110167.
- [15] Chen JH, Zhang YX, Huang R, et al. Alantolactone inhibits esophageal adenocarcinoma cells through nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated ROS increment [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2022, 132 (3): 253-262.
- [16] Ding YM, Zhen Z, Nisar MA, et al. Sesquiterpene lactones attenuate paclitaxel resistance via inhibiting MALAT1/STAT3/FUT4 axis and P-glycoprotein transporters in lung cancer cells [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 795613.
- [17] Liu JL, Yang ZJ, Kong YC, et al. Antitumor activity of alantolactone in lung cancer cell lines NCI-H1299 and Anip973 [J]. J Food Biochem, 2019, 43 (9): e12972.
- [18] Ren YJ, Lv C, Zhang J, et al. Alantolactone exhibits anti-proliferative and apoptosis-promoting properties in colon cancer model via activation of the MAPK-JNK/c-Jun signaling pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476 (12): 4387-4403.
- [19] Yin CT, Dai XX, Huang XJ, et al. Alantolactone promotes ER stress-mediated apoptosis by inhibition of TrxR1 in triple-negative breast cancer cell lines and in a mouse model [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23 (3): 2194-2206.
- [20] Zhang JM, Li Y, Duan DZ, et al. Inhibition of thioredoxin reductase by alantolactone prompts oxidative stress-mediated apoptosis of HeLa cells [J]. Biochem Pharmacol, 2016, 102: 34-44.
- [21] Sun XD, Xu HX, Dai TY, et al. Alantolactone inhibits cervical cancer progression by downregulating BMI1 [J]. Sci Rep, 2021, 11 (1): 9251.
- [22] Wu FJ, Shao RR, Zheng PS, et al. Isoalantolactone enhances the antitumor activity of doxorubicin by inducing reactive oxygen species and DNA damage [J]. Front Oncol, Frontiers Media Sa, 2022, 12: 813854.
- [23] Kim MY, Lee H, Ji SY, et al. Induction of Apoptosis by Isoalantolactone in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells through activation of the ROS-dependent JNK signaling pathway [J]. Pharmaceutics, 2021, 13 (10): 1627.
- [24] Zhang CX, Huang L, Xiong JY, et al. Isoalantolactone inhibits pancreatic cancer proliferation by regulation of PI3K and Wnt signal pathway [J]. PLoS One, 2021, 16 (3): e0247752.
- [25] Wang J, Cui L, Feng L, et al. Isoalantolactone inhibits the migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-231 cells via suppression of the p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2016, 36 (3): 1269-1276.
- [26] Zhuge WS, Chen RJ, Vladimir K, et al. Costunolide specifically binds and inhibits thioredoxin reductase 1 to induce apoptosis in colon cancer [J]. Cancer Lett, 2018, 412: 46-58.
- [27] Xu CX, Huang XY, Lei XH, et al. Costunolide-induced apoptosis via promoting the reactive oxygen species and inhibiting AKT/GSK3 β pathway and activating autophagy in gastric cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 722734.
- [28] Lee SH, Cho YC, Lim JS. Costunolide, a sesquiterpene lactone, suppresses skin cancer via induction of apoptosis and blockage of cell proliferation [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (4): 2075.
- [29] Peng Y, Zhou TX, Wang SS, et al. Dehydrocostus lactone inhibits the proliferation of esophageal cancer cells in vivo and in vitro through ROS-mediated apoptosis and autophagy [J]. Food Chem Toxicol, 2022, 170: 113453.
- [30] Duan DZ, Wang YR, Pan DB, et al. Targeting thioredoxin reductase by deoxyelephantopin from *Elephantopus scaber* triggers cancer cell apoptosis [J]. Arch Biochem Biophys, 2021, 711: 109028.
- [31] Kabeer FA, Rajalekshmi DS, Nair MS, et al. Molecular mechanisms of anticancer activity of deoxyelephantopin in cancer cells [J]. Integr Med Res, 2017, 6 (2): 190-206.
- [32] Farha AK, Dhanya SR, Mangalam SN, et al. Anti-metastatic effect of deoxyelephantopin from *Elephantopus scaber* in A549 lung cancer cells in vitro [J]. Nat Prod Res, 2015, 29 (24): 2341-2345.
- [33] Hong L, Chen JDX, Wu F, et al. Isodeoxyelephantopin inactivates thioredoxin reductase 1 and activates ROS-mediated JNK signaling pathway to exacerbate cisplatin effectiveness in human colon cancer cells [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 580517.
- [34] Verma SS, Rai V, Awasthee N, et al. Isodeoxyelephantopin, a sesquiterpene lactone induces ROS generation, suppresses NF- κ B activation, modulates lncRNA expression and exhibit activities against breast cancer [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 17980.
- [35] Gao YH, Nie ZY, Cao H, et al. Scabertopin derived from *Elephantopus scaber* L. mediates necroptosis by inducing reactive oxygen species production in bladder cancer in vitro [J]. Cancers, 2022, 14 (23): 5976.
- [36] Nakagawa-Goto K, Chen JY, Cheng YT, et al. Novel sesquiterpene lactone analogues as potent anti-breast cancer agents [J]. Mol Oncol, 2016, 10 (6): 921-937.
- [37] Cvetanova B, Li MY, Yang CC, et al. Sesquiterpene lactone deoxyelephantopin isolated from *Elephantopus scaber* and its derivative DETD-35 suppress BRAF^{V600E} mutant melanoma lung metastasis in mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (6): 3226.
- [38] Chang MT, Tsai LC, Nakagawa-Goto K, et al. Phyto-sesquiterpene lactones DET and DETD-35 induce ferroptosis in vemurafenib sensitive and resistant melanoma via GPX4 inhibition and metabolic reprogramming [J]. Pharmacol Res, 2022, 178: 106148.
- [39] Yan QL, Wang XY, Bai M, et al. Sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber* exhibit cytotoxic effects on glioma cells by targeting GSTP1 [J]. Bioorg Chem, 2022, 129: 106183.
- [40] Bai M, Chen JJ, Xu W, et al. Elephantopinolide A-P, germacrane-type sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber* induce apoptosis, autophagy and G₂/M phase arrest in hepatocellular carcinoma cells [J]. Eur J Med Chem, 2020, 198: 112362.
- [41] Zhang YY, Ren H, Yan QL, et al. SCP-7, a germacrane-type sesquiterpene lactone derivative, induces ROS-me-

- diated apoptosis in NSCLC cells in vitro and in vivo [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 925: 174989.
- [42] Liu R, Dow Chan B, Mok DKW, et al. Arnicolide D, from the herb *Centipeda minima*, is a therapeutic candidate against nasopharyngeal carcinoma [J]. Molecules, 2019, 24 (10): 1908.
- [43] Qu Z, Lin YS, Mok D KW, et al. Arnicolide D inhibits triple negative breast cancer cell proliferation by suppression of Akt/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. Int J Med Sci, 2020, 17 (11): 1482-1490.
- [44] Zhu PL, Zheng ZY, Fu XQ, et al. Arnicolide D exerts anti-melanoma effects and inhibits the NF- κ B pathway [J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153065.
- [45] Su T, Wang YP, Wang XN, et al. The JAK2/STAT3 pathway is involved in the anti-melanoma effects of brevilin A [J]. Life Sci, 2020, 241: 117169.
- [46] Saleem MZ, Nisar MA, Alshwmi M, et al. Brevilin A inhibits STAT3 signaling and induces ROS-dependent apoptosis, mitochondrial stress and endoplasmic reticulum stress in MCF-7 breast cancer cells [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 435-450.
- [47] Liu R, Qu Z, Lin YS, et al. Brevilin A induces cell cycle arrest and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 594.
- [48] You PT, Wu HZ, Deng M, et al. Brevilin A induces apoptosis and autophagy of colon adenocarcinoma cell CT26 via mitochondrial pathway and PI3K/AKT/mTOR inactivation [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 619-625.
- [49] Karam L, Abou SS, Chaaban R, et al. Anticancer activities of parthenolide in primary effusion lymphoma preclinical models [J]. Mol Carcinog, 2021, 60 (8): 567-581.
- [50] Li H, Lu H, Lv M, et al. Parthenolide facilitates apoptosis and reverses drug-resistance of human gastric carcinoma cells by inhibiting the STAT3 signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2018, 15 (3): 3572-3579.
- [51] Li XL, Huang RM, Li MY, et al. Parthenolide inhibits the growth of non-small cell lung cancer by targeting epidermal growth factor receptor [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20 (1): 561.
- [52] Liu WF, Wang XS, Sun JJ, et al. Parthenolide suppresses pancreatic cell growth by autophagy-mediated apoptosis [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 453-461.
- [53] Duan DZ, Zhang JM, Yao J, et al. Targeting Thioredoxin reductase by parthenolide contributes to inducing apoptosis of HeLa cells [J]. J Biol Chem, 2016, 291 (19): 10021-10031.
- [54] Tang XG, Ding QL, Chen C, et al. Micheliolide inhibits gastric cancer growth in vitro and in vivo via blockade of the IL-6/STAT3 pathway [J]. Pharmazie, 2019, 74 (3): 175-178.
- [55] Feng DK, Liu M, Liu YT, et al. Micheliolide suppresses the viability, migration and invasion of U251MG cells via the NF- κ B signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2020, 20 (4): 67.
- [56] Xu ZR, Xu JQ, Sun SB, et al. Mecheliolide elicits ROS-mediated ERS driven immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. Redox Biol, 2022, 54: 102351.
- [57] Zhu JB, Zhao J, Yu ZL, et al. Epoxymicheliolide, a novel-guaiane-type sesquiterpene lactone, inhibits NF κ B/COX2 signaling pathways by targeting leucine 281 and leucine 25 in IKK β in renal cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2018, 53 (3): 987-1000.
- [58] Zhang SM, Hua ZY, Ba G, et al. Antitumor effects of the small molecule DMAMCL in neuroblastoma via suppressing aerobic glycolysis and targeting PFKL [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21 (1): 619.
- [59] Yao SN, Ye JP, Yin MQ, et al. DMAMCL exerts antitumor effects on hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo [J]. Cancer Lett, 2020, 483: 87-97.
- [60] Wang YJ, Zhang JC, Yang YH, et al. ROS generation and autophagosome accumulation contribute to the DMAMCL-induced inhibition of glioma cell proliferation by regulating the ROS/MAPK signaling pathway and suppressing the Akt/mTOR signaling pathway [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 1867-1880.
- [61] Zhang YF, Zhang ZH, Li MY, et al. Britannin stabilizes T cell activity and inhibits proliferation and angiogenesis by targeting PD-L1 via abrogation of the crosstalk between Myc and HIF-1 α in cancer [J]. Phytomedicine, 2021, 81: 153425.
- [62] Cui YQ, Liu YJ, Zhang F. The suppressive effects of Britannin (Bri) on human liver cancer through inducing apoptosis and autophagy via AMPK activation regulated by ROS [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497 (3): 916-923.
- [63] Wang KL, Huang W, Sang XN, et al. Atractylenolide I inhibits colorectal cancer cell proliferation by affecting metabolism and stemness via AKT/mTOR signaling [J]. Phytomedicine, 2020, 68: 153191.
- [64] Wang J, Nasser MI, Adlat S, et al. Atractylenolide II induces apoptosis of prostate cancer cells through regulation of AR and JAK2/STAT3 signaling pathways [J]. Molecules, 2018, 23 (12): 3298.
- [65] Kim KY, Yun UJ, Yeom SH, et al. Inhibition of autophagy promotes hemistepsin A-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated AMPK-dependent signaling in human prostate cancer cells [J]. Biomolecules, 2021, 11 (12): 1806.
- [66] Cho IJ, Kim JK, Kim EO, et al. Hemistepsin A induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating STAT3 [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (9): 4743.
- [67] Baek SY, Hwang UW, Suk HY, et al. Hemistepsin A inhibits cell proliferation and induces G₀/G₁-phase arrest, cellular senescence and apoptosis via the AMPK and p53/p21 signals in human hepatocellular carcinoma [J]. Biomolecules, 2020, 10 (5): 713.
- [68] Shi TL, Zhang L, Cheng QY, et al. Xanthatin induces apoptosis by activating endoplasmic reticulum stress in hepatoma cells [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 843: 1-11.
- [69] Geng YD, Zhang L, Wang GY, et al. Xanthatin mediates G₂/M cell cycle arrest, autophagy and apoptosis via ROS/XIAP signaling in human colon cancer cells [J]. Nat Prod Res, 2020, 34 (18): 2616-2620.
- [70] Liu RJ, Shi DF, Zhang JM, et al. Xanthatin promotes apoptosis via inhibiting thioredoxin reductase and eliciting oxidative stress [J]. Mol Pharm, 2018, 15 (8): 3285-3296.
- [71] Wei RR, Zhao YQ, Wang J, et al. Tagitinin C induces ferroptosis through PERK-Nrf2-HO-1 signaling pathway in colorectal cancer cells [J]. Int J Biol Sci, 2021, 17 (11): 2703-2717.
- [72] Huang FY, Wang PT, Wang XS. Thapsigargin induces apop-

- tosis of prostate cancer through cofilin-1 and paxillin [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16 (2): 1975-1980.
- [73] Wu LL, Huang XM, Kuang YQ, et al. Thapsigargin induces apoptosis in adrenocortical carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress and the JNK signaling pathway: an in vitro and in vivo study [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2787-2798.
- [74] Ma ZQ, Fan CX, Yang Y, et al. Thapsigargin sensitizes human esophageal cancer to TRAIL-induced apoptosis via AMPK activation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35196.
- [75] Chen JH, Wu ATH, Tzeng TWD, et al. Antrocin, a bioactive component from *Antrodia cinnamomea*, suppresses breast carcinogenesis and stemness via downregulation of β -catenin/Notch1/Akt signaling [J]. *Phytomedicine*, 2019, 52: 70-78.
- [76] Chiu KY, Wu CC, Chia CH, et al. Inhibition of growth, migration and invasion of human bladder cancer cells by antrocin, a sesquiterpene lactone isolated from *Antrodia cinnamomea*, and its molecular mechanisms [J]. *Cancer Lett*, 2016, 373 (2): 174-184.
- [77] Roozbehani M, Abdolmohammadi MH, Hamzeloo-Moghadam M, et al. Gaillardin, a potent sesquiterpene lactone induces apoptosis via down-regulation of NF- κ B in gastric cancer cells, AGS and MKN45 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114529.
- [78] Wang BL, Hou D, Liu Q, et al. Artesunate sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin by downregulating RAD51 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16 (10): 1548-1556.
- [79] Tai X, Cai XB, Zhang Z, et al. In vitro and in vivo inhibition of tumor cell viability by combined dihydroartemisinin and doxorubicin treatment, and the underlying mechanism [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12 (5): 3701-3706.
- [80] Zhang ZS, Wang J, Shen YB, et al. Dihydroartemisinin increases temozolomide efficacy in glioma cells by inducing autophagy [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10 (1): 379-383.
- [81] Yao ZH, Bhandari A, Wang YH, et al. Dihydroartemisinin potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil against a resistant colorectal cancer cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501 (3): 636-642.
- [82] Drenberg CD, Buaboonnam J, Orwick SJ, et al. Evaluation of artemisinins for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77 (6): 1231-1243.
- [83] He RZ, Shi XH, Zhou M, et al. Alantolactone induces apoptosis and improves chemosensitivity of pancreatic cancer cells by impairment of autophagy-lysosome pathway via targeting TFEB [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 356: 159-171.
- [84] Cai H, He XL, Yang CH. Costunolide promotes imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells via the Bcr/Abl-Stat5 pathway [J]. *Phytother Res*, 2018, 32 (9): 1764-1769.
- [85] Sheng W, Mao HY, Wang CX, et al. Dehydrocostus lactone enhances chemotherapeutic potential of doxorubicin in lung cancer by inducing cell death and limiting metastasis [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7850-7861.
- [86] Ji HY, Zhang K, Pan GZ, et al. Deoxyelephantopin induces apoptosis and enhances chemosensitivity of colon cancer via miR-205/Bcl2 axis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 5051.
- [87] Chen JJ, Yan QL, Bai M, et al. Deoxyelephantopin, a germacrane-type sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*, induces mitochondrial apoptosis of hepatocarcinoma cells by targeting Hsp90 α in vitro and in vivo [J]. *Phytother Res*, 2022, 37 (2): 702-716.
- [88] Ji DL, Zhong XY, Huang P, et al. Deoxyelephantopin induces apoptosis via oxidative stress and enhances gemcitabine sensitivity in vitro and in vivo through targeting the NF- κ B signaling pathway in pancreatic cancer [J]. *Aging*, 2020, 12 (11): 11116-11138.
- [89] Chao WW, Cheng YW, Chen YR, et al. Phyto-sesquiterpene lactone deoxyelephantopin and cisplatin synergistically suppress lung metastasis of B16 melanoma in mice with reduced nephrotoxicity [J]. *Phytomedicine*, 2019, 56: 194-206.
- [90] Liu MH, Yang Y, Liu DJ, et al. Parthenolide increases the sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapy [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 40 (6): 908-916.
- [91] Mohammadlou H, Hamzeloo-Moghadam M, Yami A, et al. Britannin a sesquiterpene lactone from *Inula aucleriana* exerted an anti-leukemic effect in acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells and enhanced the sensitivity of the cells to vincristine [J]. *Nutr Cancer*, 2022, 74 (3): 965-977.
- [92] Zhang RJ, Wang ZJ, Yu QY, et al. Atractylenolide II reverses the influence of lncRNA XIST/miR-30a-5p/ROR1 axis on chemo-resistance of colorectal cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (5): 3151-3165.
- [93] Zhang JM, Chen YX, Fang JG. Targeting thioredoxin reductase by micheliolide contributes to radiosensitizing and inducing apoptosis of HeLa cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 186: 99-109.
- [94] Li YY, Ni KY, Chan C, et al. Dimethylaminomicheliolide sensitizes cancer cells to radiotherapy for synergistic combination with immune checkpoint blockade [J]. *Adv Ther*, 2022, 5 (1): 2100160.
- [95] Wu SL, Li ZD, Li HY, et al. Dihydroartemisinin reduces irradiation-induced mitophagy and radioresistance in lung cancer A549 cells via CIRBP inhibition [J]. *Life*, 2022, 12 (8): 1129.
- [96] Chen YA, Tzeng DTW, Huang YP, et al. Antrocin sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy through inhibiting PI3K/AKT and MAPK signaling pathways [J]. *Cancers*, 2018, 11 (1): 34.
- [97] Lu Z, Bi JC, Wan XC. Artemisinin sensitizes tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524 (2): 418-423.
- [98] Xu HC, Van der Jeught K, Zhou ZL, et al. Atractylenolide I enhances responsiveness to immune checkpoint blockade therapy by activating tumor antigen presentation [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131 (10): e146832.
- [99] He W, Cao PH, Xia YQ, et al. Potent inhibition of gastric cancer cells by a natural compound via inhibiting TrxR1 activity and activating ROS-mediated p38 MAPK pathway [J]. *Free Radic Res*, 2019, 53 (1): 104-114.

(收稿日期: 2023-01-13; 修回日期: 2023-03-01)

氧化应激诱导高血压的分子遗传学机制研究进展

张慧丹, 孟璐, 龙涛, 丁启龙* (中国药科大学药学实验教学中心, 南京 211198)

摘要: 高血压病由许多单核苷酸多态性相互作用引起, 由单一罕见基因突变引起的与高血压相关的综合征也逐渐被发现。氧化应激是高血压发生的主要原因之一, 通过影响肾素-血管紧张素系统、内皮系统和氧化应激系统相关基因的多态性, 增加人类对高血压病的易感性。本文旨在从分子遗传学角度阐述氧化应激如何增加高血压病易感性并诱导高血压的发生, 为高血压发病机制的深入探索以及高血压的预防和治疗提供参考, 为抗氧化剂的发展提供更广阔的空间。

关键词: 高血压; 遗传; 易感性; 基因多态性; 候选基因; 氧化应激

中图分类号: R544.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1599-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.030

Research progress in molecular genetic mechanism of oxidative stress-induced hypertension

ZHANG Hui-dan, MENG Lu, LONG Tao, DING Qi-long* (*Teaching Center for Pharmaceutical Experiments, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

Abstract: Hypertension is caused by the interaction of many single nucleotide polymorphisms (SNPs), and the syndrome related to hypertension caused by a single rare gene mutation is also gradually discovered. Oxidative stress is a main cause of hypertension and increases the susceptibility of humans to hypertension by affecting the gene polymorphisms related to the renin angiotensin system, endothelial system, and oxidative stress system. This article illustrates how oxidative stress increases the susceptibility of hypertension and eventually induces the occurrence of hypertension from the genetic molecular biology perspective. This article also provides a reference for in-depth explanation of pathogenesis of hypertension and possible resolutions for hypertension prevention and treatment, and advocates a more extensive use of antioxidants.

Key words: hypertension; genetics; susceptibility; gene polymorphism; candidate gene; oxidative stress

高血压分为原发性高血压和继发性高血压, 是一类由环境、遗传因素共同作用引发的多基因疾病。遗传因素是高血压发病的内部因素。在家系研究中发现, 父母一方或双方患高血压的人的发病率是父母双方均无高血压的人的 2 倍, 且单卵双生子之间的血压相关系数为 0.75, 非双生子同胞之间为 0.25^[1]。此外, 患者血压变化的影响因素里遗传因素的影响占 30% ~ 50%^[2]。全基因组连锁和关联研究 (GWAS) 的人群研究数据表明, 高血压病等多基因疾病是由许多单核苷酸多态性 (SNPs) 相互作用引起的^[3], 由单一罕见基因突变引起的与高血压相关的综合征也逐渐被发现。

氧化还原稳态有利于维持体内的正常生理条件, 保护重要的细胞成分免受其他因素造成的氧化损伤。当机体的氧化还原稳态受到干扰时, 会发生氧化应激。活性氧 (ROS) 的来源多种多样, 存在于许多细胞和组织中。高浓度氧自由基可能损害细胞成分, 可直接氧化 DNA、蛋白质、脂质体等生物分子^[4]。

本文综述氧化应激影响高血压易感性从而促进高血压发生的研究进展, 探讨高血压的分子遗传学改变与机体内氧化应激的关系。

1 高血压候选基因变异致氧化应激增加高血压病易感性

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81872930)。

作者简介: 张慧丹, 女, 硕士, 主要从事心脑血管药理研究, email: 1343564675@qq.com * **通信作者:** 丁启龙, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心脑血管药理和氧化应激研究, email: dqlcpu@163.com

GWAS 在血压调节和高血压的遗传学方面取得了重大突破, 发现了许多与血压和高血压病相关的 SNPs, 揭示了潜在的高血压相关途径^[5]。另外, 原发性高血压的每个遗传亚型都对一个实质性的内分泌成分, 例如血管紧张素 II (Ang II)、内皮素 1 (ET-1)、一氧化氮 (NO) 等, 该内分泌成分可能是氧化应激促进高血压病易感性增加的中介物质^[6]。

1.1 肾素-血管紧张素系统 (RAS) 相关基因多态性上调氧化应激水平, 增加高血压病易感性

盐敏感性高血压的发病机制多种多样, 最常见的是 RAS 异常激活^[7]。RAS 激活是导致高血压病的主要原因之一, 因此编码血管紧张素原 (AGT)、血管紧张素转化酶 (ACE)、血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 等的基因是高血压病的候选基因^[8-9]。机体氧化平衡失调引起 RAS 激活, 导致高血压的发病; RAS 也可能引发氧化应激^[10]。AGT 基因、ACE 基因和 ACE2 基因的常见多态性的表达, 会影响血管紧张素 (Ang) 的浓度, 从而引起 Ang II 水平的变化^[11-12]。Ang II 是心血管系统中氧自由基生成的重要激活物, 激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶, 增加 ROS 产生。氧化应激如何导致 AGT 基因、ACE 基因和 ACE2 基因的突变仍有待研究, 但目前已知 AGT 基因、ACE 基因和 ACE2 基因的常见多态性的表达引起氧化应激的加重可能有助于高血压的进展^[13-15]。

1.1.1 AGT 基因多态性 AGT 是肾素作用的底物, 在肾素的作用下转变为血管紧张素 I (Ang I), 在 ACE 的作用下生成 Ang II。AGT M235T 型等位基因与高血压病显著相关, 患者中 AGT M235T 型等位基因的发生频率远高于正常对照组中的频率^[16]。TT 基因型 (纯合子) 可以作为高血压病的独立危险因素, AGT 的 TT 基因型携带者具有更高的舒张压^[13]。AGT 的基因变异或表达异常, 使 Ang II 生成增加, 引起氧化应激标志物的增加, 上调氧化应激水平^[13]。

1.1.2 ACE 基因多态性 ACE 水平由遗传决定, ACE 的 I/D 多态性是研究最多的遗传系统之一, 影响基因表达和产物水平。ACE 的缺失基因型 D/D 被看作是高血压的候选基因, ACE D/D 基因型携带者具有较高的促氧化状态^[14]。尽管也有研究表明氧化应激不显著依赖于 ACE 基因型, 但是影响基因表达和产物水平。ACE 的缺失基因型 D/D 被看作是高血压的候选基因, ACE D/D 基因型携带者具有较高的促氧化状态^[14]。尽管也有研究表明, 氧化应激不显著依赖于 ACE 基因型, 但是 ACE D/D 基因型携带者的抗氧化防御的分子机制

失衡, 过氧化氢 (H_2O_2)、超氧阴离子 ($\cdot O_2^-$) 等显著增加^[14]。与其他基因型相比, I/I 基因型可能与较低水平 ROS 的产生有关^[17]。

此外, ACE2 基因、氧化应激和高血压三者密切相关。ACE2 活性或表达异常通过增加氧化应激导致高血压^[15]。ACE2 rs2074192 的 T 等位基因是成年肥胖男性患高血压病的危险因素, 并且携带该 SNP 的吸烟肥胖男性患高血压病的危险性增加^[18], 这表明在易引起体内氧化应激的环境因素 (例如吸烟) 作用下, ACE2 突变基因携带者的高血压易感性增加^[15]。通过改善 ACE2 表达和或活性, 降低体内氧化应激水平, 可能达到治疗高血压病的目的。但是 ACE2 基因疗法用于高血压病治疗时, 需要考虑到 ACE2 是冠状病毒的主要受体之一, 肺部 ACE2 的表达升高可能会增加患者感染新型冠状病毒的风险^[19]。

综上所述, 随着对氧化应激和 RAS 相关基因的深入研究, 将给 RAS 调节药物及抗氧化剂的发展提供更广阔的空间。

1.2 内皮系统基因的多态性致氧化应激增加高血压病易感性

内皮介导的血管舒张在高血压动物模型及原发性高血压患者中均减少^[20], 表明内皮系统基因是研究高血压病遗传机制的候选基因, 包括编码内皮一氧化氮合酶 (NOS3)、四氢生物蝶呤 (BH4) 合成中的限速酶鸟苷三磷酸环化水解酶 -1 (GTP-CH1) 以及编码 ET-1 的基因等。

1.2.1 NOS3 基因多态性 高血压内皮功能障碍的主要特征是, 促氧化剂和抗氧化剂系统失衡, 血管壁中对 NO 的生物利用度降低, 血管松弛作用减弱, ROS 对细胞、组织和器官等产生有害作用^[21]。氧化应激可能导致内皮功能障碍, 除抑制 eNOS 活性, 导致 eNOS 解偶联外, ROS 作用下 NOS3 的基因表达也减少^[22]。

NOS3 SNPs 与高血压病具有显著相关性。NOS3 rs3918226 SNP 和 rs3918227 SNP (均为显性) 是目前研究较多的与高血压病相关的 NOS3 多态性^[23]。此外, eNOS 基因的 G894T 突变导致氨基酸从谷氨酸 (Glu) 变为天冬氨酸 (Asp) (Glu298Asp 或 rs1799983), 与基础 NO 生成减少^[24]及较高的血压水平有关, 是高血压病发展的重要生物标志物。其中 TT 基因型与高血压病更为相关^[25]。以上研究中的基因多态性通过影响机体氧化还原平衡, 诱导血管疾病的发生^[26]。例如, G894T 多态性等位基因 T 是体内氧化剂含量升高的重要标志。研究显示基因型 GG 导致较低水平的丙二醛, GT 基因型的丙二醛水平比 GG 基因型

高 16.8%^[27]。在依赖 *NOS3* G894T 多态性的促氧化剂 - 抗氧化剂平衡中, 如果生物体的氧供应受损, *NOS3* G894T 多态性可能降低 NO 水平, 打破氧化还原平衡并促进氧化应激发展^[27]。

此外, 这些多态性与其他位点的连锁变异可能通过特定的环境因素来诱导发生。已知成瘾物质会导致氧化应激, 在土耳其药物滥用失常受试者中检测到 *NOS3* G894T 基因变异的概率高于正常对照组^[28]。吸烟等环境因素产生的自由基和 $\cdot\text{O}_2^-$ 可能诱导 *eNOS* 基因变体携带者体内 NO 产生受阻并加重氧化应激^[29]。

1.2.2 *GTP-CHI* 基因多态性 一氧化氮合酶 (NOS) 解偶联产生 ROS 与其辅因子四氢生物蝶呤 (BH4) 的氧化耗竭相关。在 BH4 存在时, 在 NOS 作用下生成 NO^[30]; 在氧化应激的病理条件下, 或当 BH4 缺乏时, NOS 结构不稳定, 发生解偶联作用产生 $\cdot\text{O}_2^-$ ^[31], 有助于高血压病的发展。

GTP 环水解酶 -1 是 BH4 合成中的限速酶。*GTP-CHI* 基因的缺陷或突变影响 BH4 的生物合成。*GTP-CHI* 基因 SNP 包括 rs841、rs3783641、rs10483639 和 rs807267^[32]。这些 SNP 的次要等位基因与血压升高相关^[33], 携带 *GTP-CHI* SNP 的次要等位基因的人在暴露于氧化应激条件下, 体内 *GTP-CHI* 的 mRNA 和蛋白表达水平较正常人更低, 限制 BH4 的合成, 导致 NOS 解偶联, NO 生成减少; 抑制超氧化物可增加 NO 生物利用度^[34]。

1.2.3 *EDN1* 基因多态性 ET-1 是一种由内皮细胞产生的强效血管收缩肽, 是血管功能障碍和心血管疾病发展的重要因素。高血压实验模型和人类高血压病患者中, ET-1 都参与了血压升高和高血压的发生过程^[35], 据报道, *EDN1* (Lys198Asn/rs5370) 影响原发性高血压的发生, ET-1 rs5370 多态性的 T 等位基因是高血压病的重要遗传危险因素^[36], 表明 *EDN1* 基因是导致高血压病的潜在候选基因。Lys198Asn 位点的 G 突变为 T 使得编码前内皮素原 1 (PPET1) 的氨基酸 198 处的赖氨酸 (Lys) 变为天冬酰胺 (Asn), rs5370 TT 纯合子患高血压病的几率比 GG 纯合子高 3 倍^[37]。另一个 SNP rs1800541 位于 *EDN1* 的启动子区, 可能影响基因表达, 导致 ET-1 水平升高^[38]。

氧化应激的增加可能导致各种基因的异常调节^[39]。氧化应激可导致 big ET-1 的内皮合成增加。例如与黄嘌呤氧化酶孵育后, ET-1 mRNA 水平增加 5 倍, 并且 *EDN1* 启动子活性的分析结果显示, 在氧化应激的影响下, 启动子活性增加了 8 倍^[40]。ET 水平随着过氧化物增加而升高, 增强血管收缩

作用; 由氧化应激引起的 ET-1 生成和释放的增加, 也会通过 ET-1 依赖的 NADPH 氧化酶的激活^[41], 进一步放大体内氧化应激信号^[42]。尽管 ET 诱导的氧化应激似乎对高血压病的影响很小, 但是它还是会影响水盐平衡和血管功能, 促进高血压病的发生^[43]。

2 氧化应激相关基因的多态性增加高血压病易感性

2.1 NADPH 氧化酶的 p22phox 亚基基因多态性与高血压病易感性

氧化应激相关基因的 SNPs 与高血压病的发生有关。p22phox 亚基是所有类型 NADPH 氧化酶的常见成分, 与高血压病患者 NADPH 氧化酶活性增强相关^[44]。

CYBA 是一种编码人类 p22phox 亚基的基因, 在 *CYBA* 中发现了一些与心血管疾病相关的等位基因变体。*CYBA* C242T 多态性与原发性高血压、心血管疾病内皮功能相关。携带该多态性的 CC 基因型的高血压病患者表现出氧化应激和内皮损伤的特征^[45]。另外, 有研究显示 *CYBA* 的 -930A/G 多态性也与高血压相关^[46]。

2.2 *SOD2* 基因多态性与高血压病易感性

锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) /*SOD2* 是一种具有高活性的抗氧化酶^[47]。*SOD2* 的基因异常表达和活性下调可诱发高血压的发生。*SOD2* Ala16Val (rs4880) 存在于 *SOD2* 的外显子区域, 该位点的 SNP 突变导致第 16 个氨基酸处的丙氨酸 (Ala) 变为缬氨酸 (Val)^[48]。MnSOD 的 Val 变体转运到线粒体中的效率降低, 纯合 Val/Val 基因型的 MnSOD 活性也比 Ala/Ala 基因型低 30% ~ 40%^[49], 氧化应激标志物水平显著增加。*SOD2* 的基因异常表达和活性下调可诱发高血压病的发生。

吸烟等外部环境因素会导致线粒体抗氧化剂 *SOD2* 的过度乙酰化, 促进心血管线粒体氧化应激, 引发内皮功能障碍和高血压^[50]。*SOD2* 基因的变异, 减弱了所编码的 MnSOD 酶活性, 降低了体内抗氧化剂水平, 使得携带 *SOD2* rs4880 SNP 的人比正常人更容易受环境影响刺激氧化应激的发生, 增加高血压病易感性。

氧化应激相关基因多态性与高血压的相关性, 也表明了氧化应激在高血压遗传分子生物学中的作用, 受环境影响和基因决定的氧化应激水平的升高, 增加了高血压病的易感性, 主要表现为携带 *CYBA* 中的 C242T、-930A/G SNP 和 *SOD2* rs4880 SNP 的人可能更容易患高血压病。

3 氧化应激增加单基因致病性高血压病的易感性

单基因致病性高血压病是指单一罕见基因突变引起的与高血压相关的综合征,直接引起血压升高,也称孟德尔式高血压,目前已知的不同形式的单基因高血压的发生都与肾钠重吸收增加的途径相关^[51],这些基因缺陷影响肾脏排泄盐和水的功能,从而导致高血压。

上皮钠通道 (epithelial sodium channel, ENaC) 负责肾脏集合管中大部分钠的再吸收,是钠重吸收的限速步骤,对调控钠离子浓度和维持血压的稳定至关重要。肾小管上皮细胞 ENaC 的过度激活是多种类型高血压发病的重要因素之一^[52]。ENaC 由 α 、 β 和 γ 三个亚基组成,并分别由 *SCNN1A*、*SCNN1B* 和 *SCNN1G* 三个基因编码合成^[53]。Liddle 综合征、盐皮质激素明显过量综合征 (SAME) 等单基因突变形式都与 ENaC 有关,通常都有 ENaC 的参与,其中 Liddle 综合征是由 ENaC 亚基突变引起,已知的 Liddle 综合征病例都继发于 ENaC 三个亚基之一的错义或移码突变^[54]。

近年来相关研究表明,ENaC 的表达和活性受细胞氧化状态的调节,ROS 水平提高使 ENaC 活性增加^[55]。当环境因素引起体内氧化应激水平增加时,由于 ENaC 亚基突变,ENaC 的表达和活性可能更容易受到细胞氧化状态的调节而过度激活,使得肾脏排泄受阻,引起血压异常升高。

4 结论

本文综述的所有基因多态性的共同特征是,它们与高血压和氧化应激有关,并且由 SNP 基因所编码的酶或内分泌成分在参与细胞防御氧化应激中发挥着重要作用,部分分子遗传学机制与氧化应激的关系如图 1 和表 1 所示。

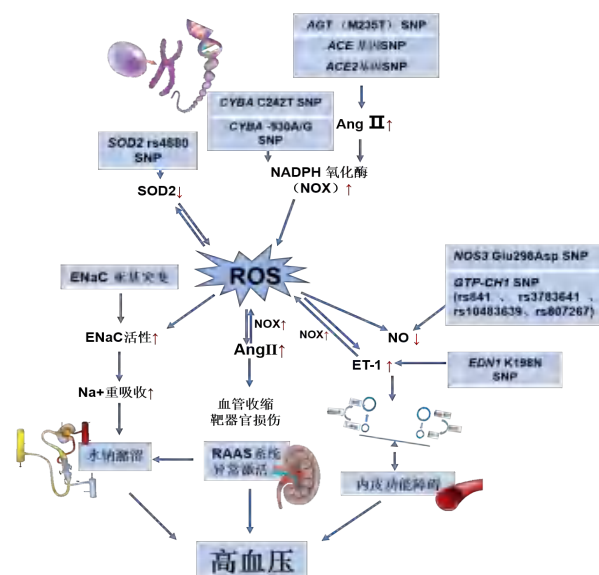


图 1 氧化应激诱导高血压的部分分子遗传学机制

Fig 1 Partial molecular genetic mechanism of oxidative stress induced hypertension

表 1 氧化应激诱导高血压的相关基因及分子遗传学机制

Tab 1 Related genes and molecular genetic mechanisms of oxidative stress induced hypertension

分类	基因名称	SNP/ 基因突变	蛋白产物名称	与氧化应激的关系	诱导高血压发生的机制	参考文献
RAS 系统相关基因	<i>AGT</i>	<i>AGT</i> (M235T)	AGT	影响 Ang II 的水平, 激活	RAS 激活引起血压调节	[7-18]
	<i>ACE</i>	存在或丢失一个 287bpDNA 片段	ACE	NADPH 氧化酶	异常	
	<i>ACE2</i>	rs2074192	ACE2			
内皮系统相关基因	<i>NOS3</i>	rs3918226、rs3918227、Glu298Asp	NOS3	自由基和 $\cdot\text{O}_2^-$ 干扰 eNOS 产生的 NO	血管舒张作用减弱	[21-27]
	<i>GTP-CH1</i>	rs841、rs3783641、rs10483639、rs807267	GTP-CH1			
	<i>EDN1</i>	rs5370、rs1800541	ET-1	活性氧增加, 促进 ET-1 的表达增加	增强血管收缩作用	[35-43]
氧化应激相关基因	<i>CYBA</i>	<i>CYBA</i> C242T、-930A/G	p22phox	NADPH 氧化酶活性增强	NADPH 氧化酶介导氧化应激和内皮损伤	[45-46]
	<i>SOD2</i>	rs4880	MnSOD/ SOD2	SOD2 的过度乙酰化, 促进心血管氧化应激	内皮功能障碍	[48-49]
单基因突变——ENaC 亚基突变	<i>SCNN1A</i> 、 <i>SCNN1B</i> 、 <i>SCNN1G</i>	三个亚基之一的错义或移码突变	ENaC	ROS 使 ENaC 活性增加	钠重吸收增加	[53-55]

这种单一变异可能不是高血压风险的可靠标志,但多态性的组合参与高血压的发展。高血压病的遗传性是许多高血压基因变异的共同作用,每个基因变体的影响取决于受试者的遗传背景

和环境因素。环境因素等诱发的体内氧化应激水平升高,促进携带部分高血压易感基因人类的发病。抗氧化剂治疗可能是预防血管损伤和高血压的理想方法^[56],这将有可能会降低家族性高血压

患者后代的患病率。除此之外,健康的生活方式和良好的生活环境也有助于保持氧化还原平衡状态,减小高血压发生的可能性。

对氧化应激相关基因、RAS 相关基因及内皮系统相关基因的深入研究,以及对氧化应激在高血压发生发展中的重要作用的逐步认识,将为高血压病发病机制的深入探索及高血压病的防治提供新的策略。

参考文献

- [1] 姜玉,宋伟民.我国汉族人群血管紧张素转换酶基因多态性与原发性高血压关系的 Meta 分析[J].环境与职业医学,2007(1):25-27,31.
- [2] 张真,张晨,朱家旺,等.中国不同民族高血压病易感基因研究现状[J].中国慢性病预防与控制,2015,23(3):222-225.
- [3] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases[J]. Nature, 2009, 461(7265):747-753.
- [4] 俞卓伟,保志军,阮清伟,等.氧化应激-炎症-衰老及其与 ApoE 基因相关性研究进展[J].生理学报,2013,65(3):338-346.
- [5] Warren HR, Evangelou E, Cabrera CP, et al. Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk[J]. Nat Genet, 2017, 49(3):403-415.
- [6] Manosroi W, Williams GH. Genetics of human primary hypertension: focus on hormonal mechanisms[J]. Endocr Rev, 2019, 40(3):825-856.
- [7] Chamathi B, Williams JS, Williams GH. A mechanism for salt-sensitive hypertension: abnormal dietary sodium-mediated vascular response to angiotensin- II [J]. J Hypertens, 2010, 28(5):1020-1026.
- [8] 李红敏.高血压遗传易感性的候选基因法研究[J].现代实用医学,2018,30(9):1167-1171.
- [9] Li ZJ, Hu X, Wan JP, et al. The alleles of AGT and HIF1A gene affect the risk of hypertension in plateau residents[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2022, 247(3):237-245.
- [10] Huang C, Gao J, Wei T, et al. Angiotensin II-induced erythrocyte senescence contributes to oxidative stress[J]. Rejuvenation Res, 2022, 25(1):30-38.
- [11] Zotova TY, Kubanova AP, Azova MM, et al. Analysis of polymorphism of angiotensin system genes (ACE, AGTR1, and AGT) and gene ITGB3 in patients with arterial hypertension in combination with metabolic syndrome[J]. Bull Exp Biol Med, 2016, 161(3):334-338.
- [12] Gintoni I, Adamopoulou M, Yapijakis C. The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism as a common risk factor for major pregnancy complications[J]. In vivo, 2021, 35(1):95-103.
- [13] Coelho C, Guerra A, Rego C, et al. Genetic polymorphisms of angiotensin-I converting enzyme, haptoglobin and angiotensinogen and oxidative stress parameters in 12 to 15-year-old adolescents[J]. Rev Port Cardiol, 2006, 25(7-8):677-690.
- [14] Mikashinovitch ZI, Nagornaia GY, Loseva TD. The genetic biochemical markers of arterial hypertension in Adolescents[J]. Klin Lab Diagn, 2015, 60(7):25-28.
- [15] 钟久昌.血管紧张素转换酶 2、氧化应激与血压调控研究进展[J].岭南心血管病杂志,2011,17(S1):116-117.
- [16] Van Rijn MJ, Bos MJ, Isaacs A, et al. Polymorphisms of the renin-angiotensin system are associated with blood pressure, atherosclerosis and cerebral white matter pathology[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007, 78(10):1083-1087.
- [17] Marushchak M, Maksiv K, Krynytska I, et al. The severity of oxidative stress in comorbid chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and Hypertension: does it depend on ace and agt gene polymorphisms? [J]. J Med Life, 2019, 12(4):426-434.
- [18] Hamet P, Pausova Z, Attaoua R, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene is associated with hypertension and severity of COVID 19: interaction with sex, obesity, and smoking[J]. Am J Hypertens, 2021, 34(4):367-376.
- [19] Zhang HB, Penninger JM, Li YM, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(4):586-590.
- [20] Konukoglu D, Uzun H. Endothelial dysfunction and hypertension[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 956:511-540.
- [21] Ferroni P, Basili S, Paoletti V, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006, 16(3):222-233.
- [22] Herur A, Aithala M, Das KK, et al. Interplay of oxidative stress and nitric oxide synthase gene expression on cardiovascular responses in preeclampsia[J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2022, 44(3):214-219.
- [23] Levinsson A, Olin AC, Björck L, et al. Nitric oxide synthase (NOS) single nucleotide polymorphisms are associated with coronary heart disease and hypertension in the INTERGENE study[J]. Nitric Oxide, 2014, 39:1-7.
- [24] Vecoli C. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in cardiovascular disease[J]. Vitam Horm, 2014, 96:387-406.
- [25] Neto ABL, Vasconcelos NBR, Dos Santos TR, et al. Prevalence of IGFBP3, NOS3 and TCF7L2 polymorphisms and their association with hypertension: a population-based study with Brazilian women of African descent[J]. BMC Res Notes, 2021, 14(1):186.
- [26] Senthil D, Raveendran M, Shen YH, et al. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells[J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(4):218-224.
- [27] Zinchuk VV, Zhadko DD, Gulyai IE. Prooxidant-antioxidant balance depending on endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism[J]. Biomed Khim, 2018, 64(4):349-353.
- [28] Pehlivan S, Aydin PC, Nursal AF, et al. A relationship

- between endothelial nitric oxide synthetase gene variants and substance use disorder [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21 (9): 1679-1684.
- [29] Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2017, 120 (4): 713-735.
- [30] Kim HL, Park YS. Maintenance of cellular tetrahydrobiopterin homeostasis [J]. *BMB Rep*, 2010, 43 (9): 584-592.
- [31] Vasquez-Vivar J. Tetrahydrobiopterin, superoxide, and vascular dysfunction [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47 (8): 1108-1119.
- [32] Lupo PJ, Chapa C, Noursome D, et al. A GCH1 haplotype and risk of neural tube defects in the National Birth Defects Prevention Study [J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 107 (3): 592-595.
- [33] Doebring A, Antoniadis C, Channon KM, et al. Clinical genetics of functionally mild non-coding GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) polymorphisms modulating pain and cardiovascular risk [J]. *Mutat Res*, 2008, 659 (3): 195-201.
- [34] Nandi M, Leiper J, Arrigoni F, et al. Developmental regulation of GTP-CH1 in the porcine lung and its relationship to pulmonary vascular relaxation [J]. *Pediatr Res*, 2006, 59 (6): 767-772.
- [35] Bakris GL, Lindholm LH, Black HR, et al. Divergent results using clinic and ambulatory blood pressures: report of a darusentan-resistant hypertension trial [J]. *Hypertension*, 2010, 56 (5): 824-830.
- [36] Salim E, Ramachandran V, Ansari N, et al. Association of endothelin-converting enzyme and endothelin-1 gene polymorphisms with essential hypertension in Malay ethnics [J]. *Genet Res*, 2022, 2022: 9129960.
- [37] Panoulas VF, Douglas KM, Smith JP, et al. Polymorphisms of the endothelin-1 gene associate with hypertension in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Endothelium*, 2008, 15 (4): 203-212.
- [38] Fang Z, Li M, Ma Z, et al. Association of endothelin-1 gene polymorphisms with essential hypertension in a Chinese population [J]. *Genet Mol Res*, 2017, doi:10.4238/gmr16037446.
- [39] Binjawhar DN, Alhazmi AT, Bin Jawhar WN, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress and epigenetic regulation of ET-1 gene in endothelial cells [J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1167773.
- [40] Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, et al. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32 (8): 1429-1437.
- [41] Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, et al. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315 (3): 1058-1064.
- [42] Heimlich JB, Speed JS, Bloom CJ, et al. ET-1 increases reactive oxygen species following hypoxia and high-salt diet in the mouse glomerulus [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, 213 (3): 722-730.
- [43] Pollock DM, Pollock JS. Endothelin and oxidative stress in the vascular system [J]. *Mol Cell Pediatr*, 2005, 3 (4): 365-367.
- [44] Schreiber R, Bellinazzi VR, Sposito AC, et al. Influence of the C242T polymorphism of the p22-phox gene (CYBA) on the interaction between urinary sodium excretion and blood pressure in an urban Brazilian population [J]. *PLoS one*, 2013, 8 (12): e81054.
- [45] Moreno MU, San José G, Fortuño A, et al. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2006, 24 (7): 1299-1306.
- [46] San José G, Moreno MU, Oliván S, et al. Functional effect of the p22phox-930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension [J]. *Hypertension*, 2004, 44 (2): 163-169.
- [47] Ali SS, Ahsan H, Zia MK, et al. Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44 (3): e13145.
- [48] Berro LF, Maurer P, Rubio D, et al. The Val16Ala Mn-SOD gene polymorphism is associated with hypertension in self-declared black individuals [J]. *Free Radic Res*, 2022, 56 (2): 154-162.
- [49] Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala-16Val superoxide dismutase gene polymorphism [J]. *Clin Biochem*, 2010, 43 (13-14): 1118-1123.
- [50] Dikalov S, Itani H, Richmond B, et al. Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316 (3): H639-H646.
- [51] Williams SS. Advances in genetic hypertension [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2007, 19 (2): 192-198.
- [52] Lu TJ, Kan WC, Yang SS, et al. MST3 is involved in ENaC-mediated hypertension [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317 (7): F30-F42.
- [53] Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases [J]. *Gene*, 2016, 579 (2): 95-132.
- [54] Furuhashi M, Kitamura K, Adachi M, et al. Liddle's syndrome caused by a novel mutation in the proline-rich PY motif of the epithelial sodium channel beta-subunit [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (1): 340-344.
- [55] Mamenko M, Zaika O, Prieto MC, et al. Chronic angiotensin II infusion drives extensive aldosterone-independent epithelial Na⁺ channel activation [J]. *Hypertension*, 2013, 62 (6): 1111-1122.
- [56] Ahmad KA, Yuan D, Nawaz W, et al. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension [J]. *Free Radic Res*, 2017, 51 (4): 428-438.

(收稿日期: 2023-02-02; 修回日期: 2023-04-15)

中药资源开发与利用

2020 年版《中国药典》果实种子类中药功能及应用特点分析

周欣欣, 刘茜茜, 孔小莉, 白莉, 苗明三* (河南中医药大学, 郑州 450046)

摘要: **目的** 总结 2020 年版《中国药典》中果实种子类中药的功能及应用特点, 促进其临床应用。**方法** 将 2020 年版《中国药典》记载的果实种子类中药逐一录入 Excel 表格, 分析其科属、入药部位、性味归经、用法用量、炮制方法、注意事项。**结果** 2020 年版《中国药典》共收录果实种子类中药 127 种, 以豆科、芸香科、蔷薇科、葫芦科多见, 多在夏、秋两季采摘; 可外用的有 22 种, 有毒或孕妇慎用的果实种子类中药 30 种, 记载详细炮制方法的有 97 种。药性以温、平、寒为主, 药味以甘、苦、辛、酸为主, 主入肝、胃、肺、脾、肾经; 临床广泛应用于内科、妇科和男科; 以 9 ~ 15 g、3 ~ 10 g、3 ~ 9 g 和 5 ~ 10 g 用量较常见。**结论** 合理充分使用果实种子类中药, 加强对果实种子类中药质量的监管制度, 完善果实种子类中药的主治功能、用法用量与炮制方法, 开发新的药用价值, 是日后需关注的重点。

关键词: 果实种子类中药; 《中国药典》; 功能主治; 炮制; 用法; 用量

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1605-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.031

Function and application of fruit and seed traditional Chinese medicine in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia

ZHOU Xin-xin, LIU Xi-xi, KONG Xiao-li, BAI Li, MIAO Ming-san* (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Abstract: **Objective** To summarize the function and application characteristics of fruit and seed Chinese medicines in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia. **Methods** Fruit and seeds of Chinese medicines recorded in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia were collected in an Excel. Their genera, drug site, taste, usage and dosage, processing method and precautions were analyzed. **Results** Totally 127 of fruit and seed Chinese medicine were included in the 2020 Edition including legumes, rutaceae, rose families and cucurbitaceae, and were mostly picked in summer and autumn. While 22 were for external use, 30 were poisonous or should be used with caution by pregnant women. Detailed processing methods were found for 97. The medicinal properties were mainly warm, flat and cold, and the medicinal taste was mainly sweet, bitter, spicy and sour, and mainly influenced the liver, stomach, lungs, spleen and kidney meridians. They were widely used departments of internal medicine, gynecology and andrology; common dosage at 9 ~ 15 g, 3 ~ 10 g, 3 ~ 9 g and 5 ~ 10 g. **Conclusion** Rational and full use of fruit and seed Chinese medicines is recommended, and the quality of fruit and seed Chinese medicine should be strengthened. Developing new medicine is key in the future.

Key words: fruit and seed Chinese medicine; Chinese Pharmacopoeia; functional; process; usage; dosage

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.80274038); 河南省重大公益专项 (No.201300310100); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目 (No.2020GGJS110)。

作者简介: 周欣欣, 女, 硕士, 主要从事中药药理学研究, email: z18530668349@163.com *通信作者: 苗明三, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药学研究, email: miaomingsan@163.com

果实种子类中药泛指一些以植物果实或者种子为药用部位的中药,在中医治疗疾病的历史中发挥着重要作用,数量大、品种多^[1],临床治疗效果好^[2-3]。由于富含营养,不少可药食同用,如枸杞子不仅可入药^[4],还可以泡茶、煮粥;且与根茎、花类药物相比,较易于获得和保存。因此,需求量较大^[5]。中医的治疗效果在很大程度上取决于中药材的质量,由于果实种子类药物的体积、形状差异性较小,鉴别有一定的难度,导致目前中药材种子市场比较混乱^[6],质量难以保证^[7]。炮制法对中药材的应用具有重要意义^[8],具有减毒、增效、净制等作用;部分中药在知网上记载了有效的炮制方法,但《中国药典》中并未记载,如天仙子、鹤虱;天仙子有大毒,临床用药时常需其考虑减毒、增效等问题,经检索中国知网收录的文献中报道,醋制法^[9]可以使天仙子降低毒性,增加其药用及营养价值^[10];鹤虱在多部古籍中标注为有小毒,但《中国药典》中并未记载其减毒的炮制方法,且检索中国知网数据库发现,尚未收录鹤虱的临床研究及毒性研究的相关报道^[11]。果实种子类中药虽在临床应用广泛,但部分药物的作用机制并不明确,限制了进

一步的药用研究。

本文通过对 2020 年版《中国药典》所收录的果实种子类中药进行统计分析,对其现状进行探讨,为完善果实种子类中药的炮制、功能及应用提供新的思考,以促进果实种子类中药更好地开发利用。

1 方法

1.1 纳入标准

①被 2020 年版《中国药典》收录;②用药部位包括种子(包含种仁)、果实(成熟果实、幼果、果穗、宿鄂、果皮、果序、果肉、假种皮、维管束)。

1.2 统计方法

将符合纳入标准的中药录入 Microsoft Excel 2010,按照中药、科属、入药部位、炮制方法、性味归经、功能、主治、用法、用量、注意事项、有无毒性的格式统计,建立果实种子类中药数据库进行数量统计分析。

2 《中国药典》收录果实种子类中药现状

2.1 2020 年版《中国药典》收录的果实种子类中药

2020 年版《中国药典》^[12]共收载果实种子类中药 127 种,以豆科、芸香科、蔷薇科、葫芦科多见,果实种子类中药及其入药部位详见表 1。

表 1 2020 年版《中国药典》记载的果实种子类中药

Tab 1 Fruit and seed traditional Chinese medicines in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia

部位	中药	n (%)
干燥成熟果实	八角茴香、大皂角、川楝子、广枣、槐角、女贞子、小叶莲、五味子、毛诃子、巴豆、山楂、瓜蒌、冬葵果(蒙古族习用药材)、地肤子、红豆蔻、豆蔻、大枣、余甘子、沙棘、诃子、辣椒、补骨脂、青果、使君子、草澄茄、牛蒡子、草果、南五味子、栀子、枸杞子、砂仁、鸦胆子、香橼、益智、蛇床子、紫苏子、蔓荆子、水飞蓟、水红花子、瓜蒌皮、金樱子、茺蔚子、小茴香、南鹤虱、楮实子、蒺藜、鹤虱、火麻仁	48 (37.80)
干燥成熟种子	千金子、娑罗子、马钱子、王不留行、韭菜子、天仙子、木蝴蝶、木鳖子、车前子、白果、白扁豆、桃仁、亚麻子、决明子、赤小豆、莲子、芥子、莱菔子、沙苑子、青箱子、苦杏仁、苘麻子、郁李仁、胡芦巴、荔枝核、牵牛子、胖大海、菟丝子、甜瓜子、淡豆豉、葶苈子、黑芝麻、黑豆、黑草种子、蓖麻子、榧子、核桃仁、槭藤子、槟榔、酸枣仁、橘核、瓜蒌子、草豆蔻、急性子	44 (34.65)
干燥近成熟或成熟果实	木瓜、乌梅、吴茱萸、预知子、母丁香、胡椒	6 (4.72)
干燥果皮	花椒、陈皮、青皮、石榴皮、化橘红	5 (3.94)
干燥果实	连翘、罗汉果、佛手、覆盆子	4 (3.15)
干燥成熟种仁	芡实、柏子仁、薏苡仁	3 (2.36)
成熟种子	大豆黄卷、莲子心	2 (1.57)
干燥宿萼	柿蒂、锦灯笼	2 (1.57)
干燥果穗	夏枯草、桑椹	2 (1.57)
干燥未成熟果实	枳壳、枳实	2 (1.57)
干燥不育果实	猪牙皂	1 (0.79)
干燥成熟带总苞的果实	苍耳子	1 (0.79)
成熟果实	刀豆	1 (0.79)
干燥成熟果实的维管束	丝瓜络	1 (0.79)
假种皮	龙眼肉	1 (0.79)
干燥成熟果序	路路通	1 (0.79)
干燥成熟果壳	罂粟壳	1 (0.79)
干燥成熟果核	蕤仁	1 (0.79)
干燥成熟果肉	山茱萸	1 (0.79)

2.2 性味归经

果实种子类中药多有沉降作用,药性以温(50)、平(34)、寒(29)为主,药味以甘(56)(其中微甘 1 例)、苦(54)(其中微苦 4 例)、辛(49)为主,主入肝(49)、胃(49)、肺(46)、脾(42)、肾(41)经。其中,广枣、小叶莲、毛诃子、冬

葵果(蒙古族习用药材)、黑种草子(维吾尔族习用药材)无归经。详见图 1。

2.3 功能

在 2020 年版《中国药典》记载的 127 味果实种子类中药中,共列出出现频次较高的 17 种果实种子类中药的功能,详见表 2。

表 2 果实种子类中药常见功能
Tab 2 Common function of fruit and seed traditional Chinese medicine

中药	功能	n (%)
莱菔子、白果 ^[13] 、车前子、陈皮、木鳖子、大皂角、佛手、甜瓜子、黑种草子、胡椒、化橘红、芥子、沙棘、锦灯笼、橘核、牵牛子、余甘子、枳实、猪牙皂、香橼、紫苏子、蕤仁	燥湿化痰	22 (17.32)
亚麻子、郁李仁、牵牛子、火麻仁、决明子、苦杏仁、柏子仁、桃仁、瓜蒌子、罗汉果、胖大海、紫苏子、榧子	润燥通便	13 (10.24)
苦杏仁、苘麻子、郁李仁、罗汉果、使君子、木鳖子、连翘、草豆蔻	杀虫消积	8 (6.30)
莲子、蛇床子、沙苑子、补骨脂、胡芦巴、母丁香、芡实、核桃仁	补肾助阳	8 (6.30)
苍耳子、茺蔚子、覆盆子、沙苑子、蕤仁、龙眼肉、川楝子、诃子	养肝明目	8 (6.30)
枸杞子、黑芝麻、山茱萸、菟丝子、楮实子、韭菜子、女贞子	滋补肝肾	7 (5.51)
苘麻子、水飞蓟、鸦胆子、青果、毛诃子、连翘、锦灯笼	清热解毒	7 (5.51)
娑罗子、香橼、预知子、佛手、青皮、蒺藜、余甘子	疏肝理气	7 (5.51)
酸枣仁、茺蔚子、地肤子、瓜蒌皮、广枣、槐角	温脾止泻	6 (4.72)
青箱子、川楝子、夏枯草、葶苈子、紫苏子	清肝泻火	5 (3.94)
车前子、大豆黄卷、地肤子、冬葵果、梔子	清热利湿	5 (3.94)
葶苈子、路路通、黑豆、水红花子、槟榔	行水消肿	5 (3.94)
巴豆、瓜蒌子、金樱子、莲子、毛诃子	健胃消食	5 (3.94)
楮实子、火麻仁、木瓜、石榴皮、黑豆	活血散瘀	5 (3.94)
乌梅、冬葵果、连翘、柿蒂、芥子	行气止痛	5 (3.94)
胡芦巴、蒺藜、王不留行、亚麻子	散寒止痛	4 (3.15)
吴茱萸、沙苑子、沙棘、桑椹	疏肝破气	4 (3.15)

2.4 用法、用量

2020 年版《中国药典》记载的 127 味果实种子类中药中,只有 35 味中药记载了详细用法,其中可外用的果实种子类中药共有 22 味,以煎汤洗和研末外敷为主,多用来治疗湿疹、风疹、痈肿疮毒^[14]、白癜风等;可入丸散用的有大皂角、千金子、马钱子、毛诃子、余甘子、使君子、牵牛子、猪牙皂;车前子和葶苈子可包煎;苦杏仁、豆蔻和砂仁可后下,胖大海可沸水泡服或煎服;水飞蓟供配制成药用,其余中药用法未收录,用法分布见图 2。

2020 年版《中国药典》记载的 127 味果实种子类中药中,125 味均有用量的详细记载,其中用量 9~15 g、3~10 g、3~9 g 和 5~10 g 为常用剂量,除巴豆和水飞蓟无用量记载(见图 3)。

2.5 炮制方法

中医中讲述“逢子必炒”“逢子必破”“逢子必捣”,认为果实种子类药物外皮坚硬,炒制、捣碎之后,被皮爆裂,有利于有效物质的渗出,更容易发挥其药效。净制和干燥是为了清除杂质,便于调剂制剂、服用和贮藏^[15]。2020 年版《中国药典》记载的

127 味果实种子类中药中,明确记载炮制方法的有 97 种,以净制、捣碎、干燥、炒制(包括清炒法、盐炙、麸炒法、蜜炙法、炒炭法、醋炙法、姜汁炙法)为主,其中没有记录炮制方法的有 30 种,详见表 3。

2.6 注意事项

有毒^[20-21]或孕妇慎用的果实种子类中药共 30 种,见表 4。

3 果实种子类中药临床应用分析

3.1 果实种子类中药的概述

唐容川^[22]曰:“物下极则反上,物上极则反下;草木上生果实,为已极矣,故反而下行;实核之性,在于内敛,故降而兼收”。中医中亦有描述果实种子类中药的词汇,如“诸子皆降”,果实果实种子类药材质地与花、叶类中药相比,显得比较沉重,因此一般认为有下降的功能;如罗汉果、柏子仁、桃仁、郁李仁等具有润肠通便的功效,在临床上可用于治疗便秘;“蔓荆子独升”,因蔓荆子质地轻飘,故“升”,为常用的解表药,临床多用于治疗感冒头痛。“凡仁皆润^[23]”,瓜蒌仁就是瓜蒌子,可降肺气,下润大肠。《医学南针》中讲述“同是果实,又有皮肉仁核之分;皮肉在外,



图 1 果实种子类中药性味归经
Fig 1 Nature, flavour, and channel tropism of fruit and seed traditional Chinese medicine



图 2 种子类中药的用法
Fig 2 Usage of fruit and seed traditional Chinese medicine

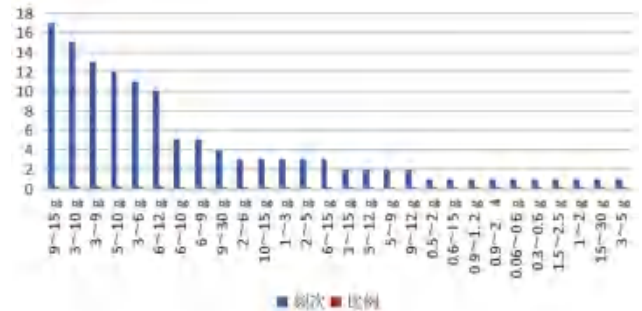


图 3 2020 年版《中国药典》记载的种子中药的用量
Fig 3 Dosage of fruit and seed traditional Chinese medicine in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia

表 3 种子类中药的炮制方法

Tab 3 Concoction methods of fruit and seed traditional Chinese medicine

炮制方法	中药	n (%)
净制	栀子、刀豆、川楝子、甜瓜子、马钱子、王不留行、桃仁、五味子、乌梅、亚麻子、韭菜子、决明子、赤小豆、莱菔子、芡实、豆蔻、连翘、沙苑子、诃子、补骨脂、菟丝子、青果、青箱子、草豆蔻、胡芦巴、南五味子、枳壳、柏子仁、砂仁、猪牙皂、葶苈子、紫苏子、黑豆、蔓荆子、蕤仁、橘核、大枣、山茱萸、牵牛子、山楂、小茴香、牛蒡子、化橘红、水飞蓟、石榴皮、瓜蒌子、母丁香、苍耳子、佛手、陈皮、青皮、菟藟子、柿蒂、蒺藜、罂粟壳、薏苡仁	56 (35.22)
捣碎	大皂角、木鳖子、五味子、白果、亚麻子、红豆蔻、芥子、吴茱萸、郁李仁、使君子、草豆蔻、胡芦巴、荔枝核、南五味子、砂仁、牵牛子、桃仁、益智、甜瓜子、猪牙皂、黑芝麻、蓖麻子、蔓荆子、榧子、酸枣仁、蕤仁、橘核、瓜蒌子、母丁香、罂粟壳	30 (18.86)
干燥	千金子、余甘子、牛蒡子、石榴皮、佛手、紫苏子、金樱子、菟藟子、枳实、罂粟壳、毛诃子、大皂角、木瓜、胡芦巴、连翘、急性子、莱菔子、预知子、沙苑子、甜瓜子、猪牙皂、莲子、黑芝麻、黑豆、大枣、化橘红、瓜蒌子、瓜蒌皮、青皮、决明子	30 (18.86)
炒制 (43)	清炒法 白扁豆、芥子、决明子、白果、苦杏仁、槟榔、莱菔子、蔓荆子、草果、牛蒡子、牵牛子、蒺藜、山楂、使君子、菟藟子、酸枣仁、桃仁、苍耳子、葶苈子、花椒、王不留行、栀子、火麻仁、紫苏子、黑芝麻 ^[16]	25 (15.72)
	盐水炙 胡芦巴、韭菜子、荔枝核、沙苑子、菟丝子、小茴香、益智、补骨脂	8 (5.03)
	麸炒法 ^[17] 薏苡仁、芡实、枳壳、枳实	4 (2.51)
	蜜炙法 粟壳、槐角	2 (1.26)
	炒炭法 ^[18] 乌梅、石榴皮	2 (1.26)
	醋炙法 ^[19] 青皮	1 (0.62)
	姜汁炙法 草果	1 (0.62)

容有升散之理；仁核在内，则专主收降，断无升散”。可见种子果实类中药的功能主治跟其所在植物部位有很大的关联，因此，在不明确果实种子

类中药功效的情况下，可根据以上理论来进行初步推断，并采用相关实验进行确证。

表 4 2020 年版《中国药典》记载有毒或孕妇慎用的种子类中药

Tab 4 Seed traditional Chinese medicine with toxicity or used with caution by pregnant women as recorded in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia

注意事项	中药
孕妇慎用	王不留行、郁李仁、枳壳、急性子、桃仁、枳实、薏苡仁、黑种草子（维吾尔族习用药材）
有小毒	川楝子、小叶莲、吴茱萸、苦杏仁、鸦胆子、蛇床子、南鹤虱、鹤虱、蒺藜、槭藤子
孕妇禁用、有毒	千金子、木鳖子、牵牛子、罂粟壳
孕妇禁用、有大毒	马钱子、天仙子、巴豆
有毒	白果、蓖麻子、苍耳子
孕妇忌用、有小毒	大皂角、猪牙皂

3.2 《中国药典》中果实种子类中药的临床应用特点
 2020 年版《中国药典》记载的 127 味果实种子类中药中，出现频次较高的主治疾病有 14 类，以内科、妇科、男科多见，临床多用于治疗咳嗽、腹痛、便秘、乳痈乳闭等。详见表 5。

表 5 果实种子类中药主治疾病

Tab 5 Seed traditional Chinese medicine for various diseases

主治	中药	n (%)
内科 咳嗽 ^[24]	核桃仁、瓜蒌子、乌梅、罂粟壳、木蝴蝶、瓜蒌、甜瓜子、罗汉果、诃子、榧子、桃仁、紫苏子、五味子、南五味子、牵牛子、胖大海、白果、香橼、车前子、瓜蒌皮、锦灯笼、莱菔子、大皂角、猪牙皂、沙棘、牛蒡子、化橘红、佛手、陈皮、苍耳子、芥子、余甘子、青果、苦杏仁	34 (26.77)
腹痛	赤小豆、川楝子 ^[25] 、牵牛子、榧子、槟榔、石榴皮、花椒、南鹤虱、鹤虱、胡椒、乌梅、益智、八角茴香、吴茱萸、荜澄茄、胡芦巴、荔枝核、小茴香、红豆蔻、槭藤子、罂粟壳、青皮、辣椒、沙棘、香橼、陈皮	26 (20.47)
便秘 ^[26]	亚麻子、苦杏仁、罗汉果、柏子仁、桃仁、紫苏子、黑芝麻、火麻仁、桑椹、核桃仁、枳实、瓜蒌、决明子、莱菔子、大皂角、猪牙皂、蓖麻子、千金子、牵牛子、郁李仁、胖大海	21 (16.54)
痰多	预知子、胡椒、猪牙皂、苦杏仁、沙棘、牛蒡子、化橘红、佛手、陈皮、青果、大皂角、瓜蒌、葶苈子、牵牛子、枳壳、紫苏子、芥子	17 (13.89)
消渴	五味子、南五味子、酸枣仁、桑椹、女贞子、枸杞子、山茱萸、青果、余甘子、连翘、黑豆、乌梅、冬葵果（蒙古族习用药材）	13 (10.24)
腰膝酸痛	枸杞子、木瓜、女贞子、菟丝子、楮实子、八角茴香、沙苑子、黑豆、补骨脂、蛇床子	10 (7.87)
遗尿尿频	五味子、白果、芡实、沙苑子、补骨脂、南五味子、韭菜子、菟丝子、山茱萸、金樱子、覆盆子	11 (8.66)
小便不利	大豆黄卷、郁李仁、预知子、葶苈子、薏苡仁、锦灯笼、车前子、连翘、地肤子	9 (7.09)
胸胁胀痛	芥子、香橼、丝瓜络、佛手、青皮、蒺藜、枳壳、葶苈子	8 (6.30)
虫病	使君子、榧子、槟榔、南鹤虱、鹤虱	5 (3.94)
腹泻 ^[27]	菟丝子、乌梅、诃子、金樱子、薏苡仁、五味子、南五味子、莱菔子、莲子、槟榔、枳实、小茴香、母丁香、石榴皮、芡实、木瓜、白扁豆、吴茱萸、补骨脂、罂粟壳	20 (15.75)
妇科 经闭痛经	黑种草子（维吾尔族习用药材）、桃仁、预知子、千金子、小叶莲、沙棘、山楂、王不留行、急性子、路路通、小茴香、菟藟子	12 (9.44)
乳痈乳癖	蒺藜、夏枯草、橘核、青皮、王不留行、木鳖子、瓜蒌、连翘、丝瓜络、路路通、黑种草子（维吾尔族习用药材）	11 (10.28)
男科 阳痿遗精	核桃仁、菟丝子、山茱萸、五味子、韭菜子、南五味子、蛇床子、母丁香、莲子心、覆盆子、益智、芡实、金樱子、沙苑子、枸杞子、莲子、补骨脂	17 (13.89)

3.3 果实种子类中药的临床新用

中药新用是指在其功效一致的基础上发现了新的临床应用，如车前子临床可用于热淋涩痛、暑湿泄泻、尿血、视物昏暗、痰热咳嗽等^[28]，而吴智高^[29]发现其临床可用于治疗痛风；女贞子用于眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、内热消渴等，丁兆平^[30]发现其亦可用于治疗高血脂血症等。目前药典收录的中药数量有限，中药资源较少，开发中药的临床新用，不仅可以在一定程度上弥补药材数量少的问题，还可以进一步推动中药材的临床应用与发展。

4 讨论与建议

本文通过对 2020 年版《中国药典》进行统计，共有 127 味果实种子类中药，其用药部位多为干燥成熟种子和干燥成熟果实，采摘季节多在夏、秋；药性以温、平为主，药味以甘、苦、辛为主，主入肝、胃、肺、脾、肾经。有明确记录的用法多以外用和入丸散服，用量以 9 ~ 15 g、3 ~ 10 g、3 ~ 9 g 和 5 ~ 10 g 为常用剂量，但药典并未记载不同用法之间的用量，日后应完善相关用法的具体用量；孕妇禁用和有毒的中药有 30 味；炮制方法多为去除杂质、捣碎、干燥、炒制，其中有 30 味果实种子类中药在药典里未记载明确的炮制方法；功能主要有燥湿化痰、润燥通便、

杀虫消积、补肾助阳、养肝明目、滋补肝肾、清热解毒、疏肝理气、温脾止泻等；目前我国对果实种子类中药的临床研究颇多，多集中在内科、妇科和男科，如菟丝子在临床治疗男性少弱精子症^[31]较多，桃仁、预知子、川楝子临床多用于治疗痛经，紫苏子临床用于治疗糖尿病、支气管哮喘^[32-33]等。经查阅知网文献和 2020 年版《中国药典》，发现果实种子类中药存在一些问题，本文提出以下几点意见：

4.1 完善果实种子类药物的功能主治和用法用量，及时更新

检索知网发现，桃仁除具有治疗痛经、肺病肠痛、跌扑损伤、肠燥便秘、咳嗽气喘的作用之外，临床还可用于防治动脉粥样硬化；预知子除用于痛经经闭、利尿外，临床还具有一定的抗抑郁作用；使君子除用于杀虫消积外，临床研究表明还可用于嗜甲症^[34]、手足癣^[35]、乳糜尿^[36]、小儿角膜软化症^[37]等的治疗，加强对药典已收录中药临床新用的挖掘，并更新其相关新用^[38]。

分析药典 127 味果实种子类中药发现，只有 35 味中药记载了详细的用法，且并未记载不同用法之间的不同用量，应加强研究并完善药典果实种子类药物的用法用量。

4.2 完善果实种子类药物的炮制方法

中药炮制是我国独有的传统制药技术^[39]，是根据中医药理论，依照临床辨证施治用药和药物自身性质，以及调剂、制剂的不同要求所采取的一项制药技术。如蔓荆子经炒后易捣碎^[40-41]，更有利于煎出有效成分，并缓其辛散之性，还易于提出多余杂质，使药物更纯净^[42]。在 2020 年版《中国药典》记载的 127 味果实种子类中药中，明确记载炮制方法的有 97 种，未记载炮制方法的有 30 种。且近代对未记载炮制方法的果实种子类药物的研究进展较缓慢，相关研究人员应参考古籍或文献报道的炮制方法，对果实种子类中药的炮制继续进行探究并逐步完善。

4.3 加强果实种子类药物的鉴别、质控与保存

4.3.1 完善果实种子类中药的鉴别 果实种子类中药因其体积和外形的特殊性，再加上基层单位没有先进的设备进行检验，导致市场上有较多的伪品或混淆品流通^[43]，如天仙子与菟丝子外观相似，不易辨别，且天仙子有大毒，混淆后会铸成大错^[44]。果实种子类中药在市场上的混乱不仅会降低临床用药的安全性，还极大可能给中药种植行业造成经济损失^[45]；因此，应向基层普及完善果实种子类药物的鉴别方法，并在市场上应严格区分，避免购买者采购错误，以确保临床用药的安全性。

4.3.2 加强种质资源的控制 中药材产业的命脉被种质资源牢牢掌控，保证中药材的产量和质量的前提是确保中药材种子的纯正优良，但目前市场中种子药材的质量参差不齐^[46]，种源尚未清晰。中药现代化战略的 GAP 标准体系中，种质控制是一项重要环节^[47]，顽拗性种子在种子科学研究领域占据重要地位，当前仍存在许多难以攻克的问题^[48]，目前对种子药材源头的鉴别较少，大多数 DNA 条形码研究的中药材来源是市场^[49-50]；因此，加强 DNA 分子鉴定研究对优化种源有更为重要的意义^[51]。

4.3.3 完善果实种子类中药的保存 合适的贮藏手段是保证种子质量的前提，与种子发芽率和保苗率息息相关。目前，超干贮藏及超低温贮藏的研究引起了许多人的关注。邹冬梅^[52]利用硅胶室温干燥法将银合欢种子含水量降到了 5% 以下，显著的提高了种子的抗老化劣变能力，为保存银合欢种子提供了新方法。

综上所述，本文对果实种子类中药进行了详细的统计，并对其入药部位、性味归经、用法用量、炮制方法和注意事项进行了相关分析，为研究果实种子类中药提供了文字和数据支持，以促进果实种子类中药的进一步发展。

参考文献

- [1] 姚瑞东. 浅谈果实种子类中药炒制的意义[J]. 中国实用医药, 2012, 7(1): 241-242.
- [2] Handelsman Y, Shapiro MD. Triglycerides, atherosclerosis, and cardiovascular outcome studies: focus on omega-3 fatty acids. *Endocr Pract*, 2017, 23(1): 100-112.
- [3] de Oliveira PA, Kovacs C, Moreira P, et al. Unsaturated fatty acids improve atherosclerosis markers in obese and overweight non-diabetic elderly patients[J]. *Obes Surg*, 2017, 27(10): 2663-2671.
- [4] 关子赫, 刘建秋, 李敬孝, 等. 枸杞子药性演变辨析[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6095-6098.
- [5] 杨雪, 郝二伟, 张帆, 等. 种子类中药及其活性成分改善动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. 中国药房, 2020, 31(7): 884-889.
- [6] 谭新宁. 细小果实种子类中药青箱子鉴定方法的系统研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [7] 李海滨, 李春日. 中药传统经验鉴别探析[J]. 亚太传统医药, 2014, 14(10): 47-48.
- [8] 张雨恬, 王学成, 黄艺, 等. 中药炮制设备的研究现状及技术升级途径策略[J]. 中草药, 2022, 53(5): 1540-1547.
- [9] 王秀琴, 王岩, 李军, 等. GC-MS 分析天仙子及其炮制品中挥发油成分[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(5): 1044-1047.
- [10] 蒋一帆, 高建超, 田春华, 等. 毒性药材天仙子的文献研究及风险探讨[J]. 中国药物警戒, 2016, 13(3): 165-168, 172.

- [11] 杨秀颖, 张雯, 袁天翊, 等. 中药鹤虱的历史认识与评价[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5): 153-155.
- [12] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020.
- [13] 张悦, 邓爱平, 方文韬, 等. 果实种子类药材商品规格等级标准——以枸杞子枳壳栀子柏子仁等 6 种药材为例[J]. 中国现代中药, 2019, 21(6): 717-722.
- [14] 张晓萍, 白莉, 李彩霞, 等. 2020 年版《中华人民共和国药典》外用成方制剂作用特点分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 207-217.
- [15] 邹冬梅. 银合欢种子的超干保存[J]. 热带作物学报, 2006, 27(3): 17-21.
- [16] 刘君, 张丽艳, 幕杨娜, 等. 中药黑芝麻不同炮制品体外抗氧化作用研究[J]. 西部中医药, 2018, 31(8): 27-30.
- [17] 王凡一, 高如汐, 郑威, 等. 麸炒法的历史沿革与现代研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(2): 94-101.
- [18] 贾舒杰, 李诗佳, 杨柳, 等. 中药制炭工艺历史沿革及现代研究进展[J]. 西部中医药, 2020, 33(7): 144-147.
- [19] 李昱, 苏麒麟, 季德, 等. 炮制辅料醋的历史沿革及现代研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(16): 4083-4088.
- [20] 孟驿佳, 康乐, 王媛, 等. 2020 年版《中国药典》(一部) 有毒中药毒性成分及毒性特点分析[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(1): 99-104.
- [21] 戎萍, 张喜莲, 刘晖, 等. 基于《中华人民共和国药典》探讨含毒性中药饮片中成药的现状与思考[J/OL]. 辽宁中医杂志, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20220929.1145.012.html>.
- [22] 陆士谔原著. 医学南针[M]. 谷峰, 朱鹏举, 董野整理. 北京: 中国中医药出版社, 2019.
- [23] 汪受宽, 屈直敏. 中华优秀传统文化精要[M]. 兰州: 甘肃人民出版社, 2018.
- [24] 林豪, 王阔, 曾钦成, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨五味子治疗慢性咳嗽的机制研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2022, 23(4): 466-470.
- [25] 魏舒婷, 盛云华, 唐黎明. 基于效-毒研究的川楝子临床应用分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 169-173.
- [26] 李萌, 于靖文, 王少丽, 等. 基于数据挖掘的《临证指南医案》便秘用药规律[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(16): 3430-3434.
- [27] 熊峥, 余丽莹, 詹志来. 金樱子的本草考证[J]. 中国现代中药, 2021, 23(7): 1282-1287.
- [28] 田硕, 苗明三. 基于临床新用的中医理论新发展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3350-3353.
- [29] 吴智高. 中药车前子临床新用[J]. 海峡药学, 2016, 28(11): 215.
- [30] 丁兆平. 女贞子临床新用[J]. 家庭中医药, 2020, 27(7): 63.
- [31] 郑燕飞, 白雪, 汤轶波, 等. 基于中医传承辅助平台探讨王琦院士临床治疗少弱精子症的用药规律[J]. 中华男科学杂志, 2020, 26(6): 532-542.
- [32] 杨梅英, 范忠杰, 张丽, 等. 白果内酯对烟雾颗粒诱导的人支气管上皮细胞 16HBE 炎性损伤的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(16): 1877-1881.
- [33] 魏文海, 李兴芳, 赵琼, 等. 基于网络药理学探讨紫苏子-葶苈子治疗支气管哮喘的作用机制[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(12): 1-4, 159-161.
- [34] 宋炜, 高卫华, 谭秀彦, 等. 使君子醇提取物下调 TPT1-AS1 抑制肝癌细胞增殖、侵袭迁移[J]. 中国药师, 2021, 24(5): 850-855.
- [35] 徐志成. 手癣验方[J]. 四川中医, 1992(10): 51.
- [36] 周水根, 熊金根, 刘国芳. 治乳糜尿中草药验方十则[J]. 农村百事通, 2001, 8(1): 45.
- [37] 史安冰. 肥儿丸加减治疗小儿角膜软化症[J]. 陕西中医, 1989(9): 415.
- [38] 王赛, 白明, 李秀敏, 等. 2020 年版《中国药典》(一部) 叶类中药功能及应用分析[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(1): 191-195.
- [39] 刘淑花, 李群, 张会敏, 等. “逢子皆炒, 见子皆捣”的古今演变、发展状况及炮制意义[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 231-235, 236.
- [40] 石芸, 徐长丽, 金俊杰, 等. “逢子必炒”炮制理论的传统认识与现代研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(7): 2227-2236.
- [41] 张卫, 王嘉伦, 唐力英, 等. 经典名方中蔓荆子本草考证[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5503-5507.
- [42] 庄延双, 秦昆明, 蔡皓, 等. 种子类中药炮制前后质量标准研究现状及几点思考[J]. 中药材, 2018, 41(1): 228-232.
- [43] 王利丽, 杨珂, 郭雨轩, 等. 果实种子类药材微形态的鉴别研究[J]. 电子显微学报, 2020, 39(3): 313-322.
- [44] 李雪莹, 王苏丽, 刘波. 20 种细小果实种子类中药经验鉴别[J]. 实用中医药杂志, 2018, 34(8): 1011-1012.
- [45] 裴河欢, 谢练武, 朱开昕, 等. 中药桑寄生种子研究进展[J]. 中国药业, 2018, 27(19): 1-4.
- [46] 连超杰, 康帅, 张南平, 等. 《中国药典》收载种子类药材统计分析与监管建议——以青箱子、鸡冠花子为例[J]. 中国食品药品监管, 2022(3): 25-33.
- [47] 方海兰, 夏从龙, 段宝忠, 等. 基于 DNA 条形码的中药材种子种苗鉴定研究——以重楼为例[J]. 中药材, 2016, 39(5): 986-990.
- [48] 王维婷, 单成钢, 朱京斌, 等. 中药种子成熟度、劣变机制及贮藏方法研究进展[J]. 种子科技, 2010, 28(2): 26-28.
- [49] 刘爱朋, 张树旺, 王世信, 等. 10 种细小果实种子类药材的微性状鉴别[J]. 中成药, 2022, 44(6): 1869-1874.
- [50] 李磊, 孟珍贵, 龙光强, 等. 植物顽拗性种子研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(1): 106-118.
- [51] 张好华. 中药材鉴定在中药库房管理中的作用分析[J]. 光明中医, 2020, 35(6): 948-950.
- [52] 邹冬梅. 银合欢种子的超干保存[J]. 热带作物学报, 2006, 27(3): 17-21.

(收稿日期: 2023-02-15; 修回日期: 2023-04-10)

药物分析与检验

金银花-连翘药对配方颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分含量测定研究

方朝缙, 甘力帆, 黄醒鹏, 徐杰, 杨赞, 刘涛乾, 崔婷*, 魏梅 (广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

摘要: **目的** 建立金银花-连翘药对配方颗粒 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量同时测定的方法。**方法** 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ Column 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 40℃, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL, 对金银花-连翘药对配方颗粒 HPLC 指纹图谱进行相似度评价、聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析等多元统计分析及主成分含量测定。**结果** 12 批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.970, 共标定了 15 个共有峰, 对照品指认了 9 个主要色谱峰, 分别是 1 号峰新绿原酸、2 号峰绿原酸、3 号峰隐绿原酸、4 号峰咖啡酸、7 号峰芦丁、8 号峰异槲皮苷、9 号峰连翘酯苷 A、13 号峰 4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸、14 号峰连翘苷。聚类分析和主成分分析均可将 12 批样品聚为 3 类; 正交偏最小二乘判别分析表明不同批次金银花-连翘药对配方颗粒略有差异, VIP 值>1 的色谱峰 9 和 6 是影响金银花-连翘药对配方颗粒差异的标志性成分。主成分定量分析结果显示, 新绿原酸含量为 0.144%~0.188%, 绿原酸含量为 2.088%~2.801%, 隐绿原酸含量为 0.238%~0.329%, 咖啡酸含量为 0.036%~0.051%, 连翘酯苷 A 含量为 3.527%~6.076%, 4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸含量为 0.385%~0.520%, 连翘苷含量为 0.300%~0.696%。**结论** 建立的金银花-连翘药对配方颗粒 HPLC 指纹图谱分析方法简单, 重现性良好, 该含量测定方法的精密度较高、稳定性较好, 可为金银花-连翘药对配方颗粒的物质基础及质量控制研究提供参考。

关键词: 金银花-连翘; 药对; 指纹图谱; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1612-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.032

Content determination of multi-component and establishment of fingerprint of flos lonicerae-fructus forsythuae formula granules

FANG Chao-zuan, GAN Li-fan, HUANG Xing-peng, XU Jie, YANG Zan, LIU Tao-qian, CUI Ting*, WEI Mei (Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd./Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Foshan Guangdong 528244)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and simultaneously determine the content of multi-component of flos lonicerae-fructus forsythuae formula granules. **Methods** An Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% phosphoric acid at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ for gradient elution. The column temperature was 40℃, the detection wavelength was 280 nm, and the injection volume was 10 μL. The fingerprint similarity was evaluated, the cluster analysis, principal component analysis and

基金项目: 佛山市应急科技攻关专项 (No.2020001000206)。

作者简介: 方朝缙, 男, 中药师, 主要从事中药配方颗粒质量标准与工艺生产研究, email: 763638458@qq.com ***通信作者:** 崔婷, 女, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药及中药配方颗粒质量标准研究, email: 770214378@qq.com

orthogonal partial least squares discriminant analysis were performed, and the content of principal components were determined. **Results** The similarity of HPLC fingerprints of 12 batches was greater than 0.970. Totally 15 common peaks were confirmed, and the structure of 9 main chromatographic peaks were identified by the reference: peak 1 was neochlorogenic acid, peak 2 was chlorogenic acid, peak 3 was cryptochlorogenic acid, peak 4 was caffeic acid, peak 7 was rutin, peak 8 was isoquercitrin, peak 9 was forsythoside A, peak 13 was 4, 5-di-*O*-caffeylquinic acid, and peak 14 was forsythin. Cluster analysis and principal component analysis showed that the 12 batches of samples were roughly divided into 3 categories. The chromatographic peaks 9 and 6 (with VIP value > 1) were the landmark components for the compositions of flos lonicerae-fructus forsythuae formula granules. The content of 7 main chromatographic peaks ranged: neochlorogenic acid 0.144% ~ 0.188%, chlorogenic acid 2.088% ~ 2.801%, cryptochlorogenic acid 0.238% ~ 0.329%, caffeic acid 0.036% ~ 0.051%, forsythoside A 3.527% ~ 6.076%, 4, 5-di-*O*-caffeylquinic acid 0.385% ~ 0.520%, and forsythin 0.300% ~ 0.696%. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method is simple and reproducible, which can provide a reference for the study of material basis and quality control of flos lonicerae-fructus forsythuae formula granules.

Key words: flos lonicerae-fructus forsythuae; drug pair; fingerprint; content determination; quality control

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 味甘性寒, 具有清热解毒、疏散风热的功效^[1]。连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 味苦性微寒, 具有清热解毒、消肿散结、疏散风热的功效^[1]。近年来, 随着中药配方颗粒的研究与开发, 临床常用配伍的“麻黄-桂枝、石膏-知母、黄连-吴茱萸、当归-川芎”等药对配方颗粒的研究也日趋广泛^[2-7], 通过药物配对, 可使单味药中较弱的功效, 在特定药物的配合下发挥独特疗效, 诸如“麻黄无桂枝不汗”“附子无干姜不热”“石膏得知母更寒”等都是前人对两药配伍应用产生特殊功效的总结。金银花、连翘配伍使用, 代表性方剂为《温病条辨》所载的银翘散, 两者相须为用, 既可用于外感温热而解表, 又可用于泄里热而解毒^[8]。开发金银花-连翘药对配方颗粒, 既保留了传统方剂共煎配伍的特点, 又具备中药配方颗粒随症加减的优势, 可降低中药配方颗粒临床调配频次, 使临床配方调剂更加方便, 并且能够进一步丰富中药配方颗粒产品体系, 弥补中药配方颗粒生产的局限性。此外, 连翘富含挥发油, 在连翘配方颗粒生产过程中, 喷雾干燥工序黏机严重, 喷干粉损耗大。金银花、连翘合煎后, 可有效改善喷雾干燥工序的黏机情况, 确保临床用药剂量的准确性和有效性。参考金银花、连翘在《中国药典》2020 年版中规定的质量标志物, 并检索文献发现, 金银花的活性成分主要有酚酸类、黄酮类、挥发油、三萜皂苷类等, 其酚酸类成分具有较好的抗病毒、抗菌、抗炎、抗氧

化、抗肿瘤等药理活性^[9-11]; 连翘的主要活性成分为苯乙醇苷类、木脂素类及其苷类、黄酮类、挥发油类等, 其中苯乙醇苷类成分连翘酯苷 A 具有抗菌、保肝、抗氧化、抑制哮喘气道炎症等药理作用^[12-15], 连翘苷具有显著的抗菌、降血脂、抗氧化、抗病毒等药理作用^[16-17]。故本研究拟建立金银花-连翘(1:1)药对配方颗粒 HPLC 指纹图谱及酚酸类成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、4, 5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸)、苯乙醇苷类成分(连翘酯苷 A)、连翘苷等 7 种成分含量同时测定的方法, 旨在为金银花-连翘药对配方颗粒物质基础及质量控制研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters Arc 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ME203E 千分之一天平、ME204E 万分之一天平、XP26 型百万分之一电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); 实验室 Milli-Q 超纯水系统(德国 Merck 公司); KQ-500DE 数控超声机清洗器(昆山市超声仪器有限公司); B-290 型喷雾干燥机(瑞士步琪有限公司); LGS20 型干法制粒机(南京迦南制药设备有限公司)。

1.2 试药

新绿原酸(批号: DSTDX001503, 纯度: 99.58%)、隐绿原酸(批号: DST210427-035, 纯度: 98.24%)(成都德思特生物技术有限公司); 绿原酸(批号: 110753-202018, 纯度: 96.1%)、芦丁(批号: 100080-202012, 纯度: 91.6%)、咖啡酸(批号: 110885-201703, 纯度: 99.7%)、4, 5-

二-O-咖啡酰奎宁酸(批号:111894-202104,纯度:95.1%)、异槲皮苷(批号:111809-201804,纯度:97.2%)、连翘苷(批号:110821-202117,纯度:94.9%)、连翘酯苷A(批号:111810-201707,纯度:97.2%)对照品(中国食品药品检定研究院);乙腈、甲醇为色谱纯(德国Merck公司),磷酸为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。金银花、连翘样品经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾,连翘为木

犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,且均为青翘。

饮片先以《中国药典》2015年版、《中国药典》2020年版金银花、连翘含量测定项下含量测定方法对酚酸类成分、木犀草苷、连翘酯苷A、连翘苷含量进行测定,再按含量测定结果由高到低进行排序,然后利用Microsoft Office Excel随机函数进行组合,给每一饮片生成一个0→1之间的随机有效数字,再按随机有效数字数值由大到小给每一批饮片进行排序,所得序号为饮片对应识别号,识别号相同的饮片两两配伍,结果见表1。

表1 样品信息
Tab 1 Sample information

编号	金银花		连翘	
	收集时间	供货单位	收集时间	供货单位
J-L-S1	2020年4月	山东中平药业有限公司	2021年4月	山东中平药业有限公司
J-L-S2	2020年6月	山东中平药业有限公司	2019年9月	民生药业集团珍医堂制药有限公司
J-L-S3	2020年11月	山东中平药业有限公司	2017年3月	山西长治市屯留县八泉村
J-L-S4	2020年1月	山东保利药业有限公司	2021年6月	哈尔滨福顺堂药材有限公司
J-L-S5	2020年12月	山东中平药业有限公司	2019年8月	山西九州天润道地药材开发有限公司
J-L-S6	2020年8月	山东中平药业有限公司	2020年2月	山东中平药业有限公司
J-L-S7	2020年3月	山东中平药业有限公司	2019年8月	山西九州天润道地药材开发有限公司
J-L-S8	2020年9月	山东中平药业有限公司	2020年4月	山东中平药业有限公司
J-L-S9	2020年3月	山东中平药业有限公司	2020年4月	山东中平药业有限公司
J-L-S10	2019年12月	山东中平药业有限公司	2021年2月	山西华逸药业有限公司
J-L-S11	2020年2月	山东中平药业有限公司	2020年11月	山东中平药业有限公司
J-L-S12	2021年4月	山东中平药业有限公司	2021年6月	哈尔滨福顺堂药材有限公司

注:金银花以“J”表示,连翘以“L”表示。

Note: J means flos *Lonicerae*, L means fructus *forsythiae*.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ Column (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 10%A; 5~10 min, 10%~15%A; 10~30 min, 15%~18%A; 30~40 min, 18%~44%A; 40~45 min, 44%~10%A);流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:280 nm;进样量:10 μL;柱温:40℃;理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于8000。

2.2 金银花-连翘药对配方颗粒的制备

按金银花-连翘药对配伍比例1:1,精密称取金银花、连翘饮片适量,加水煎煮两次,第一次加12倍量水,浸泡30 min,武火煮沸后文火保持微沸20 min,用350目筛网趁热过滤。第二次煎煮加10倍量水,武火煮沸后文火保持微沸15 min,用350目筛网趁热过滤,合并两次滤液,减压浓缩,干燥,制粒,即得(编号J-L-S1~J-L-S12)。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘酯苷A、连翘苷对照品,分别精密称定,加甲醇制成每1 mL含新绿原酸77.672 μg、绿原酸52.869 μg、隐绿原酸73.681 μg、咖啡酸62.711 μg、芦丁66.960 μg、异槲皮苷54.335 μg、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸140.368 μg、连翘酯苷A36.171 μg、连翘苷57.509 μg的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取金银花-连翘药对配方颗粒样品,研细,取约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,称定重量,超声处理(功率300 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用50%甲醇补足减失的重量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学验证

2.4.1 精密度试验 精密吸取金银花-连翘药对

配方颗粒供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以绿原酸参照物峰相应的峰为 S1 峰,计算峰 1、峰 3、峰 4、峰 5、峰 6、峰 7、峰 8 与 S1 峰的相对保留时间和相对峰面积;以连翘苷参照物峰相应的峰为 S2 峰,计算峰 9、峰 10、峰 11、峰 12、峰 13、峰 15 与 S2 峰的相对保留时间与相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间 *RSD* 值均小于 0.050%,相对峰面积 *RSD* 值均小于 1.4%,表明仪器精密度高。

2.4.2 重复性试验 取同一批金银花-连翘药对配方颗粒样品,按“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,以绿原酸参照物峰相应的峰为 S1 峰,计算峰 1、峰 3、峰 4、峰 5、峰 6、峰 7、峰 8 与 S1 峰的相对保留时间和相对峰面积;以连翘苷参照物峰相应的峰为 S2 峰,计算峰 9、峰 10、峰 11、峰 12、峰 13、峰 15 与 S2 峰的相对保留时间与相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间 *RSD* 值均小于 0.50%,相对峰面积 *RSD* 值均小于 4.0%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取金银花-连翘药对配方颗粒供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 进样测定,以绿原酸参照物峰相应的为 S1 峰,计算峰 1、峰 3、峰 4、峰 5、峰 6、峰 7、峰 8 与 S1 峰的相对保留时间和相对峰面积;以连翘苷参照物峰相应的为 S2 峰,计算峰 9、峰 10、峰 11、峰 12、峰 13、峰 15 与 S2 峰的相对保留时间与相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间 *RSD* 值均小于 0.50%,相对峰面积 *RSD* 值均小于 6.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 金银花-连翘药对配方颗粒指纹图谱的建立

2.5.1 对照指纹图谱的建立 取 12 批金银花-连翘药对配方颗粒供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行指纹图谱测定,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版),以 S1 号样品的色谱图作为参照,中位数法建立对照图谱,设置时间窗宽度为 0.1 min,采用多点校正法进行色谱峰匹配,共确定了 15 个共有峰,见图 1。

2.5.2 共有峰的归属与指认 分别取金银花、连翘药材,按“2.2”项下方法制备单味药配方颗粒,并按“2.1”项下色谱条件进行指纹图谱测定。结果显示 1~4、7、10、12、13 号峰来源于金银花,1、4~9、11、14、15 号峰来源于连翘。通过与混合对照品图谱比对,指认 1 号峰为新绿原酸,

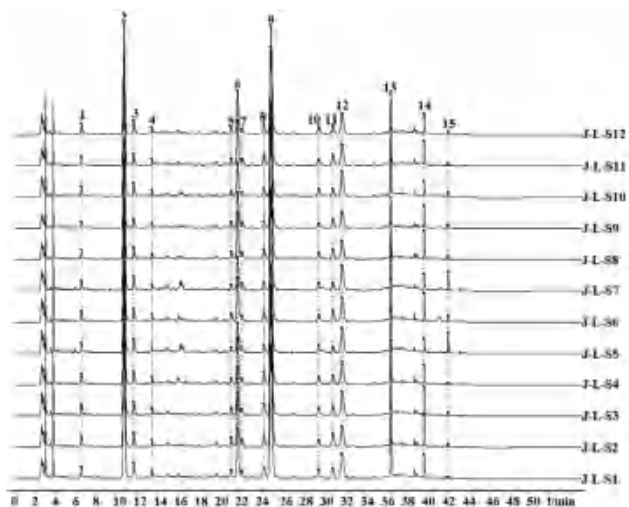


图 1 12 批金银花-连翘药对配方颗粒 HPLC 叠加图谱

Fig 1 HPLC Fingerprints of 12 batches of flos Ionicerae-fructus forsythiae formula granules

2 号峰为绿原酸,3 号峰为隐绿原酸,4 号峰为咖啡酸,7 号峰为芦丁,8 号峰为异槲皮苷,9 号峰为连翘酯苷 A,13 号峰为 4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸,14 号峰为连翘苷,结果见图 2。

2.6 化学模式识别分析

2.6.1 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)分析软件,以对照图谱 R 为参照,进行整体相似度评价。结果显示,金银花-连翘药对配方颗粒不同批次间特征图谱基本相似,与对照图谱一致性较好。12 批配方颗粒(J-L-S1→J-L-S12)相似度依次为 1.000、0.994、1.000、0.999、0.977、0.999、0.991、0.992、0.996、0.990、0.998、1.000,均>0.970,表明金银花配伍连翘在整体的质量、各成分的比例上相对稳定,且符合指纹图谱的研究要求。

2.6.2 聚类分析与方差分析 将 12 批金银花-连翘药对配方颗粒色谱峰峰面积按“峰面积/取样量/60 000”处理后导入 SPSS 26.0 软件,采用组间连接法,以平方 Euclidean 距离为分类依据,对样品进行系统聚类分析,结果见图 3。当聚类距离为 10 时,可将 12 批金银花-连翘药对配方颗粒样品聚为 3 类,其中 J-L-S1~J-L-S3、J-L-S6 聚为一类,即为 I 类;J-L-S4、J-L-S8~J-L-S9、J-L-S11~J-L-S12 聚为一类,记为 II 类;J-L-S5、J-L-S7、J-L-S10 则聚为一类,记为 III 类。即使购买来自统一厂家金银花或连翘药材,制备的金银花-连翘药对配方颗粒质量也会差异较大,这可能与原料药材的产地、采收期、加工方式等有关^[18-19],同时也说明一个或多个指标成分无法整体反映金银花-连翘药对配方颗粒的质量,建立

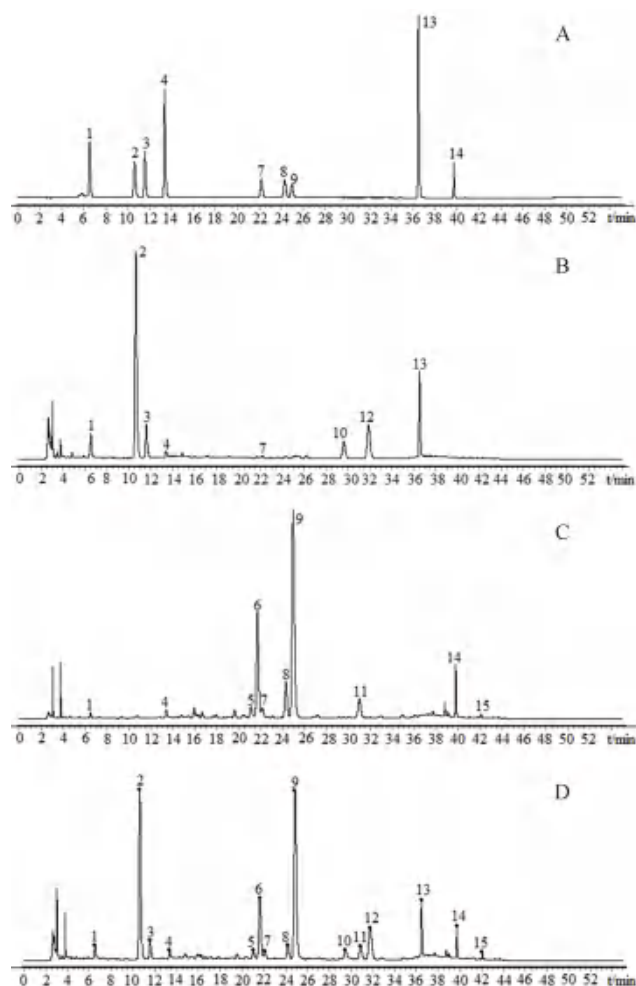


图2 金银花-连翘药对配方颗粒 HPLC 指纹图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of the flos lonicerae-fructus forsythuae formula granule

A. 混合对照品 (mixed reference solution); B. 金银花配方颗粒 (flos lonicera formula granule); C. 连翘配方颗粒 (fructus forsythuae formula granule); D. 金银花-连翘药对配方颗粒 (flos lonicerae-fructus forsythuae formula granule); 1. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 2. 绿原酸 (chlorogenic acid); 3. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid); 4. 咖啡酸 (caffeic acid); 7. 芦丁 (rutin); 8. 异槲皮苷 (isoquercitrin); 9. 连翘酯苷 A (forsythoside A); 13. 4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸 (4, 5-di-O-caffeylquinic acid); 14. 连翘苷 (forsythin)

指纹图谱可较大程度地反映整体化学特征信息。

为阐明各批次样品聚类的内在规律性, 分别计算 3 类金银花-连翘药对配方颗粒各特征峰的“峰面积/取样量/60000”值, 并进行单因素方差分析, 见表 2。结果表明, 3 类金银花-连翘药对配方颗粒样品间峰 4 (咖啡酸)、峰 7 (芦丁)、峰 10、峰 13 (4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸) 的峰面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而峰 6、峰 9 (连翘酯苷 A)、峰 14 (连翘苷) 的峰面积均差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明峰 6、峰 9 (连翘酯苷 A)、峰 14 (连翘苷) 是导致 12 批金银花-连

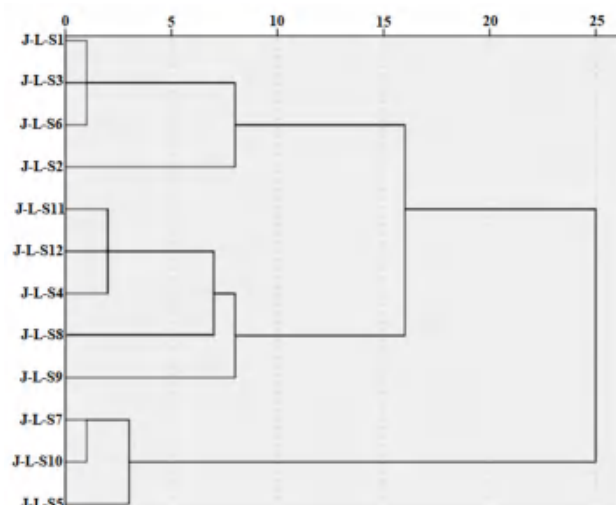


图3 12批金银花-连翘药对配方颗粒聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis diagram of 12 batches of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae* formula granules

翘药对配方颗粒聚为 3 类的关键指标, 是影响不同批次金银花-连翘药对配方颗粒质量差异的重要成分。此外, I 类与 II 类金银花-连翘药对配方颗粒样品间峰 2 (绿原酸)、峰 3 (隐绿原酸)、峰 12 的峰面积差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 I 类与 III 类差异无统计学意义 ($P > 0.05$), II 类与 III 类差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I 类与 II 类金银花-连翘药对配方颗粒样品间峰 8、峰 15 的峰面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但与 III 类均差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I 类与 III 类、II 类与 III 类金银花-连翘药对配方颗粒样品间峰 1 (新绿原酸) 的峰面积值均差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 I 类与 II 类间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); II 类与 III 类金银花-连翘药对配方颗粒样品间峰 5 的峰面积值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但与 I 类间均差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I 类与 II 类、II 类与 III 类金银花-连翘药对配方颗粒样品间峰 11 的峰面积值均差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 I 类与 III 类间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6.3 主成分分析 (PCA) 采用 SPSS 26.0 软件将 12 批金银花-连翘药对配方颗粒色谱峰峰面积进行标准化处理, 结果见表 3。将标准化处理后的数据进行主成分分析, 以特征值大于 1 为判断标准进行因子抽取, 共提取得到 3 个主成分, 可反映金银花-连翘药对配方颗粒指纹图谱整体 88.451% 以上的信息, 其特征值和方差贡献率见表 4。对主成分载荷值及得分系数进行计算, 结果见表 5。根据得分系数可构建各主成分的线型模型, 各主成分解析表达式分别为: 为 $F_1 = 0.038X_1 - 0.044X_2 -$

表 2 3 类金银花-连翘药对配方颗粒各特征峰的“峰面积/取样量/60 000”值单因素方差分析

Tab 2 ONE-way analysis of variance of “peak area/sample weight/60 000” value of three types of flos loniceræ-fructus forsythiæ formula granules on each characteristic peak

峰号	I 类	II 类	III 类
峰 1	17.21±0.24 ^a	14.59±2.24 ^b	15.68±0.47 ^{ab}
峰 2	254.24±7.77 ^a	209.14±21.32 ^b	258.57±5.53 ^a
峰 3	24.73±1.65 ^a	20.66±3.07 ^b	24.45±0.62 ^a
峰 4	8.43±1.87 ^a	7.45±1.74 ^a	7.18±0.78 ^a
峰 5	14.39±2.35 ^a	11.49±1.88 ^b	8.65±0.52 ^b
峰 6	105.72±9.73 ^a	91.94±9.58 ^b	67.13±5.73 ^c
峰 7	8.23±1.41 ^a	7.68±0.71 ^a	8.76±2.27 ^a
峰 8	24.88±3.31 ^a	22.04±4.22 ^a	15.42±1.11 ^b
峰 9	348.46±26.56 ^a	294.28±23.33 ^b	239.00±18.17 ^c
峰 10	17.77±1.91 ^a	15.54±3.03 ^a	16.45±1.30 ^a
峰 11	31.87±5.46 ^a	26.82±3.36 ^{ab}	20.35±1.97 ^b
峰 12	74.68±5.88 ^a	63.78±7.53 ^b	80.55±1.93 ^a
峰 13	52.65±3.69 ^a	47.47±6.29 ^a	54.74±2.48 ^a
峰 14	24.55±3.29 ^a	20.07±3.26 ^b	12.91±0.91 ^c
峰 15	3.08±2.17 ^a	2.22±0.95 ^a	13.99±8.74 ^b

注：同一行不同字母表示 $P < 0.05$ 。

Note: Different letters in the same line indicate $P < 0.05$.

表 3 12 批金银花-连翘药对配方颗粒各特征峰数据标准化处理

Tab 3 Standardized processing of characteristic peak data of 12 batches of flos loniceræ-fructus forsythiæ formula granules

特征峰	J-L-S1	J-L-S2	J-L-S3	J-L-S4	J-L-S5	J-L-S6	J-L-S7	J-L-S8	J-L-S9	J-L-S10	J-L-S11	J-L-S12
X ₁ (新绿原酸)	0.671	0.926	0.931	0.732	0.489	-0.496	-2.576	-0.949	0.361	0.057	-0.324	0.179
X ₂ (绿原酸)	1.030	0.471	0.634	0.410	0.002	-1.346	-2.049	-0.839	-0.687	0.992	0.789	0.594
X ₃ (隐绿原酸)	1.460	0.331	0.396	0.255	0.383	-0.881	-2.338	-1.129	-0.011	0.669	0.269	0.597
X ₄ (咖啡酸)	-0.703	-0.417	1.330	1.630	1.764	-0.601	-1.092	-0.436	-0.461	-0.665	0.234	-0.582
X ₅ (峰 5)	0.442	1.925	0.082	1.279	-0.588	0.884	-0.267	0.255	-0.733	-1.192	-0.881	-1.206
X ₆ (峰 6)	0.867	1.589	0.891	0.212	0.581	0.454	-0.825	0.208	0.046	-1.695	-1.291	-1.038
X ₇ (芦丁)	0.311	1.402	-0.480	-0.956	-0.715	0.377	-0.253	-0.114	-0.949	1.285	1.548	-1.454
X ₈ (异槲皮苷)	0.663	1.220	1.222	-0.211	1.210	-0.025	-1.161	0.281	0.420	-1.402	-1.259	-0.957
X ₉ (连翘酯苷 A)	0.828	1.854	0.683	0.772	-0.139	0.679	-0.480	0.012	-0.511	-1.629	-0.880	-1.189
X ₁₀ (峰 10)	1.671	0.004	0.513	-0.064	0.905	-0.699	-2.177	-0.842	0.762	-0.207	-0.459	0.593
X ₁₁ (峰 11)	0.053	2.009	0.125	1.250	-0.384	0.629	-0.318	0.598	-0.582	-1.379	-1.262	-0.739
X ₁₂ (峰 12)	0.928	-0.556	0.639	0.332	0.264	-1.397	-1.875	-0.734	-0.533	1.216	0.818	0.897
X ₁₃ (4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸)	1.317	-0.041	0.000	-0.074	0.812	-1.149	-2.211	-0.758	0.053	0.172	0.836	1.042
X ₁₄ (连翘苷)	0.092	1.605	0.976	0.929	-0.621	0.959	0.054	0.269	-0.383	-1.429	-1.099	-1.350
X ₁₅ (峰 15)	-0.726	-0.399	-0.418	0.083	-0.636	-0.311	-0.377	-0.619	-0.542	2.282	1.885	-0.222

2.6.4 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)

将 12 批金银花-连翘药对配方颗粒色谱峰峰面积按“峰面积/取样量/60 000”处理后采用 SIMCA 14.1 软件对指纹图谱进行监督模式识别, 进行正交偏最小二乘判别分析, 结合变量重要性投影 (VIP) 筛选出能引起不同批次金银花-连翘药对配方颗粒成分差异的主要标志性成分, 以 VIP 值大于 1 为标准, 筛选出对模型分类贡献较大的 2

$0.026X_3 + 0.035X_4 + 0.149X_5 + 0.155X_6 - 0.019X_7 + 0.129X_8 + 0.158X_9 + 0.008X_{10} + 0.154X_{11} - 0.083X_{12} - 0.050X_{13} + 0.158X_{14} - 0.123X_{15}$; $F_2 = 0.169X_1 + 0.161X_2 + 0.176X_3 + 0.089X_4 + 0.003X_5 + 0.056X_6 - 0.003X_7 + 0.080X_8 + 0.034X_9 + 0.165X_{10} + 0.001X_{11} + 0.151X_{12} + 0.165X_{13} - 0.015X_{14} + 0.009X_{15}$; $F_3 = 0.024X_1 + 0.172X_2 + 0.062X_3 - 0.132X_4 + 0.214X_5 - 0.031X_6 + 0.511X_7 - 0.128X_8 + 0.123X_9 - 0.157X_{10} + 0.121X_{11} + 0.052X_{12} - 0.031X_{13} + 0.120X_{14} + 0.334X_{15}$ 。计算各批次配方颗粒主成分得分, 并绘制主成分得分图, 见图 4。结果表明, S1、S2、S3、S6 可归为一类; S4、S8、S9、S11、S12 可归为一类, S5、S7、S10 可归为一类, 与聚类分析结果基本一致。根据各主成分的方差贡献率和得分, 构建主成分综合得分函数: $F = (39.879\% \times F_1 + 36.657\% \times F_2 + 11.915\% \times F_3) / 88.451\%$, 计算各批次金银花-连翘药对配方颗粒综合得分, 见表 6。结果表明, 排名前 3 的为 J-L-S1 ~ J-L-S3, 主要是这几批样品中峰 6、峰 9 (连翘酯苷 A)、峰 14 (连翘苷) 的峰面积高于其他批次 ($P < 0.05$)。

个变量为峰 9 (连翘酯苷 A)、峰 6, 见图 5。结果与聚类分析及方差分析的结果较为吻合。

2.7 多指标含量测定

2.7.1 线性关系考察 取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品, 分别精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含新绿原酸 76.776 μg 、绿原酸 826.941 μg 、隐绿原酸 123.728 μg 、咖啡酸 49.950 μg 、4, 5-二-O-咖啡

表 4 金银花-连翘药对配方颗粒主成分因子的特征值和方差贡献率

Tab 4 Characteristic value and variance percentage of principal component factors of flos loniceræ-fructus forsythuæ formula granule			
成分	特征值	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
1	5.982	39.879	39.879
2	5.499	36.657	76.536
3	1.787	11.915	88.451

表 5 金银花-连翘药对配方颗粒主成分载荷及得分系数矩阵

Tab 5 Rotation load and score coefficient matrix table of principal component factors of flos loniceræ-fructus forsythuæ formula granule						
特征峰	载荷			得分系数		
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 1	主成分 2	主成分 3
X ₁	0.225	0.932	0.042	0.038	0.169	0.024
X ₂	-0.265	0.887	0.307	-0.044	0.161	0.172
X ₃	-0.156	0.966	0.110	-0.026	0.176	0.062
X ₄	0.209	0.488	-0.236	0.035	0.089	-0.132
X ₅	0.893	0.015	0.382	0.149	0.003	0.214
X ₆	0.928	0.306	-0.056	0.155	0.056	-0.031
X ₇	-0.112	-0.018	0.913	-0.019	-0.003	0.511
X ₈	0.773	0.440	-0.229	0.129	0.080	-0.128
X ₉	0.946	0.188	0.220	0.158	0.034	0.123
X ₁₀	0.047	0.910	-0.280	0.008	0.165	-0.157
X ₁₁	0.924	0.007	0.216	0.154	0.001	0.121
X ₁₂	-0.495	0.828	0.092	-0.083	0.151	0.052
X ₁₃	-0.298	0.909	-0.056	-0.050	0.165	-0.031
X ₁₄	0.947	-0.080	0.215	0.158	-0.015	0.120
X ₁₅	-0.739	0.050	0.597	-0.123	0.009	0.334

表 6 金银花-连翘药对配方颗粒主成分因子综合得分及排名

Tab 6 Principal component factor score and ranking of the flos loniceræ-fructus forsythuæ formula granule					
编号	F1	F2	F3	F	排名
J-L-S1	0.311	1.229	0.140	0.668	2
J-L-S2	1.608	0.389	1.604	1.102	1
J-L-S3	0.645	0.783	-0.402	0.561	3
J-L-S4	0.701	0.423	0.109	0.506	4
J-L-S5	0.086	0.758	-1.365	0.169	5
J-L-S6	0.796	-0.993	0.395	0.000	6
J-L-S7	-0.119	-2.441	-0.332	-1.110	12
J-L-S8	0.428	-0.881	-0.209	-0.200	7
J-L-S9	-0.118	-0.019	-1.256	-0.230	8
J-L-S10	-1.815	0.177	1.248	-0.577	11
J-L-S11	-1.421	0.148	1.243	-0.412	9
J-L-S12	-1.101	0.427	-1.177	-0.478	10

酰奎宁酸 156.059 μg 的混合对照品溶液。另分别取连翘酯苷 A、连翘苷对照品，分别精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含连翘酯苷 A 1058.585 μg 、连翘苷 228.424 μg 的混合对照品溶液。精密吸取

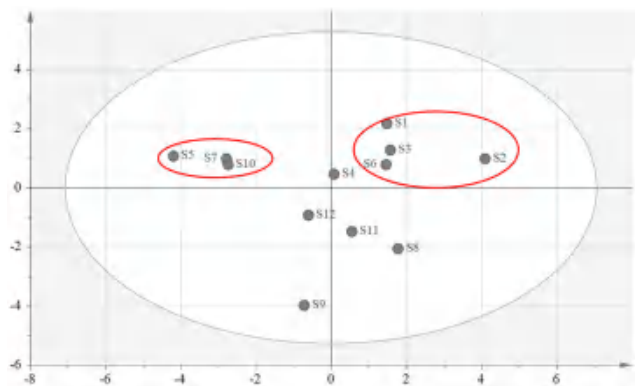


图 4 12 批金银花-连翘药对配方颗粒主成分分析得分图
Fig 4 Score plot of fingerprint of flos loniceræ-fructus forsythuæ formula granule

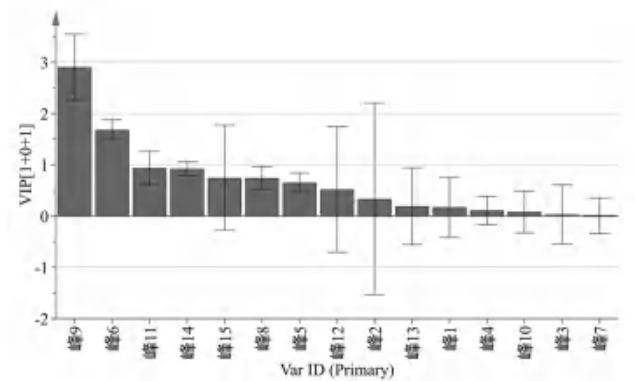


图 5 12 批金银花-连翘药对配方颗粒 OPLS-DA 模型 VIP 值
Fig 5 VIP value of OPLS-DA model of 12 batches of flos loniceræ-fructus forsythuæ formula granules

上述混合对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mL 分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，即得系列浓度的混合对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录峰面积。以对照品溶液质量浓度 (X) 为横坐标，峰面积 (Y) 为纵坐标，绘制标准曲线，得线性回归方程，结果见表 7。

2.7.2 精密度试验 精密吸取金银花-连翘药对配方颗粒供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的峰面积，计算各峰面积 RSD 值分别为 0.70%、0.43%、0.43%、1.1%、0.34%、0.59%、0.43%，表明仪器精密度良好。

2.7.3 稳定性试验 取金银花-连翘药对配方颗粒供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 进样，记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的峰面积，计算各峰面积 RSD 值分别为 3.0%、2.8%、3.0%、4.5%、3.3%、3.0%、

表 7 各成分线性关系考察结果
Tab 7 Linearity of each component

组分	回归方程	<i>r</i>	范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
新绿原酸	$Y = 1.052 \times 10^4 X - 2.951 \times 10^3$	0.9999	3.071 ~ 76.776
绿原酸	$Y = 1.323 \times 10^4 X - 2.581 \times 10^4$	0.9999	33.078 ~ 826.941
隐绿原酸	$Y = 1.108 \times 10^4 X - 5.035 \times 10^3$	0.9999	4.949 ~ 123.728
咖啡酸	$Y = 4.049 \times 10^4 X - 3.207 \times 10^3$	0.9999	1.998 ~ 49.950
连翘酯苷 A	$Y = 9.442 \times 10^3 X + 3.264 \times 10^4$	0.9999	42.343 ~ 1058.585
4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸	$Y = 2.523 \times 10^4 X - 4.686 \times 10^3$	0.9999	6.242 ~ 156.059
连翘苷	$Y = 8.075 \times 10^3 X + 1.261 \times 10^4$	0.9999	9.137 ~ 228.424

3.2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.4 重复性试验 取金银花-连翘药对配方颗粒供试品 6 份，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件进行测定，分别记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的峰面积，计算其含量并计算 *RSD* 值分别为 0.35%、0.66%、0.78%、0.68%、1.1%、1.9%、0.55%，说明该方法重复性良好。

2.7.5 加样回收试验 取金银花-连翘药对配方颗粒供试品 6 份，每份约 0.1 g，精密称定，按供试品中指标成分量与加入对照品量之比 1:1 原则，分别加入适量的对照品溶液，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件进样测定，测定供试品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、4, 5-二-O-咖啡酰奎

宁酸、连翘苷的含量，计算得平均回收率分别为 101.15%、93.33%、92.16%、106.04%、99.16%、102.85%、101.60%，*RSD* 值分别为 1.3%、1.2%、0.95%、0.32%、0.91%、2.8%、1.5%，表明该方法回收率良好。

2.7.6 样品测定 分别取 12 批金银花-连翘药对配方颗粒供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算各成分含量，结果见表 8。12 批金银花-连翘药对配方颗粒中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A、4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的含量分别为 0.144% ~ 0.188%、2.088% ~ 2.801%、0.238% ~ 0.329%、0.036% ~ 0.051%、3.527% ~ 6.076%、0.385% ~ 0.520%、0.300% ~ 0.696%，批次间各指标成分含量存在一定的差异，但整体含量较稳定。

表 8 12 批金银花-连翘药对配方颗粒中 7 种成分的含量测定结果 (%)
Tab 8 Content of 7 components in 12 batches of flos lonicerae-fructus forsythuae formula granules (%)

编号	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	连翘酯苷 A	4, 5-二-O-咖啡酰奎宁酸	连翘苷
J-L-S1	0.183	2.582	0.317	0.042	5.517	0.468	0.515
J-L-S2	0.182	2.352	0.270	0.042	6.076	0.394	0.696
J-L-S3	0.177	2.328	0.265	0.046	5.023	0.385	0.598
J-L-S4	0.180	2.294	0.280	0.051	4.731	0.443	0.417
J-L-S5	0.166	2.495	0.281	0.037	3.527	0.417	0.300
J-L-S6	0.176	2.291	0.261	0.048	5.119	0.393	0.593
J-L-S7	0.162	2.500	0.275	0.040	4.138	0.454	0.351
J-L-S8	0.164	2.088	0.257	0.036	5.597	0.387	0.686
J-L-S9	0.144	2.198	0.238	0.038	5.527	0.397	0.654
J-L-S10	0.187	2.801	0.329	0.044	4.330	0.520	0.370
J-L-S11	0.167	2.389	0.265	0.043	5.474	0.434	0.629
J-L-S12	0.188	2.339	0.299	0.046	4.750	0.454	0.504

3 讨论

根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》中“标准汤剂的制备”项下有关建议，在充分研究古今文献的基础上，考虑中药药性、药用部位、质地等因素，并参照国家中医药管理局《医疗机构中药煎药室管理规范》中给出的前处理、煎煮次数、水量、时间等相关参数，根据不

同的饮片确定加水量，以浸过药面 2 ~ 5 cm 为宜，花、草类应酌量加水；根据药性及功能主治，解表类、清热类药物不宜久煎，煮沸后煎煮 20 min 为宜，第二煎适当缩短时间。金银花、连翘均属清热类药，且金银花为花类，体积较蓬松，故制备颗粒剂时一煎加入饮片量 12 倍量水，煎煮 20 min；二煎加入 10 倍量水，煎煮 15 min。

本试验分别考察了提取溶剂(甲醇、乙醇、50% 甲醇、50% 乙醇、70% 甲醇、70% 乙醇)、提取方式(回流、超声)、提取时间(15 min、30 min、45 min)对色谱峰的峰形及峰面积的影响,结果表明 50% 甲醇超声提取 30 min 时效果整体较佳。通过对流动相(乙腈-0.05% 甲酸水溶液、甲醇-0.05% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液)、检测波长(260、280、300、330、350 nm)、流速(0.7、0.8、0.9、1.0 mL·min⁻¹)、色谱柱(Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱、Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱)进行考察,结果显示,采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱色谱柱,以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长为 280 nm 时,各色谱峰分离度较好,特征峰响应值较高,基线较平稳。

目前很多研究认为,与单味中药配方颗粒单煎合用相比,群药合煎可促进不同药物间物质成分的化学反应达到增效或减毒的作用^[20-21]。因此单煎配方颗粒与合煎传统汤剂的物质基础的一致性和等效性是大众比较关心的问题。然而,中药方剂数以万计,要一一做到与配方颗粒的等效性研究不太现实。药对是经过历代医家反复实践提炼,符合中医药对七情配伍理论,临床发挥协同、持制或新生功用,且已形成相对固定形式,经常联用的两味药物。与经典方剂相比,药对也符合中医配伍理论,同时仅有两味药,大大降低了多种药物复杂化学成分的干扰,可以实现以点带面的降维研究。酚酸类成分是金银花重要的药效物质基础,连翘酯苷 A、连翘苷是连翘的主要抗菌、抗炎成分,本研究建立的测定方法,既可以实现金银花-连翘药对配方颗粒 HPLC 指纹图谱的测定,又可以实现金银花中主要酚酸类成分、连翘中连翘酯苷 A 和连翘苷成分的含量测定,可为金银花-连翘药对的化学成分研究奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 177-178, 230-232.
- [2] 徐杰,陈丹燕,黄梦婷,等.麻黄-桂枝药对配方颗粒指纹图谱建立及指标成分含量测定研究[J].中药材, 2021, 44(8): 1930-1934.
- [3] 黄瑶,徐杰,刘佩仪,等.正交试验结合熵权 TOPSIS 优选麻黄-桂枝药对水提工艺[J].中国现代中药, 2022, 24(7): 1341-1346.
- [4] 鲁云,刘佩仪,徐杰,等.不同配伍比例麻黄-桂枝药对单煎与合煎化学成分对比分析[J].现代中药研究与实践, 2021, 35(6): 40-44.
- [5] 黄大利.相须药对石膏-知母配方颗粒剂、配伍颗粒剂及传统汤剂的制备工艺和药效学比较研究[D].南宁:广西中医药大学, 2019.
- [6] 谭朝丹,楼冰,顾伟鹰,等.不同比例黄连-吴茱萸配方颗粒/单/合煎对比分析[J].中国医院药学杂志, 2020, 40(21): 2238-2242, 2250.
- [7] 李磊,花丽,王文龙.当归川芎药对配方颗粒挥发性成分工艺过程转移率分析[J].化工与医药工程, 2019, 40(5): 21-24.
- [8] 丁晓彦,林志军,王岱.金银花-连翘药对的成分和药理作用研究进展[J].山东科学, 2019, 32(3): 36-41.
- [9] 鲍学梅,乔金为,左亚峰.金银花化学成分的研究[J].中成药, 2022, 44(5): 1501-1505.
- [10] 肖蕾,包正雪,郁阳,等.金银花化学成分及抗菌消炎活性研究[J].中南药学, 2022, 20(8): 1773-1780.
- [11] 熊乐文,金莹,王彦予,等.金银花酚酸类化学成分、药理活性及体内代谢研究进展[J].中成药, 2022, 44(3): 864-871.
- [12] 胡静,马琳,张坚,等.连翘的研究进展[J].中南药学, 2012, 10(10): 760-764.
- [13] 卫倩,李萍,吴桐,等.连翘中苯乙醇苷类成分的研究进展[J].中国临床药理学杂志, 2018, 34(20): 2481-2485.
- [14] 林星,李俊峰,车楠,等.连翘酯苷 A 通过 p38 MAPK/NF-κB 信号抑制哮喘气道炎症[J].中国免疫学杂志, 2019, 35(24): 2971-2974, 2979.
- [15] 董哲.基于微波辅助 DES 提取连翘酯苷 A 及其活性研究[D].太原:山西大学, 2019.
- [16] 谢雪艳,魏玉好,李天珍,等.连翘苷对脂多糖介导乳腺上皮细胞分泌炎症因子的影响[J].中南药学, 2018, 16(10): 1379-1383.
- [17] 魏晋宝,杨光义,陈欢,等.连翘苷的提取方法、药理毒理及药动学研究进展[J].中国药师, 2015, 18(12): 2144-2148.
- [18] 刘天亮,杨林林,董诚明,等.金银花不同采收期指纹图谱及成分变化情况研究[J].中药材, 2021, 44(10): 2358-2362.
- [19] 赵艳,雷振宏,王栋,等.青翘适宜采收期的研究[J].现代农业科技, 2019(8): 54-56.
- [20] 李吉峰,王淑荣.柴胡疏肝散单煎混合液和合煎液指纹图谱及有效成分变化分析[J].医药导报, 2014, 33(3): 392-384.
- [21] 崔景朝,赵自明.中药配方颗粒研究进展(II): 中药单煎与合煎对比研究概况[J].中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 240-245.

(收稿日期: 2022-09-20; 修回日期: 2022-11-05)

非抑制型离子色谱法测碳酸镧和碳酸镧咀嚼片中镧的含量

张蕊^{1, 2}, 李耕², 于青^{2*}, 陈民辉^{2*}, 严菲² (1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019)

摘要: **目的** 建立非抑制型离子色谱法测定碳酸镧和碳酸镧咀嚼片中镧的含量。**方法** 采用离子色谱法, 色谱柱为 Thermo Dionex IonPac SCS1 (4 mm×250 mm) 交换柱和 Dionex IonPac SCG1 (4 mm×50 mm) 保护柱, 检测器为非抑制电导检测器, 电导检测池温度为 35℃, 柱温为 30℃, 进样量为 25 μL, 淋洗液为 6 mmol·L⁻¹ 硝酸 HNO₃ 溶液, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。**结果** 镧在 10~80 μg·mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好, 相关系数为 0.9994, 检测限为 0.15 μg·mL⁻¹, 定量限为 0.5 μg·mL⁻¹, 方法精密度好, 溶液室温 24 h 内稳定。回收率在 99.0%~100.0%, RSD 小于 1.6%。**结论** 本方法测定碳酸镧咀嚼片及其原料药中镧的含量, 专属性强, 结果准确可靠。

关键词: 碳酸镧; 离子色谱法; 非抑制电导检测器; 含量测定

中图分类号: R927, R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)06-1621-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.033

Determination of lanthanum in lanthanum carbonate and lanthanum carbonate chewable tablets by non-suppressive conductance detection ion chromatography

ZHANG Rui^{1, 2}, LI Geng², YU Qing^{2*}, CHEN Min-hui^{2*}, YAN Fei² (1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029; 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019)

Abstract: Objective To determine the content of lanthanum in lanthanum carbonate and lanthanum carbonate chewable tablets by non-suppressive conductance detection ion chromatography (IC) method. **Methods** The determination was performed on Thermo Dionex IonPac SCS1 (4 mm×250 mm) anion chromatography column and Dionex IonPac SCG1 (4 mm×50 mm) guard column. The non-suppressive conductance detector was used. The detection tank temperature was 35℃; the column temperature was 30℃; and the injection volume was 25 μL. HNO₃ solution (6 mmol·L⁻¹) was used as the isocratic elution and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Results** Lanthanum showed good linearity at 10~80 μg·mL⁻¹, the correlation coefficient was 0.9994, the detection limit was 0.15 μg·mL⁻¹ (S/N = 3), and the quantification limit was 0.5 μg·mL⁻¹ (S/N = 10). The precision was good, and the solution was stable for 24 h at room temperature. The recovery was 99.0%~100.0%, and the RSD lower than 1.6% (n = 3). **Conclusion** The method to determine the content of lanthanum in lanthanum carbonate and lanthanum carbonate chewable tablets is sensitive and reproducible.

Key words: lanthanum carbonate; ion chromatography; non-suppressive conductance detector; content determination

作者简介: 张蕊, 女, 硕士研究生, 主要从事化学药品质量控制研究, email: 1506402399@qq.com ***通信作者:** 于青, 女, 主管药师, 主要从事化学药品质量控制研究, email: 279895272@qq.com; 陈民辉, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事化学药品质量控制研究, email: 18912966990@189.cn

碳酸镧咀嚼片是一种不含铝和钙的磷结合剂,用于治疗肾衰患者的高磷血症^[1]。碳酸镧咀嚼片通过解离镧离子与磷酸盐结合,形成不溶且不吸收的镧-磷酸盐复合物,随粪便排出,降低磷的消化道吸收,继而控制血浆中的磷浓度^[2]。碳酸镧咀嚼片进口注册标准 JX20090602 关于其含量测定采用的方法为滴定法,利用乙二胺醋酸钠为滴定液,进行配位滴定,该方法操作烦琐、干扰多^[3]。已报道的关于碳酸镧和碳酸镧咀嚼片中镧的测定方法有分光光度法^[4]和离子色谱法^[5],前者方法经显色处理后测定,操作烦琐,耐用性差;后者出峰时间过早,峰拖尾严重,专属性、精密度较差。

电导检测器是离子色谱法中最常用的检测器,具有抑制型电导检测和非抑制型电导检测两种模式。非抑制型电导检测即不用抑制器,洗脱液直接进入电导检测,通过使用低交换容量的色谱柱和低浓度弱酸或弱酸盐为淋洗液降低背景值,该方法简单且易于操作,适合分析碱金属、碱土金属、稀土金属和有机胺等^[6-7]。镧元素属于稀土元素,会在抑制型电导检测系统中生成沉淀,损害检测器,因此本文拟采取非抑制型离子色谱法对碳酸镧和制剂中的镧离子进行测定。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Dionex ICS-6000 型离子色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);XS205 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);Milli-Q 超纯水仪(Millipore 公司)。

1.2 试药

镧单元素标准溶液(国家有色金属及电子材料分析测试中心,10.00 mg·mL⁻¹,批号:GNM-SLA-001-2013);碳酸镧原料药(企业 A,批号:143200801、143200802、143200803,纯度>99%);碳酸镧咀嚼片(企业 A,批号:210101、210102、210103,规格:500 mg);硝酸为优级纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Dionex IonPac SCS1(4 mm×250 mm);保护柱:Dionex IonPac SCG1(4 mm×50 mm);检测器:电导检测器,电导检测池温度:35℃;淋洗液:6 mmol·L⁻¹HNO₃;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30℃;分析时间:15 min;进样量:25 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密量取镧单元素标准溶液(10.00 mg·mL⁻¹) 5.00 mL,置 100 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,得对照品储备液。精密量取对照品储备液 2.00 mL,置 25 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2.2 原料药供试品溶液的制备 取原料药(约相当于镧 10 mg),精密称定,置于 250 mL 量瓶中,加水至 2/3 体积,加 2 mmol·L⁻¹HNO₃ 1.0 mL,溶解得澄清溶液,用水稀释至刻度,摇匀,得原料药供试品溶液。

2.2.3 制剂供试品溶液的制备 取碳酸镧咀嚼片 20 片,精密称定,研细,取细粉(约相当于镧 10 mg),精密称定,置于 250 mL 量瓶中,加水至 2/3 体积,加 2 mmol·L⁻¹HNO₃ 1.0 mL,超声使其分散均匀,用水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液为制剂供试品溶液。

2.2.4 阴性样品溶液 称取处方量的空白辅料,按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密量取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 25 μL,进样测定,记录色谱图,见图 1。结果在该色谱条件下,理论板数按镧离子峰计为 5247,保留时间为 10.4 min;其他成分在镧离子峰的保留时间处无色谱峰出现,目标峰与相邻峰分离度大于 2.0,表明本方法满足检测的需要。

2.3.2 线性关系考察 取对照品储备液适量,用水定量稀释制成质量浓度分别为 10、20、30、40、50、60 和 80 μg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液,进样测定,记录峰面积。以镧离子质量浓度(x , μg·mL⁻¹)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得镧离子回归方程为 $y = 0.142x + 0.031$ ($r = 0.9994$)。结果表明,镧离子质量浓度在 10~80 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。

2.3.3 检测限和定量限 取对照品溶液适量,倍比稀释,注入离子色谱仪,记录离子色谱图。按信噪比 10:1 确定定量限,信噪比为 3:1 确定检测限。结果镧离子定量限为 0.50 μg·mL⁻¹,检测限为 0.15 μg·mL⁻¹。

2.3.4 进样精密度试验 取对照品溶液连续进样 6 次,镧离子峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.09%、0.27%,表明仪器进样精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取制剂供试品溶液,室温放

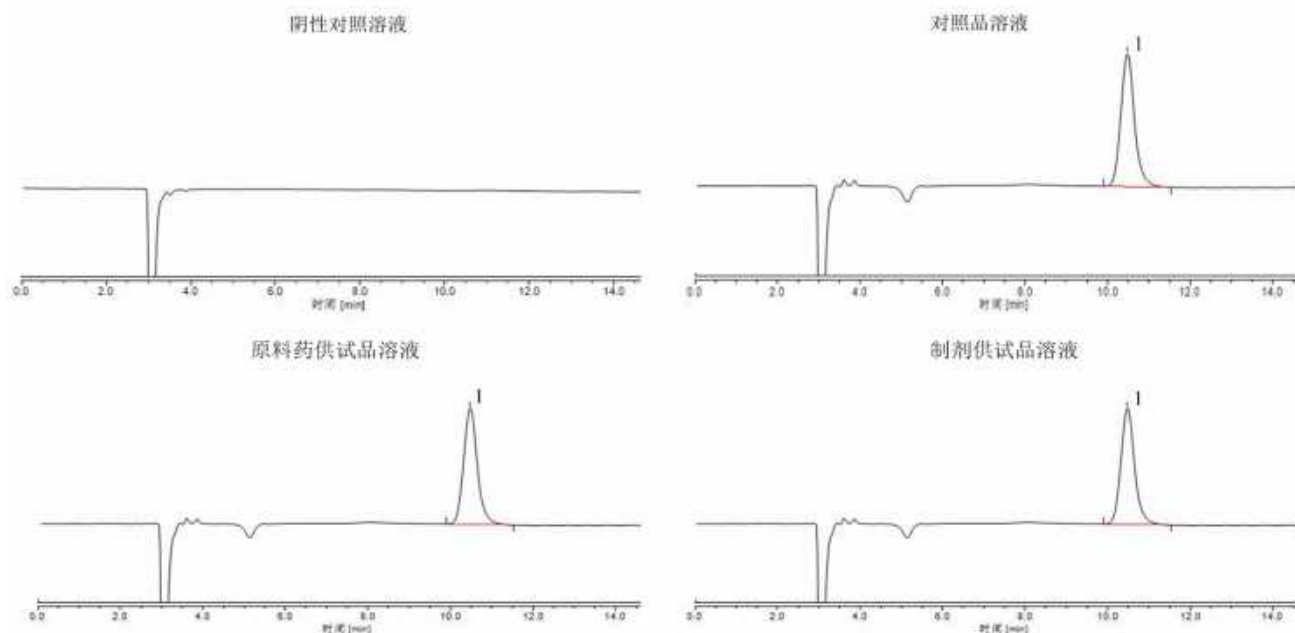


图1 镧测定的离子色谱图

Fig 1 Ion chromatograms of lanthanum

1. 镧 (lanthanum)

置, 分别在 0、4、8、24 h 测定, 镧离子峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 分别为 0.02%、0.29%, 表明溶液稳定性良好。

2.3.6 回收试验 取处方量的空白辅料和镧单元素标准溶液适量, 按“2.2.3”项下方法操作, 制成含限度浓度 80%、100%、120% 的加标供试品溶液, 平行制备 3 份。取上述系列待测溶液适量, 进样测定, 记录峰面积并计算回收率, 结果 3 个浓度回收率分别为 100.00%、99.5%、99.0%, *RSD* 分别为 1.6%、0.80%、0.40%。

2.4 样品测定

取 3 批碳酸镧原料药和 3 批碳酸镧咀嚼片, 分别采用本法和进口注册标准项下含量测定方法 (滴定法), 测定镧的含量, 每批制备 2 份, 每份测定 2 次, 取平均值, 结果见表 1。测定结果显示, 本方法与滴定法测定结果基本一致。

表 1 样品含量测定结果

Tab 1 Sample content

样品	批号	镧含量 /%	
		滴定法	离子色谱法
原料药	143200801	60.6	60.1
	143200802	60.6	60.1
	143200803	60.6	59.9
制剂	210101	99.2	98.4
	210102	99.7	99.5
	210103	99.1	99.1

3 讨论

3.1 样品基体氢离子浓度对镧离子的影响

在方法开发过程中, 发现加入过量的酸, 峰面积和峰形会发生改变, 因此考察基体酸度对镧离子检测的影响。精密称定碳酸镧原料药, 加入化学应当量的硝酸, 配制含镧离子约 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 精密量取储备液 1.0 mL 置于 100 mL 量瓶, 加入不同量的 1% 的硝酸, 用水稀释定容, 制得镧离子浓度相同、酸度不同的系列溶液。

样品基体酸度影响镧离子的保留, 主要表现为对峰形和理论塔板数的影响, 结果见图 2 和 3。基体酸浓度的影响主要分为 3 个阶段: 基体酸浓度小于 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 理论塔板数高、峰形最佳; 基体酸浓度在 $5 \sim 12.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 理论塔板数下降, 峰形略有展宽; 基体酸浓度超过 $12.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 峰分叉。基体酸度在 $0 \sim 12.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 峰面积几乎不发生变化。因此, 基体酸浓度小于 $12.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 合适, 小于 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 最佳; 结合镧单元素标准溶液稀释倍数, 镧离子峰面积, 本方法选择镧离子 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为测量浓度。

造成这种现象的主要原因是 Thermo Dionex IonPac SCS1 色谱柱适用淋洗液 pH 范围为 2 ~ 7, 基体酸的浓度超过其适用范围, 使其结构受到破坏^[8], 从而影响镧离子的分离和检测。

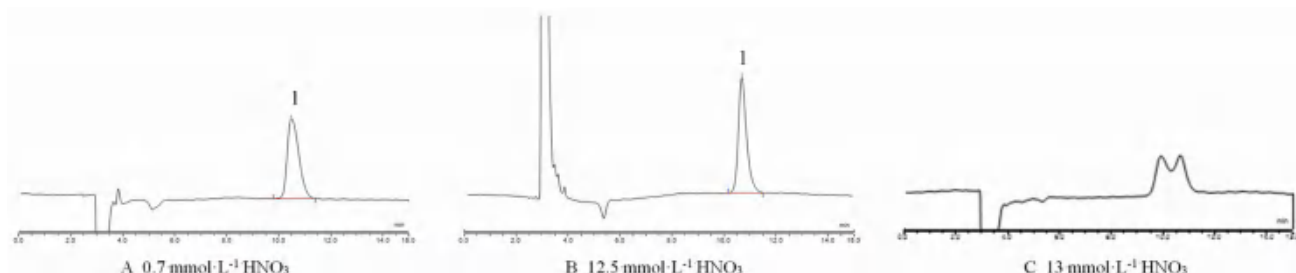


图2 不同酸浓度下的镧离子色谱图

Fig 2 Ion chromatograms of lanthanum at different acid concentrations

1. 镧 (lanthanum)

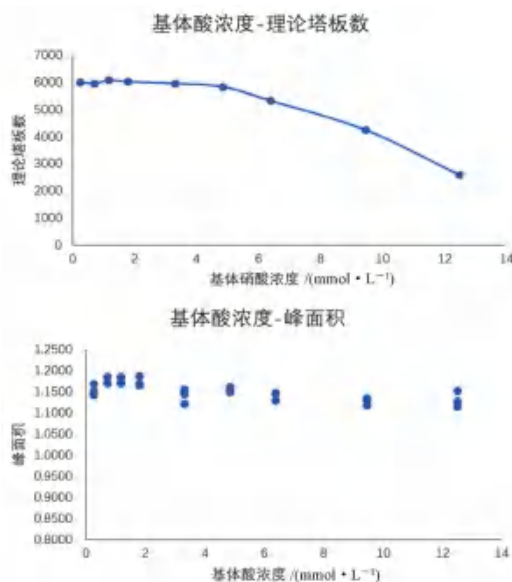


图3 理论塔板数和峰面积随酸浓度变化图

Fig 3 Theoretical plate number and the peak area changes with acid concentration

3.2 色谱条件的选择

镧离子在中性条件下易水解,生成氢氧化镧沉淀^[9],在非抑制电导检测器中稳定且响应高,因此本法选择非抑制电导检测器。本研究考查了甲磺酸、硝酸、柠檬酸淋洗液^[10],其中柠檬酸淋洗液中镧离子没有保留,可能是因为镧离子与柠檬酸发生了络合^[11];甲磺酸淋洗液中,镧离子出峰时间过长且基线不平;硝酸淋洗液中镧离子出峰快、基线平稳,因此本文选择了硝酸作为淋洗液。

本文考察了不同淋洗液浓度(4、6、8 mmol·L⁻¹)、流速(0.8、1.0、1.2 mL·min⁻¹)及柱温(25、30、35℃)条件下镧离子出峰情况^[12],结果表明当淋洗液浓度为6 mmol·L⁻¹,流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为30℃时,镧的保留时间短、峰形良好、基线平稳,为最优条件。

试验结果表明本法相较于现行法定标准操作简便,专属性强,灵敏度高,重复性好,结果准确可靠,可为碳酸镧咀嚼片质量标准中镧含量测

定提供科学参考,也为碳酸镧咀嚼片溶出度试验、溶出曲线试验、体外磷结合试验中关于镧的分析提供参考^[13-14]。

参考文献

- [1] 吴攀,舒亚民,何绪成,等.基于FAERS数据库的司维拉姆和碳酸镧不良事件信号挖掘研究[J].中南药学,2022,20(2):435-440.
- [2] 江艳,黄珍伦,聂凌.碳酸镧治疗尿毒症维持性血液透析患者高磷血症的临床观察[J].中国药房,2017,28(20):2787-2789.
- [3] 鹿麟,贺建华,徐桂连,等.碳酸锂(缓释)片含量测定方法探讨[J].中国药品标准,2016,17(3):167-169.
- [4] 吴桐,吴俊业.分光光度法测定碳酸镧咀嚼片中镧含量[J].黑龙江医药,2009,22(2):126-127.
- [5] 郇志茹,温弘,王娟.一种碳酸镧制剂中的镧含量的测定方法:CN113311100A[P].2021-08-27.
- [6] 林立,孙海波,梁立娜,等.离子色谱法测定复方氨基酸注射液中钠、钾、镁和钙的含量[J/OL].分析试验室,2022. doi.org/10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2022.041104.
- [7] 周旭,王金平,崔成来,等.非抑制离子色谱法测定炼油厂脱硫液中N-甲基二乙醇胺[J].石油炼制与化工,2011,42(6):88-92.
- [8] Riviello JM. Water, electricity and ion exchange; how Hamish small sustained the evolution of ion chromatography[J]. Heliyon, 2021, 7(7): e07495.
- [9] 牟世芬,刘克纳,朱岩.离子色谱方法及应用[M].3版.北京:化学工业出版社,2018:84-89.
- [10] 于泓,白雪峰,郑德敏.非抑制型电导检测离子交换色谱法的淋洗液[J].色谱,1999,17(6):539-543.
- [11] 乔军,高婷,侯睿恩,等.晶型柠檬酸镧的制备工艺及表征[J].稀土,2018,39(6):129-135.
- [12] 储韞婧,邵方娴,陈民辉,等.离子色谱法测定盐酸二甲双胍药物中二甲胺的含量[J].中南药学,2022,20(5):1162-1166.
- [13] 张丹,马婧怡,李敏,等.碳酸镧咀嚼片体外磷结合试验的一般考虑[J].中国新药杂志,2021,30(2):110-113.
- [14] 宋更申,石红燕,郑红兵,等.一种碳酸镧咀嚼片溶出曲线的测定方法:CN110108832A[P].2019-08-09.

(收稿日期:2023-01-27;修回日期:2023-03-29)

“蒂达”类藏药川西獐牙菜 HPLC 指纹图谱研究

杨增亮¹, 刘学良², 苏媛¹, 李维业¹, 刘安平¹, 王开祥¹, 刘海青^{2*}, 鲁尚静³, 刘文平³ (1. 西宁市食品药品检验检测中心, 西宁 810007; 2. 青海省药品审评核查中心, 西宁 810007; 3. 青海三普药业有限公司, 西宁 810007)

摘要: **目的** 建立“蒂达”类藏药川西獐牙菜的 HPLC 指纹图谱, 并结合化学计量学分析进行常用“蒂达”类藏药川西獐牙菜药材的质量分析。**方法** 采用 Waters SunFire C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (含 0.05% 磷酸) 为流动相, 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30℃。对不同来源和不同批次的川西獐牙菜进行指纹图谱测定, 并通过化学计量学系统解决方案软件 (ChemPattern 2017 版) 对结果进行处理分析。**结果** 14 批次川西獐牙菜药材与生成对照指纹图谱的相似度在 0.923 ~ 1.000, 具有较好的一致性。标定了 22 个共有峰, 并对其中 9 个峰进行了指认, 分别为马钱苷酸、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、芒果苷、异荭草素、当药醇苷、1, 8-二羟基-3, 7-二甲氧基呋喃酮、8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖-1, 3, 5-三羟基呋喃酮。主成分分析提取出 3 个主成分进行综合评价, 可以反映样品数据中的绝大部分信息。聚类分析将样品分为 2 类, 采集于青海地区的样品 S01、S02、S04 ~ S13 聚为一组, 采集于四川、西藏地区的样品 S03、S14 聚为一组。**结论** 该方法科学、准确且简便易行, 方法精密度、稳定性和重复性良好, 专属性强, 可以作为常用“蒂达”类藏药川西獐牙菜的质量控制方法。

关键词: 川西獐牙菜; HPLC 指纹图谱; 质量控制; 化学计量学分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1625-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.034

Fingerprints of commonly used “Dida” Tibetan medicine *Swertia mussotii* Franch by HPLC

YANG Zeng-liang¹, LIU Xue-liang², SU Yuan¹, LI Wei-ye¹, LIU An-ping¹, WANG Kai-xiang¹, LIU Hai-qing^{2*}, LU Shang-jing³, LIU Wen-ping³ (1. *Xining Center for Food and Drug Inspection & Testing, Xining 810007*; 2. *Qinghai Drug Evaluation and Verification Center, Xining 810007*; 3. *Qinghai Sanpu Pharmaceutical Co., Ltd., Xining 810007*)

Abstract: Objective To establish the chromatographic fingerprints of commonly used “Dida” Tibetan medicine swertia in *Swertia mussotii* Franch by HPLC and analyze its quality with chemometrics. **Methods** Waters SunFire C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with methanol-0.05% phosphoric acid solution as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ with gradient elution. The detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 30℃. The fingerprints of *Swertia mussotii* Franch from different sources and batches were determined, the results were analyzed through chemometrics system solution software (ChemPattern 2017). **Results** The similarity between the 14 batches of *Swertia mussotii* Franch and the generated reference fingerprint was 0.923 ~ 1.000 with good consistency. Totally 22 common peaks were calibrated and 9 of them were identified as loganin acid, swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, mangiferin, isoorientin, swertianolin, 1, 8-dihydroxy-3, 7-dimethoxy-xanthone, and 8-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-1, 3, 5-trihydroxy-xanthone. Principal component analysis was used to extract three principal components

基金项目: 青海省基础研究项目 (No. 2020-ZJ-747)。

作者简介: 杨增亮, 男, 主管技师, 主要从事食品药品检验检测及研究工作, email: 598784825@qq.com *通信作者: 刘海青, 男, 主任药师, 主要从事中藏药研究工作, email: QHDC1958@aliyun.com

for comprehensive evaluation, which reflected most information in the sample data. Cluster analysis divided the samples into two categories. Among the 14 batches of samples, S01, S02, and S04 ~ S13 collected in Qinghai belonged to one group, while S03 and S14 collected in Sichuan and Tibet were another group. **Conclusion** The method is scientific, accurate and easy to operate with good precision, stability, repeatability and specificity, which can be used for the quality control of commonly used “Dida” Tibetan medicine *Swertia mussotii* Franch.

Key words: *Swertia mussotii* Franch; HPLC fingerprint; quality control; chemometric analysis

川西獐牙菜 (*Swertia mussotii* Franch) 为龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜属 (*Swertia* L.) 一年生草本植物, 主要分布在青海、四川、西藏和云南等地, 藏药名“蒂达”, 民间俗称“藏茵陈”, 以干燥的全草入药, 为我国藏族民间常用药^[1-2], 已被卫生部《药品标准·藏药》(WS3-BC-0006-95) 收载。本品性凉味苦, 具有保肝利胆、清热解毒、除湿、抑菌、抗肿瘤等功效, 可治疗消化不良、黄疸型肝炎、病毒性肝炎、血病以及其他肝胆系统疾病等^[3-5]。其主要化学成分有獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷等环醚萜类; 芒果苷、当药醇苷等呋喃类以及异荭草素等黄酮类^[6-10]。

近年来, 川西獐牙菜有关化学成分、药理作用、临床应用以及提取物研究等方面的报道较多^[11-18], 但对其质量控制方面的研究较少, 川西獐牙菜化学成分比较复杂, 单一成分的确认很难有效控制药材的质量。指纹图谱技术可以较全面地反映多种成分在天然药物中的分布。本文通过对川西獐牙菜提取物的高效液相色谱分析, 建立了川西獐牙菜的 HPLC 指纹图谱, 并通过化学计量学对川西獐牙菜药材进行相似度、聚类分析和主成分等评价分析, 为进一步完善川西獐牙菜质量评价体系提供了客观、科学的依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters2695 型高效液相色谱仪, Waters 2998 PDA detector 型二极管阵列检测器, Waters 2695 型 Empower 化学工作站 (美国沃特世有限公司); XS105DU 梅特勒-托利多专业型 XS 分析天平 (感量 0.01 mg, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); SB25-12DT 新芝超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Milli-Q2355 超纯水机 (美国密理博有限公司)。

1.2 试药

对照品马钱苷酸 (批号: 111865-202005, 纯度: 97.5%)、獐芽菜苦苷 (批号: 110785-201404, 纯度: 98.3%)、龙胆苦苷 (批号: 110770-201918, 纯度: 97.1%)、芒果苷 (批号: 111607-201704, 纯

度: 98.1%)、异荭草素 (批号: 111974-201401, 纯度: 94.0%)、当药苷 (批号: 111742-200501, 纯度: 99.27%) (中国食品药品检定研究院); 当药醇苷 (批号: 19041505, 纯度: 99.27%, 成都普菲德生物技术有限公司); 1, 8-二羟基-3, 7-二甲氧基呋喃 (纯度: 96.5%)、8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-1, 3, 5-三羟基呋喃 (纯度: 96.3%) (中科院西北高原生物研究所)。甲醇、磷酸均为色谱纯, 其他试剂为市售分析纯; 水为超纯水。14 批样品信息详见表 1, 经青海省药品审评核查中心刘海青主任药师鉴定为龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜属 (*Swertia* L.) 植物川西獐牙菜的干燥全草。

表 1 样品信息

Tab 1 Information of sample

编号	来源	采集时间	供样单位
S01	青海玉树州	2020-09	青海大学医学院
S02	青海玉树州	2020-09	青海大学医学院
S03	四川阿坝州	2020-08	四川省成都市荷花池药材专业市场
S04	青海海西州	2020-07	青海晶珠藏药高科技有限公司
S05	青海玉树州	2020-09	青海大学医学院
S06	青海海西州	2020-09	青海海西州蒙藏医院
S07	青海玉树州	2020-08	青海玉树州称多县藏医院
S08	青海玉树州	2021-09	青海玉树州藏医院
S09	青海果洛州	2021-07	青海琦鹰汉藏生物制药股份有限公司
S10	青海玉树州	2021-07	青海玉树州治多县藏医院
S11	青海玉树州	2021-09	青海海南州同德县藏医院
S12	青海玉树州	2021-09	青海玉树州囊谦县藏医院
S13	青海玉树州	2021-08	自采
S14	西藏昌都市	2021-09	自采

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

Waters SunFire C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇 (A) -0.05% 磷酸 (B) 溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 7 min, 10% ~ 20%A; 7 ~ 15 min, 20% ~ 35%A; 15 ~ 30 min, 35% ~ 55%A; 30 ~ 40 min, 55% ~ 65%A; 40 ~ 45 min, 65% ~ 75%A; 45 ~ 50 min, 75%A; 50 ~ 55 min, 75% ~ 10%A; 55 ~ 60 min, 10%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品马钱苷酸 11.76 mg、獐芽菜苦苷 17.75 mg、龙胆苦苷 31.39 mg、当药苷 14.01 mg、芒果苷 27.28 mg、异荛草素 19.93 mg、当药醇苷 14.03 mg、1, 8-二羟基-3, 7-二甲氧基呋喃酮 13.80 mg、8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-1, 3, 5-三羟基呋喃酮 17.28 mg, 分别置 25、50、10、25、10、25、100、25、100 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度、摇匀, 作为标准储备, 再分别取上述标准储备液 1、2、2.5、3、2、2、0.5、1、0.5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得各对照品质量浓度分别为 0.018 82、0.028 40、0.313 90、0.067 30、0.218 24、0.063 78、0.002 81、0.022 08、0.003 46 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过三号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 30 mL, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 W, 频率 50 kHz), 取出, 放至室温, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取按“2.3”项下方法制成的同一批(S02)样品溶液, 连续进样 6 次, 以 7 号峰(芒果苷)为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均 < 0.47%, 相对峰面积 *RSD* 均 < 2.0%。结果表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取按“2.3”项下方法制成的同一批(S02)样品溶液, 分别在 0、4、8、16、24、48 h 测定。结果以 7 号峰(芒果苷)为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均 < 0.38%, 相对峰面积 *RSD* 均 < 1.9%。结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取川西獐牙菜样品(S02)6 份, 按“2.3”项下方法制备, 进样测定。结果以 7 号峰(芒果苷)为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均 < 1.2% ($n = 6$), 相对峰面积 *RSD* 均 < 1.8% ($n = 6$)。结果表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.1 指纹谱图的测定 14 批次川西獐牙菜药材按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再取“2.2”项下混合对照品溶液进样测定, 记录图谱(见图 1A)。通过化学计量学系统解决方案软件(ChemPattern 2017 版)进行数据分析处理, 设定 S02 为代表性样品, 将其他样品的色谱峰与代表性图谱进行自动匹配生成共有模式的对照指纹图

谱(见图 1B)和川西獐牙菜指纹图谱色谱叠加图(见图 2)。

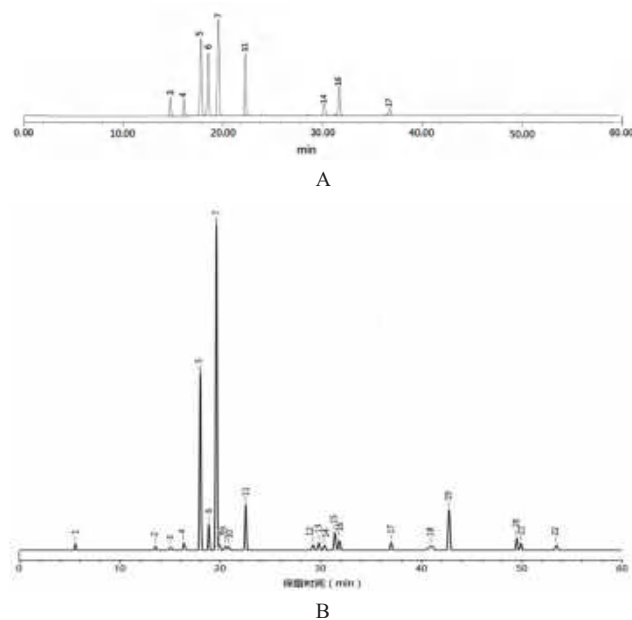


图 1 混合对照品 HPLC 图谱(A)及对照指纹图谱(B)

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed reference (A) and control fingerprint (B)

3. 马钱苷酸(loganic acid); 4. 獐芽菜苦苷(swertiamarin); 5. 龙胆苦苷(gentiopicroside); 6. 当药苷(sweroside); 7. 芒果苷(mangiferin); 11. 异荛草素(isoorientin); 14. 当药醇苷(swertianolin); 16. 1, 8-二羟基-3, 7-二甲氧基呋喃酮(1, 8-dihydroxy-3, 7-dimethoxy-xanthone); 17. 8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-1, 3, 5-三羟基呋喃酮(8-*O*- β -D-glucopyranosyl-1, 3, 5-trihydroxy-xanthone)

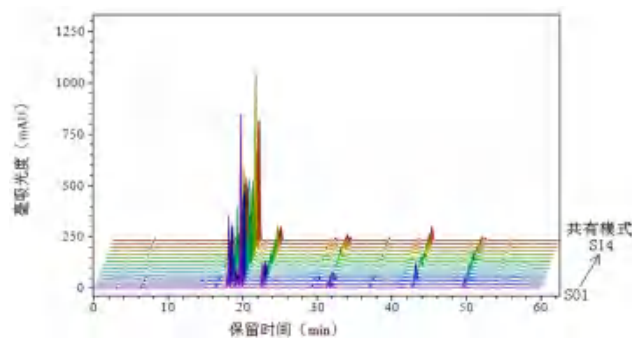


图 2 14 批次川西獐牙菜药材叠加的特征指纹图谱

Fig 2 Characteristic fingerprint of 14 batches of *Swertia mussotii*

2.5.2 共有峰的标定及相似度分析 采用化学计量学系统解决方案软件(ChemPattern 2017 版)以指纹图谱为参照设定峰面积较大、出峰时间适中且色谱峰分离良好的 7 号色谱峰(芒果苷)为参照峰自动匹配计算(夹角余弦相似度算法), 14 批川西獐牙菜共标定出了 22 个稳定性好、吸收峰强、特征明显的共有峰, 分别计算各样品的相似度(见图 3), 结果显示, 14 批次川西獐牙菜药材相似度在 0.923 ~ 1.000 (见表 2), 相似度在 0.98 以上的药材占 85.71%。

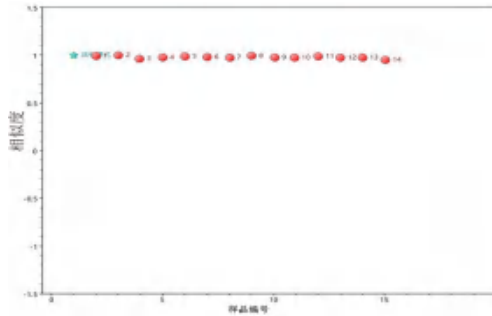


图 3 川西獐牙菜相似度分析图

Fig 3 Similarity analysis of *Swertia mussotii*

表 2 14 批川西獐牙菜药材与对照指纹图谱的相似度

Tab 2 Similarity between 14 batches of *Swertia mussotii* and the control fingerprint

编号	相似度	编号	相似度
S01	0.999	S08	0.997
S02	1.000	S09	0.982
S03	0.924	S10	0.981
S04	0.993	S11	0.996
S05	0.995	S12	0.992
S06	0.987	S13	0.985
S07	0.983	S14	0.923

2.5.3 色谱峰指认 通过样品 HPLC 叠加指纹图谱与对照品在相同色谱条件下保留时间的比对和经二极管阵列检测器检测对比样品与对照品紫外光谱一致后,共指认了 9 个色谱峰:3 号峰为马钱苷酸、4 号峰为獐芽菜苦苷、5 号峰为龙胆苦苷、6 号峰为当药苷、7 号峰为芒果苷、11 号峰为异荭草素、14 号峰为当药醇苷、16 号峰为 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡酮、17 号峰为 8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-1,3,5-三羟基吡酮。

2.6 化学计量学分析

2.6.1 主成分分析 (PCA) 以 14 批川西獐牙菜药材指纹图谱的共有峰峰面积为变量,利用化学计量学系统解决方案软件 (ChemPattern 2017 版) 进行主成分分析,结果共提取特征值最大的 3 个主成分,其中主成分 1 的特征值最大,为 7 943 274.63,累积解释方差为 94.93%;主成分 2 的特征值为 177 621.57,累积解释方差为 97.06%;主成分 3 的特征值为 144 546.49,累积解释方差为 98.78%。结果表明所有样品均在 95% 可信区间内,且提取的这 3 个主成分可以反映样品数据中的绝大部分信息,能代表 14 批川西獐牙菜药材样品中 22 个共有峰峰面积,提示川西獐牙菜药材质量受多个成分的影响 (见图 4 ~ 5)。

2.6.2 聚类分析 利用化学计量学系统解决方案软件 (ChemPattern 2017 版) 对 14 批川西獐牙菜样品进行系统聚类分析:选用欧氏距离度量标

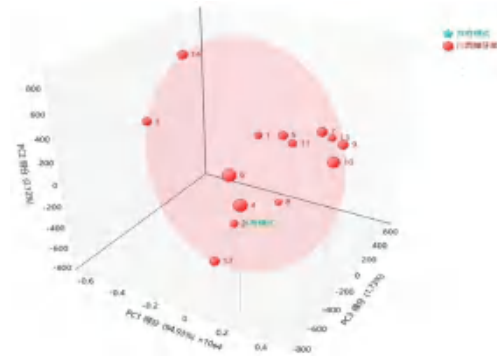


图 4 PCA 分析得分图

Fig 4 PCA analysis score chart

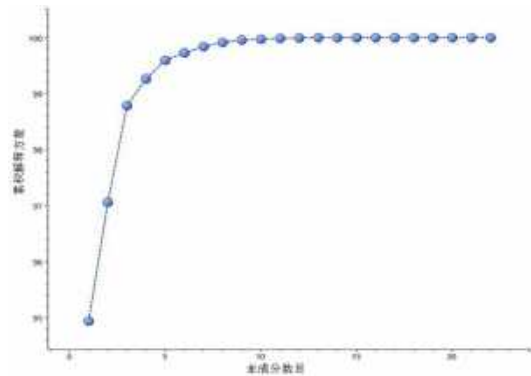


图 5 主成分分析自变量方差解释图

Fig 5 Variance of independent variables of principal component analysis

准,以共有峰相对峰面积为对照模板,进行聚类分析,见图 6。14 批川西獐牙菜药材样品可聚为 2 组: S03、S14 为一组,相似度相近 (分别为 0.924、0.923); S01、S02、S04 ~ S13 为一组,相似度比较相近 (相似度 0.980 ~ 1.000),其组内又可分为 2 个亚组,采集于青海玉树州 9 月份的样品 S01、S02、S05、S08、S11、S12 为一亚组,相似度最高且特别接近 (相似度 0.992 ~ 1.000),采集于青海地区其他月份的样品 S04、S06、S07、S09、S10、S13 为一亚组 (相似度 0.981 ~ 0.993)。聚类分析树形图与指纹图谱相似度结果一致,说明川西獐牙菜具有一定的地域性,不同地区、不同采收季节样品质量存在一定差异。

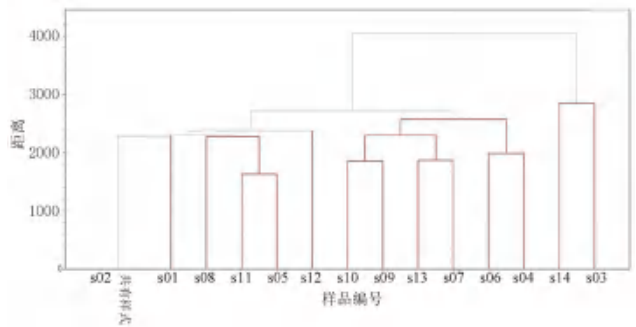


图 6 系统聚类分析图

Fig 6 Systematic cluster analysis

3 讨论

3.1 检测波长的确定

对 200 ~ 800 nm 扫描的各波长下的色谱图进行比较分析, 结果当检测波长为 254 nm 时, 各色谱峰均有较强吸收, 色谱图基线平稳, 峰数目较多, 而且分离度也较好, 故确定 254 nm 为本研究的检测波长。

3.2 提取方法的选择

比较不同溶剂(甲醇、乙腈、乙醇、水), 不同提取方法(超声提取、回流提取、索氏提取), 不同提取时间(20、30、40、60 min)对样品提取效果的影响, 用 HPLC 进行检测, 结果发现以甲醇为溶剂、超声处理 30 min 川西獐牙菜中各种成分提取较充分, 且操作简单。

3.3 色谱条件的优化

分别对乙腈 -0.1% 磷酸溶液、乙腈 -0.05% 磷酸溶液、乙腈 - 水、甲醇 - 水、甲醇 -0.05% 磷酸溶液、甲醇 -0.1% 磷酸溶液等流动相进行考察, 从混合对照品和样品中被测成分的分离情况、基线的稳定性以及分析时间等方面综合考虑, 最终选择以甲醇 -0.05% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱较为合适。

3.4 结论

本研究结果显示川西獐牙菜药材 HPLC 指纹图谱具有较好的稳定性和重复性, 14 批次川西獐牙菜药材指纹图谱的特征性和专属性很强, 指纹图谱平均相似度为 0.981, 符合指纹图谱研究的技术要求。在这 14 批样品 22 个共有峰中共标定 9 个色谱峰。

在分析的样品中, 发现川西獐牙菜药材由于不同产地、采集时间等因素影响, 药材指纹图谱存在一定差异。根据指纹图谱的相似度及化学计量学分析可以得知青海地区川西獐牙菜指纹图谱具有较好的一致性, 特别是青海玉树州的川西獐牙菜指纹图谱一致性最高, 质量也相对稳定, 故采集于青海地区的川西獐牙菜聚为一组, 其中因采收季节的不同, 7、8 月份采集的样品聚为一亚组, 9 月份花果期采集的样品聚为一亚组。考虑到样品采集地相邻, 加之地域辽阔, 因此个别样品产地出现交叉是有可能的。

综上所述, 本研究建立的川西獐牙菜药材的 HPLC 指纹图谱测定及分析方法精密度、稳定性、重复性良好, 方法简便、高效、准确、经济实用, 可为青海地区常用“蒂达”类藏药川西獐牙菜的

鉴别、质量控制等提供新的科学依据, 同时对进一步完善川西獐牙菜药材的质量评价体系具有一定的参考意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第 62 卷. 北京: 科学出版社, 2004: 400.
- [2] 文检, 张艺, 刘川, 等. 藏药“蒂达”的基原、药性及功效的考证 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (4): 609-612.
- [3] 杜晓煌, 柴进, 封欣婵, 等. 川西獐牙菜醇提物对大鼠胆汁酸转运蛋白 Mrp4、转录因子 Nrf2 表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2015, 37 (10): 957-961.
- [4] 孟宪华, 陈德道, 张樱山, 等. 川西獐牙菜的化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27 (2): 176-179.
- [5] 王海霞. 藏茵陈化学成分及抗肿瘤活性研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2014.
- [6] 张应鹏, 杨云裳, 刘宇, 等. 藏药川西獐牙菜挥发性化学成分及抑菌活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (3): 595-597.
- [7] 尚军, 井灵, 刘叶, 等. 大孔吸附树脂结合硅胶色谱分离川西獐牙菜正丁醇萃取部位化学成分研究 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14 (7): 52-54.
- [8] 李珊, 吕露阳, 刘圆, 等. HPLC 测定川西高原 4 种龙胆科植物中的环烯醚萜苷类 [J]. 华西药学杂志, 2016, 31 (5): 514-516.
- [9] 李剑锋, 杨月琴, 李婷, 等. 青海 4 种入药獐牙菜的多糖及黄酮含量特征 [J]. 农技服务, 2019, 36 (12): 25-27.
- [10] 韵海霞, 陈志. 川西獐牙菜的研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2020, 35 (5): 567-571.
- [11] 熊雯豆, 宋道光, 何西丰, 等. 高速逆流色谱法分离制备川西獐牙菜中的两种吡啶酮 [J]. 华西药学杂志, 2020, 35 (6): 660-663.
- [12] 保怡, 吉文鹤, 马玉花, 等. HPLC 测定四川及青海地区獐牙菜植物中 6 种主要成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (24): 2036-2038.
- [13] 杨红霞, 魏立新, 杜玉枝, 等. 不同海拔川西獐牙菜中药成分的 HPLC 分析 [J]. 中药材, 2010, 33 (6): 867-869.
- [14] 靳有才, 肖远灿, 邹小艳, 等. HPLC 法同时测定 2 种獐牙菜中 4 种苷类成分 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (7): 1889-1890.
- [15] 马玉花, 纪兰菊, 吉文鹤, 等. 栽培川西獐牙菜中 6 种药用成分的测定方法和动态积累研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25 (2): 393-396.
- [16] 谭亮, 胡风祖, 董琦. UPLC 法同时测定青海川西獐牙菜中 3 个苦苷类成分和 3 个黄酮类成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (8): 1469-1475.
- [17] 杜欢, 莫家祺, 徐瑾, 等. 藏族药川西獐牙菜化学成分与生态因子的相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (20): 141-146.
- [18] 戢爽, 梁向平, 张勐, 等. 立地因子对川西獐牙菜药效的影响 [J]. 安徽农学通报, 2020, 26 (23): 33-35.

(收稿日期: 2022-10-20; 修回日期: 2022-11-17)

都梁丸指纹图谱的建立及 4 种成分的含量测定研究

王静¹, 朱春璐², 袁子民^{1*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 石药集团远大大连制药有限公司, 辽宁 大连 116021)

摘要: **目的** 建立都梁丸的指纹图谱及 4 种成分含量测定方法。**方法** 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃; 检测波长 300 nm。**结果** 所建立的 10 批都梁丸指纹图谱, 有 16 个共有峰; 利用对照品指认出 11 个色谱峰, 分别为阿魏酸、洋川芎内酯 I、水合氧化前胡素、白当归素、佛手柑内酯、白当归脑、氧化前胡素、洋川芎内酯 A、欧前胡素、藁本内酯、异欧前胡素, 相似度均大于 0.95; 阿魏酸、欧前胡素、洋川芎内酯 A、异欧前胡素 4 种成分含量测定的结果平均值分别为 0.0620%、0.1401%、0.3064%、0.0752%。**结论** 本方法简单可行, 重复性良好, 可用于都梁丸的质量控制。

关键词: 都梁丸; 指纹图谱; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1630-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.035

Fingerprint and determination of 4 components of Duliang pills

WANG Jing¹, ZHU Chun-lu², YUAN Zi-min^{1*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Shiyao Group Yuanda Dalian Pharmaceutical Co., Ltd., Dalian Liaoning 116021)

Abstract: **Objective** To establish the fingerprints determine the content of Duliang pills. **Methods** HPLC was performed on Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution was used as the mobile phase, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30℃. The detection wavelength was 300 nm. **Results** The established fingerprints of 10 batches of Duliang pills had 16 common peaks, and 11 of the chromatographic peaks (ferulic acid, ligustrolide I, oxypeucedanin hydrate, byakangelicin, bergapten, byakangelicol, oxypeucedanin, ligustrolide A, imperatorin, ligustilide and isoimperatorin) were identified by reference samples, with similarity greater than 0.95. The content of ferulic acid, imperatorin, ligustrolide A, and isoimperatorin was 0.0620%, 0.1401%, 0.3064%, and 0.0752% respectively. **Conclusion** This method is simple and feasible, which can be used for the quality control of Duliang pills.

Key words: Duliang pill; fingerprint; HPLC; content determination

都梁丸收载于 2020 年版《中国药典》, 为临床用于治疗风寒瘀血阻滞脉络所致头痛的常用中成药, 具有祛风散寒、活血通络之功效^[1]。其处方由酒炖白芷和川芎组成, 化学成分主要含有香豆素类、苯酞类、挥发油类、有机酸类等, 现代药理研究结果表明, 该方主要通过抗炎、镇痛、调节血管舒缩相关因子、改善血液黏度与血流动

力学等多种药理作用发挥抗偏头痛的作用^[2-4]。目前, 关于都梁丸指纹图谱的研究甚少。因此, 本研究在对其血清药物化学研究的基础上^[5], 采用 HPLC 法建立都梁丸的指纹图谱, 对其成分进行归属, 并对都梁丸 4 种成分进行了含量测定, 以期都为梁丸大品种二次开发及药典质量标准的提升提供科学依据。

基金项目: 辽宁省自然科学基金应用基础研究资助项目 (No.2023014); 辽宁省教育厅 2022 年度高等学校基本科研课题项目 (No.LJKMZ20221320)。

作者简介: 王静, 女, 副教授, 主要从事中药质量分析及代谢组学研究, email: wjyuanmeng@163.com * **通信作者:** 袁子民, 男, 教授, 主要从事中药药剂及炮制机制研究, email: yuanzmin@163.com

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); SG3300 型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); FAA1004 精密电子天平(天津天马衡基仪器有限公司); SartoriusCP225D 十万分之一分析天平(赛德利斯)。

1.2 试药

都梁丸(自制, 编号: D1 ~ D10); 白芷购自安国市光明饮片加工厂, 经鉴定李峰教授鉴定为伞形科植物 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根; 川芎购自大连权健中药饮片厂, 经李峰教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根; 酒炖白芷实验室自制; 欧前胡素(批号: 110826-200307, 纯度 $\geq 98\%$, 中国食品药品检定研究院); 异欧前胡素(批号: ZM0531BB13)、氧化前胡素(批号: Y26A6S2757)、水合氧化前胡素(批号: R25A6F2764)、白当归脑(批号: P0103SA13)、白当归素(批号: P01028SA13)、佛手柑内酯(批号: RF0224FA14)(纯度均 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 阿魏酸(批号: 17092501)、洋川芎内酯 I (批号: 17121104)、洋川芎内酯 A (批号: 17051901)、藁本内酯(批号: 18010201)(纯度均 $\geq 98\%$, 成都普菲德生物技术有限公司)。乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 300 nm。流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 50 min, 95% ~ 35%B; 50 ~ 70 min, 35% ~ 5%B); 流速: 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 进样量: 10 μ L。

2.2 供试品溶液的制备

分别取 10 批都梁丸样品, 剪碎, 混匀, 取约 3 g, 精密称定, 精密加入等量的硅藻土, 研匀, 取约 2 g, 精密称定, 置量瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定, 超声 (250 W, 40 kHz) 1 h, 放冷, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 即得。另分别取酒炖白芷(过 80 目筛)约 0.8 g、川芎(过 80 目筛)约 0.2 g, 精密称定, 分别置量瓶中, 加 70% 甲醇 25 mL, 同法制成酒炖白芷及川芎的供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取水合氧化前胡素、白当归素、佛手

柑内酯、白当归脑、氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 3.4、6.0、6.25、8.25、3.25、8.0、6.25、5.8、20.9、84.4、34.6 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 参照峰的选取 鉴于欧前胡素是都梁丸中含量测定的指标性成分, 且化学性质稳定, 故选择欧前胡素(即 13 号峰)作为参照峰, 计算各峰的相对峰面积和相对保留时间。

2.4.2 精密度试验 取同一份都梁丸(D1)供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果各特征峰相对保留时间 RSD 为 0.0061% ~ 0.14%, 相对峰面积 RSD 为 0.017% ~ 2.7%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份都梁丸(D1)供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样测定, 结果各特征峰相对保留时间 RSD 为 0.0073% ~ 0.71%, 相对峰面积 RSD 为 0.19% ~ 3.3%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批都梁丸(D1)6 份, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备 6 份, 进样测定, 结果各特征峰相对保留时间 RSD 为 0.0027% ~ 0.31%, 相对峰面积 RSD 为 0.18% ~ 3.2%, 表明方法重复性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立及分析 取都梁丸 10 批, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 得到都梁丸 HPLC 指纹图谱(见图 1 ~ 2)。将 10 批指纹图谱导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》2012 版, 以中位数生成都梁丸溶液对照指纹图谱, 共确定了 16 个共有峰^[6-7]。将对照指纹图谱的相似度设定为 1, 以 16 个共有峰为标记, 计算 10 批都梁丸指纹图谱与对照指纹图谱的相似度, 结果相似度均大于 0.95, 表明各批次都梁丸质量具有一致性。

2.4.5 指纹图谱中主要色谱峰的化学指认及归属

取混合对照品溶液与都梁丸供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 根据混合对照品色谱峰保留时间, 对都梁丸中相应的色谱峰进行辨认, 结果 5 号峰为阿魏酸, 6 号峰为洋川芎内酯 I, 7 号峰为水合氧化前胡素, 8 号峰为白当归素, 9 号峰为佛手柑内酯, 10 号峰为白当归脑, 11 号峰为氧化前胡素, 12 号峰为洋川芎内酯 A, 13 号峰为欧前胡素, 15 号峰为藁本内酯, 16 号峰为异欧前胡素。取酒炖白芷、川芎的供试品

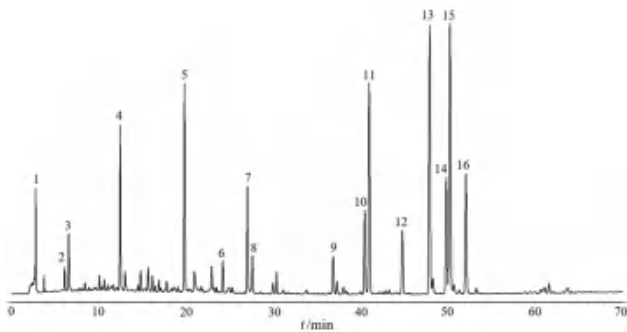


图 1 10 批都梁丸指纹图谱生成的共有模式图
Fig 1 Common pattern map generated from fingerprints of 10 batches of Duliang pills

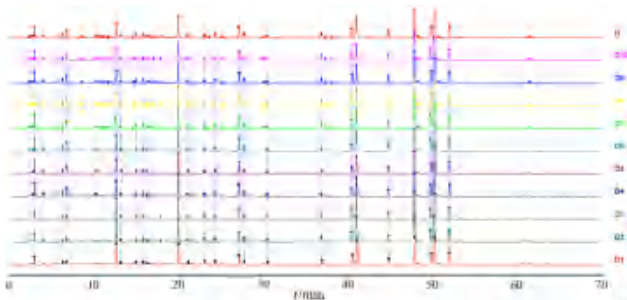


图 2 10 批都梁丸 HPLC 指纹图谱
Fig 2 HPLC fingerprint of 10 batches of Duliang pills

溶液和都梁丸的供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定，根据酒炖白芷和川芎特征峰的保留时间，对都梁丸溶液中相应的特征峰进行指认，以确定特征峰的归属，结果见图 3，都梁丸溶液 HPLC 指纹图谱 16 个特征峰中 1~4、7~11、13、14、16 号峰来自酒炖白芷，4~6、12、15 号峰来自川芎。

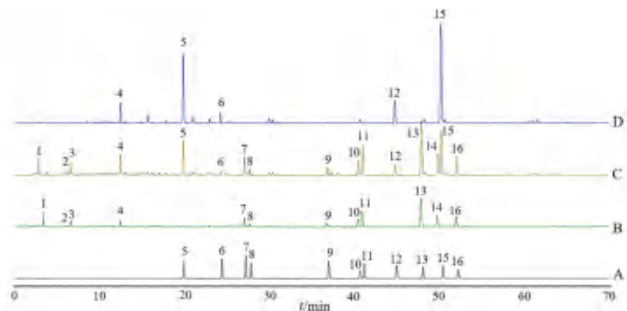


图 3 混合对照品 (A)、酒炖白芷 (B)、都梁丸 (C) 和川芎 (D) 的 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A), Angelica dahurica Radix processed with yellow rice wine (B), Duliang pills (C) and Ligusticum wallichii (D)

5. 阿魏酸 (ferulic acid); 6. 洋川芎内酯 I (senkyunolide I); 7. 水合氧化前胡素 (oxypeucedanin hydrate); 8. 白当归素 (byakangelicin); 9. 佛手柑内酯 (5-methoxypsoralen); 10. 白当归脑 (byakangelicol); 11. 氧化前胡素 (oxypeucedanin); 12. 洋川芎内酯 A (senkyunolide A); 13. 欧前胡素 (imperatorin); 15. 藁本内酯 (ligustilide); 16. 异欧前胡素 (isoimperatorin)

2.5 都梁丸中 4 种成分的含量测定

2.5.1 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含阿魏酸 0.116 mg、欧前胡素 0.16 mg、洋川芎内酯 A 0.844 mg、异欧前胡素 0.125 mg 的混合对照品溶液。

2.5.2 线性关系考察 分别精密量取“2.5.1”项下混合对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度、摇匀，分别精密量取 10 μ L 注入液相色谱仪，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品进样量 (μ g) 为横坐标 (X)，进行线性回归，得回归方程，结果见表 1，表明各成分在各自浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表 1 回归方程及线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range			
化合物	回归方程	r	线性范围/ μ g
阿魏酸	$Y = 4054.5X - 9.7780$	0.9999	0.029 ~ 0.232
洋川芎内酯 A	$Y = 354.25X - 5.3872$	0.9992	0.211 ~ 1.688
欧前胡素	$Y = 3263.1X - 9.8024$	0.9998	0.04 ~ 0.32
异欧前胡素	$Y = 2711.4X - 2.5055$	0.9999	0.03 125 ~ 0.25

2.5.3 专属性试验 按照都梁丸处方及制法分别制备不含酒炖白芷、川芎的阴性样品，按“2.2”项下方法制备阴性样品溶液，即得。分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μ L，按“2.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 4。由图可知，各待测成分与相邻色谱峰分离较好，阴性样品溶液无干扰。

2.5.4 回收试验 取 D5 批次已知含量的都梁丸 (含阿魏酸 0.0625%，洋川芎内酯 A 0.3052%，欧前胡素 0.1400%，异欧前胡素 0.0750%) 约 3 g，平行 6 份，分别加入等量硅藻土，研匀，各取约 1 g，精密称定，分别加入阿魏酸 ($0.232 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.65 mL、欧前胡素 ($0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.2 mL、洋川芎内酯 A ($0.422 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.8 mL、异欧前胡素 ($0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.5 mL，制备成供试品后进样测定并计算，结果阿魏酸、欧前胡素、洋川芎内酯 A 和异欧前胡素的加样回收率分别为 99.89%、98.87%、101.34%、100.72%，RSD 分别为 1.8%、1.9%、2.0%、1.7%，表明回收率符合相关规定。

2.5.5 含量测定 精密吸取 10 批都梁丸供试品溶液各 10 μ L，按“2.1”项下色谱条件进样测定，采用外标法计算都梁丸中 4 种成分含量，结果见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件及供试品溶液提取溶剂的考察 在指纹图谱的研究中，色谱条件考察了甲

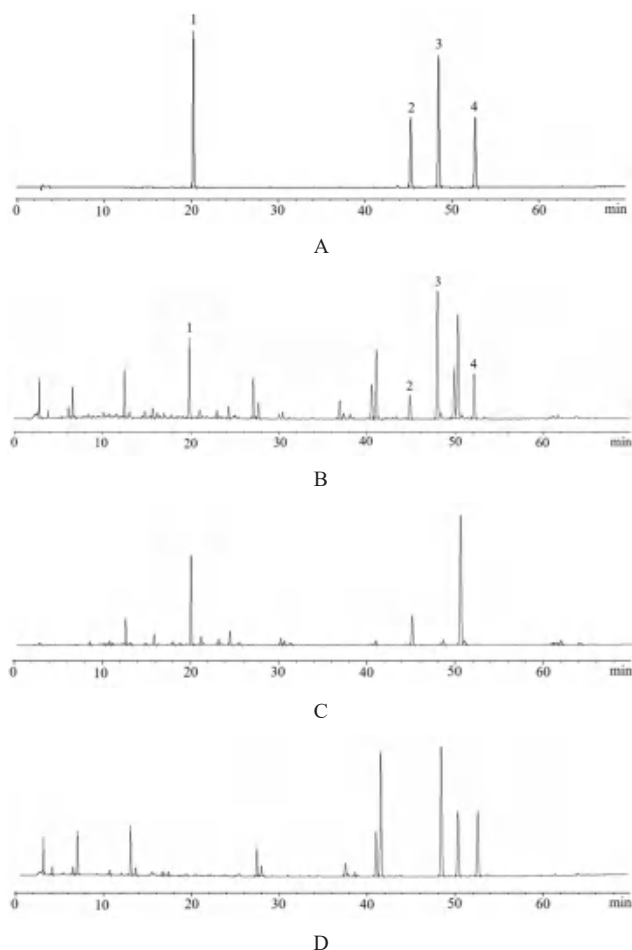


图 4 都梁丸 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of Duliang pills

A. 混合对照品 (mixed reference); B. 都梁丸 (Duliang pills); C. 缺白芷阴性样品 (negative sample without *Angelica dahurica*); D. 缺川芎阴性样品 (negative sample without *Ligusticum wallichii*); 1. 阿魏酸 (ferulic acid); 2. 欧前胡素 (imperatorin); 3. 洋川芎内酯 (senkyunolide A); 4. 异欧前胡素 (isoimperatorin)

 表 2 10 批都梁丸样品中 4 种成分的含量 (% , $n = 3$)

 Tab 2 Content of 4 components in 10 batches of Duliang pills (% , $n = 3$)

批次	阿魏酸	欧前胡素	洋川芎内酯 A	异欧前胡素
D1	0.0620	0.1386	0.3035	0.0749
D2	0.0620	0.1391	0.3060	0.0756
D3	0.0616	0.1404	0.3060	0.0750
D4	0.0619	0.1401	0.3088	0.0756
D5	0.0625	0.1400	0.3052	0.0750
D6	0.0619	0.1393	0.3076	0.0754
D7	0.0624	0.1402	0.3053	0.0750
D8	0.0616	0.1410	0.3086	0.0757
D9	0.0620	0.1407	0.3071	0.0749
D10	0.0624	0.1417	0.3060	0.0752
平均值	0.0620	0.1401	0.3064	0.0752

醇-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-水等流动相系统,结果以乙腈-0.1%磷酸溶液流动相的梯度程序系统的基线波动平稳,指纹峰分离效果最

佳,重复性好。测定波长考察了 254 nm 和 300 nm,结果在 300 nm 测定波长下的指纹峰较多,信号强,故确定 300 nm 为测定波长。供试品溶液制备的提取溶剂考察了乙醇、50%乙醇和 70%甲醇,结果发现 70%甲醇提取的色谱峰较多,杂质峰干扰少,故选择 70%甲醇作为提取溶剂。本研究建立的指纹图谱方法简单可行,重复性好,可用于都梁丸的质量控制。

3.2 指纹图谱特征峰的标记

本研究前期在对都梁丸血清药物化学的研究中发现^[5],都梁丸入血的 12 个原形成分主要有花椒毒酚、水合氧化前胡素、白当归素、氧化前胡素、白当归脑、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素、阿魏酸、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 I 和藁本内酯,在指纹图谱研究中发现,除花椒毒酚含量较低未被检测到外,其余 11 种成分均在指纹图谱中被标记。

3.3 含量测定的指标性成分选定

目前,药典关于都梁丸质量标准的含量测定项下只测定了酒炖白芷中的欧前胡素,未对川芎中的活性成分进行测定,文献报道也多以都梁丸的单一成分阿魏酸或欧前胡素作为含量测定指标^[8-10]。本研究在都梁丸指纹图谱的研究中共确认 16 个特征峰的归属,其中阿魏酸、欧前胡素、洋川芎内酯 A、异欧前胡素 4 种成分含量较高,色谱峰分离度较好,并能够吸收入血^[5],且阿魏酸、洋川芎内酯 A 为川芎有效部位中抗偏头痛的主要活性成分^[11],欧前胡素、异欧前胡素为白芷有效部位中镇痛的主要成分^[12],可发挥抗偏头痛的镇痛作用,能够作为都梁丸的药效物质基础,因此,本研究在指纹图谱研究的基础上,选择酒炖白芷中的欧前胡素、异欧前胡素,川芎中的阿魏酸、洋川芎内酯 A 作为都梁丸含量测定的指标,以期都为都梁丸药效物质基础及质量标准的提升研究提供参考^[13]。由于含量测定所用色谱条件与指纹图谱色谱条件相同,其涉及的精密度、稳定性、重复性试验在指纹图谱中已进行了考察且符合相关规定,因此,含量测定中主要对线性关系、专属性、回收率进行了研究。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 1428.
- [2] 韩李阳, 鄢良春, 田韦韦, 等. 都梁方制剂的现代药理学, 药理学及临床应用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 205-213.
- [3] 韩笑, 徐祎, 许建阳, 等. 都梁丸提取液的镇痛作用及

- 其对小鼠脑组织中 5-HT、5-HIAA、DA 及 NE 含量的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(6): 29-31.
- [4] 韩笑, 刘文, 邱德文, 等. 都梁丸提取液镇痛作用及对外周组织 c-fos 基因表达影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 34-35.
- [5] 朱春璐, 王静, 乔宇航, 等. 都梁丸的血清药物化学研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 443-446.
- [6] 易丽娟, 李雅, 柳兰, 等. 心痛泰颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2019, 50(22): 5478-5483.
- [7] 谢百波, 苏加乐, 里艳茹, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱及一测多评法的复方珍珠解毒口服液质量评价[J]. 中南药学, 2022, 20(7): 1639-1643.
- [8] 张艳秋, 王静, 袁子民, 等. HPLC 法测定都梁丸中阿魏酸的含量[J]. 中国民族民间医药, 2016, 26(15): 15-16.
- [9] 曹红, 邢俊波, 陈玉敏, 等. 都梁丸质量标准的研究[J]. 解放军药学学报, 2012, 28(5): 417-419.
- [10] 谭生建, 胡文祥, 卢嘉琪, 等. RP-HPLC 测定都梁丸中欧前胡素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 81-85.
- [11] 陈玲, 马俊, 唐艺, 等. 川芎抗偏头痛作用的有效部位筛选及指纹图谱研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 80-85.
- [12] 王梦月, 贾敏如, 马逾英, 等. 白芷镇痛有效部位的化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(8): 583-585.
- [13] 王隆隆, 杨忠杰, 张海风, 等. 芪苓益肾颗粒高效液相色谱指纹图谱物质基准研究及 7 种成分含量测定[J]. 中南药学, 2021, 19(12): 2633-2639.

(收稿日期: 2022-09-10; 修回日期: 2022-11-05)

基于 UPLC-MS 分析技术测定不同产区制何首乌饮片中 8 个化学成分的含量

刘野¹, 武俊颖², 贺奥城¹, 杨武亮¹, 张武岗^{2, 3*}, 陈海芳^{1*} (1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330004; 3. 江西本草天工科技有限责任公司, 南昌 330006)

摘要: **目的** 建立 UPLC-MS 分析技术同时测定不同产地制何首乌饮片中 4 种蒽醌类 (大黄素甲醚、大黄素、大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷和大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷) 及 3 种鞣质类 (没食子酸、儿茶素、表儿茶素) 和 1 种二苯乙烯类 (反式二苯乙烯苷) 活性成分的含量。**方法** 采用 Ultimate UPLC-XB C18 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m) 色谱柱, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 线性梯度洗脱, 流速为 0.2 mL $\cdot$ min⁻¹; 采用电喷雾离子源 (ESI)、负离子扫描模式, 在多反应监测 (MRM) 条件下进行定量分析; 并用 IBM SPSS Statistics 22 软件对数据结果进行聚类分析。**结果** 建立的 UPLC-MS 可以较好地分离 8 种成分, 各成分在相应浓度范围内与峰面积线性关系良好; 其定量限和检测限范围分别为 0.89 ~ 13.00 和 0.20 ~ 4.00 ng $\cdot$ mL⁻¹; 精密度、重复性、稳定性的 RSD 值 ($n=5$) 均小于 5%; 加样回收率在 99.47% ~ 101.49%, RSD 均小于 2.5%; 聚类分析结果显示 12 批制何首乌样品分为 3 类, 其中 S1、S2、S5、S8 ~ S12 归为 I 类, S6、S7 归为 II 类, S3 和 S4 归为 III 类; 第 III 类样本 (广西、广东) 中 3 类成分的平均含量相对较高。**结论** 该方法可靠、准确、快速、重复性好, 可用于制何首乌的质量控制与品质相关研究, 并为其临床安全用药提供依据。

关键词: UPLC-MS; 制何首乌; 蒽醌类成分; 鞣质类成分; 二苯乙烯类成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1634-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.036

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81903917, No.81660650); 江西省教育厅项目 (No.GJJ190671, No.GJJ170723); 江西省中医药中青年骨干人才培养计划 (No.S21-09); 江西中医药大学博士科研启动基金 (No.2018WBZR002)。

作者简介: 刘野, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药物质基础和作用机制研究, email: ly2063840214@163.com ***通信作者:** 陈海芳, 女, 副教授, 主要从事中药物质基础和作用机制研究, email: chenhf88@126.com; 张武岗, 男, 教授, 主要从事中药物质基础和作用机制研究, email: zwgchf98@foxmail.com

Determination of 8 chemical components in *Polygonum multiflorum* Thunb. from different production areas based on UPLC-MS

LIU Ye¹, WU Jun-ying², HE Ao-cheng¹, YANG Wu-liang¹, ZHANG Wu-gang^{2,3*}, CHEN Hai-fang^{1*}
(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of Solid Chinese Medicine Preparations, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 3. Jiangxi Bencao Tiangong Technology Co., Ltd., Nanchang 330006)

Abstract: Objective To determine 4 anthraquinones (physcion, emodin, physcion-8-*O*- β -D-glucoside and emodin-8-*O*- β -D-glucoside), 3 tannins (gallic acid, catechin, and epicatechin) and 1 stilbene glycoside (trans-THSG) in *Polygonum multiflorum* decoction slices from different regions by UPLC-MS. **Methods** Ultimate UPLC-XB C18 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m) column was used with 0.1% formic acid as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. Linear gradient elution was performed at the flow rate of 0.2 mL $\cdot$ min⁻¹. Quantitative analysis was performed with ESI source, negative ion scanning mode and multi-reaction monitoring (MRM). IBM SPSS Statistics 22 was used for cluster analysis. **Results** The UPLC-MS method well separated the 8 target components with good linearity in the corresponding concentration ranges. The limits of quantification and detection were 0.89 ~ 13.00 and 0.20 ~ 4.00 ng $\cdot$ mL⁻¹, respectively. RSDs of precision, repeatability and stability ($n = 5$) were all less than 5%. The recoveries ranged from 99.47% to 101.49%, and RSDs were all lower than 2.5%. Cluster analysis showed that the 12 batches of *Polygonum multiflorum* samples were divided into 3 categories, among which S1, S2, S5, S8 ~ S12 were classified as class I, S6 and S7 classified as class II, while S3 and S4 classified as class III. The average content of 3 components in class III samples from Guangxi and Guangdong was relatively high. **Conclusion** The method is reliable, accurate, rapid and reproducible. It can be used to determine the content of 8 components in *Polygonum multiflorum* from different regions, and provide reference for the quality control of *Polygonum multiflorum*, as well as for safety and quality research.

Key words: UPLC-MS; *Polygonum multiflorum* radix preparata; anthraquinones; tannins; stilbene glycoside

药材何首乌为蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根, 主产于广东、广西、贵州、四川、河南、湖北、贵州等地。何首乌属于生熟异用品种, 生首乌性温, 味苦、涩, 具有润肠通便、解毒消痈等功效; 制何首乌能补肝益肾、强筋健骨和化浊降脂等^[1]。现代药理学表明制何首乌具有保护神经系统、免疫调节、抗氧化和调节糖脂代谢等作用。然而药材产地、炮制工艺等因素均影响制何首乌含有的化学成分种类与含量^[2-4]。因此, 通过对制何首乌中不同类别的多成分含量进行评价, 才能更好地控制市场流通的药材种类品质, 保障其传统药用功效。

研究报道制何首乌中主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、鞣质等化学成分, 其中二苯乙烯类成分是制何首乌中含量较高的大类成分, 尤其以反式

二苯乙烯苷 (trans-THSG) 的含量最高, 是制何首乌的标志性成分, 其具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降低胆固醇和影响代谢酶等诸多药理活性^[5-6]; 蒽醌类包含具有泻下作用的结合蒽醌和抗菌消炎的游离蒽醌^[7-8], 并且研究发现何首乌蒽醌类化合物具有显著的抗肿瘤作用, 可诱导细胞凋亡、阻断能量代谢等, 例如大黄素、大黄酸、大黄素甲醚可通过抑制固醇调节元件结合蛋白-1来改善脂质代谢^[9]; 鞣质类成分具有抗菌消炎、抑制肿瘤细胞生长、抗溃疡、降血脂等功效^[10]。而且, 研究表明大黄素、大黄素甲醚、儿茶素、二苯乙烯苷等协同发挥何首乌的抗衰老功效^[11]。因此, 本研究选取上述三类成分中 8 个活性化合物 (没食子酸、儿茶素、表儿茶素、trans-THSG、大黄素甲醚、大黄素、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大

黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷)作为评价指标,采用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS)对市售的制何首乌进行含量测定,以期为不同产地制何首乌的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 6460 三重四极杆质谱仪(美国安捷伦科技公司);Analyst TF1.6 和 peakview 1.2 数据处理系统(美国 Sciex 公司);LC-30A 超高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯, TEDIA 公司);蒸馏水(屈臣氏集团);其余试剂为分析纯。对照品没食子酸(批号:110831-201906,纯度:91.5%)、儿茶素(批号:110877-202005,纯度:95.1%)、表儿茶素(批号:110878-201703,纯度:99.7%)、trans-THSG(批号:110844-201915,纯度:90.7%)、大黄素(批号:111857-201703,纯度:98.0%)、大黄素甲醚(批号:110758-201616,纯度:98.0%)(中国食品药品检定研究院),对照品大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号:PS1521,纯度:98.0%)、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号:PS1508,纯度:98.0%)(成都普思生物科技股份有限公司)。

12 批制何首乌饮片具体样品信息见表 1。所有药材均经江西中医药大学徐艳琴教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 干燥块根的炮制品。

表 1 药材来源

Tab 1 Source of medicinal materials

编号	产地	药厂
S1	贵州	普宁市泽群中药饮片有限公司
S2	四川	洪雅县瓦屋山药业有限公司
S3	广东	康美药业股份有限公司
S4	广西	广西柳州百草堂药业有限公司
S5	安徽	广东合百草制药有限公司
S6	陕西	安徽省亳州市药材市场
S7	河南	广西泰峰药业有限公司
S8	湖北	北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司
S9	四川	安徽康和中药科技有限公司
S10	云南	江西齐仁堂中药饮片有限公司
S11	湖南	湖南省博士康中医药有限公司
S12	贵州	贵州同德药业有限公司

2 方法与结果

2.1 液相条件

采用 Ultimate UPLC-XB C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m, Welch Materials Inc)。流动相为 0.1%

甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0.01~0.8 min, 10%B; 0.8~1.5 min, 10%~15%B; 1.5~4 min, 15%B; 4~7.5 min, 15%~40%B; 7.5~10 min, 40%~90%B; 10~12 min, 90%B),柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 0.2 mL $\cdot$ min $^{-1}$,进样量 1 μ L。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI);毛细管电压 4000 kV;雾化气压力 30 psi;去溶剂气温度:350 $^{\circ}$ C;去溶剂气:N $_2$;流速:10 L $\cdot$ min $^{-1}$;负离子化模式,扫描方式为多反应监测模式(MRM),其他质谱参数见表 2。对照品及供试品的色谱图见图 1。

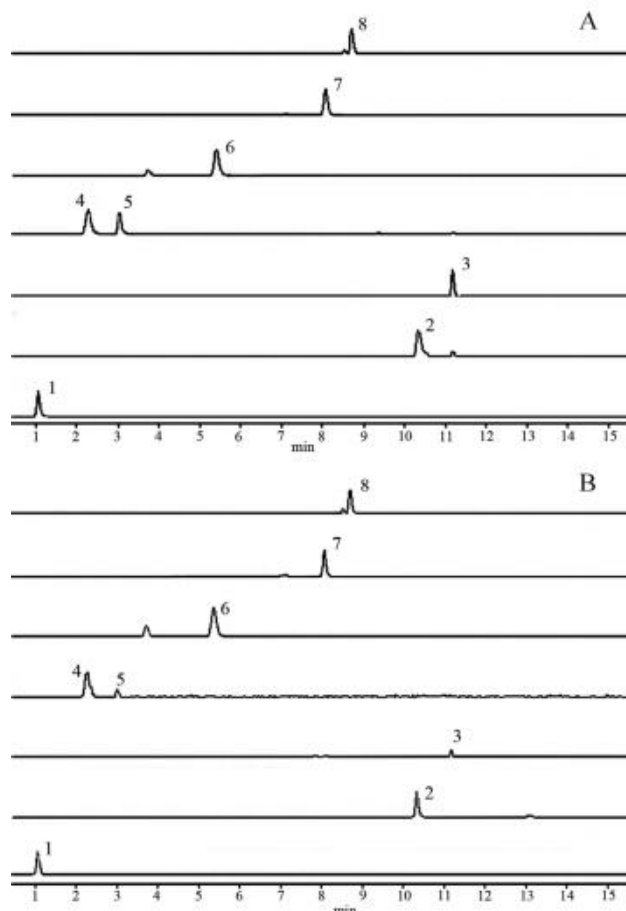


图 1 对照品(A)和供试品(B)的UPLC-MS图

Fig 1 UPLC-MS chromatogram of reference (A) and sample (B)

1.没食子酸(gallic acid); 2.大黄素(emodin); 3.大黄素甲醚(phycion); 4.儿茶素(catechin); 5.表儿茶素(epicatechin); 6.反式二苯乙烯苷(trans-THSG); 7.大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(emodin-8-*O*- β -D-glucoside); 8.大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(physion 8-*O*- β -D-glucoside)

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称定各对照品适量,用甲醇溶解制备对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得没食子酸、儿茶素、表儿茶素、trans-THSG、大

表 2 8 种成分的 UPLC-MS 参数

Tab 2 UPLC-MS parameters of 8 components

成分	母离子 [M-H] ⁺	子离子	碎裂 电压 /V	碰撞 电压 /V	驻留 时间 /s
没食子酸	169.0	125.0	135	16	50
儿茶素	289.0	245.0	145	20	50
表儿茶素	289.0	245.0	145	20	50
trans-THSG	405.0	243.1	135	15	50
大黄素 -8-O-β-D- 葡萄糖苷	431.2	269.1	135	30	50
大黄素甲醚 -8-O- β-D- 葡萄糖苷	445.1	283.1	135	5	50
大黄素	269.0	225.0	175	30	50
大黄素甲醚	283.0	240.0	145	33	50

黄酮 -8-O-β-D- 葡萄糖苷、大黄素甲醚 -8-O-β-D- 葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚对照品溶液质量浓度分别为 300.0、75.0、55.0、341.7、107.5、50.0、

125.0 和 47.5 μg · mL⁻¹ 的储备液。

2.4 供试品溶液的制备

参考文献^[12]方法, 略作改动。将制何首乌饮片粉碎后过四号筛, 准确称取 0.500 g 置于具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 甲醇, 称定重量, 室温超声 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 取 100 μL 溶液置于 2 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 摇匀, 取 100 μL 溶液以 13 000 r · min⁻¹ 转速离心 10 min 后, 取上清液即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系 精密吸取“2.3”项下对照品储备液适量, 逐级稀释配制成系列混合对照品溶液, 进样测定。以对照品质量浓度 (μg · mL⁻¹) 为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 结果见表 3, 可知 8 种化合物在各自的浓度范围内呈良好的线性关系。

表 3 8 种成分的回归方程、相关系数和线性范围

Tab 3 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of the 8 components

成分	回归方程	r	范围 / (ng · mL ⁻¹)	LOQ/ (ng · mL ⁻¹)	LOD/ (ng · mL ⁻¹)
没食子酸	$y = 3.80 \times 10^3 x - 7.32 \times 10^2$	0.9996	80 ~ 12 000	3.00	0.50
儿茶素	$y = 9.03 \times 10^2 x - 5.32$	0.9999	30 ~ 4500	2.00	0.50
表儿茶素	$y = 1.08 \times 10^3 x + 11.96$	0.9999	15 ~ 2200	1.00	0.20
trans-THSG	$y = 3.29 \times 10^4 x + 6.32 \times 10^3$	0.9997	137 ~ 20 500	13.00	4.00
大黄素 -8-O-β-D- 葡萄糖苷	$y = 6.05 \times 10^4 x + 3.15 \times 10^3$	0.9992	29 ~ 4300	8.00	1.00
大黄素甲醚 -8-O-β-D- 葡萄糖苷	$y = 4.07 \times 10^3 x + 63.20$	0.9995	13 ~ 2000	9.00	2.00
大黄素	$y = 1.22 \times 10^4 x + 1.22 \times 10^3$	0.9991	50 ~ 7500	0.89	0.45
大黄素甲醚	$y = 2.41 \times 10^4 x + 3.26 \times 10^2$	0.9997	13 ~ 1900	4.00	1.38

2.5.2 精密度试验 精密吸取“2.5.1”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算日内精密度; 连续 3 d 进样分析, 计算日间精密度。计算 8 种化合物没食子酸、儿茶素、表儿茶素、trans-THSG、大黄素 -8-O-β-D- 葡萄糖、大黄素甲醚 -8-O-β-D- 葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚的日内精密度的 RSD 值分别为 4.1%、2.9%、2.6%、3.6%、3.4%、2.2%、1.9%、2.0%; 日间精密度的 RSD 值分别为 3.5%、1.7%、3.1%、3.2%、3.8%、3.1%、3.0%、4.1%。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 6 次, 记录峰面积, 测定 8 种成分的含量 RSD, 结果显示各成分的含量 RSD 值均小于 3.5%。

2.5.4 重复性试验 取制何首乌饮片 (S12) 粉末 6 份, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得峰面积, 结果显示没食子酸、儿茶素、表儿茶素、trans-THSG、大黄素 -8-O-β-D- 葡萄糖苷、大黄素甲醚 -8-O-β-D- 葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚的峰面积的 RSD 分别为 4.6%、

4.2%、4.5%、1.1%、1.7%、4.9%、2.2% 和 3.5%。

2.5.5 加样回收试验 取已知含量的制何首乌饮片 (S12) 粉末 9 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别置于量瓶中, 按照 80%、100% 和 120% 的比例精密加入相应量的对照品溶液, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样测定, 计算加样回收率和 RSD 值。8 种成分的低、中、高浓度的平均加样回收率均在 99.47% ~ 101.49%, RSD 均在 0.67% ~ 2.1%。

2.6 样品含量测定

取 12 批不同产地制何首乌样品, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 并进样测定, 根据相应线性方程计算 12 批药材中没食子酸、儿茶素、表儿茶素、trans-THSG、大黄素 -8-O-β-D- 葡萄糖苷、大黄素甲醚 -8-O-β-D- 葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚的含量, 结果见表 4。

2.7 系统聚类分析

使用 IBM SPSS Statistics 22 软件对不同产地制何首乌药材中 8 种活性成分的含量测定结果进行系统聚类。以 8 种活性成分含量为聚类的变

表 4 12 批制何首乌样品含量测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 4 Content of *Polygonum multiflorum* radix preparata in 12 batches ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

样品	产地	没食子酸	儿茶素	表儿茶素	trans-THSG	大黄素 -8-O- β -D-葡萄糖苷	大黄素甲醚 -8-O- β -D-葡萄糖苷	大黄素	大黄素甲醚
1	贵州	482.09	170.89	18.49	8390.54	47.39	32.02	2128.26	200.06
2	四川	760.99	122.16	30.94	7146.48	191.38	92.72	1160.82	26.05
3	广东	571.29	837.28	98.44	13 563.78	469.73	153.89	1829.91	138.72
4	广西	608.90	804.34	36.47	15 233.01	511.79	325.92	1403.04	3.35
5	安徽	514.22	112.19	/	6980.62	445.01	229.84	963.14	14.06
6	陕西	935.74	390.16	17.10	10 603.67	710.72	350.99	1690.78	44.48
7	河南	550.83	152.62	26.79	11 415.15	155.91	65.56	2170.68	163.66
8	湖北	686.72	102.23	9.72	8022.46	174.76	57.82	981.39	37.43
9	四川	738.29	131.20	29.90	7534.39	179.28	89.92	1209.82	23.04
10	云南	783.91	/	/	7064.16	252.02	84.36	959.75	90.65
11	湖南	796.28	411.20	79.83	7301.82	358.14	136.21	969.41	56.70
12	贵州	530.28	386.28	32.78	6995.06	458.59	300.86	956.06	33.76

注：“/”表示未检测出。
Note: “/” Indicates no detection.

量,选择组间联接为聚类分析方法,选择平方 Euclidean 距离作为度量标准,获得聚类分析树状图。如图 2 所示,当平方 Euclidean 距离为 5 时,12 批制何首乌样品可分为 3 类,其中 S1、S2、S5、S8~S12 归为 I 类, S6、S7 归为 II 类, S3 和 S4 归为 III 类。分别计算 3 类产区中二苯乙烯类、蒽醌类、鞣质类成分总含量平均值,结果见表 5,鞣质类和二苯乙烯类成分平均总含量由低到高排序为 I < II < III; 蒽醌类成分平均总含量由低到高排序为 I < III < II,但其 II 类和 III 类蒽醌类成分含量比较接近;综合分析得出第 III 类样本最好,各成分含量均较高。

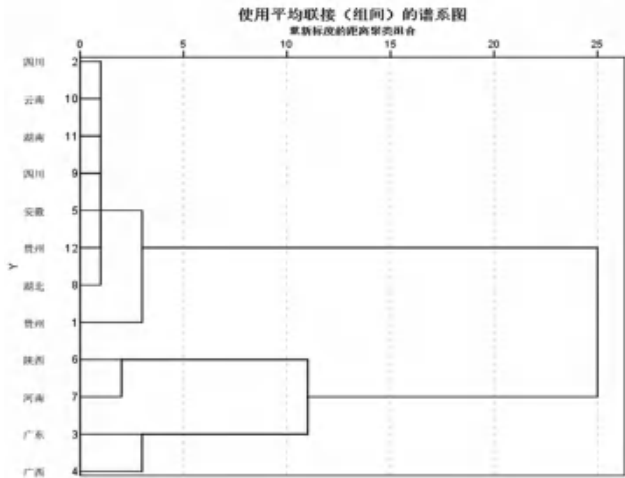


图 2 12 批制何首乌药材系统聚类分析树状图
Fig 2 Systematic cluster analysis of *Polygonum multiflorum* radix preparata in 12 batches

3 讨论

何首乌在民间一直被认为具有祛病延年和养颜乌发的功效,现代药理学研究证实其具有抗衰老、提高免疫力、保护心血管、抗肿瘤等药理作

表 5 二苯乙烯类、蒽醌类、鞣质类成分总含量平均值 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 5 Average contents of stilbene glycosides, anthraquinones and tannins ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

分类	产地	鞣质	二苯乙烯	蒽醌
I	四川、安徽、贵州、湖北、云南、湖南	866.33	7429.44	1617.59
II	陕西、河南	1036.61	11 009.41	2676.40
III	广东、广西	1478.36	14 398.39	2418.18

注:单类成分总含量平均值=各省单类成分总含量之和/省个数。
Note: Average value of total content of single component = Sum of total content of single component of each province/number of provinces.

用^[13-18]。制何首乌为何首乌的炮制加工品,可药食两用,被广泛应用于须发早白、血虚眩晕、腰膝酸软等证的临床治疗、食疗和药用养生等的日常保健^[19-20]。然而何首乌药材的产地、炮制工艺等影响制何首乌的化学成分的种类与含量。因此,本课题采用 UPLC-MS 技术,对制何首乌中 8 个活性成分进行含量测定(没食子酸、儿茶素、表儿茶素、trans-THSG、大黄素甲醚、大黄素、大黄素甲醚 -8-O- β -D-葡萄糖苷和大黄素 -8-O- β -D-葡萄糖苷),为制何首乌药材的质量控制提供依据。

研究结果显示,12 批制何首乌样本中没食子酸、trans-THSG、大黄素含量均相对较高,其余成分含量相对较少。聚类分析结果将 12 批样本分为 3 类,各类样本间成分含量有差异,分析可能与地理环境、气候温度等因素相关。二苯乙烯苷是由紫外线照射、气候湿热、真菌感染、机械损伤等不利条件下产生的^[21],蒽醌类成分更喜欢在低温低湿的环境下积累^[22]。III 类产区日照充足、气候湿热,有利于二苯乙烯苷的产生,因

此该产地的制何首乌 trans-THSG 成分含量最高。Ⅱ类产区包括陕西和河南,主要是温带大陆和温带季风性气候,具有夏季高温多雨,冬季寒冷干燥,四季气温变化分明的特点,该产区对二苯乙烯苷和蒽醌类成分积累均有利。Ⅰ类产区样本成分含量相对最低,且该类产区样本相比于Ⅱ、Ⅲ类产区样本的地理特异性不强,可能由其他因素影响了成分含量,例如采收期、生长年限、炮制时间等。从唐代《何首乌录》开始最先记载何首乌的产地以来到明代李时珍的《本草纲目》,何首乌的道地产区不断南移,并最终以东广东所产质量最佳^[23],与本试验结果基本一致。

综上所述,本研究构建 UPLC-MS 法测定制何首乌中各活性成分的含量,可为后续深入完善其质量控制体系、临床安全用药等相关研究提供新的依据。

参考文献

- [1] 张飘, 戚进. 制何首乌药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(11): 40-43.
- [2] 菅瑞至, 刘洋洋, 冯剑, 等. 经典名方中何首乌与首乌藤的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 12-22.
- [3] 李妍怡, 王莹, 张南平, 等. 基于 UPLC-MS/MS 检测技术探讨清蒸时间对何首乌 26 种化学成分的影响[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(12): 1295-1302.
- [4] 汪颖舒, 朱广灏, 王冰, 等. 古法黑豆蒸晒与药典黑豆汁连续蒸对何首乌中 12 个成分含量的影响[J]. 中草药, 2020, 51(19): 4972-4982.
- [5] 柴士伟, 邢彦超, 高建, 等. 何首乌及炮制品中二苯乙烯苷的稳定性研究[J]. 天津中医药, 2022, 39(7): 934-939.
- [6] 孙晋苓, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 何首乌中顺式和反式-二苯乙烯苷的 HPLC/DAD/MS 测定及其光稳定性考察[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(7): 541-544.
- [7] 张丹丹. 大黄的临床药理研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(17): 68-69.
- [8] 刘喜纲, 刘沛, 陈大为, 等. 优选大黄总蒽醌结肠定位壳聚糖微球的制备工艺[J]. 中草药, 2015, 46(1): 38-42.
- [9] 朱艺, 李琛, 李洪亮, 等. 何首乌中相关蒽醌类化合物抗癌作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 196-205.
- [10] 吴海涛, 陈玥, 杨微, 等. 金荞麦 HPLC 条件优化及表儿茶素鉴定研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2022, 34(4): 80-86, 133.
- [11] 李学林, 张帆, 唐进法, 等. 何首乌炮制品有效成分与抗衰老功效的相关性研究[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(9): 1040-1046.
- [12] 王靖越, 张语凡, 柴冲冲, 等. 何首乌饮片的颜色与蒽醌类和二苯乙烯苷含量的相关性研究[J]. 中南药学, 2020, 18(4): 635-640.
- [13] Jang JY, Kim HN, Kim YR, et al. Hexane extract from *Polygonum multiflorum* attenuates glutamate-induced apoptosis in primary cultured cortical neurons[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1): 261-268.
- [14] Li XY, Wang Z, Jiang JG, et al. Role of polyphenols from *Polygonum multiflorum* Caulis in obesity-related disorders[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 294, 115378.
- [15] Li MH, Ruan LY, Chen C, et al. Protective effects of *Polygonum multiflorum* on ischemic stroke rat model analysed by 1H NMR metabolic profiling[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 155: 91-103.
- [16] Xue X, Quan Y, Gong LH, et al. A review of the processed *Polygonum multiflorum* (Thunb.) for hepatoprotection: clinical use, pharmacology and toxicology[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 261, 113121.
- [17] Qian J, Hou M, Wu X, et al. A review on the extraction, purification, detection, and pharmacological effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside from *Polygonum multiflorum*[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 109923.
- [18] 管淑玉, 苏薇薇. 何首乌的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中南药学, 2008, 33(4): 454-455.
- [19] 姜建辉, 张志强, 汤丹丹, 等. 基于多元统计分析的产地制何首乌品质评价研究[J]. 中南药学, 2021, 19(2): 285-289.
- [20] 杨欢欢, 井继雪, 崔悦, 等. 制何首乌不同提取物的肝毒性血浆代谢组学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(2): 139-146, 163.
- [21] 黄晓冰, 黄霁霞, 王光宁, 等. HPLC 测定不同产地何首乌中二苯乙烯苷和蒽醌类成分的含量[J]. 食品与药品, 2019, 21(2): 111-115.
- [22] 李欣, 孟磊, 魏胜利, 等. 不同产地何首乌药材质量及差异研究[J]. 中国现代中药, 2020, 22(3): 384-390.
- [23] 李皓翔, 袁一鸣, 梅全喜, 等. 何首乌和德庆何首乌的考证及发展现状[J]. 中国药业, 2021, 30(21): 123-127.

(收稿日期: 2023-02-09; 修回日期: 2023-03-28)

盐酸替罗非班注射液中对映异构体分析方法的建立

崔芹芹^{1, 2, 3}, 刘阿利^{1, 2, 3}, 王昭钦^{1, 2, 3}, 袁丹^{1, 2, 3}, 赵文杰^{1, 2, 3} (1. 鲁南贝特制药有限公司, 山东 临沂 276000; 2. 药物新制剂研发山东省工程研究中心, 山东 临沂 276000; 3. 国家手性制药工程技术研究中心, 山东 临沂 276000)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法分析盐酸替罗非班注射液中的对映异构体。**方法** 采用 Ultron ES-OVM (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 甲酸铵溶液 (用甲酸调节溶液的 pH 值为 4.0) - 甲醇 (85 : 15), 等度洗脱 30 min, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 检测波长 227 nm, 进样量 100 μL。**结果** 盐酸替罗非班与其对映异构体能有效分离, 分离度大于 2.0, 溶液在室温条件下 12 h 内稳定。对映异构体浓度在 0.025 ~ 0.375 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r = 0.9999$); 低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 100.86%、96.86%、98.04%, RSD 分别为 2.7%、1.4%、2.1% ($n = 3$)。以自身对照法计算对映异构体含量不大于 0.5%。**结论** 本法可用于盐酸替罗非班注射液中对映异构体的检测。

关键词: 盐酸替罗非班注射液; 对映异构体; 高效液相色谱; 分析方法

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1640-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.037

Determination of enantiomer in tirofiban hydrochloride injection

CUI Qin-qin^{1, 2, 3}, LIU A-li^{1, 2, 3}, WANG Zhao-qin^{1, 2, 3}, YUAN Dan^{1, 2, 3}, ZHAO Wen-jie^{1, 2, 3} (1. Lunan Better Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong 276000; 2. Shandong Engineering Research Center for Research and Development of New Drugs, Linyi Shandong 276000; 3. National Chiral Pharmaceutical Engineering and Technology Research Center, Linyi Shandong 276000)

Abstract: Objective To determine the enantiomer in tirofiban hydrochloride injection by HPLC. **Methods** The Ultron ES-OVM column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was 0.1% ammonium formate solution (pH of the solution adjusted to 4.0 with formic acid) and methanol (85 : 15), and equivalent elution for 30 min. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, the temperature was 25℃, the detection wavelength was 227 nm, and the injection volume was 100 μL. **Results** Tirofiban hydrochloride and enantiomer were effectively separated with the resolution over 2.0. The solution was stable within 12 h at room temperature. The concentration of enantiomers showed good linearity within 0.025 ~ 0.375 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$). The average recoveries were 100.86%, 96.86%, and 98.04% at low, medium and high concentrations with the RSD of 2.7%, 1.4%, and 2.1%, respectively ($n = 3$). The content of enantiomers calculated by self comparison method were not more than 0.5%. **Conclusion** The method is suitable for the determination of enantiomers in tirofiban hydrochloride injection.

Key words: tirofiban hydrochloride injection; enantiomer; HPLC; analysis method

盐酸替罗非班, 化学名为 *N*-(丁磺酰基)-*O*-[4-(4-哌啶基)丁基]-*L*-酪氨酸盐酸盐一水合物, 是一种非肽类血小板表面糖蛋白 (GP II b/III a) 受体拮抗剂, 可阻止纤维蛋白原与 GP II b/III a 受体结合, 从而阻断血小板的交联及血小板的聚集^[1-2], 是一种很有发展前途的抗血小板药, 临床上与肝素联用用于预防不稳定型心绞痛或非 Q 波形心肌梗

死患者, 预防心脏缺血事件, 同时也用于冠脉缺血综合征患者进行冠脉血管成形术或冠脉内斑块切除术, 以预防与经治冠脉突然闭塞有关的心脏缺血并发症^[3-7]。

盐酸替罗非班具有一个手性碳原子, 结构中含有 *L* 型酪氨酸片段, *D* 型为合成工艺中引入的光学异构体^[8]。目前在临床上以 *L* 异构体形式给药, *D*

型作为杂质需严格控制其含量。该药原料及制剂在国内已有上市,但《中国药典》尚未收载。

吴燕等^[9]报道了手性高效液相色谱法测定盐酸替罗非班光学异构体,杨彩霞^[10]报道了 HPLC 测定盐酸替罗非班氯化钠注射液中的 *D*-异构体,胡小燕等^[11]报道了 HPLC 法测定盐酸替罗非班注射液中光学异构体。盐酸替罗非班注射液作为一种注射剂,主成分浓度是一定的,且浓度较低,采用正相检测方法处理样品相对复杂,开发一种简便、专属性好、准确度高的检测方法非常有必要。本文以盐酸替罗非班注射液为研究对象,参考相关文献和指导原则^[12-14],对盐酸替罗非班注射液中的对映异构体开展研究,建立了相应的分析方法,为盐酸替罗非班注射液的质量控制提供有效保障,盐酸替罗非班化学结构式见图 1。

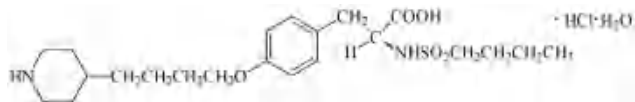


图 1 盐酸替罗非班

Fig 1 Tirofiban hydrochloride

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)、色谱柱(Ultrons ES-OVM, 4.6 mm×150 mm, 5 μm)、XS105 型电子天平、pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)。消旋盐酸替罗非班对照品(纯度:100%,中国食品药品检定研究院),盐酸替罗非班注射液自制制剂,甲酸、甲酸铵为分析纯,甲醇为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultrons ES-OVM (4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相为 0.1% 甲酸铵溶液(用甲酸调节 pH 为 4.0)-甲醇(85:15),等度洗脱;流速 0.5 mL·min⁻¹;柱温 25℃;检测波长 227 nm;进样量 100 μL。按照《中国药典》2020 年版四部通则(0512)检测^[12]。

2.2 系统适用性

精密称取消旋盐酸替罗非班对照品(对映异构体与主成分量 1:1)适量,置 50 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置 25 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,配制成质量浓度约为 50 μg·mL⁻¹的溶液,作为系统适用性试验溶液,8.046 min 的峰为对映异构体,9.623 min 的峰为主成分,分离度为 2.2 (见图 2)。

2.3 波长选择

通过二极管阵列检测器对主成分和已知杂质

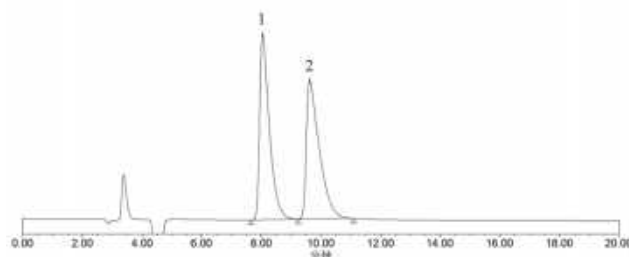


图 2 系统适用性色谱图

Fig 2 System applicability chromatogram

1. 对映异构体(enantiomer); 2. 盐酸替罗非班(tirofiban hydrochloride)进行考察,发现主成分和已知杂质均在 227 nm 处有最大吸收,且辅料在此波长处无干扰,因此,采用 227 nm 为检测波长。

2.4 专属性考察

取测定浓度的空白辅料适量进行测定,结果显示,空白辅料在主成分及对映异构体峰位置处不出峰,对测定没有干扰(见图 3)。

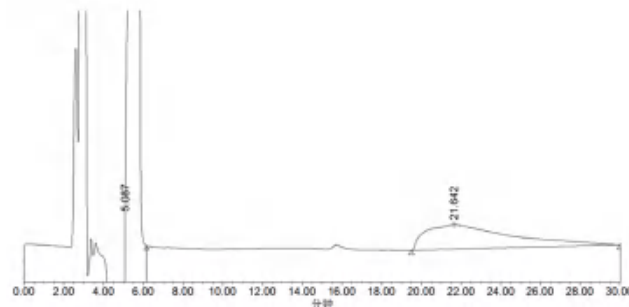


图 3 空白辅料溶液色谱图

Fig 3 Blank excipient solution chromatogram

2.5 溶液的稳定性

2.5.1 对照品储备液的配制 取消旋盐酸替罗非班对照品适量,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取此溶液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,得质量浓度约为 50 μg·mL⁻¹的溶液,作为储备液①。

2.5.2 对照品溶液稳定性 取储备液① 1.0 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释制成质量浓度约为 0.5 μg·mL⁻¹的溶液,摇匀,作为对照品溶液,室温放置,分别于配制后 0、2、4、6、8、10、12 h 取样测定,结果 RSD 为 1.9%,说明在室温条件下 12 h 内稳定。

2.5.3 供试品溶液稳定性 取储备液① 1.0 mL,置 100 mL 量瓶中,加盐酸替罗非班注射液定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液;室温放置,分别于配制后 0、2、4、6、8、10、12 h 取样测定,结果供试品溶液在室温条件下放置 12 h,对映异构体峰面积的 RSD 值小于 2.0%,说明供试品溶液在室温条件下 12 h 内稳定。

2.6 线性试验

精密量取储备液① 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度约为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为储备液②。

分别精密量取储备液② 0.5、1、2.5、5.0、6.0、7.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 得质量浓度分别约为 0.05、0.10、0.25、0.50、0.60、0.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 其中对映异构体的质量浓度分别为 0.025、0.05、0.125、0.25、0.30、0.375 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 进样测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得线性方程: $Y = 160.99X - 0.0492$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明对映异构体在 0.025 ~ 0.375 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.7 定量限和检测限

精密量取储备液② 0.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释制成对映异构体质量浓度约为 0.025 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为定量限溶液, 约为供试品浓度的 0.05%, 精密量取适量, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 信噪比为 15.1; 取定量限溶液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 混匀, 作为检测限溶液, 精密量取适量, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 信噪比为 5.7。结果计算得定量限为 2.56 ng, 检测限为 0.77 ng。

2.8 加样回收试验

精密量取储备液① 0.5、1、1.5 mL 分别置 100 mL 量瓶中, 加盐酸替罗非班注射液定容至刻度, 摇匀, 配成相当于 50%、100%、150% 浓度的溶液, 进样测定, 记录色谱图。采用外标法计算盐酸替罗非班注射液中对映异构体的含量, 扣除样品中已知的对映异构体后与加入量进行比较, 计算加样回收率。结果对映异构体低、中、高浓度的平均回收率分别为 100.86%、96.86%、98.04% ($n = 3$), RSD 分别为 2.7%、1.4%、2.1%。说明本方法测定对映异构体回收率符合要求。

2.9 精密度试验

分别精密量取储备液② 2.5、5.0、7.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释制成对映异构体的质量浓度分别为 0.125、0.25、0.375 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液; 每个浓度同法配制 3 份, 分别注入液相色谱仪, 依法测定, 计算 RSD , 结果 3 种浓度的 RSD 值分别为 1.0%、1.5%、1.1%, 表明本方法精密度良好。

2.10 耐用性试验

通过改变检测波长、柱温、流速、流动相的比例、pH 值, 考察检测方法参数微小变动对系统适用性试验溶液和对映异构体测定结果的影响,

结果表明系统适用性试验溶液中对映异构体和主峰的分离度均符合要求, 空白辅料不干扰对映异构体的检测, 检测结果无明显差异, 耐用性良好。

2.11 样品含量测定

按照建立的方法对 3 批样品进行检测, 3 批样品中异构体含量分别为 0.086%、0.085%、0.086%。

3 结论

通过对波长选择、专属性、溶液稳定性、线性与范围、检测限和定量限、准确度、精密度及耐用性进行方法验证, 建立了盐酸替罗非班注射液中对映异构体的 HPLC 分析方法。该方法灵敏度高、专属性强, 适用于盐酸替罗非班注射液中对映异构体的检测, 可用于控制产品质量。

参考文献

- [1] Kellert L, Hametner C, Stampfl S. Response to letter regarding article, endovascular stroke therapy: tirofiban is associated with risk of fatal intracerebral hemorrhage and poor outcome [J]. *Stroke*, 2013, 44 (9): e113.
- [2] 吴依风. 盐酸替罗非班治疗急性冠脉综合征 80 例临床观察 [J]. *中国现代药物应用*, 2009, 3 (8): 114.
- [3] 董春阳. 盐酸替罗非班注射液联合酒石酸美托洛尔治疗急性心肌梗死的效果 [J]. *河南医学研究*, 2019, 28 (12): 2217-2218.
- [4] 曾广伟. 小剂量盐酸替罗非班注射液在老年急性 ST 段抬高型心肌梗死患者经皮冠状动脉介入治疗中的应用效果 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25 (5): 105-108.
- [5] 王蕊, 李正, 王广林. 盐酸替罗非班注射液联合酒石酸美托洛尔治疗急性心肌梗死的效果分析 [J]. *微量元素与健康研究*, 2020, 37 (4): 85-86.
- [6] 李路. 盐酸替罗非班注射液联合酒石酸美托洛尔治疗急性心肌梗死的效果观察 [J]. *健康必读*, 2020 (33): 26-27.
- [7] 盐酸替罗非班注射液 (AGGRASTAT) 进口药品说明书 [R]. *Medicure Pharma, Inc.*
- [8] 郑永勇. 盐酸替罗非班的合成 [J]. *中国医药工业杂志*, 2012, 43 (6): 408-410.
- [9] 吴燕, 林向阳, 张福成. 手性高效液相色谱法测定盐酸替罗非班光学异构体 [J]. *中国药学杂志*, 2014, 49 (13): 1165-1167.
- [10] 杨彩霞. HPLC 法测定盐酸替罗非班氯化钠注射液中的 D-异构体 [J]. *华西药学杂志*, 2014, 29 (6): 714-716.
- [11] 胡小燕, 石胜男, 薛允宁. HPLC 法测定盐酸替罗非注射液光学异构体 [J]. *辽宁化工*, 2022, 51 (4): 569-572.
- [12] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 61-65, 480-485.
- [13] 夏振华, 井凤鸣, 周艳. HPLC 法测定药物主成分及杂质方法验证探讨 [J]. *药学与临床研究*, 2012, 20 (4): 364-366.
- [14] 赵丽佳, 俞炯, 蒋惠娣. 醋酸亮丙瑞林杂质谱研究和有关物质 HPLC 分析方法建立 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37 (8): 1423-1429.

(收稿日期: 2022-11-09; 修回日期: 2023-02-03)

医院药学

固定剂量与按体重调整剂量使用重组人血小板生成素
临床疗效的探索性分析

刘丹娜¹, 陈露², 苏田丽¹, 张玉洁², 赵晓丽², 孔天东^{2*} (河南大学肿瘤医院 (郑州市第三人民医院); 1. 药学部, 2. 肿瘤内科, 郑州 450000)

摘要: **目的** 明确固定剂量或按体重调整剂量使用重组人血小板生成素 (rhTPO) 的疗效及安全性差异。 **方法** 共入组 31 例化疗患者, 采用自身对照模式, 在其整个化疗周期第一次血小板下降至 $< 75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 时给予 rhTPO 干预, 用量为 $300 \text{ u} / (\text{kg} \cdot \text{d})$, 连续使用至多 14 d, 直至血小板回升至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上, 或者较用药前提升 $50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上停药, 以上方案为对照周期; 下个化疗周期结束后仍待血小板下降至 $< 75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 时给予 rhTPO 干预, 用法: $\leq 60 \text{ kg}$, 1 大支 ($15\,000 \text{ u}$); $> 60 \text{ kg}$ 且 $\leq 85 \text{ kg}$, 1 大支 + 1 小支 (7500 u); $> 85 \text{ kg}$, 2 大支, 以上方案为观察周期。评价两种周期化疗后血小板下降的最低值和恢复最高值, 血小板 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 的持续天数, 血小板恢复至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上所需天数, rhTPO 使用量。 **结果** 对照周期和观察周期在血小板下降最低值、血小板恢复最高值、血小板 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 及恢复至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上所需天数方面, 差异均无统计学意义。31 例患者对照周期 rhTPO 累积总用量多于观察周期。两个周期在不良反应方面也无明显差异。 **结论** 固定剂量使用 rhTPO 与传统按体重换算剂量相比临床疗效和不良反应类似, 但能增加安全性及临床用药便捷性。

关键词: 固定剂量; 重组人血小板生成素; 化疗相关性血小板减少症

中图分类号: R973.1, R730.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1643-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.038

Efficacy of fixed dose and body weight adjusted dose of recombinant
human thrombopoietin

LIU Dan-na¹, CHEN Lu², SU Tian-li¹, ZHANG Yu-jie², ZHAO Xiao-li², KONG Tian-dong^{2*} (1. Department of Pharmacy, 2. Department of Oncology, Cancer Hospital of Henan University/the Third People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000)

Abstract: **Objective** To determine the efficacy and safety between fixed dose and weight-adjusted dose of recombinant human thrombopoietin (rhTPO). **Methods** Totally 31 chemotherapy patients were enrolled in this study. Self-control mode was used and rhTPO intervention was given when the platelet decreased to $< 75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ for the first time in the whole chemotherapy cycle at $300 \text{ u} / (\text{kg} \cdot \text{d})$. The intervention continuous to up to 14 days until the platelet recovered to more than $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, or the drug was stopped when increasing by more than $50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ compared with that before the treatment (the control cycle). At the end of the next chemotherapy cycle, rhTPO intervention was given when the platelets decreased to $< 75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$. Specific usage was as follows: $\leq 60 \text{ kg}$, 1 large dose ($15\,000 \text{ u}$); $> 60 \text{ kg}$ and $\leq 85 \text{ kg}$, 1 large dose + 1 small dose (7500

基金项目: 河南省科技攻关计划 (No. 202102310456); 河南省医学科技攻关计划 (No. 2018020746)。

作者简介: 刘丹娜, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: 15427316@qq.com *通信作者: 孔天东, 男, 主任医师, 主要从事肿瘤个体化治疗, email: kongtiandong@126.com

u); > 85 kg, 2 large doses (the observation cycle). The lowest platelet decline and the highest recovery after the two cycles of chemotherapy, the duration of platelet $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, days required for platelet recovery above $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, and the amount of rhTPO were evaluated.

Results There was no significant difference between the control cycle and the observation cycle in the lowest platelet decline, the highest platelet recovery, the number of days needed for platelet $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ and recovery to over $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$. The total amount of rhTPO in the control cycle was higher than that in the observation period in the 31 patients. There was no significant difference in adverse reactions between the two cycles. **Conclusion** The clinical efficacy and adverse reactions of fixed dose rhTPO are similar to those of traditional weight conversion dose, but the former is safer and more convenient.

Key words: fixed dose; recombinant human thrombopoietin; chemotherapy-induced thrombocytopenia

近年来,随着各种新型靶向药物或者免疫治疗药物上市,实体瘤的治疗模式有了很大改变,但化疗仍是大多数肿瘤不可或缺的治疗手段^[1-3]。化疗所致骨髓抑制,尤其是化疗相关性血小板减少症(chemotherapy-induced thrombocytopenia, CIT),是导致化疗延迟或减量的重要原因^[4]。重组人血小板生成素(recombinant human thrombopoietin, rhTPO)是目前治疗或预防 CIT 最常用的药物^[5],但 rhTPO 的商品剂型仅有 7500 u 和 15 000 u 两种,而指南或说明书推荐的标准用法为 $300 u \cdot kg^{-1}$ ^[6-7]。按此推荐标准计算,临床工作中大多数患者的最终使用剂量不能恰好为上述两种剂型的组合,经常需要再加用不到 1 支的量,导致药品浪费,另外临床护士计算注射量较为烦琐,降低用药安全性。目前 rhTPO 即使经过医保谈判,价格仍然较高,如何能在不影响疗效的情况下,尽可能不浪费 rhTPO 使用,显得很有必要。因此,本研究拟探索固定剂量支数使用 rhTPO 治疗 CIT 的临床疗效。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

纳入标准:①经病理确诊的恶性实体瘤患者;②需行化疗,预计需 4~6 周期;③体力状况评分(performance status, PS) 0~1 分;④年龄 18~70 岁;⑤心肝肾功能正常。排除标准:①预计生存期<3 个月;② d1、8 方案化疗者;③骨髓浸润引起血小板下降患者;④血液病引起血小板下降患者;⑤存在活动性细菌或真菌感染或活动性病毒感染的临床证据;⑥依从性差,不能按时化疗或参与设定方案者;⑦治疗期间使用除 rhTPO 外的其他升血小板药物;⑧精神疾患。

1.2 试验药品

rhTPO 规格为 15 000 u/支(大支,国药准字 S20050048)、7500 u/支(小支,国药准字 S20050049)(均为针剂,沈阳三生制药股份有限公司)。

1.3 试验介绍及给药方案

本研究采用前瞻性、自身对照设计模式^[8-9],已通过本院伦理委员会批准(批件号:2020-06-012-Y03)。1 大支 rhTPO = 15 000 u/支,1 小支 rhTPO = 7500 u/支。符合入组条件的化疗患者,在其整个化疗周期第一次血小板下降至 $< 75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 时给予 rhTPO 干预,用量为 $300 u / (kg \cdot d)$,连续使用至多 14 d,直至血小板回升至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上,或者较用药前提升 $50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上停药,以上方案为对照周期;下个周期化疗结束后仍待血小板下降至 $< 75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 时,按 $300 u / (kg \cdot d)$ 的量四舍五入换算给予 rhTPO 干预(见表 1),用法:≤ 60 kg, 1 大支; > 60 kg 且 ≤ 85 kg, 1 大支 + 1 小支; > 85 kg, 2 大支,以上方案为观察周期。考虑到临床便捷性及实际意义,体重计算以每 5 kg 为进阶单位。对照周期及观察周期无化疗药物剂量调整。

表 1 rhTPO 按体重调整的使用量及换算后的固定剂量
Tab 1 Dose of rhTPO adjusted for body weight and fixed dose after the conversion

rhTPO 剂量	体重范围/kg	总量/u	rhTPO 使用量	四舍五入换算量 等价值
300 u · kg ⁻¹	50 ~ 55	15 000	1 大支	1 大支
	55 ~ 60	16 500	1 大支 + 0.2 小支	
	60 ~ 65	18 000	1 大支 + 0.4 小支	
	65 ~ 70	19 500	1 大支 + 0.6 小支	1 大支 + 1 小支
	70 ~ 75	21 000	1 大支 + 0.8 小支	
	75 ~ 80	22 500	1 大支 + 1 小支	
	80 ~ 85	24 000	1 大支 + 1.2 小支	
	85 ~ 90	25 500	1 大支 + 1.4 小支	
	90 ~ 95	27 000	1 大支 + 1.6 小支	2 大支
	95 ~ 100	28 500	1 大支 + 1.8 小支	
	≥ 100	30 000	2 大支	

1.4 观察指标

于化疗前(1~3 d)及化疗第3、5、7、10、13、16 d检测血常规。评价对照周期和观察周期化疗后血小板下降的最低值和恢复最高值,血小板 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 的持续天数,血小板恢复至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上所需天数, rhTPO 使用量。

1.5 统计学方法

本研究采用 SPSS 26.0 软件。计数资料及率的比较采用 pearson χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。计量资料若符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用配对 t 检验;若不符合正态分布,采用中位数表示,采用非参数检验。 $\alpha = 0.05$, 双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入组患者临床资料

根据纳排标准,于 2020 年 9 月—2021 年 12 月在本中心共入组符合条件患者 40 例,9 例因各种原因中途退组,实际完成对照周期和观察周期的患者 31 例,其入组流程及一般资料特征见表 2。

表 2 完成治疗患者临床特征 ($n = 31$)

Tab 2 Clinical characteristics of the patients completed treatment ($n = 31$)

临床特征	n (%)
年龄(岁)	
> 60	13 (41.9)
≤ 60	18 (58.1)
性别	
男	20 (64.5)
女	11 (35.5)
PS 评分(分)	
0	16 (51.6)
1	10 (32.3)
2	5 (16.1)
瘤种	
肺癌	15 (48.4)
乳腺癌	5 (16.1)
胃癌	3 (9.7)
大肠癌	4 (12.9)
其他	4 (12.9)
既往治疗	
初治	24 (77.4)
复治	7 (22.6)
骨转移	
有	11 (35.5)
无	20 (64.5)

2.2 血小板下降最低值及恢复最高值

对照周期血小板下降最低值为 $(42 \pm 15) \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 观察周期为 $(36 \pm 16) \times 10^9 \cdot L^{-1}$,

差异无统计学意义($t = 1.768$, $P = 0.087$)。对照周期血小板恢复最高值为 $(196 \pm 67) \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 观察周期为 $(179 \pm 54) \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 差异无统计学意义($t = 1.096$, $P = 0.282$)。见图 1。

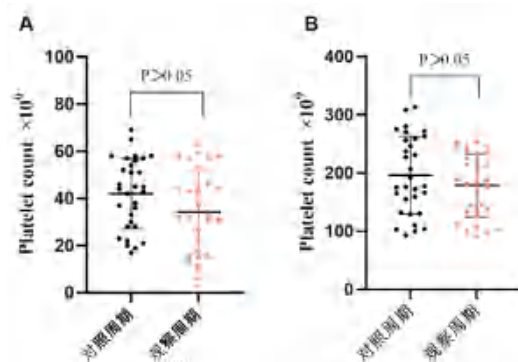


图 1 对照周期及观察周期血小板计数比较

Fig 1 Platelet count of the control cycle and the observation cycle

A. 最低值 (lowest); B. 恢复最高值 (restore to the maximum value)

2.3 血小板 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 及恢复至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上所需天数

血小板最低值 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 对照周期共有 19 例, 观察周期共有 24 例。两个治疗周期血小板 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 的天数分别为 3 d (1~13) 和 4 d (1~12) ($Z = 1.035$, $P = 0.301$), 差异无统计学意义。回升至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上的中位天数, 对照周期为 5 d (3~15), 观察周期为 6 d (3~16) ($Z = 0.235$, $P = 0.217$), 差异无统计学意义(见表 3)。

2.4 rhTPO 使用量

31 例入组患者, 对照周期 rhTPO 总用量, 大支为 200 支, 小支为 117 支; 观察周期 rhTPO 总用量, 大支为 192 支, 小支为 86 支, 观察周期总体 rhTPO 使用量少于对照周期。两个治疗周期每位患者平均用量比较, 对照周期大支用量为 (6.5 ± 2.6) 支, 观察周期为 (6.2 ± 2.6) 支, 差异无统计学意义($t = 0.524$, $P = 0.604$); 对照周期小支用量为 (3.8 ± 3.6) 支, 观察周期为 (2.8 ± 3.6) 支, 差异无统计学意义($t = 1.573$, $P = 0.126$)(见表 3)。

2.5 不良反应

两种使用周期患者, 不良反应方面类似, 主要为发热、关节痛、头晕、乏力等。其中对照周期共有 7 例患者出现不良反应, 发热 1 例, 关节痛 2 例, 头晕 2 例, 乏力 2 例, 均为 1~2 度; 观察周期共有 5 例患者出现不良反应, 发热 1 例, 关节痛 2 例, 头晕 1 例, 乏力 1 例, 均为 1~2 度。

3 讨论

表 3 两个周期治疗后的结果对比

Tab 3 Outcomes of the two cycles of treatment

周期	血小板 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 天数		血小板回升至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$		rhTPO 使用总量 / 支		rhTPO 平均使用量 / 支	
	例数	持续天数 / d	例数	所需天数 / d	大支	小支	大支	小支
对照周期	19	3 (1 ~ 13)	31	5 (3 ~ 15)	200	117	6.5 ± 2.6	3.8 ± 3.6
观察周期	24	4 (1 ~ 12)	31	6 (3 ~ 16)	192	86	6.2 ± 2.6	2.8 ± 3.6
Z/t		1.035		0.235	—	—	0.524	1.573
P		0.301		0.217	—	—	0.604	0.126

多年来, CIT 一直是导致化疗延迟或化疗减量的重要原因^[4, 10]。在临床实践或指南推荐中, rhTPO 仍是治疗或者预防 CIT 的最主要药物, 且其推荐的标准用量为根据体重计算为 $300 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[7]。按体重标准计算的 rhTPO 使用量, 存在剂型规格、剂量换算等方面的不便之处, 除了造成安全隐患, 还可能导致药物浪费。因此, 寻找安全、有效的替代给药方案, 采用固定剂量代替按体重换算剂量, 将为 rhTPO 的临床使用带来便利。

近年来, 以定量药理学为基础的药物研发或临床替代剂量选择方案研究方兴未艾^[11]。目前在肿瘤治疗领域研究较多的为 PD-1/PD-L1 固定剂量使用^[12]。例如纳武利尤单抗传统剂量为 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 但使用非常不便, 通过临床药理学方法评估 240 mg 固定剂量相对于 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 在暴露量、安全性和功效上基本相似^[13], 因此 FDA 批准 240 mg 的固定剂量给药方案。另外一个类似的研究药物为硫培非格司亭, 该药批准上市使用剂量为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 考虑到药物使用的便捷性, 分别进行了一项 II 期和 III 期研究, 结果显示 6 mg 固定剂量与 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量在疗效、安全性方面无明显差异^[14-15], 因此目前指南推荐 6 mg 固定剂量使用^[16]。

但目前对于 rhTPO, 国内外尚无固定剂量使用方面的研究, 临床使用非常不便。本研究结果显示, 基于不同体重范围的固定剂量支数使用 rhTPO 与传统体重换算剂量相比, 在化疗后血小板下降最低值、血小板恢复最高值、血小板 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 的天数及恢复至 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以上所需天数方面, 差异均无统计学意义。在 rhTPO 使用量方面, 虽然两种剂量使用方案各患者平均使用量差异无统计学意义, 但在总体人群累积使用总量方面, 观察周期大支、小支分别为 192、86 支, 均少于对照周期的 200、117 支。

安全性方面, 两种使用方法均无明显差异, 主要为发热、关节痛、头晕、乏力等。与既往

rhTPO 临床研究的不良反应发生情况类似^[17-19]。

综上所述, 本研究初步显示基于体重范围的固定剂量使用 rhTPO 与传统单纯体重换算剂量相比临床疗效和不良反应类似, 但能增加临床用药便捷性, 减少用药差错; 另外在总体人群中的累积使用量也明显少于传统用药方式, 具有较高的卫生经济学特点。但本研究也存在着入组样本量较少, 非随机研究, 以及未使用完全交叉研究等缺陷, 期待今后开展大样本随机对照研究进一步明确最佳固定剂量。

参考文献

- [1] El-Hussein A, Manoto SL, Ombinda-Lemboumba S, et al. A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 21 (2): 149-161.
- [2] Chang L, Ruiz P, Ito T, et al. Targeting pan-essential genes in cancer: challenges and opportunities [J]. Cancer Cell, 2021, 39 (4): 466-479.
- [3] Azizi AA, Lamarca A, McNamara MG, et al. Chemotherapy for advanced gallbladder cancer (GBC): a systematic review and meta-analysis [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2021, 163: 103328.
- [4] Al-Samkari H, Soff GA. Clinical challenges and promising therapies for chemotherapy-induced thrombocytopenia [J]. Expert Rev Hematol, 2021, 14 (5): 437-448.
- [5] 史艳侠, 邢镭元, 张俊, 等. 中国肿瘤化疗相关性血小板减少症专家诊疗共识 (2019 版) [J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46 (18): 923-929.
- [6] 李焕, 刘洪悦, 张志圣, 等. 化疗所致血小板减少症的治疗药物选择 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53 (6): 467-471.
- [7] 肿瘤化疗所致血小板减少症诊疗中国专家共识 (2018 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40 (9): 714-720.
- [8] 朱海龙, 张璇. 重组人血小板生成素单用或联合重组人白介素-11 减轻三阴性乳腺癌患者化疗 GP 方案导致血小板减少 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2019, 40 (16): 1998-2001.
- [9] 钟辉, 闫晓红, 崔翠花, 等. 重组人血小板生成素预防吉西他滨化疗相关血小板减少症的临床观察 [J]. 癌症进展, 2016, 14 (10): 1010-1012.
- [10] Moik F, Makatsariya A, Ay C. Challenging anticoagu-

- lation cases: cancer-associated venous thromboembolism and chemotherapy-induced thrombocytopenia-A case-based review of clinical management [J]. *Thromb Res*, 2021, 199: 38-42.
- [11] 胡志皇, 常建华. PD-1/PD-L1 抑制剂的剂量选择与优化 [J]. *中国肿瘤*, 2021, 30 (5): 385-392.
- [12] 刘维, 薛钧升, 于之恒, 等.《基于药代动力学方法支持 PD-1/PD-L1 单抗治疗肿瘤患者的替代剂量方案选择指南》解读 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2022, 27 (1): 86-94.
- [13] Zhao X, Suryawanshi S, Hruska M, et al. Assessment of nivolumab benefit-risk profile of a 240-mg flat dose relative to a 3-mg/kg dosing regimen in patients with advanced tumors [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28 (8): 2002-2008.
- [14] Xu F, Zhang Y, Miao Z, et al. Efficacy and safety of mectapegfilgrastim for prophylaxis of chemotherapy-induced neutropenia in patients with breast cancer: a randomized, multicenter, active-controlled phase III trial [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7 (18): 482.
- [15] Xu F, Zhang Y, Miao Z, et al. Erratum to efficacy and safety of mectapegfilgrastim for prophylaxis of chemotherapy-induced neutropenia in patients with breast cancer: a randomized, multicenter, active-controlled phase III trial [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (10): 660.
- [16] 马军, 秦叔逵, 朱军, 等. 硫培非格司亭临床应用专家共识 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2020, 25 (5): 461-465.
- [17] 白春梅, 邹晓阳, 赵永强, 等. 重组人血小板生成素治疗化疗诱导的重度血小板减少的临床研究 [J]. *中华医学杂志*, 2004 (5): 49-52.
- [18] 王理扬, 蒙荣钦, 张瑜, 等. 重组人血小板生成素治疗肿瘤化疗后血小板减少的临床观察 [J]. *华西医学*, 2010, 25 (9): 1686-1688.
- [19] 吴全睿, 赵永强, 储大同, 等. 重组人血小板生成素治疗肿瘤患者化疗后血小板减少症的疗效和安全性: II/III 期及补充多中心随机对照临床试验的汇总分析 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20 (6): 645-653.

(收稿日期: 2022-10-07; 修回日期: 2022-11-10)

左乙拉西坦致横纹肌溶解的临床特征分析

孙文静, 何阳, 龙远雄, 陈镇, 欧阳林旗, 邓桂明* (湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

摘要: **目的** 探讨左乙拉西坦致横纹肌溶解的临床特点。 **方法** 检索中英文数据库, 收集左乙拉西坦致横纹肌溶解的病例报道, 提取患者相关信息, 进行描述性统计分析。 **结果** 共检索到左乙拉西坦致横纹肌溶解的病例报道文献 16 篇, 涉及患者 16 例 (男性 11 例, 女性 5 例), 中位年龄是 26 岁 (13, 62)。10 例患者用左乙拉西坦治疗全身性强直-阵挛性发作, 3 例患者用于全身性癫痫发作, 2 例患者治疗复杂的部分性癫痫发作, 1 例患者治疗良性癫痫。6 例患者合并其他疾病, 10 例患者同时使用了其他药物。左乙拉西坦导致横纹肌溶解的中位时间为 2 d (1, 365)。9 例患者出现临床症状, 包括肌痛 6 例, 下肢肌无力 2 例, 血尿 1 例。实验室检查发现肌酸激酶中位值为 $15\,811\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ (986, 49\,539), 其中 10 例患者肌酸激酶 $> 15\,000\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, 属于重度横纹肌溶解。5 例患者出现急性肾损伤。3 例患者尿液检查显示肌红蛋白阳性, 4 例患者血清肌红蛋白升高。患者停用左乙拉西坦, 给予对症治疗, 症状和肌酸激酶逐渐恢复正常, 肌酸激酶恢复到正常水平的中位时间为 6.5 d (3, 40)。 **结论** 左乙拉西坦相关横纹肌溶解可发生在用药后 1 ~ 365 d, 多发生在用药 2 周内, 肌酸激酶水平多呈重度升高。停用左乙拉西坦后症状消失和肌酸激酶恢复正常。

关键词: 左乙拉西坦; 横纹肌溶解症; 抗癫痫药物; 肌酸激酶

中图分类号: R69.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1647-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.039

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: 孙文静, 女, 硕士研究生, 主要从事药理学研究, email: sunwenjing@stu.hnucm.edu.cn * **通信作者:** 邓桂明, 女, 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

Clinical features of rhabdomyolysis induced by levetiracetam

SUN Wen-jing, HE Yang, LONG Yuan-xiong, CHEN Zhen, OU YANG Lin-qi, DENG Gui-ming* (*The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007*)

Abstract: Objective To determine the clinical characteristics of levetiracetam-induced rhabdomyolysis. **Methods** We searched Chinese and English databases, collected related case reports, and analyzed patient data. **Results** Totally 16 reports of levetiracetam-induced rhabdomyolysis were retrieved, involving 16 patients (11 males and 5 females), with a median age of 26 years (13, 62). Levetiracetam was used to treat generalized tonic-clonic seizures in 10 patients, generalized seizures in 3 patients, complex partial seizures in 2 patients, and benign epilepsy in 1 patient. Six patients had comorbidities and 10 patients had combined medications. The median time for levetiracetam to cause rhabdomyolysis was 2 days (1, 365). Nine patients showed clinical symptoms, including myalgia in 6 patients, lower extremity muscle weakness in 2 patients, and hematuria in 1 patient. Laboratory examination found that the median value of creatine kinase was $15\,811\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ (986, 49\,539), and 10 patients with creatine kinase (CK) $> 15\,000\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ had severe rhabdomyolysis. Acute kidney injury occurred in 5 patients. Urine examinations of 3 patients showed positive myoglobin, and 4 patients had elevated serum myoglobin. Levetiracetam was stopped and symptomatic treatment was given. The creatine kinase gradually returned to normal, and symptoms disappeared with a median of 6.5 d (3, 40). **Conclusion** Levetiracetam-related rhabdomyolysis can occur from 1 to 365 days after the treatment, mostly within 2 weeks of treatment, and the level of creatine kinase is often much increased. Symptoms disappear and creatine kinase returns to normal after discontinuation of levetiracetam.

Key words: levetiracetam; rhabdomyolysis; antiepileptic drug; creatine kinase

左乙拉西坦 (levetiracetam, LEV) 是一种乙酰吡咯烷类抗癫痫药物, 于 1999 年 FDA 批准上市。左乙拉西坦抗癫痫作用的确切机制尚不清楚, 目前的研究发现可能是通过与脑内突触囊泡蛋白 (synaptic vesicle 2A, SV2A) 结合, 减少兴奋性神经递质的释放有关。此外, N 型钙通道阻滞作用和间接的增强氨基丁酸和甘氨酸能神经元抑制也参与了部分抗癫痫机制^[1-2]。目前适用于成人及 4 岁以上癫痫部分性发作、肌阵挛发作及原发性全身性强直-阵挛发作的辅助治疗, 局灶性癫痫的单药治疗和苯二氮草类难治性持续癫痫患者二线药物选择^[3]。

左乙拉西坦耐受性相对较好, 并且大多数不良反应是轻中度的, 常见的不良反应有嗜睡、乏力、头晕、头痛、行为障碍, 常发生于治疗早期^[4]。越来越多的病例报道表明左乙拉西坦是导致横纹肌溶解症的药物之一。然而对于左乙拉西坦诱导的横纹肌溶解症的临床特征尚不清楚。笔者通过对收集左乙拉西坦相关的横纹肌溶解的病例报道

进行分析, 探讨左乙拉西坦相关的横纹肌溶解的临床特点, 为临床合理使用左乙拉西坦提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

以“左乙拉西坦”“横纹肌溶解”“肌痛”和“Levetiracetam”“rhabdomyolysis”“myopathy”分别为中、英文关键词, 检索中国知网、万方、维普数据库、PubMed、Ovid、Web of Science、Embase、Springer-link 和 Wiley Online Library (截至 2022 年 12 月), 收集左乙拉西坦致横纹肌溶解的病例报道。

1.2 纳入和排除标准

文献纳入标准: 左乙拉西坦导致的横纹肌溶解的病例报道, 血清肌酸激酶 (CK) 大于 $1000\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 且应包括完整治疗过程、临床表现、实验室检查、预后。排除标准: 动物研究, 机制研究, 会议论文, 毕业论文, 综述及重复发表的文献, 仅有摘要而无全文的文献。

1.3 方法

由不同的研究者独立对文献进行初步筛选,然后提取患者相关信息(性别、年龄、国籍、基础疾病、联合用药、药物剂量及给药途径、临床表现、实验室检查结果、治疗及预后情况等)。对提取的各类数据进行描述性统计分析。

采用诺氏(Naranjo's)药物不良反应评估量表制订的评价标准,评价左乙拉西坦与横纹肌溶解的关联性。根据评价结果,可将药物不良反应分为确定的(≥ 9 分),很可能的(5~8分),可能的(1~4分),可疑的(≤ 0 分)^[5]。根据CK升高的水平对横纹肌溶解症严重程度进行分类:轻度横纹肌溶解症(CK 1000~5000 U·L⁻¹),中度横纹肌溶解症(CK 5000~15 000 U·L⁻¹),重度横纹肌溶解症(CK > 15 000 U·L⁻¹)^[6]。

1.4 数据处理

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料采用以中位值(最小值,最大值)表示,计数资料进行描述性统计分析。

2 结果

2.1 文献收集及患者一般情况

共检索到16篇文献^[7-22],涉及患者16例,其中男性11例,女性5例,中位年龄是26岁(13,62)(见表1)。来自美国7例,日本和土耳其各2例,法国、巴基斯坦、阿联酋、意大利和西班牙各1例。左乙拉西坦用于治疗全身性强直-阵挛性发作10例,全身性癫痫发作3例,复杂的部分性癫痫发作2例,良性癫痫1例。2例患者有吸毒史。6例患者有基础疾病,其中1例患者自闭症,1例患者星形细胞瘤,1例患者智力障碍,1例患者轻度贫血,1例患者烟雾病,1例患者同时合并精神分裂症、高血压、双相情感障碍。16例患者在使用左乙拉西坦后癫痫均得到控制。

2.2 用药情况

15例患者描述了左乙拉西坦给药剂量,其中2例患者的给药方案始终为1000 mg bid iv; 1例患者始终为500 mg qd po; 2例患者剂量始终为1000 mg qd po或注射; 3例患者给予了负荷剂量(2例1 g, 1例2 g),然后给予维持剂量500 mg bid; 3例患者进行剂量滴定[其中1例患者250 mg·d⁻¹滴定至500 mg·d⁻¹; 1例患者10 mg/(kg·d)滴定至20 mg/(kg·d) po; 1例患者首次两剂500 mg,后续750 mg bid iv]; 4例患者首次静脉注射,随后给予口服,剂量分别为750 mg bid、500 mg bid、500 mg qd。10例患者同时使用

了其他药物,其中3例患者使用1种药物,4例患者使用2种药物,2例患者使用3种药物,1例患者同时使用了4种药物。5例患者合用其他抗癫痫药物,4例患者合用苯二氮草类药物,3例患者合用肝素类,1例患者合用质子泵抑制剂,1例患者合用麻醉药物,1例患者合用抗精神病药物,1例患者合用巴比妥类药物,1例患者合用抗抑郁药物,1例患者合用抗胆碱药物。

2.3 横纹肌溶解出现时间、临床表现

2.3.1 症状出现时间 15例患者描述了症状出现时间。左乙拉西坦导致横纹肌溶解的中位时间为2 d(1,365),其中12例患者出现横纹肌溶解时间为3 d内,2例患者在给药后1~2周,1例患者使用时间长达1年。

2.3.2 临床表现 9例患者出现临床症状,其中6例患者出现肌痛(主要发生在腰背部和下肢),2例患者表现为下肢肌无力,1例患者出现血尿; 7例患者无任何症状。

2.4 实验室检查

16例患者均描述了横纹肌溶解时血清CK水平,CK中位值为15 811 U·L⁻¹(986,49 539),其中5例患者CK低于5000 U·L⁻¹,1例患者CK处于5000~15 000 U·L⁻¹,10例患者CK>15 000 U·L⁻¹。5例患者出现急性肾损伤,肌酐中位值为2.19 mg·dL⁻¹(1.51,4.67)。3例患者尿液检查显示肌红蛋白阳性,4例患者血清肌红蛋白升高,1例患者出现蛋白尿,1例患者出现低钠血症。

2.5 治疗及预后

所有患者立即停用左乙拉西坦,其中10例患者给予水化治疗,8例患者转换为其他抗癫痫药物,其中转换为丙戊酸钠3例,其余转换为苯巴比妥、苯妥英钠、拉考沙胺和奥卡西平各1例,转换为托吡酯和拉考沙胺1例。所有患者症状和CK逐渐恢复正常,CK恢复到正常水平的中位时间为6.5 d(3,40)。

2.6 关联性评价

根据诺氏评估量表评价结果,对16例患者左乙拉西坦与横纹肌溶解的关联性进行评价,结果判定为很可能的12例(6~8分),可能的4例(3~4分)。

3 讨论

横纹肌溶解症是一种常见的,由肌肉组织的分解和坏死以及细胞内内容物释放到血流中引起的临床综合征。横纹肌溶解症的典型三联征是无

表 1 左乙拉西坦致横纹肌溶解的 16 例患者的临床资料
Tab 1 Clinical data of 16 patients with rhabdomyolysis induced by levetiracetam

文献	基础信息	合并用药	用药目的	用法用量	横纹肌溶解出现时间	临床表现	CK 最高值 / (U·L ⁻¹)	肌酐 / (mg·dL ⁻¹)	治疗及预后
[7]	男, 30 岁, 自闭症	无	全身性强直 - 阵挛性发作	不明	2 d	不明	37 622	不明	停药, 水化, 4 d 后 CK 恢复到正常水; 随访 2 年, 横纹肌溶解未发作
[8]	男, 16 岁, 无基础病	劳拉西泮	全身性强直 - 阵挛性	首次静脉注射, 然后 750 mg bid po	2 d	腰骶部, 上背部和大腿疼痛	15 111	2.2	停药, 水化, 改用双丙戊酸钠, 10 d 后 CK 水平和肾功能均恢复正常
[9]	女, 48 岁, 星形细胞瘤	无	全身性癫痫发作	第 1 日静脉注射, 随后口服, 2 d 总剂量 1000 mg	3 d	肌痛	8199	无	停药, 改用苯巴比妥, 6 d 后 CK 恢复正常
[10]	男, 28 岁, 无	地西泮, 咪达唑仑, 依诺肝素	全身性发作	1000 mg bid ivgtt	1 d	无	1559	4.67	停药, 水化, 改用拉考沙胺, 10 d 后, 肌酐、CK 和白蛋白排泄率恢复正常
[11]	女, 26 岁, 智力障碍	卡马西平, 苯巴比妥	复杂的部分性和继发性全身性癫痫	500 mg qd po	15 d	无法站立, 双腿近端肌无力	2723	无	停药, 11 d 后 CK 恢复正常
[12]	男, 43 岁, 无	托吡酯	全身性强直 - 阵挛性发作	1000 mg qd ivgtt	1 d	无	29 750	无	停药, 改用托吡酯和拉考沙胺, CK 一周内恢复正常
[13]	男, 19 岁, 无	奥卡西平, 劳拉西泮	复杂的部分性癫痫发作	首次 2000 mg ivgtt 然后 500 mg qd po	1 d	血尿	29 136	2.17	停药, 1 d 后肌酐水平正常, CK 一个月后恢复正常
[14]	男, 25 岁, 无	氯巴占, 埃索美拉唑, 丙泊酚, 依诺肝素	全身性强直 - 阵挛性发作	500 mg bid, 不明	2 d	无	15 811	无	停药, 水化, 改为丙戊酸, 3 d 后 CK 恢复正常
[15]	女, 23 岁, 无	劳拉西泮	全身性强直 - 阵挛性发作	负荷剂量 1 g, 后 500 mg bid, 不明	2 d	肌痛, 食欲下降	1368	4.22	停药, 水化, 改用苯妥英治疗; 6 d 后 CK 和肌酐水平均正常
[16]	女, 29 岁, 无	丙戊酸钠, 苯妥英	全身性强直 - 阵挛性发作	1000 mg qd po	2 d	肌痛 (背痛) 和双下肢无力	2410	不明	停药, 丙戊酸钠, CK 和症状迅速改善至正常
[17]	女, 13 岁, 无	无	良性癫痫	250 mg·d ⁻¹ 滴定至 500 mg·d ⁻¹	7 d	轻微肌痛	986	无	停药, 水化, 停药后 CK 和血红蛋白水平逐渐恢复至正常
[18]	男, 27 岁, 烟雾病	肝素, 多库酯	全身性强直 - 阵挛性发作	1000 mg bid ivgtt	第 2 次给药后 8 h	无	49 539	不明	用药 6 剂后停药, 40 d 后 CK 恢复正常
[19]	男, 62 岁, 无	无	全身性强直 - 阵挛性发作	负荷剂量 1 g, 后 500 mg bid,	不明	肌痛、背痛	19 518	无	停药, 水化, 改用奥卡西平, CK 迅速下降
[20]	男, 15 岁, 轻度贫血	无	癫痫发作	10 mg/(kg·d) 滴定至 20 mg/(kg·d) po	1 年	肌痛 (尤其下肢)	26 798	无	停药, 碱化, 水化, 5 d 后 CK 恢复正常
[21]	男, 22 岁, 无	无	全身性强直 - 阵挛性发作	首次静脉注射, 随后 500 mg bid po	第 1 次给药后 8 h	无	21 936	无	停药, 水化, 9 d 后 CK 恢复正常
[22]	男, 42 岁, 精神分裂症, 高血压, 双相情感障碍	苯扎托品, 利培酮, 曲唑酮	全身性强直 - 阵挛性发作	首次两剂 500 mg, 后 750 mg bid ivgtt	3 d	无	30 000	1.51	停药, 水化, 4 d 后 CK 和肾功能改善

力、肌痛及茶色尿, 经典三联征仅发生在 < 10% 的患者中, > 50% 的患者没有肌肉疼痛或无力^[6]。部分患者可能会出现非特异性症状, 如发烧、不适、恶心和呕吐^[23]。随后可能出现急性肾

损伤、弥散性血管内凝血和多器官功能衰竭的临床表现。横纹肌溶解症最常见原因是毒物或酒精滥用、药物使用、创伤、恶性综合征、感染和遗传代谢性疾病^[22]。引起横纹肌溶解的常见药物包

括他汀类药物、贝特类药物、精神科药物、抗菌药物等^[6]。横纹肌溶解症目前尚无统一的共识标准,诊断大部分是基于血清 CK 升高至正常上限的 10 倍以上^[22]。

左乙拉西坦不与血浆蛋白结合,给药剂量的三分之一通过非肝脏水解代谢,其余的以原形经肾脏排泄^[23]。因其良好的药动学、极少的药物相互作用以及具有口服和静脉给药形式而成为指南推荐治疗癫痫肌阵挛发作和局灶性发作的一线药物。左乙拉西坦剂型主要分为普通片剂(250、500、750 和 1000 mg),口服溶液(100 mg·mL⁻¹),注射剂(100 mg·mL⁻¹)和缓释剂型(500 和 750 mg)^[24]。横纹肌溶解症是左乙拉西坦罕见的不良反应。根据左乙拉西坦的上市信息,日本服用该药的患者横纹肌溶解的发生率极低,为 0.001%~0.001 25%^[14]。本研究发现左乙拉西坦诱导的横纹肌溶解症主要发生在 30 岁以下的青年患者中,只有 1 例患者的年龄在 60 岁以上。观察到的峰值 CK 水平变化很大,范围在 996~49 539 U·L⁻¹。根据 CK 升高水平进行的横纹肌溶解症的分类,62.5% 的患者属于重度横纹肌溶解。肌肉疼痛是左乙拉西坦诱导横纹肌溶解的主要临床表现,部分患者无任何临床症状。药物诱导的横纹肌溶解发生的时间因所涉及的药物类型而异。对于抗菌药物,尤其是喹诺酮类,横纹肌溶解通常在开始治疗后的 1~6 d 内发生,而对于他汀类药物,通常在药物开始或剂量增加后 1 个月内发生^[25-26]。左乙拉西坦诱导的横纹肌溶解通常发生在用药 3 d 内,个别患者可长达 1 年。

左乙拉西坦引起横纹肌溶解的确切机制尚不清楚。目前提出的一种理论是左乙拉西坦除与大脑中突触小泡中的 SV2A 蛋白相互作用外,还与慢肌纤维运动神经末梢中的 SV2A 蛋白相互作用,导致胆碱能神经传递增强和肌肉压力增加,从而导致横纹肌溶解^[27]。横纹肌溶解症在男性、非裔美国人、年龄<10 岁和>60 岁的人群以及体质量指数>40 kg·m⁻²的人群中更为常见^[22]。多种因素可能使使用左乙拉西坦的患者易患横纹肌溶解症,包括癫痫发作、低钠血症和伴随药物。Brigo 等^[28]指出癫痫发作也会导致肌酸磷酸激酶(CPK)轻微升高(<180 U·L⁻¹),峰值出现在 36~40 h。低钠血症与横纹肌溶解有关^[29]。患者同时联用了其他可能导致横纹肌溶解的药物,如利培酮、苯妥英、丙戊酸钠和丙泊酚^[30-31]。此外,左乙拉西坦可能导致肌肉发达的患者的横纹

肌溶解^[14, 19]。Moinuddin 等^[21]认为 CK 峰值水平可能与患者肌肉质量有关。本研究发现左乙拉西坦在低剂量也可诱发横纹肌溶解,说明横纹肌溶解症可能与左乙拉西坦剂量无关。横纹肌溶解此前被报道与丙泊酚输注综合征有关^[32],与丙泊酚输注剂量高、持续时间超过 48 h 之间存在关联。本研究还发现口服或低剂量静脉滴注也可诱发横纹肌溶解,故推测横纹肌溶解症可能与左乙拉西坦的静脉滴注无关。上述结果需要更多的临床病例予以证实。

药物诱导的横纹肌溶解症的治疗措施包括及时停用致病药物,早期大量补液,保护肾功能,积极处理并发症。急性肾损伤是横纹肌溶解症最严重的并发症,发生率为 7%~10%^[33]。早期识别和补液治疗对于预防肾损伤至关重要。患者一旦出现急性肾损伤,需要血液透析或血液净化以除去肌肉受损释放出的尿素和钾。在大多数情况下,急性肾损伤是完全可逆的,多数患者在几个月内恢复功能^[22]。横纹肌溶解症的预后在很大程度上取决于潜在的病因和相关的并发症。尽管目前缺乏随机对照研究,但来自病例报道和小型回顾性研究的证据表明,横纹肌溶解症在早期积极治疗时具有良好的预后。

左乙拉西坦尽管具有良好的耐受性,仍可能在某些患者中引起横纹肌溶解症。因此,临床医师需要意识到并警惕左乙拉西坦的这种罕见不良反应,尤其是在治疗的早期阶段,对所有患者进行常规 CK 水平和肾功能监测。如果发现 CK 水平显著升高,则考虑更换抗癫痫药物。

参考文献

- [1] Klitgaard H, Matagne A, Nicolas JM, et al. Brivaracetam: rationale for discovery and preclinical profile of a selective SV2A ligand for epilepsy treatment [J]. *Epilepsia*, 2016, 57 (4): 538-548.
- [2] Madeja M, Margineanu DG, Gorji A, et al. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? [J]. *Neuropharmacology*, 2003, 45 (5): 661-671.
- [3] Howard P, Remi J, Remi C, et al. Levetiracetam [J]. *J Pain Symptom Manage*, 2018, 56 (4): 645-649.
- [4] Verrotti A, Prezioso G, Di Sabatino F, et al. The adverse event profile of levetiracetam: a meta-analysis on children and adults [J]. *Seizure*, 2015, 31: 49-55.
- [5] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1981, 30 (2): 239-245.
- [6] Cabral BMI, Edding SN, Portocarrero JP, et al. Rhabdo-

- myolysis [J]. *Dis Mon*, 2020, 66 (8): 101015.
- [7] Sivasambu B, Yogarajah M. Levetiracetam induced rhabdomyolysis [J]. *Crit Care*, 2015, 148 (4): 277A.
- [8] Singh R, Patel DR, Pejka S. Rhabdomyolysis in a hospitalized 16-year-old boy: a rarely reported underlying cause [J]. *Case Rep Pediatr*, 2016, 2016: 7873813.
- [9] Rota E, Arena L, Celli L, et al. Levetiracetam-induced rhabdomyolysis: the first Italian case [J]. *Neurol Sci*, 2018, 39 (9): 1629-1630.
- [10] Mena-Martin FJ, Gutierrez-Garcia A, Martin-Escudero JC, et al. Acute kidney injury and creatine kinase elevation after beginning treatment with levetiracetam [J]. *Eur Neurol Rev*, 2018, 13 (2): 113.
- [11] Kubota K, Yamamoto T, Kawamoto M, et al. Levetiracetam-induced rhabdomyolysis: a case report and literature review [J]. *Neurology Asia*, 2017, 22 (3): 275-278.
- [12] Shahbaz N, Younus SM, Khan SA, et al. Levetiracetam induced increase in creatine phosphokinase levels. *N Shahbaz [J]. J Coll Physicians Surg Pak*, 2017, 27 (3): S63-S64.
- [13] Isaacson JE, Choe DJ, Doherty MJ. Creatine phosphokinase elevation exacerbated by levetiracetam therapy [J]. *Epilepsy Behav Case Rep*, 2014, 2: 189-191.
- [14] Ramon M, Tourteau E, Lemaire N, et al. Hyper CKemia induced by levetiracetam [J]. *Presse Med*, 2016, 45 (10): 943-944.
- [15] Spengler DC, Montouris GD, Hohler AD. Levetiracetam as a possible contributor to acute kidney injury [J]. *Clin Ther*, 2014, 36 (8): 1303-1306.
- [16] Akiyama H, Haga Y, Sasaki N, et al. A case of rhabdomyolysis in which levetiracetam was suspected as the cause [J]. *Epilepsy Behav Case Rep*, 2014, 2: 152-155.
- [17] Incek F, Herguner OM, Besen S, et al. Acute rhabdomyolysis associated with levetiracetam therapy in a child [J]. *Acta Neurol Belg*, 2016, 116 (3): 369-370.
- [18] Di Lorenzo R, Li Y. Rhabdomyolysis associated with levetiracetam administration [J]. *Muscle Nerve*, 2017, 56 (1): E1-E2.
- [19] Thomas L, Mirza MMF, Shaikh NA, et al. Rhabdomyolysis: a rare adverse effect of levetiracetam [J]. *BMJ Case Rep*, 2019, 12 (8): e230851.
- [20] Aslan N, Yildizdas D, Huseynli B, et al. Levetiracetam treatment-associated acute rhabdomyolysis in an adolescent [J]. *J Pediatr Intensive Care*, 2020, 9 (2): 139-140.
- [21] Moinuddin IA. Suspected levetiracetam-induced rhabdomyolysis: a case report and literature review [J]. *Am J Case Rep*, 2020, 21: e926064.
- [22] Rastogi V, Singh D, Kaur B, et al. Rhabdomyolysis: a rare adverse effect of levetiracetam [J]. *Cureus*, 2018, 10 (5): e2705.
- [23] Patsalos PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43 (11): 707-724.
- [24] Elsayed EF, Reilly RF. Rhabdomyolysis: a review, with emphasis on the pediatric population [J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25 (1): 7-18.
- [25] Hsiao SH, Chang CM, Tsao CJ, et al. Acute rhabdomyolysis associated with ofloxacin/levofloxacin therapy [J]. *Ann Pharmacother*, 2005, 39: 146-149.
- [26] Tournadre A. Statins, myalgia, and rhabdomyolysis [J]. *Joint Bone Spine*, 2020, 87 (1): 37-42.
- [27] Carnovale C, Gentili M, Antoniazzi S, et al. Levetiracetam induced rhabdomyolysis: analysis of reports from the FDA adverse event reporting system database [J]. *Muscle Nerve*, 2017, 56 (6): E176-178.
- [28] Brigo F, Igwe SC, Erro R, et al. Postictal serum creatine kinase for the differential diagnosis of epileptic seizures and psychogenic non-epileptic seizures: a systematic review [J]. *J Neurol*, 2015, 262 (2): 251-257.
- [29] Kashiura M, Sugiyama K, Hamabe Y. Association between rapid serum sodium correction and rhabdomyolysis in water intoxication: a retrospective cohort study [J]. *J Intensive Care*, 2017, 5: 37.
- [30] Star K, Iessa N, Almandil NB, et al. Rhabdomyolysis reported for children and adolescents treated with antipsychotic medicines: a case series analysis [J]. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2012, 22 (6): 440-451.
- [31] Hemphill S, McMenamin L, Bellamy MC, et al. Propofol infusion syndrome: a structured literature review and analysis of published case reports [J]. *Br J Anaesth*, 2019, 122 (4): 448-459.
- [32] Kam PC, Cardone D. Propofol infusion syndrome [J]. *Anaesthesia*, 2007, 62 (7): 690-701.
- [33] Zutt R, van der Kooi AJ, Linthorst GE, et al. Rhabdomyolysis: review of the literature [J]. *Neuromuscular Disorders*, 2014, 24 (8): 651-659.

(收稿日期: 2023-01-06; 修回日期: 2023-03-09)

重症耶氏肺孢子菌肺炎患者复方磺胺甲噁唑 血药浓度监测的临床研究

潘欢妍^{1, 2, 3}, 祁慧⁴, 梁培^{3, 4}, 安姝润^{1, 2, 3}, 李俐³ (1. 中国药科大学南京鼓楼医院, 南京 210009; 2. 中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 210009; 3. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008; 4. 南京大学医学院附属鼓楼医院重症医学科, 南京 210008)

摘要: **目的** 通过监测复方磺胺甲噁唑 (SMX-TMP) 治疗耶氏肺孢子菌肺炎 (PCP) 血药峰浓度 ($C_{\max}$) 水平, 评价其临床效果及不良反应。**方法** 回顾性分析 2016 年 3 月至 2022 年 8 月 60 例重症患者接受 SMX-TMP 治疗 PCP 的临床资料, 记录患者磺胺甲噁唑 (SMX) $C_{\max}$ 水平, 评估临床治疗结局, 评价药物不良反应等。**结果** SMX 初始平均 $C_{\max}$ 为 $118.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 浓度范围分布广泛 (IQR, $97.84 \sim 172.80$), 初始给药剂量与 SMX 初始 $C_{\max}$ 成显著正相关 ($r^2 = 0.099$, $P = 0.014$); 治疗过程中 68.33% 的患者 SMX $C_{\max}$ 可以达到预先设定的目标水平; 患者的总体死亡率为 51.66%, 治疗过程中无法达到目标水平是 PCP 患者临床治疗失败率和 28 d 全因死亡的危险因素 ($P < 0.05$); 与 SMX-TMP 相关的不良反应发生率为 35.00%, 患者 SMX $C_{\max}$ 高于目标水平时肾功能损伤的发生率显著增加 ($P < 0.05$)。**结论** 在 PCP 患者治疗期间监测 SMX 水平可以改善患者的临床结局, 减少不良反应的发生。

关键词: 耶氏肺孢子菌肺炎; 复方磺胺甲噁唑; 治疗药物监测; 重症患者

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1653-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.040

Concentration monitoring of compound sulfamethoxazole in patients with severe pneumocystis jassinii pneumonia

PAN Huan-yan^{1, 2, 3}, QI Hui⁴, LIANG Pei^{3, 4}, AN Shu-run^{1, 2, 3}, LI Li³ (1. Nanjing Drum Tower Hospital, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 2. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 3. Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University, Nanjing 210008; 4. Department of Critical Care Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008)

Abstract: **Objective** To determine the clinical efficacy and adverse reactions of sulfamethoxazole and trimethoprim (SMX-TMP) in the treatment of pneumocystis carinii pneumonia (PCP) by monitoring the $C_{\max}$ of SMX-TMP. **Methods** This study retrospectively analyzed the clinical data of 60 critically ill patients who received SMX-TMP for PCP from March 2016 to August 2022. The $C_{\max}$ level of SMX was recorded, the clinical treatment outcome was assessed, and the adverse drug reactions were evaluated. **Results** The initial average $C_{\max}$ of SMX was $118.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the concentration range was wide (IQR, $97.84 \sim 172.80$). The initial dose was positively correlated with the initial $C_{\max}$ of SMX ($r^2 = 0.099$, $P = 0.014$). During the treatment, 68.33% patients of SMX $C_{\max}$ reached the preset target level. The overall mortality rate of patients was 51.66%. Failure to reach the target level during the treatment was a risk factor for treatment failure and 28-day all-cause death in PCP patients ($P < 0.05$). The incidence of adverse reactions associated with SMX-TMP was 35.00%, and the incidence of renal dysfunction was significantly increased when SMX $C_{\max}$ was higher than the target level ($P < 0.05$). **Conclusion** Monitoring SMX $C_{\max}$ levels during the treatment of PCP

作者简介: 潘欢妍, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药理学和医院药学研究, email: 1033620695@qq.com * 通信作者: 李俐, 女, 主任药师, 主要从事临床药理学和管理药学研究, email: njgllily@163.com

patients helps improve the clinical outcome of patients and reduce the incidence of adverse reactions.

Key words: pneumocystis jassinii pneumonia; compound sulfamethoxazole; therapeutic drug monitoring; critically ill patient

耶氏肺孢子菌肺炎 (PCP) 是一种急性的、严重威胁生命的机会性感染, 在免疫功能低下的群体中具有较高的发病率^[1-2], 复方磺胺甲噁唑 (SMX-TMP) 被认为是治疗 PCP 的一线治疗方法, 但是接受 SMX-TMP 治疗的患者的不良反应发生率高^[3-4], 且接受治疗后患者的死亡率也仍然很高, 总体死亡率高达 48% ~ 67%^[5]。SMX-TMP 的药代动力学研究显示其具有显著的个体间药代动力学差异^[6]。因此在治疗过程中可通过治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM) 优化临床结局、减少不良反应, 这也是评估 SMX-TMP 治疗的有效性和安全性的重要方法。先前的研究主张将磺胺甲噁唑 (SMX) 的目标峰浓度 ($C_{\max}$) 水平定为 100 ~ 150 mg · L⁻¹^[7], 以实现 SMX-TMP 的最大化治疗效果。因此本研究开展回顾性研究, 评估重症患者 SMX $C_{\max}$ 与患者的临床结局和不良反应的关系, 为优化临床治疗方案提供参考。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集 2016 年 3 月至 2022 年 8 月入住南京鼓楼医院重症医学科诊断为 PCP 的患者的临床资料, 进行回顾性研究。纳入标准: ① 使用 SMX-TMP 进行抗感染治疗并且用药疗程 ≥ 72 h; ② 治疗期间监测 SMX-TMP 的血药浓度。排除标准: ① 年龄 < 18 岁; ② 妊娠或哺乳期患者; ③ 使用 SMX-TMP 预防性或经验性给药。

1.2 数据收集

通过医院的电子病历系统收集患者的一般资料, 包括性别、年龄、临床诊断、急性生理和慢性健康评分 (APACHE II 评分)、序贯器官衰竭估计评分 (SOFA 评分)、合并疾病 (高血压、糖尿病、肿瘤、肾功能损伤和自身免疫性疾病等)、年龄校正 Charison 合并症指数 (aCCI)、既往用药史 (激素和免疫抑制治疗史)、SMX-TMP 的用药情况 (初始治疗剂量、初始治疗持续时间和疗程)、SMX 血药浓度监测结果、治疗过程中的不良反应和临床转归等。复方磺胺甲噁唑片 (特一药业, 规格: SMX 0.4 g, 甲氧苄啶 80 mg)。

1.3 临床结局及不良反应判定标准

主要结局指标是患者 28 d 全因死亡率, 次要结局指标是 PCP 的临床治疗失败率 (出科时患者的临床症状和体征无好转, 影像学较治疗前无明显改善, 感染指标未恢复正常)。记录患者治疗期间发生的不良反应, 根据美国国家癌症研究所不良反应通用术语标准 ([CTCAE] 5.0 版) 对不良反应进行了定义和分级, 主要包括血液毒性、肝毒性、肾毒性和电解质异常等, 分为轻度 (1 级)、中度 (2 级)、严重 (3 级)、危及生命 (4 级) 和死亡相关 (5 级)。本研究将 CTCAE ≥ 3 级的不良反应定义为严重不良反应。

1.4 统计学分析

所有数据用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。首先进行 Shapiro-Wilk 正态性检验, 对定量数据, 符合正态分布用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 连续非正态分布计量资料用中位数 (M) 以及四分位数间距 (IQR) 表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验 (正态分布) 或者是非参数检验 (非正态分布)。分类变量用百分比表示, 两组间比较使用皮尔逊卡方检验、连续性校正检验或曼希尔精确检验。SMX 日剂量 (mg · kg⁻¹) 与 SMX $C_{\max}$ (mg · L⁻¹) 之间的关系用简单的线性回归模型评估。使用单因素和多因素 COX 比例风险模型估计 SMX $C_{\max}$ 水平组之间的风险比 (HR)。使用 Kaplan-Meier 方法对不同 SMX $C_{\max}$ 组的临床治疗失败率和全因死亡率进行描述。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本情况

2016 年 3 月至 2022 年 8 月共有 61 例重症患者感染 PCP, 根据排除标准排除 1 例妊娠状态患者, 最终纳入 60 例研究对象。死亡组和存活组患者除了间质性肺炎和系统性红斑狼疮的发生率外, 其他基线特征相似 (见表 1)。

2.2 SMX $C_{\max}$ 监测结果

在 SMX-TMP 治疗开始后的中位数 4.0 d (IQR, 3.0 ~ 5.0) 测量 SMX 初始 $C_{\max}$ 水平。SMX $C_{\max}$ 的中位数为 118.98 mg · L⁻¹ (IQR, 97.84 ~ 172.80), 21 个 $C_{\max}$ (35.00%) 在预定的目标范围内, SMX-TMP 剂量 [SMX 组分 (mg · kg⁻¹)] 与初始 $C_{\max}$ 成显著正

表 1 60 例 PCP 感染患者的一般情况
Tab 1 General information of 60 patients with PCP infection

临床特征	总人群 (n = 60)	分组		统计值	P
		死亡组 (n = 31)	存活组 (n = 29)		
女/[n(%)]	37 (61.66)	21 (67.74)	16 (55.17)	0.002	0.923
年龄/岁	54.13±11.97	56.76±17.41	51.34±12.19	1.637	0.172
体质量/kg	57.52±1.33	57.27±10.64	57.79±10.16	0.132	0.849
APACHE II	23.0 (18.5, 24.5)	23.0 (20.0, 25.0)	23.0 (17.0, 24.5)	0.804	0.201
SOFA 评分/分	6.0 (4.0, 9.0)	6.0 (4.5, 9.0)	6.0 (4.0, 8.5)	0.818	0.785
基础性疾病/[n(%)]					
糖尿病	9 (15.00)	6 (19.35)	3 (10.34)	0.378	0.539
高血压	23 (38.33)	14 (45.16)	9 (31.03)	1.265	0.261
肿瘤	12 (20.00)	7 (22.58)	5 (17.24)	1.729	0.189
肾功能损伤	13 (21.67)	9 (29.03)	4 (13.79)	2.050	0.152
间质性肺炎	17 (28.33)	14 (45.16)	3 (10.34)	8.945	0.003
aCCI	4.0 (2.0, 6.0)	5.0 (2.0, 6.0)	3.0 (2.0, 6.0)	0.662	0.511
自身免疫性疾病/[n(%)]	38 (63.33)	20 (64.52)	18 (62.07)	0.039	0.844
类风湿关节炎	8 (13.33)	7 (22.58)	1 (3.45)	0.200	0.655
系统性红斑狼疮	9 (15.00)	1 (3.23)	8 (27.59)	5.194	0.023
皮炎	7 (11.66)	4 (12.90)	3 (10.34)	0.000	1.000
混合性结缔组织病	1 (1.67)	1 (3.23)	0 (0.00)	0.000	1.000
多血管炎	5 (8.33)	2 (6.45)	3 (10.34)	0.006	0.938
干燥综合征	8 (13.33)	5 (16.13)	3 (10.34)	0.078	0.781
肾病综合征	5 (8.33)	0 (0.00)	5 (17.24)	3.792	0.051
实体器官移植	5 (8.33)	3 (9.68)	2 (6.90)	0.000	1.000
连续性肾脏替代疗法 (CRRT)	22 (36.67)	13 (41.94)	9 (31.03)	0.767	0.381
既往激素治疗	44 (73.33)	25 (80.65)	19 (65.52)	1.753	0.185
既往免疫抑制治疗	41 (68.33)	20 (64.52)	21 (72.41)	0.432	0.511
初始 SMX 剂量/(mg·kg ⁻¹)	68.40±2.48	70.12±18.11	66.57±20.44	0.047	0.480
治疗疗程/d	16 (7, 21)	13 (7, 19)	20 (8, 21)	1.249	0.786
联合卡泊芬净治疗	57 (95.00)	29 (93.55)	28 (96.55)	1.313	0.252

相关 ($r^2 = 0.099$, $P = 0.014$), 见图 1。SMX 初始峰值水平组间年龄和肾功能损伤的基线特征存在显著差异 (见表 2)。

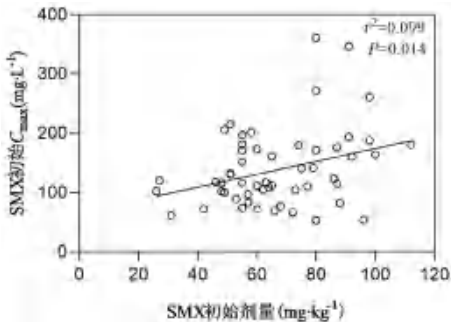


图 1 SMX 初始 C_{max} 和初始给药剂量之间的关系
Fig 1 Relationship between initial SMX peak concentration and initial dose

SMX 的纵向 TDM 监测 (治疗过程中的多次 TDM 监测) 结果如表 3 显示, 对于 SMX 初始 C_{max} 低于或高于目标浓度范围的患者, 经过剂量调整后 51.28% (20/39) 的患者可以达到目标浓度范围, 另仍有 48.72% (19/39) 患者治疗过程中始

终无法达到目标浓度范围。

2.3 临床结局

患者接受 SMX-TMP 治疗后, 总体临床治疗失败率为 63.33% (n = 38), 其中有 31 名患者在治疗过程中死亡, 另有 1 例患者因骨髓抑制而停药, 6 例患者疗程结束后在仍未治愈的情况下转科/转院继续治疗。在单因素 COX 回归分析中 (见表 4), 低于目标水平组和目标水平组的临床失败率没有差异, 高于目标水平的患者的临床失败率显著高于目标水平组。低于目标水平组和目标水平组内的 28 d 全因死亡率没有差异, 高于目标水平的患者的临床失败率与目标组也没有显著差异。SMX 初始 C_{max} 低于或高于目标浓度均是导致临床治疗失败和 28 d 全因死亡的危险因素。

SMX 的纵向 TDM 监测结果显示, 患者经过剂量调整后 C_{max} 达到目标浓度和初始 C_{max} 即达标患者之间的临床治疗失败率与 28 d 全因死亡率没有显著差异, 而 SMX C_{max} 始终未达标是患者临床治疗失败和 28 d 全因死亡的危险因素 (见表 5)。

表 2 SMX 初始 $C_{\max}$ 组间基线水平比较

Tab 2 SMX initial $C_{\max}$ baseline level between groups

指标	低于目标水平 ($n = 18$)	目标水平 ($n = 21$)	高于目标水平 ($n = 21$)	P
女性 / n	10	11	16	0.232
年龄 / 岁	57.00 ± 15.78	47.67 ± 14.21	58.14 ± 14.24	0.039
体质量 / kg	56.60 ± 12.14	58.83 ± 11.61	57.01 ± 7.17	0.808
肾功能损伤	6	1	6	0.036
间质性肺炎	4	7	6	0.741
CRRT	10	6	6	0.139
自身免疫性疾病	13	13	12	0.613
初始给药剂量 (SMX) / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	60.06 ± 15.99	60.71 ± 17.73	76.81 ± 18.63	0.017

表 3 SMX $C_{\max}$ 水平达标情况纵向监测 (n)

Tab 3 Longitudinal monitoring of $C_{\max}$ standard of SMX (n)

分组	SMX 初始 $C_{\max}$	剂量调整后 $C_{\max}$	
		达到目标水平	未达到目标水平
低于目标水平	18	7	11
目标水平	21	18	3
高于目标水平	21	13	8

2.4 不良反应

在 60 例 PCP 患者中有 21 例 (35.00%) 患者发生了 25 个 SMX-TMP 相关不良反应, 其中 1 名患者因严重血液系统毒性停止用药。血液系统毒性、高钾血症、肝功能损伤和消化道反应的发生率在不同 $C_{\max}$ 组间没有显著差异 ($P > 0.05$), 肾功能

表 4 SMX $C_{\max}$ 与 28 d 全因死亡和临床治疗失败之间的关系

Tab 4 Association of SMX $C_{\max}$ with 28 d all-cause mortality and clinical treatment failure

临床结局指标	低于目标水平组 vs 目标水平组		高于目标水平组 vs 目标水平组	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
临床治疗失败率 (单因素 COX 模型)	2.079 (0.847, 5.102)	0.110	2.426 (0.982, 5.990)	0.046
临床治疗失败率 (多因素 COX 模型)	6.038 (1.851, 19.098)	0.003	3.094 (1.168, 8.196)	0.023
28 d 全因死亡率 (单因素 COX 模型)	1.472 (0.558, 3.882)	0.434	2.481 (0.935, 6.580)	0.058
28 d 全因死亡率 (多因素 COX 模型)	5.243 (1.407, 19.534)	0.014	3.392 (1.166, 9.867)	0.025

表 5 SMX $C_{\max}$ 与 28 d 全因死亡和临床治疗失败之间的关系

Tab 5 Association of SMX $C_{\max}$ with 28 d all-cause mortality and clinical treatment failure

比较组别 SMX $C_{\max}$	28 d 全因死亡率		临床治疗失败率	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
调整后达标 vs 初始达标	1.178 (0.472, 2.943)	0.756	1.310 (0.561, 3.060)	0.533
始终未达标 vs 初始达标	2.759 (1.027, 7.411)	0.044	2.957 (1.198, 7.299)	0.019
始终未达标 vs 调整后达标	1.360 (0.568, 3.256)	0.488	1.441 (0.657, 3.159)	0.356

损伤主要发生在高 SMX $C_{\max}$ 组 ($P < 0.05$) (见表 6)。如表 7 所示, 患者发生不良反应时的平均给药剂量高于未发生不良反应的患者的给药剂量, 但是组间差异并不显著 ($P > 0.05$), 发生不良反应的患者 SMX 的 $C_{\max}$ 显著高于未发生不良反应的患者 ($P < 0.05$)。

表 6 SMX $C_{\max}$ 与不良反应之间的关系

Tab 6 Relationship between SMX $C_{\max}$ and adverse reactions

不良反应	低于目标水平	目标水平	高于目标水平	P
血液系统毒性	4	2	5	0.469
高钾血症	2	1	4	0.393
肾功能损伤	0	0	3	0.043
肝功能损伤	0	1	1	0.482
消化道反应	0	1	1	0.482
严重不良反应	2	1	6	0.108

表 7 不良反应与 SMX 初始给药剂量和 $C_{\max}$ 结果比较

Tab 7 Adverse reactions and SMX initial dosage and $C_{\max}$

组别	SMX 剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$C_{\max}$ / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
发生不良反应 ($n = 21$)	70.79 ± 21.07	170.01 ± 80.90
未发生不良反应 ($n = 39$)	64.94 ± 18.49	125.14 ± 46.41
P	0.267	0.008

3 讨论

SMX-TMP 是一种常用的抗菌药物, 用于治疗各种病原体感染。本研究回顾分析了 60 例重症 PCP 患者使用 SMX-TMP 治疗后的 SMX $C_{\max}$ 水平与临床治疗有效性和安全性的关系。研究结果显示, 65.00% 的患者初始 SMX $C_{\max}$ 无法达到目标浓度水平, 并且初始 SMX $C_{\max}$ 表现出较大的个体差异。经过剂量调整后, 68.33% 的患者在治疗过程中可以达到目标浓度。治疗过程中始终未达到

目标浓度是临床治疗失败率和 28 d 全因死亡的危险因素, 高 SMX $C_{\max}$ 水平与肾功能损伤的发生相关。本研究结果表明, 常规 TDM 联合 SMX-TMP 治疗可以改善患者的临床结果或减轻毒性。

原发病方面, 合并自身免疫性疾病 38 例 (63.33%), 73.33% 的患者既往接受过激素治疗, 68.33% 的患者既往接受过免疫抑制治疗。值得注意的是, 合并自身免疫性疾病患者的总体死亡率超过 50.00%, 其中合并类风湿关节炎为 87.50%、合并皮炎为 57.14%、合并混合性结缔组织病为 100.00%、合并干燥综合征为 62.50%。以往的研究多集中于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染患者的 PCP 治疗^[8-9], 近年来非 HIV 感染免疫功能低下患者数量不断增加, 较 HIV 感染患者, 非 HIV 感染免疫功能低下的 PCP 患者的特征主要表现为疾病进展迅速, 呼吸衰竭风险更高, 死亡率更高^[10-11], 也给临床医师带来了更大的临床诊断和治疗压力。

血药浓度监测方面, 本研究纳入的 60 个初始 SMX $C_{\max}$ 水平中, 表现出显著的个体间差异 ($53.00 \sim 201.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 仅 35.00% 的初始 SMX $C_{\max}$ 落在 $100 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的目标范围内, 支持了先前的临床研究和药代动力学研究, 这些研究表明与 SMX 的血药峰浓度具有很高的个体间差异性^[6, 12-13]。Blaser 等^[6]通过控制给药和按体重给药观察 SMX $C_{\max}$ 的变化, 结果显示这种血药浓度之间的差异性仍然存在, 并且与各种实验室或临床参数的变化无关。本研究结果显示, SMX 初始 $C_{\max}$ 与初始给药剂量之间存在显著相关性。Dao 等^[14]对 SMX 的初始 $C_{\max}$ 的达标率研究也显示出相近的结果, 仅 29% 的患者的初始血药浓度达标, 并且无论服用高剂量或低剂量的 SMX-TMP, 达标率都很低, 但是患者的 SMX 的峰值中位数略高于本研究结果 ($144.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ vs $118.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。对 SMX $C_{\max}$ 水平进行纵向监测的结果显示虽然 SMX 初始 $C_{\max}$ 达标率并不高, 经过后期的剂量调整, 共计 68.33% 的患者在治疗过程中可以达到目标浓度范围。

剂量调整方面, 由于不良反应的高发生率和初始血药浓度的显著个体差异性, 医师通常会在治疗过程中多次调整剂量。本研究中, 对于初始 SMX $C_{\max}$ 低于目标范围的患者, 8 例患者加量治疗后有 7 例患者 $C_{\max}$ 达标, 而减量或维持剂量治疗的 11 例患者 $C_{\max}$ 始终会低于目标范围; 对于初始 SMX $C_{\max}$ 即达标的患者, 17 例维持剂量治疗或者减量后又加量仍可维持在目标范围, 而 4 例加量治疗的患者中有 3 例患者 $C_{\max}$ 超标; 对

于初始 SMX $C_{\max}$ 高于目标范围的患者, 15 例患者减量治疗后有 13 例患者 $C_{\max}$ 可达标, 6 例患者加量治疗后 $C_{\max}$ 始终高于目标范围。对于初始 SMX $C_{\max}$ 无法达标的患者, 建议增加剂量/减少剂量以达到目标浓度范围。若初始 SMX $C_{\max}$ 低于目标范围的患者仍继续减量, 高于目标范围的患者仍继续加量, SMX $C_{\max}$ 将很难达到目标范围。在本研究对象中, 患者增加/减少的剂量在 $0.4 \sim 4 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ (SMX 组分剂量), 因此对于调整的具体剂量, 仍要结合临床实际情况进行个体化调整^[15-16]。

临床结局方面, 患者的总体临床治疗失败率为 63.33%, 28 d 全因死亡率为 51.67%。原发免疫疾病对患者的 28 d 全因死亡率影响并不显著。SMX $C_{\max}$ 与临床结局的相关性研究结果显示, SMX 初始 $C_{\max}$ 低于或高于目标浓度均是临床治疗失败和 28 d 全因死亡的危险因素。在此基础上, 对 SMX 的纵向 TDM 监测结果进行进一步研究, 发现经过剂量调整后 $C_{\max}$ 达到目标浓度和初始 $C_{\max}$ 即达标的患者临床治疗失败率与 28 d 全因死亡率没有显著差异, 而 SMX $C_{\max}$ 始终未达标是患者临床治疗失败和 28 d 全因死亡的危险因素。Hughes 等^[7]在一项包含 50 例 PCP 患者的随机对照研究中确定低 SMX $C_{\max}$ 与治疗失败有关, 并建议将 $100 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为最佳治疗范围, 这一结论并没有得到充分的肯定^[17], 可能是因为作者仅对患者的初始 SMX $C_{\max}$ 进行了分析。本研究结果支持 Hughes 关于 SMX-TMP 治疗 PCP 的研究结论, 治疗过程中 SMX $C_{\max}$ 是否达到目标浓度范围确实可以影响患者的临床治疗失败率和 28 d 全因死亡率, 并且治疗过程中始终无法达到目标浓度范围的患者更容易发生临床治疗失败和死亡。

安全性方面, 研究结果显示 35.00% 的患者在治疗期间出现不良反应。高 SMX $C_{\max}$ 水平组的不良反应和严重不良反应的发生率较另外两个浓度组更高, 但是除肾功能损伤外组间均没有显著差异。不良反应与 SMX 给药剂量之间的相关性也并不显著。60 名患者中仅一名患者因严重骨髓抑制而停药, 说明患者对 SMX-TMP 治疗的耐受性较高。Klinker 等^[13]建议监测 SMX 水平以减少不良反应, 因为他们发现 SMX-TMP 相关的不良反应发生随着 SMX $C_{\max}$ 的升高以及治疗时间的增加而增加; 而 Hughes 等^[18]研究结果显示不良反应增加与 SMX $C_{\max}$ 之间相关性仅限于某几种不良反应 (如贫血、中性粒细胞减少和氮质血症), 其他

不良反应的发生与 $SMX C_{max}$ 无关。但是两项研究都只包括 HIV 背景下的 PCP 患者。本研究中不良反应的发生虽然与 $SMX C_{max}$ 显著相关,但是与 $SMX-TMP$ 给药剂量并不无关,Campoli 等^[12]针对 $SMX-TMP$ 血清浓度监测的研究也显示相同的结果。

本研究存在一些局限性,首先这是一项单中心、回顾性的分析。其次,研究纳入的样本量较少,可能无法准确识别组间差异。第三,由于重症患者治疗过程的复杂性和剂量调整的不确定性, $SMX C_{max}$ 也会随之改变。建议未来通过多中心、前瞻性、随机对照研究进一步验证临床 TDM 联合 $SMX-TMP$ 治疗的临床益处。

综上,本研究结果显示 $SMX C_{max}$ 达到目标浓度范围可以优化 PCP 治疗的临床结局和最小毒性。在治疗过程中应结合 TDM 监测结果及时进行剂量调整,给予个体化治疗方案,使患者的 $SMX C_{max}$ 尽可能维持在 $100 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 目标水平范围内。

参考文献

- [1] Wang Y, Zhou X, Saimi M, et al. Risk factors of mortality from pneumocystis pneumonia in non-HIV patients: a meta-analysis [J]. *Frontiers in Public Health*, 2021, 9: 680108.
- [2] Lee SH, Huh KH, Joo DJ, et al. Risk factors for pneumocystis jirovecii pneumonia (PJP) in kidney transplantation recipients [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 1571.
- [3] Chang HM, Tsai HC, Lee SS, et al. High daily doses of trimethoprim/sulfamethoxazole are an independent risk factor for adverse reactions in patients with pneumocystis pneumonia and AIDS [J]. *J Chin Med Assoc*, 2016, 79 (6): 314-319.
- [4] Kato H, Samukawa S, Takahashi H, et al. Diagnosis and treatment of pneumocystis jirovecii pneumonia in HIV-infected or non-HIV-infected patients-difficulties in diagnosis and adverse effects of trimethoprim-sulfamethoxazoles [J]. *J Infect Chemother*, 2019, 25 (11): 920-924.
- [5] Zhang G, Chen M, Zhang S, et al. Efficacy of caspofungin combined with trimethoprim/sulfamethoxazole as first-line therapy to treat non-HIV patients with severe pneumocystis pneumonias [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15 (2): 1594-1601.
- [6] Blaser J, Joos B, Opravil M, et al. Variability of serum concentrations of trimethoprim and sulfamethoxazole during high dose therapy [J]. *Infection*, 1993, 21 (4): 206-209.
- [7] Hughes WT, Feldman S, Chaudhary SC, et al. Comparison of pentamidine isethionate and trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of pneumocystis carinii pneumonia [J]. *J Pediatr*, 1978, 92 (2): 285-291.
- [8] Lee BL, Medina I, Benowitz NL, et al. Dapsone, trimethoprim, and sulfamethoxazole plasma levels during treatment of pneumocystis pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Evidence of drug interactions [J]. *Ann Intern Med*, 1989, 110 (8): 606-611.
- [9] BMClean I, Lucas CR, Mashford ML, et al. Modified trimethoprim-sulphamethoxazole doses in pneumocystis carinii pneumonia [J]. *Lancet*, 1987, 2 (8563): 857-858.
- [10] Salzer HJF, Schäfer G, Hoenigl M, et al. Clinical, diagnostic, and treatment disparities between HIV-infected and non-HIV-infected immunocompromised patients with pneumocystis jirovecii pneumonia [J]. *Respiration*, 2018, 96 (1): 52-65.
- [11] Guegan H, Robert-Gangneux F. Molecular diagnosis of pneumocystis pneumonia in immunocompromised patients [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2019, 32 (4): 314-321.
- [12] Campoli CC, Saleh OA, Mara KC, et al. Observational study of the clinical utility of sulfamethoxazole serum level monitoring in the treatment of brain abscesses due to nocardia species [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101 (9): e28951.
- [13] Klinker H, Langmann P, Zilly M, et al. Drug monitoring during the treatment of AIDS-associated pneumocystis carinii pneumonia with trimethoprim-sulfamethoxazole [J]. *J Clin Pharm Ther*, 1998, 23 (2): 149-154.
- [14] Dao BD, Barreto JN, Wolf RC, et al. Serum peak sulfamethoxazole concentrations demonstrate difficulty in achieving a target range: a retrospective cohort study [J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2014, 76: 104-109.
- [15] 姚芳, 路敏, 孔妍, 等. 耶氏肺孢子虫肺炎患者复方磺胺甲噁唑剂量调整分析 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38 (3): 267-269.
- [16] Haseeb A, Abourehab MAS, Almalki WA, et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole (bactrim) dose optimization in pneumocystis jirovecii pneumonia (PCP) management: a systematic review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19 (5): 2833.
- [17] Ice LL, Barreto JN, Dao BD, et al. Relationship of sulfamethoxazole therapeutic drug monitoring to clinical efficacy and toxicity: a retrospective cohort study [J]. *Ther Drug Monit*, 2016, 38 (3): 319-326.
- [18] Hughes WT, LaFon SW, Scott JD, et al. Adverse events associated with trimethoprim-sulfamethoxazole and atovaquone during the treatment of AIDS-related pneumocystis carinii pneumonia [J]. *J Infect Dis*, 1995, 171 (5): 1295-1301.

(收稿日期: 2023-01-04; 修回日期: 2023-03-15)

粒细胞或粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子致肺毒性临床特征分析

向必晓^{1, 2}, 左笑丛^{1, 2*}, 谢悦良² (1. 遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563003; 2. 中南大学湘雅三医院药学部, 长沙 410013)

摘要: **目的** 探讨粒细胞或粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (G-CSF 或 GM-CSF) 致肺毒性的临床特点。**方法** 检索中国知网、万方、维普、PubMed、Embase 数据库自建库至 2022 年 8 月 31 日期间发表的关于 G-CSF 或 GM-CSF 致肺毒性的病例报道, 对其进行回顾性分析。**结果** 共纳入 34 例患者, 中位年龄为 59 岁 (3 ~ 82 岁); 肺部症状多在 G-CSF 或 GM-CSF 给药后第 5 日出现, 主要表现为呼吸困难 (64.7%)、发热 (47.1%)、咳嗽 (20.6%); 影像学特征以双侧肺渗出 (82.1%) 和肺间质性损伤 (50.0%) 为主。在停用 G-CSF 或 GM-CSF 并接受治疗干预 (包括糖皮质激素和吸氧治疗) 后, 25 例 (73.5%) 患者症状改善。**结论** 肺毒性是 G-CSF 或 GM-CSF 罕见的不良反应, 早期诊断、及时停药和治疗干预对预后有重要意义。G-CSF 或 GM-CSF 治疗期间应加强呼吸困难、咳嗽和发烧等症状的监测, 警惕 G-CSF 或 GM-CSF 导致肺毒性的发生。

关键词: 粒细胞集落刺激因子; 粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子; 肺毒性; 不良反应; 文献分析
中图分类号: R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)06-1659-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.041

Clinical features of pulmonary toxicity induced by granulocytes or granulocyte-macrophage colony-stimulating factors

XIANG Bi-xiao^{1, 2}, ZUO Xiao-cong^{1, 2*}, XIE Yue-liang² (1. College of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563003; 2. Department of Pharmacy, The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013)

Abstract: Objective To determine the clinical features of pulmonary toxicity induced by granulocyte-(macrophage) colony-stimulating factors (G-CSF or GM-CSF). **Methods** We collected and analyzed case reports from the inception to August 31st, 2022 in CNKI, Wanfang, VIP, PubMed and Embase databases on pulmonary toxicity induced by G-CSF or GM-CSF retrospectively. **Results** Totally 34 patients were included. The median age of patients was 59 years (3 ~ 82). The median time of onset of clinical symptoms was 5 days after G-CSF or GM-CSF administration. Common initial symptoms included dyspnea (64.7%), fever (47.1%), and cough (20.6%). The main radiological features were characterized by exudation (82.1%) and interstitial lung damage (50.0%) in bilateral lungs. After the discontinuation of G-CSF or GM-CSF and starting the therapeutic interventions (including glucocorticoids and oxygen therapy), 25 patients (73.5%) recovered. **Conclusion** Pulmonary toxicity is a reversible reaction of G-CSF or GM-CSF. Earlier diagnosis, cessation of G-CSF or GM-CSF and therapeutic interventions are important for prognosis. Attention should be paid to possible pulmonary toxicity in patients with symptoms such as dyspnea, cough, and fever during G-CSF or GM-CSF treatment.

Key words: granulocyte colony-stimulating factor; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; pulmonary toxicity; adverse drug reaction; literature analysis

基金项目: 药源性器官损伤智能防控湖南省工程研究中心 (No.40); 中南大学教育教学改革研究项目 (No. 2022jy168-2)。

作者简介: 向必晓, 男, 硕士研究生, 主要从事医院药学和临床药学研究, email: xiangbx29@163.com * **通信作者:** 左笑丛, 女, 教授, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事临床药学与临床药理学研究, email: zuoxc08@126.com

粒细胞或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(G-CSF 或 GM-CSF)是一类可促进或增强中性粒细胞祖细胞和成熟中性粒细胞的存活、增殖、分化和功能的细胞因子^[1]。目前, G-CSF 广泛应用于预防和化疗引起的中性粒细胞减少、治疗骨髓造血功能障碍或骨髓增生异常综合征引起的中性粒细胞减少等^[2]。此外, G-CSF 也被用于动员外周血干细胞, 并成为临床上造血干细胞首选动员剂^[3-4]。

研究显示, G-CSF 可降低新型冠状病毒感染(COVID-19)伴有淋巴细胞减少但无合并症的患者发展为重症和死亡的风险^[5-6]。然而, 也有案例报道称, 患者在使用 G-CSF 或 GM-CSF 期间出现诱发或加重肺损伤, 干扰临床诊疗^[7-8]。1991 年, 首次报道了一名成年人在 GM-CSF 和阿糖胞苷治疗期间出现了致命的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[9]。自此, G-CSF 或 GM-CSF 致肺毒性的病例相继被报道, 近年来呈上升趋势^[10-12]。

目前, 对于 G-CSF 或 GM-CSF 肺毒性的认识主要基于病例报告, 对其临床特征、易感人群和治疗转归仍不明确。本研究拟通过对 G-CSF 或 GM-CSF 相关的肺毒性的临床特征、诊断、治疗与转归进行归纳分析, 为 G-CSF 或 GM-CSF 的临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

检索中国知网、万方、维普数据库、PubMed、Embase 数据库检索了自建库到 2022 年 8 月 31 日报道的 G-CSF 或 GM-CSF 致肺毒性的案例文献, 以“粒细胞集落刺激因子”“粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子”“非格司汀”“肺毒性”“肺损伤”“肺炎”“G-CSF”“rhG-CSF”“filgrastim”“pegfilgrastim”“lenograstim”“GM-CSF”“hrGM-CSF”“sargramostim”“pulmonary toxicity”“lung injury”“ARDS”“pneumonia”为检索词。纳入文献标准: ①国内外公开发表的个案报道; ②肺毒性与 G-CSF 或 GM-CSF 用药的相关性明确; ③具有患者基本信息、临床表现及治疗等相对完整的临床病例资料。排除标准: ①重复的文献、综述; ②主要临床数据不完整或缺失; ③无法获取全文的文献。

1.2 研究方法

采用回顾性研究方法, 用自行设计的表格提取患者相关信息, 包括地区、性别、年龄、基础疾病、联合用药、G-CSF 和 GM-CSF 的剂量、临床表现、实验室指标、影像学检查、治疗、预后等。计量资料以中位数(范围)表示; 计数资料以例数(百分比)表示。

2 结果

2.1 患者一般情况

共纳入了 24 篇文献, 涉及 34 例患者, 主要来自亚洲(占 47.1%)和欧洲(占 41.2%); 男性 18 例, 女性 16 例; 患者中位年龄为 59 岁(3~82 岁)。在 34 例患者中, 含 12 例非霍奇金淋巴瘤、9 例实体瘤和 2 例白血病。另外, 肺部感染、COVID-19、类风湿关节炎患者分别为 4 例、2 例、2 例。9 例患者伴有贫血, 8 例患者有血小板减少症。

G-CSF 或 GM-CSF 主要用于治疗中性粒细胞减少(18 例, 52.9%), 其次是预防中性粒细胞减少(7 例, 20.6%)和动员外周血造血干细胞(7 例, 20.6%)。共 16 例患者(占 47.1%)有化疗药物用药史, 其中 13 例患者(占 38.2%)在一年内接受过化疗。联合用化疗药物中博来霉素为 7 例, 环磷酰胺 7 例, 阿霉素 7 例, 甲氨蝶呤 5 例, 长春地辛 5 例, 阿糖胞苷 4 例, 其他化疗药物 4 例。

在使用 G-CSF 的 27 例患者中(2 例未报道剂量), 剂量以 $5 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ (8 例, 29.6%)或 $300 \mu\text{g}$ (6 例, 22.2%)居多。另外, 在接受 GM-CSF 治疗的 4 例患者中, 2 例患者的剂量为 $300 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 1 例为 $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 1 例为 $250 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 。结果见表 1。

2.2 临床特征

G-CSF 或 GM-CSF 引起肺毒性类型主要为间质性肺炎、ARDS、急性肺损伤。其中 22 例患者首发症状为呼吸困难或呼吸短促, 16 例伴有发热, 7 例伴有咳嗽, 6 例伴有呼吸窘迫加重, 5 例出现咯血等, 其他症状包括骨痛、胸闷、胸痛等。28 例患者出现症状的中位时间为 G-CSF 或 GM-CS 治疗后 5 d(1 h~23 d)。详见表 2。

2.3 实验室检查特点

有 8 例患者记录了 C 反应蛋白(CRP)水平, 中位数为 $55.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (8~1920 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。共 24 例患者报告白细胞(WBC)计数, 其中 16 例白细胞升高, 1 例白细胞下降。14 例患者的中性粒细胞中位数为 $14.31 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$, 4 例患者的嗜酸性粒细胞中位数为 $3.32 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, 24 例患者(70.6%)出现低氧血症。详见表 3。

2.4 影像学检查

28 例患者进行了影像学检查, 其中 22 例患者行胸片检查, 14 例行 CT 检查。G-CSF 或 GM-CSF 引起肺损伤以累及双侧肺为主, 23 例出现弥漫性或局灶性渗出, 14 例患者出现间质性肺损伤。详见表 4。

2.5 治疗及预后

28 例患者出现肺损伤后立即停药, 其中, 23 例给予糖皮质激素(以甲泼尼龙使用最多, 其次为泼尼松或泼尼松龙), 5 例给予吸氧治疗, 11 例行呼吸机辅助通气缓解缺氧症状。25 例患者经

表 1 纳入病例的基本特征

Tab 1 Characteristics of patients

基本特征	例数	占比或中位数 (范围)
年龄 / 岁	32	59 (3 ~ 82)
性别	34	
男	18	52.9%
女	16	47.1%
地区	34	
亚洲	16	47.1%
欧洲	14	41.2%
美洲	3	8.8%
大洋洲	1	2.9%
G-CSF 或 GM-CSF 适应证	34	
治疗中性粒细胞减少症	18	52.9%
药物致性粒细胞减少症	13	38.2%
贫血或骨髓抑制诱发的中性粒细胞减少	3	8.8%
其他原因	2	5.9%
预防中性粒细胞减少症	7	20.6%
动员外周血造血干细胞	7	20.6%
其他	2	5.9%
药物种类	34	
G-CSF	29	85.3%
PEG-G-CSF	1	2.9%
GM-CSF	4	11.8%
G-CSF 日剂量	27	
5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (含 300 μg)	14	51.8%
1.5 ~ 2 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (150 μg 或 100 $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$)	7	25.9%
10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	4	14.8%
7.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	1	3.7%
0.5 MU $\cdot \text{kg}^{-1}$	1	3.7%
GM-CSF 日剂量	4	
300 μg	2	50.0%
10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	1	25.0%
250 $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$	1	25.0%
合并症	34	
非霍奇金淋巴瘤	12	35.3%
实体瘤	9	26.5%
白血病	2	5.9%
肺部感染	4	11.8%
COVID-19	2	5.9%
类风湿关节炎	2	5.9%
接受化疗	16	47.1%
一年内接受过化疗	13	38.2%
一年前接受过化疗	3	8.8%
合并化疗药物	16	
博来霉素	7	43.8%
环磷酰胺	7	43.8%
阿霉素	7	43.8%
甲氨蝶呤	5	31.3%
长春地辛	5	31.3%
阿糖胞苷	4	25.0%
基线血红蛋白水平 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	10	80 (46 ~ 130)
贫血 ($< 120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	9	90.0%
基线血小板值 ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	9	31 (2 ~ 171)
血小板减少症 ($< 100 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	8	88.9%
有吸烟史	3	8.8%

表 2 纳入病例的临床特征

Tab 2 Clinical manifestations of patients

临床特征	例数	占比或中位数 (范围)
肺毒性类型	34	
间质性肺炎	11	32.3%
ARDS	9	26.5%
急性肺损伤	9	26.5%
急性嗜酸性肺炎	2	5.9%
呼吸衰竭	2	5.9%
肺水肿	1	2.9%
临床症状	34	
呼吸困难或呼吸短促	22	64.7%
发热	16	47.1%
咳嗽	7	20.6%
咯血	5	14.7%
呼吸窘迫加重	6	17.6%
呼吸衰竭	1	2.9%
骨痛	2	5.9%
胸痛	2	5.9%
其他	2	5.9%
出现症状的时间 / d	28	5 (1 h ~ 23 d)
< 1	2	7.1%
1 ~ 7	16	57.1%
> 7	10	35.7%

表 3 纳入病例的实验室检查

Tab 3 Laboratory examination of patients

实验室检查	例数	占比或中位数 (范围)
CRP / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	8	55.26 (8 ~ 1920)
白细胞水平 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	24	14.63 (1.7 ~ 100)
4 ~ 10	7	29.2%
> 10	16	66.7%
< 4	1	4.2%
中性粒细胞 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	14	14.31 (1.23 ~ 41.14)
嗜酸性粒细胞 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	4	3.32 (1.58 ~ 39.22)
低氧血症	34	
有	24	70.6%
无	10	29.4%
氧分压 (PO_2)	14	
80 ~ 110 mmHg	2	14.3%
< 80 mmHg	12	85.7%
二氧化碳分压 (PCO_2)	7	
35 ~ 45 mmHg	3	42.9%
< 35 mmHg	4	57.1%

3 讨论

G-CSF 或 GM-CSF 是临床常用的促进髓系祖细胞增殖、分化的细胞因子, 广泛应用于中性粒细胞减少症的治疗和外周造血干细胞动员。G-CSF/GM-CSF 在局部抗感染过程中发挥重要作用, 是脓毒症和 COVID-19 的免疫靶点^[13]。然而, G-CSF 被报道可能引起肺毒性, 尤其是近期有肺浸润或肺炎史的患者更易发生^[10], 且有研究表明其可能增加 COVID-19 患者呼吸恶化、急性肺损伤或呼吸窘迫综合征的风险^[14-16]。肺毒性是 G-CSF 或 GM-CSF 的一种罕见的不良反应, 发病率尚不清楚, 严重者可致肺功能迅速恶化、呼吸困难、低氧血症甚至死亡^[17]。

过治疗后症状好转或恢复, 症状消失中位时间为 7 d (2 ~ 21 d)。详见表 5。

表 4 纳入病例的影像学特点

Tab 4 Imaging examination of patients including in the study		
影像学检查	例数	占比或中位数(范围)
检查手段	28	
胸片	22	78.6%
CT	14	50.0%
肺损伤部位	22	
双侧	19	86.4%
单侧	3	13.6%
影像学表现	28	
渗出(弥漫性或局灶性)	23	82.1%
间质性肺损伤	14	50.0%
结节	4	14.3%
肺纤维化	3	10.7%
胸腔积液	3	10.7%
淋巴结肿大	1	3.6%

表 5 纳入病例的治疗与转归

Tab 5 Therapy and prognosis of patients including in the study		
治疗与转归	例数	占比或中位数(范围)
治疗	34	
停用 G-CSF 或 GM-CSF	28	82.4%
继续用 G-CSF 或 GM-CSF	2	5.9%
无记录	4	11.7%
糖皮质激素治疗	23	67.6%
甲泼尼龙	10	29.4%
泼尼松(或泼尼松龙)	5	14.7%
地塞米松	3	8.8%
氢化可的松	1	2.9%
其他	4	11.8%
氧疗	5	14.7%
呼吸机辅助通气	11	32.4%
症状消失时间/d	17	7(2~21)
≤5	4	23.5%
5~7	5	29.4%
>7	8	47.1%
转归情况	34	
好转	25	73.5%
死亡	9	26.5%

本文发现 G-CSF 或 GM-CSF 引起的肺毒性类型以间质性肺炎、ARDS、急性肺损伤为主。临床症状主要为呼吸困难、呼吸短促、发热及咳嗽,多在 G-CSF 或 GM-CSF 治疗后 5 d 出现。常累及双侧肺,并伴有弥漫性或局灶性渗出物和肺间质性损伤。本研究发现 G-CSF 或 GM-CSF 相关的肺毒性发生患者中肿瘤患者或接受化疗的患者占比较高,这可能与该类患者更多地应用 G-CSF 或 GM-CSF 治疗或预防放疗或化疗引起的中性粒细胞减少,进而增高了继发不良反应的风险^[18]。此外,合并使用的化疗药物(如博来霉素、环磷酰胺、阿霉素、甲氨蝶呤等)本身也具有肺毒性,G-CSF 或 GM-CSF 联用时可能会降低化疗药物肺毒性的剂量阈值,且这种作用可能在多个化疗疗程中具有累积效应^[19-20]。因此,当 G-CSF 和放化疗同时进行,应高度警惕其潜在的毒性相加作用。

G-CSF 或 GM-CSF 所致肺毒性的具体机制尚不清楚,可能是因为 G-CSF 治疗后,大量中性粒细胞在肺部积累,在肺毛细血管中停留和聚集,然后释放炎症介质,导致肺毛细血管损伤、通透性增加和组织水肿^[21-22]。此外,也有报道称,免疫重建炎症综合征(IRIS)在 COVID-19 患者使用 G-CSF 后呼吸衰竭/肺浸润的恶化中发挥了重要作用^[11]。本研究发现 G-CSF 诱导的肺毒性患者伴随中性粒细胞计数和 CRP 升高,提示可能存在 IRIS。在本研究中,2 例年龄小于 18 岁的患者,在使用 G-CSF 动员供者的外周血干细胞时出现了肺毒性^[19, 23],而老年人(65 岁以上)主要在 G-CSF 用于治疗化疗等药物引起的中性粒细胞减少症的过程中出现了肺毒性^[24-28]。因此,年龄可能与肺毒性关联性较低。在本研究中,大多数患者剂量为 300 μg·d⁻¹ 或 5 μg/(kg·d),提示肺毒性可能与 G-CSF 或 GM-CSF 的剂量相关。其中,最早的不良症状出现时间是用药 1 h 后,发生在一个健康的造血干细胞移植患者中,在首次使用 G-CSF 后 1 h 出现严重的低氧血症^[29]。因此,在给予初始剂量的 G-CSF 后,应早期监测,警惕 G-CSF 或 GM-CSF 导致肺毒性的发生。

糖皮质激素可抑制过度活化的炎症反应,减少肺组织水肿和渗出,改善 G-CSF 或 GM-CSF 所致的肺毒性^[10]。有研究发现,接受延长糖皮质激素治疗的 ARDS 患者的炎症标志物水平和机械通气时间显著降低^[30-31]。

综上所述,G-CSF 或 GM-CSF 引起的肺毒性是一种罕见的并发症,以双侧肺弥漫性或局灶性渗出和肺间质性损伤为主要特征。G-CSF 或 GM-CSF 治疗期间若出现呼吸困难、咳嗽和发热等症状,应警惕肺毒性发生的可能性,G-CSF 或 GM-CSF 引起的肺毒性的易感人群多为联合化疗药物或潜在肺部感染的患者。当出现肺毒性相关表现时,建议进行多学科会诊(肿瘤科、呼吸内科、临床药学等),完善实验室检查和影像学检查,明确诊断为 G-CSF 或 GM-CSF 致肺毒性后,给予相应的激素治疗,较为严重的患者行呼吸机辅助通气。早期诊断、停用 G-CSF 或 GM-CSF 以及积极对症支持治疗对改善所致肺毒性至关重要。

参考文献

[1] Lang FM, Lee KM, Teijaro JR, et al. GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches [J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(8): 507-514.
[2] Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: from granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(4): 355-367.
[3] Schmitz N, Linch DC, Dreger P, et al. Randomised trial

- of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients [J]. *Lancet*, 1996, 347 (8998): 353-357.
- [4] Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor [J]. *Blood*, 1991, 78 (11): 2791-2808.
 - [5] Cheng LL, Guan WJ, Duan CY, et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor for patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) and lymphopenia: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Intern Med*, 2021, 181 (1): 71-78.
 - [6] Mehta P, Porter JC, Manson JJ, et al. Therapeutic blockade of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in COVID-19-associated hyperinflammation: challenges and opportunities [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8 (8): 822-830.
 - [7] Chakraborty S, Sachdev M, Bansal M, et al. Pulmonary toxicity from granulocyte colony stimulating factor in a pediatric patient undergoing autologous stem cell harvest [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2021, 43 (7): e1048-e1049.
 - [8] Seebach J, Speich R, Fehr J, et al. GM-CSF-induced acute eosinophilic pneumonia [J]. *Br J Haematol*, 1995, 90 (4): 963-965.
 - [9] Verhoef G, Boogaerts M. Treatment with granulocyte-macrophage colony stimulating factor and the adult respiratory distress syndrome [J]. *Am J Hematol*, 1991, 36 (4): 285-287.
 - [10] Shalata W, Waichenberg L, Massalha I, et al. Pulmonary toxicity following administration of granulocyte colony-stimulating factor during chemotherapy for breast cancer: a case report and literature review [J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 32 (10): 1142-1145.
 - [11] Mertens J, Laghrib Y, Kenyon C. A case of steroid-responsive, COVID-19 immune reconstitution inflammatory syndrome following the use of granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2020, 7 (8): ofaa326.
 - [12] Doig C, Cooke R, Chua C, et al. Acute respiratory distress syndrome precipitated by granulocyte colony-stimulating factor in undiagnosed *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. *BMJ Case Rep*, 2022, 15 (2): e242316.
 - [13] Mu X, Liu K, Li H, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an immunotarget for sepsis and COVID-19 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (8): 2057-2058.
 - [14] Garcia-Carretero R, Vazquez-Gomez O, Ordonez-Garcia M. Delayed immune reconstitution inflammatory syndrome in an immunosuppressed patient with SARS-CoV-2 [J]. *Cureus*, 2021, 13 (11): e19481.
 - [15] Demuyneck H, Zachee P, Verhoef GE, et al. Risks of rhG-CSF treatment in drug-induced agranulocytosis [J]. *Ann Hematol*, 1995, 70 (3): 143-147.
 - [16] Azoulay E, Darmon M, Delclaux C, et al. Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30 (4): 781-786.
 - [17] Ruiz-Arguelles GJ, Arizpe-Bravo D, Sanchez-Sosa S, et al. Fatal G-CSF-induced pulmonary toxicity [J]. *Am J Hematol*, 1999, 60 (1): 82-83.
 - [18] Theyab A, Algahtani M, Alsharif KF, et al. New insight into the mechanism of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) that induces the mobilization of neutrophils [J]. *Hematology*, 2021, 26 (1): 628-636.
 - [19] Miskiewicz-Migon I, Miskiewicz-Bujna J, Rosa M, et al. Severe, reversible acute lung injury during autologous hematopoietic stem cell mobilization after filgrastim in a child with neuroblastoma: a case report [J]. *Transplant Proc*, 2020, 52 (9): 2849-2853.
 - [20] D' Souza A, Jaiyesimi I, Trainor L, et al. Granulocyte colony-stimulating factor administration: adverse events [J]. *Transfus Med Rev*, 2008, 22 (4): 280-290.
 - [21] Hierholzer C, Kelly E, Tsukada K, et al. Hemorrhagic shock induces G-CSF expression in bronchial epithelium [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273 (5): L1058-L1064.
 - [22] Wiedermann FJ, Mayr AJ, Kaneider NC, et al. Alveolar granulocyte colony-stimulating factor and alpha-chemokines in relation to serum levels, pulmonary neutrophilia, and severity of lung injury in ARDS [J]. *Chest*, 2004, 125 (1): 212-219.
 - [23] Chakraborty S, Sachdev M, Bansal M, et al. Pulmonary toxicity from granulocyte colony stimulating factor in a pediatric patient undergoing autologous stem cell harvest [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2021, 43 (7): E1048-E1049.
 - [24] Couderc L J, Stelianides S, Frachon I, et al. Pulmonary toxicity of chemotherapy and G/GM-CSF: a report of five cases [J]. *Respir Med*, 1999, 93 (1): 65-68.
 - [25] Katoh M, Shikoshi K, Takada M, et al. Development of interstitial pneumonitis during treatment with granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Ann Hematol*, 1993, 67 (4): 201-202.
 - [26] Motomura S, Fujisawa S, Fujimaki K, et al. Interstitial pneumonia induced by combination therapy with low-dose cytarabine and granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Am J Hematol*, 1995, 49 (4): 364.
 - [27] Hasegawa Y, Ninomiya H, Kamoshita M, et al. Interstitial pneumonitis related to granulocyte colony-stimulating factor administration following chemotherapy for elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Intern Med*, 1997, 36 (5): 360-364.
 - [28] Briasoulis E, Froudarakis M, Milionis HJ, et al. Chemotherapy-induced noncardiogenic pulmonary edema related to gemcitabine plus docetaxel combination with granulocyte colony-stimulating factor support [J]. *Respiration*, 2000, 67 (6): 680-683.
 - [29] Yamamoto K, Doki N, Senoo Y, et al. Severe hypoxemia in a healthy donor for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after only the first administration of granulocyte-colony stimulating factor [J]. *Transfus Med Hemother*, 2016, 43 (6): 433-435.
 - [30] Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, et al. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354 (16): 1671-1684.
 - [31] Annane D, Sebille V, Bellissant E. Effect of low doses of corticosteroids in septic shock patients with or without early acute respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34 (1): 22-30.

(收稿日期: 2023-02-27; 修回日期: 2023-04-25)

基于数据挖掘探究芳香中药治疗抑郁症的用药规律

王梓安, 刘超群, 张嘉宁, 任越, 李莹莹, 张燕玲* (北京中医药大学 中药学院 国家中医药管理局中药信息工程重点实验室, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于数据挖掘技术探究芳香中药治疗抑郁症的用药规律, 为临床芳香药物的使用提供依据。**方法** 检索中国知网 (CNKI)、万方数据知识服务平台 (Wanfang)、维普中文期刊数据库 (VIP)、中国生物医学数据库 (CBM), 收集抑郁症临床研究的相关文献及常用处方, 并进行频数分析、关联规则分析、聚类分析和因子分析。**结果** 共纳入中医处方 138 首, 涉及中医证型 17 类, 其中肝郁证最多。处方共涉及芳香中药 88 味, 累计使用频次 867 次, 四气主要为温性; 五味主要集中在辛、苦; 归经以肝、脾、肺、心经最为常见。使用频次较高的芳香中药依次是柴胡、白芍、郁金、石菖蒲、香附, 药物功效以疏肝解郁、理气健脾、安神为主。关联规则分析获得“柴胡-白芍”“柴胡-郁金”“柴胡-石菖蒲”等常用芳香中药组合; 聚类分析得到芳香中药核心基础方 4 个, 新方 2 个; 因子分析共提取 7 个公因子, 其组方治疗原则以解郁安神、疏肝理气健脾为主。**结论** 通过频数统计、关联规则分析获得了临床治疗抑郁症的常用芳香中药及药对, 并通过聚类分析挖掘了芳香中药核心基础方及新方, 为后续治疗抑郁症临床芳香药物的使用及研发提供了指导。

关键词: 数据挖掘; 抑郁症; 芳香中药; 用药规律

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)06-1664-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.042

Medication rules of aromatic Chinese medicine for depression based on data mining

WANG Zi-an, LIU Chao-qun, ZHANG Jia-ning, REN Yue, LI Ying-ying, ZHANG Yan-ling* (Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Information Engineering, National Administration of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the medication rules of aromatic Chinese medicine for depression by data mining, and to provide reference for clinical medication. **Methods** Common clinical prescriptions for depression were collected from CNKI, Wanfang, VIP and CBM. Frequency analysis, association rule analysis, cluster analysis and factor analysis were conducted. **Results** Totally 138 traditional Chinese medicine (TCM) prescriptions were obtained, involving 17 TCM syndromes among which liver depression syndrome ranked the top. Totally 88 aromatic Chinese medicines were included in the prescriptions, and the cumulative frequency of use reached 867. Aromatic Chinese medicines for depression were mainly warm, pungent and bitter, and the main meridians covered the liver, the spleen, the lung and the heart. The top frequency of medication use included *Bupleuri Radix*, *Paeoniae Radix Alba*, *Curcumae Radix*, *Acori Tatarinowii Rhizoma* and *Cyperii Rhizoma*, whose efficacy mainly focused on soothing the liver and resolving depression, strengthening the spleen and regulating qi as well as calming nerves. “*Bupleuri Radix-Paeoniae Radix Alba*”, “*Bupleuri Radix-Curcumae Radix*”, and “*Bupleuri Radix-Acori Tatarinowii Rhizoma*” were commonly used aromatic Chinese medicine combinations obtained by association rule analysis. The cluster analysis and factor analysis revealed 4 core basic formulas, 2 new formulas and 7 common factors. The prescription

基金项目: 中药卫材研发项目 (No.BUCM-2022-JS-KF-026)。

作者简介: 王梓安, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药物设计与优化研究, email: wza9998888@163.com *通信作者: 张燕玲, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药物设计与优化研究, email: zhangyanling@bucm.edu.cn

principles were mainly for resolving depression and calming the nerves, soothing the liver, regulating qi and strengthening the spleen. **Conclusion** Frequency and association rule analysis help obtain the common aromatic Chinese medicine and drug combinations for depression. Core basic formulas and new formulas of aromatic Chinese medicine are obtained through cluster analysis, providing guidance for future development and clinical use of aromatic Chinese medicines.

Key words: data mining; depression; aromatic Chinese medicine; medication rule

抑郁症是一种心理障碍或情感障碍类疾病,以显著而持久的心境低落、思维迟缓、意志活动减退等临床特点为主^[1],常引起焦虑、失眠、神经衰弱等症状。抑郁症为世界第四大疾病,其患病率高达4.4%,且抑郁症治愈率低,发病时间长,三次发作后复发率大于90%,具有患病率高、治愈率低、复发率高的特点,对社会具有严重的危害^[2]。在中医学中,抑郁症属于“情志病”,归属于中医“郁证”的范畴,《中医内科学》对郁证的定义为“由于肝气太旺,或体质平素太弱,加之情志因素所伤引起气机郁滞不畅,肝气失于疏泄,脾失健运,心失所养,脏腑阴阳气血失调而成”。病位涉及肝、脾、心,其基本治疗方法是理气疏郁,调畅气机^[3]。

芳香中药是一类具有芳香气味且带有挥发性的中草药^[4],其气味芳香,辛散升浮,顺应肝木条达升发之性,可助肝气之升发与疏泄;善行脾胃,可除郁滞,散结聚,使脾气健运;可入心经,开心气,而宁心安神,改善因情志不遂所致的心神不安。因此,芳香中药对治疗抑郁症具有极大的优势。但目前尚无芳香中药治疗抑郁症用药规律特点的研究。因此,本研究通过数据挖掘收集并整理临床治疗抑郁症的相关文献,分析研究芳香中药用药规律,以期对芳香药物治疗抑郁症提供参考。

1 资料与方法

1.1 处方来源

检索中国知网(CNKI)、万方数据知识服务平台(Wanfang)、维普中文期刊数据库(VIP)、中国生物医学数据库(CBM),收集含有芳香中药治疗抑郁症的临床研究文献。以“抑郁症”“郁证”分别与“复方”“方剂”“中药”“汤”“饮”“方”或“中医”等检索词进行组合检索。检索时限为2002年01日—2022年06日。

1.2 方剂纳入标准

①原始资料中研究疾病为原发性抑郁症,观察对象为原发性抑郁症患者,性别、年龄没有特殊限制;②有明确的诊断标准和疗效评价结果(如汉密尔顿抑郁量表评估);③研究类型为中医药治疗抑郁症的临床研究,且研究设计为随机对照试验;④干预措施采用中药复方治疗,所载

方药有明确的药物组成,且必须疗效显著;⑤重复文献只纳入一篇。

1.3 排除标准

①抑郁症伴有其他并发症或其他病继发抑郁症(如高血压合并抑郁症、中风后抑郁、脑卒中后抑郁等);②药物组成不明确;③合并用中医外治法或西药的研究;④综述、会议报告、动物实验、个案报道、理论探讨以及重复发表文献。

1.4 数据库建立与名称规范化处理

根据纳入标准与排除标准筛选其中符合要求的文献,将方剂中涉及的证型、中药、四气、五味、归经等基本信息录入Microsoft Office Excel 2019中,为确保数据的准确性,资料录入完成后进行两轮审核,第一轮审核确保录入信息完整,第二轮审核确保录入信息无重复。根据《中医临床诊疗术语·证候部分》^[5]、《抑郁症中西医结合诊疗专家共识》^[2]规范录入方剂涉及的疾病证型并进行分类,如“肝郁气滞”“肝郁痰阻”归属于肝郁证项下,因此统归为肝郁证。

依据钟赣生主编的《中药学》^[6]、2020年版《中国药典》^[7]及《中药大辞典》^[8]规范化处理录入中药,如“抚芎”统一为“川芎”,“广郁金”统一为“郁金”等;性味中的“微温”“微苦”统一归为“温”“苦”。依据《香药本草》^[9]、《芳香中药学》^[10]对芳香中药进行筛选并分类。

1.5 数据分析

对所有方剂中涉及的证型及芳香中药的使用频次(本研究定义使用频次大于10次为高频中药)、四气、五味、归经进行统计分析。使用IBM SPSS Modeler 18.0软件中的Apriori板块进行高频药物关联规则运算,参数设置为最小支持度为20%,最小置信度为60%,最大前项数为2^[11]。利用IBM SPSS Statistics 25.0软件对高频芳香中药进行聚类分析、因子分析。

2 结果

2.1 文献筛选

共纳入含有芳香中药的临床研究文献138篇,其中知网82篇、万方48篇、维普4篇、中国生物医学数据库4篇。

2.2 证型

138 首中药处方中有 84 篇记录了中医证型，经规范后得到 33 种证型，共分为 17 类，其中以肝郁气滞、肝郁脾虚最多，证型类别以肝郁证最多，具体见表 1。

表 1 抑郁症证型分布

Tab 1 Distribution of depression syndromes							
序号	证型	频次	分类	序号	证型	频次	分类
1	肝郁脾虚	15	肝郁证	18	肝经湿热	1	肝经证
2	肝郁气滞	15	肝郁证	19	肝气虚	1	肝虚证
3	肝郁痰阻	5	肝郁证	20	肝阳虚	1	肝虚证
4	肾虚肝郁	5	肝郁证	21	肝瘀化热	1	肝瘀实证
5	心脾两虚	5	心脾兼证	22	肝郁化火	1	肝郁证
6	痰气郁结	4	痰气证	23	肝郁肾虚	1	肝郁证
7	肝郁痰火	2	肝郁证	24	肝郁痰扰	1	肝郁证
8	肝郁血虚	2	肝郁证	25	肝郁心虚	1	肝郁证
9	肝郁血瘀	2	肝郁证	26	脾肾阳虚	1	脾肾兼证
10	脾阳虚	2	脾虚证	27	气虚血瘀	1	气虚兼夹证
11	气郁化火	2	肝郁证	28	痰火郁结	1	痰火证
12	肾阳虚	2	肾虚证	29	痰热内扰	1	痰火证
13	心胆气虚	2	心肝兼证	30	痰热郁结	1	痰火证
14	心阳虚	2	心虚证	31	心肾不交	1	心肾兼证
15	胆热痰扰	1	胆热证	32	心肾阴虚	1	心肾兼证
16	胆郁痰扰	1	胆实证	33	阳虚水泛	1	阳虚兼夹证
17	肝火郁结	1	肝郁证				

2.3 高频芳香中药使用频次

将 138 首处方中的中药进行统计，共涉及中药 184 味，累计使用频次为 1528 次。经过中药名称标准化后获得芳香中药 88 种，占比 47.8%，累计使用频次 867 次。排名前五的芳香中药依次是柴胡（94 次，6.15%）、白芍（63 次，4.12%）、郁金（61 次，3.99%）、石菖蒲（53 次，3.47%）、香附（47 次，3.08%），使用频次大于 10 的芳香中药见表 2。

2.4 芳香中药性味归经分析

芳香中药四气累计频次 867 次，使用频次较高的为温性药（400 次，46.14%）、寒性药（322 次，37.14%）；五味累积频次 1623 次，使用频次较高的为辛味药（637 次，39.25%）、苦味药（598 次，36.85%）；归经分析共涉及 12 条归经，累计频次 2285 次，使用频次最高的依次是肝经（517 次，23.63%）、肺经（387 次，20.92%）、脾经（380 次，16.63%），心经（357 次，15.62%），见图 1。

2.5 高频芳香中药关联规则分析

为挖掘方剂中芳香中药间的组合规律，通过 IBM SPSS Modeler 18.0 软件中的 Apriori 算法对芳香中药进行关联规则分析，共得到 73 条关联规则，其中芳香中药组合有 26 条，提升度均 > 1，

表 2 芳香中药使用频次

Tab 2 Frequency of aromatic Chinese medicine			
序号	芳香中药	频次 [n (%)]	分类
1	柴胡	94 (6.15)	芳香解表药
2	白芍	63 (4.12)	芳香补益药
3	郁金	61 (3.99)	芳香活血药
4	石菖蒲	53 (3.47)	芳香开窍药
5	香附	47 (3.08)	芳香理气药
6	远志	45 (2.95)	芳香开窍药
7	当归	39 (2.55)	芳香补益药
8	白术	34 (2.23)	芳香补益药
9	陈皮	30 (1.96)	芳香理气药
10	川芎	28 (1.83)	芳香活血药
11	合欢皮	26 (1.70)	芳香理气药
12	枳壳	24 (1.57)	芳香理气药
13	枳实	19 (1.24)	芳香理气药
14	合欢花	19 (1.24)	芳香理气药
15	桂枝	18 (1.18)	芳香解表药
16	生姜	15 (0.98)	芳香解表药
17	苍术	15 (0.98)	芳香化湿药
18	丹参	14 (0.92)	芳香活血药
19	薄荷	14 (0.92)	芳香解表药

提示均为有效关联，芳香中药组合根据支持度大小进行排列，见表 3 及图 2。

表 3 芳香中药关联规则分析

Tab 3 Association rules of aromatic Chinese medicine					
序号	后项	前项	支持度百分比 /%	置信度百分比 /%	提升度
1	柴胡	白芍	45.65	87.30	1.30
2	柴胡	郁金	43.48	75.00	1.11
3	柴胡	石菖蒲	37.68	76.92	1.14
4	郁金	香附	33.33	63.04	1.45
5	柴胡	香附	33.33	82.61	1.23
6	石菖蒲	远志	32.61	64.44	1.71
7	柴胡	远志	32.61	77.78	1.15
8	郁金	石菖蒲 + 柴胡	28.99	62.50	1.44
9	白芍	当归	28.26	66.67	1.46
10	柴胡	当归	28.26	82.05	1.22
11	郁金	香附 + 柴胡	27.54	60.53	1.39
12	石菖蒲	远志 + 柴胡	25.36	65.71	1.74
13	郁金	远志 + 柴胡	25.36	62.86	1.45
14	当归	白术	24.64	61.76	2.19
15	白芍	白术	24.64	67.65	1.48
16	柴胡	白术	24.64	67.65	1.00
17	白芍	当归 + 柴胡	23.19	75.00	1.64
18	远志	石菖蒲 + 郁金	22.46	61.29	1.88
19	柴胡	石菖蒲 + 郁金	22.46	80.65	1.20
20	石菖蒲	陈皮	21.74	60.00	1.59
21	柴胡	陈皮	21.74	83.33	1.24
22	柴胡	香附 + 郁金	21.01	79.31	1.18
23	郁金	远志 + 石菖蒲	21.01	65.52	1.51
24	柴胡	远志 + 石菖蒲	21.01	79.31	1.18
25	香附	川芎	20.29	75.00	2.25
26	柴胡	川芎	20.29	71.43	1.06

2.6 高频中药聚类分析

应用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件对高频芳

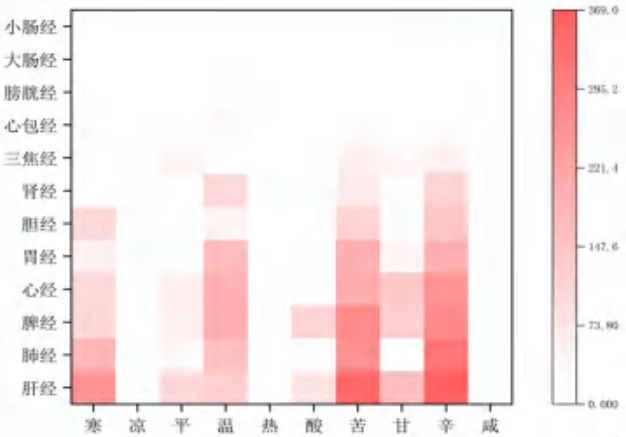


图 1 芳香中药性味、归经热图

Fig 1 Heat map of aromatic Chinese medicine with nature and flavorur, and meridians

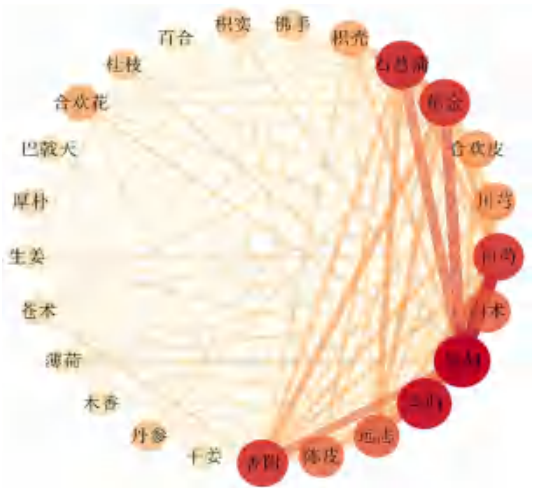


图 2 芳香中药关联规则网络图

Fig 2 Association rule network of aromatic Chinese medicine

香中药进行系统聚类分析,通过 Pearson 法构建树状聚类图,图中纵轴代表中药变量,横轴代表相对距离,距离越小,表示药物共性越高,关系越紧密。聚类分析结果显示,当横轴截距为 17.0 时,可将治疗抑郁症的高频芳香中药聚成 6 类,其中核心基础方 4 个,新方 2 个。具体见图 3、表 4、表 5。

2.7 高频芳香中药因子分析

运用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行因子分析,结果显示 KMO = 0.616, Bartlett 球形度检验 $P < 0.001$,证明变量间相关性较强,符合因子分析标准。采用主成分分析,选取凯撒正态化最大方差法旋转得到旋转成分矩阵成分图见图 4。提取初始特征值 > 1 ,因子累计贡献率 63.47%,为获取具有实际意义的公因子,设置载荷系数最小绝对值为 0.5,旋转在 11 次迭代后收敛,共获取 7 个公因子,见图 4 及表 6。

3 讨论

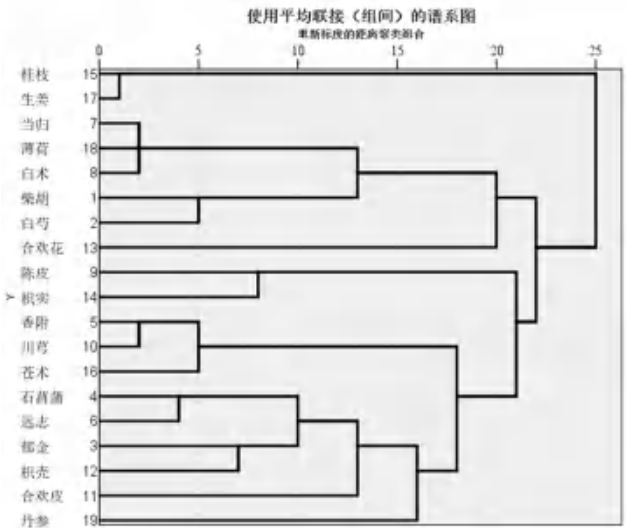


图 3 治疗抑郁症高频芳香中药聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis dendrogram of high frequency aromatic Chinese medicine for depression

表 4 基于系统聚类的类芳香中药核心基础方组合

Tab 4 Combination of aromatic Chinese medicine core foundation formulas based on systematic clustering		
聚类	芳香中药组合	主要功效
C1	当归、薄荷、白术、柴胡、白芍	疏肝、养肝
C2	合欢花	解郁、安神
C3	陈皮、枳实	理气、健脾、化痰
C4	香附、川芎、苍术	疏肝、理气、健脾

表 5 基于系统聚类的芳香中药新方组合

Tab 5 New combination of aromatic Chinese medicine based on systematic clustering		
聚类	芳香中药组合	主要功效
C5	桂枝、生姜	温阳、活血
C6	石菖蒲、远志、郁金、枳壳、合欢皮、丹参	解郁、安神

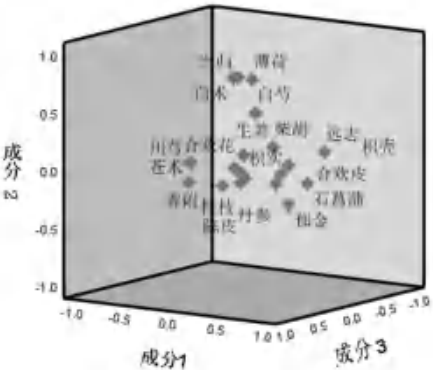


图 4 高频芳香中药旋转因子空间成分

Fig 4 Component plot in rotated space of high frequency aromatic Chinese medicine

3.1 基于证型用药规律分析

研究发现,138 首含有芳香中药的处方共涉及 17 类中医证型,其中以肝郁证居多,主要包括肝气郁结、肝郁脾虚等,说明抑郁症发病与肝

表 6 高频芳香中药公因子信息

Tab 6 Common factor information of high frequency aromatic Chinese medicine

公因子	药物
F1	郁金、石菖蒲、远志、枳壳
F2	当归、白术、薄荷
F3	香附、川芎、苍术
F4	桂枝、生姜
F5	陈皮、枳实
F6	柴胡、合欢花
F7	合欢皮、丹参

最为密切，并会累及心、脾等脏。肝五行属木，性喜条达，而恶抑郁，可行疏泄之功。情志不遂，使肝失条达，疏泄不利，影响气机，神志不宁，发为本病。

3.2 基于芳香中药频次统计用药规律分析

芳香中药频次分析发现，频次较高的芳香中药多具有疏肝解郁、理气健脾、安神功用，如香附、柴胡、郁金、川芎疏肝理气解郁，可改善因情绪不畅而致肝气郁滞的症状；白术、陈皮理气健脾，可改善因肝郁日久伤脾，脾失运化的症状；远志、石菖蒲、合欢皮解郁安神，可改善因肝郁而耗伤心气，致心失所养的症状。使用频次前五的中药中，柴胡、香附性善条达肝气，善理肝气之郁，为疏肝解郁之要药；白芍可养血柔肝，敛肝气之横逆，为养肝、柔肝、平肝之要药；郁金可疏肝行气，清心解郁；石菖蒲主入心经，具有宁心安神之功。上述药物为针对肝气郁结、心神不安的佳品。现代药理学研究表明，上述多数芳香中药挥发油具有抗抑郁的作用；如柴胡中十五烷三烯-4, 6-二炔-1-醇乙酯、十五烷三烯-4, 6-二炔-1-醇乙酯等挥发性成分可有效抑制去甲肾上腺素（NE）和 5-羟色胺（5-HT）的再摄取^[12]；石菖蒲挥发油中的 β -细辛醚能够显著增加慢性不可预知温和应激（CUMS）诱发的抑郁症大鼠糖水消耗量^[13]；川芎挥发油可极显著地提高 CUMS 抑郁模型大鼠海马区多巴胺（DA）、NE 的含量^[14]；香附挥发油中的 α -香附酮、异长叶烯-5-酮等可提高抑郁小鼠脑组织中 5-HT 的含量^[15]。综上所述，临床多采用柴胡、香附、石菖蒲等具有疏肝解郁、理气健脾、安神功效的芳香中药来改善抑郁症。

3.3 基于性味归经统计用药规律分析

芳香中药性味归经统计显示，四气中温性药使用频率最高，五味以辛、苦为主，与芳香中药药性特点符合。芳香中药多为辛温药，属阳，其气清正，鼓舞人体正气，振奋阳气，促进气的运行，缓解气机郁滞，助脾胃运化；苦味药物可泻

郁滞之实，缓解气郁导致的热盛、津伤等症状。高频中药归经在肝、肺、脾、心经，四经总占比达 71.82%，提示芳香中药治疗抑郁症主要从肝、肺、脾、心四脏进行论治。郁证病机为情志失调，致气失疏泄，肝失条达，肝郁日久及脾，使脾失健运，蕴湿生痰；肝郁抑脾，耗伤心气，心失所养，即所谓忧郁伤神^[4]；气机失常，影响肺之主气功能，且辛味药物主入肺经。故治疗所用药物主归肝、肺、脾、心四经。

3.4 基于关联规则用药规律分析

通过关联规则结果可以得出，芳香药物组合功效主要分为疏肝养肝药物组，如柴胡-白芍、柴胡-当归；疏肝解郁理气药物组，如柴胡-郁金、柴胡-香附；解郁安神药物组，如石菖蒲-远志。以上药物组合为临床治疗抑郁症方中的主要配伍组合。柴胡-白芍是逍遥散、四逆散等多个疏肝解郁经典方剂的基础方，柴胡与白芍配伍，既能疏肝解郁以治肝用之不达，又能柔肝益阴以补肝体。药理实验研究表明，柴胡-白芍药对可通过调节脑内神经递质含量来改善抑郁^[16]。柴胡-香附在治疗抑郁症方剂中应用广泛，如经典方剂柴胡疏肝散，柴胡善于疏肝解郁，香附善于理气疏肝止痛，两药配伍，可解肝经之郁，行气止痛。药理实验研究表明，柴胡疏肝散可调节束缚肝郁证大鼠脑内单胺神经递质和血清免疫因子的水平^[17]。综上所述，临床多采用柴胡-白芍、柴胡-香附、远志-石菖蒲等具有疏肝养肝、疏肝理气、解郁安神功效的药物组合对抑郁症进行改善，与抑郁症的发病机制即情志不遂、气机郁滞、心神不宁相契合。

3.5 基于聚类及因子分析用药规律分析

将聚类分析结果和因子分析结果相互对照。基于系统聚类分析得到的核心基础方中，发现 C3 与 F5（陈皮、枳实），C4 与 F3（香附、川芎、苍术）完全一致。C4 与 F3（香附、川芎、苍术）药物组合为越鞠丸组成部分，C4 与 F5（陈皮、枳实）为柴胡疏肝散的组成部分，适用于肝郁气滞证。研究表明，越鞠丸可通过增加抑郁症患者血清脑源性神经营养因子（BDNF）水平对抑郁症进行改善^[18]；柴胡疏肝散可通过影响单胺神经递质水平，增加大脑内 BDNF 水平的表达，改善下丘脑-垂体-肾上腺轴（HPA）等发挥抗抑郁的作用^[19]，C1 与 F2 组柴胡、白芍、当归、白术、薄荷为逍遥丸组成部分，具有疏肝健脾的功效，适用于肝郁脾虚型抑郁症患者。药理实验表明，逍遥丸可有效降低抑郁小鼠血清皮质酮含量，并增加海马 BDNF 含量^[20]。

基于系统聚类分析得到的新方中, C5 与 F4 中桂枝、生姜辛散温通, 桂枝可温脾阳, 助心阳, 通血脉; 生姜入肺、胃经, 可温肺阳与胃阳; 二药组合具有温阳活血之效, 可适用于阳虚型抑郁症者。研究表明, 生姜挥发油中的 6-姜烯酚通过抑制炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 和 BDNF 的氧化应激来改善小鼠抑郁样行为^[21]; 桂枝挥发油中的反式桂皮醛可调节抑郁小鼠神经递质水平^[22]。C6 侧重解郁安神治则, 主治心神不安, 其中合欢皮-丹参是解郁安神的经典配伍组合, 合欢皮解郁安神, 活血消肿止痛; 丹参活血化瘀, 清心除烦; 两药合用, 具有解郁除烦, 养血活血之效。研究表明丹参挥发油中的 β -石竹烯可改善慢性应激引起的抑郁样行为^[23]; 郁金挥发油中的莰术二酮、姜黄素可通过抑制神经炎症、保护神经元、调节神经内分泌等途径改善抑郁症^[24]。

以上组方中, C6、F7 蕴含了解郁安神的治则, C4、F5, C5、F3 和 C2、F2 突出了疏肝理气健脾治法, 与频数、关联规则分析结果相契合。

4 结论

芳香中药味辛能行, 芳香走窜, 故能调畅气机, 以治疗肝气郁结等气机不通所致的多种疾患, 在治疗抑郁症处方中占有重要地位。本研究通过数据挖掘技术探究了芳香中药改善抑郁症的用药规律。通过频数及关联规则分析获得了高频芳香中药及药对, 系统聚类分析及因子分析挖掘出了越鞠丸、逍遥丸等核心基础方及两个新方[(桂枝、生姜)、(石菖蒲、远志、郁金、枳壳、合欢皮、丹参)]。本研究可为抑郁症临床芳香中药用药以及药物研发提供参考。但本研究尚存在一定的局限性, 纳入文献含有较多的经验方, 所得结果与临床用药可能存在偏差, 通过系统聚类得到核心基础方和新方具有一定的参考价值, 但疗效有待进一步验证。

参考文献

- [1] 杨丽英, 王艳丽, 郝立炜. 中医药治疗抑郁症的研究进展[J]. 中医药信息, 2022, 39(7): 86-89.
- [2] 过伟峰, 曹晓岚, 李建香. 抑郁症中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(2): 141-148.
- [3] 常军, 章明星. 抑郁症的发病机制及治疗研究进展[A]//第六届中国中西医结合学会心身医学专业委员会换届大会暨第十二次中国中西医结合心身医学学术交流会议论文集[C]. 中国中西医结合学会, 2019.
- [4] 王荣, 胡晓阳, 于斌, 等. 香药概念探讨[J]. 中医药信息, 2020, 37(4): 100-102.

- [5] GB/T 16751.2-2021. 中医临床诊疗术语第 2 部分: 证候[S]. 2021.
- [6] 钟赣生. 中药学[M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [7] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020.
- [8] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [9] 李良松. 香药本草[M]. 北京: 学苑出版社, 2020.
- [10] 熊磊. 芳香中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2022.
- [11] 王博龙, 吴春兴, 易增兴, 等. 基于数据挖掘探讨中医药治疗鼻窦炎的用药规律[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 1114-1119.
- [12] 方媛. 柴胡石油醚部位的化学成分与抗抑郁活性研究[D]. 太原: 山西大学, 2016.
- [13] 徐飞飞, 李钦青, 楚世峰, 等. 石菖蒲挥发油中主要成分 α -和 β -细辛醚的神经药理学作用及机制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1969-1979.
- [14] 吴玲, 唐宇, 郑琴, 等. 基于 CUMS 大鼠川芎挥发油抗抑郁作用研究[J]. 世界中医药, 2019, 14(7): 1643-1648.
- [15] 刘欢, 张孟历, 于猛, 等. 醋制香附挥发油抗抑郁活性及化学成分分析[J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 436-442.
- [16] 于春泉, 李蓐, 张敏, 等. 柴胡-白芍药对抗抑郁作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 286-289.
- [17] 白娟, 刘燕, 王丹妮, 等. 柴胡疏肝散在肝郁证中的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(3): 199-204.
- [18] 张煜萱. 越鞠丸治疗气郁体质抑郁症患者及影响血清 BDNF 水平的临床对照研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [19] 王常麟, 高冬梅, 高明周, 等. 柴胡疏肝散化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 124-131, 271.
- [20] 王双双, 易立涛, 董淑琦, 等. 逍遥丸对皮质酮诱导小鼠抑郁样行为的干预机制[J]. 中医药通报, 2020, 19(2): 63-65.
- [21] Afzal M, Kazmi I, Quazi AM, et al. 6-Shogaol attenuates traumatic brain injury-induced anxiety/depression-like behavior via inhibition of oxidative stress-influenced expressions of inflammatory mediators TNF- α , IL-1 β , and BDNF: insight into the mechanism[J]. ACS Omega, 2021, 7(1): 140-148.
- [22] Lin J, Song Z, Chen X, et al. Trans-cinnamaldehyde shows anti-depression effect in the forced swimming test and possible involvement of the endocannabinoid system[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518(2): 351-356.
- [23] Hwang ES, Kim HB, Lee S, et al. Antidepressant-like effects of β -caryophyllene on restraint plus stress-induced depression[J]. Behav Brain Res, 2020, 380: 112439.
- [24] 马建福, 王豆, 李涛, 等. 郁金治疗卒中后抑郁的药理机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 276-282.

(收稿日期: 2022-12-08; 修回日期: 2023-02-24)

基于 openFDA 数据库挖掘与评价 Paxlovid 上市后的不良反应

刘胜男, 冀召帅, 王雪, 毛乾泰, 艾超* (清华大学附属北京清华长庚医院/清华大学临床医学院药学部, 北京 102218)

摘要: **目的** 利用美国食品药品监督管理局公共数据开放项目 (openFDA) 检索 Paxlovid 的不良事件报告的相关情况, 评价 Paxlovid 上市后的不良反应, 为临床合理用药提供参考。 **方法** 收集 openFDA 数据库 2021 年 11 月 21 日—2022 年 12 月 31 日 Paxlovid 相关不良事件数据, 提取并进行相关分析。 **结果** 共检索到 Paxlovid 相关不良反应事件 21 254 份, 其中由消费者或非健康专业人士上报 15 301 份 (71.99%), 美国报告 19 732 份 (92.84%), 适应证为 COVID-19 20 319 份 (95.60%), 转归情况为已恢复/恢复中 7249 份 (34.11%), 报告严重不良反应 3632 例次 (17.09%)。不良反应类型主要表现为味觉障碍/异常 (3596 例)、腹泻 (1858 例)、恶心呕吐 (1183 例)、头痛 (942 例)、口咽疼痛 (644 例) 等, 涉及神经系统、胃肠系统、肌肉骨骼系统等。 **结论** 基于 openFDA 数据库对 Paxlovid 的 ADR 相关信息进行多方面、多维度的挖掘分析, 提示该药与味觉障碍/异常、腹泻、恶心呕吐、头痛等不良反应具有一定关联性, 在临床使用过程中应密切关注不良反应, 促进临床安全、合理用药。

关键词: Paxlovid; openFDA; 药品不良反应; 数据挖掘

中图分类号: R969.3, R978.7 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1670-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.043

Data mining and evaluation of adverse reactions of Paxlovid after marketing based on openFDA database

LIU Sheng-nan, JI Zhao-shuai, WANG Xue, MAO Qian-tai, AI Cao* (*Department of Pharmacy, Beijing Tsinghua Changgung Hospital, School of Clinical Medicine, Tsinghua University, Beijing 102218*)

Abstract: Objective To report adverse events (AE) of Paxlovid based on the US Food and Drug Administration Public Data Open Project (openFDA), to evaluate the postmarketing AEs of Paxlovid, and provide reference for clinical rational drug use. **Methods** The AE reports of Paxlovid in the openFDA database from November 21, 2021 to December 31, 2022 were searched to collect the relevant data. **Results** Totally 21 254 related AE reports of Paxlovid were collected, including 15 301 (71.99%) reported by consumers or non-health professionals, 19 732 (92.84%) reported by the US, 20 319 (95.60%) for COVID-19 indications, 7249 (34.11%) recovered or recovering, and 3632 (17.09%) of serious AEs reported. The main types of AEs included dyspepsia (3596), diarrhoea (1858), nausea (1183), headache (942), oropharyngeal pain (644) and so on, involving the nervous system, gastrointestinal system, musculoskeletal system and so on. **Conclusion** Based on the openFDA database, the AEs of Paxlovid mainly cover dyspepsia, diarrhoea, nausea, headache, etc. We should pay close attention to the clinical use of Paxlovid.

Key words: Paxlovid; openFDA; adverse reaction; data mining

奈玛特韦片/利托那韦片组合包装 (Paxlovid) (COVID-19) 的新药, 由两种抗病毒药物组合而成。Ⅲ期临床试验初步结果显示, 与安慰药相比,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.22208188); 北京市医院管理中心创新梦工场经费资助 (No.202121)。

作者简介: 刘胜男, 女, 主管药师, 硕士, 主要从事医院药学管理, email: lsna00411@btch.edu.cn *通信作者: 艾超, 男, 副主任药师, 博士, 主要从事医院药事管理、精准药学、智能药房管理, email: aca00183@btch.edu.cn

在症状出现 3 d 内接受治疗的患者,任何原因导致住院和死亡的风险可降低约 89%^[1]。2021 年 11 月 21 日, FDA 紧急授权批准该新药用于治疗新型冠状病毒检测呈阳性、症状为轻中度的、且有较高风险会转为重症(包括住院或死亡)的成人和儿童患者(≥ 12 岁,体质量 ≥ 40 kg)^[2]。2022 年 2 月 12 日, Paxlovid 获我国国家药品监督管理局应急附条件批准,用于治疗成人伴有进展为重症高风险因素的轻至中度 COVID-19 患者,例如伴有高龄、慢性肾脏疾病、糖尿病、心血管疾病、慢性肺病等重症高风险因素的患者^[3],同年 3 月 15 日,被写入国家卫生健康委发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)》中。随着全球疫情管控逐步放开, Paxlovid 的临床应用在逐步增加,但目前国内外尚未见其药品不良反应(ADR)的整体发生情况报道。本研究通过检索 openFDA 药品不良事件数据库中 Paxlovid 相关 ADR 的相关数据,并进行汇总与分析,旨在为临床安全、合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据检索

数据来源于 openFDA 药品不良事件数据库中的 API 模块^[4]。打开 openFDA 网站,选择 Drug API Endpoints,选择 Adverse Events,进入 Explore the API with an interactive chart 板块,在灰色输入框中输入限定时间+限定药品名。根据研究需求,选择相应字段对不良事件(AE)年度报告例数、发生 AE 患者年龄、性别、上报人职业、ADR 名称及 ADR 结局等进行检索,获取数据并进行分析。

1.2 研究方法

以“Paxlovid”为目标药物,以通用名“Nemastvir/Litonavir”和商品名“Paxlovid”为关键词,以 openFDA 数据库中的 APIs 模块为基础,采用数据库交互式图表板块进行访问。检索时间段为 2021 年 11 月 21 日至 2022 年 12 月 31 日。

2 结果

2.1 AE 报告年度分布

自 Paxlovid 上市以来,共检索到 AE 报告 21 254 份,其中 2021 年上报 5 例,2022 年上报 21 249 例,年度报告数量整体呈增长趋势。上报类型主要是自主上报,共 21 083 份,其他途径上报 102 份,研究数据上报 69 份。

2.2 AE 报告的基本情况

应用 Paxlovid 出现 AE 的患者中,女性 12 371 例(58.21%),男性 6914 例(32.53%)。报告中明确注明年龄分组的 376 例,主要分布在成人组。上报人员中,消费者或非健康专业人员占大部分,上报国家以美国为主,适应证以 COVID-19 为主,AE

类型中一般占 82.91%,严重占 17.09%。其他详见表 1。

表 1 Paxlovid 不良事件报告的基本情况

类别	报告例数	构成比/%
性别		
女	12 371	58.21
男	6914	32.53
性别不详	1969	9.26
年龄分组		
成人	211	56.12
老年人	157	41.76
青少年	5	1.33
儿童	2	0.53
新生儿	1	0.27
上报人职业		
消费者或非健康专业人士	15 301	71.99
其他卫生医学专员	2469	11.62
医师	2105	9.90
药师	1302	6.13
其他	77	0.36
上报国家		
美国	19 732	92.84
英国	332	1.56
法国	236	1.11
日本	221	1.04
加拿大	139	0.65
其他	594	2.79
适应证		
COVID-19	20 319	95.60
高血压	304	1.43
新型冠状病毒检测呈阳性	150	0.71
哮喘	120	0.56
其他(胃食管反流、焦虑等)	361	1.70
AE 类型		
一般	17 622	82.91
严重(包括住院、死亡、危及生命、残疾及其他严重事件)	3632	17.09

2.3 AE 报告的情况

上报的 Paxlovid 相关 ADR 中,有 8223 例明确描述了 ADR 类型,涉及神经系统、胃肠系统、肌肉骨骼系统等。药物关联性方面,有 21 036 例(69.99%)被怀疑可能由该药品直接引起。在 310 例重复使用报告中,有 124 例再次发生了 ADR。在 3205 例记录了出现 ADR 后用药调整情况的患者中,64.69%进行了停药处理。12 952 份明确注明转归情况的患者中,未恢复或未解决的占 41.95%。其他详见表 2。

3 讨论

3.1 不良反应发生的人群特点

Paxlovid 于 2021 年 11 月在美国上市,故美国提交的 AE 报告最多,超总报告数的 92.84%。发生 AE 的患者女性多于男性,因此 Paxlovid 相

表 2 Paxlovid 不良反应报告的情况

Tab 2 Type information of top ADR of Paxlovid

类别	报告例数	构成比 /%
ADR 类型		
味觉障碍 / 异常	3596	43.73
腹泻	1858	22.60
恶心呕吐	1183	14.39
头痛	942	11.46
其他	644	7.83
ADR 药物相关性		
怀疑由 Paxlovid 直接引起	21 036	69.99
怀疑是共用了其他药物导致	8750	29.11
怀疑药物相互作用导致	268	0.89
重复使用药物		
再次发生了 ADR	124	40.00
未再发生 ADR	95	30.65
未记录	91	29.35
用药调整情况		
停药	2074	64.69
维持服药剂量	1075	33.53
减少服药剂量	42	1.31
增加服药剂量	15	0.47
转归情况		
未恢复 / 未解决	5433	41.95
恢复中 / 解决中	4135	31.93
已恢复 / 已解决	3114	24.04
经治疗后有后遗症	141	1.09
死亡	129	1.00

关 AE 的发生可能具有性别特异性,但目前还没有性别相关研究,有待进一步证明。发生 AE 的患者中,成人较多,青少年和儿童较少,可能与该药仅批准成人和 ≥ 12 岁儿童使用有关,另外报告中明确注明年龄分组的案例较少,仅 376 例,由于无法获得各年龄和不同性别群体的使用量数据,因此难以确定 AE 发生率的人群差异,目前仅反映 AE 的构成比。

3.2 ADR 发生的器官及系统特点

21 254 份有关 Paxlovid 的 AE 报告中,发生次数最多的是味觉障碍 / 异常和腹泻;恶心呕吐、头痛、口咽疼痛相对发生率较低,以上 ADR 在说明书中均有提及。有关 Paxlovid 上市前安全性的主要数据来自 EPIC-HR (NCT04960202) 研究^[5],该研究是一项 II/III 期随机、双盲、安慰剂对照的临床试验,研究对象为确诊为新型冠状病毒感染的非住院成年人,受试者共计 2224 名,均为 ≥ 18 岁的成年人,均存在进展为重症的 COVID-19 的高风险因素,受试者接受了至少一剂 Paxlovid ($n = 1109$) 或安慰剂 ($n = 1115$);受试者服用 Paxlovid 或相匹配的安慰剂,每日服用两次,连续 5 d;AE 在 Paxlovid 组和安慰剂发生类型和比例分别是味觉障碍 (5.6% vs 0.3%)、腹泻 (3.1% vs 1.6%)、高血压 (0.6% vs 0.2%) 和

肌痛 (0.6% vs 0.2%),因 AE 而停止治疗的受试者比例在 Paxlovid 组为 2.1%,安慰剂组为 4.2%。据国外文献报道,Paxlovid 可能会导致呼吸困难、轻度皮疹、皮肤瘙痒、荨麻疹和血管性水肿等过敏反应^[6]。

新西兰不良反应监测中心最新数据显示,自 2022 年 3 月 2 日至 9 月 30 日共收到 72 例 Paxlovid 相关 ADR,分别是味觉障碍 (17 例)、腹泻 (14 例)、COVID-19 反弹效应 (12 例)、恶心 (9 例)、高血压 (3 例)、黄疸 (2 例)、其他 (15 例)^[7]。马来西亚国家药品监管机构最新数据显示,截止至 2022 年 10 月初,共收到 1001 份 Paxlovid 相关 ADR,分别为苦味 (562 例)、腹泻 (247 例)、味觉障碍 (134 例)、呕吐 (70 例)、恶心 (69 例)、皮肤过敏症状 (20 例)^[8-9]。虽然国内使用 Paxlovid 治疗 COVID-19 的患者很多,但相关的 ADR 并没有公开的统计数据,仅个别文献报道过,如不同程度的心动过缓^[10]、皮疹^[11]等。国内学者对国外 8 个临床研究进行了 Meta 分析^[12],结果显示,相比于安慰剂,口服抗新型冠状病毒药物引发的不良反应并没有明显增加 ($OR = 0.85$, 95%CI, 0.72 ~ 1.02),而这些 ADR 中最常见的 AE 包括恶心、腹泻、头痛、流鼻涕和肌肉疼痛,且 AE 大多是轻微的,少有严重 AE 报道。

3.3 ADR 发生的严重程度

有关 Paxlovid 的 AE 报告中,82.91% 为一般,17.09% 为严重。值得注意的是,71.99% 上报案例来自消费者或非健康专业人士,药物导致严重 ADR 的关联性有待进一步评估,部分新型冠状病毒感染的患者也会出现味觉障碍 / 异常、腹泻、头痛等症状,这些症状与 Paxlovid 的 ADR 有重叠,所以不排除疾病本身导致相关 ADR 的发生。在 3205 例记录了出现 ADR 后用药调整情况的报告中,有 64.69% 的患者采取了停药措施,停药后症状是否消失,报告中未记录。在临床应用过程中应密切关注用药后的反应,对于无法耐受的 ADR,需及时予以相应的解救措施以避免重大伤害的发生。

3.4 药物相互作用

21 254 份有关 Paxlovid 的 AE 报告中,69.99% 被怀疑可能由该药品直接引起,30.00% 被怀疑可能是共用了其他药物或药物相互作用导致,这些 ADR 与 Paxlovid 相关性只是由上报者初步判断,且多数报告者并非医学专业人士,并未经 FDA 再次评估和确认,可能对本研究的结果会产生偏倚,因 openFDA 未提供患者所患疾病和联合用药的具体情况,所以本研究未挖掘 ADR 是由药物相互作用

用引起的, 还是由疾病本身引起。但从药物的作用机制上, 怀疑引起味觉障碍 / 异常的原因可能与利托那韦有关, 单独服用利托那韦或与其他抗反转录病毒药物联合服用后最常见的 ADR 包括胃肠道不适 (如腹泻、恶心、呕吐和上下腹痛), 神经系统疾病 (如味觉倒错和头痛头晕), 关节痛和背痛, 咽炎, 口咽疼痛, 咳嗽, 瘙痒, 皮疹 (如红斑疹和斑丘疹) 和疲劳等。利托那韦长期使用可能会导致高脂血症、脂代谢异常综合征及糖代谢异常, 但 Paxlovid 治疗 COVID-19 仅 5 d 的疗程, 利托那韦对患者血脂的影响可能有限。但对于既往有三酰甘油升高的患者, 应警惕使用 Paxlovid 期间胰腺炎的发生。有研究表明, 接受利托那韦治疗的患者也易出现肝转氨酶升高、临床肝炎和黄疸^[13]。奈玛特韦和利托那韦都是 CYP3A 肝药酶的强抑制剂, 经 CYP3A 肝药酶广泛代谢并具有较高首过代谢的药品可能受影响最大而使自身暴露大幅增加, 这些药物很多是心脑血管常用药, 例如辛伐他汀、洛伐他汀、利伐沙班、替格瑞洛、胺碘酮等, 如果 Paxlovid 与高度依赖 CYP3A 肝药酶清除的药物联合使用, 且血浆浓度升高可能导致严重和 / 或危及生命的 ADR, 临床应重视, 在用药过程中进行监测, 建议治疗期间应避免合用高度依赖 CYP3A 肝药酶清除的药物。

3.5 研究局限性

本研究存在一定的局限性: ① openFDA 数据库大多数证据来自消费者的自主上报, 获取的数据可能信息不全, 因而无法判断疗程、药物使用情况、并发症等因素的影响, 对分析结果存在一定的偏倚; ② 获取的数据只有结果, 而临床上可能涉及多种药物合用, 呈报的 AE 和药品之间因果关系未进行考量, 同时报告数据可能存在模糊、不规范等问题, 不能计算 ADR 的实际发生率, 仅能获得构成比, 并不能系统地了解相关 ADR 的风险或特征; ③ openFDA 数据库大多数证据来源于美国, 其他国家的数据仅来源于相关文献报道, 由于用药人群种族差异、地区差异及其他因素的影响, 这些 ADR 在中国人群中的发生情况及特点有待后续追踪。

综上, 虽然 Paxlovid 上市时间短, 基于真实世界中大样本数据的 Paxlovid 相关 ADR 研究较少, 但本研究通过挖掘 openFDA 数据库, 分析 Paxlovid 可能导致 ADR 的发生风险、临床特征以及发生原因, 提示了该药与味觉障碍 / 异常、腹泻、恶心呕吐、头痛等具有一定关联性, 药物

相互作用也可能导致 ADR 的发生, 临床在使用 Paxlovid 时应加强安全性监测, 若发生相关 ADR 应及时采取干预措施, 以保证患者安全用药。

参考文献

- [1] Mahase E. COVID-19: Pfizer's Paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports [J]. BMJ, 2021, 375: n2713.
- [2] FDA. Important prescribing information. Subject: Paxlovid emergency use authorization (EUA) dosing and dispensing in moderate renal impairment, and risk of serious adverse reactions due to drug interactions [EB/OL]. (2021-12-12) [2023-01-09]. <https://www.fda.gov/media/155071/download>.
- [3] 国家药品监督管理局. 国家药监局应急附条件批准辉瑞公司新冠病毒治疗药物奈玛特韦片 / 利托那韦片组合包装进口注册 [EB/OL]. (2022-02-12) <https://www.nmpa.gov.cn/zhuanli/yqyjzxd/yqyjxd/20220212085753142.html>.
- [4] 耿宇宇, 蔡俊, 谢茜, 等. 基于 openFDA 对枸橼酸芬太尼及枸橼酸舒芬太尼不良反应的分析 [J]. 中南药学, 2020, 18 (4): 706-710.
- [5] Hammond J, Leister-tebbe H, Gardner A, et al. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with COVID-19 [J]. N Engl J Med, 2022, 386 (15): 1397-1408.
- [6] FDA. Fact sheet for healthcare providers: emergency use authorization for paxlovid TM [EB/OL]. (2021-12-12) [2023-01-09]. <https://www.fda.gov/media/155050/download>.
- [7] ADRs following use of oral COVID-19 therapeutics (Paxlovid, Lagevrio) in New Zealand [J]. Reactions Weekly, 2022, 43 (4): 51-54.
- [8] Chang CT, Ong SY, Lim XJ, et al. Managing nirmatrelvir/ritonavir during COVID-19: pharmacists' experiences from the Perak state of Malaysia [J]. Pharm Policy Pract, 2022, 15 (1): 70.
- [9] Nirmatrelvir/ritonavir-related anaphylaxis. Reactions Weekly 1928, 5 (2022) [EB/OL]. <https://doi.org/10.1007/s40278-022-25270-9>.
- [10] 徐永祥, 沈利汉, 韩伟超, 等. 用洛匹那韦利托那韦对 7 例危重型新型冠状病毒肺炎患者的治疗与药学监护 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36 (7): 918-921.
- [11] 石双, 董娜, 丁颖, 等. 口服奈玛特韦与利托那韦组合用药治疗儿童新型冠状病毒肺炎 3 例 [J]. 中华儿科杂志, 2022, 60 (11): 1168-1171.
- [12] Wen W, Chen C, Tang J, et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19: a meta-analysis [J]. Ann Med, 2022, 54 (1): 516-523.
- [13] Vitiello A, La Porta R, Trama U, et al. Pandemic COVID-19, an update of current status and new therapeutic strategies [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2022, 395 (10): 1159-1165.

(收稿日期: 2023-01-09; 修回日期: 2023-03-05)

基于 CiteSpace 的 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的研究现状可视化分析

刘晓晨¹, 农雅琴¹, 张洪茂¹, 高梅菲¹, 徐浩¹, 潘小芳¹, 米文静¹, 陈睿^{1, 2}, 霍丽妮^{1*} (1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530222)

摘要: **目的** 总结 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂整体概况, 探究其发展趋势, 为后续研究提供参考。**方法** 运用 CiteSpace 5.7.R5 软件对 2012 年 1 月—2022 年 4 月收录在 Web of Science (WOS) 核心合集数据库中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂的相关文献进行作者、机构、被引期刊、国家、关键词可视化分析。**结果** 共纳入有效文献 1186 篇, Yves Pommier 为发文量最高的作者; 美国国家癌症研究所为发文量最高的机构, 机构之间具有一定的联系但是合作较为分散, 美国研究该领域最全面; *Journal of Biological Chemistry* 为被引率最高的期刊; 关键词细胞凋亡、抗肿瘤、抑制剂出现频率高, Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究方向集中于 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的发现、合成以及抗肿瘤机制。**结论** 开发更多新型 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂甚至 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂以进一步提高药物抗肿瘤活性将成为未来研究趋势。

关键词: Top1 抑制剂; Tdp1 抑制剂; CiteSpace; 可视化分析

中图分类号: R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)06-1674-00
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.044

Visual analysis of research status of Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors based on CiteSpace

LIU Xiao-chen¹, NONG Ya-qin¹, ZHANG Hong-mao¹, GAO Mei-fei¹, XU Hao¹, PAN Xiao-fang¹, MI Wen-jing¹, CHEN Rui^{1, 2}, HUO Li-ni^{1*} (1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222)

Abstract: Objective To overall overview Top1 inhibitor and Tdp1 inhibitors and their development to provide reference for future studies. **Methods** CiteSpace 5.7.R5 software was used to visualize and analyze the authors, institutions, cited journals, countries, and keywords of Top1 inhibitor and Tdp1 inhibitor-related literatures in the Web of Science (WOS) core collection database from January 2012 to April 2022. **Results** Totally 1186 papers were included. Yves Pommier was author with the most publications; the National Cancer Institute was the institution with most publications. Some connections and collaborations existed between institutions. The most comprehensive research in this field was in the US; *Journal of Biological Chemistry* was the most cited journal; keywords apoptosis, anticancer, and inhibitors appeared most frequently; Top1 inhibitor and Tdp1 inhibitor research focused most on the discovery, synthesis, and anti-tumor mechanisms. **Conclusion** Discovery of more novel Top1 inhibitor or Tdp1 inhibitors or even Top1-Tdp1 dual-target inhibitors in further enhance the anti-tumor activity of the drugs is a hot topic for future research.

Key words: Top1 inhibitor; Tdp1 inhibitor; CiteSpace; visual analysis

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 22067001); 广西壮瑶药重点实验室 (桂科基字 [2014]32 号); 壮瑶药协同创新中心 (桂教科研 [2013]20 号); 广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心 (桂发改高技函 [2020]2605 号); 广西研究生联合培养基地 (桂学位 [2021]6 号)。

作者简介: 刘晓晨, 女, 硕士研究生, 主要从事中药化学研究与应用, email: 2380547315@qq.com * **通信作者:** 霍丽妮, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药有效成分、结构修饰及药理活性研究, email: huolini@126.com

遗传信息的传递有赖于 DNA 的复制与转录, 内源因素(碱基错配、缺失、突变)和外源因素(电离、紫外线、烷化剂)可导致 DNA 损伤, 引发相关疾病, 因此 DNA 复制能否正常进行对生物体而言至关重要。在 DNA 复制转录过程中拓扑异构酶扮演着重要的角色, DNA 拓扑异构酶 IB (DNA topoisomerase IB, Top1) 是人类 6 个拓扑异构酶中的一个, 可调节 DNA 超螺旋结构, 修复 DNA 损伤^[1], 因而在 DNA 的代谢过程中 Top1 的参与尤为关键。Top1 抑制剂具有良好的抗癫痫^[2]、抗病毒^[3]、抗肿瘤^[4]作用, 对急性肺损伤^[5]以及系统性红斑狼疮也展现出良好的治疗效果。其中, Top1 抑制剂的抗肿瘤作用研究较为深入, 喜树碱、伊立替康、拓扑替康等作为抗肿瘤药^[6-7]已进入临床使用。酪氨酸-DNA 磷酸二酯酶 1 (Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, Tdp1) 是一种主要存在于真核生物中的酶, 可通过水解 3'-酪氨酰-DNA 键与 Top1 一起参与 DNA 损伤的修复^[8-9]。Tdp1 抑制剂普遍具有抗氧化损伤、抗肿瘤、抗病毒的活性^[10], 该抑制剂多用于增强 Top1 抑制剂的活性。Tdp1 抑制剂的使用可协同增强 Top1 抑制剂对横纹肌肉瘤^[11]、系统性红斑狼疮^[12]等疾病的疗效, 特别在抗肿瘤方面, Tdp1 抑制剂可提高 Top1 抑制剂的细胞毒性, 加速肿瘤细胞死亡, 从而提高 Top1 抑制剂的抗肿瘤效果^[13-15], Top1-Tdp1 抑制剂具有较高的应用前景。目前, 关于 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的文献较多, 但未对其研究的状况进行统一的归类整理。为整体把握 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的研究现状, 本研究采用文献计量学手段对两者之间的联系进行分析。

CiteSpace 是基于 JAVA 语言而设计的软件, 主要应用于文献计量学研究中。该软件通过知识图谱的节点大小、色彩变化、连线粗细对所检索的文献进行分析, 直观地展现文献中作者、机构、关键词等信息, 揭示彼此之间的联系^[16]。以图谱的方式展现结果不仅简单、易读、美观, 并且可实现对该主题的研究现状分析, 清晰明了地展现出该主题热点及研究的趋势。本文拟使用 CiteSpace 5.7.R5 软件对近年的 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂相关文献进行分析与归纳, 旨在为 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂的进一步研究与开发提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源与筛选

以 Web of Science (WOS) 核心合集数据库作为文献来源, 以主题词 DNA topoisomerase 1 inhibitor OR Top1 inhibitor OR Tyrosyl-DNA Phos-

phodiesterase 1 inhibitor OR Tdp1 inhibitor 进行检索, 检索时间为 2012 年 1 月 1 日至 2022 年 4 月 16 日, 共检索出 1225 篇文献。文章类型为 article 和 review, 经软件去重, 共剔除英文文献 39 篇, 最终纳入有效英文文献 1186 篇。

1.2 数据处理与分析

采用 CiteSpace 5.7.R5 软件进行数据分析。文献题录以“纯文本文件”格式导出, “download_*.txt”命名。软件分析条件设置为时间分区 (time slicing) 为 2012—2022 年; 时间切片 (years per slice) 为 1 年; 阈值 (top per N slice) 为 10%; 节点类型 (node type) 为作者、机构、被引期刊、国家、关键词; 修剪方式为 pathfinder、pruning sliced networks。

根据所设置的参数, 对所纳入的 1186 篇文献进行发文趋势、作者、机构、期刊共被引、国家以及关键词分析, 生成相应的图谱并且对数据进行深入分析。

2 结果与讨论

2.1 发文趋势

2012—2022 年发表的 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的文献年度发文量总体呈现波动上升的趋势 (见图 1), 2012—2016 年研究呈现增长趋势, 并于 2016 年达到峰值 (135 篇); 2017—2021 年呈波动式增长, 由于 2022 年的文献只纳入至 4 月故该年的发文量较少。总体来看近十年来对于 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂年发文量均在 100 篇以上, 具有较高的研究价值。

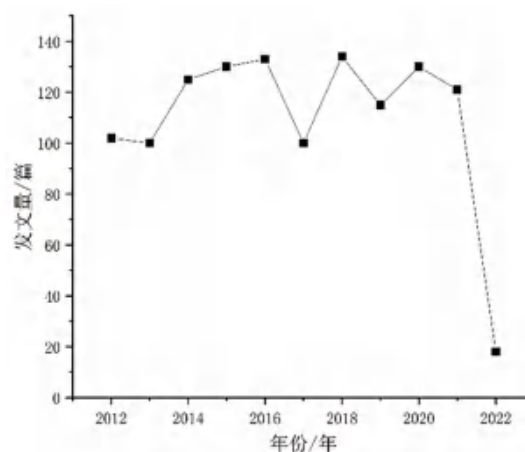


图 1 2012—2022 年 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂研究的年度发文量分布
Fig 1 Annual publications on the research of Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors from 2012 to 2022

2.2 作者

以“author”为图谱的节点, 生成 $N = 454$, $E = 997$, $density = 0.0097$ 的共现图谱。图谱共涉及 454 位作者, 彼此间的合作关系有 997 个,

网络密度为 0.0097 (见图 2)。图中节点代表作者, 节点间的连线代表作者之间的合作关系, 节点半径、字体大小与作者发文量成正比^[17], 结果显示共有 6 名作者发文量在 15 篇以上, 排名前三的作者分别为 Yves Pommier、Alexandra L Zakharenko、Keli Agama。

对 Top1 抑制剂或者 Tdp1 抑制剂的研究已经形成了两个较稳定、联系紧密的团队, 分别是以 Yves Pommier、Keli Agama、Christophe Marchand、Mark Cushman 为代表的团队和以 Alexandra L Zakharenko、Johannes Reynisson、Konstantin P Volcho 为代表的团队。

2.3 机构

以 “institution” 作为图谱节点, 对纳入的文献进行可视化分析。软件生成 $E = 361$, $N = 427$, $density = 0.0066$ 的机构共现图谱 (见图 3), 图中共有 361 个机构且机构间的合作关系为 427 个。从可视化结果来看, 发文量在 20 篇以上的机构有 4 家, 发文量在 15 ~ 20 篇的机构有 8 家。其中 Novosibirsk State Univ (新西伯利亚国立大学), Russian Acad Sci (俄罗斯科学院)、Univ Auckland (奥克兰大学)、Keele Univ (基尔大学) 之间存在相对紧密的合作关系。机构之间虽然具有一定的联系, 但是各机构合作较为分散, 发文量大的机构之间合作较为薄弱, 各机构间的联系仍需加强。

2.4 期刊共被引

以 “cited journal” 为节点, 对文献进行被引期刊分析, 结果显示期刊共被引频次最高为 *Journal of Biological Chemistry* (645 篇), 其次为 *Journal of Medicinal Chemistry* (624 篇)。本文利用期刊双图叠加分析期刊的专业领域分布 (见图 4), 图左侧为施引期刊、右侧为被引期刊^[18]。通过期刊双图叠加, 发现了 2 条橙色关键路径, 路径提示在 *Molecular/Biology/Immunology* 期刊发表的文章中引用 *Molecular/Biology/Genetics* 和 *Chemistry/Materials/Physics* 期刊中文章的频次较高, 表明 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的研究与分子生物、免疫遗传、化学领域密切相关。

2.5 国家

以 “country” 为节点, 对纳入的文献进行国家发表文献情况进行分析。结果涉及 71 个国家, 国家间的合作关系有 286 个, 发文量前三的分别为美国、中国、印度 (见表 1), 表明这几个国家对于 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂的研究较多。

2.6 关键词

2.6.1 关键词共现分析 关键词是对论文中心的

表 1 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究关键词发文量 ≥ 45 的英文文献

Tab 1 English literatures with Keywords of Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors more than 45		
序号	国家	发文量
1	The United States of America	347
2	Peoples' Republic of China	219
3	India	135
4	Japan	78
5	England	65
6	Russia	60
7	Italy	58
8	Egypt	52
9	France	48

概括, 涵盖了文章的内容与重点。以 “keywords” 作为节点, 合并同类项, 经软件分析形成 $E = 415$, $N = 1815$, $density = 0.021$ 的关键词共现图谱 (见图 5)。415 个关键词中, 英文文献关键词频次 ≥ 150 的有 6 个, 120 ~ 150 的有 4 个 (见表 2)。从可视化图谱中的关键词可知抑制剂、拓扑异构酶 I、拓扑异构酶、机制、细胞凋亡、衍生物节点较大。

表 2 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂英文文献频次 ≥ 127 的关键词

Tab 2 Keywords with frequency more than 127 in English literatures on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors		
No.	关键词	频次
1	inhibitor	228
2	topoisomerase I	213
3	topoisomerase	180
4	mechanism	166
5	apoptosis	157
6	anticancer	154
7	derivative	145
8	camptothecin	143
9	topoisomerase II	133
10	biological evaluation	127

2.6.2 关键词聚类分析 基于对数似然比 log likelihood ratio (LLR) 算法对所提取的关键词进行聚类分析, 其可视化结果如图 6 所示。图谱共获得 8 个有效聚类标签, $Q = 0.4443$ ($Q > 0.4$, Q 为模块值, 该值越大该主题越适合聚类, 其聚类结构越显著); $S = 0.7507$ ($S > 0.5$, S 为轮廓值, 其数值越大表明同一聚类的关键词同质性越强, 聚类结果越可信^[19])。图中各聚类相互重叠, 各聚类之间具有较为紧密的联系。根据其可视化结果可将聚类标签分为抑制剂设计合成研究和抗肿瘤、抗菌活性及机制研究两大类 (见表 3)。

对节点数较大的聚类进行分析发现, 聚类 #0 主要研究 DNA 损伤的机制、修复以及治疗方式; 聚类 #1 主要对 Tdp1 的生理作用及其抑制剂的作用



图 2 WOS 中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究的作者合作网络展示
Fig 2 Cooperation of authors on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors in WOS



图 3 WOS 中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究的机构合作网络展示
Fig 3 Cooperation of institutions on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors in WOS



图 4 WOS 中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂的发文期刊双图叠加分析
Fig 4 Dual map overlay in published literatures on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors in WOS

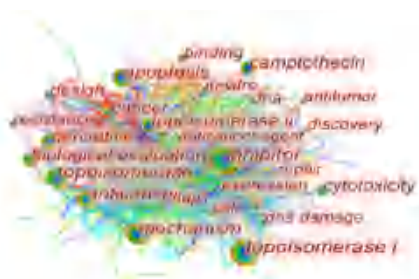


图 5 WOS 中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究的关键词共现网络展示
Fig 5 Co-occurrence network of keywords on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors in WOS

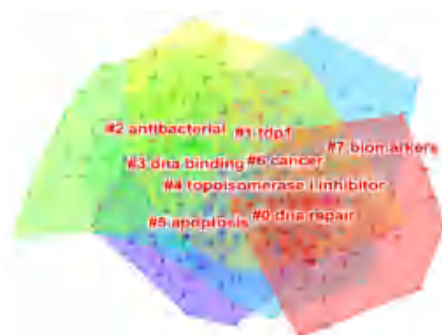


图 6 WOS 中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究的关键词聚类网络展示
Fig 6 Clustering network of keywords on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors in WOS

用机制进行分析；聚类 #2 侧重于相关抑制剂的抗菌机制及生物评价；聚类 #3 主要对抗肿瘤药物的抗增殖及细胞毒性进行探究；聚类 #4 主要对相关 Top1 抑制剂抗肿瘤药物及其耐药性进行研究。

基于关键词聚类图谱，选择“timeline view”生成 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂关键词聚类时间线图谱，对聚类的时间跨度及聚类间的联系进行可视化

分析（见图 7）。线图中年份为横坐标，聚类编号及名称为纵坐标，每个节点代表一个关键词，频次与节点成正相关关系。聚类 #0 dna repiar（DNA 修复）、#1 Tdp1、#2 antibacterial（抗 菌）、#3 dna binding（DNA 结 合）、#4 Topoisomerase I inhibitor（Top1 抑制剂）、#5 apoptosis（细胞凋亡）所代表的

表 3 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究英文文献关键词聚类分析

Tab 3 Clustering analysis of keywords in English literatures on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors				
聚类 ID	节点数	轮廓值	生成年份	主要关键词
#0	77	0.742	2014	activation; cell cycle; double-strand break; chemotherapy
#1	71	0.687	2016	cleavage; chromatin; transcription; damage
#2	68	0.864	2016	docking; derivative; inhibitor; DNA gyrase
#3	63	0.722	2014	antiproliferative activity; in vitro; cytotoxic activity; antitumor agent
#4	61	0.661	2015	drug resistance; breast cancer; topotecan; cancer cell
#5	52	0.793	2016	anticancer agent; inhibition; topoisomerase II; apoptosis

研究方向在近十年的研究中时间跨度相对较长，是具有较高研究价值的主题。

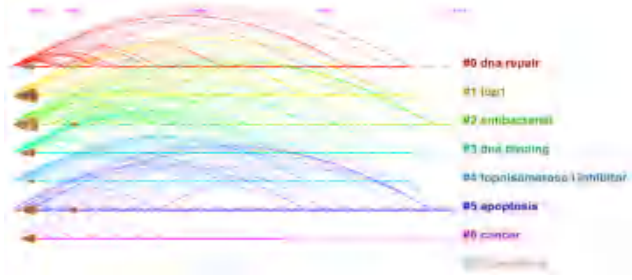


图 7 WOS 中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究的关键词聚类时间线图

Fig 7 Clustering analysis of timeline map of keywords on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors in WOS

2.6.3 关键词突现分析 若该关键词在短时间内出现次数大幅度增加则称之为关键词突现，可据此判断该段时间内该领域的研究趋势。图 8 中“begin”为突现开始时间，“end”为突现结束时间，“strength”为突变强度，突变强度越大影响力越大。WOS 中 Top1-Tdp1 相关文献关键词突现分析见下。

从突现强度看，排名前四的关键词分别为 replication（复制）、potent inhibitor（有效抑制剂）、doxorubicin（阿霉素）、enhance（增强）。从研究的时间看，各突现的持续时间较短，在 2012—2013 年的研究中更侧重抗肿瘤机制研究，主要关键词有 induced apoptosis（诱导凋亡）、gene（基因）、poison（毒药）；2014—2017 年侧重研究抗肿瘤抑制剂的抑制机制以及新抑制剂的发现，主要关键词有 podophyllotoxin（鬼臼毒素）、potent inhibitor、cell cycle arrest（细胞周期停滞）；2018—2022 年则侧重于通过计算机筛选、合成等方式发现新抑制剂以及增强原有抑制剂的抑制作用，主要关键词有 enhance、empirical scoring function（经验评分函数）、synthesis（合成）。从图 8 中可以看出 empirical scoring function、topoisomerase 1、enhance、model（模型）可能成为今后的研究热点。

3 讨论

3.1 研究核心团队

由作者共现图谱可知，对于 Top1、Tdp1 抑制剂的研究已形成了两个较大的团队，如 Yves

Top 24 Keywords with the Strongest Citation Bursts

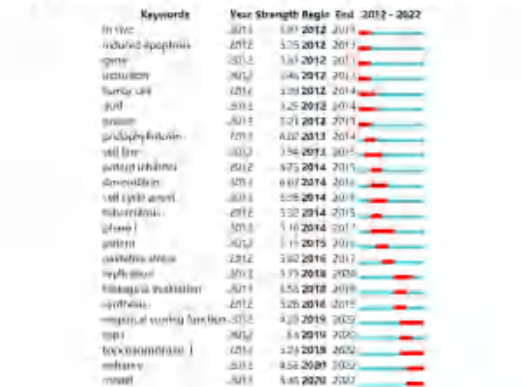


图 8 WOS 中 Top1 抑制剂与 Tdp1 抑制剂研究的关键词突现网络分析
Fig 8 Network analysis of the emergence of keywords on Top1 inhibitors or Tdp1 inhibitors in WOS

Pommier 和 Alexandra L Zakharenko 所带领的团队致力于 Top1、Tdp1 单一靶点的抑制剂及同时针对这两个靶点的双重抑制剂的发现以及抗肿瘤活性的研究。以 Yves Pommier 为代表的团队长期开展喹啉类衍生物的合成、抗肿瘤活性以及机制的研究。该团队最早提出了 Top1 酶及 Top1 抑制剂的作用机制^[20]，发现了非喜树碱类 Top1 抑制剂如双茛异喹啉化合物^[21]、吡啶异喹啉^[22]的良好抗肿瘤活性。研究中发现吡啶异喹啉芳环 2, 3 位含有硝基、二甲氧基或 8, 9 位含有亚甲基二氧基取代的吡啶异喹啉的糖苷衍生物，具有优越的 Top1 抑制活性。自 2008 年开始 Pommier 团队关注到 Tdp1 是潜在的抗肿瘤靶点^[23]，并通过高通量实验筛选出具有 Tdp1 抑制作用的化合物咪喃脒^[24]。研究过程中发现 Tdp1 抑制剂可协同增强 Top1 抑制剂的抗肿瘤效果，并在后续研究中成功合成了一系列具有 Top1-Tdp1 双靶点抑制作用的化合物^[25]。目前该研究团队的研究方向仍在于发现、合成新的 Top1、Tdp1 或双靶点甚至多靶点抑制剂^[26-27]以及通过多个抑制剂的联合使用提高药物的临床抗肿瘤疗效。

Mamontova 团队^[28]在抑制剂的研究中主要涉及 Tdp1 抑制剂发现、合成以及抗肿瘤活性评价，主要对单萜类化合物的 Tdp1 抑制作用进行研究。Zakharenko 团队通过单萜类片段与金刚烷^[29]、芳基香豆素^[30]、松子酸^[31]等结合来合成具有 Tdp1

抑制活性的化合物,该团队发现单萜与其他片段结合在毫摩尔浓度下具有良好的 Tdp1 抑制活性,同时增强了 Top1 抑制剂拓扑替康的细胞毒性,表明 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂具有高应用前景。该团队研究时间尚短,目前的研究重点为探究单萜类化合物对 Tdp1 抑制剂的作用以及新 Tdp1 抑制剂的发现^[32],未见更深入的药理研究。

3.2 关键词分析

从关键词可视化信息并结合聚类标签中可知, inhibitor (抑制剂)、topoisomerase (拓扑异构酶)、apoptosis (细胞凋亡)、derivative (衍生物)、biological evaluation (生物学评价)、cytotoxicity (细胞毒性)、DNA damage (DNA 损伤) 等关键词出现频次较高。结果表明对 Tdp1 抑制剂、Top1 抑制剂的研究中主要集中于 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的发现与合成、抗肿瘤活性及其机制研究、Top1 抑制剂和 Tdp1 抑制剂的抗菌活性三个方面。Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂多从结构修饰、全合成以及从天然植物中提取具有抑制活性的成分这三个途径获得。目前可运用高通量筛选法筛选出新的具有抑制活性的化合物; Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的抗肿瘤活性与其细胞毒性相关,抑制剂可上调 P53 基因的表达,将肿瘤细胞阻滞于 G₁ 期或抑制抗凋亡蛋白 cIAP2 的表达加速细胞凋亡从而达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。在抗菌研究方面主要以 DNA 旋转酶、拓扑异构酶 IV 作为有效的抗菌靶点。

3.3 研究现状及趋势

关键词突现可反映出该研究领域的热点与前沿发展,关键词突现结果发现近三年发表的相关文献中的突现词分别为 empirical scoring function、protein ligand docking、enhance、model。其中,突现强度最大的关键词为“enhance”,表明如何增强抑制剂的抑制作用是未来 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的研究重点。同时两者相关研究均集中于抗肿瘤方面,因此如何提高 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的抗肿瘤活性是未来的研究趋势。

3.3.1 Top1 抑制剂研究现状及趋势 Top1 抑制剂抗肿瘤活性研究自 20 世纪就有相关报道,对于 Top1 抑制剂的发现、合成、构效关系研究、药理活性、临床应用等方面已经较为成熟。Top1 抑制剂可分为喜树碱和非喜树碱类化合物,喜树碱类化合物包括喜树碱及其衍生物,非喜树碱类化合物包括茚并异喹啉类、吲哚咪唑类、苯并咪唑类、吡啶类、黄酮类、苯并菲啶类化合物以及一些金属配合物^[33-34]。

喜树碱是从喜树 (*Camptotheca acuminata*)

中分离出的一种五环生物碱,其衍生物拓扑替康、伊立替康、10-羟基喜树碱、贝洛替康等目前已作为抗肿瘤药物应用于临床中^[35](结构见图 9)。喜树碱类药物虽然对多种癌症有疗效,但由于水溶性较差且伴随着腹泻、中性白细胞减少等严重的不良反应使得其临床应用受到限制^[36]。因此,非喜树碱类 Top1 抑制剂的发现引起了广泛关注,其结构修饰以及相关抗肿瘤活性是研究的重点,已有多种衍生物进入临床前研究。如茚并异喹啉类化合物 (NSC314622、LMP776、LMP400、LMP744)、吲哚咪唑类化合物 Edotecarin、苯并咪唑类化合物多韦替尼以及吡啶类化合物胺苯吡啶^[33, 37]等均已进入临床研究阶段(结构见图 10)。茚并异喹啉酮 NSC 314622 因化学结构稳定、较强的抗增殖活性和多靶点抑制效果而受研究者的广泛关注,研究发现在茚并异喹啉酮 A 环 2 或 3 位、B 环 6 位 N 上的取代基、C 环 8 或 9 位以及 D 环 11 位有咪唑、吗啉、硝基、甲氧基等不同取代基时均可不同程度增强 Top1 抑制活性^[38-41],特别是 6 位 N 上连有吗啉 (LMP400)、咪唑 (LMP776) 基团的化合物表现出强的 Top1 抑制作用,对淋巴瘤展现出良好的疗效。此外,苯并菲啶类生物碱的抗肿瘤活性也引起学者们的注意,主要包含血根碱、勒榿碱、白屈菜红碱、两面针碱以及花椒宁碱等,该类化合物普遍具有良好的抗肿瘤活性,特别是 2, 3 位的亚甲基二氧基、8, 9 位的甲氧基取代可使化合物具有高 Top1 抑制活性^[42]。有研究表明,苯并菲啶骨架 A 环替换成嘧啶环取代物后在微摩尔浓度下表现出强烈的 Top1 抑制活性,并对 MGC-803、HepG-2、NCI-H460、SKOV3、T24 等多种肿瘤细胞有良好的生长抑制活性^[43]。吲哚咪唑类代表化合物 Edotecarin,其 6 位上的 2-甲基吡啶取代物在纳摩尔浓度下表现出 Top1 抑制活性,并且对 MKN-45 人胃癌和 MX-1 人乳腺癌异种移植小鼠的抗肿瘤活性高于 Edotecarin^[44]。苯并咪唑类代表化合物 Hoechst 33258 的二氯代物在 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下具有 Top1 抑制作用,其对 U87 细胞的细胞毒性是 Hoechst 33258 的 2.8 倍,对 HeLa 细胞的毒性甚至与喜树碱相当^[45]。9-苄基氧基吡啶类似物不仅具有中等强度的 Top1 抑制活性,同时对酪氨酸激酶、VEGFR-2 和 Src 等也均有抑制活性^[46]。CiteSpace 软件分析发现,近十年来借助计算机通过虚拟筛选的方式来设计合成一系列 Top1 抑制剂具有较高的研究热度,对这些活性骨架进行结构修饰并发现新 Top1 抑制剂仍然是目前研究的重要发展方向。

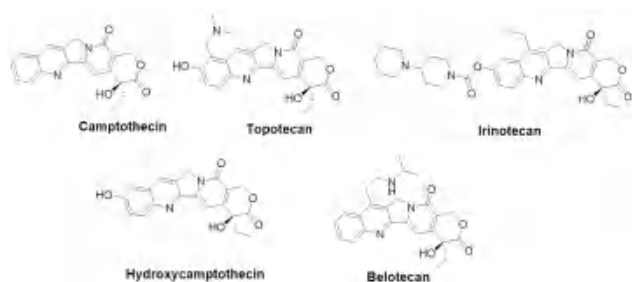


图 9 喜树碱类抑制剂

Fig 9 Camptothecin inhibitors

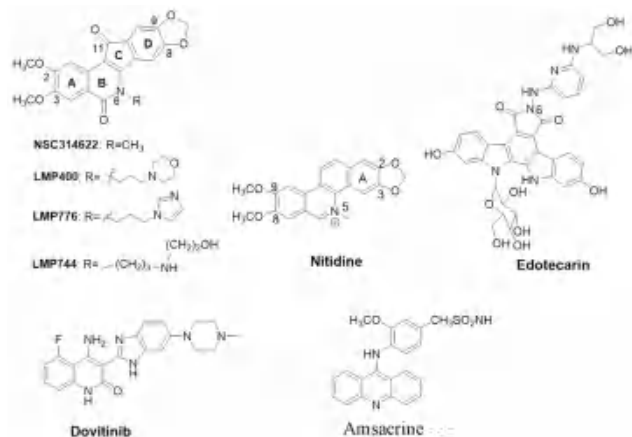


图 10 非喜树碱类抑制剂

Fig 10 Non-camptothecin inhibitors

3.3.2 Tdp1 抑制剂研究现状及趋势 Tdp1 是近年发现的抗肿瘤的新靶点, 关于 Tdp1 抑制剂的研究还比较少, 目前 Tdp1 抑制剂多在现有药物中筛选以及化学合成得到。钒酸盐和钨酸盐是最早报道的 Tdp1 抑制剂, 可通过抑制多种参与磷酸化酰基转移反应的酶来发挥抑制作用, 但因为两者对磷酸基转移反应的广泛活性, 未能作为药物抑制剂使用^[13, 38]。Marchand 等^[47]发现苏拉明具有 Tdp1 抑制活性, 并可抑制多种生长因子从而抑制肿瘤细胞增殖。除此之外, Liao 等^[48]发现氨基糖苷类抗菌药物如新霉素等具有一定的 Tdp1 抑制作用。

研究者发现通过化学结构修饰所获得的 Tdp1 抑制剂在微摩尔至纳摩尔浓度范围下具有较好的 Tdp1 抑制活性, 同时这些 Tdp1 抑制剂普遍具有良好的抗肿瘤活性 (见图 11)。Jun 等^[49]设计并合成了嘧啶基磺胺类化合物, 其中化合物 **1** 可明显抑制 Tdp1 的活性, IC_{50} 值为 $23.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并且对白血病细胞系 HL-60-TB 表现出较为显著的抑制活性。Dexheimer 等^[50]发现类固醇衍生物孕酮用苯基磺酰基团取代后获得了良好的 Tdp1 活性, 特别是 NSC88915 (**2**) 对 Tdp1 的抑制效果较强, 该化合物的 IC_{50} 值达到了 $7.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Sirivolu 等^[51]经构效关系研究发现了芳基硫氧嘧啶烷类化合物的 Tdp1 抑制活性, 其代表化合物 (**3**) IC_{50} 为 0.87

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Dean 等^[52]证实了化合物 CD00509 (**4**) 具有 Tdp1 靶向抑制作用, IC_{50} 值达到 $0.71 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 该化合物不仅增加了细胞对喜树碱的敏感性, 增加 DNA 的断裂并且对 MCF-7 细胞具有良好的细胞毒性。Zakharenko 等^[53]合成了苯并戊硫吡啶类化合物, 该团队发现此类化合物具有强的 Tdp1 抑制活性, 其 IC_{50} 值达 $0.22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可引起 MCF-7 和 HepG-2 细胞的凋亡进而导致细胞死亡, 其中细胞毒性最强为化合物 **5**。此外, Zakharenko 等^[54]发现松萝酸胍噻唑衍生物 (**6**) 具有很强的 Tdp1 抑制作用, 其 IC_{50} 值达到纳摩尔级别 ($26 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 并且可协同增强抗肿瘤药物拓扑替康的抗增殖作用。该化合物经小鼠的急性毒性实验表明该化合物 LD_{50} 超过 $5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 口服无毒, 并对 Lewis 肺癌小鼠有明显的治疗效果。

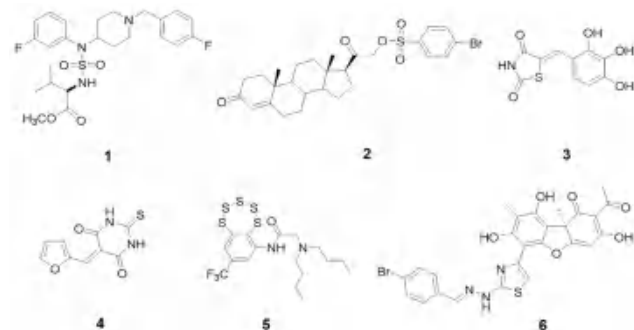


图 11 部分 Tdp1 抑制剂

Fig 11 Partial Tdp1 inhibitors

从目前已知的 Tdp1 抑制剂来看, 具有磺酸基、苯硫平、噻唑等片段的化合物均具有较强的 Tdp1 抑制活性。有文献报道磺酸基团可与人 Tdp1 蛋白形成稳定的配合物^[55], 阻止 Tdp1 参与 Top1 对 DNA 的修复从而达到抗肿瘤的目的, 因此在结构中引入这些活性片段可能获得具有强 Tdp1 抑制作用的化合物。但是 Tdp1 抑制剂的研究目前仍处于初级阶段, 发现更多 Tdp1 抑制剂以及阐明其构效关系仍然是目前的研究重点。CiteSpace 软件分析也表明借助高通量筛选、分子模拟等方式发现新型 Tdp1 抑制剂具有较高的发展前景, 结合计算机来发现更多 Tdp1 抑制剂或具有 Tdp1 抑制活性基团是目前该类抑制剂研究的趋势。

3.4 研究不足与展望

通过对近十年文献分析发现, 中文数据库文献不多仅有 53 篇, Tdp1 抑制剂相关文献仅有 2 篇, 中文文献主要针对 Top1 抑制剂的设计、抗肿瘤活性研究及 Top1 抑制剂治疗不同肿瘤的机制进行研究; 目前文献发文主要以英文文献为主, 但多集中于单靶点抑制剂的研究。Top1 抑制剂虽然具有良好抗肿瘤活性但其毒副作用不可避免, 也

限制了 Top1 抑制剂在临床上的应用, 如何降低 Top1 抑制剂的毒性仍是未来重要研究方向。此外, Tdp1 抑制剂目前的研究不多, 已知的 Tdp1 抑制剂种类及数量较少, 与 Top1 抑制剂如何协同发挥抗肿瘤作用的研究仍处于初级阶段, Tdp1 抑制剂开发以及构效关系研究是目前研究热点之一。近年来有研究表明, Tdp1 抑制剂临床上可协同增强 Top1 抑制剂对肿瘤细胞的细胞毒性并提高了伊立替康的抗转移作用^[14], 因此, 开发一系列 Top1-Tdp1 双重抑制剂作为靶向抗肿瘤药物具有较高的发展潜力。本课题组近年来也对 Top1 抑制剂的设计合成以及抗肿瘤活性进行了深入的研究, 先后以吡啶、两面针碱、吡喃香豆素为骨架, 结合药物拼合的原理通过引入一系列杂环、氨基、酰胺基、硫脲基等活性基团, 发现了部分活性优越且毒副作用较小的先导化合物^[56-58]。研究发现这些化合物良好的 Top1 抑制活性可能与其结构中的共轭平面相关, 计算机辅助药物设计显示这些平面结构可通过氢键、疏水键等嵌入 DNA 中发挥抑制作用。但遗憾的是目前我们只进行了 Top1 抑制活性研究, 这些结构对 Tdp1 是否同时具有抑制活性仍需要进一步验证, 以这些骨架为母核进一步设计合成 Top1-Tdp1 双抑制剂是未来的研究方向。

目前所知的 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂对多种肿瘤细胞均有良好的抑制效果, 且具有特异性强、疗效好、耐受性强, 毒性反应小的优势。已知的双靶点抑制剂有从樟芝提取出的多糖 ACPS-1^[59]、茛并异喹啉类化合物 (7)^[24, 60]、苯并菲啶酮类化合物 (8、9)^[41, 61]、从天然植物中提取出的查耳酮衍生物 (10、11)^[62]、白藜芦醇 (12)、紫檀芪 (13)^[63] 等 (见图 12)。其中对茛并异喹啉化合物的研究最为深入且效果最好, 茛并异喹啉化合物不仅化学结构稳定并且克服了喜树碱化合物易失活、剂量毒性等缺点。其中双氨基茛并异喹啉 (7) 具有与喜树碱相当的抑制活性并且在毫摩尔浓度下即可展现出良好的抗肿瘤活性。此外, 从天然植物中提取的化合物具有较高的发展潜力。如白藜芦醇与紫檀芪具有良好的 Top1 酶抑制活性, 特别是紫檀芪抑制活性强于喜树碱。两者均能降低过表达 Tdp1 的 CL187 细胞系细胞的 Tdp1 的含量, 显著提高细胞的存活率^[63]。进一步药理研究机制表明, 白藜芦醇与紫檀芪可通过抑制 Top1-Tdp1 介导的 DNA 损伤修复通路与 Top1、Tdp1 的 mRNA 的表达, 延缓肿瘤细胞生长。Top1-Tdp1 双靶点抑制剂不仅活性高且不良反应少, 部分化合物甚至不会对正常细胞产生抑制作用, 具有很高的应用前景^[59, 62]。

许多 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂虽然已被发现, 但 Tdp1 如何协同 Top1 发挥抗肿瘤活性, 增强其抗肿瘤活性仍需要进一步研究证实。

因此, 如何发现更多新型 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂甚至 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂及进一步提高药物的抗肿瘤活性将成为未来的研究趋势以及热点。

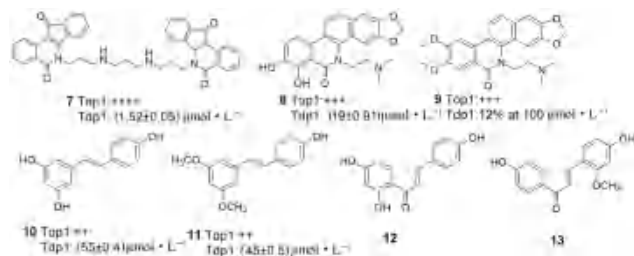


图 12 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂

Fig 12 Top1-Tdp1 dual target inhibitor

4 结论

本文运用 CiteSpace 软件对 WOS 数据库近 10 年文献中发表的 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的相关文献进行作者、机构合作、国家、期刊被引、关键词分析旨在直观展现 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂的研究现状及趋势。分析结果表明目前 Top1 抑制剂、Tdp1 抑制剂在抗肿瘤方面的研究中保持较高的热度, 但机构间合作较少、单靶点抑制剂或者 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂数量少、药理研究不足、临床应用欠缺等问题仍亟待解决。设计合成更多 Top1、Tdp1 或者 Top1-Tdp1 双靶点抑制剂并发现高效低毒的抗肿瘤先导化合物是未来学者的关注重点, 有待更深入的研究。

参考文献

- [1] Pommier Y, Redon C, Rao VA, et al. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage [J]. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2003, 532 (1-2): 173-203.
- [2] Song J, Hu J, Tanouye M. Seizure suppression by Top1 mutations in drosophila [J]. *J Neurosci*, 2007, 27 (11): 2927-2937.
- [3] Wu KX, Chu JJH. Antiviral screen identifies EV71 inhibitors and reveals camptothecin-target, DNA topoisomerase 1 as a novel EV71 host factor [J]. *Antivir Res*, 2017, 143: 122-133.
- [4] Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8 (1): 82-95.
- [5] Jin JJ, Xu WJ, Wan B, et al. Topotecan alleviates lipopolysaccharide-mediated acute lung injury via the NF-kappa B signaling pathway [J]. *J Sur Res*, 2019, 235: 83-92.
- [6] Mathijssen RHJ, Loos WJ, Verweij J, et al. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan [J]. *Curr Cancer Drug Tar*, 2002, 2 (2): 103-123.
- [7] Meisenberg C, Gilbert DC, Chalmers A, et al. Clinical and cellular roles for TDP1 and TOP1 in modulating colorectal

- cancer response to irinotecan [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14 (2): 575-585.
- [8] Interthal H, Pouliott JJ, Champoux JJ. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (21): 12009-12014.
 - [9] Pouliot JJ, Yao KC, Robertson CA, et al. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes [J]. *Science*, 1999, 286 (5439): 552-555.
 - [10] Gao R, Das BB, Chatterjee R, et al. Epigenetic and genetic inactivation of tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 (TDP1) in human lung cancer cells from the NCI-60 panel [J]. *DNA Repair*, 2014, 13: 1-9.
 - [11] Fam HK, Walton C, Mitra SA, et al. TDP1 and PARP1 deficiency are cytotoxic to rhabdomyosarcoma cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11 (10): 1179-1192.
 - [12] Keil A, Frese-Schaper M, Steiner SK, et al. The topoisomerase I inhibitor irinotecan and the tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitor furamidine synergistically suppress murine lupus nephritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67 (7): 1858-1867.
 - [13] Beretta GL, Cossa G, Gatti L, et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 targeting for modulation of camptothecin-based treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17 (15): 1500-1508.
 - [14] Zakharenko A, Dyrkheeva N, Lavrik O. Dual DNA topoisomerase I and tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibition for improved anticancer activity [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39 (4): 1427-1441.
 - [15] Laev SS, Salakhutdinov NF, Lavrik OI. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase inhibitors: progress and potential [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2016, 24 (21): 5017-5027.
 - [16] 陈悦, 陈超美, 刘则渊, 等. CiteSpace 知识图谱的方法论功能 [J]. *科学学研究*, 2015, 33 (2): 242-253.
 - [17] 韩姗姗, 代彦林, 丁樱, 等. 雷公藤毒性研究进展的 CiteSpace 知识图谱分析 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (4): 1085-1094.
 - [18] Chen CM, Leydesdorff L. Patterns of connections and movements in dual-map overlays: a new method of publication portfolio analysis [J]. *J Asso Inf Sci Tech*, 2014, 65 (2): 334-351.
 - [19] 杨京航, 康世奇, 苏晓慧, 等. 基于 CiteSpace 对山豆根研究进展的可视化分析 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (7): 1763-1768.
 - [20] Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6 (10): 789-802.
 - [21] Nagarajan M, Morrell A, Antony S, et al. Synthesis and biological evaluation of bisindenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2006, 49 (17): 5129-5140.
 - [22] Beck DE, Agama K, Marchand C, et al. Synthesis and biological evaluation of new carbohydrate-substituted indenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors and improved syntheses of the experimental anticancer agents indotecan (LMP400) and indimitecan (LMP776) [J]. *J Med Chem*, 2014, 57 (4): 1495-1512.
 - [23] Dexheimer TS, Antony S, Marchand C, et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase as a target for anticancer therapy [J]. *Anti-Cancer Agent Me*, 2008, 8 (4): 381-389.
 - [24] Antony S, Marchand C, Stephen AG, et al. Novel high-throughput electrochemiluminescent assay for identification of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors and characterization of furamidine (NSC 305831) as an inhibitor of Tdp1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35 (13): 4474-4484.
 - [25] Nguyen TX, Morrell A, Conda-Sheridan M, et al. Synthesis and biological evaluation of the first dual tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1)-topoisomerase I (Top1) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2012, 55 (9): 4457-4478.
 - [26] Elbadawi MM, Eldehna WM, Wang WJ, et al. Discovery of 4-alkoxy-2-aryl-6, 7-dimethoxyquinolines as a new class of topoisomerase I inhibitors endowed with potent in vitro anticancer activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 215 (10): 113261.
 - [27] Yang H, Wang FT, Wu M, et al. Synthesis of 11-aminoalkoxy substituted benzophenanthridine derivatives as tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitors and their anticancer activity [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 123: 105789.
 - [28] Mamontova EM, Zakharenko AL, Zakharova OD, et al. Identification of novel inhibitors for the tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 (Tdp1) mutant SCAN1 using virtual screening [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2020, 28 (1): 115234.
 - [29] Mozhaitev ES, Zakharenko AL, Suslov EV, et al. Novel inhibitors of DNA repair enzyme TDP1 combining monoterpenoid and adamantane fragments [J]. *Anti-Cancer Agent Me*, 2019, 19 (4): 463-472.
 - [30] Khomenko TM, Zakharenko AL, Chepanova AA, et al. Promising new inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1) combining 4-aryl coumarin and monoterpenoid moieties as components of complex antitumor therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (1): 126.
 - [31] Dyrkheeva NS, Filimonov AS, Luzina OA, et al. New hybrid compounds combining fragments of usnic acid and monoterpenoids for effective tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibition [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (7): 973.
 - [32] Salomatina OV, Popadyuk, Ii, Zakharenko AL, et al. Deoxycholic acid as a molecular scaffold for tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibition: a synthesis, structure-activity relationship and molecular modeling study [J]. *Steroids*, 2021, 165: 108771.
 - [33] 冯庆梅, 陈刚, 裴月湖. DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂的研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2015, 32 (11): 900-910.
 - [34] 汤晟, 孙鑫, 陈铮, 等. 吡啶类抗癌药物的研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (1): 121-128.
 - [35] Thomas CJ, Rahier NJ, Hecht SM. Camptothecin: current perspectives [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2004, 12 (7): 1585-1604.
 - [36] 郭晓鹏, 冯思良, 王金辉, 等. 拓扑异构酶 I 及其喜树碱类抑制剂的临床研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2013, 40 (4): 405-414.
 - [37] Burton JH, Mazcko C, Leblanc A, et al. NCI comparative oncology program testing of non-camptothecin indenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors in naturally occurring canine

- lymphoma [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24 (23): 5830-5840.
- [38] 丛蔚, 吴晓明, 徐进宜. 茚并异喹啉酮类拓扑异构酶 I 抑制剂的研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2014, 22 (3): 239-245.
- [39] Nagarajan M, Morrell A, Ioanoviciu A, et al. Synthesis and evaluation of indenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors substituted with nitrogen heterocycles [J]. J Med Chem, 2006, 49 (21): 6283-6289.
- [40] Fox BM, Xiao XS, Antony S, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of cytotoxic 11-alkenylindenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors and indenoisoquinoline-Camptothecin hybrids [J]. J Med Chem, 2003, 46 (15): 3275-3282.
- [41] Nguyen TX, Abdelmalak M, Marchand C, et al. Synthesis and biological evaluation of nitrated 7-, 8-, 9-, and 10-hydroxyindenoisoquinolines as potential dual topoisomerase I (Top1)-tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (TDP1) inhibitors [J]. J Med Chem, 2015, 58 (7): 3188-3208.
- [42] 侯宝龙, 王翠玲, 刘建利, 等. 拓扑异构酶 I 抑制剂类抗癌药物的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23 (1): 63-71 + 76.
- [43] 孔石林. 苯并菲啶 A 环结构改造物的设计、合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 南宁: 广西师范大学, 2016.
- [44] Sunami S, Nishimura T, Nishimura I, et al. Synthesis and biological activities of topoisomerase I inhibitors, 6-aryl-methylamino analogues of edotecarin [J]. J Med Chem, 2009, 52 (10): 3225-3237.
- [45] Singh M, Tandon V. Synthesis and biological activity of novel inhibitors of topoisomerase I: 2-Aryl-substituted 2-bis-1H-benzimidazoles [J]. Eur J Med Chem, 2011, 46 (2): 659-669.
- [46] Lang XL, Sun QS, Chen YZ, et al. Novel synthetic 9-benzoyloxyacridine analogue as both tyrosine kinase and topoisomerase I inhibitor [J]. Chinese Chem Let, 2013, 24 (8): 677-680.
- [47] Marchand C, Lea WA, Jadhav A, et al. Identification of phosphotyrosine mimetic inhibitors of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase I by a novel AlphaScreen high-throughput assay [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8 (1): 240-248.
- [48] Liao ZY, Thibaut L, Jobson A, et al. Inhibition of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase by aminoglycoside antibiotics and ribosome inhibitors [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70 (1): 366-372.
- [49] Jun JH, Kumar V, Dexheimer TS, et al. Synthesis, anti-cancer screening and tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1) inhibition activity of novel piperidinyl sulfamides [J]. Eur J Pharm Sci, 2018, 111: 337-348.
- [50] Dexheimer TS, Gediya LK, Stephen AG, et al. 4-pregnen-21-ol-3, 20-dione-21- (4-bromobenzenesulfonate) (NSC 88915) and related novel steroid derivatives as tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors [J]. J Med Chem, 2009, 52 (22): 7122-7131.
- [51] Sirivolu VR, Vernekar SKV, Marchand C, et al. 5-arylidene-ethiothiazolidinones as inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I [J]. J Med Chem, 2012, 55 (20): 8671-8684.
- [52] Dean RA, Fam HK, An JH, et al. Identification of a putative Tdp1 inhibitor (CD00509) by in vitro and cell-based assays [J]. J Bio Screen, 2014, 19 (10): 1372-1382.
- [53] Zakharenko A, Khomenko T, Zhukova S, et al. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitors with a benzopentathiepine moiety [J]. Bioorgan Med Chem, 2015, 23 (9): 2044-2052.
- [54] Zakharenko AL, Luzina OA, Sokolov DN, et al. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models [J]. Eur J Med Chem, 2019, 161: 581-593.
- [55] Ramarajan D, Tamilarasan K, Milanovic Z, et al. Vibrational spectroscopic studies (FTIR and FT-Raman) and molecular dynamics analysis of industry inspired 3-amino-4-hydroxybenzene sulfonic acid [J]. J Mol Struct, 2020, 1205: 127579.
- [56] Chen R, Huo LN, Jaiswal Y, et al. Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 4-acyloxy derivatives of robustic acid [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (21): 5336.
- [57] Chen R, Huang JY, Jaiswal Y, et al. Molecular design, synthesis and docking study of alkyl and Benzyl derivatives of robustic acid as topoisomerase I inhibitors [J]. Chem Biodivers, 2020, 17 (3): e1900556.
- [58] Chen R, Yuan CY, Jaiswal Y, et al. Synthesis and biological evaluation of some 1, 8-naphthalimide-acridinyl hybrids [J]. J Chem-Ny, 2020, 2020: 7989852.
- [59] Zhang YT, Wang Z, Li DY, et al. A polysaccharide from Antrodia cinnamomea mycelia exerts antitumor activity through blocking of TOP1/TDP1-mediated DNA repair pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120: 1551-1560.
- [60] Hu DX, Tang WL, Zhang Y, et al. Synthesis of methoxy-, methylenedioxy-, hydroxy-, and halo-substituted benzophenanthridinone derivatives as DNA topoisomerase IB (TOP1) and tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (TDP1) inhibitors and their biological activity for drug-resistant cancer [J]. J Med Chem, 2021, 64 (11): 7617-7629.
- [61] Zhang XR, Wang HW, Tang WL, et al. Discovery, synthesis, and evaluation of oxynitidine derivatives as dual inhibitors of DNA topoisomerase IB (TOP1) and tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (TDP1), and potential antitumor agents [J]. J Med Chem, 2018, 61 (22): 9908-9930.
- [62] Zhang HL, Zhang Y, Yan XL, et al. Secondary metabolites from isodon ternifolius (D. Don) Kudo and their anticancer activity as DNA topoisomerase IB and Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28 (11): 115527.
- [63] Zhang YT, Li Y, Sun CC, et al. Effect of pterostilbene, a natural derivative of resveratrol, in the treatment of colorectal cancer through Top1/Tdp1-mediated DNA repair pathway [J]. Cancers, 2021, 13 (16): 4002.

(收稿日期: 2022-10-18; 修回日期: 2022-12-27)

华法林抗凝质量影响因素的 Meta 分析与预测模型

史金平, 张琰*, 唐亚娟, 王立珍, 路小寒, 白娟, 洪术霞 (西安国际医学中心医院药学部, 西安 710000)

摘要: **目的** 通过构建华法林抗凝质量预测模型, 提高华法林抗凝效果。**方法** 计算机检索国内外数据库, 对建库之初至 2022 年 5 月 1 日之间的所有关于华法林抗凝质量影响因素的研究进行 Meta 分析, 筛选影响因素, 构建华法林抗凝质量的预测模型。**结果** 共获得 3390 篇文献, 最终纳入文献 17 篇, 包含 66 119 名患者, Meta 分析结果显示: 年龄、糖尿病、心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病、肝脏疾病、肾脏疾病是治疗范围内时间百分比 (TTR) 达标的影响因素。以此构建的华法林抗凝质量预测模型为 $\text{Logit}(P) = -0.819 + 0.015X_{\text{年龄}} - 0.146X_{\text{糖尿病}} - 0.180X_{\text{心衰}} - 0.209X_{\text{慢阻肺}} - 0.511X_{\text{肝脏疾病}} - 0.464X_{\text{肾脏疾病}}$, ROC 曲线下面积为 0.807, 95% 置信区间为 (0.715, 0.900), 最佳临界值为 $\text{Logit}(P) = -1.238$ 、敏感性为 0.829、特异性为 0.714。**结论** 基于 Meta 分析构建的华法林抗凝质量预测模型能有效预测患者 TTR 是否达标, 预测效能中等, 但仍需大量数据验证。

关键词: 华法林; 抗凝质量; 治疗范围内时间百分比; 影响因素; Meta 分析; 预测模型

中图分类号: R541.75, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)06-1684-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.045

Factors affecting the anticoagulation quality of warfarin: a meta-analysis and prediction model

SHI Jin-ping, ZHANG Yan*, TANG Ya-juan, WANG Li-zhen, LU Xiao-han, BAI Juan, HONG Shu-xia (Department of Pharmacy, Hospital of Xi'an International Medical Center, Xi'an 710000)

Abstract: **Objective** To establish the prediction model of warfarin anticoagulation quality, and to improve anticoagulation of warfarin. **Methods** We searched domestic and foreign databases, conducted a meta-analysis of all relevant studies on factors affecting the anticoagulation quality of warfarin from the beginning of the database to May 1st, 2022. We also screened the influencing factors, and constructed a prediction model of anticoagulation quality. **Results** Totally 3390 articles were retrieved from the databases, and 17 studies were included, involving 66 119 patients. The meta analysis showed that age, diabetes mellitus (DM), heart failure (HF), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), liver disease (LD), and kidney disease (KD) were the risk factors for the standard time within therapeutic range. The prediction model of warfarin anticoagulation quality was $\text{Logit}(P) = -0.819 + 0.015X_{\text{Age}} - 0.146X_{\text{DM}} - 0.180X_{\text{HF}} - 0.209X_{\text{COPD}} - 0.511X_{\text{LD}} - 0.464X_{\text{KD}}$. The AUC of ROC was 0.807, the 95% confidence interval was (0.715, 0.900), the best critical value was $\text{Logit}(P) = -1.238$, the sensitivity was 0.829, and the specificity was 0.714. **Conclusion** The prediction model of warfarin anticoagulation quality based on meta-analysis can predict whether patients' TTR reaches the standard with moderate prediction efficiency, which still needs to be verified with more data.

Key words: warfarin; anticoagulation quality; time within therapeutic range; influence factor; meta-analysis; prediction model

华法林是一种维生素 K 拮抗剂口服抗凝药, 治疗, 也用于关节置换手术、人工心脏瓣膜置换广泛用于静脉血栓栓塞性疾病、非瓣膜性房颤的手术等外科手术后血栓栓塞性疾病的预防, 其抗

作者简介: 史金平, 男, 主管药师, 主要从事抗凝药物治疗, email: 903442614@qq.com * **通信作者:** 张琰, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事抗感染药物治疗, email: 648773953@qq.com

凝治疗的有效性与安全性取决于抗凝治疗的国际标准化比值 (international normalized ratio, INR) 和治疗范围内时间百分比 (time within therapeutic range, TTR), 但由于其治疗窗窄、个体差异大、易受食物及药物等因素影响, 部分患者难以取得较高的抗凝质量^[1]。2022 年 Tadesse 等^[2]的一项 Meta 分析显示, 仅 10.4% ~ 32.3% 的华法林使用者达到了理想的抗凝水平, 且慢性疾病、年龄 < 50 岁、女性、受教育程度较低、吸烟史等是影响华法林抗凝质量的危险因素, 但该研究未进一步建立预测模型, 不能对接受华法林治疗的患者抗凝质量进行预测。目前关于华法林给药剂量及抗凝质量影响因素的研究较多, 但缺乏华法林抗凝质量的预测模型^[3]。本文通过 Meta 分析扩大了样本量, 对影响 TTR 达标的多项因素进行效应量合并, 利用各影响因素的风险值 (OR/RR 值) 建立 Logistic 预测模型, 可在治疗之初通过患者的基本信息, 预测该患者使用华法林的抗凝质量, 指导患者用药^[4]。

1 资料与方法

1.1 Meta 分析

1.1.1 文献纳入及排除标准 纳入标准: ① 国内外已经公开发表的华法林抗凝质量影响因素的研究; ② 以 TTR 是否达标作为评价抗凝质量的指标。排除标准: ① 纽卡斯尔-渥太华量表 (Newcastle-Ottawa Scale, NOS) 评分 < 5 分的研究; ② 综述及经验总结性文献; ③ 无法合并效应量的研究; ④ 仅纳入一项影响因素的研究。

1.1.2 文献检索策略 采用“主题+关键词”的检索方式, 以“‘华法林’ AND (‘抗凝质量’ OR ‘治疗范围内时间百分比’ OR ‘达标时间百分比’)”为中文检索策略, 以“‘warfarin’ AND (‘anticoagulant quality’ OR ‘time within therapeutic range’ OR ‘percentage of time reaching the standard’ OR ‘TTR’)”为英文检索策略, 检索 PubMed、Cochrane Library、Embase、中国知网数据库、维普期刊全文数据库、万方数据库从建库之初至 2022 年 5 月 1 日发表的全部文献。

1.1.3 文献纳入及风险偏倚评价 依据制订的检索策略进行文献检索, 获得的文献经 EndNote 软件去重后由两名研究人员依据文献纳入标准及排除标准独立交叉筛选符合本次研究的文献, 两名研究员出现分歧时, 由第三名研究员讨论裁决, 然后制订基本信息数据表, 提取所需数据。由两位研究员依据 NOS 评分标准对纳入的文献质量进行评分, 满分为 10 分, 评分 ≥ 5 分为高质量

文献, 评分 < 5 分为低质量文献, 两名研究员出现分歧时, 由第三名研究员讨论裁决。

1.2 模型的构建

基于 Meta 分析的结果, 以 TTR 达标的影响因素为基础, 建立华法林抗凝质量预测模型, 公式为: $\text{Logit}(P) = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_n X_n$, 其中 α 为某段时间某地区获得高抗凝质量的人数比率与低抗凝质量人数比率之比的自然对数, 公式简化为 $\alpha = \ln[P/(1-P)]$, X_n 为第 n 个危险因素, β_n 为第 n 个危险因素的回归系数, 计算公式为 $\beta = \ln(OR)$ 。

1.3 模型的验证

回顾性调取 2020 年 4 月至 2022 年 3 月至某院就诊, 使用华法林抗凝治疗, 且定期检查凝血指标的患者病例。纳入标准: 长期使用华法林抗凝治疗、INR 监测 ≥ 3 次。排除标准: 因各种原因中断使用华法林者、合用其他抗凝药者。采用 NICE 指南推荐的 Rosendaal 线性内插法计算 TTR, 以 $TTR \geq 65\%$ 为达标, 使用构建的 TTR 预测模型计算每位患者的 $\text{Logit}(P)$, 绘制 ROC 曲线。

1.4 统计学方法

使用 Stata 16 软件对纳入的文献进行 Meta 分析, 本文纳入的影响因素均为二分类变量, 采用比值比 (OR) 及 95% 置信区间 (CI) 作为统计量, 采取 I^2 进行异质性检验, 如果 $P > 0.10$ 或 $I^2 \leq 50\%$, 说明各研究之间异质性较小, 采用固定效应模型进行分析; 若 $P \leq 0.10$ 或 $I^2 > 50\%$, 说明各研究之间异质性较大, 采用随机效应模型进行分析。使用 SPSS 23.0 软件绘制 ROC 曲线, 曲线下面积 (AUC) 为 0.5 时认为无预测效能、AUC 为 0.5 ~ 0.7 时该模型预测效能较差、AUC 为 0.7 ~ 0.9 时预测效能中等、AUC 为 0.9 ~ 1.0 时预测效能较好。

2 结果

2.1 文献检索结果

根据检索策略, 检索数据库共获得 3390 篇文献, 去重后得到 1465 篇, 阅读标题和摘要排除无关研究后得 107 篇, 阅读全文排除无法合并效应量的研究, 最终纳入 17 篇^[5-21], 包含 66 119 名患者, 结果见表 1。

2.2 Meta 分析结果

对纳入的 17 篇研究中的 24 项影响因素进行 Meta 分析, 结果显示: 年龄 ≥ 75 岁是 TTR 达标的保护因素; 合并糖尿病、心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病、肝脏疾病、肾脏疾病是 TTR 达标的危险因素, 结果如表 2 所示。

表 1 纳入文献基本信息及 NOS 评分

Tab 1 Basic information of included literatures and NOS scorings

纳入研究	研究方法	TTR		纳入人群	结局指标 (影响因素)	文献质量评价 (NOS 评分) / 分			
		达标	不达标			选择性	可比性	暴露或结局	总分
罗潇 ^[5]	回顾性	63	274	心房颤动	1、2、4~9、15、16	3	2	3	8
程小荣 ^[6]	回顾性	131	169	心房颤动	1~3、8	3	1	2	8
吴婷婷 ^[7]	回顾性	57	69	肺栓塞者	5~6、8、12~14、17、20~22	3	2	2	7
Asarcıklı ^[8]	前瞻性	119	129	心脏疾病	2~7、10~11、15	3	2	4	9
Botton ^[9]	前瞻性	174	248	服华法林	2、11	3	2	3	8
徐风燕 ^[10]	回顾性	24	173	心房颤动	2、4~9、15~19、24	3	2	3	8
Praxedes ^[11]	前瞻性	190	122	服华法林	2、4~5、7、10~11、13、18、22	4	2	3	9
伍珊珊 ^[12]	回顾性	30	251	心房颤动	2、4~9、15~19、24	3	2	3	8
李瑞娟 ^[13]	回顾性	61	139	服华法林	2、11	3	1	2	6
Cosansu ^[14]	回顾性	132	139	心房颤动	2、4~5、8、10、12	3	1	3	7
McAlister ^[15]	回顾性	16 639	41 030	服华法林	1、2、4~5、7~9、13	4	2	4	10
Perreault ^[16]	前瞻性	599	243	服华法林	2~6、9~10、12、14、16~18、20~23	4	2	3	9
Esteve-Pastor ^[17]	前瞻性	602	868	心房颤动	2~5、7~10、12~17、19、23	4	2	3	8
Dallalzadeh ^[18]	回顾性	1156	1685	服华法林	1~2、4~9、14、17、23~24	3	2	3	8
Farsad ^[19]	前瞻性	152	262	心房颤动	1~7	4	1	3	8
陈文文 ^[20]	回顾性	38	34	心房颤动	2~7、15~16、18、20~21、24	3	2	3	8
Gómez ^[21]	回顾性	44	73	心房颤动	2、11	3	0	3	6

注 (Note): 1. 年龄 ≥ 75 岁 (age ≥ 75); 2. 性别 (sex); 3. 文化程度 (education); 4. 高血压 (hypertension); 5. 糖尿病 (diabetes mellitus); 6. 冠心病 (coronary heart disease); 7. 心力衰竭 (heart failure); 8. 脑卒中 (stroke); 9. 外周血管病 (peripheral vascular disease); 10. 血脂异常 (dyslipidemia); 11. 心房颤动 (atrial fibrillation); 12. 慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease); 13. 肝脏疾病 (liver disease); 14. 肾脏疾病 (kidney disease); 15. 吸烟 (smoke); 16. 饮酒 (drink); 17. β 受体阻滞剂 (β -blocker); 18. 胺碘酮 (amiodarone); 19. 地高辛 (digoxin); 20. 阿司匹林 (aspirin); 21. 氯吡格雷 (clopidogrel); 22. 他汀类 (statin); 23. 钙通道阻滞剂 (calcium channel blocker); 24. $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc} \geq 2$ 。

表 2 华法林抗凝质量影响因素的 Meta 分析表

Tab 2 Meta analysis of factors affecting the anticoagulation quality of warfarin

项目	研究数目 (人数)	异质性检验		效应模型	Meta 分析结果		
		<i>P</i>	<i>I</i> ² /%		<i>OR</i>	95% 置信区间	<i>P</i>
年龄 ≥ 75 岁	5 (61 617)	0.365	7.2	固定效应	1.015	1.060 ~ 1.152	< 0.001
性别 (男性)	16 (65 988)	0.248	18.0	固定效应	1.033	0.999 ~ 1.069	0.056
文化程度 (高中及以上)	6 (3329)	0.010	66.8	随机效应	1.335	0.974 ~ 1.831	0.073
合并高血压	12 (64 979)	0.451	0	固定效应	0.973	0.932 ~ 1.016	0.212
合并糖尿病	13 (65 105)	0.620	0	固定效应	0.864	0.832 ~ 0.898	< 0.001
合并冠心病	9 (5383)	0.016	57.3	随机效应	0.797	0.606 ~ 1.047	0.104
合并心力衰竭	10 (63 911)	0.008	59.6	固定效应	0.835	0.703 ~ 0.993	0.041
合并脑卒中	9 (63 462)	< 0.001	71.9	随机效应	0.967	0.736 ~ 1.271	0.811
合并外周血管疾病	7 (63 611)	0.009	65.0	随机效应	0.920	0.683 ~ 1.240	0.585
合并血脂异常	5 (3143)	0.008	71.0	随机效应	0.938	0.684 ~ 1.289	0.698
合并房颤	5 (1299)	< 0.001	83.8	随机效应	0.724	0.395 ~ 1.329	0.297
合并慢性阻塞性肺疾病	4 (2790)	0.096	52.7	随机效应	0.811	0.671 ~ 0.979	0.030
合并肝脏疾病	4 (59577)	0.603	0	固定效应	0.600	0.461 ~ 0.781	< 0.001
合并肾脏疾病	4 (5279)	0.022	68.9	随机效应	0.629	0.460 ~ 0.860	0.004
吸烟	6 (2574)	0.110	44.3	固定效应	0.825	0.614 ~ 1.108	0.201
饮酒	6 (3168)	0.177	34.6	固定效应	0.825	0.648 ~ 1.051	0.120
合用 β 受体阻滞剂	6 (5535)	0.658	0	固定效应	1.069	0.951 ~ 1.202	0.266
合用胺碘酮	5 (1481)	0.187	35.2	固定效应	0.847	0.549 ~ 1.308	0.455
合用地高辛	3 (1918)	0.544	0	固定效应	1.015	0.786 ~ 1.310	0.908
合用阿司匹林	3 (847)	0.096	57.4	随机效应	0.946	0.499 ~ 1.793	0.864
合用氯吡格雷	3 (847)	0.200	37.9	固定效应	0.860	0.557 ~ 1.326	0.494
合用他汀类	3 (1088)	0.568	0	固定效应	0.983	0.756 ~ 1.277	0.897
合用钙通道阻滞剂	3 (4961)	0.006	80.2	随机效应	1.049	0.922 ~ 1.194	0.467
$\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc} \geq 2$	4 (3360)	0.379	2.6	固定效应	0.984	0.827 ~ 1.171	0.855

2.3 预测模型

本研究共纳入 17 篇文献, 包含 66 119 名患者, 其中 20 211 名患者 TTR 达标, 占总人数的 30.6%, 则 $\alpha = \ln[(0.306/(1 - 0.306))] = -0.819$, TTR 初始预测模型为: $\text{Logit}(P) = -0.819 + 0.015X_{\text{年龄}} - 0.146X_{\text{糖尿病}} - 0.180X_{\text{心衰}} - 0.209X_{\text{慢阻肺}} - 0.511X_{\text{肝脏疾病}} - 0.464X_{\text{肾脏疾病}}$ 。

2.4 预测模型验证

本研究共调取 104 例符合纳入标准的患者病例, 男性 45 人, 女性 59 人, 年龄 (70.2 ± 12.8) 岁, 其中 41 人 TTR 达标, 占比 39.4%, 患者基础资料如表 3 所示。验证结果显示: 该模型 ROC 的 AUC 为 0.807, 95% 置信区间为 $(0.715, 0.900)$, P 值 < 0.01 , 提示该模型对华法林抗凝质量有中等效能的预测价值。最佳临界值为 $\text{Logit}(P) = -1.238$ 、敏感性为 0.829、特异性为 0.714, 提示当 $\text{Logit}(P) \geq -1.238$ 时, 患者可能获得较高抗凝质量。结果如图 1 所示。

表 3 模型验证患者资料
Tab 3 Patient data for model validation

影响因素	TTR		χ^2	P
	达标 ($n = 41$)	不达标 ($n = 63$)		
年龄 ≥ 75 岁	12	26	1.543	0.214
性别 (男)	20	25	0.838	0.360
合并糖尿病	22	25	1.959	0.126
合并心力衰竭	13	40	10.040	0.002
合并慢性阻塞性肺疾病	3	22	10.364	0.001
合并肾脏疾病	3	13	3.384	0.066
合并肝脏疾病	7	37	17.658	< 0.001

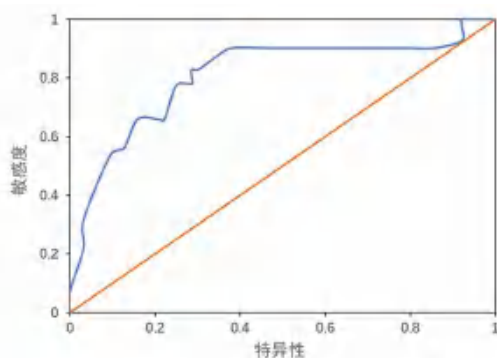


图 1 模型验证的 ROC 曲线图

Fig 1 ROC curve of model validation

3 讨论

3.1 年龄与性别对 TTR 达标的影响

本文 Meta 分析结果显示年龄 ≥ 75 岁是华法林抗凝治疗时 TTR 达标的保护因素, 也有研究显示, 平均 TTR 随着年龄的增长而增加, 可以与本文

Meta 分析结果相互印证^[22], 这可能与不同国家对不同年龄的患者 INR 控制水平不一致有关, 例如日本的一项前瞻性研究显示, 年龄 ≥ 70 岁的患者 TTR 为 $(77 \pm 17)\%$, 而年龄 < 70 岁的患者 TTR 仅为 $(46 \pm 23)\%$, 而造成这种现象的原因是日本指南推荐年龄 < 70 岁的患者 INR 控制在 $2.0 \sim 3.0$, 年龄 ≥ 70 岁的患者 INR 控制在 $1.6 \sim 2.6$ ^[23]。

性别也可能影响华法林抗凝质量, Costa 等^[24]的一项 Meta 显示, 与男性相比, 女性患者抗凝质量较低 [$OR = 0.87$, $95\%CI = (0.78, 0.96)$; $z = -2.75$, $P = 0.006$, $I^2 = 67\%$], 但原因尚不明确, 本文 Meta 分析结果与之存在矛盾, 因此在构建预测模型时未考虑性别对华法林抗凝质量的影响。假设以 Costa 等^[24]的研究结果为依据, 将性别对华法林抗凝质量的影响纳入预测模型, 则 TTR 预测模型为: $\text{Logit}(P) = -0.819 + 0.015X_{\text{年龄}} - 0.139X_{\text{女性}} - 0.146X_{\text{糖尿病}} - 0.180X_{\text{心衰}} - 0.209X_{\text{慢阻肺}} - 0.511X_{\text{肝脏疾病}} - 0.464X_{\text{肾脏疾病}}$, ROC 的 AUC 为 0.801, 95% 置信区间为 $(0.710, 0.893)$, 与本文初始构建的预测模型无显著差异。

3.2 合并症对 TTR 达标的影响

多项队列研究表明, 患者的合并疾病, 如糖尿病、脑卒中、冠心病、房颤、心力衰竭、肝肾疾病等均可影响华法林抗凝质量^[11, 15, 17-18], 这可能与患者的出血风险相关, 合并以上疾病的患者华法林抗凝的出血风险显著增加, 医师在开具华法林时可能考虑患者属于高出血风险人群, 而降低剂量, 导致 INR 不达标。本文 Meta 分析结果提示, 合并高血压、冠心病、脑卒中等不是 TTR 达标的危险因素, 这可能与各研究的纳入人群不一致有关。

在本研究的基础上, 笔者还按纳入人群的疾病进行了亚组分析, 结果显示, 在房颤患者中, 合并高血压 ($OR = 0.993$, $95\%CI = 0.833, 1.184$; $z = 0.08$, $P = 0.938$, $I^2 = 26.6\%$)、冠心病 ($OR = 0.995$, $95\%CI = 0.738, 1.342$; $z = 0.03$, $P = 0.973$, $I^2 = 16.1\%$)、脑卒中 ($OR = 0.995$, $95\%CI = 0.738, 1.342$; $z = 0.03$, $P = 0.936$, $I^2 = 16.1\%$) 不是 TTR 达标的危险因素; 在使用华法林的患者中, 仅合并脑卒中 ($OR = 0.952$, $95\%CI = 0.914, 0.991$; $z = 2.41$, $P = 0.016$, $I^2 = 0\%$) 是 TTR 达标的危险因素, 而合并高血压 ($OR = 0.971$, $95\%CI = 0.928, 1.015$; $z = 1.32$, $P = 0.187$, $I^2 = 0\%$)、冠心病 ($OR = 0.883$, $95\%CI = 0.762, 1.023$; $z = 2.01$, $P = 0.097$, $I^2 = 50.3\%$) 仍不是 TTR 达标的危险因素。

3.3 药物、吸烟及饮酒史对 TTR 达标的影响

华法林的疗效易受多种药物及食物相互作用的影响,抑制或诱导肝药酶活性是影响华法林抗凝效果的主要机制之一,例如胺碘酮的代谢产物去乙胺碘酮可强烈抑制 CYP2C19 的活性,显著增强华法林抗凝效果,同时食物及饮品也会影响华法林体内代谢^[25-27]。本文结果显示合用地高辛、胺碘酮、 β 受体阻滞剂等不是华法林抗凝质量的独立影响因素,这可能是因为本文构建模型时纳入的部分研究为回顾性研究,而临床在初始治疗时可能已考虑了药物相互作用的影响。此外,虽然 Meta 分析显示吸烟与饮酒并不是华法林抗凝质量的危险因素,但研究表明,吸烟通过诱导 CYP1A2 增加了华法林的清除率,缩短了半衰期,并降低了华法林的分布容积,而饮酒也可通过影响肝药酶而影响华法林代谢,因此仍需教育患者戒烟戒酒^[28-29]。

3.4 未纳入模型的其他因素对 TTR 达标的影响

患者依从性是影响华法林抗凝质量的重要因素,一项研究显示,268 例使用华法林的患者中,1 年后仅有 54.10% 的患者坚持服药,在坚持服药的患者中,仅 60.69% 能坚持规范监测凝血功能,但目前不同研究评价患者华法林抗凝依从性的方式仍不相同,尚需建立统一的评价标准^[30-31]。同时,药师可通过用药教育、药学监护、院外随访等措施提高患者对华法林抗凝的认知度,督促患者定期监测 INR 并根据监测结果个体化调整用药方案,显著提高华法林抗凝质量^[32]。此外,华法林相关的药物基因多态性也是影响华法林抗凝质量的重要因素,研究发现 CYP2C9 和 VKORC1 基因与华法林代谢显著相关,因此多名学者依据患者基因多态性,构建了华法林给药剂量的预测模型,用以提高华法林抗凝的安全性及有效性^[33]。虽然基因检测在国内多数地区尚未普及,但基因检测指导个体化药物治疗应是未来研究与推广的重点。

综上所述,本文以 Meta 分析合并效应值,扩大了样本量,相较于单个研究构建模型更为可靠。此外,本文使用 Logistic 回归模型预测华法林抗凝质量,纳入了 6 项临床医师容易获取的影响因素,临床可操作性强,且验证结果提示该模型对华法林抗凝质量有中等效能的预测价值。但本研究仍存在不足之处,部分影响因素仅有 4 篇文献报道,且模型验证数据来自于单中心,样本量尚不充分,仍需大量多中心数据进行验证。

参考文献

- [1] 中华医学会心电生理和起搏分会,中国医师协会心律学专业委员会,中国房颤中心联盟心房颤动防治专家工作委员会.心房颤动:目前的认识和治疗建议(2021)[J].中华心律失常学杂志,2022,26(1):15-88.
- [2] Tadesse TA, Tegegne GT, Yadeta D, et al. Anticoagulation control, outcomes, and associated factors in long-term-care patients receiving warfarin in Africa: a systematic review [J]. Thromb J, 2022, 20(1): 58.
- [3] 李金,吴利东,唐燕华.华法林给药预测模型建模研究现状及应用前景[J].中国老年学杂志,2021,41(4):892-895.
- [4] 田旭,陈慧,宋国敏,等.基于 meta 分析的肿瘤患者经外周置入中心静脉导管相关性静脉血栓形成风险预测模型构建[J].临床与病理杂志,2017,37(4):772-778.
- [5] 罗潇,陈玲.持续性心房颤动患者使用华法林抗凝治疗稳定性影响因素的临床研究[J].临床心血管病杂志,2022,38(1):44-48.
- [6] 程小荣,廖础欣,刘锐锋,等.华法林抗凝治疗中影响 INR 达标的因素分析[J].深圳中西医结合杂志,2021,31(14):17-19.
- [7] 吴婷婷,杨林,宋晓波,等.126 例肺栓塞患者华法林达标时间及出血事件分析[J].药物流行病学杂志,2021,30(11):723-728.
- [8] Asarcıklı LD, Kafes H, Şen T, et al. Time in therapeutic range values of patients using warfarin and factors that influence time in therapeutic range [J]. Turk Kardiyol Dern Ars, 2021, 49(6):463-473.
- [9] Botton MR, Viola PP, Meireles MR, et al. Identification of environmental and genetic factors that influence warfarin time in therapeutic range [J]. Genet Mol Biol, 2020, 43(1 suppl 2): e20190025.
- [10] 徐凤燕,孙龙飞.非瓣膜性心房颤动患者华法林抗凝质量的临床研究[J].心血管病学进展,2020,41(8):868-872.
- [11] Praxedes MFS, Martins MAP, Mourão AOM, et al. Non-genetic factors and polymorphisms in genes CYP2C9 and VKORC1: predictive algorithms for TTR in Brazilian patients on warfarin [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2019, 76(2):199-209.
- [12] 伍珊珊,黄远平,王耀利,等.房颤患者服用华法林抗凝质量的影响因素[J].护理学杂志,2019,34(11):9-12.
- [13] 李瑞娟,王珂,陈维红.某院 200 例华法林用药病人抗凝治疗现状的调查分析[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(5):797-800.
- [14] Cosansu K, Vatan MB, Gunduz H, et al. Use of neutrophil-lymphocyte ratio for risk stratification and relationship with time in therapeutic range in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a pilot study [J]. Clin Cardiol, 2018, 41(3):339-342.
- [15] McAlister FA, Wiebe N, Hemmelgarn BR. Time in therapeutic range and stability over time for warfarin users in

- clinical practice: a retrospective cohort study using linked routinely collected health data in Alberta, Canada [J]. *BMJ Open*, 2018, 8 (1): e016980.
- [16] Perreault S, Shahabi P, Côté R, et al. Rationale, design, and preliminary results of the Quebec Warfarin Cohort Study [J]. *Clin Cardiol*, 2018, 41 (5): 576-585.
- [17] Esteve-Pastor MA, Rivera-Caravaca JM, Roldán-Rabadán I, et al. Quality of oral anticoagulation with vitamin K antagonists in 'real-world' patients with atrial fibrillation: a report from the prospective multicentre FANTASIA registry [J]. *Europace*, 2018, 20 (9): 1435-1441.
- [18] Dallalzadeh LO, Go AS, Chang Y, et al. Stability of high-quality warfarin anticoagulation in a community-based atrial fibrillation cohort: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5 (7): e003482.
- [19] Farsad BF, Abbasnazar M, Dabagh A, et al. Evaluation of time in therapeutic range (TTR) in patients with non-valvular atrial fibrillation receiving treatment with warfarin in Tehran, Iran: a cross-sectional study [J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10 (9): FC04-FC06.
- [20] 陈文文, 党和勤, 耿涛, 等. 影响房颤患者华法林抗凝控制质量的因素分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36 (24): 2191-2194.
- [21] Gómez A, Peixoto S, Azcúnaga M, et al. Calidad de la anticoagulación oral con warfarina en una policlínica de cardiología: porcentaje de tiempo en rango terapéutico [J]. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 2014, 29 (3): 311-316.
- [22] Kılıç S, Çelik A, Çakmak HA, et al. The time in therapeutic range and bleeding complications of warfarin in different geographic regions of Turkey: a subgroup analysis of WARFARIN-TR study [J]. *Balkan Med J*, 2017, 34 (4): 349-355.
- [23] Okumura K, Komatsu T, Yamashita T, et al. Time in the therapeutic range during warfarin therapy in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation. A multicenter study of its status and influential factors [J]. *Circ J*, 2011, 75 (9): 2087-2094.
- [24] Costa Viana C, da Silva Praxedes MF, Freitas Nunes de Sousa WJ, et al. Sex-influence on the time in therapeutic range (TTR) during oral anticoagulation with coumarin derivatives: systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (12): 4488-4503.
- [25] 赵森, 徐保利, 邹明, 等. 华法林与药物之间相互作用的研究进展 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (10): 1741-1745.
- [26] 李楠, 华璐. 华法林与心血管疾病常用药物相互作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2019, 59 (23): 83-87.
- [27] 黄宪章, 刘振杰, 黄婉姣, 等. 部分草药和食物对华法林抗凝治疗患者 INR 的影响 [J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37 (9): 715-718.
- [28] Bachmann K, Shapiro R, Fulton R, et al. Smoking and warfarin disposition [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1979, 25 (3): 309-315.
- [29] Evans M, Lewis GM. Increase in international normalized ratio after smoking cessation in a patient receiving warfarin [J]. *Pharmacotherapy*, 2005, 25 (11): 1656-1659.
- [30] Li SY, Zhao XQ, Wang CX, et al. One-year clinical prediction in Chinese ischemic stroke patients using the CHADS₂ and CHA₂DS₂-VASc scores: the China National Stroke Registry [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18 (12): 988-993.
- [31] 顾欣, 孙安修, 胡月, 等. 华法林抗凝患者依从性与认知度、满意度相关分析 [J]. *实用药物与临床*, 2021, 24 (12): 1099-1102.
- [32] 都丽萍, 李莹, 李玲玲, 等. 药师干预对华法林抗凝治疗质量的影响 [J]. *中国药学杂志*, 2019, 54 (9): 749-752.
- [33] 陈幽攸, 任小群, 杨探, 等. 基于 CYP2C9 与 VKORC1 基因多态性的心脏瓣膜置换术后华法林个体化给药剂量预测的 3 种模型算法比较 [J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42 (4): 439-443.

(收稿日期: 2022-09-10; 修回日期: 2022-11-20)

药品不良反应

1 例由奥希替尼引起肺腺癌老年患者血小板减少致停药的病例分析

鲁文茹¹, 谢聪², 罗晓媛¹, 刘冬苗², 李杨² (1. 前海人寿广州总医院, 广州 511300; 2. 南方医科大学南方医院, 广州 510515)

关键词: 奥希替尼; 肺腺癌; 血小板减少

中图分类号: R969.3 文献标识码: B
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.06.046

文章编号: 1672-2981(2023)06-1690-03

奥希替尼是一种强效、不可逆的第三代表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI), 既可用于 *EGFR* 19 外显子缺失或 21 外显子 (*L858R*) 置换突变的局晚期或转移性非小细胞肺癌(NSCLC)的一线治疗, 还可用于既往 EGFR-TKIs 治疗期间或治疗后出现疾病进展的 *EGFR* 20 外显子 *T790M* 突变阳性的局晚期或转移性 NSCLC^[1-2]。随着奥希替尼应用时间的延长及研究的深入, 相关不良反应逐渐引起人们的关注和重视。尽管目前严重不良反应的报道较少, 但在用药过程中仍需提高警惕, 定期监护。本文报道了 1 例左下肺腺癌老年患者因服用奥希替尼引起血小板反复降低致停药的案例, 为奥希替尼在临床的安全使用提供一定的参考。

1 临床资料

患者, 女, 69 岁, 2020 年 6 月因“头晕、头痛”行 CT 检查, 提示左肺下叶占位伴纵隔多发淋巴结肿大、肝硬化并脾大; 入院查体: 身高 150 cm, 体重 70 kg, 体温 36.6 °C, 脉搏 60 次·min⁻¹, 呼吸 20 次·min⁻¹, 血压 137/79 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 行 PET-CT 示: ①左肺下叶背段及后基底见团块状高代谢病灶, 考虑为左肺中央型肺癌, 该病灶与降主动脉关系密切, 左肺下叶支气管及分支受压变窄, 病灶远端阻塞性肺不张; ②左肺门、纵隔内及左侧下颈部多发淋巴结增大, 代谢增高, 考虑为多发淋巴结转移灶; ③双侧大脑实质内多发结节状、块状高代谢病灶, 考虑为多发脑转移瘤, 部分病灶内见坏死, 病灶周围水肿; ④肝右前叶上段、肝右后叶下段及肝左外叶上段多个高代

谢病灶, 考虑为转移瘤。MRI 头颅增强扫描 (3T) 提示颅内多发占位性病变, 遂行 B 超引导下左锁骨上窝淋巴结穿刺活检术, 病理符合肺腺癌转移。诊断为: 左下肺腺癌 IV 期, 多发淋巴结转移, 多发脑转移, 多发肝转移; 慢性乙型病毒性肝炎; 肝炎后肝硬化; 脾大。查血常规: 白细胞计数 (WBC) $7.64 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 血红蛋白 (HGB) 测定 $145 g \cdot L^{-1}$, 血小板计数 (PLT) $87 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$, 中性粒细胞总数 (NEU) $6.34 \times 10^9 \cdot L^{-1}$; 肝肾功能无明显异常; 肿瘤标志物: CA15-3 $32.32 U \cdot mL^{-1}$, CA-125 $259.77 U \cdot mL^{-1}$, Cyfra21-1 $49.6 ng \cdot mL^{-1}$, TPS $318.57 U \cdot mL^{-1}$, CEA $1144.50 ng \cdot mL^{-1}$; 免疫组化: PD-L1 (TPS = 30%, 22C3), *EGFR* 基因 21 外显子 *L858R* 突变。考虑患者有靶向治疗指征, 给予奥希替尼靶向治疗 (80 mg qd)。2020 年 7 月入院复查 CT、MRI 提示疗效评价部分缓解 (PR); 查血常规提示血小板低 (PLT $38 \times 10^9 \cdot L^{-1}$), 考虑患者肝硬化、脾功能亢进基础上靶向治疗致血小板进行性降低, 予暂停奥希替尼、给予重组人血小板生成素注射液 (特比澳) 15 000 U qd 升血小板治疗、行脾部分栓塞术; 术后复查血常规, 血小板恢复正常 (PLT $124 \times 10^9 \cdot L^{-1}$), 恢复奥希替尼靶向治疗 (80 mg qd)。2020 年 9 月入院查血常规提示血小板低 (PLT $39 \times 10^9 \cdot L^{-1}$), 给予重组人血小板生成素注射液 (特比澳) 15 000 U qd, 皮下注射联合艾曲泊帕片 25 mg qd po。3 日后复查血常规提示血小板进行性下降 (PLT $33 \times 10^9 \cdot L^{-1}$), 遂暂停奥希替尼靶向治疗, 继续给予升血小板治疗后再恢复奥希替尼靶向治疗 (80 mg qd); 此后复查血小板仍反复

基金项目: 广东省医院协会药学科专项基金 (恒瑞) (No.2021YXQN01)。

作者简介: 鲁文茹, 女, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: happy1wr@163.com

降低, 间断停用奥希替尼并进行升血小板治疗。

2021 年 6 月患者再次入院, 血常规: WBC $3.06 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, HGB $114 g \cdot L^{-1}$, PLT $36 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, NEU $1.89 \times 10^9 \cdot L^{-1}$; 肝肾功能无明显异常; 彩超检查: ① 双侧锁骨上窝小淋巴结; ② 腹膜后淋巴结肿大; ③ 肝实质呈结节状; ④ 脾大; ⑤ 胆囊壁毛糙; ⑥ 胰腺回声增强; ⑦ 绝经期盆腔图像、子宫肌瘤、宫颈囊肿; ⑧ 双肾未见明显异常。MRI 头颅增强扫描 (3T): ① 颅内多发占位性病变, 考虑为脑转移瘤, 大部分较前略缩小; ② 轻度脑萎缩。肿瘤标志物: CA15-3 $14.77 U \cdot mL^{-1}$, CA-125 $9.81 U \cdot mL^{-1}$, Cyfra21-1 $1.6 ng \cdot mL^{-1}$, CEA $287.8 ng \cdot mL^{-1}$; 患者目前检查提示疗效评价维持 PR。考虑血小板反复下降与奥希替尼有关, 结合患者病史, 更换奥希替尼为阿美替尼靶向治疗 ($110 mg qd$), 治疗过程见表 1。随访期间, 血小板下降程度较前减轻, 逐渐恢复正常 (见图 1)。

表 1 患者治疗过程及不良反应

日期	抗肿瘤治疗方案	不良反应
2020.06—2021.06	奥希替尼 80 mg qd	血小板降低
2021.06—2021.11	阿美替尼 110 mg qd	无明显不适

表 2 奥希替尼致血小板下降的 Naranjo 评估结果

评价标准	是	否	未知	评估内容
该反应之前是否已有结论性报告	+ 1			说明书有提及
该不良反应是否在使用所疑药物后出现	+ 2			用药后出现
所疑药物停用或使用拮抗剂后, 不良反应是否改善	+ 1			停药并对症治疗后有改善
再次用药, 不良反应是否再次出现	+ 2			
其他原因是否也可引起该不良反应	- 1			肿瘤并发症可致血小板下降
给予安慰剂, 不良反应是否再次出现			0	未给予安慰剂
血药浓度是否为已知的中毒浓度			0	给药剂量为说明书推荐剂量, 未开展血药浓度监测
不良反应轻重程度是否与计量增减有关			0	未调整剂量
患者之前使用该药或相似药是否发生类似不良反应			0	未使用过相似药物
该不良反应是否经过客观检查证实	+ 1			血常规检测结果
总分			6	

血小板降低是最常见的化疗相关性血液学毒性之一, 可增加出血风险, 甚至导致死亡。有关升血小板的治疗, 中国肿瘤化疗相关性血小板减少症专家诊疗共识 (2019 版) 推荐治疗包括输注血小板和给予促血小板生长因子。血小板输注是对严重血小板减少症最快最有效的治疗方法之一, 然而也会带来潜在的获得性传染病疾病的风险, 以及可能出现与血小板输注相关的并发症。目前, 临床常用的促血小板生长因子有重组人白细胞介素 -11、重组人血小板生成素 (rhTPO)、TPO 受体激动剂阿伐曲泊帕和艾曲泊

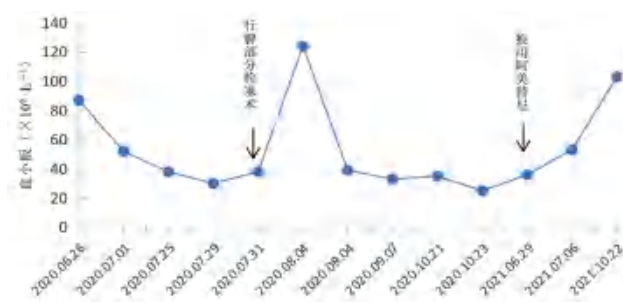


图 1 患者靶向治疗期间血小板变化曲线

2 讨论与分析

2.1 血小板降低的关联性分析

正常血小板范围在 $(150 \sim 400) \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 当血小板小于 $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 即为血小板减少。奥希替尼片说明书中提到其导致血小板下降至 3 级或 3 级以上的不良事件发生频率为 1.6%。本例患者于 2020 年 6 月开始服用奥希替尼 80 mg 每日 1 次, 期间多次发生 3 级或以上血小板减少症, 患者的用药过程与血小板下降有一定的时间关系, 停药并对症治疗复查血小板有所回升; 采用 Naranjo 评估法^[3], 按照量表评价标准的权重对该患者 PLT 降低与奥希替尼的关联性进行判定, 得分 6 分, 关联性评价为“很可能” (见表 2)。

帕等, 重组人白细胞介素 -11 易引起水肿、过敏、心脏毒性等, 临床应用 rhTPO 较广泛。有临床研究结果显示阿伐曲泊帕与 rhTPO 均可有效提升血小板, 降低出血风险, 安全性高, 与 rhTPO 相比, 阿伐曲泊帕提升血小板效果更好, 且口服给药应用方便^[4]。1 例帕博利珠单抗引起重度难治性血小板减少症的病例报道中激素和免疫球蛋白治疗效果欠佳后, 使用艾曲泊帕治疗血小板恢复正常^[5]。本文报道的患者在使用 rhTPO 联合艾曲泊帕治疗后血小板有所回升, 治疗有效, 且无明显不良反应。

2.2 奥希替尼引起血小板降低的分析

EGFR-TKI 常见的不良反应有腹泻、皮疹、甲沟炎、口腔黏膜炎、血小板减少等^[6-7]。一项双盲、Ⅲ期临床研究的数据^[8]表明奥希替尼作为一线疗法总体耐受性良好,主要的 3 级及以上不良反应包括皮疹/痤疮、腹泻和甲沟炎,该研究中并未有血小板减少的不良事件报告^[8]。一些前期的研究认为奥希替尼引起的血小板降低会随着治疗时间的延长逐渐恢复正常,保持在正常值下限以上,一般不会引起严重的不良事件^[9-10],但随着临床用药的增加,有个别患者在用药期间出现了重度的血小板降低^[11]。

基于一项奥希替尼治疗 EGFR T790M 阳性 NSCLC 老年患者的Ⅱ期临床试验^[12],我们认为老年患者的血小板减少发生率可能较高,尤其是发生严重血小板减少。本例患者是 69 岁的老年女性,确诊肺腺癌后,给予奥希替尼靶向治疗,期间复查疗效评价 PR,但血小板反复降低至重度血小板减少症,在权衡药物的疗效与不良反应并结合患者意愿后,停止奥希替尼治疗,更换为同是第三代 EGFR-TKI 的阿美替尼。

3 小结

对 EGFR19 外显子缺失或 21 外显子 (L858R) 置换突变的 NSCLC 患者,奥希替尼在发挥良好疗效的同时,也带来了一些不良反应^[13-14]。尽管目前的研究认为奥希替尼致重度血小板减少症的发生率较低^[15],但一旦出现可能造成严重后果^[16]。

该病例启示我们,鉴于老年患者的特殊性,需要更加关注和监测药物相关的不良反应并积极处理。在用药经验较少的情况下,全面评估患者情况,权衡药物的疗效与不良反应,制订个体化给药方案。同时,希望通过本案例让更多的临床工作者认识到不良反应监测的重要性,重视特殊人群的用药。

参考文献

- [1] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 非小细胞肺癌诊疗指南 2022 [S]. 2022.
- [2] 柴芳,邢孔浪,李志强,等. 奥希替尼药物利用评价标准的建立及应用 [J]. 中南药学, 2021, 19 (10): 2170-2173.
- [3] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for

estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther, 1981, 30 (2): 239-245.

- [4] 徐慧,赵洋,马雅婷,等. 阿伐曲泊帕与重组人血小板生成素治疗肿瘤化疗所致血小板减少症的疗效及安全性 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2022, 36 (10): 1073-1076.
- [5] Song P, Zhang L. Eltrombopag treatment for severe refractory thrombocytopenia caused by pembrolizumab [J]. Eur J Cancer, 2019, 121: 4-6.
- [6] 中国抗癌协会肺癌专业委员会. EGFR-TKI 不良反应管理专家共识 [J]. 中国肺癌杂志, 2019, 2 (22): 57-81.
- [7] 张雅兰,陈文发,陈瑞家,等. 基于美国 FDA 不良事件数据库报告系统的奥希替尼不良反应事件分析 [J]. 海峡药学, 2021, 33 (6): 199-201.
- [8] Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378 (2): 113-125.
- [9] Ohe Y, Imamura F, Nogami N, et al. Osimertinib versus standard-of-care EGFR-TKI as first-line treatment for EGFR-m advanced NSCLC: FLAURA Japanese subset [J]. Jpn J Clin Oncol, 2019, 49 (1): 29-36.
- [10] Ahn MJ, Tsai CM, Shepherd FA, et al. Osimertinib in patients with T790M mutation-positive, advanced non-small cell lung cancer: long-term follow-up from a pooled analysis of 2 phase 2 studies [J]. Cancer, 2019, 125 (6): 892-901.
- [11] 高志强,马美丽,顾爱琴,等. 奥希替尼治疗 EGFR T790M 阳性晚期肺腺癌患者出现重度血小板减少 1 例 [J]. 临床与病理杂志, 2019, 39 (12): 2902-2908.
- [12] Nakao A, Hiranuma O, Uchino J, et al. Final results from a phase II trial of osimertinib for elderly patients with epidermal growth factor receptor T790M-positive non-small cell lung cancer that progressed during previous treatment [J]. J Clin Med, 2020, 9 (6): 1762.
- [13] Cho JH, Lim SH, An HJ, et al. Osimertinib for patients with non-small-cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations: a multicenter, open-label, phase II trial (KCSG-LU15-09) [J]. J Clin Oncol, 2020, 38 (5): 488-495.
- [14] 张丛惠,崔小康,彭婷婷,等. 奥希替尼治疗 EGFR 突变的晚期非小细胞肺癌疗效与安全性的 Meta 分析 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18 (2): 178-183.
- [15] Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378 (2): 113-125.
- [16] Fan MD, Mo T, Shen LL. Osimertinib-induced severe interstitial lung disease: a case report [J]. Thorac Cancer, 2019, 10 (7): 1657-1660.

(收稿日期: 2022-11-17; 修回日期: 2022-12-16)