中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 21 卷　第 10 期（总第 213 期）　2023 年 10 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

细胞代谢在重大疾病中的研究进展专题

（2547）一氧化氮调控线粒体功能在疾病中的作用…… 李昊琦，呼庆勋

（2553）NAD（H）调控线粒体功能在疾病中的作用 … 程子捷，呼庆勋

研究论文

（2560）桑叶联合二甲双胍对 2 型糖尿病小鼠的糖脂代谢、炎症及肠道微生物的影响 …… 陆东裕，赵燕琳，金鹏，等

（2570）基于理化性质和抗胃溃疡作用优化煅牡蛎的炮制工艺 …… 张凤婷，钤莉妍，包丽媛，等

（2577）阿替利珠单抗修饰二氢丹参酮Ⅰ纳米粒的制备及其抗肿瘤作用研究 …… 王雪，荆紫琪，李妍怡，等

（2585）UHPLC 结合化学计量学分析不同采收期茶枝柑青皮中黄酮类成分 …… 张戴英，何小芳，黄健晶，等

（2591）尼可地尔鼻腔给药制剂的处方前研究 …… 杨蕾，彭俊文，谷福根

（2597）基于 UPLC-Q-TOF HRMS 技术建立逍遥丸指纹图谱及化学成分鉴定 …… 王雅静，周思倩，冯敏，等

（2602）铝碳酸镁咀嚼片及铝碳酸镁颗粒动态抑酸曲线研究 …… 兰文，王皖，刘雁鸣，等

（2606）基于 TLR4、NF-κB 信号通路探讨当归拈痛汤治疗痛风性关节炎的作用机制 …… 刘毓，杨钊田，孙理军

（2616）艳山姜挥发油调控 CaMKⅡ信号改善糖尿病诱导视网膜 Müller 细胞自噬障碍 …… 陈冰，杨红，杨惠，等

（2622）基于网络药理学的余甘子有效部位调控巨噬细胞极化机制研究 …… 陈尹心，常子豪，胡倩，等

（2630）UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 结合网络药理学分析泻肺利水汤的化学成分及治疗心力衰竭的作用机制 …… 周德勇，龚韬，佟彤，等

（2638）基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的脉络宁注射液酯提废渣大孔树脂富集液的化学成分鉴定和含量测定 …… 鲁正熹，姚静远，印敏，等

（2647）左氧氟沙星联合芪归银方对铜绿假单胞菌生物膜和绿脓菌素的影响 …… 赖晓静，李颜伶，吴珺，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　朱荣华　向大雄　刘　娜
刘　韶　刘文虎　刘艺平　刘芳群
刘茂柏　刘建平　刘高峰　刘塔斯
刘雁鸣　汤海峰　孙　进　孙平华
孙国祥　孙铁民　劳海燕　苏薇薇
李　昕　李　勇　李文龙　李文莉
李顺祥　李晓宇　李健和　李湘平
杨志平　杨星钢　杨献文　肖　雪
肖贵南　何　丹　何江江　何鸽飞
余自成　谷福根　张　俐　张　峻
张毕奎　张洪文　陈　力　陈　琦
陈　碧　陈卫东　陈西敬　陈勇川
武新安　范国荣　金鹏飞　周　权
屈　建　孟宪生　赵立波　赵志刚
姜德建　娄月芬　宫　建　祝德秋
秦红岩　袁　成　袁　易　贾素洁
夏道宗　原永芳　徐　珽　徐　萍
徐必学　徐华丽　高利臣　郭　韧
郭怀忠　郭建军　唐　芳　曹　玲
常福厚　章越凡　巢志茂　彭文兴
董亚琳　董得时　蒋孟良　覃　丽
傅　强　温金华　谢　诚　谢奕丹
睢大篑　肇丽梅　翟　青　黎　敏
颜　苗　潘卫三　魏高文

（2654）莪术醇片剂的制备及大鼠在体肠吸收研究 …… 李林峻，刘国翔，刘张驰，等

（2659）桃红四物颗粒对原发性痛经模型大鼠下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴功能的影响 …… 唐林峰，聊晓玉，常昊，等

（2666）基于 Zeta 电位表征血小板因子 4/ 依诺肝素钠复合物的方法学研究 …… 赵婧雯，欧阳艺兰，钱玉兰，等

综述

（2672）金属药物在肿瘤免疫原性细胞死亡中的研究进展 …… 王欣如，郝炳荣，孙丽新，等

（2680）植物来源大环二萜类化合物的研究进展 …… 付嘉，刘楠，颜晓晖

（2690）酸枣仁中黄酮类成分的研究进展 …… 李宝剑，杨远贵，宋忠兴，等

（2698）ALK5 小分子抑制剂生物活性研究进展 …… 李倩倩，薛晓文

（2704）基于传承创新的中医药与现代科学结合路径探析——以砷剂治疗白血病为例 …… 张玲玲，丰志培，王良悦，等

药物分析与检验

（2710）超高效液相色谱串联质谱法测定除臭类化妆品中乌洛托品及 13 种喹诺酮类抗菌物质 …… 涂晓琴，钟慧，吴姣娇，等

（2715）蒙花锚肝宁片质量标准研究 …… 问静，韩达斌，汪永明，等

（2720）GC-MS/MS 法测定复方二甲双胍格列吡嗪胶囊中 *N*- 亚硝基二甲胺与 *N*- 亚硝基二乙胺 …… 岳青阳，张耀文，徐万魁

（2724）供透析用盐类药用辅料中铝含量通用石墨炉原子吸收光谱法的建立 …… 张悦，谢莹莹

（2729）HPLC-ELSD 法和 UPLC-MS/MS 法评价石斛夜光丸中人参投料掺伪情况 …… 朱韬，何颂华，李丽莉，等

（2734）覆盆子及其易混品桉叶悬钩子的鉴别 …… 邓雯姬，杨洁瑜

（2738）基于高效液相色谱指纹图谱及多模式化学计量学分析评价菝葜饮片的质量 …… 陈彦洁，蒋学青，罗鑫，等

（2743）顶空气相色谱和顶空气相色谱 - 质谱法测定 20 种中药材中磷化铝的残留量 …… 王月玲，戚鹏飞，吴福祥，等

医院药学

（2749）基于数据挖掘痰瘀互结型冠心病组方用药规律的研究 …… 郑敏，朱茜茜，胡蓉，等

（2755）非小细胞肺癌靶向治疗固定剂量持续给药模式的利与弊 …… 马进安，吴元强，马弋然，等

（2761）某院卡瑞利珠单抗应用的合理性与安全性分析 …… 孙艳艳，夏一淼，蒋俊杰，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　刘心如　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　丹　李　娟　李语玲　李新刚
肖朝江　吴成军　邱玉玲　何　艳
邹振兴　张　弘　张　凭　张妙红
张纯刚　张程亮　陈　倩　陈　璐
陈国宁　陈富超　呼庆勋　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　黄亚辉
梅升辉　龚力民　梁光平　寇龙发
蒋跃平　蒋德旗　韩立峰　韩晓芳
韩晓鹏　舒　畅　曾贵荣　蒙光义
廖德华　潘　昊　魏　博

编辑：邬志娟　彭金飞　李　科
陆窈窈

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。

（2766）治疗革兰氏阳性菌感染重症患者替考拉宁安全浓度范围的探讨
…… 郑灵招，林小青，温悦，等

（2773）某院阿帕替尼超适应证用药调查分析
…… 王旭东，黄佩文，邱季

药事管理

（2780）门诊药房自动发药机储位优化的实践与探索
…… 张慧丽，赵亮，曹凯，等

（2784）关于药品检验能力验证 Z 比分数判定方法改进的探讨
…… 寻延滨，敖红光，刘利群，等

（2787）药品集中采购政策背景下仿制药与原研药有效性和安全性对比的系统综述 …… 陈思煌，谢菡，魏璟璇，等

药学教育

（2793）《天然药物化学实验指导》中黄酮类化合物显色反应的考证
…… 秦凌月，谢文豪，彭越，等

临床药师在临床

（2797）临床药师参与 1 例腺垂体功能减退症患者的药学监护
…… 王莉平，邢瑞敏，郭金明，等

药品不良反应

（2801）四环素类药物致 DRESS 综合征的文献分析
…… 王樟根，周峰，周晓峰，等

（2809）13 例 PD-1 抑制剂致免疫性肺炎病例分析
…… 程晟，温爱萍，董怡文，等

（2813）2 例患者因药物致 QT 间期延长的用药分析 … 刘丛丛，刘越群

（2817）注射用氨甲环酸致双眼黑朦 1 例…… 张涛，刘天龙，李文斌

（2818）碘克沙醇致严重的大疱性剥脱性皮炎 1 例
…… 胡佳丽，王纯，严俊，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*272*zh*P*25.0*46*2023-10

本期责任编辑：陆窈窈，彭金飞，邬志娟，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 10 October 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

(2547) Role of nitric oxide in regulating mitochondrion function in diseases ····· *LI Hao-qi, HU Qing-xun*

(2553) Role of NAD (H) in regulating mitochondrion function in diseases ····· *CHENG Zi-jie, HU Qing-xun*

(2560) Effect of mulberry leaf combined with metformin on glucose and lipid metabolism disorder, inflammation and gut microbiota dysbiosis in type 2 diabetes mellitus mice ····· *LU Dong-yu, ZHAO Yan-lin, JIN Peng, et al*

(2570) Optimization of the concoction of calcined oyster based on its physico-chemical properties and anti-gastric ulcer effect ····· *ZHANG Feng-ting, QIN Li-yan, BAO Li-yuan, et al*

(2577) Preparation and anti-tumor effect of atezolizumab modified dihydrotanshinone Ⅰ nanoparticles ····· *WANG Xue, JING Zi-qi, LI Yan-yi, et al*

(2585) UHPLC combined with chemometrics for the analysis of flavonoids in *Citrus reticulata* Blanco at different harvesting periods ····· *ZHANG Dai-ying, HE Xiao-fang, HUANG Jian-jing, et al*

(2592) Preformulation research on nicorandil nasal preparation ····· *YANG Lei, PENG Jun-wen, GU Fu-gen*

(2597) Fingerprint and identification of chemical constituents in Xiaoyao pills based on UPLC-Q-TOF HRMS ····· *WANG Ya-jing, ZHOU Si-qian, FENG Min, et al*

(2602) Dynamic acid-neutralizing curve of hydrotalcite chewable tablets and particles ····· *LAN Wen, WANG Wan, LIU Yan-ming, et al*

(2606) Mechanism of Danggui Niantong decoction for gouty arthritis based on TLR4 and NF-κB signaling pathway ····· *LIU Yu, YANG Zhao-tian, SUN Li-jun*

(2616) Protection effect of essential oil from *Fructus Alpiniae* zerumbet on the autophagy dysfunction of retinal Müller cells induced by diabetes via CaMK Ⅱ signaling pathways ····· *CHEN Bing, YANG Hong, YANG Hui, et al*

(2622) Regulation of macrophage polarization by effective part of *Phyllanthus emblica* L. and related mechanism based on network pharmacology ····· *CHEN Yin-xin, CHANG Zi-hao, HU Qian, et al*

Postal code
42-290

Publish
Editorial Office of Central South Pharmacy

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

Price
￥ 25.00 an issue
￥ 300.00 a year

CSSN
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

Copyright 2023 by the Central South Pharmacy

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

(2630) Active components and mechanism of Xiefei Lishui decoction for heart failure based on UHPLC-Q-Exactive-MS/MS combined with network pharmacology ····· *ZHOU De-yong, GONG Tao, TONG Tong, et al*

(2638) Chemical composition and content determination in macroporous resin enrichment solution from ester extraction residue of Mailuoning injection based on UPLC-Q-TOF-MS ····· *LU Zheng-xi, YAO Jing-yuan, YIN Min, et al*

(2647) Effect of levofloxacin combined with Qiguiyin decoction on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and pyocyanin ····· *LAI Xiao-jing, LI Yan-ling, WU Jun, et al*

(2654) Prescription selection and in vivo intestinal absorption of curcumol tablets ····· *LI Lin-jun, LIU Guo-xiang, LIU Zhang-chi, et al*

(2659) Effect of Taohong Siwu granules on the function of hypothalamic-pituitary-ovarian axis in rats with primary dysmenorrhea ····· *TANG Lin-feng, LIAO Xiao-yu, CHANG Hao, et al*

(2666) Development of a Zeta potential method to characterize platelet factor 4-enoxaparin complex ····· *ZHAO Jing-wen, OU-YANG Yi-lan, QIAN Yu-lan, et al*

(2672) Research progress in metal drugs for tumor immunogenic cell death ····· *WANG Xin-ru, HAO Bing-rong, SUN Li-xin, et al*

(2680) Advances in the studies on plant macrocyclic diterpenoids ····· *FU Jia, LIU Nan, YAN Xiao-hui*

(2690) Research progress of flavonoids in Ziziphi Spinosae Semen ····· *LI Bao-jian, YANG Yuan-gui, SONG Zhong-xing, et al*

(2698) Advances in biological activities of ALK5 small molecule inhibitors ····· *LI Qian-qian, XUE Xiao-wen*

(2704) Combination of Chinese medicine and modern science via inheritance and innovation——taking arsenic for leukemia as an example ····· *ZHANG Ling-ling, FENG Zhi-pei, WANG Liang-yue, et al*

(2710) Determination of methenamine and 13 quinolone antibiotics in deodorizing cosmetics by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry ····· *TU Xiao-qin, ZHONG Hui, WU Jiao-jiao, et al*

(2715) Quality standard of Menghuamao Ganning tablets ····· *WEN Jing, HAN Da-bin, WANG Yong-ming, et al*

(2720) Determination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in compound metformin hydrochloride and glipizide capsules by GC-MS/MS ····· *YUE Qing-yang, ZHANG Yao-wen, XU Wan-kui*

(2724) Determination of aluminum content in salt pharmaceutical excipients for dialysis ····· *ZHANG Yue, XIE Ying-ying*

(2729) Evaluation of Ginseng Radix et Rhizoma in Shihu Yeguang pills by HPLC-ELSD and UPLC-MS/MS ····· *ZHU Tao, HE Song-hua, LI Li-li, et al*

(2734) Identification of *Rubus chingii* Hu and *Rubus eucalyptus* Focke ····· *DENG Wen-ji, YANG Jie-yu*

(2738) **Quality evaluation of *Smilax china* L. by combined HPLC fingerprint and chemical pattern recognition**
····· *CHEN Yan-jie, JIANG Xue-qing, LUO Xin, et al*

(2744) **Determination of aluminum phosphide residues in 20 Chinese medicinal materials by headspace gas chromatography and headspace gas chromatography-mass spectrometry**
····· *WANG Yue-ling, QI Peng-fei, WU Fu-xiang, et al*

(2749) **Prescription and medication rules of phlegm and blood stasis intermingled coronary heart disease based on data mining**
····· *ZHENG Min, ZHU Qian-qian, HU Rong, et al*

(2755) **Advantages and disadvantages of fixed and continuous dose regimen for targeted therapy of non-small cell lung cancer**
····· *MA Jin-an, WU Yuan-qiang, MA Yi-ran, et al*

(2762) **Rationality and safety application of camrelizumab in a hospital**
····· *SUN Yan-yan, XIA Yi-miao, JIANG Jun-jie, et al*

(2766) **Safe concentration range of teicoplanin for patients with severe gram-positive bacterial infection**
····· *ZHENG Ling-zhao, LING Xiao-qing, WEN Yue, et al*

(2773) **Off-label indications use of apatinib in a hospital**
····· *WANG Xu-dong, HUANG Pei-wen, QIU Ji*

(2784) **Improvement of the judgment method of Z-score for drug inspection and proficiency testing**
····· *XUN Yan-bin, AO Hong-guang, LIU Li-qun, et al*

(2787) **Clinical efficacy and safety between generic and original drugs under the centralized drug procurement policy: a systematic review**
····· *CHEN Si-huang, XIE Han, WEI Jing-xuan, et al*

(2793) **Chromogenic reaction of flavonoids in *Experiment Instruction of Natural Pharmaceutical Chemistry***
····· *QIN Ling-yue, XIE Wen-hao, PENG Yue, et al*

(2797) **Pharmaceutical care for a patient with hypopituitarism by clinical pharmacists** ····· *WANG Li-ping, XING Rui-min, GUO Jin-ming, et al*

(2801) **Literature analysis of DRESS syndrome caused by tetracyclines**
····· *WANG Zhang-gen, ZHOU Feng, GUO Xiao-feng, et al*

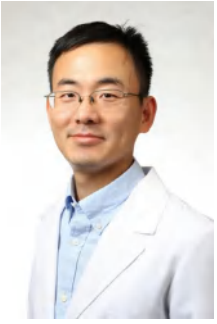
(2809) **13 cases of immune-related pneumonia induced by PD-1 inhibitor**
····· *CHENG Sheng, WEN Ai-ping, DONG Yi-wen, et al*

细胞代谢在重大疾病中的研究进展专题

【编者按】

细胞代谢是各项生命活动的基础，其代谢紊乱会影响细胞稳态，进而导致组织器官结构和功能上的改变。针对特定的代谢途径或靶点进行精准干预细胞代谢重构，能对疾病产生治疗效果。目前细胞代谢与疾病的关系已经成为生物医学以及疾病研究的重要对象。因此，阐明细胞代谢在疾病中的作用，对进一步了解相关发病机制，探索新的防治方法具有重要意义。本专栏综述细胞代谢在多种重大疾病中的研究进展，旨在为研究细胞代谢机制和开发靶向细胞代谢的药物提供新思路。

【专题主持人简介】



呼庆勋，上海大学副教授，硕士研究生导师。研究领域专注于线粒体代谢监测与功能调控，一方面致力于发展新型遗传编码的荧光探针，用于在时间和空间尺度上解析生理及病理情况下心脑血管系统的复杂功能；另一方面，借助先进的工具建立高通量筛选全新受体及先导化合物分析系统，为心脑血管疾病的诊治提供新理论和新方法。近年研究成果在 *Cell Metabolism*，*Circulation Research*，*Developmental Cell*，*Cell Reports Methods*，*Redox Biology* 和 *Antioxidants and Redox Signaling* 等期刊发表学术论文。已授权国际 PCT 专利 2 项和中国发明专利 4 项。入选上海市海外高层次人才计划，主持国家自然科学基金 1 项。荣获上海药学科技二等奖和美国心脏协会 New Investigator Travel Award。担任上海市生物工程学会一碳生物技术专业委员会委员，*Fronters in Cardiovascular Medicine* 客座编辑。

一氧化氮调控线粒体功能在疾病中的作用

李昊琦，呼庆勋*（上海大学医学院，上海　200444）

摘要：一氧化氮是机体内重要的气体信号分子，广泛分布于体内各组织中，参与多种生理病理过程的调节。线粒体作为细胞代谢和细胞内信号传导的中心枢纽，其功能障碍会导致多种疾病的发生，包括心血管疾病、神经系统变性疾病、肿瘤、炎症等。近年来，越来越多的研究表明一氧化氮可作为线粒体的调控因子，影响线粒体功能和细胞活性，进而介导疾病的发生与发展。本文就一氧化氮通过调控线粒体功能参与疾病的发病机制展开综述，旨在为疾病的预防和治疗提供新的思路。

关键词：一氧化氮；线粒体；调控机制
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2547-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.001

Role of nitric oxide in regulating the mitochondrion function in diseases

LI Hao-qi, HU Qing-xun* (*School of Medicine*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444)

Abstract: Nitric oxide has been highlighted as an important gas signaling molecule in the body, widely distributed in various tissues and involved in the regulation of various physiological and pathological processes. Mitochondrion, as the central hub of cellular metabolism and intracellular

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 82100405）。
作者简介：李昊琦，女，硕士研究生，主要从事线粒体代谢监测与功能调控研究，email：lihaoqioo33@163.com　*通信作者：呼庆勋，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事线粒体代谢监测与功能调控研究，email：qingxh@shu.edu.cn

signal transduction, their dysfunction may cause various diseases, including cardiovascular diseases, neurological diseases, tumors, inflammation, etc. In recent years, more and more studies have shown that nitric oxide may act as a regulatory factor in mitochondria, affect the mitochondrial function and cell activity, and then mediate the development of diseases. This article reviewed the involvement of nitric oxide in the pathogenesis of diseases by regulating the mitochondrial function, aiming to provide new ideas for disease prevention and treatment.

Key words: nitric oxide; mitochondrion; regulation mechanism

一氧化氮（NO）作为生物体内具有生物活性的信号分子，介导多种生物学作用，在生物系统中发挥着重要的生理功能。随着对 NO 的深入探索，多项研究表明 NO 作为一种能在细胞间传递信号的分子，普遍存在于多种细胞、组织和器官中，参与心血管稳态 [1]、免疫反应 [2]、神经传递 [3] 以及与细胞凋亡和增殖 [4] 相关的多种生理病理途径。

线粒体是参与调节各种重要细胞过程的细胞器，除了作为细胞的能量工厂以产生大量三磷酸腺苷（ATP）外，也在细胞信号传导、细胞分化、细胞凋亡等过程中发挥着重要作用。线粒体通过调控细胞代谢和表观遗传修饰等机制对机体稳态产生影响，其功能异常将参与多种疾病的发生发展。近年来的研究表明 NO 及其衍生物对线粒体功能的调控起到重要影响作用，进而影响细胞生理状态和疾病的发生发展 [5-6]。本文就 NO 对线粒体功能的调控机制及其通过调控线粒体功能参与疾病发病的机制进行综述。

1　NO 的生物学作用

NO 作为一种新型的气体信号分子，在氮原子上有不成对的电子对，对多种生物分子都具有很高的反应性。作为具有脂溶性的介质，NO 可以快速透过生物膜扩散发挥生理作用，但在体内具有不稳定性，能迅速被血红蛋白、氧自由基等灭活。

内源性 NO 的产生主要是指在一氧化氮合酶（NOS）催化下，以 L- 精氨酸和分子氧为底物，在辅助因子四氢生物蝶呤（BH4）、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）、黄素单核苷酸（FMN）参与下产生。NOS 主要包括三种亚型：神经元型一氧化氮合酶（nNOS）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）和内皮型一氧化氮合酶（eNOS）。在三种亚型中，eNOS 主要表达于内皮细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞中，对于维持心血管系统的稳态是最重要的 [7]。nNOS 在大脑的特定神经元中组成性表达，主要调节神经信号转导，在骨骼肌和心肌组织中也有表达。eNOS 和 nNOS 的活性都受 Ca^{2+} 和钙调素（CaM）以及自身翻译后修饰的调节。iNOS 最早被发现存在于巨噬细胞中，iNOS 非钙离子依赖的特性使其具有较高的催化活性，其催化产生的 NO 在炎症条件下的多种生化途径和能量代谢调节中起着核心作用 [8]。此外，据报道，线粒体基质和内膜中具有线粒体一氧化氮合酶（mtNOS），以调节线粒体的耗氧量和生物发生。mtNOS 被认为是 nNOS 的 α 亚型，但有关其性质尚未有确切定论 [9]。除了 NOS 的催化作用，NO 的合成也可以被其氧化代谢物亚硝酸盐还原，亚硝酸盐可以通过与质子反应或酶促反应转化为 NO。

NO 通过激活环磷酸鸟苷（cGMP）信号通路和参与细胞功能的各种蛋白质（包括参与线粒体生物学的蛋白质）的 *S*- 亚硝基化来介导大部分功能 [10]。NO 可激活可溶性鸟苷酸环化酶（sGC），使细胞内 cGMP 增加，启动一系列蛋白磷酸化反应，从而发挥重要的生理功能。NO-cGMP 信号通路广泛存在于人类和动物的多种组织细胞中，它代表一种新的细胞间信息传递和细胞功能调节的信号传导系统。NO 也会通过 cGMP 非依赖性途径介导生物学效应，其作用于半胱氨酸残基，通过 *S*- 亚硝基化酶在靶蛋白上产生 *S*- 亚硝基硫醇（SNO），称为 *S*- 亚硝基化的翻译后修饰。

2　NO 对线粒体功能的调控机制

2.1　NO 介导靶蛋白的 *S*- 亚硝基化修饰

S- 亚硝基化是指部分亚硝基与蛋白质的巯基残基（S）共价连接形成 *S*- 亚硝基，其动态过程主要由细胞内 *S*- 亚硝基谷胱甘肽（GSNO）的水平调节。*S*- 亚硝基化是一种基于氧化还原的蛋白质翻译后修饰，可调节多种生理和病理过程，若发生异常可能导致蛋白质错误折叠，发生细胞凋亡和代谢紊乱 [11]。研究表明 NO 通过介导靶蛋白的 *S*- 亚硝基化修饰可以调控线粒体功能（见图 1）。

NO 水平的升高会导致三羧酸循环（TCA 循环）中的酶以及电子传递链（ETC）中蛋白质的异常 *S*- 亚硝基化，从而损害它们的酶活性。ETC 中复合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ和Ⅴ中关键亚基的直接 *S*- 亚硝

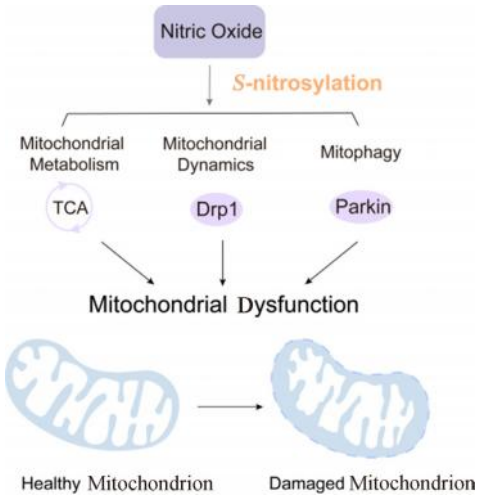


图 1　NO 介导靶蛋白的 *S*- 亚硝基化修饰调控线粒体功能

Fig 1　Nitric oxide mediates the *S*-nitrosylation modification of target proteins to regulate the mitochondrion function

基化或硝化抑制了它们的呼吸活性，从而抑制了它们产生 ATP 的能力。

GSNO 是 NO 在体内的主要生物活性形式，可被亚硝基化谷胱甘肽还原酶（GSNOR）不可逆分解。因此，GSNOR 在 NO 信号途径中可作为主要调节因子以调控反应发生。缺乏 GSNOR 会促进线粒体亚硝化应激，导致动力相关蛋白 1（Drp1）和 Parkin 过度 *S*- 亚硝基化，对线粒体动力学和线粒体自噬产生损伤作用 [12]。已有研究表明 *S*- 亚硝基化可以调节 Drp1 的磷酸化状态，从而影响 Drp1 的定位和功能。Drp1 的 *S*- 亚硝基化促进 Ser-616 磷酸化，导致线粒体裂变增加 [13]。在 GSNOR 敲除小鼠的肝脏和大脑中发现 *S*- 亚硝基化的 Parkin 累积，表明 GSNOR 缺乏会诱导 Parkin 异常 *S*- 亚硝基化从而抑制 Parkin 活性，导致线粒体自噬失调 [14]。

2.2　NO 调节线粒体呼吸链活性

NO 及其衍生物通过不同的机制抑制线粒体呼吸，低浓度的 NO 特异性和可逆地抑制细胞色素 C 氧化酶，较高浓度的 NO 可导致呼吸链不可逆抑制、解偶联、通透性转变或细胞死亡 [15]。NO 可以与细胞色素 C 氧化酶的血红素 α3-CuB 活性中心结合并抑制其活性。NO 与铜离子（CuB）结合，形成一种新的血红素 -CuB-NO 配合物，从而阻碍了 ETC 的正常运作，降低了细胞色素 C 氧化酶的活性。NO 还通过形成不可逆地抑制线粒体呼吸的高反应性分子来发挥病理生理作用。NO 与线粒体氧化磷酸化过程中产生的超氧化物阴离子反应形成过氧亚硝酸盐（$ONOO^-$），破坏基质、内膜、外膜以及膜间空间中的关键线粒体组分。在线粒体中，$ONOO^-$ 抑制复合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ在呼吸链中的作用和 ATP 合酶的活性，还影响其他蛋白质的活性，如锰超氧化物歧化酶（Mn-SOD）和细胞色素 C 等，导致线粒体功能障碍 [16]（见图 2）。

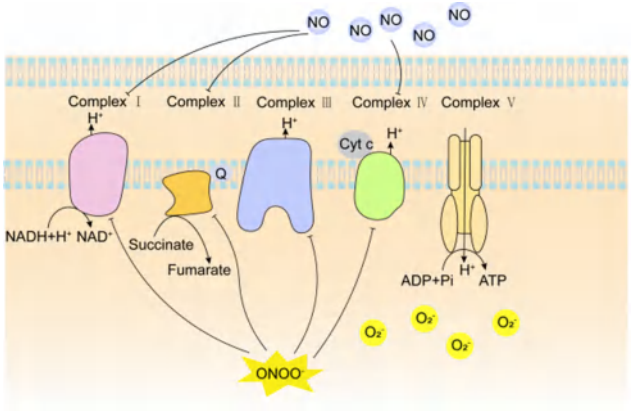


图 2　NO 介导线粒体呼吸链活性调控线粒体功能

Fig 2　NO mediated mitochondrion respiratory chain activity regulates the mitochondrion function

3　NO 调控线粒体功能在疾病中的作用

3.1　心血管疾病

心血管疾病是全球死亡的主要原因，在心血管疾病的发生和预防中，NO 起着重要的作用。NO 在心血管系统中发挥保护作用的机制主要包括调节血压和血管张力，抑制血小板聚集和白细胞黏附，防止平滑肌细胞增殖等 [17]。NO 生物利用度的紊乱会导致心血管系统保护功能的丧失，在某些情况下甚至会加速疾病进程。

线粒体是心肌细胞的能量代谢中心，在维持正常心肌收缩力和心脏活动中发挥必不可少的作用，因此线粒体已成为心血管系统保护策略的关键靶标。NO 通过使线粒体呼吸链复合体、代谢酶以及线粒体相关蛋白质发生 *S*- 亚硝基化以影响其活性与功能，参与不同心血管疾病的发病机制。早期已有研究发现 NO 使线粒体复合物Ⅰ发生 *S*- 亚硝基化，抑制再灌注期间复合物Ⅰ活性的恢复，减少活性氧（ROS）的产生，减轻心脏再灌注损伤 [18]。同样，Castillo 等 [19] 在离体大鼠心脏缺血再灌注损伤模型中抑制 GSNOR，发现可促进线粒体复合物Ⅲ和Ⅴ发生 *S*- 亚硝基化。用 GSNOR 抑制剂治疗的心脏显示心肌损伤标志物肌酸激酶的释放较低，心肌梗死区域减少，并且改善了缺血后的心室功能，表明 *S*- 亚硝基化水平提高在缺血性心脏病中能发挥一定的心肌保护作用。Siragusa 等 [20] 研究发现 eNOS 与内皮细胞中的丙酮酸激酶 2 型（PKM2）相互作用并使其 *S*- 亚硝基化，降低其酶活性，PKM2 抑制将葡萄

糖分解代谢转向磷酸戊糖途径，通过磷酸戊糖途径增加底物通量，以产生还原当量（NADPH 和 GSH）并防止氧化应激，维持内皮的氧化还原状态。Tang 等[21]研究阐明 GSNOR 在心肌细胞线粒体定位，通过调控线粒体蛋白腺嘌呤核苷酸转位酶 1（ADP/ATP translocase 1，ANT1）的 *S*- 亚硝基化修饰影响线粒体功能，使得线粒体氧化应激增加并抑制了线粒体自噬，最终导致心肌重构和心力衰竭。因此，推测线粒体 GSNOR 将会成为心力衰竭的一个新治疗靶点，也有研究已证实 GSNOR 可以通过调节线粒体动力学和线粒体自噬相关蛋白的 *S*- 亚硝基化水平以维持线粒体稳态并延迟细胞衰老[12]，这表明 GSNOR 具有间接影响细胞氧化还原状态的效力，可以对心血管稳态发挥一定的保护作用。

综上研究结果表明，NO 除了作为内源性血管舒张因子参与对心血管的保护作用外，也可以通过对心肌线粒体的调控作用来维持心血管稳态。靶向 *S*- 亚硝基化修饰正成为保护心血管系统的潜在目标，可以为开发新的治疗策略提供新的途径，然而一些抑制剂是否会对心血管功能造成不良影响仍需进一步研究。

3.2　神经系统变性疾病

在大多数神经系统变性疾病中，线粒体功能紊乱，ROS 和活性氮（RNS）的产生增加，从而导致突触丢失和神经元损伤[22]。RNS 过量产生会导致 NO 介导的蛋白质翻译后修饰，如半胱氨酸残基的 *S*- 亚硝基化和酪氨酸残基的硝化。在阿尔茨海默病（AD）中，*S*- 亚硝基化水平升高是其发病机制之一，且 *β*- 淀粉样蛋白（A*β*）能在 NO 调节下使得 Drp1 亚硝基化而导致线粒体分裂增加。Nakamura 等[23]发现 AD 中 iNOS 的表达上调使 NO 合成增加，NO 进而 *S*- 亚硝基化 Drp1。其研究表明去泛素化酶 Uch-L1 促进 *S*- 亚硝基化级联反应，其将 NO 基团转移到 Cdk5，然后再转移到 Drp1，刺激 Drp1 活性增强。由此导致线粒体过度分裂碎片化和生物能量受损，引起神经元突触缺失及细胞死亡。Wang 等[24]研究发现 GSNOR 通过减轻 Drp1 的 *S*- 亚硝基化修饰，维持线粒体稳态以及减少神经元凋亡蛋白的释放，从而发挥神经保护作用。另有研究表明，当 NO 在帕金森病（PD）中表达过高时，PINK1 的 *S*- 亚硝基化会抑制其激酶活性，损害 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬，从而导致多巴胺能神经元细胞死亡[25]。以上研究揭示了 NO 介导线粒体动力学和线粒体自噬以致神经系统变性疾病的发生，而靶向部分酶的亚硝基化活性可能是神经系统变性疾病的治疗靶点。

此外，对于部分神经系统变性疾病，高浓度的 NO 可通过抑制线粒体呼吸和激活细胞死亡途径而导致神经毒性。NO 是介导 PD 中多巴胺能神经元退变的主要影响因素之一，研究表明 NO 与多巴胺代谢物 3，4- 二羟基苯乙酸（DOPAC）的协同相互作用，可抑制细胞色素 C 氧化酶，引起线粒体损伤并通过消耗谷胱甘肽和氮氧应激的机制导致多巴胺能细胞死亡[26]。iNOS 介导的 NO 产生也有助于 *α*- 突触核蛋白的聚集，导致线粒体呼吸能力下降及多巴胺能神经元的选择性丧失[27]。

3.3　肿瘤

NO 在肿瘤中有着双重作用，低浓度 NO 可以促进肿瘤生长，高浓度 NO 则可抑制肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞死亡[6]。当 NO 存在时，与铁硫簇（Fe-S）形成铁 - 亚硝酰复合物，引发线粒体去极化，导致线粒体氧化应激，介导细胞凋亡。NO 也可抑制电子呼吸链复合物Ⅳ，减少 ATP 的产生并降低细胞存活率。这种抑制作用还可以增加 ROS/RNS 的产生，诱导氧化 / 亚硝化应激或氧化还原信号传导，引起细胞凋亡，进而可抑制肿瘤进展，降低肿瘤细胞的转移潜力。目前，高浓度 NO 在肿瘤治疗方面具有广阔的应用前景，在肿瘤微环境中可与 ROS 反应生成具有更强氧化性的活性氮类衍生物，共同影响线粒体功能、调控细胞因子，在分子和细胞水平上有效地抑制肿瘤的生长和转移[28]。

代谢重编程是恶性肿瘤的特征，即使在有氧条件下，肿瘤细胞仍然以糖酵解途径为主要能量来源，即 Warburg 效应。NO 通过与酶的相互作用或通过激活致癌途径来影响肿瘤细胞代谢。Gao 等[29]研究表明，nNOS 可促进磷酸果糖激酶 1（PFK-1）亚型 PFKM Cys351 位点的 *S*- 亚硝基化修饰，导致卵巢癌细胞糖酵解增加。Li 等[30]发现 iNOS 衍生的 NO 通过诱导 PKM2 发生核转位来促进卵巢癌细胞的糖酵解。另一方面，在肿瘤中发现编码 TCA 循环酶的基因发生突变，如富马酸水合酶（FH）、琥珀酸脱氢酶（SDH）和异柠檬酸脱氢酶（IDH），导致代谢产物琥珀酸、富马酸和 2- 羟基戊二酸的丰度增加[31]。这些代谢产物可作为驱动不同癌症的致病因子，并且代谢物积累会促进恶性肿瘤的发展。以上研究表明 NO 诱导代谢变化，导致致癌信号传导、增殖和突变发生率增

加，因此靶向肿瘤细胞代谢可以作为潜在的肿瘤治疗手段，但仍需进一步研究阐明该类药物与肿瘤相关的免疫细胞产生不良影响的可能性。

3.4　炎症

巨噬细胞存在于大部分组织中，与组织稳态、炎症和宿主防御有关，在一些细胞因子和内毒素的诱导下可以产生大量的 NO。NO 可以通过改变线粒体生物性质来介导巨噬细胞效应活性，并且在控制巨噬细胞代谢重编程方面具有重要影响。在细胞代谢方面，NO 可以通过抑制 TCA 循环中关键酶和相关代谢产物的活性调控巨噬细胞代谢 [32]。研究表明 NO 可以通过抑制乌头酸酶 2（ACO2）以调节衣康酸盐水平来调节炎症信号传导，并且通过改变呼吸链复合物Ⅰ中关键 N- 模块亚基的丰度来调节巨噬细胞呼吸功能 [33]。NO 还抑制丙酮酸脱氢酶（PDH），通过 PDH-E3 亚单位（DLD）的半胱氨酸亚硝基化，从而阻断丙酮酸进入 TCA 循环 [34]。NO 通过靶向 ACO2 和 PDH 限制了代谢产物进入 TCA 循环，进而影响了免疫细胞代谢重编程。在细胞凋亡方面，NO 可以通过线粒体膜电位直接介导或通过产生过氧化亚硝酸盐间接诱导细胞色素 C 的释放，进而活化半胱氨酸蛋白酶（Caspase）依赖的细胞凋亡途径。Simpson 等 [35] 发现过量的 NO 促进细胞凋亡和炎症。巨噬细胞内 Caspase-8 减少增加了 iNOS 的表达，从而促进了促凋亡蛋白 BAX/BAK 的信号传导，以驱动线粒体凋亡。NO 影响免疫细胞代谢和细胞凋亡新机制的进一步阐明，可以为患有炎症性疾病的患者带来新的治疗方法。

4　总结与展望

综上所述，一氧化氮合酶亚型、*S*- 亚硝基化修饰的靶蛋白、呼吸链组分、细胞因子等是机体内 NO 调控线粒体功能的重要因素。NO 调控线粒体功能在各疾病的发生发展中发挥重要作用，靶向该途径可以为治疗各类疾病提供新的治疗策略，也为相应疾病的药物研发提供新的思路。但也应注意 NO 对于疾病的调控有双重性，NO 及其衍生物与不同靶标的相互作用，具体取决于浓度、时间和空间限制。因此在临床治疗中有必要提出新的策略来提高 NO 的生物利用度，以增强其防治潜力。同时在 NO 介导线粒体代谢方面也需要进一步的研究来揭示复杂代谢途径之间的关系，并发现调节细胞生命活动的新代谢途径，将有助于我们进一步明确靶向目标，为疾病的防治提供新的策略。

参考文献

[1] Farah C，Michel LYM，Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease [J]. Nat Rev Cardiol，2018，15（5）：292-316.

[2] Jiang W，Dong W，Li M，et al. Nitric oxide induces immunogenic cell death and potentiates cancer immunotherapy [J]. ACS Nano，2022，16（3）：3881-3894.

[3] Kausar S，Wang F，Cui H. The role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its implications for neurodegenerative diseases [J]. Cells，2018，7（12）：274.

[4] Zhang XG，Jin L，Tian Z，et al. Nitric oxide inhibits autophagy and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci，2019，110（3）：1054-1063.

[5] Ghasemi M，Mayasi Y，Hannoun A，et al. Nitric oxide and mitochondrial function in neurological diseases [J]. Neuroscience，2018，376：48-71.

[6] Kamm A，Przychodzen P，Kuban-Jankowska A，et al. Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield [J]. Nitric Oxide，2019，93：102-114.

[7] Zhao YZ，Vanhoutte PM，Leung SWS. Vascular nitric oxide：beyond eNOS [J]. J Pharmacol Sci，2015，129（2）：83-94.

[8] Cinelli MA，Do HT，Miley GP，et al. Inducible nitric oxide synthase：regulation，structure，and inhibition [J]. Med Res Rev，2020，40（1）：158-189.

[9] Ally A，Powell I，Ally MM，et al. Role of neuronal nitric oxide synthase on cardiovascular functions in physiological and pathophysiological states [J]. Nitric Oxide，2020，102：52-73.

[10] Ghimire K，Altmann HM，Straub AC，et al. Nitric oxide：what’s new to NO? [J]. Am J Physiol Cell Physiol，2017，312（3）：C254-C262.

[11] Fernando V，Zheng X，Walia Y，et al. *S*-nitrosylation：an emerging paradigm of redox signaling [J]. Antioxidants（Basel），2019，8（9）：404.

[12] Rizza S，Cardaci S，Montagna C，et al. *S*-nitrosylation drives cell senescence and aging in mammals by controlling mitochondrial dynamics and mitophagy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2018，115（15）：E3388-E3397.

[13] Jin JY，Wei XX，Zhi XL，et al. Drp1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease [J]. Acta Pharmacol Sin，2021，42（5）：655-664.

[14] Liu K，Liu Z，Liu Z，et al. Manganese induces *S*-nitrosylation of PINK1 leading to nerve cell damage by repressing PINK1/Parkin-mediated mitophagy [J]. Sci Total Environ，2022，834：155358.

[15] Poderoso JJ，Helfenberger K，Poderoso C. The effect of nitric oxide on mitochondrial respiration [J]. Nitric Oxide，2019，88：61-72.

[16] Pappas G，Wilkinson ML，Gow AJ. Nitric oxide regulation of cellular metabolism：adaptive tuning of cellular energy [J]. Nitric Oxide，2023，131：8-17.

[17] Infante T，Costa D，Napoli C. Novel insights regarding

nitric oxide and cardiovascular diseases [J]. Angiology，2021，72（5）：411-425.

[18] Chouchani ET，Methner C，Nadtochiy SM，et al. Cardioprotection by *S*-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I [J]. Nat Med，2013，19（6）：753-759.

[19] Castillo OA，Herrera G，Manriquez C，et al. Pharmacological inhibition of *S*-nitrosoglutathione reductase reduces cardiac damage induced by ischemia-reperfusion [J]. Antioxidants（Basel），2021，10（4）：555.

[20] Siragusa M，Thole J，Bibli SI，et al. Nitric oxide maintains endothelial redox homeostasis through PKM2 inhibition [J]. Embo J，2019，38（17）：e100938.

[21] Tang X，Zhao S，Liu JQ，et al. Mitochondrial GSNOR alleviates cardiac dysfunction via ANT1 denitrosylation [J]. Circ Res，2023，133（3）：220-236.

[22] Tewari D，Sah AN，Bawari S，et al. Role of nitric oxide in neurodegeneration：function，regulation，and inhibition [J]. Curr Neuropharmacol，2021，19（2）：114-126.

[23] Nakamura T，Oh CK，Liao L，et al. Noncanonical transnitrosylation network contributes to synapse loss in Alzheimer’s disease [J]. Science，2021，371（6526）：eaawo843.

[24] Wang LL，Wang ZQ，You WC，et al. Enhancing *S*-nitrosoglutathione reductase decreases *S*-nitrosylation of Drp1 and reduces neuronal apoptosis in experimental subarachnoid hemorrhage both in vivo and in vitro [J]. Brain Res Bull，2022，183：184-200.

[25] Zhang ZZ，Liu L，Jiang XX，et al. The essential role of Drp1 and its regulation by *S*-nitrosylation of Parkin in dopaminergic neurodegeneration：implications for Parkinson’s disease [J]. Antioxid Redox Sign，2016，25（11）：609-622.

[26] Tapias V，Hu XP，Luk KC，et al. Synthetic alpha-synuclein fibrils cause mitochondrial impairment and selective dopamine neurodegeneration in part via iNOS-mediated nitric oxide production [J]. Cell Mol Life Sci，2017，74（15）：2851-2874.

[27] Nunes C，Laranjinha J. Nitric oxide and dopamine metabolism converge via mitochondrial dysfunction in the mechanisms of neurodegeneration in Parkinson’s disease [J]. Arch Biochem Biophys，2021，704：108877.

[28] Khan FH，Dervan E，Bhattacharyya DD，et al. The role of nitric oxide in cancer：master regulator or NOt? [J]. Int J Mol Sci，2020，21（24）：9393.

[29] Gao WW，Huang MQ，Chen X，et al. The role of *S*-nitrosylation of PFKM in regulation of glycolysis in ovarian cancer cells [J]. Cell Death Dis，2021，12（4）：408.

[30] Li LL，Zhu LQ，Hao BT，et al. iNOS-derived nitric oxide promotes glycolysis by inducing pyruvate kinase M2 nuclear translocation in ovarian cancer [J]. Oncotarget，2017，8（20）：33047-33063.

[31] Somasundaram V，Basudhar D，Bharadwaj G，et al. Molecular mechanisms of nitric oxide in cancer progression，signal transduction，and metabolism [J]. Antioxid Redox Signal，2019，30（8）：1124-1143.

[32] Palmieri EM，McGinity C，Wink DA，et al. Nitric oxide in macrophage immunometabolism：hiding in plain sight [J]. Metabolites，2020，10（11）：429.

[33] Bailey JD，Diotallevi M，Nicol T，et al. Nitric oxide modulates metabolic remodeling in inflammatory macrophages through TCA cycle regulation and itaconate accumulation [J]. Cell Rep，2019，28（1）：218-230. e7.

[34] Palmieri EM，Gonzalez-Cotto M，Baseler WA，et al. Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase [J]. Nature Commun，2020，11（1）：698.

[35] Simpson DS，Pang J，Weir A，et al. Interferon-γ primes macrophages for pathogen ligand-induced killing via a caspase-8 and mitochondrial cell death pathway [J]. Immunity，2022，55（3）：423-441. e9.

（收稿日期：2023-06-20；修回日期：2023-08-14）

NAD（H）调控线粒体功能在疾病中的作用

程子捷，呼庆勋*（上海大学医学院，上海　200444）

摘要：线粒体是细胞内最重要的细胞器之一，不仅作为能量合成器在细胞代谢中发挥着重要作用，也通过介导 SIRTs、PARPs 等多种酶的功能参与细胞信号传导。NAD（H）是活细胞中的辅酶，可作为线粒体的调控因子广泛参与调节细胞生长、分化、能量代谢、凋亡等生物学过程，从而影响疾病的发生与发展。本文综述 NAD（H）调控线粒体功能的分子机制，并简述 NAD（H）的合成、消耗与检测方法，阐述其在神经系统变性疾病、衰老、肿瘤和心血管疾病等状态下的调控机制和潜在的药物靶点特性，旨在为 NAD（H）介导的疾病预防和诊疗提供新的思路。

关键词：线粒体；能量代谢；NAD^+；NADH
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2553-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.002

Role of NAD (H) in regulating the mitochondrion function in diseases

CHENG Zi-jie, HU Qing-xun* (*School of Medicine*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444)

Abstract: Mitochondria are one of the most important organelles in the cells, playing a crucial role in energy synthesis in cell metabolism and participating in cell signaling through the action of various enzymes such as SIRTs and PARPs. NAD (H) is a coenzyme in living cells and extensively participates in regulating biological processes such as the cell growth, differentiation, energy metabolism, and apoptosis as regulatory factors of mitochondria, thereby affecting the occurrence and development of diseases. This article reviewed the molecular mechanism of NAD (H) in regulating mitochondrion function and the synthesis, consumption, and detection of NAD (H). It also explained the regulatory mechanism and potential drug target characteristics of NAD (H) in aging, tumors, and neurodegenerative diseases, aiming to provide new insight for disease prevention and diagnosis of NAD (H).

Key words: mitochondrion; energy metabolism; NAD^+; NADH

线粒体是细胞内的重要细胞器，对维持细胞结构与功能具有多重作用。作为细胞的能量供应车间，线粒体利用多种能量物质合成生命活动所需的三磷酸腺苷（ATP）；作为生物合成中心，核酸等生物大分子的合成前体在线粒体内生成；此外，线粒体内存在多种酶参与细胞信号传导和细胞凋亡等过程，并在调控细胞生长和细胞周期中发挥重要作用[1]。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD（H）是一种存在于活细胞中的辅酶，在生物体内常以氧化态 NAD^+和还原态 NADH 的形式存在；在细胞内的一系列生物过程中，两者可以相互转化。研究表明，NAD（H）不仅是线粒体中必不可少的氧化还原辅助因子，也作为关键信号分子，在发生营养摄入改变或细胞损伤等环境变化时调控细胞功能，包括影响线粒体功能、DNA 损伤修复、细胞凋亡、细胞衰老、信号转导等多个方面[2-3]。越来越多的证据表明，细胞内 NAD（H）代谢异常会影响线粒体结构与功能，从而诱发多种疾病。本文综述 NAD（H）在细胞内的合成、消耗、转化与检测过程，并阐述 NAD（H）通过调控线粒体功能影响疾病发生与发展的分子机制，旨在为疾病预防和诊疗提供新的研究思路。

1　NAD（H）的合成与转化

1.1　NAD（H）的合成

NAD（H）几乎存在于生物体内所有活细胞中，主要有三种合成路径，分别为犬尿酸途径（De Novo synthesis）、Preiss-Handler 途径和补救

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82100405）。
作者简介：程子捷，女，硕士研究生，主要从事线粒体代谢监测与功能调控研究，email：ccczjcpu@163.com　*通信作者：呼庆勋，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事线粒体代谢监测与功能调控研究，email：qingxh@shu.edu.cn

途径（Repair）（见图 1）。

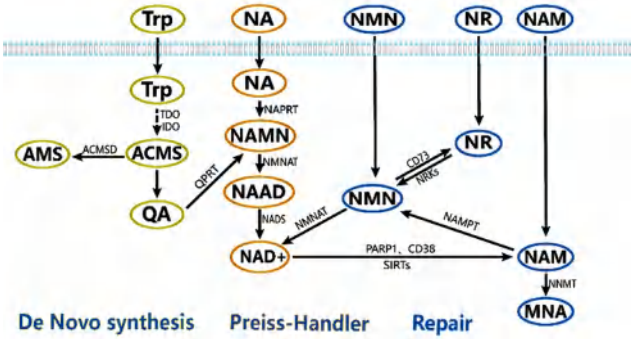


图 1　NAD（H）的生物合成途径

Fig 1　Biosynthetic pathway of NAD（H）

在犬尿酸途径中，色氨酸（Trp）经多步反应转化为烟酸单核苷酸（NAMN），NAMN 最终经一系列酶的催化生成 NAD（H）[3-5]。

在 Preiss-Handler 途径生成中，烟酸（NA）经烟酸转磷酸核糖基酶（NAPRT）催化作用生成 NAMN。NAMN 最终经一系列酶的催化生成 NAD（H）[3-5]。

在哺乳动物中，第三种 NAD（H）合成路径——通过“补救途径”从烟酰胺（NAM）、NA、烟酰胺核苷（NR）和烟酰胺单核苷酸（NMN）中回收是维持胞内 NAD（H）正常水平最重要的合成途径[3]。NAM 既是 NAD（H）消耗酶如 NAD（H）依赖的蛋白去乙酰化酶 sirtuins（SIRTs）、聚 ADP- 核糖聚合酶（PARPs）、CD38 等的副产物，也可能来源于外界食物摄取[4]。在补救途径中，首先 NAM 经烟酰胺转磷酸核糖基酶（NAMPT）和烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶（NMNAT）催化生成 NAD（H）[6]。其中 NMNAT3 主要分布在线粒体中，对线粒体呼吸产生重要影响[7-8]。

1.2　NAD（H）的消耗

在生物体中，NAD（H）合成与降解之间存在动态平衡。与氧化还原反应不同，在细胞内存在多种酶，包括 SIRTs、PARPs、NAD（H）糖水解酶与环 ADP- 核糖（cADPR）合成酶 CD38、CD157 和 SARM1（sterile alpha and TIR motif containing 1）等，能够在发挥自身生理功能的同时，将 NAD（H）分解为 NAM[9]。

目前已发现 SIRTs 家族中存在七种亚型，分别命名为 SIRT1 ～ SIRT7，其中 SIRT3 ～ SIRT5 主要分布在线粒体；作为 NAD（H）依赖的蛋白去乙酰化酶，SIRTs 与特定蛋白相结合并发生去乙酰化，并将辅助底物 NAD（H）转化为 NAM，从而调节生物体内关键信号通路[10-12]。PARP1-PARP3 能够将 NAD（H）作为单 ADPR 或聚 ADPR 靶蛋白的共底物，介导 NAD（H）分解产生副产物 NAM 和 ADPR，并在 DNA 损伤修复、转录调控、细胞凋亡等过程中发挥作用[9，13]。

CD38 和 CD157 是多功能的胞外酶，具有糖水解酶和 ADP- 核糖环化酶的活性，将 NAD（H）分解为 NAM 和 cADPR[14-15]；此外，二聚化 SARM1 能够产生相似催化作用，将 NAD（H）水解为 ADPR 和 NAM，并产生少量的 cADPR[16]。

1.3　NAD（H）的生物转化

1.3.1　NAD$^+$与 NADH 的相互转化　葡萄糖是人体内的主要能量来源，进入胞质后在多种酶的催化下经有氧糖酵解生成丙酮酸，在此过程中伴随着 NAD$^+$和 NADH 的转化及 ATP 生成[17]。此后，丙酮酸在胞质内生成乳酸，或进入线粒体后经氧化脱羧生成乙酰辅酶 A，从而参与三羧酸循环（TCA 循环）；在此过程中生成大量 ATP，同时 NAD$^+$转化为 NADH[18]。最终，NADH 经电子传递链（ETC）再次氧化为 NAD$^+$，维持细胞内 NADH 与 NAD$^+$的动态平衡；随着质子从线粒体内膜向外层转移，所形成的跨膜氢离子梯度提供势能，驱动氧化磷酸化（OXPHOS）反应合成 ATP，这一过程由五种结构复杂的酶协同催化完成[9，18]（见图 2）。

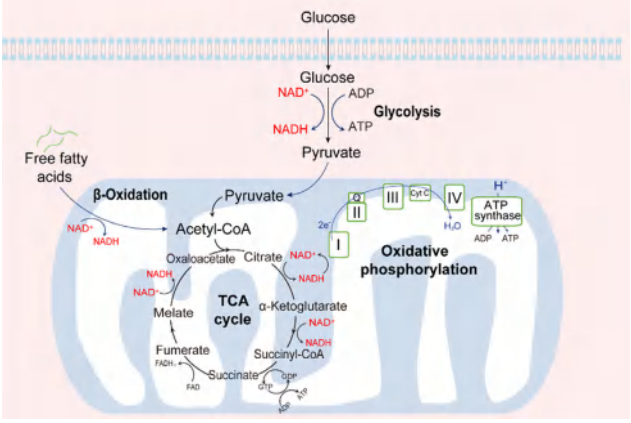


图 2　NAD（H）的生物转化途径

Fig 2　Biological conversion of NAD（H）

有研究表明，约有 70% 的 NAD（H）存在于线粒体中；脂质载体蛋白（SLCs）是生物体内重要的转运家族，其中 SLC25A51 通过调控线粒体代谢和 ETC 中复合物 I 的功能，进而影响线粒体消耗氧气和产生 ATP 以及将 NAD$^+$转运到线粒体基质中的能力[19]。由于细胞内的大多数生理活动都依赖 ATP 提供能量，因此探究 NAD（H）对线粒体能量代谢和器官功能的影响具有重要意义。

1.3.2　NAD$^+$与 NADP$^+$的相互转化　除了 NAD$^+$与 NADH 的相互转化，细胞内约有 10% 的 NAD$^+$可以被烟酰胺核苷酸转氢酶（NNT）和 NAD$^+$激酶（NADKs）磷酸化为 NADP$^+$[3]。NADPH 是 NADP$^+$的还原形式，线粒体内 NADPH 可在 ME3

将丙酮酸转化为苹果酸的过程中和 IDH2 催化异柠檬酸转化为 α- 酮戊二酸的过程中产生 [20]。这些烟酰胺核苷酸在氧化形式（NAD^+和 $NADP^+$）和还原形式（NADH 和 NADPH）之间不断相互转化，作为生物合成途径中的重要辅助因子而发挥作用 [8]。

2　NAD（H）的测定

NAD（H）的分布与代谢具有组织特异性，因此检测 NAD（H）的合成与消耗途径，以及其在不同类型的细胞、组织、生理状态和疾病中的差异具有重要意义。

引入 ^{14}C 标记的 NR 等 NAD（H）前体后，测定 NAD（H）标记可以量化 NAD（H）的合成和消耗通量 [21]。液相色谱 - 质谱联用技术对 NAD（H）的定量标记也具有广泛应用前景，在研究中曾用于检测人体活检样本 [22]。近年来，也有研究构建出靶向线粒体的生物传感器，通过实时成像并检测活细胞内线粒体和细胞质中的 NAD^+/NADH 比率，为探究 NAD（H）调控不同细胞、组织和器官中的线粒体功能提供了可能 [23]。

3　NAD（H）在相关疾病中的调控作用

3.1　NAD（H）调控线粒体功能在神经系统变性疾病中的作用

神经元细胞代谢功能障碍是阿尔茨海默病（AD）、帕金森综合征（PD）和亨廷顿病（HD）等神经系统变性疾病发生的原因之一，大量研究证实 NAD（H）代谢参与神经系统变性疾病的发生与发展过程，线粒体能量稳态的丧失是影响神经系统变性疾病的发病和进展的重要因素 [24-25]。

3.1.1　AD　在 AD 模型中可以广泛观察到线粒体游离 NAD（H）水平降低，有学者认为这一特征与年龄依赖性的 *NAMPT* 基因表达缺失和代谢变化相关 [25-26]，也可能与糖酵解通量受损所导致的胞质 NADH 产生减少和线粒体碳通量供应减少相关 [27]。在载脂蛋白 E4（ApoE4）表达的神经元中，NAD^+/NADH 比值降低引起线粒体氧化磷酸化受损，ECT 中线粒体复合物Ⅳ的活性降低，最终导致 ATP 生成能力降低，加速 AD 疾病进程 [28]。因此，维持适当的 NAD（H）水平能够维持线粒体完整性和神经元细胞活力。

除底物水平外，NAD（H）代谢还可以通过其他途径影响线粒体功能。NAD（H）通过调节氧化磷酸化和 SIRT3 ～ SIRT5 活性在线粒体中发挥重要作用，并通过 SIRT1-PGC-1α 轴介导线粒体内的生物合成 [25]。在 AD 患者中，神经元 SIRT3 通过在 K320 位点去乙酰化 p53，阻止线粒体 p53 诱导的细胞死亡和线粒体功能障碍，从而调节线粒体活性氧（ROS）水平与耗氧量 [29]。Sorrentino 等 [30] 研究发现通过诱导应激相关的激活转录因子 -1（ATFS-1），NR 等 NAD^+前体能够有效激活线粒体非折叠蛋白反应（UPRmt）和线粒体自噬途径，从而降低 AD 模型中的 Aβ 蛋白的聚集与毒性，维持线粒体蛋白平衡。

3.1.2　PD　PD 患者在临床上常表现为肌肉震颤、肌强直和运动功能减退，线粒体功能障碍是关键致病标志之一。Tapias 等 [31] 研究发现氧化还原失衡和黑质纹状体多巴胺（DA）神经变性是导致 ETC 复合物Ⅰ持续抑制和线粒体功能障碍的主要原因。

Schondorf 等 [32] 研究发现 NAD（H）代谢增强可以显著改善神经元的线粒体功能。在鱼藤酮诱导的 PD 细胞模型中，上调 NAD（H）介导的 SIRT3 通路能够通过保护线粒体膜电位而提高细胞存活率，减轻细胞内超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽（GSH）水平并减少 ROS 产生 [33]。Park 等 [34] 研究发现线粒体 SIRT3 受 AMPKα-CREB 信号通路影响与 PD 患者 α- 突触核蛋白（α-syn）聚集和 DA 神经元变性成负相关，从而减少 α-syn 所诱导的线粒体 ROS。

此外，也有研究发现 *PINK1* 基因是可导致 PD 的致病性变异基因之一，PINK1 和 Parkin 通过 PARIS/PGC-1α 轴调控线粒体生物合成并维持线粒体功能 [35-36]。NAD（H）介导的 SIRT3 途径可以通过结合 PINK1 和 E3 泛素蛋白连接酶 Parkin（PARK2）使其去乙酰化，以促进线粒体自噬 [37]。

3.1.3　HD　HD 是一种常染色体显性遗传性神经系统变性疾病，患者会出现运动、认知等方面的障碍；细胞代谢与线粒体功能障碍也是 HD 细胞中的重要特征 [38]。在来源于 HD 患者的 iPSC（HD-iPSC）细胞中，存在线粒体呼吸减弱，ATP/ADP 降低，PGC-1α 和复合物Ⅲ亚基表达和活性减弱等特征 [39]；这可能与 4 号染色体短臂上亨廷顿蛋白 Htt 突变体降低了 SIRT3 的去乙酰化酶作用相关，进而导致 NAD（H）水平下降 [29]。

目前，通过 NAD（H）代谢途径调控 SIRTs 介导的各项生理活动具有很大的潜力，纠正氧化还原紊乱也被认为是预防或治疗神经系统变性疾病的一种潜在策略。例如，通过长期给予吩噻嗪治疗可使 NADH/NAD^+比例正常化，从而维持线粒体完整性并保护黑质纹状体多巴胺系统，改善大鼠的 PD 样行为缺陷 [31]。Zhang 等 [40] 发现使用鸢尾素也可以通过整合素受体上调下游 Akt 信号通路和 ERK1/2 信号通路，提高线粒体复合物Ⅰ活性和 mtDNA 拷贝数，促进 NAD^+再生和 ATP 合成。

3.2　NAD（H）调控线粒体功能在衰老中的作用

衰老是机体内不可逆的生理过程，在生长发育达到成熟期后，人体内各组织、器官发生退行性变化导致生理功能降低和紊乱。由于合成与降解失衡，多种组织中的 NAD（H）水平随年龄增长而下降[4，41]。有研究表明，在年老或患病的动物中恢复 NAD（H）水平可能通过多种作用途径延长寿命[6，42]。

在衰老过程中，NAD（H）水平下降通过 SIRTs 和 PARPs 调节 p53、NF-κB、PGC-1α 和 HIF-1α 等信号通路，导致氧化损伤、昼夜节律异常、代谢紊乱和线粒体功能障碍[3，43]。有研究发现，在老年小鼠中 PARPs 异常激活能够抑制 SIRT1 活性，并导致线粒体功能障碍；使用 PARPs 抑制剂和 NAD（H）前体可以缓解这一过程[3]。在秀丽隐杆线虫中，NAD（H）水平升高后通过 SIRT2.1 影响有丝分裂蛋白失衡，并通过 UPRmt 激活应激信号、FOXO 转录因子 DAF-16 的核易位和激活延长寿命[42]。提高 NAD（H）水平可以通过 SIRTs 途径恢复老年小鼠的线粒体功能[3]，因此，调控线粒体 NAD（H）代谢在衰老和长寿中起重要作用。

3.3　NAD（H）调控线粒体功能在心血管疾病中的作用

3.3.1　缺血再灌注　在心肌细胞中，线粒体氧化磷酸化是细胞内 ATP 产生的主要途径。当血流量减少时会产生有害的细胞过程，而再灌注也导致许多独立于凋亡和坏死组织损伤的信号通路的激活，例如介导线粒体损伤增加 ROS 的产生，胞质诱导的线粒体 Ca^{2+}超载，NADH/FAD 氧化还原比率降低，以及线粒体通透性转换孔（mPTP）的形成和开放等，最终导致细胞死亡[44]。

SIRT4 是一种线粒体定位的 sirtuin，在心脏中大量存在，其作用与调控细胞能量代谢和应激反应相关。与 SIRT1 和 SIRT3 不同，目前对 SIRT4 的生理机制研究相对有所欠缺。在心肌细胞缺血再灌注（IR）后，体外和体内模型中均可检测到 SIRT4 下调，SIRT4 过表达后心肌梗死面积和血清肌酸激酶（CK）水平降低；因此通过 NAD（H）途径激活 SIRT4 可能通过维持线粒体功能以及减少心肌细胞凋亡，从而保护 IR 损伤的心脏[11]。

还有研究发现，SIRT4 过表达能够通过抑制 AKT/mTOR 途径依赖性自噬，抑制阿霉素给药后引起的心肌细胞凋亡，从而起到心脏保护作用[15，45]。因此，继续探索心肌细胞中 SIRT4 作用机制具有广泛的研究价值，为心脏保护药物的研发提供了新的思路。

3.3.2　糖尿病心肌病（DCM）　目前，2 型糖尿病的发病率正在逐渐上升，DCM 是 2 型糖尿病的主要并发症之一。DCM 心功能障碍与代谢异常有关，表现为 NAD^+/NADH 比率降低、脂肪酸摄取率提高和线粒体 ETC 缺陷[46]。

一系列研究表明，上调 SIRT3 也在改善 DCM 线粒体功能中起关键作用。在 db/db 小鼠心脏组织中，外源性给予硫化氢（H_2S）能够恢复心肌细胞中 NAD^+/NADH 比率，提高 SIRT3 的表达和活性，降低了线粒体乙酰化水平，从而增强了线粒体 ETC 活性并提高 ATP 生成水平[12]。鹰嘴豆黄酮粗提物（CCFE）也通过 PARPs 和 SIRT3 途径，改善 NAD^+/NADH 氧化还原失衡和线粒体复合物Ⅰ的功能障碍；同时降低血清中的过氧化氢（H_2O_2）和丙二醛（MDA）水平，并上调谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）和超氧化物歧化酶（SOD）[47]。

3.3.3　心力衰竭（HF）　HF 与主动脉硬化、心肌和微血管重构相关，HF 的患病风险随着年龄的增长而飙升[48]。有研究者在 HF 模型中发现一种独特的蛋白质乙酰化模式，即在射血分数保留的心力衰竭（HFpEF）小鼠心脏中观察到蛋白质赖氨酸乙酰化（LysAc）升高[49]。研究表明，这一特征与 NAD^+/NADH 比率降低、线粒体功能受损和 TCA 代谢物减少相关；通过补充 NR 可使 NAD^+/NADH 比率正常化，乙酰化水平降低，从而改善线粒体功能和 HFpEF 表型[49]。

此外，研究发现这种 NAD（H）氧化还原失衡所引起的线粒体蛋白超乙酰化修饰主要通过两种不同的机制促进心脏的病理性重构：首先，线粒体苹果酸 - 天冬氨酸穿梭蛋白的高乙酰化抑制线粒体中 NAD（H）的氧化和运输，导致细胞质中氧化还原的不平衡；其次，寡霉素敏感赋予蛋白的乙酰化修饰增加了其与亲环蛋白 D 的结合，增强了线粒体通透性过渡孔的敏感性[50]。

3.3.4　肥厚性心肌病（HCM）　人类 HCM 是一种常见的遗传性心肌病，以舒张功能受损和左心室不对称肥厚为主要特征。研究表明，HCM 线粒体功能障碍与心肌细胞结构破坏有关，可以通过改善 NAD（H）驱动的线粒体呼吸来纠正[51]。

在 HCM 中还可以观察到能量代谢紊乱，表现为 ATP 生成减少和涉及 ATP 合成的线粒体基因表达降低，如催化 TCA 循环的大多数基因（*CS*、*IDH2*、*OGDH*、*SUCLA2*、*FH* 和 *MDH1*）和参与线粒体能量代谢的关键基因的下调，包括 *ANT1*（腺嘌呤核苷酸转位酶 1 型）、*CKM2*（肌酸激酶 2）等[52]。通过电子显微镜可以观察到受损的线粒体比例增加，嵴密度降低，线粒体内膜肿胀及嵴密度降低[52]。

因此，线粒体能量代谢结构和功能的损伤可能是 HCM 功能恶化的一个重要机制，线粒体也有望成为改善或预防 HCM 中心脏重构的新药物靶点。

3.4　NAD（H）调控线粒体功能在肿瘤中的作用

随着肿瘤研究不断深入，研究者们发现线粒体是肿瘤细胞增殖、存活和转移的代谢枢纽，线粒体中的各种代谢途径也能影响肿瘤的代谢和进展。例如，缺氧是大多数肿瘤微环境的显著标志；肿瘤细胞线粒体呼吸缺陷导致 NAD（H）增加，AKT 信号通路激活，从而使肿瘤细胞在缺氧条件下获得耐药性和生存优势 [53]。

分布在线粒体上依赖 NAD（H）的 SIRTs 与细胞自噬密切相关，根据诱导或抑制自噬的策略不同，可以对不同种类或分期的肿瘤细胞产生不同影响 [15，54]。例如在肿瘤细胞中，缺氧诱导的自噬可以减少氧化损伤，促进肿瘤细胞存活 [53]。而 SIRT4 可以通过抑制谷氨酰胺代谢激活 p53 蛋白的磷酸化，同时腺苷酸活化蛋白激酶 α（AMPK）也参与了 SIRT4 介导的自噬和 p53 磷酸化的调控，从而抑制胰腺肿瘤的发生 [55]；因此线粒体 NAD（H）介导的 SIRT4/AMPKα/p53/ 自噬轴在人类胰腺导管腺癌中可能具有临床意义。

信号转导及转录激活因子 3（STAT3）是一种参与炎症和肿瘤发生的转录因子，其结构部分定位于线粒体；有研究表明，STAT3 在三阴性乳腺癌中起着重要的促癌作用，当 STAT3 缺失时复合物Ⅰ活性降低，导致 NAD（H）再生受损，从而抑制抗氧化基因的表达 [56]。

广泛研究证实，调控 NAD（H）代谢途径是抑制肿瘤细胞增殖和转移，促进细胞凋亡的有效方法。Zhang 等 [57] 研究发现在前列腺癌细胞中敲低 *ACACA* 基因（编码乙酰辅酶 A 羧化酶 α 形式的基因），能够提高 NAD^+/NADH 比率和 ROS 水平，减少线粒体 ATP 生成，从而减小肿瘤体积与重量。肿瘤干细胞高度依赖氧化磷酸化获得能量，因此靶向氧化磷酸化或相关基因、相关酶的抑制剂被认为可以有效杀灭肿瘤干细胞 [53，58]。例如，小分子化合物 DX2-201 通过抑制氧化磷酸化并直接结合线粒体复合物Ⅰ的 NDUFS7 亚基，可以实现对胰腺癌的有效治疗 [59]。

综上所述，探究线粒体 NAD（H）在肿瘤代谢和进展中的作用，有利于了解肿瘤发生机制并开发新的治疗策略。

3.5　NAD（H）调控线粒体功能在肝脏疾病中的影响

在肝组织中，端粒功能障碍和 p53 通过 p53 依赖性抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活物 -1α/β（PGC-1α/β）机制下调线粒体 SIRTs；补充 NAD（H）后可逆转肝组织中 p53、FOXO1、PGC-1α、SOD2 和 CPS1 等 SIRTs 靶点的超乙酰化，从而稳定端粒并改善肝纤维化 [60]。此外，依赖 NAD（H）的 SIRT3 能够通过肝细胞中 AMPK-UNC51 样激酶 1（ULK1）途径，促进脂滴自噬降解，促进脂滴在去酪氨酸微管上分散，抑制硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（SCD1）表达从而抑制脂肪生成，使长链酰基辅酶 A 脱氢酶（LCAD）去乙酰化，增强线粒体脂肪酸氧化，从而改善肝细胞中的脂肪毒性，在非酒精性脂肪肝病中发挥保护作用 [61]。

此外，Katsyuba 等 [62] 发现 ACMSD 主要表达于肾脏和肝脏，表明 ACMSD 是肝肾细胞 NAD（H）水平、SIRTs 活性和线粒体稳态的关键调节剂。在 NR 诱导肝细胞 NAD（H）合成的过程中，烟酰胺核苷激酶 1（NRK1）是限速酶；Sambeat 等 [63] 发现 NRK1 缺乏会导致糖异生潜能降低和 PARP1 活性受损，因此更容易受到饮食诱导的肝脏 DNA 损伤。因此，调控 NAD（H）代谢途径的关键酶和信号通路也可以作为肝脏疾病防治的潜在靶点。

4　总结与展望

综上所述，NAD（H）通过调节生物体内的氧化还原平衡、基因表达、细胞能量代谢和 SIRTs 等 NAD（H）依赖酶的活性来影响线粒体的结构与功能，从而在疾病的发生发展中发挥重要调节作用。已有研究应用 NAD（H）增强剂调节线粒体功能，旨在治疗 NAD（H）缺乏的相关疾病或延长生物体寿命。例如，给予 NAD（H）前体 NR 可以使 AD 小鼠神经细胞线粒体 SIRT3 活性增加，从而改善认知功能 [13]。

但目前，研究者对 NAD（H）在体内的药代动力学仍知之甚少，也仍需通过更多研究确定不同 NAD（H）前体的特定效应分子。因此在临床治疗中有必要针对不同的人类疾病和人群特征对 NAD（H）增强剂的疗效、治疗剂量和给药途径进行优化，从而提高治疗效果。同时，NAD（H）介导的线粒体代谢研究也需要不断深入，通过探究 NAD（H）在不同疾病状态下调控线粒体功能的复杂机制和潜在的药物治疗靶点，为以 NAD（H）为核心的疾病预防和诊疗研究提供新的思路。

参考文献

[1] Spinelli JB，Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism [J]. Nat Cell Biol，2018，20（7）：745-754.

[2] Yoshino J，Baur JA，Imai SI. NAD^+ intermediates：the biology and therapeutic potential of NMN and NR [J]. Cell Metab，

2018，27（3）：513-528.

[3] Xie N，Zhang L，Gao W，et al. NAD $^{+}$ metabolism：pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential [J]. Signal Transduct Target Ther，2020，5（1）：227-264.

[4] Yaku K. Okabe K，Nakagawa T. NAD metabolism：implications in aging and longevity [J]. Ageing Res Rev，2018，47：1-17.

[5] Katsyuba E，Auwerx J. Modulating NAD $^{+}$ metabolism，from bench to bedside [J]. EMBO J，2017，36（18）：2670-2683.

[6] Rajman L，Chwalek K，Sinclair DA. Therapeutic potential of NAD-boosting molecules：the in vivo evidence [J]. Cell Metab，2018，27（3）：529-547.

[7] Wang X，Zhang Z，Zhang N，et al. Subcellular NAMPT-mediated NAD $^{+}$ salvage pathways and their roles in bioenergetics and neuronal protection after ischemic injury [J]. J Neurochem，2019，151（6）：732-748.

[8] Tedeschi PM，Bansal N，Kerrigan JE，et al. NAD $^{+}$ kinase as a therapeutic target in cancer [J]. Clin Cancer Res，2016，22（21）：5189-5195.

[9] Chini CCS，Zeidler JD，Kashyap S，et al. Evolving concepts in NAD $^{+}$ metabolism [J]. Cell Metab，2021，33（6）：1076-1087.

[10] Wu QJ，Zhang TN，Chen HH，et al. The sirtuin family in health and disease [J]. Signal Transduct Target Ther，2022，7（1）：402-476.

[11] Zeng G，Liu H，Wang H. Amelioration of myocardial ischemia-reperfusion injury by SIRT4 involves mitochondrion protection and reduced apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，502（1）：15-21.

[12] Sun Y，Teng Z，Sun X，et al. Exogenous H_2S reduces the acetylation levels of mitochondrion respiratory enzymes via regulating the NAD $^{+}$ -SIRT3 pathway in cardiac tissues of db/db mice [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2019，317（2）：284-297.

[13] Hou Y，Lautrup S，Cordonnier S，et al. NAD $^{+}$ supplementation normalizes key Alzheimer’s features and DNA damage responses in a new AD mouse model with introduced DNA repair deficiency [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2018，115（8）：1876-1885.

[14] Covarrubias AJ，Kale A，Perrone R，et al. Senescent cells promote tissue NAD $^{+}$ decline during ageing via the activation of CD38（＋）macrophages [J]. Nat Metab，2020，2（11）：1265-1283.

[15] Wilson N，Kataura T，Korsgen ME，et al. The autophagy-NAD axis in longevity and disease [J]. Trends Cell Biol，2023.

[16] Essuman K，Summers DW，Sasaki Y，et al. TIR domain proteins are an ancient family of NAD $^{+}$ -consuming enzymes [J]. Curr Biol，2018，28（3）：421-430 e4.

[17] Chandel NS. Glycolysis [J]. CSH Perspect Biol，2021，13（5）：a040535.

[18] Hocaoglu H，Sieber M，Mitochondrial respiratory quiescence：a new model for examining the role of mitochondrion metabolism in development [J]. Semin Cell Dev Biol，2023，138：94-103.

[19] Kory N，Bos J，Rijt S，et al. MCART1/SLC25A51 is required for mitochondrion NAD transport [J]. Science advances，2020，6（43）：e5310.

[20] Francisco A，Figueira TR，Castilho RF. Mitochondrial NAD（P）$^{+}$ transhydrogenase：from molecular features to physiology and disease [J]. Antioxid Redox Signal，2022，36（13-15）：864-884.

[21] Liu L，Su X，Quinn WJ，et al. Quantitative analysis of NAD synthesis-breakdown fluxes [J]. Cell Metab，2018，27（5）：1067-1080 e5.

[22] Pirinen E，Auranen M，Khan NA，et al. Niacin cures systemic NAD $^{+}$ deficiency and improves muscle performance in adult-onset mitochondrion myopathy [J]. Cell Metab，2020，31（6）：1078-1090 e5.

[23] Hu Q，Wu D，Walker M，et al. Genetically encoded biosensors for evaluating NAD $^{+}$ /NADH ratio in cytosolic and mitochondrion compartments [J]. Cell Rep Methods，2021，1（7）：100116.

[24] Procaccini C，Santopaolo M，Faicchia D，et al. Role of metabolism in neurodegenerative disorders [J]. Metabolism，2016，65（9）：1376-1390.

[25] Hikosaka K，Yaku K，Okabe K，et al. Implications of NAD metabolism in pathophysiology and therapeutics for neurodegenerative diseases [J]. Nutr Neurosci，2021，24（5）：371-383.

[26] Dong Y，Digman MA，Brewer GJ. Age- and AD-related redox state of NADH in subcellular compartments by fluorescence lifetime imaging microscopy [J]. Geroscience，2019，41（1）：51-67.

[27] Theurey P，Connolly NMC，Fortunati I，et al. Systems biology identifies preserved integrity but impaired metabolism of mitochondria due to a glycolytic defect in Alzheimer’s disease neurons [J]. Aging Cell，2019，18（3）：e12924.

[28] Mahley RW. Apolipoprotein E4 targets mitochondria and the mitochondria-associated membrane complex in neuropathology，including Alzheimer’s disease [J]. Curr Opin Neurobiol，2023，79：102684.

[29] Lee J，Kim Y，Liu T，et al. SIRT3 deregulation is linked to mitochondrion dysfunction in Alzheimer’s disease [J]. Aging Cell，2018，17（1）：e12679.

[30] Sorrentino V，Romani M，Mouchiroud L，et al. Enhancing mitochondrion proteostasis reduces amyloid-beta proteotoxicity [J]. Nature，2017，552（7684）：187-193.

[31] Tapias V，McCoy JL，Greenamyre JT，Phenothiazine normalizes the NADH/NAD $^{+}$ ratio，maintains mitochondrion integrity and protects the nigrostriatal dopamine system in a chronic rotenone model of Parkinson’s disease [J]. Redox Biol，2019，24：101164.

[32] Schondorf DC，Ivanyuk D，Baden P，et al. The NAD $^{+}$ precursor nicotinamide riboside rescues mitochondrion defects and neuronal loss in iPSC and fly models of Parkinson’s disease [J]. Cell Rep，2018，23（10）：2976-2988.

[33] Zhang JY，Deng YN，Zhang M，et al. SIRT3 acts as a neuroprotective agent in rotenone-induced parkinson cell model [J]. Neurochem Res，2016，41（7）：1761-73.

[34] Park JH，Burgess JD，Faroqi AH，et al. Alpha-synuclein-induced mitochondrion dysfunction is mediated via a sirtuin 3-dependent pathway [J]. Mol Neurodegener，2020，15（1）：5.

[35] Pereira SL，Grossmann D，Delcambre S，et al. Novel insights into Parkin-mediated mitochondrion dysfunction and neuroin-

flammation in Parkinson's disease [J]. Curr Opin Neurobiol，2023，80：102720.

[36] Pirooznia SK，Yuan C，Khan MR，et al. PARIS induced defects in mitochondrion biogenesis drive dopamine neuron loss under conditions of parkin or PINK1 deficiency [J]. Mol Neurodegener，2020，15（1）：17.

[37] Zhou ZD，Tan EK，Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide-dependent mitochondrion deacetylase sirtuin-3 as a potential therapeutic target of Parkinson's disease [J]. Ageing Res Rev，2020，62：101107.

[38] Campesan S，Del Popolo I，Marcou K，et al. Bypassing mitochondrion defects rescues Huntington's phenotypes in Drosophila [J]. Neurobiol Dis，2023，185：106236.

[39] Lopes C，Tang Y，Anjo SI，et al. Mitochondrial and redox modifications in huntington disease induced pluripotent stem cells rescued by CRISPR/Cas9 CAGs targeting [J]. Front Cell Dev Biol，2020，8：576592.

[40] Zhang X，Xu S，Hu Y，et al. Irisin exhibits neuroprotection by preventing mitochondrion damage in Parkinson's disease [J]. NPJ Parkinsons Dis，2023，9（1）：13.

[41] Das A，Huang GX，Bonkowski MS，et al. Impairment of an endothelial NAD^+-H_2S signaling network is a reversible cause of vascular aging [J]. Cell，2018，173（1）：74-89 e20.

[42] Mouchiroud L，Houtkooper RH，Moullan N，et al. The NAD^+/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrion UPR and FOXO signaling [J]. Cell，2013，154（2）：430-41.

[43] Covarrubias AJ，Perrone R，Grozio A，et al. NAD^+ metabolism and its roles in cellular processes during ageing [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology，2021，22（2）：119-141.

[44] Sun J，Mishra J，Yang M，et al. Hypothermia prevents cardiac dysfunction during acute ischemia reperfusion by maintaining mitochondrion bioenergetics and by promoting hexokinase Ⅱ binding to mitochondria [J]. Oxid Med Cell Longev，2022，2022：4476448.

[45] Sun J，Mishra J，Yang M，et al. SIRT4 suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the AKT/mTOR/autophagy pathway [J]. Toxicology，2022，469：153119.

[46] Berthiaume JM，Kurdys JG，Muntean DM，et al. Mitochondrial NAD^+/NADH redox state and diabetic cardiomyopathy [J]. Antioxid Redox Signal，2019，30（3）：375-398.

[47] Fu Y，Li Z，Xiao S，et al. Ameliorative effects of chickpea flavonoids on redox imbalance and mitochondrion complex Ⅰ dysfunction in type 2 diabetic rats [J]. Food Funct，2022，13（17）：8967-8976.

[48] Paneni F，Diaz Canestro C，Libby P，et al. The aging cardiovascular system：understanding it at the cellular and clinical levels [J]. J Am Coll Cardiol，2017，69（15）：1952-1967.

[49] Liu X，Zhang YB，Deng Y，et al. Mitochondrial protein hyperacetylation underpins heart failure with preserved ejection fraction in mice [J]. J Mol Cell Cardiol，2022，165：76-85.

[50] Lee CF，Chavez JD，Garcia-Menendez L，et al. Normalization of NAD^+ redox balance as a therapy for heart failure [J]. Circulation，2016，134（12）：883-894.

[51] Nollet EE，Duursma I，Rozenbaum A，et al. Mitochondrial dysfunction in human hypertrophic cardiomyopathy is linked to cardiomyocyte architecture disruption and corrected by improving NADH-driven mitochondrion respiration [J]. Eur Heart J，2023，44（13）：1170-1185.

[52] Ranjbarvaziri S，Kooiker KB，Ellenberger M，et al. Altered cardiac energetics and mitochondrion dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy [J]. Circulation，2021，144（21）：1714-1731.

[53] Liu YE，Sun YH，Guo YD，et al. An overview：the diversified role of mitochondria in cancer metabolism [J]. Int J Biol Sci，2023，19（3）：897-915.

[54] Amaravadi RK，Kimmelman AC，Debnath J. Targeting autophagy in cancer：recent advances and future directions [J]. Cancer Discov，2019，9（9）：1167-1181.

[55] Li J，Zhan HX，Ren YD，et al. Sirtuin 4 activates autophagy and inhibits tumorigenesis by upregulating the p53 signaling pathway [J]. Cell Death Differ，2023，30（2）：313-326.

[56] Lahiri T，Brambilla L，Andrade J，et al. Mitochondrial STAT3 regulates antioxidant gene expression through complex Ⅰ-derived NAD in triple negative breast cancer [J]. Mol Oncol，2021，15（5）：1432-1449.

[57] Zhang H，Liu SY，Cai ZD，et al. Down-regulation of ACACA suppresses the malignant progression of prostate cancer through inhibiting mitochondrion potential [J]. J Cancer，2021，12（1）：232-243.

[58] Snyder V，Reed-Newman TC，Arnold L，et al. Cancer stem cell metabolism and potential therapeutic targets [J]. Front Oncol，2018，8：203.

[59] Xu Y，Xue D，Kyani A，et al. First-in-class NADH/ubiquinone oxidoreductase core subunit S7（NDUFS7）antagonist for the treatment of pancreatic cancer [J]. ACS Pharmacol Transl Sci，2023，6（8）：1164-1181.

[60] Lautrup S，Sinclair DA，Mattson MP，et al. Telomere dysfunction induces sirtuin repression that drives telomere-dependent disease [J]. Cell Metab，2019，29（6）：1274-1290 e9.

[61] Zhang T，Liu JX，Shen SN，et al. SIRT3 promotes lipophagy and chaperon-mediated autophagy to protect hepatocytes against lipotoxicity [J]. Cell Death Differ，2020，27（1）：329-344.

[62] Katsyuba E，Mottis A，Zietak M，et al. De Novo NAD^+ synthesis enhances mitochondrion function and improves health [J]. Nature，2018，563（7731）：354-359.

[63] Sambeat A，Ratajczak J，Joffraud M，et al. Endogenous nicotinamide riboside metabolism protects against diet-induced liver damage [J]. Nat Commun，2019，10（1）：4291-4302.

（收稿日期：2023-06-20；修回日期：2023-08-10）

研究论文

桑叶联合二甲双胍对 2 型糖尿病小鼠的糖脂代谢、炎症及肠道微生物的影响

陆东裕[1]，赵燕琳[1]，金鹏[1]，王倩[1]，杜岩[2]，汤道权[2*]（1. 徐州医科大学附属医院睢宁分院药剂科，江苏　睢宁 221200；2. 徐州医科大学江苏省新药研究与临床药学重点实验室，江苏　徐州　221004）

摘要：目的　探讨桑叶水提物（MLE）联合二甲双胍（MET）对 2 型糖尿病（T2DM）小鼠体内糖脂代谢紊乱、炎症及肠道微生物的影响。**方法**　C57BL/6J 小鼠高脂高糖饮食 4 周后腹腔注射链脲佐菌素 90 mg•kg^{-1} 建立 T2DM 小鼠模型，随机分为模型组、MET 组（200 mg•kg^{-1}）、MLE 组（2 g • kg^{-1}，按生药量计）、联合用药组（MET 200 mg • kg^{-1} ＋ MLE 2 g • kg^{-1}），另设同周龄普通饲料喂养小鼠为正常对照组（NC）。灌胃给药，每日 1 次，NC 组和 HFHS 组给予生理盐水。13 周末，试剂盒法测血清中空腹血糖（FBG）、三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、胰岛素（INS）、C- 肽及脂多糖（LPS）的水平；RT-PCR 法测肝脏中白细胞介素 1*β*（*IL-1β*）、*IL-6*、*IL-10* 及肿瘤坏死因子 *α*（*TNF-α*）mRNA 表达；16S rDNA 法测肠道菌群丰度。**结果**　联合用药可改善 T2DM 小鼠的 FBG、INS、胰岛素抵抗、葡萄糖及胰岛素耐受性、C- 肽、TG、TC、LDL-C、LPS、ALT、AST、*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-10* 等指标的异常；还可改善肝脏指数及 *IL-10* mRNA 表达。微生物组学结果同样显示，联合用药不仅呈现出单一用药的互补作用，还可降低两者单用均不能改善的 T2DM 小鼠粪便中 *Cyanobacteria* 及 *Deferribacterota* 细菌门和与糖脂代谢及炎症密切相关的 *Clostridia_vadinBB60*、*Eubacterium_siraeum*、*Harryflintia*、*Mucispirillum*、*Romboutsia* 等细菌属的丰度。**结论**　MLE 与 MET 联用可改善 T2DM 小鼠的炎症及糖脂代谢紊乱，其机制可能与调控肠道微生物异常有关，且两者之间呈现一定程度上的药效学互补与协同。

关键词：2 型糖尿病；糖脂代谢紊乱；桑叶水提物；二甲双胍；肠道菌群

中图分类号：R961　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2560-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.003

Effect of mulberry leaf combined with metformin on glucose and lipid metabolism disorder, inflammation and gut microbiota dysbiosis in type 2 diabetes mellitus mice

LU Dong-yu[1], ZHAO Yan-lin[1], JIN Peng[1], WANG Qian[1], DU Yan[2], TANG Dao-quan[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Suining Branch of the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University*, *Suining Jiangsu* 221200; 2. *Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy*, *Xuzhou Medical University*, *Xuzhou Jiangsu* 221004)

Abstract: Objective To determine the effect of mulberry leaf water extract (MLE) combined with metformin (MET) on the glucose and lipid metabolism disorder, inflammation, and gut microbiota dysbiosis

基金项目：江苏省高校自然科学基金面上项目（No.22KJD360004）；徐州市科技计划项目（No.KC21024）；江苏省新药研究与临床药学重点实验室开放项目（No.KFKT-2107）。

作者简介：陆东裕，男，副主任药师，主要从事中药药效物质基础研究，email：ludongyu_snry@163.com　*通信作者：汤道权，男，博士，教授，主要从事中药药效物质基础研究，email：tangdq@xzhmu.edu.cn

in type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice. **Methods** C57BL/6J T2DM mouse models were induced by intra-peritoneal injection of 90 mg • kg^{-1} streptozotocin after being fed with high fat and high sucrose diet for 4 weeks. The mice were then randomly divided into a model group, an MET group (200 mg • kg^{-1}), an MLE group (2 g • kg^{-1} crude drugs), and a combination group (200 mg • kg^{-1} MET plus 2 g • kg^{-1} MLE). Age-matched mice fed with normal diet were set as the normal group. The serum levels of fasting blood glucose (FBG), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), insulin (INS), C-peptide and lipopolysaccharide (LPS) in the mice were determined with Kits. RT-PCR was used to detect the expression levels of inflammatory factors including interleukin-1β (*IL-1β*), *IL-6*, *IL-10* and tumor necrosis factor α (*TNF-α*) mRNA in the livers of mice. The relative abundance of fecal gut microbiota was detected by 16S rDNA. **Results** MLE combined with MET changed the abnormality FBG, INS, insulin resistance, glucose and insulin tolerance, C-peptide, TG, TC, LDL-C, LPS, ALT, AST, *TNF-α*, *IL-1β*, and *IL-10* in T2DM mice, but also improved the hepatic index and mRNA expression of *IL-10* that could not influenced by MET or MLE alone. The gut microbiota showed that the combination of MLE and MET decreased the abundance of the phyla including *Cyanobacteria* and *Deferribacterota* and the genera including *Clostridia_vadinBB60*, *Eubacterium_siraeum*, *Harryflintia*, *Mucispirillum* and *Romboutsia* in the feces of T2DM mice, which were positively correlated with glucose and lipid metabolism disorder and inflammation. **Conclusion** MLE combined with MET may improve the inflammation and glucose and lipid metabolism disorder in T2DM mice by regulating gut microbiota dysbiosis, and the complementary and synergetic effects exist between MLE and MET.

Key words: type 2 diabetes mellitus; glucose and lipid metabolism disorder; mulberry leaf water extract; metformin; gut microbiota

近年来，随着人们饮食及生活方式的改变，糖尿病的发病率逐年升高。据国际糖尿病联盟统计，2021 年全球约有 5.37 亿人患有糖尿病，预计到 2030 年患糖尿病人数将增长到 6.43 亿。2 型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）占糖尿病患者总数的 90% 以上，致病因素包括肥胖、缺乏锻炼、高能量饮食和遗传因素等，同时会引发心血管疾病、糖尿病肾病、糖尿病足、视网膜病变等一系列并发症，给患者及其家庭带来了巨大的压力，给社会造成了极大的经济负担。

二甲双胍（metformin，MET）为临床上用于治疗糖尿病的主要口服降糖药物，其主要通过减少肝脏葡萄糖的输出和改善外周胰岛素抵抗而降低血糖，是 T2DM 患者控制高血糖的一线用药和药物联合中的基本用药。长期服用 MET 可引起胃肠道反应、维生素 B_{12} 水平下降及药物抵抗，其对脂质代谢紊乱及炎症的治疗作用也有待确认，且无法阻止并发症的发生。因此，MET 与中药联合对 T2DM 及其并发症的延缓或阻滞作用，已引起广泛的注意。

桑叶是桑科植物桑的干燥叶，具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目的功效。《本草纲目》中首次记载了桑叶茶可用于“消渴症”的治疗。现代药理学研究同样证实，桑叶可改善链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）及高脂饮食诱导的糖尿病大鼠及小鼠体内的血糖水平异常；降低糖尿病患者的血糖水平、改善其糖脂代谢异常 [1-3]。

研究证实，桑叶茶和 MET 联用可有效改善肺热津伤证 T2DM 患者中医证候评分及胰岛素抵抗，抑制白细胞介素 -6（interleukin-6，IL-6）水平，该联合用药效果可能与桑叶能延迟 MET 的体内消除时间有关 [4]。大量研究表明，糖尿病与肠道菌群的种类与数量存在一定的关系 [5]。因此，本文在前期实验的基础上，以 STZ 联合高脂高糖（high fat and high sucrose，HFHS）饮食诱导的 T2DM 小鼠为对象，观察桑叶水提物（mulberry leaf water extract，MLE）联合 MET 对 T2DM 小鼠糖脂代谢、炎症及肠道菌群的影响，以期从肠道微环境的角度揭示桑叶联合 MET 改善 T2DM 的作用机制，并为临床上两者联合应用治疗 T2DM 提供实验依据。

1　仪器与材料

1.1　试药

桑叶购自徐州广济连锁药店有限公司，经徐

州医科大学季帅副教授鉴定为桑科植物桑（*Morus alba* L.）的干燥叶；MLE 为本实验室自制[1]；MET（纯度≥ 98.5%；批号：A-32611906092）（江苏万邦生化医药股份有限公司）；STZ（纯度≥ 98%；批号：WXBD1402V）（美国 Sigma 公司）；Trizol 总 RNA 提取试剂、PrimeScript RT Master Mix 及 TB Green Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒（日本 Takara 公司）；鼠源 *IL-6*、*IL-1β*、*IL-10*、肿瘤坏死因子 *-α*（*TNF-α*）及 *β*-actin 上下游引物（上海生工生物工程股份有限公司）；三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、谷丙转氨酶（ALT）及谷草转氨酶（AST）试剂盒（南京建成生物工程研究所）；胰岛素、C- 肽、脂多糖（LPS）试剂盒（上海岚派有限公司）；粪便 DNA 分离及纯化试剂盒、DEAE 琼脂糖凝胶（德国默克公司）；高保真热启动酶试剂盒（美国 KAPA Biosystems 公司）；Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina（英国 New England Biolabs 公司）；其他试剂均为分析纯。

1.2　仪器

手持组织匀浆器（美国 Biospec 公司）；EA-11 型血糖测试仪（长沙三诺生物传感股份有限公司）；NanoDrop 1000 核酸浓度测定仪（美国 Thermo 公司）；PCR 仪（美国 AB 公司）；酶标仪（Elx808，美国 Bio Tek 公司）；RT-PCR 仪（瑞士 Roche 公司）。

1.3　实验动物

4 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠，体重（20±2）g（上海斯莱克实验动物有限责任公司），动物生产许可证号：SCXK（沪）2008-0016。饲养于徐州医科大学 SPF 级动物房，自由摄食和饮水，每 2 日更换一次饮水瓶，每 3 日更换一次垫料，室温保持在（22±2）℃，相对湿度（55±10）%，12 h/12 h 间隔照明。

2　方法

2.1　动物分组、造模及给药

C57BL/6J 雄性小鼠适应性饲养 7 d 后，随机分为正常组和模型组，正常组给予普通饲料，模型组给予 HFHS 饲料（含 60% 脂肪、20% 蛋白质、20% 碳水化合物），4 周后测空腹血糖（FBG）。造模前所有小鼠均禁食不禁水 12 h，模型组小鼠按 90 mg • kg^{-1} 腹腔注射 STZ 的柠檬酸盐缓冲液（0.1 mmol • L^{-1}，pH 4.5），正常组注射同等体积的柠檬酸盐缓冲液。STZ 诱导 7 d 后，禁食过夜测血糖，FBG ＞ 11.1 mmol • L^{-1} 的小鼠认为 T2DM 小鼠造模成功。T2DM 小鼠按 FBG 水平随机分为模型组（HFHS）、MLE 组（MLE）、MET 组（MET）、MLE 联合 MET 组（CMT）。MLE 组按 2 g/（kg•d）（以生药含量计算）灌胃给予 MLE；MET 组按 200 mg/（kg • d）灌胃给予 MET；CMT 组同时给予 2 g/（kg • d）MLE 及 200 mg/（kg • d）MET；另取正常小鼠设为正常对照组（NC），NC 组及 HFHS 组均同法给予等体积溶媒，连续 8 周。实验周期内 NC 组给予普通饲料，其他组均给予 HFHS 饲料，每周记录一次体重，各组小鼠均自由饮水。第 12 周进行胰岛素耐受试验（ITT），第 13 周收集小鼠粪便并进行口服葡萄糖耐量试验（OGTT）[1]。干预结束后处死小鼠，收集血液、肝脏、附睾脂肪，用于测定生化指标及计算肝脏及附睾脂肪指数（脏器重量 / 体重 ×100%）。

2.2　血液、肝脏、附睾脂肪、粪便的采集与处理

摘除小鼠眼球取血，室温放置 30 min 后，3000 r • min^{-1} 离心 15 min，收集血清并分装，－80 ℃保存，用于后续的检测。小鼠取血处死后，迅速摘取肝脏及附睾脂肪，用预冷的生理盐水冲洗、滤纸擦干并称重，于液氮中速冷后置－ 80 ℃保存，用于后续 RT-PCR 实验。在无菌条件下收集到新鲜粪便样本后，液氮速冻 30 s，保存至－80 ℃冰箱。

2.3　血液生化指标的测定

按照试剂盒的操作步骤测定各组小鼠血清中 TG、TC、HDL-C、LDL-C、ALT 和 AST 含　量。采用血糖仪测定血清中 FBG 浓度；按照试剂盒的操作步骤，采用 ELISA 法测定小鼠血清中胰岛素、C- 肽及 LPS 的浓度。用胰岛素抵抗稳态模型（homeostatic model assessment for insulin resistance，HOMA-IR）计算胰岛素抵抗指数，HOMA-IR ＝空腹血糖水平（FPG，mmol • L^{-1}）× 空腹胰岛素水平（FINS，μU • mL^{-1}）/22.5。

2.4　RT-PCR 检测肝脏中炎症因子 mRNA 的水平

各基因的上下游引物见表 1。实验结束后取小鼠肝脏组织，依试剂盒法提取总 RNA、进行逆转录反应获得 cDNA。以上述 cDNA 为模板，将鼠来源的 *β-Actin*、*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*IL-10* 上下游引物稀释到 10 μmol • L^{-1}，使用 TB Green Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒法进行 RT-PCR 反应，以 *β-Actin* 基因为内参，校正每个样本目的基因的 C_t 值，以 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 值计算基因相对表达水平。

2.5　肠道菌群分析

取小鼠新鲜粪便，按试剂盒操作要求提取粪便细菌 DNA；采用核酸浓度测定仪测定 DNA 浓度及纯度；利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量后，合格的 DNA 采用 16S rDNA 片段 V3 和 V4

表 1　引物序列

Tab 1　Primer sequences used in the experiment

基因	正向引物	反向引物
β-Actin	CTACCTCATGAAGATCCTGACC	CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC
TNF-α	CGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGG	GTGGTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG
IL-1β	CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC	TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGTAC
IL-6	GGAGTCACAGAAGGAGTGGC	AACGCACTAGGTTTGCCGAG
IL-10	CTGGACAACATACTGCTAACCGACTC	ACTGGATCATTTCCGATAAGGCTTGG

区通用引物 338F（5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'）和 806R（5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'）进行扩增；采用 2% 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物，经纯化后根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2×300 的文库，并进行测序。测得的原始数据经拼接、过滤后的有效数据，使用 QIIME2 软件进行过滤，获得最终的扩增序列变体（amplicon sequence variants，ASV）以及特征表。随后，使用 QIIME2 软件将得到的 ASV 与数据库比对及 *α* 多样性分析。结合环境因素进行 Spearman 相关性分析。

2.6　统计学处理

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据和绘图处理。数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$），两组比较采用 *t* 检验，多组比较采用单因素方差分析，假设检验水准按 $\alpha = 0.05$ 判定，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　对体重、FBG 周期性变化及脏器指数的影响

由图 1A ～ 1D 结果可知，给药周期内，MET、MLE 及两者联合用药，均不显著改变 T2DM 小鼠体重增加。MET 及 MLE 单独给药均不能显著改善 T2DM 小鼠的脏器指数改变，但两者联合用药可明显降低 T2DM 小鼠的肝脏指数（$P < 0.05$）。MET 组、MLE 组及 CMT 组小鼠的 FBG 水平从第 6 周开始下降，但差异无统计学意义，而实验结束后上述干预组的小鼠 FBG 水平均显著低于 HFHS 组（$P < 0.01$），但联合用药与单独用药之间无显著性差异。

由图 1E ～ 1H 中可见，MET、MLE 及两者联合，均可显著降低 T2DM 小鼠的 FBG、空腹胰岛素、HOMA-IR 指数及 C- 肽（$P < 0.05$ 或 0.01），且联合用药组和单独给药组之间无明显差异。OGTT 及 ITT 的结果见图 1I ～ 1J，由图 1 可知，MLE 单独用药及与 MET 联合用药，均可提高 T2DM 小鼠的口服葡萄糖耐受性及腹腔注射胰岛素耐受性（$P < 0.05$ 或 0.01），而 MET 单独给药则不能对抗 HFHS 饮食导致的葡萄糖及胰岛素耐受。

3.2　对血脂、炎症及肝功能的影响

由图 2A ～ 2D 可知，MLE 单用及联合用药，均可显著降低 T2DM 小鼠血清中 TG、TC 及 LDL-C 的水平（$P < 0.05$ 或 0.01），MET 单用仅可降低 T2DM 小鼠血清中 LDL-C 的水平（$P < 0.05$），且联合用药组与单独用药之间无明显差异；而 MET、MLE 及两者联合，对 T2DM 小鼠血清中 HDL-C 均无明显影响。

由图 2E ～ 2G 可知，MLE 单用及联合用药，均显著降低 T2DM 小鼠血清中 LPS、ALT 及 AST 水平（$P < 0.05$ 或 0.01）；MET 单用仅可降低 T2DM 小鼠血清中 LPS 水平（$P < 0.05$）；且联合用药和单独用药之间无显著性差异。

由图 2H ～ 2K 可见，MLE 单用可明显降低 T2DM 小鼠肝脏中 *TNF-α* 和 *IL-1β* 的 mRNA 的表达，升高 *IL-10* mRNA 的表达（$P < 0.05$），但对 *IL-6* mRNA 表达无显著影响；MET 单用可明显降低 T2DM 小鼠肝脏中 *TNF-α* 和 *IL-1β* 的 mRNA 的表达（$P < 0.05$ 或 0.01），但对 *IL-6* 及 *IL-10* mRNA 表达无明显影响；而两者联合用药仅可降低 T2DM 小鼠肝脏中 *TNF-α* 和 *IL-6* 的 mRNA 表达（$P < 0.05$）。

3.3　对肠道微生物的影响

3.3.1　*α* 多样性分析　*α* 多样性分析用于反映各样本的微生物群落丰富度和多样性。常用的 *α* 多样性分析包括 Chao1、Pielou_e、Shannon 和 Simpson。其中 Chao1 用来估计样本群落中包含的物种总数；Pielou_e 是均匀度指数；Shannon 指样本中的分类总数及其占比；Simpson 表征群落内物种分布的多样性和均匀度。这些多样性指数越大，代表群落多样性越高，物种分布越均匀。由表 2 可知，NC 组小鼠肠道微生物群落内物种分布较均匀，HFHS 组小鼠粪便中微生物的物种均匀度较 NC 组减少。与 HFHS 组相比，MET 组无明显变化；MLE 组小鼠粪便样本中物种数目减少（$P < 0.01$）；CMT 组小鼠粪便中微生物的物种总数、均匀度、分类总数及其占比均减少（$P < 0.05$）。

3.3.2　菌群群落结构分析　根据物种注释结果，选取各样本和各组在门及属水平上相对丰度排名

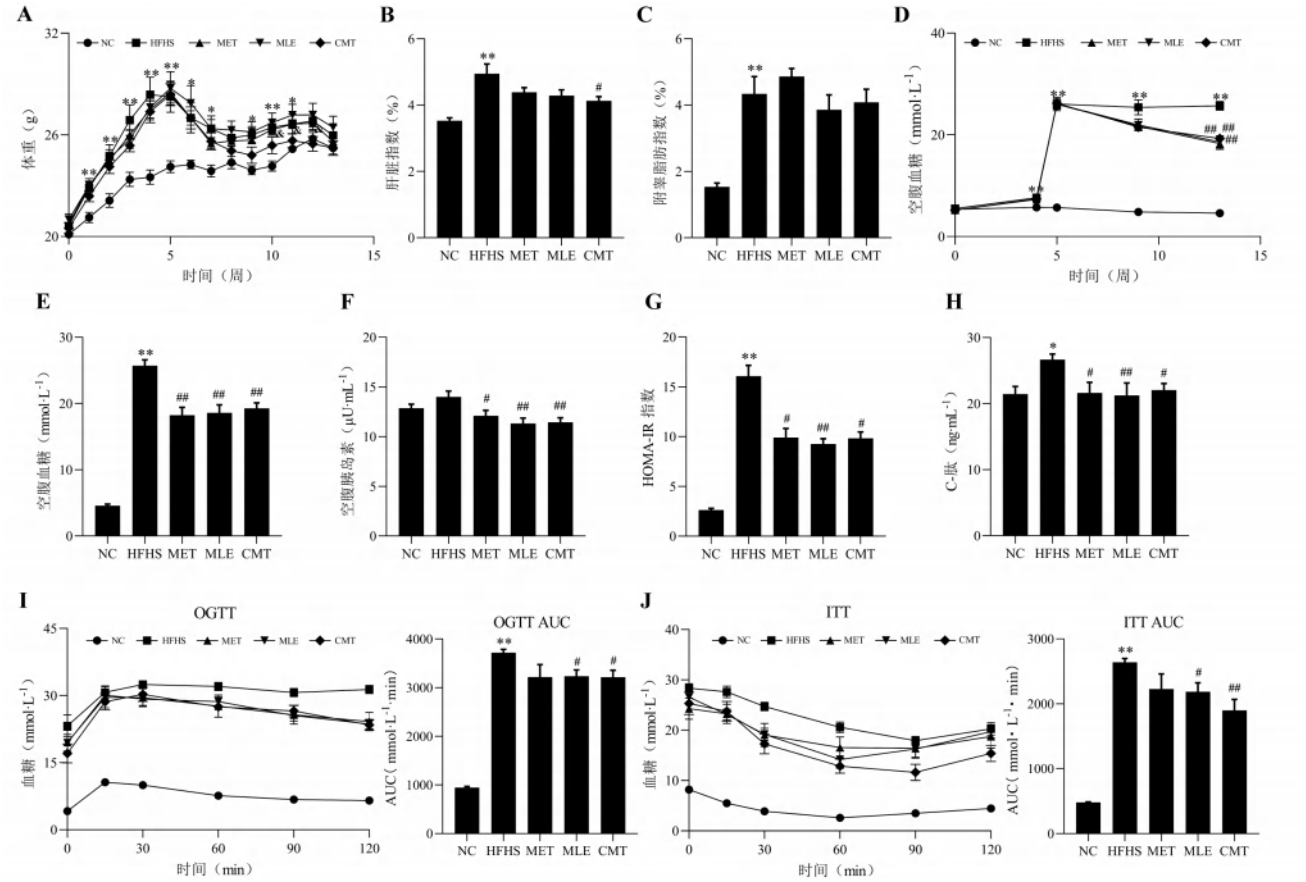


图 1　MLE 联合 MET 对 T2DM 小鼠体重（A）、肝脏（B）及附睾脂肪（C）指数、周期性 FBG 变化（D）、13 周空腹血糖（E）及胰岛素（F）、HOMA-IR（G）、C- 肽（H）、OGTT（I）及 ITT（J）的影响（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

Fig 1　Effect of MLE combined with MET on the levels of body weight（A），hepatic index（B），epididymal fat index（C），periodic change of FBG（D），FBG of 13th week（E），serum insulin at 13th week（F），HOMA-IR（G），C-peptide（H），OGTT（I），and ITT（J）of T2DM mice（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

注：与 NC 组相比，$^{**}P < 0.01$；与 HFHS 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* the NC group，$^{**}P < 0.01$；*vs* the HFHS group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

表 2　小鼠粪便中肠道微生物多样性 ($n = 8$，$\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Alpha diversity indexes in fecal sample of mice ($n = 8$，$\bar{x} \pm s$)

组别	Chao1	Pielou_e	Shannon	Simpson
NC	374.39±54.52	0.71±0.10	6.06±0.93	0.95±0.06
HFHS	368.96±84.78	0.61±0.12*	5.23±1.15	0.87±0.14
MLE	281.74±48.67##	0.58±0.07	4.72±0.62	0.88±0.05
MET	343.88±71.13	0.56±0.09	4.67±0.88	0.84±0.09
CMT	287.51±37.10#	0.51±0.07#	4.13±0.55#	0.82±0.08

注：与 NC 组相比，$^{*}P < 0.05$；与 HFHS 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* the NC group，$^{*}P < 0.05$；*vs* the HFHS group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

前 10 的物种，生成物种相对丰度柱形图，结果如图 3 所示。门水平上，各组粪便样本中主要的门分类水平有：拟杆菌门（*Bacteroidota*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）、脱硫杆菌门（*Desulfobacterota*）、疣微菌门（*Verrucomicrobiota*）和放线菌门（*Actinobacteriota*）为主要优势菌门。属水平上，按所占比例依次为 *Muribaculaceae*、栖粪杆菌属（*Faecalibaculum*）、阿克曼菌（*Akkermansia*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）等。

3.3.3　组间物种差异分析　利用 MetaStat 方法对两组间的物种丰度数据进行 *t* 检验得到 *P* 值，并根据 *P* 值筛选出具有组间显著性差异的物种，门、属水平的组间显著性分析结果见图 4。门水平上，MET 可明显降低 T2DM 小鼠粪便中 *Bacteroidota* 的相对丰度、升高 *Proteobacteria* 的相对丰度（$P < 0.05$）；MLE 可明显降低 *Desulfobacterota* 的相对丰度（$P < 0.05$）；而两者联合不仅明显影响上述三个细菌的丰度，还可明显逆转单用 MET 或 MLE 不能改变的 *Cyanobacteria*、*Deferribacterota*、*Firmicutes* 三种细菌的丰度改变（$P < 0.05$ 或 0.01），且对 *Bacteroidota*、*Firmicutes* 相对丰度的改善作用明显好于单用 MET 或 MLE（$P < 0.05$ 或 0.01）。属水平上，MET 干预可明显降低 T2DM 小鼠粪便中 *Anaerovorax*、*Citrobacter*、*Clostridioides*、*Clostridium_methylpentosum*、*Gastranaerophilales*、*Peptococ-*

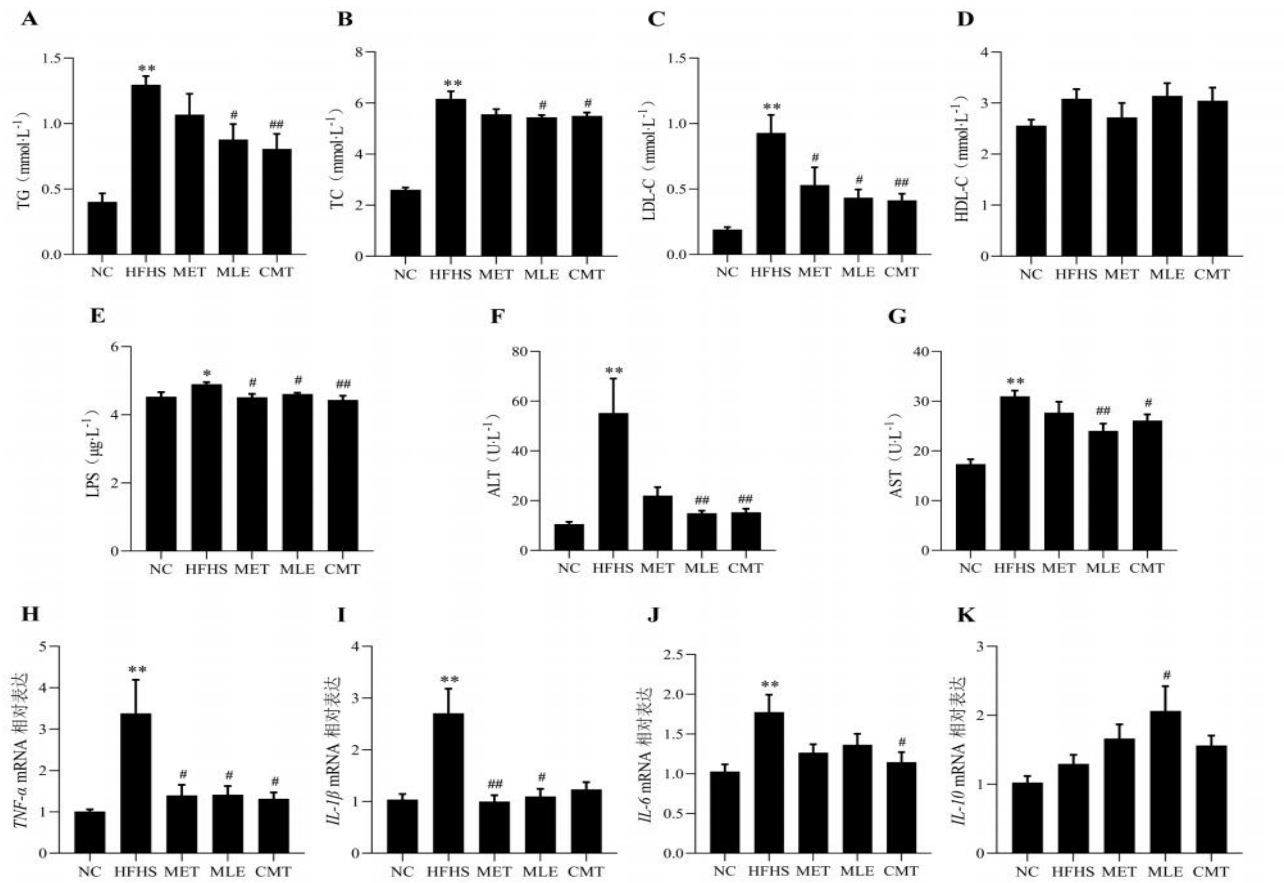


图 2　MLE 联合 MET 对 T2DM 小鼠血清 TG（A）、TC（B）、LDL-C（C）、HDL-C（D）、LPS（E）、ALT（F）、AST（G）及肝脏中 *TNF-α*（H）、*IL-1β*（I）、*IL-6*（J）、*IL-10*（K）mRNA 表达的影响（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

Fig 2　Effect of MLE combined with MET on the levels of TG（A），TC（B），LDL-C（C），HDL-C（D），LPS（E），ALT（F），AST（G）in serum and mRNA expressions of *TNF-α*（H），*IL-1β*（I），*IL-6*（J）and *IL-10*（K）in the liver of T2DM mice（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

注：与 NC 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 HFHS 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* the NC group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the HFHS group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

cus 及 *Tuzzerella* 的相对丰度，升高 *Akkermansia* 及 *Parvibacter* 的相对丰度（$P < 0.05$ 或 0.01）；MLE 干预可明显降低 T2DM 小鼠粪便中 *Acetatifactor*、*Anaerovorax*、*Bilophila*、*Citrobacter*、*Clostridium_methylpentosum*、*Colidextribacter*、*Eisenbergiella*、*Eubacterium_xylanophilum*、*GCA-900066575*、*Intestinimonas*、*Lachnospiraceae_FCS020*、*Lachnospiraceae_NK4A136*、*Oscillibacter*、*Peptococcus*、*Tuzzerella* 的相对丰度（$P < 0.05$ 或 0.01）；而两者联合不仅可明显改善 T2DM 小鼠粪便中上述细菌的相对丰度，还可影响 *Clostridia_vadinBB60*、*Eubacterium_siraeum*、*Harryflintia*、*Mucispirillum*、*Romboutsia* 等细菌的丰度改变，且对 *Akkermansia*、*Bilophila*、*Clostridioides*、*Colidextribacter*、*Eubacterium_siraeum*、*Gastranaerophilales*、*GCA-900066575*、*Intestinimonas*、*Lachnospiraceae_FCS020*、*Lachnospiraceae_NK4A136*、*Parvibacter*、*Peptococcus*、*Romboutsia*、*Tuzzerella* 的改善作用明显好于单用 MET 或 MLE（$P < 0.05$ 或 0.01）。

3.3.4　相关性分析　为了确定肠道微生物群的改变与宿主表型之间是否存在潜在关联，本研究采用 Spearman 相关性分析探究属水平的差异细菌与生化参数之间的相关性，结果如图 5 所示。*Acetatifactor*、*Anaerovorax*、*Bilophila*、*Clostridia_vadinBB60*、*Clostridium_methylpentosum*、*Clostridioides*、*Colidextribacter*、*Gastranaerophilales*、*GCA-900066575*、*Harryflintia*、*Intestinimonas*、*Oscillibacter*、*Peptococcus* 与 FBG 显著正相关；*Romboutsia* 与 C- 肽显著正相关；*Clostridia_vadinBB60*、*Gastranaerophilales*、*Romboutsia* 与 TC 显著正相关；*Colidextribacter*、*GCA-900066575*、*Harryflintia*、*Intestinimonas*、*Oscillibacter* 与 TG 显著正相关；*Clostridioides*、*Mucispirillum*、*Romboutsia* 与 LDL-C 显著正相关，而 *Parvibacter* 与 LDL-C 显著负相关；*Anaerovorax*、*Clostridium_methylpentosum*、*GCA-900066575*、*Harryflintia*、*Intestinimonas*、*Oscillibacter*、*Peptococcus* 与 HDL-C 显

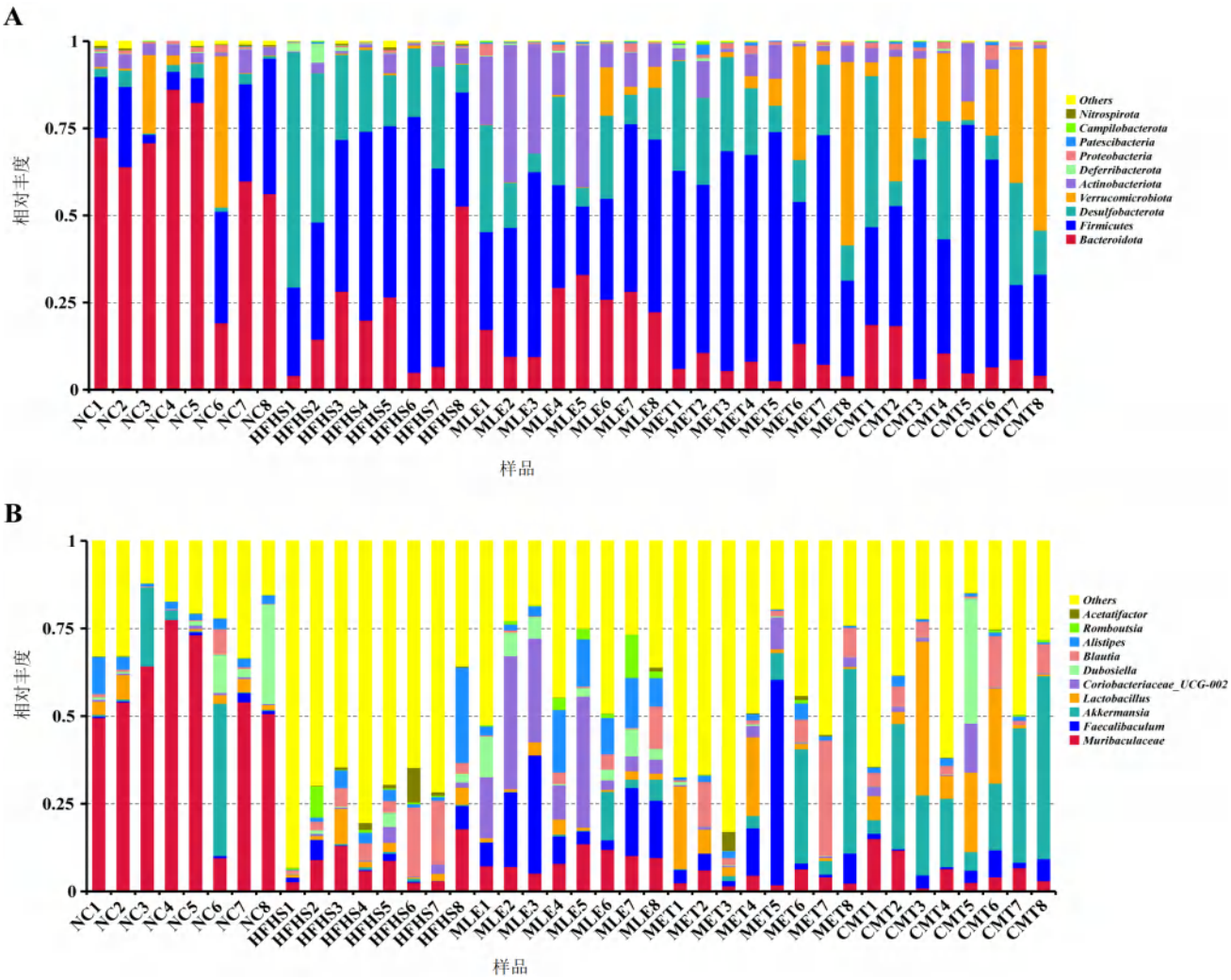


图 3　各组小鼠肠道微生物物种分布图

Fig 3　Microbial species distribution of mouse gut microbiota

A. 排名前 10 位肠道微生物在门水平上的物种组成分析（relative contribution of the top 10 gut microbiota at the phylum level）；B. 排名前 10 位肠道微生物在属水平上的物种组成分析（relative contribution of the top 10 gut microbiota at the genus level）

著正相关；*Clostridium_methylpentosum* 与体重显著负相关；*Acetatifactor*、*Bilophila*、*Colidextribacter*、*Gastranaerophilales*、*Intestinimonas*、*Oscillibacter* 与 IL-1*β* 正相关；*Clostridium_methylpentosum*、*Eubacterium_xylanophilum*、*GCA-900066575*、*Intestinimonas* 与 IL-6 正相关；*Colidextribacter*、*Lachnospiraceae_NK4A136*、*Oscillibacter* 与 IL-10 正相关；*Anaerovorax*、*Clostridium_methylpentosum*、*Colidextribacter*、*Eubacterium_xylanophilum*、*GCA-900066575*、*Intestinimonas*、*Oscillibacter* 与 TNF-*α* 正相关。

4　讨论与结论

T2DM 已成为危害人类健康的重要社会问题，作为一线基础降糖药使用的 MET，其对 T2DM 所伴随的慢性炎症、血脂代谢紊乱、肝功能损伤及其他并发病的防治作用尚未得到有效临床验证 [4]，而桑叶含有生物碱、黄酮及酚酸类等成分 [5-6]，对 T2DM 的血糖、血脂、氧化应激、炎症等方面发挥多环节的调节作用 [1-3，7]。据此，本研究从药效互补或协同角度，对 MLE 和 MET 的联合治疗作用进行了评价，并从肠道微生物角度探讨其潜在机制。

T2DM 的典型病理特征包括血糖升高、胰岛 *β* 细胞功能受损、胰岛素抵抗、免疫功能低下等。持续高水平血糖可促进葡萄糖向脂肪转化，进而引起脂质代谢紊乱及血清 TG、TC、LDL-C 水平的升高及 HDL-C 水平的降低，而高脂饮食诱发的肥胖或超重又可引发慢性低度炎症，进而导致胰岛素抵抗或 T2DM。本研究发现 MLE 单用可降低 T2DM 小鼠血清中 FBG、INS、C- 肽、TG、TC、LDL-C 的水平，改善 T2DM 小鼠的胰岛素抵抗及对葡萄糖及胰岛素的耐受能力，但对 T2DM 小鼠的体重、脏器指数及 HDL-C 血清水平无明显影响；单用 MET

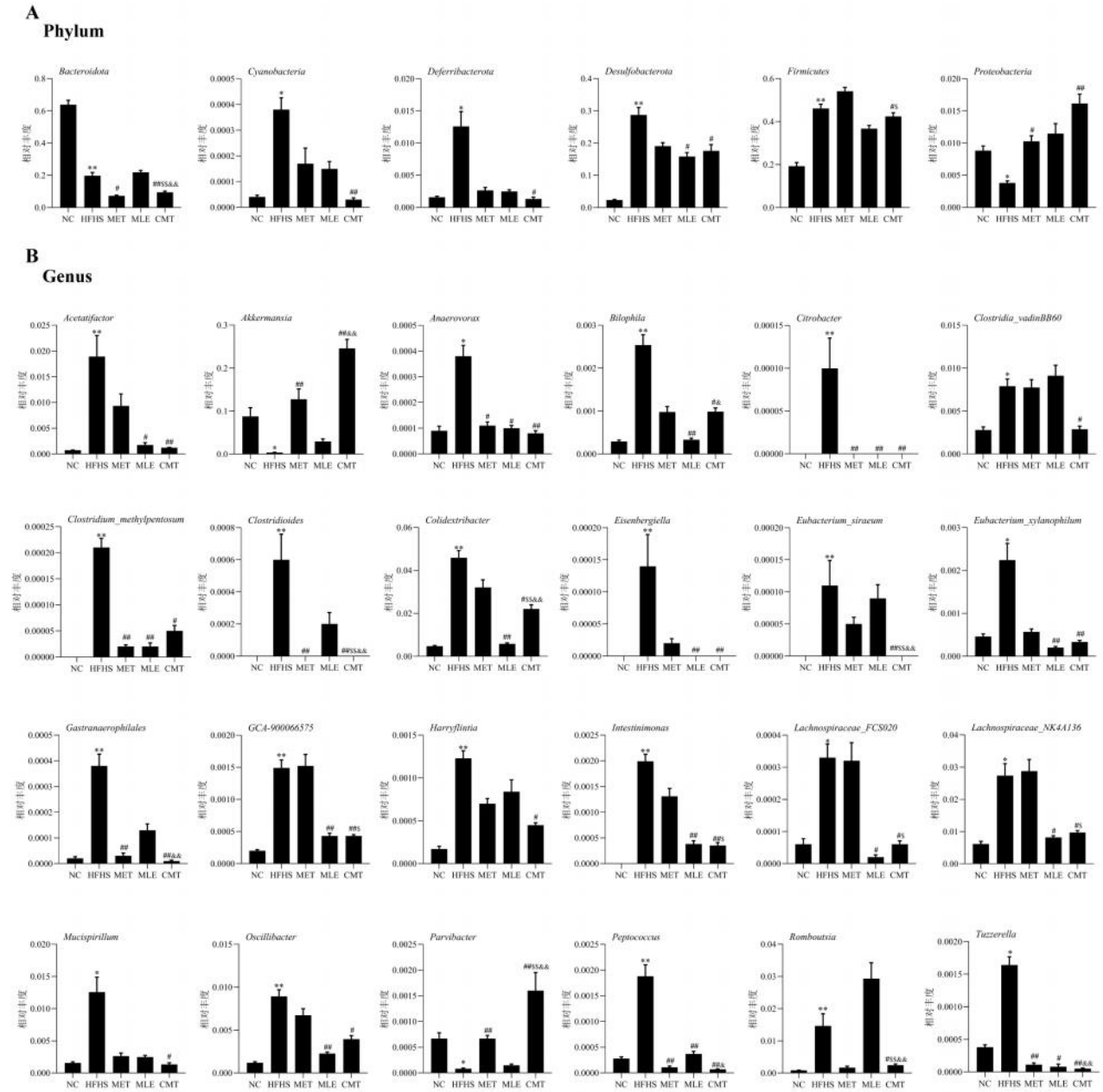


图 4　小鼠肠道中门水平（A）及属水平（B）上的差异微生物

Fig 4　Differential microbiota at the phylum（A）and genus（B）level in the gut of mice

注：与 NC 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 HFHS 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与 MET 组相比，$^{\$}P < 0.05$，$^{\$\$}P < 0.01$；与 MLE 组相比，$^{\&}P < 0.05$，$^{\&\&}P < 0.01$。

Note：*vs* the NC group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the HFHS group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；*vs* the MET group，$^{\$}P < 0.05$，$^{\$\$}P < 0.01$；*vs* the MLE group，$^{\&}P < 0.05$，$^{\&\&}P < 0.01$.

仅可改善 T2DM 小鼠血清中 FBG、INS、C-肽、LDL-C 的水平及胰岛素抵抗；两者合用不仅呈现出 MLE 及 MET 之间的互补效果，改善 T2DM 小鼠的上述指标，还可改善两者单用均不能影响的 T2DM 小鼠的肝脏指数。炎症可引发胰岛素抵抗，并推动 T2DM 的发生发展，而高脂饮食所致脂肪堆积可提升促炎因子的水平，诱发炎症及肝功能受损。LPS 为革兰氏阴性菌的细胞壁降解产物，可激活 Toll 样受体 4（TLR4）-髓样分化因子（MyD88）-核因子 κB（NF-κB）或者 TLR4-MyD88-c-Jun 氨基末端激酶（JNK）信号通路，导致 TNF-α、IL-1β、IL-6 释放增加。本研究发现，MLE 单用可明显降低 T2DM 小鼠血清 LPS、AST、ALT 水平及肝脏中 TNF-α、IL-1β 的表达，但对 IL-6 及 IL-10 的表达无影响；MET 单用仅可降低 T2DM 小鼠血清 LPS 水平及肝脏 TNF-α 及 IL-1β 的表达；而两者联用，不

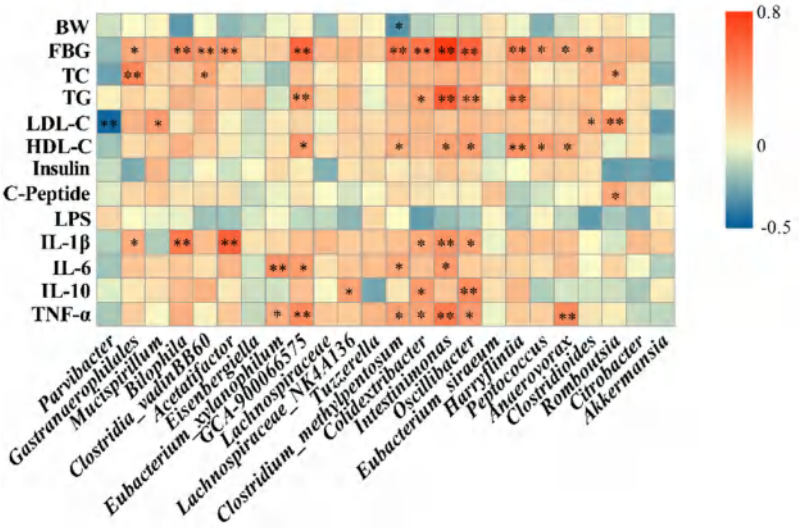


图 5　属水平上的差异微生物与生化指标之间 Spearman 相关性分析热图

Fig 5　Heatmap of Spearman correlation analysis between differential gut microbiota at genera level and biochemical indexes

注：红色方框代表正相关，绿色方框代表负相关；$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，表示相关性具有统计学意义。

Note：Red cells represent positive correlation and blue cells represent negative correlation，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，represents significant value of Spearman correlation coefficient.

仅呈现出了 MLE 与 MET 之间的互补作用，且可改善两者均不能影响的 IL-6 的表达。上述结果提示，MLE 与 MET 之间存在一定程度的互补和协同作用，可全面改善 T2DM 小鼠的炎症、肝脏损伤、糖脂代谢异常。

越来越多的证据表明，肠道菌群失调所致细菌毒素、短链脂肪酸、胆汁酸、内源性大麻素类似物、碳水化合物、氨基酸等代谢产物水平变化与肥胖及 T2DM 的炎症、胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱等密切相关[8]。肥胖及 T2DM 宿主的粪便中，通常呈现较高丰度的 *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Cyanobacteria* 及较低丰度的 *Bacteroidetes*，而 MET 或桑叶干预可逆转上述细菌的丰度[9-10]；本研究同样发现 T2DM 小鼠粪便中 *Firmicutes*、*Cyanobacteria* 的丰度显著增加，而 *Bacteroidetes* 的丰度显著降低；但本研究还发现，T2DM 小鼠粪便中 *Proteobacteria* 的丰度显著降低，MET 可进一步降低 T2DM 小鼠粪便中 *Bacteroidetes* 丰度的、增加 *Proteobacteria* 的丰度，MLE 并不能显著改善上述细菌门的丰度，推测可能与模型、MLE 及 MET 用量不同有关；而 MLE 及 MET 的联合使用可明显对抗 T2DM 小鼠粪便中 *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Cyanobacteria* 的丰度增加及 *Bacteroidetes* 的丰度降低。另外，本研究尚发现，T2DM 小鼠粪便中 *Deferribacterota* 及 *Desulfobacterota* 的丰度显著增加，而 MLE 仅可降低 *Desulfobacterota* 的丰度，与 MET 联合则可同时逆转这两个细菌门的丰度增加。

从属水平看，既往研究表明，*Acetatifactor* 及 *Bilophila* 与胆汁酸代谢异常密切相关，而 *Mucispirillum* 与炎症密切相关，在肥胖或 T2DM 宿主粪便中呈现较高水平[11]；*Parvibacter* 与血清 LDL-C 水平成负相关，*Akkermansia* 与肠道通透性成负相关，均为有益菌，在肥胖宿主粪便中呈现较低丰度[12]；另外，*Anaerovorax*、*Citrobacter*、*Colidextribacter*、*Clostridioides*、*Eisenbergiella*、*Eubacterium_siraeum*、*Gastranaerophilales*、*Intestinimonas*、*Lachnospiraceae_NK4A136*、*Oscillibacter*、*Peptococcus* 及 *Tuzzerella*[4，10，13-18] 在肥胖或 T2DM 宿主肠道中均呈现较高丰度，与本研究结果相同。然而，既往研究表明 *Clostridia_vadinBB60* 与 FBG 显著负相关，*Clostridium_methylpentosum* 及 *Eubacterium_xylanophilum* 为产短链脂肪酸菌，*Romboutsia* 及 *Lachnospiraceae_FCS020* 为有益菌，在肥胖或 T2DM 宿主体内均呈现较低丰度[19]，而本研究的结果正好相反，推测这种矛盾的结果可能与模型动物、饮食不同有关。此外，本研究还发现 *GCA-900066575* 及 *Harryflintia* 在 T2DM 小鼠粪便中呈现较高的丰度。药物干预改变疾病状态下细菌丰度，是其发挥作用的潜在机制之一。与以前研究一致的是[1，10，12]，本研究同样发现 MET 可明显改善 T2DM 小鼠粪便中 *Gastranaerophilales*、*Peptococcus*、*Akkermansia* 的丰度，而 MLE 可明显改善 *Oscillibacter* 的丰度。本研究还发现，MET 可明显改善 T2DM 小鼠粪便中 *Anaerovorax*、*Citrobacter*、*Clostridium_methylpentosum*、*Clostridioides*、

Parvibacter 及 *Tuzzerella* 的丰度；MLE 可明显改善 T2DM 小鼠粪便中 *Acetatifactor*、*Anaerovorax*、*Bilophila*、*Citrobacter*、*Clostridium_methylpentosum*、*Colidextribacter*、*Eisenbergiella*、*Eubacterium_xylanophilum*、*GCA-900066575*、*Intestinimonas*、*Lachnospiraceae_FCS020*、*Lachnospiraceae_NK4A136*、*Peptococcus* 及 *Tuzzerella* 的丰度；而两者联合不仅可明显改善 T2DM 小鼠粪便中上述所有菌属的丰度，且可明显改善两者均不能影响的 *Clostridia_vadinBB60*、*Eubacterium_siraeum*、*Harryflintia*、*Mucispirillum* 及 *Romboutsia* 等细菌的丰度。

综上所述，本研究发现 MLE 联合 MET 可明显改善 T2DM 小鼠体内的炎症及糖脂代谢紊乱，这种改善作用与其调控肠道菌群失调密切相关，且 MLE 与 MET 之间呈现一定程度上的互补及协同作用。

参考文献

[1] Du Y，Li DX，Lu DY，et al. *Morus alba* L. water extract changes gut microbiota and fecal metabolome in mice induced by high-fat and high-sucrose diet plus low-dose streptozotocin [J]. Phytother Res，2022，36（3）：1241-1257.

[2] Ji S，Zhu CC，Gao SK，et al. *Morus alba* leaves ethanol extract protects pancreatic islet cells against dysfunction and death by inducing autophagy in type 2 diabetes [J]. Phytomedicine，2021，83：153478.

[3] 赵燕琳，许冰菊，陆东裕，等 . 桑叶水提物对 2 型糖尿病小鼠花生四烯酸代谢通路的影响 [J]. 药学学报，2021，56（10）：2809-2816.

[4] 谢秀英，雷涛，沙雯君，等 . 桑叶代茶饮联合二甲双胍对肺热津伤证 2 型糖尿病患者的临床疗效 [J]. 中成药，2020，42（10）：2627-2631.

[5] Yang G，Wei JL，Liu PY，et al. Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases [J]. Metabolism，2021，117：154712.

[6] 李鑫，曾光尧，谭健兵，等 . 桑叶降糖有效部位活性成分研究 [J]. 中南药学，2012，10（4）：245-248.

[7] 杨永玉，曾光尧，谭健兵，等 . 桑叶化学成分研究 [J]. 中南药学，2011，9（2）：92-95.

[8] 陈滔彬，姚宏亮，严曾豪，等 . 肠道微生态对疾病的影响及其与中药的相互作用研究进展 [J]. 中南药学，2018，16（3）：382-388.

[9] Ji SQ，Wang LW，Li L. Effect of metformin on short-term high-fat diet-induced weight gain and anxiety-like behavior and the gut microbiota [J]. Front Endocrinol，2019，10：704.

[10] Sheng Y，Liu JY，Zheng SJ，et al. Mulberry leaves ameliorate obesity through enhancing brown adipose tissue activity and modulating gut microbiota [J]. Food Funct，2019，10（8）：4771-4781.

[11] Li K，Zhang L，Xue J，et al. Dietary inulin alleviates diverse stages of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in db/db mice [J]. Food Funct，2019，10（4）：1915-1927.

[12] Shin NR，Lee JC，Lee HY，et al. An increase in the *Akkermansia spp*. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice [J]. Gut，2014，63（5）：727-735.

[13] Thaiss CA，Levy M，Grosheva I，et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection [J]. Science，2018，359（6382）：1376-1383.

[14] Shilo S，Godneva A，Rachmiel M，et al. The gut microbiome of adults with type 1 diabetes and its association with the host glycemic control [J]. Diabetes Care，2022，45（3）：555-563.

[15] Gong SQ，Ye TT，Wang MX，et al. Traditional Chinese medicine formula Kang Shuai Lao Pian improves obesity，gut dysbiosis，and fecal metabolic disorders in high-fat diet-fed mice [J]. Front Pharmacol，2020，11：297.

[16] Wang P，Gao JP，Ke WX，et al. Resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed mice via modulating the composition and metabolic function of the gut microbiota [J]. Free Radic Biol Med，2020，156：83-98.

[17] Zhang C，Ma SS，Wu JH，et al. A specific gut microbiota and metabolomic profiles shifts related to antidiabetic action：The similar and complementary antidiabetic properties of type 3 resistant starch from *Canna edulis* and metformin [J]. Pharmacol Res，2020，159：104985.

[18] Yue SJ，Zhao D，Peng CX，et al. Effects of theabrownin on serum metabolites and gut microbiome in rats with a high-sugar diet [J]. Food Funct，2019，10（11）：7063-7080.

[19] Yao Y，Yan LJ，Chen H，et al. *Cyclocarya paliurus* polysaccharides alleviate type 2 diabetic symptoms by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids [J]. Phytomedicine，2020，77：153268.

（收稿日期：2023-06-02；修回日期：2023-08-10）

基于理化性质和抗胃溃疡作用优化煅牡蛎的炮制工艺

张凤婷[1]，钤莉妍[2]，包丽媛[1]，齐晓丹[2]，米硕[1]，李文汇[1]，赵颖[1]，贺文慧[2]，王颖莉[3]，谢磊磊[3]，张丽丽[3]，宋亮亮[1]，杜红[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 东阿阿胶股份有限公司山东省胶类中药技术创新中心，山东　聊城　252200；3. 山西中医药大学，太原　030619）

摘要：目的　通过比较牡蛎不同炮制品的理化性质和对大鼠实验性胃溃疡的治疗作用，优化煅牡蛎的炮制工艺。**方法**　将牡蛎分别在 100、200、300、400、500、600、700、800、900 ℃下煅制 1、2、3、4 h 得到不同炮制品，对各炮制品的红外光谱、X 射线衍射图谱、硬度、钙离子溶出度和水煎液 pH 值等理化性质进行考察，初步筛选具有特征性变化的煅制条件；通过大鼠抗实验性胃溃疡药效实验，根据溃疡指数、溃疡抑制率筛选出药效最佳的炮制品并结合血清生化指标对其发挥治疗作用的机制进行初步研究，综合分析，筛选出最优的炮制工艺。**结果**　红外光谱和 X 射线衍射图谱显示牡蛎在 500 ℃以下煅制时随着温度升高逐渐失去部分有机质，600 ℃煅制 4 h、700 ℃煅制 3 h、800 ℃煅制 2 h、900 ℃煅制 1 h 的煅牡蛎中碳酸钙已经开始分解，而 800 ℃煅制 3 h、900 ℃煅制 2 h 时的煅牡蛎中碳酸钙已分解完全。随着煅制温度的升高，硬度逐渐变小，水煎液 pH 值明显变大，水煎液钙离子溶出明显增多。基于上述理化性质结果进行聚类分析，结果显示煅制样品可明显分为三类。抗胃溃疡实验结果表明牡蛎煅品均具有抑制溃疡作用，但效果以 600 ℃煅品和 900 ℃煅品最佳，600 ℃煅品可提高胃溃疡大鼠胃组织 NO、PGE2 水平，900 ℃煅品可中和胃酸。**结论**　根据理化性质和抗实验性胃溃疡作用，煅牡蛎的最佳炮制工艺为 600 ℃煅 4 h。

关键词：煅牡蛎；炮制工艺；理化性质；抗胃溃疡
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2570-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.004

Optimization of the concoction of calcined oyster based on its physicochemical properties and anti-gastric ulcer effect

ZHANG Feng-ting[1], QIAN Li-yan[2], BAO Li-yuan[1], QI Xiao-dan[2], MI Shuo[1], LI Wen-hui[1], ZHAO Ying[1], HE Wen-hui[2], WANG Ying-li[3], XIE Lei-lei[3], ZHANG Li-li[3], SONG Liang-liang[1], DU Hong[1*] (1. *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing*　102488; 2. *Shandong Technology Innovation Center of Gelatin-Based Traditional Chinese Medicine*, *Liaocheng*　*Shandong*　252200; 3. *Shanxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Taiyuan*　030619)

Abstract: Objective　To optimize the preparation of calcined oyster by comparing the physicochemical properties and the therapeutic effects of different concoctions of oyster on gastric ulcer experiment in rats. **Methods**　Different concoctions were calcined at 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 and 900 ℃ for 1, 2, 3 and 4 h. The physicochemical properties of each concoction, such as infrared spectra, X-ray diffraction patterns, hardness, Ca^{2+} solubility, and pH value of the aqueous decoction were determined. The calcined oyster samples prepared under the screening conditions were tested for their efficacy against gastric ulcer experiment in rats. We comprehensively to screened out the optimal concoction process. According to ulcer index, ulcer suppression rate, the best efficacy was screened and the mechanism of their therapeutic effect was preliminarily studied by combining serum

基金项目：聊城市重点研发计划项目（No.2021ZD07）。
作者简介：张凤婷，女，硕士研究生，主要从事中药炮制机制研究，email：18801379775@163.com　*通信作者：杜红，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药炮制研究，email：duhong@vip.163.com

biochemical indexes. **Results** Infrared spectra and X-ray diffraction patterns showed that oysters gradually lost some of their organic matter with increasing temperature when calcined below 500 ℃. Calcium carbonate in oysters calcined at 600 ℃ for 4 h, 700 ℃ for 3 h, 800 ℃ for 2 h and 900 ℃ for 1 h started to decompose, while calcium carbonate in oysters calcined at 800 ℃ for 3 h and 900 ℃ for 2 h had completely decomposed. As the calcination temperature increased, the hardness gradually decreased, the pH value of the aqueous decoction became higher, the calcium ions dissolved in the aqueous decoction increased. Based on the above physical and chemical properties for clustering analysis, the calcined samples were classified into 3 categories. An oyster calcined products had ulcer-inhibiting effects, with the best effect at 600 ℃ and 900 ℃. Calcined products at 600 ℃ increased NO and PGE2 levels in the gastric tissues in rats with gastric ulcer, and calcined products at 900 ℃ neutralized the gastric acid. **Conclusion** According to the physicochemical properties and anti-experimental gastric ulcer effect, the best preparation of oyster is 600 ℃ calcination for 4 h.

Key words: calcined oyster; concoction process; physicochemical property; anti-gastric ulcer

牡蛎是牡蛎科动物长牡蛎 *Ostrea gigas* Thunberg、大连湾牡蛎 *Ostrea talienwhanensis* Crosse 或近江牡蛎 *Ostrea rivularis* Gould 的贝壳[1]。生品具有重镇安神、平肝潜阳的功效，其质地坚硬，临床常使用其煅制品。煅品具有收敛固涩、制酸止痛的功效，临床常用于胃溃疡的治疗。

关于煅牡蛎的炮制工艺，《中国药典》2020 年版中要求“煅至红透，质地酥脆时取出”，未明确煅制温度与时间要求。以研究的温度范围一般是片段式，并不全面，且多以表观性状、孔道大小，结合钙离子溶出作为主要考察因素[2-5]。然而，牡蛎生、煅品作用不同，碳酸钙作为牡蛎的主要成分，仅以其含量的高低难以解释生熟异用的特点。因此，本研究系统考察 100 ～ 900 ℃煅制 1 ～ 4 h 的煅制品的理化性质，结合反映煅牡蛎制酸止痛作用的药理学指标，综合对其炮制工艺进行优选。

1　材料

1.1　试药与仪器

牡蛎购自安徽亳州药材市场，经北京中医药大学中药鉴定系王晶娟教授鉴定为牡蛎科大连湾牡蛎的贝壳。饮片经检查符合《中国药典》2020 年版要求。溴化钾（批号：20210427，天津福晨化学厂），碳酸钙（批号：20171226，北京化工厂），氧化钙（批号：20220418，天津福晨化学厂），硫糖铝咀嚼片（批号：210103，上海华源安徽仁济堂制药有限公司）。一氧化氮检测试剂盒（BN27106，北京百瑞极生物科技有限公司），超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）测定试剂盒（批号分别为 20221011、20221008，南京建成），PGE2、IL-4、TNF-*α* ELISA 测定试剂盒（批号分别为 202203、202202、202202，科特生物）。

SX2-2.5-10A 箱式电阻炉（绍兴市上虞道墟科析仪器厂），PerkinElmer Spectrum One 傅里叶变换红外光谱仪（德国 Bruker），TMS-Touch 物性分析仪（北京盈盛恒泰科技有限责任公司），X 射线衍射仪（粉末 D/max 2500 型，日本理学公司），ASAP 2460 Version 2.01 比表面积和孔径分析仪（Micromeritics）。

1.2　动物

SPF 级雄性 SD 大鼠（180 ～ 220 g）[斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证编号 SCXK（京）2019-0010]。给予普通维持饲料和自由饮水，维持室温 20 ～ 25 ℃，相对湿度 60% ～ 70%，灯照周期 12 h。动物伦理委员会批件号：BUCM-4-2023022104-1020。

2　方法和结果

2.1　煅牡蛎样品制备

称取 100 g 净制后的牡蛎，置于马弗炉中，分别设定温度为 100、200、300、400、500、600、700、800、900 ℃，各煅制 1、2、3、4 h，得到不同条件下煅牡蛎样品 36 份。粉碎过 100 目筛备用。

2.2　理化性质测定

2.2.1　红外分析　取“2.1”项下样品粉末，采用溴化钾压片法压制成透明薄片进行检测[6]。检测条件为 DTGS 检测器，4 cm^{-1} 分辨率，扫描光谱范围 4000 ～ 400 cm^{-1}，16 次扫描累加。所得光谱数据运用 OMNIC 进行基线校正、自动平滑等优化处理。结果如图 1 所示。

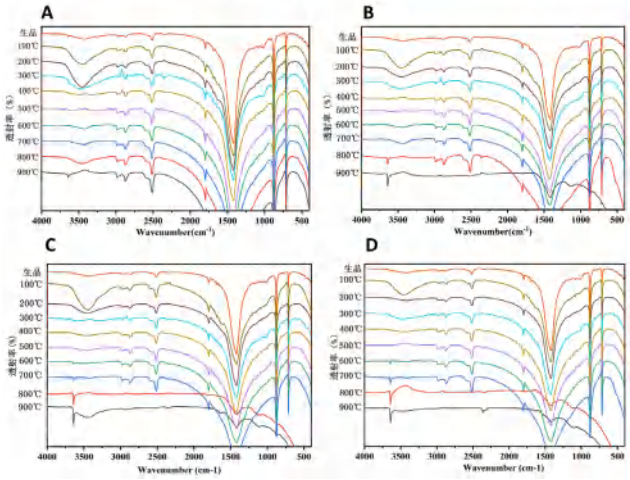


图 1　牡蛎及不同煅制品红外光谱

Fig 1　Infrared spectra of oysters and different calcined products

A ～ D. 分别为 1、2、3、4 h 煅制品（1，2，3，4 h calcined product）

3530 cm^{-1} 左右是 O-H/N-H 的吸收峰，属于有机基团 [7]；3000 ～ 2800 cm^{-1} 附近是有机质 C-H 伸缩振动的吸收峰，2520 cm^{-1} 附近也属于有机质，1760 cm^{-1}、1500 cm^{-1}、1000 ～ 600 cm^{-1} 为 CO_3^{2-} 的特征吸收峰；3640 cm^{-1} 附近小吸收峰是氧化钙吸收水生成 Ca（OH）$_2$ 形成的 [8]；2330 cm^{-1} 附近是由于高温分解生成的 CO_2 吸附于多孔的氧化钙中所致 [9]。

结果显示，600 ℃ 煅 4 h、700 ℃ 煅 3 h、800 ℃煅 2 h、900 ℃煅 1 h 的煅牡蛎中碳酸钙已开始部分分解，成分中既有碳酸钙也有氧化钙。800 ℃煅 3 h、900 ℃煅 2 h 的煅牡蛎中碳酸钙已全部分解，成分组成只有氧化钙。这表明，在 600 ～ 900 ℃煅制时，煅制温度和煅制时间对煅牡蛎中碳酸钙的分解的影响具有一定的交互作用。

2.2.2　X 射线衍射（XRD）分析　利用 XRD 分析煅制过程中物相的变化和可能出现的新物相 [10]。仪器的检测条件为：Cu Kα 射线，石墨单色器，管压 36 kV，管电流 30 mA，扫描速率 8°•min^{-1}，步长 0.01°，扫描范围 15° ～ 70°。利用 JADE6.0 对 XRD 图谱进行寻峰处理。结果如图 2 所示。

生牡蛎在 2θ 为 23.05、29.40、31.43、35.97、39.41、43.16、47.11、48.50、57.39 等处有衍射峰，符合碳酸钙的标准 PDF 卡片（PDF 47-1743）；低温煅制牡蛎的衍射图谱并没有明显的变化，直至 700 ℃煅 3 h，800 ℃煅 2 h 时样品衍射图谱中出现了符合氧化钙的标准卡片（PDF 48-1476）的峰，分别在 2θ 为 32.14、35.99（700 ℃ 煅 3 h）；32.14、35.82、53.75（800 ℃煅 2 h）处，这表明牡蛎在 700 ℃下煅制 3 h 或在 800 ℃下煅制 2 h 即有部分碳酸钙开始分解。800 ℃煅 3 h 以上煅品

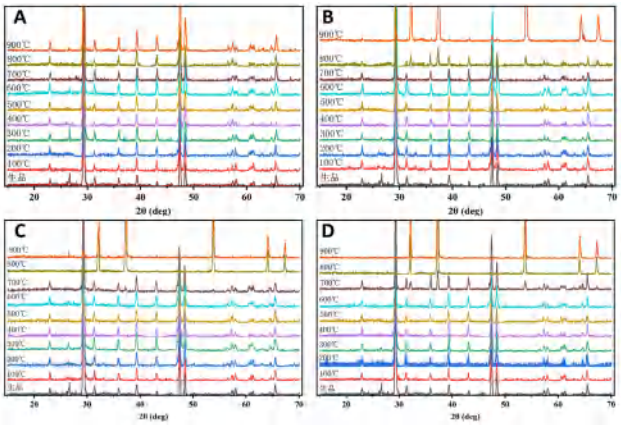


图 2　牡蛎及不同煅制品 X 射线衍射图谱

Fig 2　XRD patterns of oysters and different calcined products

A ～ D. 分别为 1、2、3、4 h 煅制品（1，2，3，4 h calcined product）

和 900 ℃煅 2 h 以上煅品的衍射图谱与氧化钙特征衍射峰基本重合，无碳酸钙相关衍射峰，表明在 800 ℃下煅制 3 h 以上或在 900 ℃下煅制 2 h 以上时样品中碳酸钙已完全分解。当煅制温度＞600 ℃时，煅制温度和煅制时间对牡蛎碳酸钙的分解具有交互影响。

2.2.3　质构分析　利用 TMS-Touch 物性分析仪对牡蛎及不同条件煅制品的硬度进行测定。软件（Texture Lab Pro）设置参数为（量程 800 N 或 40 N，测试速度为 30 mm•min^{-1}，形变量 100%），选择 TMS 2 mm Steel 针型检测探头进行测量。结果如图 3 所示，硬度主要受煅制温度的影响，煅制时间的影响不大。当煅制温度高于 300 ℃时，样品硬度明显变小。随着煅制温度的升高，煅品硬度逐渐变小，酥脆程度明显增加。

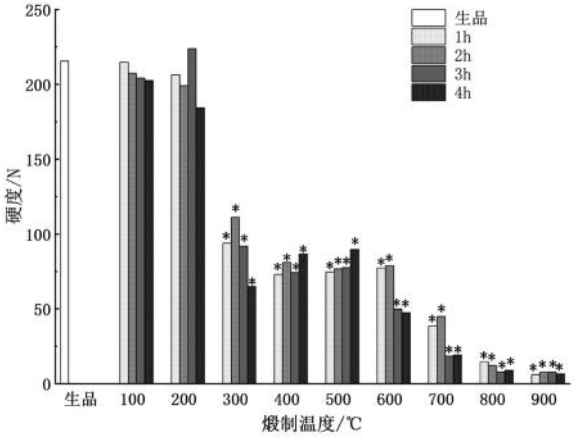


图 3　牡蛎及不同煅制品硬度（$^*P < 0.05$）

Fig 3　Hardness of oysters and different calcined products（$^*P < 0.05$）

2.2.4　水煎液 pH 值及钙离子含量测定　精密称取 2 g 样品粉末，分别加入 10 倍和 8 倍量的水先后煎煮 60 min，得到水煎液，使用 pH 计对水煎液 pH 值进行测定。采用《中国药典》2020 年

版[1]中牡蛎含量测定方法对水煎液中钙离子含量进行测定。结果如图 4 所示，与生品相比，400 ℃ 2 ～ 4 h 煅品以及 500 ～ 900 ℃煅品水煎液 pH 值显著升高。

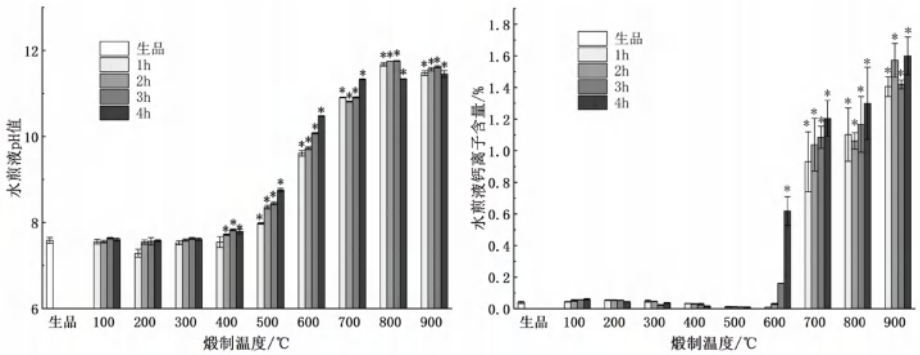


图 4　牡蛎及不同煅制品水煎液的 pH 值（A）和钙离子含量（B）（$^{*}P < 0.05$）

Fig 4　pH of decoction（A）and calcium ion content（B）of oysters and different calcined products（$^{*}P < 0.05$）

2.2.5　聚类分析　对牡蛎及不同条件煅牡蛎的硬度、水煎液 pH 值、水煎液钙离子含量等理化性质结果进行系统聚类分析。结果如图 5 所示，样品可分为三类，分别为第一类（生品、100 ℃煅品和 200 ℃煅品），第二类（300 ℃煅品、400 ℃煅品、500 ℃煅品以及 600 ℃ 1 h/2 h/3 h 煅品）和第三类（600 ℃ 4 h 煅品、700 ℃煅品、800 ℃煅品、900 ℃煅品）。

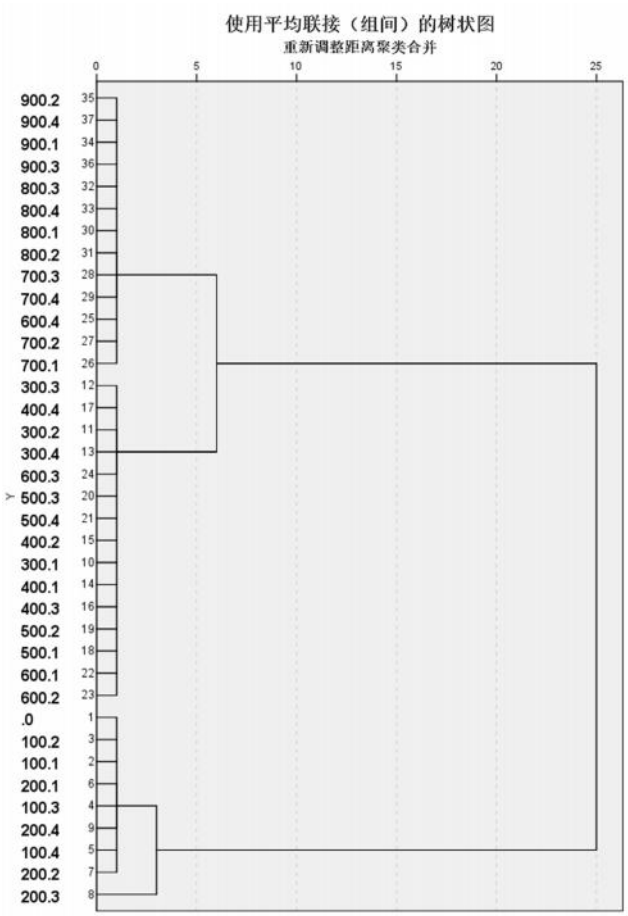


图 5　系统聚类分析树状图

Fig 5　Systematic cluster analysis tree diagram

综合上述实验结果选取 100 ℃、400 ℃、600 ℃以及 900 ℃下各煅制 4 h 样品进行大鼠抗实验性胃溃疡作用研究。

2.3　抗大鼠实验性胃溃疡作用研究

2.3.1　动物分组、给药与造模　将动物分为模型组、正常组、阳性药（硫糖铝）组、生品低剂量组、生品高剂量组、100 ℃煅品低剂量组、100 ℃煅品高剂量组、400 ℃煅品低剂量组、400 ℃煅品高剂量组、600 ℃煅品低剂量组、600 ℃煅品高剂量组、900 ℃煅品低剂量组、900 ℃煅品高剂量组、碳酸钙低剂量组、碳酸钙高剂量组、氧化钙低剂量组、氧化钙高剂量组。

分别取一定量 100 ℃ 4 h 煅品、400 ℃ 4 h 煅品、600 ℃ 4 h 煅品、900 ℃ 4 h 煅品样品粉末、碳酸钙对照品、氧化钙对照品，各加入 10 倍量纯净水煎煮两次，过滤浓缩得到低剂量（0.14 g • mL^{-1}）和高剂量（0.28 g • mL^{-1}）药液。阳性药组将硫糖铝口嚼片研磨过 100 目筛，加适量纯净水制成 0.043 g • mL^{-1} 药液。

按照 1 mL/100 g 给药，每日一次，连续给药 6 d，末次给药前 24 h 禁食不禁水。模型组及正常组给予同等体积纯净水。除正常组外，其余各组末次给药后 1 h 灌胃 2 mL 含 60% 乙醇的 0.15 mol • L^{-1} 盐酸溶液进行造模[11]，正常组给予等量纯净水。

2.3.2　胃液 pH 值测定　造膜 1 h 后，腹腔注射 10% 戊巴比妥麻醉大鼠，结扎幽门与贲门后，取胃，剪一小口收集胃液，利用精密 pH 试纸（0.5 ～ 5.0）测定胃液 pH 值。结果如图 6 所示，与模型组相比，900 ℃煅品高剂量组、氧化钙高剂量组胃液 pH 值明显升高，这可能与药液 pH 值偏大有关。与正常组相比，生品低、高剂量组，

400 ℃煅品高剂量组，900 ℃煅品低、高剂量组，碳酸钙低、高剂量组，氧化钙低、高剂量组胃液 pH 值显著增大。

2.3.3　溃疡指数及溃疡抑制率测定　沿胃大弯将胃剪开，展开并平铺于桌面，利用相机进行电子成像，利用 PS 软件统计溃疡面积，按照以下公式计算溃疡指数与溃疡抑制率[12]。溃疡指数（%）＝溃疡部分面积 / 胃部总面积 ×100%；溃疡抑制率（%）＝（模型组溃疡指数－给药组溃疡指数）/ 模型组溃疡指数 ×100%。结果如图 7 所示。与模型组比较，除生品给药组外，其余各组给药后溃疡指数均显著减小，表明牡蛎煅制后均具有抗胃溃疡作用，以 600 ℃ 4 h 煅品、900 ℃ 4 h 煅品作用更好，两者作用优于碳酸钙和氧化钙。

2.3.4　形态学观察和组织病理学检查　剪取大约 0.5 mm×0.5 mm 大小胃组织，置于 10 倍量的甲醛溶液中进行固定，包埋，切片，并进行 HE 染色，在显微镜下观察组织病理变化。

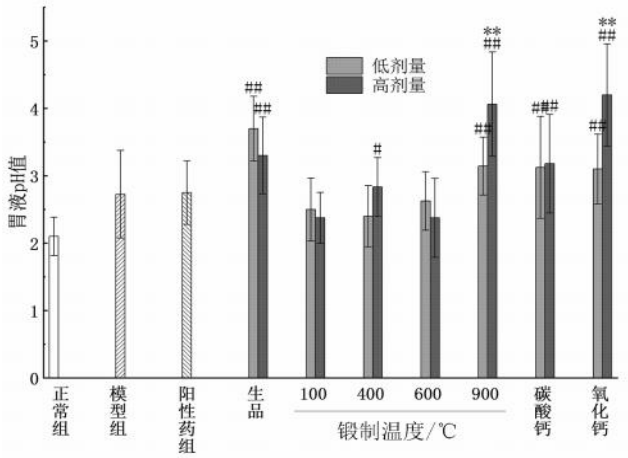


图 6　牡蛎及不同煅制品对实验性胃溃疡大鼠胃液 pH 值的影响

Fig 6　Effect of oysters and different calcined products on the pH of gastric juice of rats with experiment gastric ulcer

注：与模型组相比，$^{**}P < 0.01$；与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

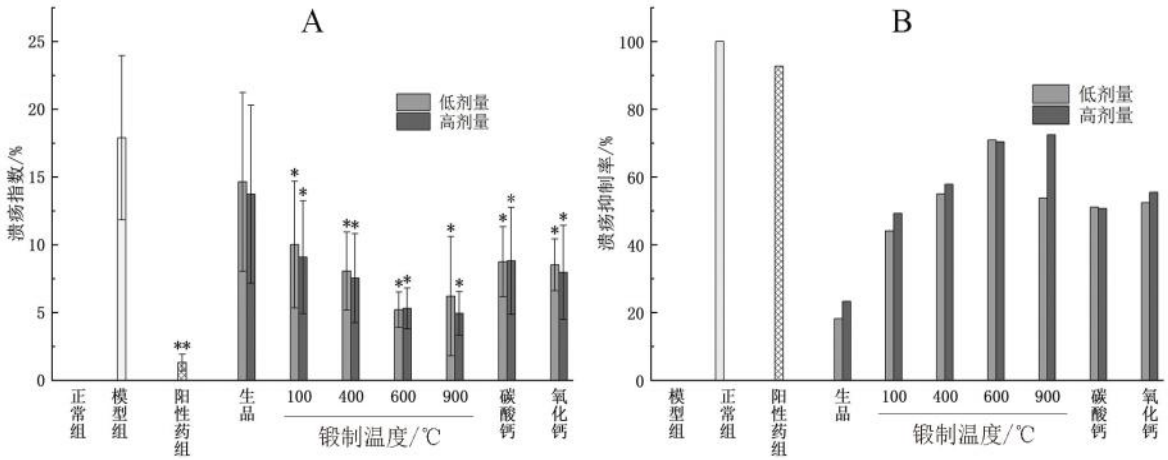


图 7　牡蛎及不同煅制品对实验性胃溃疡大鼠溃疡指数（A）与溃疡抑制率（B）的影响

Fig 7　Effect of oyster and different calcined products on ulcer index（A）and ulcer inhibition rate（B）in rats with experimental gastric ulcer

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

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

图 8 为各给药组的胃组织病理切片。正常组胃黏膜细胞形态正常，排列分布整齐致密。模型组胃黏膜细胞形态严重缺损，可见明显细胞裂隙，大范围炎细胞红细胞浸润。阳性药组胃黏膜细胞形态保持良好，排列致密，仅胃壁深处微有炎细胞浸润，无红细胞浸润。生品、100 ℃煅品、400 ℃煅品及碳酸钙组明显可见细胞肿胀失活，细胞间隙明显增大，胃黏膜破损。生品组还可见胃壁处明显炎细胞和红细胞浸润。600 ℃煅品组胃黏膜细胞微有破损但胃壁组织细胞形态良好，组织致密，无明显裂隙，微有炎细胞浸润。900 ℃煅品低高剂量组均可见细胞肿胀，偶有失活，胃黏膜轻微缺损，可见炎症细胞浸润。氧化钙低高剂量组均可见胃黏膜明显损伤，细胞肿胀，细胞间隙明显变大，炎细胞浸润。

2.3.5　大鼠胃组织生化指标测定　刮取胃黏膜组织，加入适量生理盐水制成 10% 组织匀浆。利用对应试剂盒测定胃组织中 NO、PGE2、SOD、GSH-Px、TNF-α、IL-4 水平，结果如图 9 所示。

图 9A 显示与模型组相比，阳性药组、600 ℃煅品高剂量组，碳酸钙高剂量组及氧化钙低、高剂量组的胃组织中 NO 明显增多。图 9B 显示与

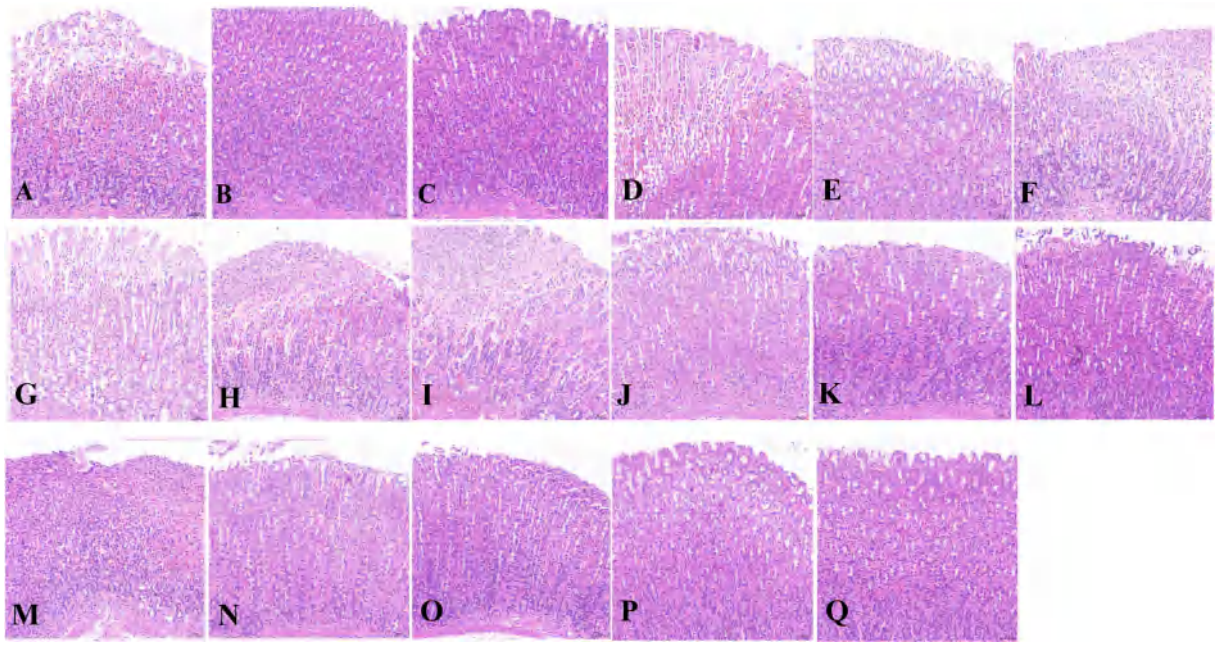


图 8　牡蛎及不同炮制品对实验性胃溃疡大鼠胃组织病理学观察（HE 染色，×20）

Fig 8　Histopatholog of oysters and different concoction products on the stomach of rats with experiment gastric ulcer（HE staining，×20）

A. 模型组（the model group）；B. 正常组（the normal group）；C. 阳性药组（the positive drug group）；D. 生品低剂量组（raw oyster low dose group）；E. 100 ℃煅品低剂量组（100 ℃ calcined oyster low dose group）；F. 400 ℃煅品低剂量组（400 ℃ calcined oyster low dose group）；G. 碳酸钙低剂量组（calcium carbonate low dose group）；H. 生品高剂量组（raw oyster high dose group）；I. 100 ℃煅品高剂量组（100 ℃ calcined oyster high dose group）；J. 400 ℃煅品高剂量组（400 ℃ calcined oyster high dose group）；K. 碳酸钙高剂量组（calcium carbonate high dose group）；L. 600 ℃煅品低剂量组（600 ℃ calcined oyster low dose group）；M. 900 ℃煅品低剂量组（900 ℃ calcined oyster low dose group）；N. 氧化钙低剂量组（calcium oxide low dose group）；O. 600 ℃煅品高剂量组（600 ℃ calcined oyster high dose group）；P. 900 ℃煅品高剂量（900 ℃ calcined oyster high dose group）；Q. 氧化钙高剂量组（calcium oxide high dose group）

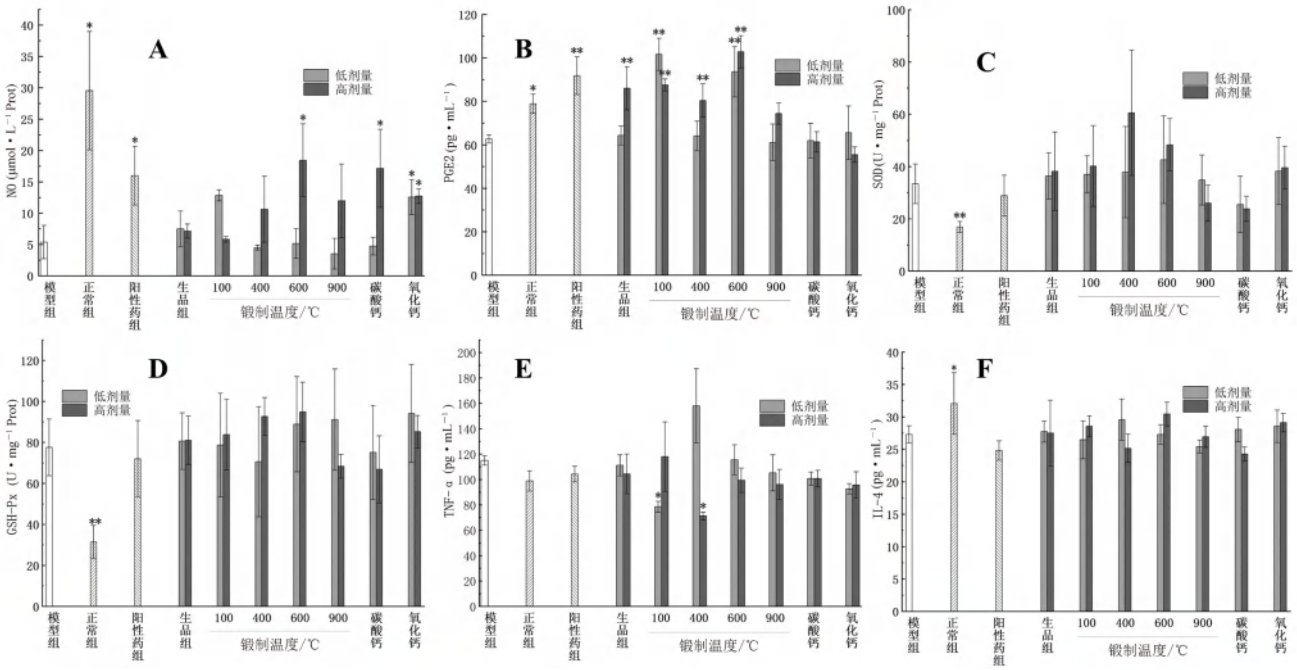


图 9　牡蛎不同煅制品对实验性胃溃疡大鼠胃组织 NO（A）、PGE2（B）、SOD（C）、GSH-Px（D）、TNF-α（E）、IL-4（F）的影响

Fig 9　Effects of different calcined products of oysters on NO（A），PGE2（B），SOD（C），GSH-Px（D），TNF-α（E）and IL-4（F）in the gastric tissues of rats with experiment gastric ulcer

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

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

模型组相比，阳性药组，生品高剂量组，100 ℃煅品低、高剂量，400 ℃煅品高剂量组，600 ℃煅品低、高剂量组的胃黏膜中 PGE2 水平明显增高。图 9C 为不同给药组胃黏膜中 SOD 活力，与模型组相比，给药组差异无统计学意义。图 9D 为不同给药组胃黏膜中 GSH-Px 活力，结果显示给药组与模型组相比，差异无统计学意义。图 9E 为不同给药组胃黏膜中 TNF-α 分泌水平，结果显示与模型组相比，100 ℃煅品低剂量组和 400 ℃煅品高剂量组明显降低。图 9F 为不同给药组胃黏膜中 IL-4 分泌水平，结果显示给药组与模型组相比，差异无统计学意义。

综上所述，生品可增加 PGE2 水平；100 ℃煅品、400 ℃煅品可增加 PGE2 水平，降低 TNF-α 水平；600 ℃煅品可增加 NO、PGE2 水平。

4　讨论

牡蛎的炮制工艺不定，市售药材饮片质量参差不齐，优化牡蛎的煅制工艺十分重要。本文通过红外光谱和 X 射线衍射图谱确定了不同条件所得牡蛎煅制品的物相组成，通过测定硬度、水煎液 pH 值、钙离子溶出度对不同条件煅制品的理化性质进行初步了解，并进行系统聚类分析将样品分为三类。传统认为，牡蛎煅制后具有制酸止痛的功效，本研究以盐酸乙醇诱导实验性胃溃疡模型来筛选牡蛎的最佳炮制工艺，结果表明牡蛎煅制后均具有抑制溃疡的作用，其中 600 ℃ 4 h 煅品和 900 ℃ 4 h 煅品作用最强。生化指标检测结果表明不同条件煅牡蛎的抗胃溃疡作用机制可能不同，100 ℃煅品、400 ℃煅品、600 ℃煅品可提高组织中 PGE2 水平，900 ℃煅品对各生化因子并无明显作用。

药效作用的不同可能与理化性质的改变有一定关系。400 ℃煅品的组成主要为碳酸钙，但其质地明显变酥脆，药液更容易进入，胃液 pH 值略高于 100 ℃煅品给药组。600 ℃煅品的组成既有碳酸钙也有氧化钙，质地更酥脆。900 ℃煅品为纯氧化钙，可明显提高胃液 pH 值起到中和胃酸减缓伤害的作用。但其属于强碱氧化物遇水反应发热对黏膜具有强烈的刺激性，临床长时间使用可能会引起患者不适。

牡蛎为生熟异用品，生品重镇安神，煅品制酸止痛。选择合理的指标对生品、煅品进行质量控制是必要的。目前多数炮制研究都是以钙离子溶出作为主要的评价指标，无法体现出生品、煅品的差异。本研究结合质构、钙离子溶出、水煎液 pH 值和抗胃溃疡作用综合分析，优化炮制工艺，结果更加全面可靠。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：180-181.
[2] 郑晓霞，何春花，周凤娇 . 牡蛎炮制工艺研究 [J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19（46）：289.
[3] 曹思玮，乡世健，吴文锋，等 . 牡蛎煅制过程中的微观结构及 $CaCO_3$ 含量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（16）：7-11.
[4] 李社花 . 煅牡蛎的加工炮炙条件 [J]. 中国中药杂志，2000，25（1）：55-56.
[5] 李铁林，江文君，麻印莲，等 . 炮制条件对煅牡蛎质量影响的研究 [J]. 中国中药杂志，1993，18（12）：723-725.
[6] 杜成智，邓家刚，侯小涛，等 . 贝壳类中药碳酸钙含量测定及红外光谱比较 [J]. 湖北农业科学，2018，57（17）：84-87.
[7] Lee SW，Kim YM，Kim RH，et al. Nano-structured biogenic calcite：a thermal and chemical approach to folia in oyster shell [J]. Micron，2008，39（4）：380-386.
[8] 林郁郁，张楚，张健，等 . CaO 伴随生物质热裂解固体产物分析 [J]. 工程热物理学报，2011，32（12）：2133-2136.
[9] 余林，徐奕德，蔡晟，等 . SrO-La_2O_3/CaO 催化剂表面的碱性和催化行为Ⅱ . CO_2 同催化剂表面相互作用的红外研究 [J]. 催化学报，1996，17（1）：23-28.
[10] 董雯雯，刘小平 . 牡蛎等中药的 X 射线衍射鉴定研究 [J]. 中国医药导报，2007，80（18）：186-187.
[11] 崔兵迪，郭辉，龚曼，等 . 基于 Akt/NF-κB 信号通路探讨牛蒡根水提物对盐酸 / 乙醇诱导的急性胃溃疡大鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（2）：1-9.
[12] 王倩倩，杜鹃，冯凤琴 . 海参肽对大鼠乙酸性胃溃疡愈合的促进作用 [J]. 中国食品学报，2022，22（8）：109-117.

（收稿日期：2023-03-23；修回日期：2023-04-30）

阿替利珠单抗修饰二氢丹参酮Ⅰ纳米粒的制备及其抗肿瘤作用研究

王雪，荆紫琪，李妍怡，李楚，闫天月，黄晓滨，张玉杰*，马鹏凯*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的　构建阿替利珠单抗修饰二氢丹参酮Ⅰ纳米粒（ATEZO DHT NP），优化其制备工艺，并进行体内外药效评价。**方法**　采用乳化溶剂扩散法制备载二氢丹参酮Ⅰ聚合物纳米粒（DHT NP），以包封率为评价指标，单因素实验联合正交设计优化制备工艺；阿替利珠单抗巯基化后与 DHT NP 表面马来酰亚胺基反应，制备 ATEZO DHT NP，BCA 法测定单抗的偶联率和载药量；粒度仪考察纳米粒粒径和电位，透射电镜观察纳米粒形貌，并考察稳定性和体外释药情况；在胃癌细胞模型上，激光共聚焦显微镜评价细胞摄取情况，MTT 法考察细胞毒性，流式细胞术考察细胞凋亡情况；在胃癌裸鼠模型上，通过肿瘤体积变化、HE 和 TUNEL 染色法评价药物抗肿瘤药效，生理生化检测和正常组织 HE 染色评价药物安全性。**结果**　ATEZO DHT NP 的最佳制备工艺为：有机相浓度为 1.5%，水相为 2% 胆酸钠溶液，有机相与水相体积比为 1∶1.8，药物与载体质量比为 1∶2；DHT NP 的二氢丹参酮Ⅰ载药量和包封率分别为 11.73% 和 54.49%；ATEZO DHT NP 的阿替利珠单抗偶联率和载药量分别为 56.93% 和 14.43%，粒径 246.9 nm，Zeta 电位－ 19.57 mV，形态近似球形，具有良好的稳定性和缓释特性。在胃癌细胞模型上，ATEZO DHT NP 有效提高原药细胞增殖抑制能力和诱导细胞凋亡能力；在胃癌裸鼠模型上，ATEZO DHT NP 诱导肿瘤细胞凋亡，显著抑制肿瘤生长，给药期间裸鼠体重无明显下降，血浆生化指标均在正常范围，主要器官形态学无变化，没有明显的毒副作用。**结论**　本研究成功构建了 ATEZO DHT NP，能有效增强二氢丹参酮Ⅰ的体内外抗肿瘤作用且安全性良好。

关键词：二氢丹参酮Ⅰ；阿替利珠单抗；纳米粒；抗肿瘤

中图分类号：R94，R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2577-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.005

Preparation and anti-tumor effect of atezolizumab modified dihydrotanshinone Ⅰ nanoparticles

WANG Xue, JING Zi-qi, LI Yan-yi, LI Chu, YAN Tian-yue, HUANG Xiao-bin, ZHANG Yu-jie*, MA Peng-kai* (*School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488)

Abstract: Objective　To construct atezolizumab modified dihydrotanshinone Ⅰ poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles (ATEZO DHT NP), optimize their preparation, and evaluate their efficacy in vivo and vitro. **Methods**　Dihydrotanshinone Ⅰ polymer nanoparticles (DHT NP) were prepared by emulsion solvent diffusion. The encapsulation rate and drug loading were used as the evaluation indexes, and the preparation was optimized by single-factor investigation combined with orthogonal design. Subsequently, the hihydrated atezolizumab reacted with the maleimide group on the DHT NP surface. Atezolizumab on the DHT NP surface was modified to

基金项目：国家自然科学基金青年基金项目（No.82104404）。

作者简介：王雪，女，硕士，主要从事中药纳米靶向制剂研究，email：wx19981020wx@126.com　*通信作者：张玉杰，女，教授，主要从事中药药动学研究，email：zhyj227@126.com；马鹏凯，男，博士，讲师，主要从事中药新剂型开发及抗肿瘤机制研究，email：mapengkai1990@126.com

prepare ATEZO DHT NP, and the atezolizumab coupling rate and loading rate were determined by BCA. The particle size and potential were determined by particle size analyzer. The morphology of nanoparticles was observed by transmission electron microscopy. The stability and drug release in vitro were determined. In the gastric cancer cell model, the cellular uptake was evaluated by laser-based confocal microscopy, cytotoxicity determinated by MTT method, and apoptosis detected by flow cytometry. In the nude mouse model of gastric cancer, the antitumor efficacy was evaluated by tumor volume change, tumor tissue HE and TUNEL staining. Physiological and biochemical tests and normal tissue HE staining was used to evaluate the safety. **Results** The optimal preparation process of ATEZO DHT NP was as follows: the organic phase concentration was 1.5%, the aqueous phase was 2% sodium cholate solution, organic phase to aqueous volume ratio at 1∶1.8, drug-carrier mass ratio at 1∶2, DHT NP drug loading was 11.73% and the encapsulation rate was 54.49%. The coupling rate and atezolizumab loading of ATEZO DHT NP were 56.93% and 14.43%, respectively. The particle size of ATEZO DHT NP was 246.9 nm, with a Zeta potential of － 19.57 mV, with an approximate spherical shape, good stability and sustained release characteristics. In the gastric cancer cell model, ATEZO DHT NP significantly improved the ability of original drug to inhibit the cell proliferation and induced cells apoptosis. In the nude mouse model of gastric cancer, ATEZO DHT NP significantly inhibited the tumor growth, causing tumor cell apoptosis. During the administration, nude mice had no significant decrease in the body weight, and the plasma biochemical indexes were in the normal range. No changes in the main organ morphology and no obvious toxic side effects were found. **Conclusion** ATEZO DHT NP is successfully constructed, which can effectively enhance the anti-tumor effect of dihydrotanshinone Ⅰ in vitro and in vivo safely.

Key words: dihydrotanshinone Ⅰ; atezolizumab; nanoparticles; antitumor

二氢丹参酮Ⅰ（dihydrotanshinone Ⅰ，DHT）是从中国传统植物丹参的根茎中提取出的一种脂溶性菲醌类成分，具有扩张冠状动脉和改善心肌缺血等作用[1]。研究表明，DHT 对卵巢癌、肝癌、胃癌等多种恶性肿瘤均具有良好的治疗作用[2-5]。尽管 DHT 具有极高的药用价值，但存在水溶性差、靶向性差、副作用大等问题，极大限制了其临床应用和新药开发。

聚合物纳米粒是以适当的载体材料与药物结合形成的具有纳米尺度的药物制剂[6-7]。纳米粒作用优势在于药物可包封于纳米粒中以提高溶解度，通过其纳米尺度特有的肿瘤增强的渗透和滞留效应（EPR 效应）选择性在肿瘤部位聚集，实现被动靶向功能[8]。并且可通过各类功能分子对聚合物材料进行修饰实现特定功能，如针对肿瘤细胞过表达的受体或抗原，通过氨基酸、糖类、多肽和抗体等对纳米粒进行修饰，利用配体 - 受体或抗原 - 抗体的特异性相互作用，进一步提高纳米粒对肿瘤细胞的主动靶向能力，增强肿瘤细胞摄取，增加胞内药物浓度以提高药效[9-10]。

近年来，以免疫检查点阻断（immune checkpoint blockade，ICB）为代表的免疫疗法逐渐成为肿瘤治疗主流[11-13]。目前以程序性死亡受体 -1（programmed death 1，PD-1）及其配体 1（programmed death 1 ligand 1，PD-L1）[14] 为靶点的免疫检查点阻断疗法最为成熟[15]。阿替利珠单抗（atezolizumab，ATEZO）是针对 PD-L1 的人源化免疫球蛋白 G1 单克隆抗体，通过作用于肿瘤细胞过表达的 PD-L1，阻止 PD-1 和 PD-L1 相互结合，激活免疫细胞杀伤肿瘤[16-19]。有研究发现，通过抗 PD-L1 单抗或多肽修饰纳米载体[20]，可以提高药物对肿瘤组织靶向性，与化疗药物产生协同治疗作用，更好地治疗肿瘤。

基于此，本研究以聚乳酸 - 羟基乙酸 - 聚乙二醇 - 马来酰亚胺（PLGA-PEG-Mal）为载体材料，制备载 DHT 纳米粒，提高 DHT 生物利用度及肿瘤组织靶向性，并在纳米粒表面修饰 ATEZO，制备主动靶向 PD-L1 的 ATEZO DHT NP，进一步提高肿瘤细胞靶向性和胞内药物浓度，提高抗肿瘤药效。

1　材料

1.1　*动物*

7 周龄 BALB/c 雄性裸鼠 36 只，体重（20±2）g

[北京维通利华生物技术有限公司，合格许可证号：SCXK（京）2021-0006]。饲养期间自由进水进食，实验流程符合实验动物管理和保护的相关规定。

1.2　试药

二氢丹参酮Ⅰ（纯度：98%，成都植标化纯生物技术有限公司，批号：210409）；甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸（mPEG-PLGA，批号：RM0212213）、PLGA-PEG-Mal（批号：RA0220627）（西安瑞禧生物科技有限公司）；阿替利珠单抗注射液（上海罗氏制药公司，批号：H0228801）；Sephadex G-50 medium（北京索莱宝科技有限公司，批号：20210930）；2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐（Traut's 试剂，纯度：98%，上海源叶生物科技有限公司，批号：J28GS156194）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，批号：090321220106）；人胃癌细胞 HGC-27（北京北纳创联生物科技有限公司）；IR808（纯度：99%，上海凯瑜琳医药科技有限公司，批号：IR808-202001）；Annexin-V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒（北京百瑞极生物技术有限公司，批号：273D0101）；注射用紫杉醇脂质体（南京绿叶制药有限公司，批号：221120921）。

1.3　仪器

RE-52AA 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；LGJ-10 真空冷冻干燥机（北京松源华兴科技发展有限公司）；ZEN3600 Nano 微射流均质机（上海诺泽流体科技有限公司）；T10 basic S025 高速分散机（德国 IKA）；1290 Infinity Ⅱ 超高效液相色谱仪 [安捷伦科技（中国）有限公司]；Malvern Zetasizer Nano-ZS 动态光散射粒度仪（英国 Malvern Instruments）；TCS-SP8 激光共聚焦显微镜（德国 Leica）；SRSPECTROstar Nano 多功能酶标仪（德国 BMG）；A00-1-1102 流式细胞仪 [贝克曼库尔特商贸（中国）有限公司]。

2　方法与结果

2.1　DHT NP 的制备

采用乳化溶剂扩散法制备 DHT NP。称取处方量 mPEG-PLGA 和 DHT 溶解在丙酮中，作为有机相，乳化剂溶于去离子水中作为水相，将有机相逐滴滴入水相后在高速分散机作用下分散 30 min，形成粗乳液，粗乳液经微射流均质机整粒形成细乳液，将细乳液滴入 5 倍体积的 4 ℃冷水中，固化形成纳米粒混悬液。旋转蒸发仪去除丙酮后，纳米粒溶液经 50 kDa 超滤离心管 4 ℃离心 3 次（3000 g，15 min），去除游离药物，收集超滤离心管上部溶液，冻干，得到 DHT NP。

2.2　载药量和包封率的测定

采用超高效液相色谱法对 DHT 进行含量测定。色谱条件：流动相为甲醇和水（80∶20），色谱柱为 Akzo Nobel Kromasil C18（4.6 mm×150 mm，5 μm），检测波长为 280 nm，流速为 0.8 mL·min^{-1}，柱温为 25 ℃。经方法学验证符合药典要求。

将 DHT NP 完全溶解在甲醇中，定容后测定 DHT 含量，计为 $W_{总}$；取等量 DHT NP 溶液超滤离心去除游离药物，纯化后的 DHT NP 溶液溶解在甲醇中，测定 DHT NP 中封装的 DHT 含量，计为 W_D；将等量纯化后的 DHT NP 溶液冻干得到 DHT NP，称重计为 W_{NP}，载药量和包封率计算如下：包封率（%）＝ $W_D/W_{总}$×100%；载药量（%）＝ W_D/W_{NP}×100%。

2.3　正交试验优化 DHT NP 制备工艺

以有机相浓度（A）、药物与载体质量比（B）、有机相与水相体积比（C）为影响因素（见表 1），以包封率为指标，利用 SPSS 20.0 软件进行正交试验设计，结果见表 2 和 3，方差分析结果表明，整体模型未达到显著水平（P ＜ 0.05），可通过直观分析进行判断。由直观分析可知，3 个因素对 DHT NP 的影响程度依次为 A ＞ C ＞ B，最优工艺条件确定为 $A_2B_1C_2$，即有机相浓度为 1.5%，药物与载体质量比 1 ∶ 2，有机相与水相体积比为 1 ∶ 1.8。在此条件下，DHT NP 的二氢丹参酮Ⅰ载药量和包封率分别为 11.73% 和 54.49%。

表 1　因素水平

Tab 1　Factor and level

水平	因素		
	有机相浓度（A）/%	药物与载体质量比（B）	有机相与水相体积比（C）
1	1	1∶2	1∶10
2	1.5	1.1∶1	1∶1.8
3	2	2∶1	1∶1

DHT NP 的制备工艺如下：精密称取 DHT 5 mg、mPEG-PLGA 10 mg 于反应瓶中，加入 1 mL 丙酮，超声溶解形成有机相；精密称取胆酸钠 36 mg 溶于 1.8 mL 去离子水中形成水相；高速分散作用下形成粗乳液，经微射流均质机整粒，均质强度 10 000 psi，均质 15 min 形成细乳液；将细乳液滴入 5 倍体积的 4 ℃去离子水中固化形成纳米粒混悬液。采用旋转蒸发的方法去除纳米粒混悬液中的有机溶剂，超滤离心管离心除去未包封的药物。上述制备条件下，预冻后冷冻干燥 48 h，即得 DHT NP。在此条件下进行试验验证，3 次

试验得到 DHT NP 包封率的平均值为 54%，与理论值接近，说明模型可靠。

表 2　正交试验结果

Tab 2　Orthogonal experimental

试验号	A	B	C	包封率 /%
1	1	1	1	15.20
2	1	2	2	36.09
3	1	3	3	44.41
4	2	1	2	54.49
5	2	2	1	34.48
6	2	1	3	14.51
7	3	1	2	15.69
8	3	2	3	29.39
9	3	3	1	30.55
K_1	95.70	99.89	80.23	
K_2	103.48	99.96	106.27	
K_3	75.63	74.96	88.31	
R	27.85	25.00	26.04	

表 3　误差分析

Tab 3　Error analysis

方差来源	平方和	d_f	均方	F	$Sig.$
校正模型	1468.416	6	244.736	8.438	0.110
截距	8391.171	1	8391.171	289.295	0.003
A	137.662	2	68.831	2.373	0.296
B	1212.317	2	606.159	20.898	0.046
C	118.437	2	59.218	2.042	0.329
误差	58.011	2	29.006		
总计	9917.598	9			
校正的总计	1526.427	8			

2.4　ATEZO DHT NP 的制备

取 1 mL 阿替利珠单抗注射液（60 mg • mL^{-1}）置 10 kDa 超滤离心管中，加 4 mL pH 8.0 PBS，4 ℃超滤离心（3000 g，15 min）至液体量剩余 1/2，再补加等体积 PBS，重复 5 次后，得到 ATEZO 磷酸盐缓冲溶液。通过 Traut’s 试剂对抗体进行巯基化修饰，BCA 法和 DTNB 法分别测定蛋白和巯基含量，计算每个抗体修饰巯基个数。ATEZO 溶液与 Traut’s 试剂反应比例为 1∶20 时，单位抗体修饰的巯基为 7.7 个，为最佳反应比例，ATEZO 溶液与 Traut’s 试剂反应时间为 1 h 时，溶液浑浊，所以 ATEZO 溶液巯基化的反应时间不宜过长。将巯基化 ATEZO 与马来酰亚胺基封端的 DHT NP 混合，在黑暗中搅拌 12 h，反应后的混合物在 12 000 r • min^{-1}、4 ℃下离心 40 min，收集含有游离巯基化 ATEZO 的上清液，采用 BCA 法测定上清液中游离的单抗含量。同时收集离心后沉淀进行冻干，获得 ATEZO DHT NP，ATEZO 偶联率和载药量计算公式如下，ATEZO DHT NP 的 ATEZO 偶联率为 56.93%，载药量为 14.43%。偶联率（%）＝（ATEZO 投入量－上清中 ATEZO 的量）/ATEZO 投入量 ×100%；载药量（%）＝（ATEZO 投入量－上清液中 ATEZO 的量）/ATEZO DHT NP 的质量 ×100%。

2.5　纳米粒的表征

将冻干的纳米粒分别分散于超纯水和含 10% FBS 的 PBS（10 mol • L^{-1}，pH 7.4）溶液中，并且分别取静置 2、4、8、12、24、48、72 h 后的纳米粒溶液，用马尔文粒度仪进行粒径的测定，观察粒径变化，同时测量纳米粒电位。如图 1 所示，DHT NP 粒径为 184.9 nm，Zeta 电位为－18.55 mV；ATEZO DHT NP 粒径为 246.9 nm，Zeta 电位为－19.57 mV，72 h 内两种纳米粒在水溶液和含 10% FBS 的 PBS 溶液中粒径变化不大，表明其具有良好的稳定性。将 DHT NP 和 ATEZO DHT NP 分散于超纯水中，选择合适的浓度，吸取 500 μL 样品，多次滴加于电镜专用铜网表面，待自然干燥后，通过透射电子显微镜拍摄到 DHT NP 和 ATEZO DHT NP 都近似球形，分布均匀，结果见图 2。

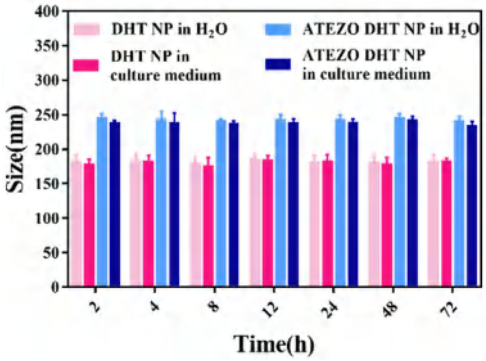


图 1　不同纳米粒的粒径变化

Fig 1　Change of particle sizes in different nanoparticles

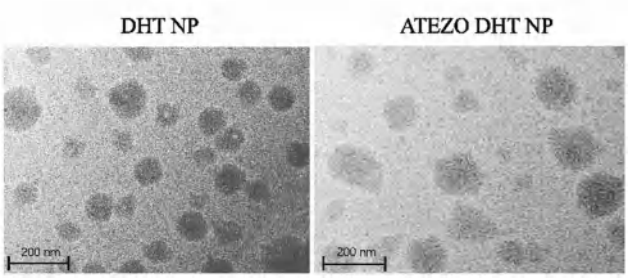


图 2　DHT NP 和 ATEZO DHT NP 的透射电镜图（×30 000）

Fig 2　Morphology image of DHT NP and ATEZO DHT NP（×30 000）

2.6　纳米粒体外释药特性

采用透析法对体外释药特性进行考察。精密称取纳米粒分散于 PBS 溶液中，得 1 mg • mL^{-1} 的含药溶液（以 DHT 计）。精密移取 1.0 mL 纳米粒溶液于透析袋中（MWCO：7 kDa），置于 50 mL 的释放介质中（含 0.2% 吐温 80 的 PBS 溶液），在温

度为 37 ℃、转速为 100 r • min^{-1} 的恒温振荡水浴培养箱摇床中振荡。分别于 0、1、2、4、8、12、24、48、72 h 后取 1.0 mL 释放介质，测定 DHT 浓度 C_d，与此同时补加 1.0 mL 新鲜的释放介质至原释放介质中。按下式计算校正浓度 C_c，其中 W_t 为纳米粒中 DHT 的含量，每组设 3 个平行样品，计算累积释放率（F，%）：$C_c = C_d + 1/50\sum_{i=1}^{n=1} C_d$；$F = (C_c \times 50)/W_t \times 100\%$。

结果如图 3 所示，DHT NP 和 ATEZO DHT NP 在前 10 h 的累积释放不超过 60%，然后在接下来的 62 h 内观察到药物释放缓慢，表明纳米颗粒具有持续释药的特性。

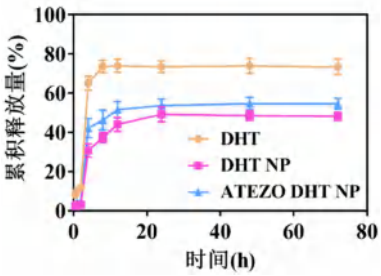


图 3　不同样品的体外释药曲线

Fig 3　Drug release profiles of different sample

2.7　激光共聚焦显微镜评价药物体外细胞摄取情况

将 HGC-27 细胞以 1×10^6 个 / 孔接种于玻璃底激光共聚焦细胞培养皿中，细胞培养 12 h 后，加入荧光标记的纳米颗粒 IR808 NP 和 ATEZO IR808 NP（以 IR808 计，终浓度为 4 μmol • L^{-1}），与细胞共孵育 3 h 后，除去含药培养基，细胞核用 Hoechst 33342 染色 15 min 后，用激光共聚焦激光扫描显微镜观察细胞。为了进一步证实 PD-L1 受体介导的特异性细胞摄取，HGC-27 细胞用 ATEZO 预处理 30 min 后，加入 ATEZO IR808 NP，观察荧光强度变化。如图 4 所示，游离的 IR808、IR808 NP 和 ATEZO IR808 NP 都能被肿瘤细胞有效摄取，经 ATEZO 修饰后，细胞对 ATEZO IR808 NP 的摄取进一步增强。此外，当 ATEZO 预处理 30 min 时，由于 ATEZO 的阻断作用，ATEZO IR808 NP 的荧光强度下降。

2.8　体外药效学评价

采用 MTT 法评价细胞毒性。HGC-27 细胞以 1×10^4 个 / 孔的密度接种于 96 孔板中。当细胞达到对数生长期时，用 100 μL 的药物与细胞共孵育，浓度梯度分别为 0.5、1、2、4、8、16、32 和 64 μmol•L^{-1}（以 DHT 计），48 h 后小心移去含药培养基，每孔加入 100 μL 的 MTT（0.5 mg•mL^{-1}）溶液，放入培养箱中继续孵育 4 h，去除各孔内溶液，加

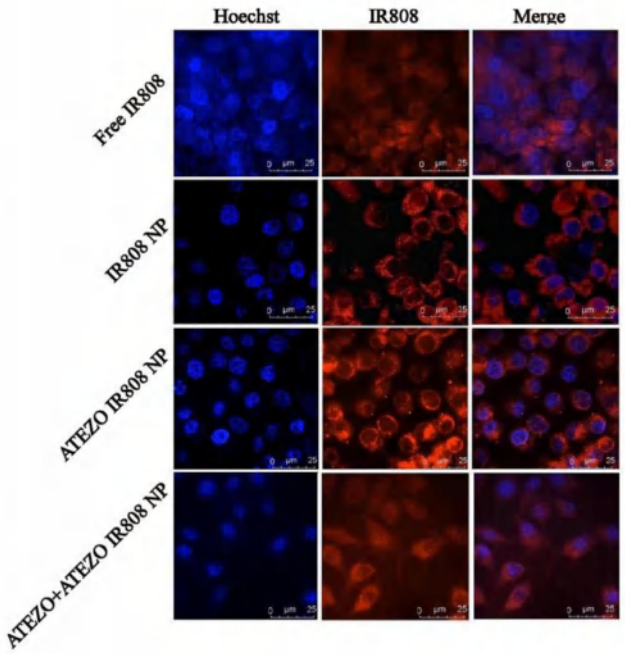


图 4　HGC-27 细胞对不同载药纳米粒的摄取

Fig 4　Uptake of different drug-loaded nanoparticles by HGC-27 cells

入 150 μL DMSO，振荡后，用酶标仪测定 570 nm 处各孔吸光度，计算细胞存活率，结果如图 5 所示。

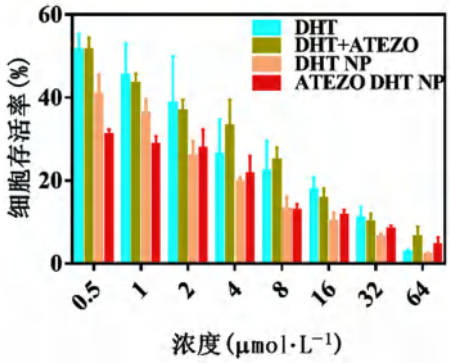


图 5　DHT 和 DHT ＋ ATEZO，DHT NP 和 ATEZO DHT NP 的细胞毒性（$n = 6$）

Fig 5　Cell viability of DHT，DHT ＋ ATEZO，DHT NP and ATEZO DHT NP（$n = 6$）

采用流式细胞仪和 Annexin-V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡情况。HGC-27 细胞以 1×10^6 个 / 孔的密度接种于 6 孔板中，各给药组处理细胞（以 DHT 计，浓度为 8 μmol • L^{-1}）。孵育 48 h 后，用胰蛋白酶消化细胞，以 1800 r • min^{-1} 离心 5 min，然后分散在 100 μL 预冷的 PBS 中。在黑暗中分别加入 5 μL 的 Annexin-V-FITC/7 和 PI 染色液，孵育 15 min。用 400 μL PBS 稀释细胞，流式细胞仪检测细胞凋亡水平，以未加药液处理孔为对照组，对照组与各给药组均设有 3 个复孔。结果如图 6 所示，游离 DHT、游离 DHT ＋ ATEZO、DHT NP 和 ATEZO DHT NP 组的细胞凋亡率分别为（12.6±0.213）%、

（13.2±0.145）%、（39.6±0.243）%、（44.2±0.318）%，与其他各组相比，ATEZO DHT NP 的细胞凋亡率最高，与细胞摄取实验和细胞毒性实验结果一致，表明 ATEZO DHT NP 可以增强 DHT 诱导细胞凋亡的能力。

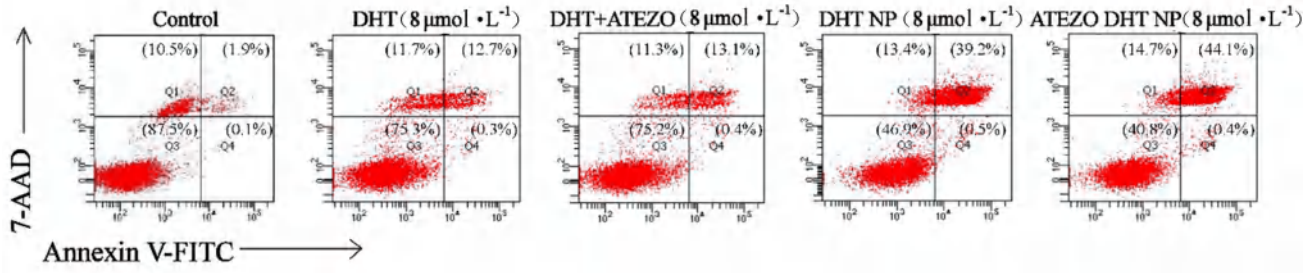


图 6　对照组及各给药组的细胞凋亡情况

Fig 6　Cells apoptosis of the control group and different administration groups

2.9　体内药效学评价

HGC-27 肿瘤移植 BALB/c 裸鼠模型的建立。用 4 ℃的 PBS 将 HGC-27 细胞稀释为 2×10^8 个 •mL^{-1} 的细胞悬液，取 0.1 mL 细胞悬液，裸鼠用戊巴比妥钠（50 mg•kg^{-1}）麻醉后，在裸鼠右腋窝皮下注射接种进行造模，肿瘤体积达到 100 mm^3 时进行给药。将 36 只荷瘤裸鼠随机分为 6 组：生理盐水组，游离 DHT 组，游离 DHT ＋ ATEZO 组，DHT NP 组，ATEZO DHT NP 组，紫杉醇脂质体（Lps-P）阳性对照组，每组 6 只。给药方案为：DHT 15 mg/（kg•d），ATEZO 10 mg/（kg•d），Lps-P 10 mg/（kg•d），2 d 给药一次，给药周期 14 d。在给药期间，2 d 记录一次裸鼠体重，并使用游标卡尺测量肿瘤体积，结果如图 7 所示。给药结束后第 2 日，所有裸鼠脱颈椎处死，剥离肿瘤组织称重，计算抑瘤率。抑瘤率＝（生理盐水组肿瘤重量－给药组肿瘤重量）/ 生理盐水组肿瘤重量 ×100%。

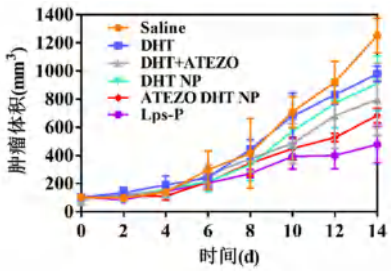


图 7　不同给药组荷瘤裸鼠肿瘤体积的变化曲线（$n = 6$）

Fig 7　Tumor volume of nude mice in different administration groups（$n = 6$）

结果如图 8 所示，与生理盐水组相比，所有给药组均可抑制 HGC-27 肿瘤裸鼠的肿瘤生长，ATEZO DHT NP 组肿瘤抑制率是原药 DHT 组 1.90 倍，约为 DHT NP 组的 1.75 倍。切取部分肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定，肿瘤组织切片用 HE 染色和 TUNEL 染色评估药物对肿瘤细胞的作用，如图 9 所示，相比于 DHT NP 组，ATEZO DHT NP 组肿瘤组织大片坏死，肿瘤细胞凋亡增强，证实了修饰 ATEZO 以后可增强 DHT NP 的抗肿瘤疗效。

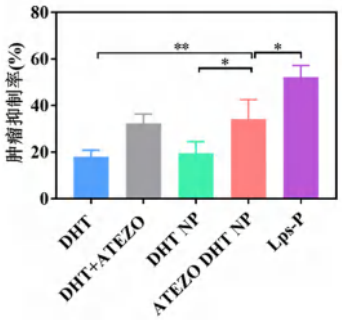


图 8　不同给药组荷瘤裸鼠的肿瘤抑制率（$n = 6$，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 8　Tumor suppression rate of different administration group in nude mice（$n = 6$，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

2.10　体内药物安全性评价

在整个给药期间，各组荷瘤裸鼠体重基本保持不变，表明 ATEZO DHT NP 没有明显的全身毒性。给药结束后第 2 日，所有裸鼠脱颈椎处死，取血及心、肝、脾、肺、肾脏组织。血液于 4 ℃、3500 r • min^{-1} 离心 15 min，收集血浆，并通过生理生化测定试剂盒 [丙氨酸氨基转移酶 ALT 测定试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶 AST 测定试剂盒、尿素氮 BUN 测定试剂盒、肌酐 CRE 测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）] 分析谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、肌酐（CRE）和尿素氮（BUN）生化指标，ATEZO DHT NP 给药组 ALT 的含量为（119.73±2.989）U•L^{-1}，AST 的含量为（146.21±8.423）U•L^{-1}，CRE 的含量为（26.064±2.756）μmol•L^{-1}，BUN 的含量为（7.813±0.139）mg•dL^{-1}，均在正常范围内，表明 ATEZO DHT NP 无肝肾毒性。心、肝、脾、肺、肾脏组织用 4% 多聚甲醛固定，组织切片后用 HE 染色评估组织的形态学变化，结果如图 10 所示，显示各治疗组组织形态没有明显变化，进一步确证纳米粒具有良好的安全性。

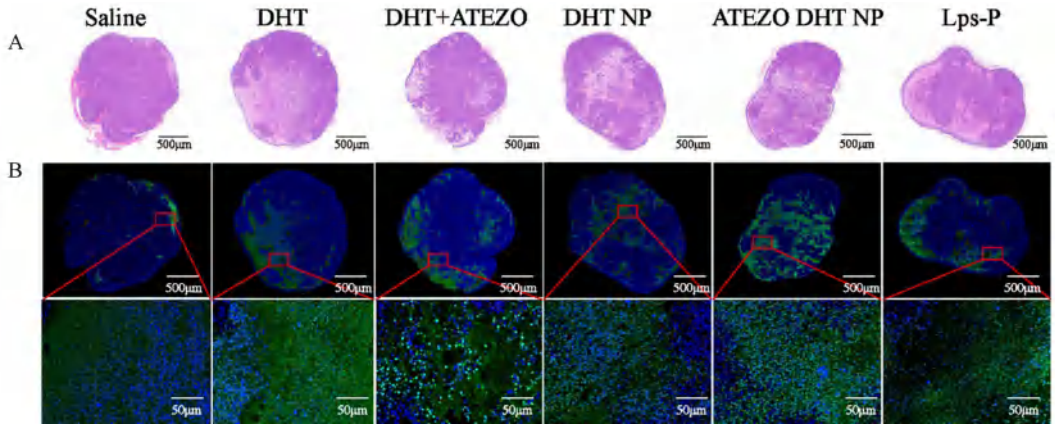


图 9　肿瘤组织 HE 染色（×30）（A）和 TUNEL 染色（×30，×300）（B）

Fig 9　HE staining（×30）（A）and TUNEL staining（×30，×300）of tumor tissue sections（B）

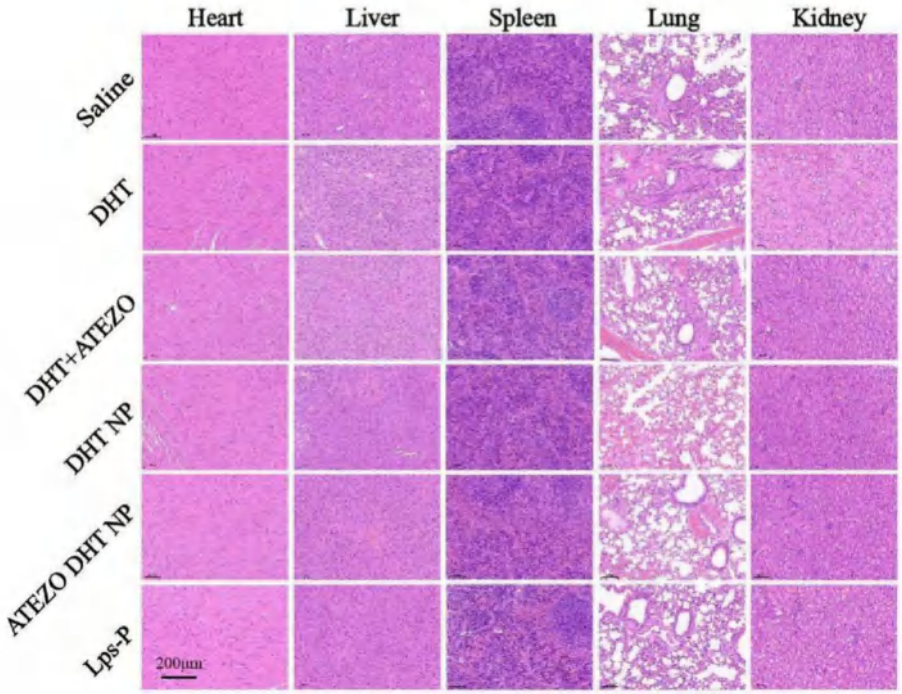


图 10　裸鼠心、肝、脾、肺、肾脏各脏器的 HE 染色结果（×100）

Fig 10　HE stained micrographs of heart、liver、spleen、lung、kidney organ sections（×100）

2.11　统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析，数据以平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。采用 t 检验和单因素方差分析（ANOVA）来比较两组或两组以上之间的数据差异。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　讨论

DHT 是中药丹参的活性成分，具有抗肿瘤作用，作为极具开发潜力的药物分子，如何提高 DHT 生物利用度和肿瘤靶向性是其临床转化面临的关键问题。纳米药物递送系统可以改善药物理化性质，增强药物肿瘤靶向能力和降低药物毒性。免疫治疗联合化疗是目前癌症治疗的研究热点，本研究选择 ATEZO 作为靶头，对 DHT NP 进行表面修饰，不仅可以通过纳米粒的被动靶向作用提高药物在肿瘤部位的分布，而且可以借助 ATEZO 对肿瘤细胞表面过表达 PD-L1 的靶向作用提高药物的胞内浓度，增强药物抗肿瘤作用。

本研究通过乳化溶剂扩散法制备 DHT NP，正交试验考察有机相浓度、药物与载体质量比和有机相与水相体积比对包封率的影响，优化得到最佳制备工艺，制得的 DHT NP 的载药量为 11.73%，包封率为 54.49%。将巯基化的阿替利珠单抗修饰在 DHT NP 表面，通过 BCA 法测定蛋白偶联率和载药量分别为 56.93% 和 14.43%。粒度仪测量 DHT NP 粒径为 184.9 nm，粒径合适；修饰 ATEZO 后 ATEZO DHT NP 的粒径有所增加，电位降低；72 h

内 ATEZO DHT NP 在水溶液和含 10% FBS 的 PBS 溶液中粒径变化不明显，表现出较好的稳定性；透射电镜观测到 DHT NP 和 ATEZO DHT NP 形貌为球形；纳米粒体外释药情况良好。细胞实验结果显示，ATEZO DHT NP 可显著抑制 HGC-27 细胞的增殖；促进 HGC-27 细胞的凋亡。体内抗肿瘤药效评价结果显示，ATEZO DHT NP 在动物模型上具有良好的抑制肿瘤生长的能力，肿瘤坏死情况明显。在整个给药周期内，ATEZO DHT NP 组动物体重无明显变化，血浆 ALT、AST、CRE 和 BUN 水平均在正常范围内，未见明显毒性作用；HE 染色结果显示各主要脏器未见明显异常，说明 ATEZO DHT NP 具有较好的生物安全性。ATEZO DHT NP 在提高抗肿瘤效果方面具有巨大的潜力，后续实验可以进一步验证药物具有激活体内 T 淋巴细胞免疫从而杀伤肿瘤的作用，为深入开发提供研究基础。

参考文献

[1] 林肖惠，徐为人，刘鹏，等 . 二氢丹参酮 I 的降血脂作用研究 [J]. 中草药，2008，39（9）：1378-1380.

[2] Sun CT，Han B，Zhai YF，et al. Dihydrotanshinone Ⅰ inhibits ovarian tumor growth by activating oxidative stress through Keap1-mediated Nrf2 ubiquitination degradation [J]. Free Radic Biol Med，2022，180：220-235.

[3] Han SL，Bi SN，Guo TT，et al. Nano co-delivery of plumbagin and dihydrotanshinone Ⅰ reverses immunosuppressive TME of liver cancer [J]. J Control Release，2022，348：250-263.

[4] 钟雄东 . 丹参有效成分——二氢丹参酮 I 抑制胃癌的作用研究 [J]. 广州医药，2020，51（6）：11-18.

[5] Wang XQ，Xu X，Jiang GQ，et al. Dihydrotanshinone Ⅰ inhibits ovarian cancer cell proliferation and migration by transcriptional repression of PIK3CA gene [J]. J Cell Mol Med，2020，24（19）：11177-11187.

[6] Chen JH，Ning E，Wang ZJ，et al. Docetaxel loaded mPEG-PLA nanoparticles for sarcoma therapy：preparation，characterization，pharmacokinetics，and anti-tumor efficacy [J]. Drug Deliv，2021，28（1）：1389-1396.

[7] Yang JY，Sun B，Wei XL，et al. Arenobufagin-loaded PEG-PLA nanoparticles for reducing toxicity and enhancing cancer therapy [J]. Drug Deliv，2023，30（1）：2177362.

[8] Yang ST，Liu Y，Wang YW，et al. Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions [J]. Small，2013，9（10）：1635-1653.

[9] 李芳婵，韦志英，罗小莉，等 . 共载姜黄素与阿霉素胶束的制备工艺优化及体外抗肿瘤评价 [J]. 中南药学，2023，21（2）：449-455.

[10] Surekha B，Kommana NS，Dubey SK，et al. PAMAM dendrimer as a talented multifunctional biomimetic nanocarrier for cancer diagnosis and therapy [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2021，204：111837.

[11] Morad G，Helmink BA，Sharma P，et al. Hallmarks of response，resistance，and toxicity to immune checkpoint blockade [J]. Cell，2021，184（21）：5309-5337.

[12] Kroemer G，Galassi C，Zitvogel L，et al. Immunogenic cell stress and death [J]. Nat Immunol，2022，23（4）：487-500.

[13] Kraehenbuehl L，Weng CH，Eghbali S，et al. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways [J]. Nat Rev Clin Oncol，2022，19（1）：37-50.

[14] Deng JJ，Zhou M，Liao TT，et al. Targeting cancer cell ferroptosis to reverse immune checkpoint inhibitor therapy resistance [J]. Front Cell Dev Biol，2022，10：818453.

[15] Cheng AL，Hsu C，Chan SL，et al. Challenges of combination therapy with immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol，2020，72（2）：307-319.

[16] Herbst RS，Giaccone G，de Marinis F，et al. Atezolizumab for first-line treatment of PD-L1-selected patients with NSCLC [J]. N Engl J Med，2020，383（14）：1328-1339.

[17] Xue YY，Gao S，Gou JX，et al. Platinum-based chemotherapy in combination with PD-1/PD-L1 inhibitors：preclinical and clinical studies and mechanism of action [J]. Expert Opin Drug Deliv，2021，18（2）：187-203.

[18] Yu YJ，Li J，Song BY，et al. Polymeric PD-L1 blockade nanoparticles for cancer photothermal-immunotherapy [J]. Biomaterials，2022，280：121312.

[19] Nasser NJ，Gorenberg M，Agbarya A. First-line immunotherapy for non-small-cell lung cancer [J]. Pharmaceuticals（Basel），2022，40（6）：586-597.

[20] Moon Y，Shim MK，Choi J，et al. Anti-PD-L1 peptide-conjugated prodrug nanoparticles for targeted cancer immunotherapy combining PD-L1 blockade with immunogenic cell death [J]. Theranostics，2022，12（5）：1999-2014.

（收稿日期：2023-03-17；修回日期：2023-04-27）

UHPLC 结合化学计量学分析不同采收期茶枝柑青皮中黄酮类成分

张戴英[1, 2]，何小芳[3]，黄健晶[1, 2]，张英[3]，吴孟华[3]，曹晖[3]，马志国[3*]（1.广东大翔中药制药有限公司，广州　510385；2.张戴英女职工创新工作室，广州　510385；3.暨南大学岭南传统中药研究中心，广州　511400）

摘要：目的　比较不同采收期茶枝柑青皮中黄酮类成分的差异，为青皮的质量评价提供依据。**方法**　采用 UHPLC 法建立指纹图谱，对不同采收期的青皮进行相似度评价，同时测定并比较不同采收期样品中芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、甜橙黄酮、川陈皮素、3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮、5-去甲川陈皮素和桔皮素的含量。**结果**　建立了青皮的 UHPLC 指纹图谱，共指认了 8 个特征峰，7 ～ 9 月采收的青皮相似度大于 0.97，5 月份与其他月份的相似度均小于 0.8。8 个黄酮类成分的总量随着生长期的增长而减少，5 月采收的个青皮中芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷含量明显高于其他月份，而 3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮含量明显低于其他月份；甜橙黄酮、川陈皮素、5-去甲川陈皮素、桔皮素的含量在不同采收期变化不明显。聚类分析与主成分分析均可将 5 月采收的样品与 7 ～ 9 月采收的样品分开。**结论**　不同采收期的茶枝柑青皮中黄酮类成分的含量差异较大，本文可为青皮药材的质量控制提供依据。

关键词：茶枝柑；不同采收期；黄酮类成分；特征图谱；含量测定
中图分类号：R284.1，R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2585-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.006

UHPLC combined with chemometrics for the analysis of flavonoids in *Citrus reticulata* Blanco at different harvesting periods

ZHANG Dai-ying[1, 2], HE Xiao-fang[3], HUANG Jian-jing[1, 2], ZHANG Ying[3], WU Meng-hua[3], CAO Hui[3], MA Zhi-guo[3*] (1. *Guangdong Daxiang Chinese Medicine Pharmaceutical Co., Ltd.*, *Guangzhou* 510385; 2. *Zhang Daiying Female Employee Innovation Studio*, *Guangzhou* 510385; 3. *Research Center for TCM of Lingnan* (*Southern China*), *Jinan University*, *Guangzhou* 511400)

Abstract: Objective To compare the difference in flavonoid components in Canarh Fructus (*Citrus reticulata* Blanco) at different harvesting periods, and to provide a basis for the quality evaluation of Canarh Fructus. **Methods** Fingerprint was established by UHPLC method to evaluate the similarity of different harvesting periods of Canarh Fructus. The content of narirutin, hesperidin, didymin, hesperetin, sinensetin, nobiletin, 3', 4', 3, 5, 6, 7, 8-heptamethoxyflavone, 5-demethylnobiletin and tangeretin in samples from different harvesting periods was determined and compared. **Results** UHPLC fingerprints were established and 8 characteristic peaks were identified. The similarity of Canarh Fructus collected from July to September was greater than 0.97, and the similarity between May and other months was less than 0.8. The total amount of the 8 flavonoids decreased with the growth period. The content of narirutin, hesperidin, and didymin in Canarh Fructus collected in May was significantly higher than that in other months, while the content of 3', 4', 3, 5, 6, 7, 8-heptamethoxyflavone was significantly lower than that in other samples. The contents of hesperetin, sinensetin, nobiletin, 5-demethylnobiletin and tangeretin did not change obviously in different harvesting periods. Both cluster analysis and principal component analysis can separate the samples

基金项目：2020 年广东省重点领域研发计划（第五批）（No.2020B1111110005）；全国名老中医药专家传承工作室建设项目（国中医药人教函 [2022]75 号）。
作者简介：张戴英，女，主管中药师，主要从事中药饮片炮制工艺及质量标准研究，email：2572667821@qq.com　*通信作者：马志国，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药饮片质量评价研究，email：mzg79@hotmail.com

collected in May from that collected from July to September. **Conclusion** There is difference in the content of flavonoids Canarh Fructus (*Citrus reticulata* Blanco) from different harvesting periods. This article can provide a basis for the quality control of Canarh Fructus.

Key words: *Citrus reticulata* Blanco; different harvesting period; flavonoid; characteristic chromatogram; content determination

青皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮，具有疏肝破气、消积化滞的功效 [1]。青皮中含有挥发油、黄酮类化合物、氨基酸、胺类、生物碱、有机酸等成分，其中以橙皮苷为代表的黄酮类成分是青皮的主要活性成分 [2-3]，多采用 HPLC 法进行分析 [4-7]。文献报道，采收期不同的个青皮与四花青皮中黄酮类成分、挥发油含量及组成均存在较大差异 [8-12]。茶枝柑（*Citrus reticulata* ‘Chachi’）是橘的众多栽培品种之一，主产于广东新会，为广东道地药材广陈皮的基原植物，5 月落果晒干为个青皮，俗称“柑胎仔”；7 ～ 9 月份采收未成熟的果实后将果皮纵向剖成 4 瓣，去除果籽果肉，晒干后即得四花青皮 [13]，俗称“柑青皮”，文献报道橙皮苷在“柑胎仔”中的含量明显高于“柑青皮”[14]，而其他成分与采收时间的相关性未见报道。本研究采用 UHPLC-DAD 指纹图谱结合多指标定量方法，对不同采收期茶枝柑青皮的指纹图谱和 8 个黄酮类成分含量进行对比，为不同采收期茶枝柑青皮中黄酮类成分变化趋势和质量控制提供科学依据。

1　材料

1.1　仪器

Agilent 1290 Infinity Ⅱ 超高效液相色谱仪（DAD 检测器）；XSR105/A 十万分之一天平（瑞士梅特勒 - 托利多），FA 2204B 万分之一电子天平（上海佑科仪器仪表有限公司）；KQ-300DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；DK-98- Ⅱ 单列两孔恒温水浴锅（TAISITE 仪器有限公司）；YF- 高速中药粉碎机（瑞安市永历制药机械有限公司）；DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海精其仪器有限公司）。

1.2　试药

芸香柚皮苷（批号：Y-071-190329）、橙皮苷（批号：C-006-191012）、香蜂草苷（批号：X-034-181216）、甜橙黄酮（批号：T-046-190328）、川陈皮素（批号：C-015-180306）、3'，4'，3，5，6，7，8- 七甲氧基黄酮（批号：Q-113-191016）、桔皮素（批号：J-022-180730）（成都瑞芬思生物科技有限公司，纯度均大于 98.0%）；5- 去甲川陈皮素（批号：wkq19021312，四川维客奇生物科技有限公司，纯度大于 98.0%）。乙腈（上海麦克林生化科技有限公司）、甲酸（天津科密欧化学试剂有限公司）、甲醇（上海晶纯实业有限公司）均为色谱纯，水为纯净水 [华润怡宝饮料（中国）有限公司]，其余试剂均为分析纯。

本研究收集了 5 月产的茶枝柑干燥幼果 11 批，晒干，为个青皮；7 ～ 9 月采摘茶枝柑未成熟鲜果 38 批，加工为干燥的果皮，为四花青皮。详见表 1。

表 1　样品信息表

Tab 1　Sample information

序号	样品编号	序号	样品编号
1	QP-0501	25	QP-0801
2	QP-0502	26	QP-0802
3	QP-0503	27	QP-0803
4	QP-0504	28	QP-0804
5	QP-0505	29	QP-0805
6	QP-0506	30	QP-0806
7	QP-0507	31	QP-0807
8	QP-0508	32	QP-0808
9	QP-0509	33	QP-0809
10	QP-0510	34	QP-0810
11	QP-0511	35	QP-0811
12	QP-0701	36	QP-0812
13	QP-0702	37	QP-0813
14	QP-0703	38	QP-0901
15	QP-0704	39	QP-0902
16	QP-0705	40	QP-0903
17	QP-0706	41	QP-0904
18	QP-0707	42	QP-0905
19	QP-0708	43	QP-0906
20	QP-0709	44	QP-0907
21	QP-0710	45	QP-0908
22	QP-0711	46	QP-0909
23	QP-0712	47	QP-0910
24	QP-0713	48	QP-0911
—	—	49	QP-0912

2　方法与结果

2.1　供试品溶液的制备

取青皮样品粉末 0.2 g（过 5 号筛），精密称定，置 150 mL 具塞锥形瓶中，加甲醇 50 mL，密塞，摇匀，称定重量，超声处理（700 W，40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失重量，摇匀，滤过，取续滤液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.2　混合对照品溶液的制备

精密称取芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、甜橙黄酮、川陈皮素、3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮、桔皮素和5-去甲川陈皮素对照品粉末适量，加入甲醇配成质量浓度分别为149、334、61.6、15.4、62、16、60.8、15.7 μg·mL^{-1}的混合对照品溶液。

2.3　色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），流动相为乙腈（B）-0.1%甲酸水（A），梯度洗脱（0～8 min：15%→45%B，8～12 min：45%→65%B，12～15 min：65%→15%B），检测波长为283 nm或330 nm，流速为0.3 mL·min^{-1}，柱温为35 ℃，进样量为2 μL。

2.4　UHPLC 指纹图谱的建立

2.4.1　精密度试验　取同一批样品（QP-0501）粉末（过5号筛），按“2.1”项下方法制备供试品溶液，连续进样6次，以2号峰为参照峰，计算各特征峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于0.10%，相对峰面积的 *RSD* 均小于0.20%，表明仪器精密度良好。

2.4.2　稳定性试验　取同一批样品（QP-0501）粉末（过5号筛），按“2.1”项下方法制备供试品溶液，分别于0、1、2、4、8、12 h进样测定，以2号峰为参照峰，计算各特征峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于0.70%，表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.4.3　重复性试验　分别取同一批样品（QP-0501）粉末（过5号筛）各6份，精密称定，按“2.1”项下方法分别制备，进样测定，以2号峰为参照峰，计算各特征峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于0.20%，相对峰面积 *RSD* 均小于2.3%，表明该方法重复性良好。

2.4.4　指纹图谱的建立　取所有批次的样品，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。利用 Agilent Chem Station 软件将色谱数据导出为“AIA”格式，并将5、7、8、9月份的青皮样品所得的数据分别导入《中药指纹图谱相似度评价系统》（2012）相似度软件，生成各自的指纹图谱及共有模式图谱（见图1、2）。

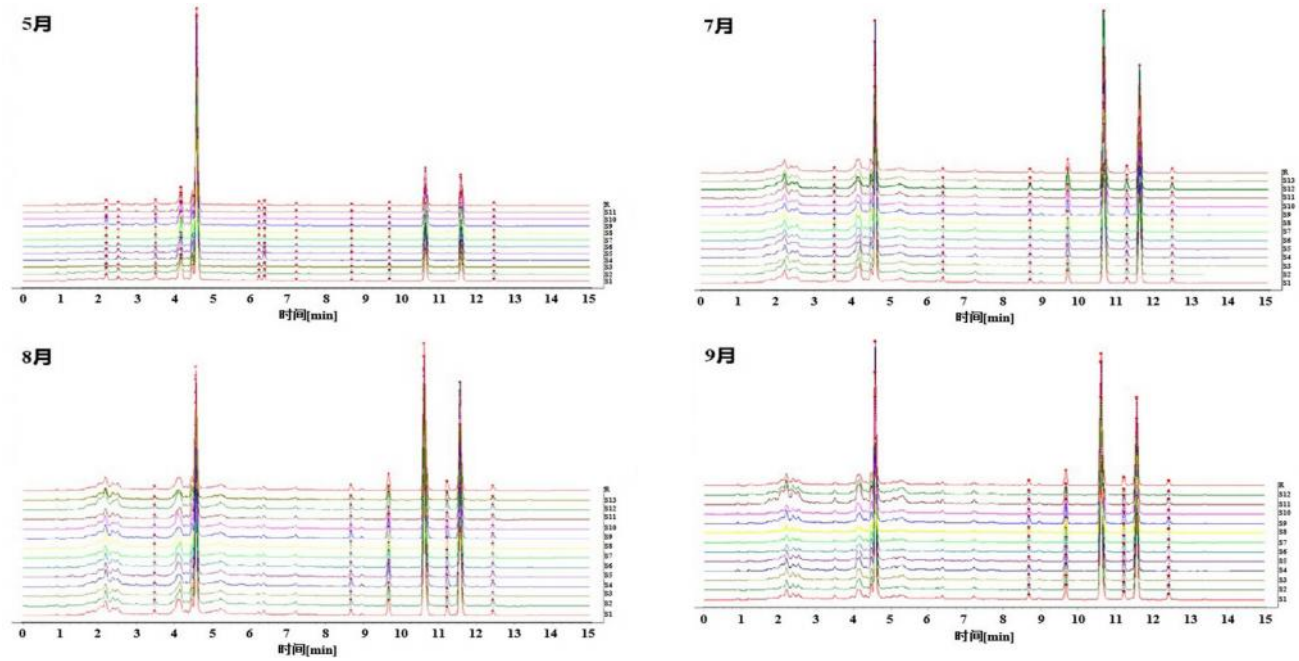


图1　不同采收期青皮药材的指纹图谱

Fig 1　UHPLC chromatograms of Canarh Fructus at different harvesting periods

2.4.5　共有峰的指认　取混合对照品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定。通过保留时间结合紫外光谱图对指纹图谱中的8个共有峰进行了指认，分别为芸香柚皮苷（1号峰）、橙皮苷（2号峰）、香蜂草苷（3号峰）、甜橙黄酮（4号峰）、川陈皮素（5号峰）、3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮（6号峰）、桔皮素（7号峰）、5-去甲川陈皮素（8号峰）。

从图1、2可以看出，5月采收的青皮图谱与另外3个月采收的青皮图谱有明显差异，而7～9月间的青皮图谱变化不明显；随着生长期的增加，2号峰（橙皮苷）的相对峰高明显降低，A区域的共有峰随着月份的增加变化不明显，需进一步通过含量测定进行分析比较。

2.4.6　相似度分析　将以上得到的数据导入《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012）相似度软件，计算各自的相似度，结果见表2。

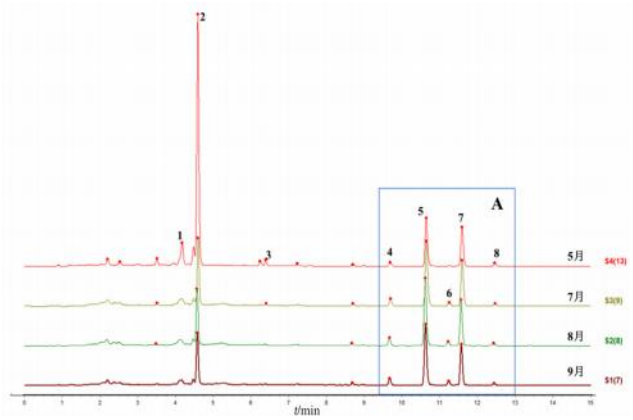


图 2　不同采收期青皮的共有模式图

Fig 2　Specific chromatograms of Canarh Fructus at different harvesting periods

1. 芸香柚皮苷（narirutin）；2. 橙皮苷（hesperidin）；3. 香蜂草苷（didymin）；4. 甜橙黄酮（sinensetin）；5. 川陈皮素（nobiletin）；6. 3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮（3'，4'，3，5，6，7，8-heptamethoxyflavone）；7. 桔皮素（tangeretin）；8. 5-去甲川陈皮素（5-demethylnobiletin）

从表 2 可知，49 批 4 个不同采收期（5、7、8、9 月份）青皮的指纹图谱相似度分别是 0.996 ～ 1.000、0.972 ～ 1.000、0.985 ～ 1.000、0.984 ～ 1.000。相同采收期的青皮相似度均＞0.97，说明相同月份采摘的青皮之间质量稳定性较好。通过对比 4 个不同采摘月份的青皮的共有模式图的相似度（见表 3），发现 7 ～ 9 月采收的四花青皮相似度极高，而 5 月份采收的个青皮与四花青皮相似度＜ 0.78，相似度较低，表明不同成熟度的青皮质量存在一定的差异。

2.5　青皮中 8 种黄酮类成分的含量测定

参考本课题组已建立的 UHPLC 法 [15]，对不同采收期茶枝柑青皮的样品中的 8 个黄酮类成分进行定量分析。

2.5.1　含量测定　分别精密吸取“2.1”及“2.2”项下供试品溶液和对照品溶液 2 μL，按“2.3”项下方法测定，用外标法计算含量，结果见表 4、5。

表 2　不同采收期青皮样品相似度评价

Tab 2　Similarity evaluation of Canarh Fructus at different harvesting periods

5 月		7 月		8 月		9 月	
批号	相似度	批号	相似度	批号	相似度	批号	相似度
QP-0501	0.997	QP-0701	0.997	QP-0801	0.995	QP-0901	0.998
QP-0502	0.998	QP-0702	0.986	QP-0802	0.998	QP-0902	0.997
QP-0503	0.999	QP-0703	0.995	QP-0803	0.999	QP-0903	1.000
QP-0504	0.996	QP-0704	0.999	QP-0804	0.985	QP-0904	0.998
QP-0505	0.999	QP-0705	0.998	QP-0805	0.999	QP-0905	1.000
QP-0506	0.999	QP-0706	1.000	QP-0806	1.000	QP-0906	1.000
QP-0507	1.000	QP-0707	0.994	QP-0807	0.999	QP-0907	0.997
QP-0508	0.997	QP-0708	0.998	QP-0808	0.995	QP-0908	0.987
QP-0509	0.999	QP-0709	0.994	QP-0809	0.987	QP-0909	0.975
QP-0510	0.998	QP-0710	0.989	QP-0810	0.994	QP-0910	0.999
QP-0511	0.999	QP-0711	0.996	QP-0811	0.990	QP-0911	0.993
		QP-0712	0.972	QP-0812	0.996	QP-0912	0.984
		QP-0713	0.999	QP-0813	0.999		

表 3　共有模式的相似度比较

Tab 3　Similarity of shared patterns

采收时间	5 月	7 月	8 月	9 月
5 月	1.000	0.776	0.720	0.737
7 月	0.776	1.000	0.996	0.998
8 月	0.720	0.996	1.000	1.000
9 月	0.737	0.998	1.000	1.000

由表 5 可知，不同采收期的青皮样品中各测定成分有不同程度的差异，采用单因素方差分析，对不同月份的 8 种成分含量进行差异比较。结果表明，芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷和 5-去甲川陈皮素的 5 月份的含量显著高于 7 ～ 9 月份（P ＜ 0.001）。甜橙黄酮 5 月份的含量明显低于 7 ～ 9 月份（P ＜ 0.001）。川陈皮素 5 月份的含量明显低于 7 月份和 8 月份（P ＜ 0.001），而 9 月份的川陈皮素含量低于 8 月份（P ＜ 0.05）。3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮 5 月份的含量明显低于 7 ～ 9 月份（P ＜ 0.001），而且 7 月份的 3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮含量显著低于 8 月份（P ＜ 0.01）。桔皮素在 5 月、7 月、8 月和 9 月的含量没有显著差异。

2.5.2　聚类分析　为比较不同采收时间青皮之间成分的差异，以各样品中黄酮类成分含量测定结果为变量，将数据导入 ImageGP 进行热图聚类分析（见图 3）。由聚类分析结果可得，5 月份采收的青皮可聚为一类，7、8、9 月份的青皮聚为另一类，从热图可以看出 5 月份采收的个青皮中芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷含量均高于其他月份采收的四花青皮，提示随着采收时间的后推，黄酮苷类成分有降低的趋势。

2.5.3　主成分分析　采用 SIMCA 14.1 软件，以

表 4　不同采收期青皮样品 8 个成分含量测定结果 (%)

Tab 4　Content of 8 components of Canarh Fructus at different harvesting periods (%)

编号	采收时间	产地	芸香柚皮苷	橙皮苷	香蜂草苷	甜橙黄酮	川陈皮素	3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮	桔皮素	5-去甲川陈皮素	总量
QP-0501	5 月	新会司前镇	0.747	21.6	0.338	0.0437	0.564	0.0204	0.278	0.0658	23.6
QP-0502	5 月	新会茶坑镇	0.621	18.4	0.269	0.0315	0.435	0.0178	0.267	0.0445	20.1
QP-0503	5 月	新会三江镇	0.682	25.1	0.282	0.0311	0.439	—	0.330	0.0572	26.9
QP-0504	5 月	新会天马村	0.806	24.5	0.278	0.0323	0.474	—	0.329	0.0664	26.5
QP-0505	5 月	新会天马村	0.714	17.1	0.332	0.0269	0.377	0.0162	0.268	0.0449	18.9
QP-0506	5 月	新会三江镇	1.07	21.0	0.466	0.0321	0.445	0.0177	0.318	0.0548	23.4
QP-0507	5 月	新会茶坑镇	0.984	20.6	0.414	0.0386	0.544	0.0225	0.356	0.0600	23.1
QP-0508	5 月	新会天马村	1.19	22.9	0.395	0.0234	0.374	—	0.283	0.0532	25.2
QP-0509	5 月	新会司前镇	1.11	22.0	0.396	0.0288	0.509	—	0.351	0.0673	24.5
QP-0510	5 月	新会司前镇	0.745	22.6	0.252	0.0206	0.358	—	0.263	0.0576	24.3
QP-0511	5 月	新会三江镇	1.18	21.3	0.427	0.0373	0.547	0.0209	0.342	0.0624	23.9
QP-0701	7 月	新会罗坑镇	0.274	6.63	0.097	0.0505	0.577	0.0403	0.385	0.0421	8.09
QP-0702	7 月	新会罗坑镇	0.260	7.01	0.0918	0.0441	0.498	0.0475	0.317	0.0327	8.30
QP-0703	7 月	新会双水镇	0.242	5.90	0.102	0.0417	0.486	0.0537	0.300	0.0351	7.16
QP-0704	7 月	新会茶坑镇	0.233	5.34	0.0716	0.0561	0.637	0.0619	0.350	0.0373	6.79
QP-0705	7 月	新会梅江镇	0.195	5.67	0.0656	0.0541	0.611	0.0593	0.355	0.0405	7.05
QP-0706	7 月	新会三江镇	0.340	6.47	0.0815	0.0543	0.622	0.0552	0.356	0.0418	8.02
QP-0707	7 月	新会天马村	0.234	7.73	0.0782	0.0560	0.648	0.0541	0.345	0.0506	9.19
QP-0708	7 月	新会南坦镇	0.213	6.61	0.0827	0.0524	0.599	0.0487	0.378	0.0367	8.02
QP-0709	7 月	新会司前镇	0.173	5.47	0.0532	0.0607	0.684	0.0719	0.304	0.0430	6.86
QP-0710	7 月	新会双水镇	0.205	4.91	0.0542	0.0667	0.724	0.0686	0.374	0.0412	6.44
QP-0711	7 月	新会司前镇	0.321	8.40	0.0849	0.0588	0.704	0.0646	0.454	0.0552	10.1
QP-0712	7 月	新会茶坑镇	0.242	4.73	0.0550	0.0809	0.898	0.0685	0.504	0.0576	6.64
QP-0713	7 月	新会梅江镇	0.161	5.32	0.0584	0.0556	0.596	0.0652	0.323	0.0332	6.61
QP-0801	8 月	新会罗坑镇	0.330	6.18	0.0719	0.0677	0.698	0.0660	0.434	0.0493	7.90
QP-0802	8 月	新会罗坑镇	0.280	4.58	0.0649	0.0501	0.524	0.0622	0.279	0.0329	5.87
QP-0803	8 月	新会双水镇	0.136	4.29	0.0524	0.0853	0.868	0.0887	0.487	0.0499	6.05
QP-0804	8 月	新会茶坑镇	0.227	5.88	0.0655	0.0633	0.693	0.0746	0.348	0.0462	7.40
QP-0805	8 月	新会梅江镇	0.242	4.99	0.0617	0.0617	0.634	0.0791	0.361	0.0385	6.47
QP-0806	8 月	新会三江镇	0.226	5.53	0.0811	0.0579	0.619	0.0674	0.359	0.0371	6.98
QP-0807	8 月	新会天马村	0.207	5.81	0.0729	0.0558	0.586	0.0661	0.321	0.0357	7.15
QP-0808	8 月	新会南坦镇	0.140	4.81	0.0541	0.0780	0.794	0.0873	0.413	0.0395	6.41
QP-0809	8 月	新会司前镇	0.136	3.96	0.0476	0.0721	0.745	0.0960	0.321	0.0420	5.42
QP-0810	8 月	新会双水镇	0.174	5.70	0.0673	0.0553	0.575	0.0622	0.307	0.0325	6.97
QP-0811	8 月	新会司前镇	0.172	5.89	0.0583	0.0463	0.538	0.0601	0.293	0.0415	7.10
QP-0812	8 月	新会茶坑镇	0.187	5.70	0.0697	0.0660	0.698	0.0733	0.466	0.0471	7.31
QP-0813	8 月	新会梅江镇	0.133	4.54	0.0408	0.0522	0.548	0.0748	0.270	0.0341	5.69
QP-0901	9 月	新会罗坑镇	0.157	5.44	0.0640	0.0514	0.540	0.0569	0.323	0.0365	6.67
QP-0902	9 月	新会双水镇	0.0825	4.93	0.0509	0.0605	0.624	0.0672	0.338	0.0328	6.18
QP-0903	9 月	新会茶坑镇	0.165	5.11	0.0617	0.0572	0.562	0.0691	0.363	0.0300	6.42
QP-0904	9 月	新会梅江镇	0.139	4.62	0.0503	0.0533	0.564	0.0764	0.313	0.0333	5.85
QP-0905	9 月	新会三江镇	0.120	4.75	0.0530	0.0514	0.550	0.0703	0.309	0.0351	5.94
QP-0906	9 月	新会天马村	0.0538	3.43	0.0375	0.0510	0.488	0.0491	0.251	0.0239	4.39
QP-0907	9 月	新会南坦镇	0.0363	3.17	0.0297	0.0544	0.568	0.0685	0.288	0.0307	4.25
QP-0908	9 月	新会司前镇	0.063	3.06	0.0370	0.0660	0.669	0.0940	0.301	0.0396	4.33
QP-0909	9 月	新会双水镇	0.133	4.93	0.0535	0.0521	0.548	0.0787	0.335	0.0336	6.16
QP-0910	9 月	新会司前镇	0.147	5.58	0.0542	0.0512	0.559	0.0578	0.322	0.0418	6.81
QP-0911	9 月	新会茶坑镇	0.296	6.64	0.0879	0.0569	0.596	0.0789	0.362	0.0429	8.16
QP-0912	9 月	新会梅江镇	0.165	4.98	0.0566	0.0376	0.409	0.0448	0.218	0.0305	5.94

注（Note）：“—”未检测到（“—”means no detection）。

测得的 8 个黄酮类成分含量测得结果为变量，建立主成分分析模型，绘制主成分分析得分图（见图 4）。结果可知，前 2 个主成分累积贡献率为 93.5%，其中第 1 主成分贡献率为 68.8%，第 2 主成分贡献率为 24.7%。从所得的方差贡献率来看，建立的模型累积解释能力参数 R^2X 和预测能力参

表 5　不同采收期青皮中 8 个成分的含量平均值 (%)

Tab 5　Average content of 8 components of Canarh Fructus at different harvesting periods (%)

成分	采收时间			
	5 月	7 月	8 月	9 月
芸香柚皮苷	0.895±0.238	0.238±0.0523[1)]	0.199±0.0608[1)]	0.130±0.0691[1)]
橙皮苷	21.6±2.35	6.17±1.10[1)]	5.22±0.722[1)]	4.72±1.05[1)]
香蜂草苷	0.35±0.0735	0.0751±0.0168[1)]	0.0622±0.0112[1)]	0.0530±0.0150[1)]
甜橙黄酮	0.0315±0.0067	0.0563±0.0098[1)]	0.0624±0.0113[1)]	0.0536±0.0068[1)]
川陈皮素	0.461±0.0735	0.637±0.105[1)]	0.655±0.105[1)]	0.556±0.0645[2)]
3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮	0.0105±0.0024	0.0584±0.0095[1)]	0.0737±0.0113[1)，3)]	0.0676±0.0138[1)]
桔皮素	0.308±0.0363	0.365±0.0582	0.358±0.0711	0.310±0.0424
5-去甲川陈皮素	0.0576±0.0079	0.0421±0.0079[1)]	0.0405±0.0061[1)]	0.0342±0.0054[1)2)]

注：与 5 月的含量进行比较，[1)] $P < 0.001$；与 9 月的含量比较，[2)] $P < 0.05$；与 8 月的含量比较，[3)] $P < 0.01$。

Note：Compared with July，[1)] $P < 0.001$；compared with September，[2)] $P < 0.05$；compared with August，[3)] $P < 0.01$.

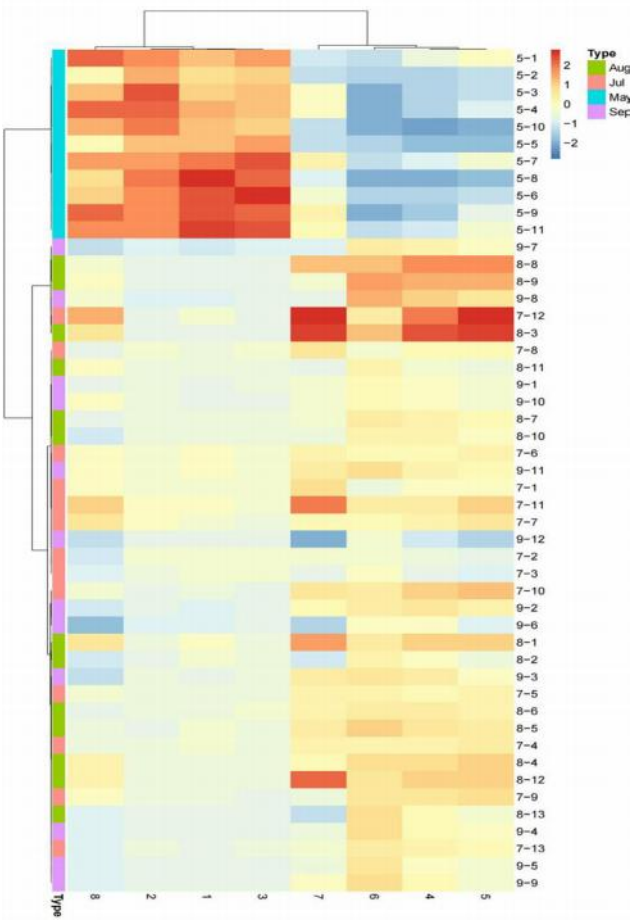


图 3　不同月份青皮聚类热图

Fig 3　Cluster analysis chart for different months

1. 芸香柚皮苷（narirutin）；2. 橙皮苷（hesperidin）；3. 香蜂草苷（didymin）；4. 甜橙黄酮（sinensetin）；5. 川陈皮素（nobiletin）；6. 3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮（3'，4'，3，5，6，7，8-heptamethoxyflavone）；7. 桔皮素（tangeretin）；8. 5-去甲川陈皮素（5-demethylnobiletin）

数 Q^2 分别为 0.935 和 0.855，说明模型的区分度和预测程度都较好，前 2 个主成分已基本能反映出不同月份青皮样品的主要特征。5 月份采收的个青皮与 7、8、9 月份采收的四花青皮能显著区分开来，个青皮与四花青皮在成分含量上存在明显的差异；

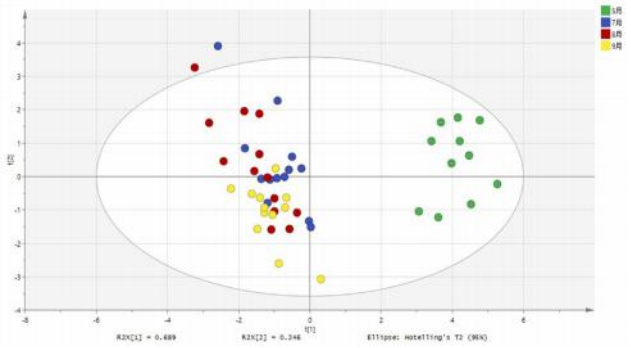


图 4　不同月份青皮主成分分析图

Fig 4　Principal component analysis for different months

而 7 ～ 9 月采收的样品并不能显著分开，说明这 3 个月份采收的青皮黄酮类含量差异不明显。主成分分析结果与热图聚类分析结果一致，提示青皮含有的黄酮类成分与采收时间具有一定的相关性。

3　讨论

3.1　不同采收期青皮的指纹图谱

本研究建立了青皮药材中黄酮类成分的 UHPLC-DAD 指纹图谱，共标定了 8 个共有峰，分别为芸香柚皮苷（1 号峰）、橙皮苷（2 号峰）、香蜂草苷（3 号峰）、甜橙黄酮（4 号峰）、川陈皮素（5 号峰）、3'，4'，3，5，6，7，8-七甲氧基黄酮（6 号峰）、桔皮素（7 号峰）和 5-去甲川陈皮素（8 号峰）。采用 UHPLC 指纹图谱法对不同采收期的青皮进行相似度分析，发现相同月份采收的青皮样品的指纹图谱相似度均＞ 0.9，说明相同采收期的青皮样品之间均一性相对较高、质量相对较稳定。5 月份与其他月份的共有模式图相似度均＜ 0.8，而 7 ～ 9 月采收的青皮的相似度极高。聚类分析与主成分分析均可将 5 月采收的样品与 7 ～ 9 月采收的样品分开，说明采收期是影响青皮质量的关键因素，7 ～ 9 月份采收的青皮质量较稳定。

3.2　不同采收期青皮的黄酮类成分含量

不同采收期青皮中 8 种黄酮类成分含量测定结果表明，7～9月的青皮中甜橙黄酮和3'，4'，3，5，

6，7，8-七甲氧基黄酮的含量明显高于5月；川陈皮素和桔皮素的含量随着月份的增加变化不明显；随着生长期的增加，芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、5-去甲川陈皮素4种黄酮类成分显著减少，其中以未成熟幼果入药的个青皮（柑胎仔）含量最高，说明青皮中黄酮类成分的含量与生长期密切相关。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：205.

[2] 陈红，刘传玉，李承晏 . 青皮的化学及药理作用研究进展 [J]. 中草药，2001，32（11）：1050-1052.

[3] 刘龙婵，王星宇，李林楠，等 . 青皮与陈皮化学成分及分析方法研究进展 [J]. 中国中药杂志，2022，47（11）：2866-2879.

[4] 肖小春，何小芳，张英，等 . 青皮的高效液相特征图谱和 5 个黄酮类成分含量测定 [J]. 中南药学，2023，21（2）：515-519.

[5] 邓芸，叶惠煊，谢安，等 . 高效液相色谱特征图谱结合化学计量学评价青皮饮片的质量 [J]. 中南药学，2017，15（11）：1598-1601.

[6] 邝敏贤，潘弟仪，陈用年，等 . 一测多评法同时测定青皮中 5 种成分的含量 [J]. 药品评价，2022，19（19）：1166-1171.

[7] 何民友，叶瑞平，段志文，等 . 青皮及其炮制品 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究 [J]. 中药材，2022，45（10）：2418-2424.

[8] 陈芳，梁月仪，童培珍，等 . 不同规格青皮饮片指纹图谱 [J]. 中国现代中药，2021，23（1）：117-122.

[9] 李先端，马志静，毛淑杰，等 . 个青皮和四花青皮中四种成分的含量比较 [J]. 中成药，2005，27（5）：611-612.

[10] 孙梓玮，崔伟亮，王杨，等 . 基于 HPLC 指纹图谱及化学计量学筛选个青皮、四花青皮质量标志物 [J]. 中药材，2022，45（3）：647-651.

[11] 冯涌微，刘晓霞，梁月仪，等 . 不同规格青皮药材 UPLC 特征图谱和多指标成分含量对比研究 [J]. 天然产物研究与开发，2022，34（7）：1169-1180.

[12] 赵小艳，吕武清，刘朋 . 个青皮和四花青皮挥发油成分的比较 [J]. 中国现代医生，2008，46（21）：66-67.

[13] 刘梦诗，杨得坡，杨婉玲，等 . 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析四花青皮的成分 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（23）：2395-2400，2427.

[14] 盛钊君，葛思媛，张焜，等 . 新会柑胎仔与青皮、陈皮的黄酮含量分析与比较 [J]. 食品研究与开发，2017，38（20）：135-139.

[15] He XF，Huang SS，Wu MM，et al. Simultaneous quantitative analysis of ten bioactive flavonoids in Citri Reticulatae Pericarpium Viride（Qing Pi）by ultrahigh performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods [J]. Phytochem Anal，2021，32：1152-1161.

（收稿日期：2023-05-04；修回日期：2023-07-07）

尼可地尔鼻腔给药制剂的处方前研究

杨蕾[1, 2]，彭俊文[2]，谷福根[2*]（1. 内蒙古医科大学药学院，呼和浩特　010110；2. 内蒙古医科大学附属医院，呼和浩特　010050）

摘要：目的　考察尼可地尔溶液化学稳定性、油水分配系数（*P*）及溶解度并对该药经鼻黏膜吸收促渗剂进行筛选，为研制尼可地尔鼻腔给药新剂型奠定实验基础。**方法**　建立尼可地尔的 HPLC 含量测定方法，研究在不同 pH 值下该药物溶液的化学稳定性、*P* 值及溶解度；以离体羊鼻黏膜为实验模型，以羟丙基 -*β*- 环糊精（HP-*β*-CD）、磺丁基 -*β*- 环糊精（SBE-*β*-CD）、二甲基 -*β* 环糊精（DM-*β*-CD）为候选促渗剂，采用 Franz 扩散池法，筛选尼可地尔经鼻黏膜吸收的理想促渗剂。**结果**　尼可地尔溶液在强酸 pH 下化学稳定性最好，而在强碱性 pH 值下最差；尼可地尔的 *P* 值随着 pH 值的增大总体呈增大趋势；尼可地尔的溶解度随介质 pH 值的增大总体呈减小趋势；HP-*β*-CD 与 SBE-*β*-CD 对尼可地尔经羊鼻黏膜吸收有明显促进作用，而 DM-*β*-CD 对药物的吸收呈抑制作用。**结论**　尼可地尔溶液的化学稳定性、油水分配系数及溶解度均与介质 pH 值密切相关。SBE-*β*-CD 可能是制备尼可地尔鼻腔给药制剂的最佳促渗剂。

关键词：尼可地尔；鼻腔给药；处方前研究；化学稳定性；油水分配系数；溶解度；促渗剂

中图分类号：R944　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2591-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.007

作者简介：杨蕾，女，硕士研究生，主要从事鼻黏膜给药新剂型研究，email：2394006470@qq.com　*通信作者：谷福根，男，主任药师，硕士研究生导师，主要从事环糊精包合物及鼻腔给药新剂型研究，email：fgczh@sina.com

Preformulation research on nicorandil nasal preparation

YANG Lei[1, 2], PENG Jun-wen[2], GU Fu-gen[2*] (1. *School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010110; 2. *Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010050)

Abstract: Objective To determine the chemical stability of aqueous solution, oil-water partition coefficient (*P*) and solubility of nicorandil, and further sieve the ideal permeation enhancer of the drug via nasal mucosa to provide a theoretical foundation for developing nicorandil nasal preparation. **Methods** An HPLC method was firstly established for the determination of nicorandil, the aqueous solution stability of the drug, its *P* value and solubility were studied under various pH conditions. In vitro sheep nasal mucosa as the test model and with Franz diffusion cell method, the ideal absorption enhancer for nicorandil via nasal mucosa were determined among three commonly used *β*-CD water-soluble derivatives, including HP-*β*-CD, SBE-*β*-CD and DM-*β*-CD. **Results** Nicorandil solution was found to be most stable under strongly acidic pH conditions and most unstable in strongly alkaline pH media. The *P* values of nicorandil generally increased with the pH value of media. The solubility of nicorandil tended to reduce with the increase of media pHs. HP-*β*-CD and SBE-*β*-CD both exhibited obvious permeation enhancing effect on the nicorandil absorption via in vitro sheep nasal mucosa. DM-*β*-CD showed an inhibitive effect on the nasal mucosa absorption of nicorandil. **Conclusion** The solution stability, *P* value and solubility of nicorandil are all closely related to the media pH values. SBE-*β*-CD may be the ideal permeation enhancer for nicorandil nasal preparation.

Key words: nicorandil; nasal dosing; preformulation study; chemical stability; oil-water partition coefficient; solubility; permeation enhancer

尼可地尔是一种新型硝酸酯类化合物，同时也是一种钾离子通道开放剂，通过双重机制改善心肌缺血，可用于冠心病及各类心绞痛治疗[1-2]。与传统硝酸类抗心肌缺血药相比，它具有疗效确切、不良反应少、耐受性好等特点，是目前临床抗心肌缺血首选药物之一[3]。尼可地尔现上市剂型有口服片剂与注射剂。前者吸收起效缓慢、生物利用度低，不适用于心绞痛的紧急治疗，后者属于侵入性给药，会给患者带来一定痛苦，且需协助用药，用药依从性差，此外，给药前需要配药、消毒等操作，易延误疾病的治疗。鼻腔给药具有给药方便、吸收起效快、生物利用度高等特点，作为快速治疗重要手段，已成为部分镇痛药、退热药、癫痫与偏头痛治疗药的理想给药途径而受到国内外高度关注，也是目前制剂领域研究的热点[4-5]。另外，尼可地尔熔点低、使用剂量小，且相对分子量低，这些性质均符合鼻腔给药的基本要求。药物溶解度、溶液化学稳定性是制备溶液型鼻腔给药必须要考虑的主要因素，而药物油水分配系数的大小又与其经鼻黏膜吸收难易程度密切相关[6]。鉴于尼可地尔在结构上属于具有硝酸酯侧链的烟酰胺类化合物，故 pH 值可能对其溶液化学稳定性、油水分配系数及溶解度有重要影响；此外，为进一步改善药物经鼻黏膜吸收，鼻腔制剂处方中常需加入吸收促渗剂，因而有必要筛选尼可地尔经鼻黏膜吸收的理想促渗剂。基于上述分析，本文将完成尼可地尔鼻腔给药制剂的处方前研究工作，旨在为今后研制该药物溶液型鼻腔给药新制剂提供重要理论依据。

1　材料

1.1　仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪（包括 SPD-20A 紫外 - 可见检测器，日本岛津公司）；TP-6 智能透皮试验仪（天津市鑫洲科技有限公司）；PHS-3C 型 pH 计（上海仪电科学仪器有限公司）；AB265-S 型电子分析天平（瑞士梅特勒 • 托利多公司）；KQ5200E 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Arioso UP 900 型超纯水器（韩国 Human 公司）；101 型电热鼓风干燥箱（北京市永光明医疗仪器厂）。

1.2　试药

尼可地尔对照品（纯度：99.5%，批号：k1710021，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；HP-*β*-CD（纯度：98%，山东新大精细化工有限公

司）；SBE-β-CD（纯度：99%，山东新大生物科技有限公司）；DM-β-CD（纯度：98%，山东滨洲智源生物科技有限公司）；正辛醇（AR，天津市化学试剂有限公司，批号：20200401）；生理盐水（批号：2104153404，石家庄四药有限公司）；水为双蒸水，甲醇、乙腈均为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　尼可地尔含量测定方法建立

2.1.1　色谱条件[7]　色谱柱：InertSustain C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水（48∶52）；流速：1.0 mL・min^{-1}；检测波长：254 nm；柱温：36 ℃；进样量：10 μL。

2.1.2　专属性试验　以 50% 甲醇溶液为溶剂，配制质量浓度为 80 μg・mL^{-1} 的尼可地尔溶液。取上述尼可地尔溶液适当体积于 10 mL 具塞刻度试管中，分别以 0.1 mol・L^{-1} 盐酸溶液、0.01 mol・L^{-1} 氢氧化钠溶液、0.5% 过氧化氢溶液稀释至刻度，摇匀，然后置于 80 ℃恒温条件下放置，分别于适当时间取样，进样分析，其中，以 0.1 mol・L^{-1} 盐酸溶液、0.01 mol・L^{-1} 氢氧化钠溶液所制样品，需在进样前以相同浓度碱或酸溶液进行中和。结果见图 1，在该色谱条件下，尼可地尔与其降解产物能够很好地分离，表明该分析方法专属性强；此外，尼可地尔溶液在酸性及碱性条件下均不稳定，但在强氧化条件下较稳定。

2.1.3　标准曲线的制备　精密称取尼可地尔对照品适量，以 50% 甲醇溶液为溶剂，制得质量浓度为 500.0 μg・mL^{-1} 的尼可地尔储备液。将上述尼可地尔储备液，以 50% 甲醇稀释不同倍数，分别制得质量浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 μg・mL^{-1} 的尼可地尔系列对照品溶液。进样分析，记录药物色谱峰面积。以尼可地尔质量浓度（C，μg・mL^{-1}）为横坐标，峰面积（A）为纵坐标，求得回归方程为：$A = 3255.5C - 1713.7$（$r = 0.9997$），表明尼可地尔在 2.5 ～ 80.0 μg・mL^{-1} 内与峰面积呈现良好的线性关系。

2.1.4　精密度试验　分别取 5.0、20.0、60.0 μg・mL^{-1} 的尼可地尔对照品溶液，日内重复测定 5 次，连续测定 5 d，计算方法的日内及日间 *RSD* 值。结果该方法的日内 *RSD* 在 0.23% ～ 0.63%，日间 *RSD* 在 0.60% ～ 1.6%（$n = 5$），表明该方法的精密度良好。

2.1.5　回收试验　配制 5.0、20.0、60.0 μg・mL^{-1} 尼可地尔对照品溶液，每个浓度各 5 份，进样分析，记录尼可地尔峰面积，并根据随行标准曲线方程，计算方法的回收率。结果低、中、高浓度尼可地尔的回收率分别为 103.12%、96.72%、98.52%，*RSD* 分别为 0.92%、0.67%、0.39%，表明该方法的准确度较高。

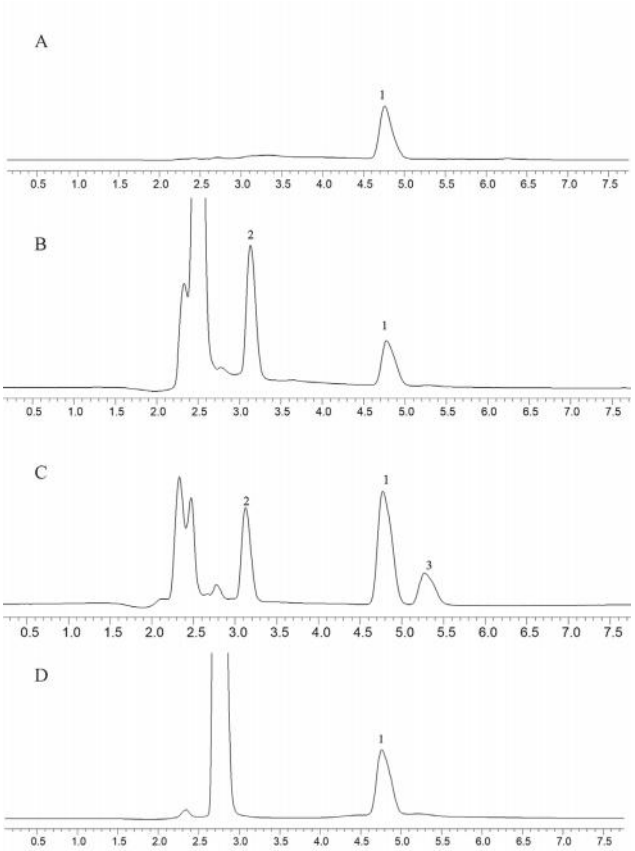


图 1　尼可地尔专属性考察色谱图

Fig 1　Specificity chromatogram of nicorandil

A. 水溶液（aqueous solution）；B. 酸降解（acid degradation）；C. 碱降解（alkali degradation）；D. 氧化降解（oxidative degradation）；1. 尼可地尔（nicorandil）；2、3. 降解产物（degradation products）

2.1.6　检测限与定量限　将标准曲线下尼可地尔最低浓度对照品溶液逐步稀释，以信噪比 $S/N = 3$ 时，药物浓度作为方法的检测限，以 $S/N = 10$ 时，药物浓度作为方法的定量限。结果该方法的检测限为 0.05 μg・mL^{-1}，定量限为 0.15 μg・mL^{-1}。

2.2　尼可地尔溶液化学稳定性研究

按照《中国药典》2020 年版四部中“缓冲液”项下方法，分别配制 pH 值为 2.0、4.5、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0 的系列缓冲液。

精密称取尼可地尔适量，加 50% 甲醇溶液溶解，制得质量浓度为 1000.0 μg・mL^{-1} 的尼可地尔储备液。取尼可地尔储备液，加蒸馏水稀释，制得质量浓度为 80.0 μg・mL^{-1} 的尼可地尔溶液。取尼可地尔溶液 1 mL 置于 10 mL 试管中，分别加入上述不同 pH 值系列缓冲液至 10 mL，摇匀，密封，于 80 ℃恒温条件下放置，分别于 0、2、4、

8 h取样，放冷至室温，进样分析，测定反应液中尼可地尔的浓度并计算药物降解百分率，结果见图 2。可见，尼可地尔溶液随着介质 pH 的增加，其降解百分率总体呈现上升趋势；且随着加热时间的延长，药物的降解百分率也随之增加。此外，在 pH 2.0 的强酸条件下药物溶液的降解速度最慢，而 pH 值在 4.5 ～ 8.0 时药物溶液的降解速度较 pH 2.0 时明显增大，但在此 pH 值范围内，不同 pH 值下药物降解速度基本相似，而尼可地尔溶液在 pH 10.0 及以上强碱性条件下，其降解速度显著加快，化学稳定性最差，如在 pH 值为 12 时，2 h 内药物已基本降解完全。

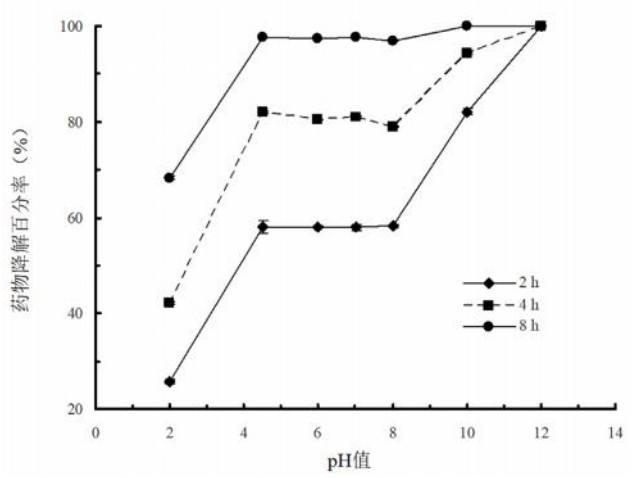


图 2　尼可地尔溶液在不同 pH 条件下的降解曲线（$n = 3$）

Fig 2　Degradation curves of nicorandil solution under different pH conditions（$n = 3$）

2.3　尼可地尔油水分配系数的测定

2.3.1　油水平衡时间测定　配制 pH 值分别为 2.0、4.5、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0 的系列缓冲液作为水相，以经过水饱和的正辛醇作为油相。

取质量浓度为 1000 μg • mL^{-1} 的尼可地尔储备液，分别加入不同 pH 值水相进行稀释，制得质量浓度为 32 μg • mL^{-1} 的尼可地尔系列水相溶液。取尼可地尔水相溶液 10 mL，置于具塞锥形瓶中，加入相同体积油相，密塞，于 25 ℃恒温振荡器中振荡，分别于 0、20、40、60、120、180 min 在水相中取样，再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，进样分析，测定水相中尼可地尔的浓度。实验结果可见，当恒温振摇 120 min 时，不同 pH 值水相中尼可地尔的浓度已达恒定，故将该药物在油相、水相中分配平衡时间设为 120 min。

2.3.2　油水分配系数的测定　将不同 pH 值药物水相溶液与相同体积油相混合，在 25 ℃恒温振荡器中振荡 120 min 后，在水相中取样，同法处理后进样分析，测定不同 pH 值水相中药物的浓度。根据公式：$P = (C_0 - C_w)/C_w$，计算不同 pH 下药物的油水分配系数 P。式中，C_0 是水相中药物初始浓度，C_w 是分配平衡后水相中药物浓度。结果测得，尼可地尔在正辛醇 - 水中的 P 值为 2.31，而药物在正辛醇 / 不同 pH 值缓冲液中尼可地尔的 P 值变化，见图 3。可见，尼可地尔的 P 值随着 pH 值增大而呈波动式增加，在 pH 值为 6.0 时，P 值出现一定程度下降，而后又逐渐增大。

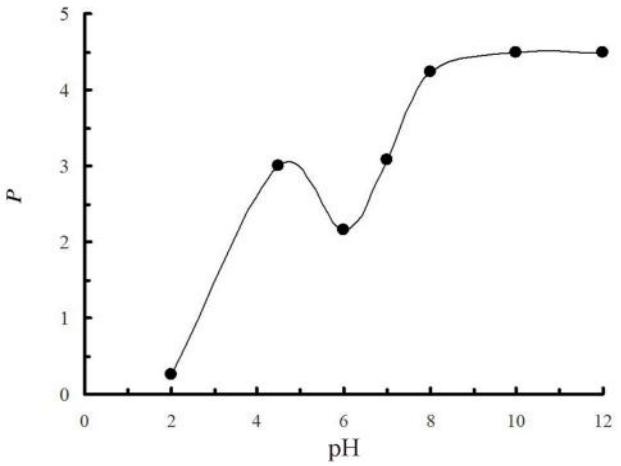


图 3　尼可地尔的 P 值随 pH 变化的曲线（$n = 3$）

Fig 3　P change curve of nicorandil under various pHs（$n = 3$）

2.4　溶解度的考察[8]

分别取适当体积水、丙二醇、PEG400 及 pH 值分别为 2.0、4.5、6.0、8.0 磷酸盐缓冲液，置于 0.5 mL EP 管中，均加入过量尼可地尔，超声处理，观察药物溶解情况，直至药物不再溶解。然后，将样品置于 25 ℃恒温振荡器中继续振摇 72 h，使药物溶解达饱和状态。将 EP 管以 10 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液以 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液以 50% 甲醇溶液稀释适当倍数后，进样分析，计算尼可地尔在不同溶剂中的溶解度，结果见表 1。可见，在 pH 值 2.0 ～ 8.0 内，尼可地尔的溶解度随介质 pH 的增加而总体呈减小趋势，而其在丙二醇中的溶解度与在水中的溶解度基本相似，在 PEG400 中的溶解度却较小。

表 1　尼可地尔在不同溶剂中的平衡溶解度 ($n = 3$)

Tab 1　Equilibrium solubility of nicorandil in different solvents ($n = 3$)

溶剂	溶解度 /（mg • mL^{-1}）
pH 2.0 磷酸盐缓冲液	112.28±0.48
pH 4.5 磷酸盐缓冲液	69.13±1.49
pH 6.0 磷酸盐缓冲液	70.11±0.81
pH 8.0 磷酸盐缓冲液	62.85±0.72
水	76.88±0.42
丙二醇	78.63±0.65
PEG400	23.61±1.96

2.5　促渗剂的筛选

以鼻腔给药制剂中使用广泛、安全性高的 3 种 β-CD 水溶性衍生物 DM-β-CD、HP-β-CD、SBE-β-CD 为候选促渗剂[9]，筛选尼可地尔鼻用制剂的最佳促渗剂。

取新宰杀羊鼻黏膜，采用 Franz 立式扩散池法，完成药物渗透性试验。试验时，将鼻黏膜剪成适宜大小，固定于扩散池接口处，黏膜侧朝向供给池，以生理盐水为接收液，在供给池内加 0.1% 尼可地尔供试液 1.0 mL，内含 5%β-CD 水溶性衍生物，水浴温度设为 34 ℃，搅拌速率为 300 r • min^{-1}，分别于 20、40、60、90、120、180 min，从接收池中取样 1.0 mL，并立即补充同体积等温生理盐水。按“2.1.1”项下色谱条件，测定样品中尼可地尔的浓度。样品中尼可地尔的定量方程为：$A = 2883.9C + 2199$（$r = 0.9999$），尼可地尔在 0.2 ～ 80.0 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好线性关系。方法的日内精密度在 0.18% ～ 0.72%，日间精密度在 0.41% ～ 2.3%（$n = 5$）。

依据药物累积渗透量（Q_n，μg • cm^{-2}）计算公式[10]：$Q_n = (C_nV_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_iV_i)/A$，计算不同时间尼可地尔的累积渗透量。式中，$V_0$ 为接收液体积，C_n 为第 n 个取样点的药物浓度，V_i 为第 i 次取样体积，C_i 为第 i 次取样接收液中药物浓度，A 为有效透皮面积，以 Q_n 对时间 t 作图，绘制尼可地尔经鼻黏膜的渗透曲线，结果见图 4。可见，5%SBE-β-CD 对尼可地尔经鼻黏膜吸收的促渗作用最强，5%HP-β-CD 的促渗作用次之，而 5%DM-β-CD 却抑制药物的鼻黏膜渗透。

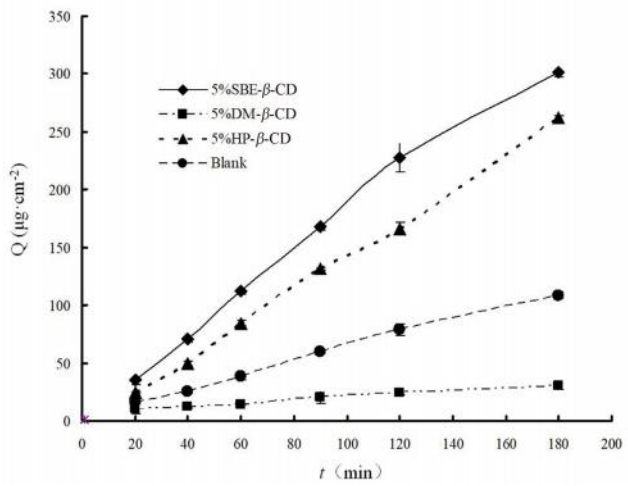


图 4　不同促渗剂对尼可地尔经离体羊鼻黏膜渗透量的影响（$n = 3$）

Fig 4　Effect of different absorption enhancers on the permeation amount of nicorandil via in vitro sheep nasal mucosa（$n = 3$）

因此，确定了 SBE-β-CD 为最佳促渗剂，进一步考察其浓度对促渗效果的影响，方法同前。分别考察了 1.0%、3.0%、5.0%、7.0% SBE-β-CD 对尼可地尔的促渗作用，结果见图 5。可见，当 SBE-β-CD 浓度较低时，随着浓度的增加，其促渗作用随之增加，当浓度为 5.0% 时，其促渗效果达到最大，此后，随着浓度增加，其促渗作用下降。因此，5.0%SBE-β-CD 作为尼可地尔鼻腔给药制剂的最佳促渗剂。

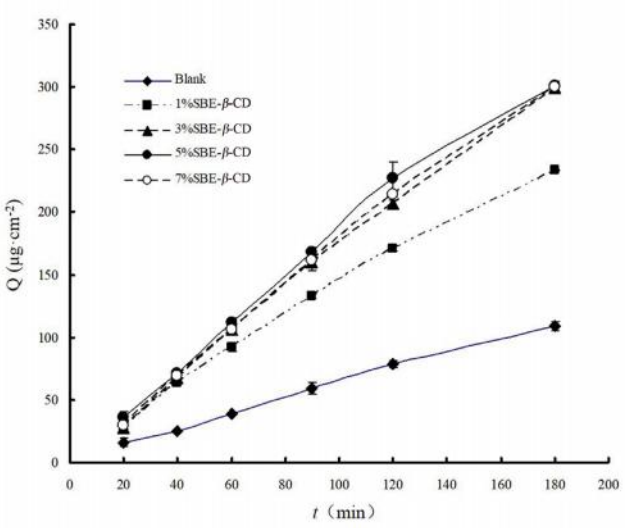


图 5　SBE-β-CD 浓度对尼可地尔经离体羊鼻黏膜渗透的影响（$n = 3$）

Fig 5　Effect of SBE-β-CD concentrations on permeation amount of nicorandil via in vitro sheep nasal mucosa（$n = 3$）

3　讨论

本文首先建立了 HPLC 法测定尼可地尔含量的方法，该方法专属性强、操作简单、线性范围大、精密度与准确度良好。因尼可地尔结构上属于硝酸酯类化合物，具有易水解的特性，其溶液化学稳定性易受介质 pH 的影响。尼可地尔溶液稳定性研究结果显示，药物溶液在强酸性 pH 条件下稳定性最好，在弱酸性与中性 pH 下稳定性次之，而在强碱性 pH 下稳定性最差，这是由于在碱性条件下，尼可地尔易发生专属性碱催化水解反应，生成降解产物 *N*-（2- 羟乙基）- 烟酰胺的缘故，该结果与文献报道基本一致[11-12]。

有研究证实，当药物油水分配系数为 $-1 < \log P < 2$，在此范围内药物通过被动扩散较易透过细胞膜[13]。本文测定结果显示，在 pH 4.5 ～ 12 内，尼可地尔的 P 值在 2.2 ～ 4.5，其 $\log P$ 大致在 0.33 ～ 0.65，在正辛醇 - 水中的 $\log P$ 为 0.36，均处于药物最佳吸收范围内，预期经鼻腔黏膜较易吸收。尼可地尔的 P 值随 pH 值增大而呈波动式增加，其原因可能是由于其结构上同时含有酰胺基与吡啶环，使药物总体呈现弱碱性，导致其 P 值随

pH 值的变化不同于一般弱碱的变化规律[14-15]。

其次，本文采用饱和溶液法测定了尼可地尔溶解度，发现在强酸性 pH 条件下，该药物的溶解度最大，随着介质 pH 值增大，药物溶解度总体呈逐渐下降趋势，这可能是由于尼可地尔属于弱碱性化合物，在强酸性 pH 值下，有部分药物发生解离，以离子形式存在，从而增加药物的溶解度，而随着介质 pH 值逐渐增加，绝大部分药物以分子形式存在，故溶解度明显降低。此外，还发现尼可地尔在丙二醇中的溶解度与其在水中相似，均远大于在 PEG400 中的溶解度。鉴于尼可地尔上市口服片剂的规格为 5 mg，而人单侧鼻孔每次给药体积范围应为 100 ～ 200 μL[16]，本文测得该药物在常温下水中的溶解度大于 70 mg • mL^{-1}，完全可满足制备溶液型鼻用制剂要求，因此，可考虑以水作为制备尼可地尔鼻腔制剂的理想溶剂。

最后，离体鼻黏膜渗透性试验结果发现，候选的 3 种促渗剂中，HP-*β*-CD 与 SBE-*β*-CD 均可明显促进尼可地尔的经鼻黏膜吸收，但后者促渗效果更好；相反，DM-*β*-CD 则表现为明显抑制该药物经鼻黏膜的渗透作用，产生这一现象的原因尚不明确，可能与 *β*-CD 母体结构上取代基的不同有关。此外发现，不同浓度 SBE-*β*-CD 的促渗作用大小顺序为：5.0%SBE-*β*-CD ＞ 7.0%SBE-*β*-CD ≈ 3%SBE-*β*-CD ＞ 1.0%SBE-*β*-CD，表明 SBE-*β*-CD 对尼可地尔的促渗效果具有一定程度的浓度依赖性：在低浓度时，促渗作用随其浓度增加而增强，当浓度达到 5% 时，其促渗效果最大，进一步提高 SBE-*β*-CD 的浓度，其促渗作用不再增加，这一现象与文献报道结果类似[17]。

人体鼻腔正常生理 pH 值范围为 5.5 ～ 6.5，平均值为 6.4[18]，综合考虑尼可地尔溶液化学稳定性、油水分配系数、溶解度和对鼻黏膜可能产生的刺激性，制备该药物鼻腔制剂的 pH 值应控制在 6.0 ～ 6.5 为宜，而其最佳促渗剂为 5.0%SBE-*β*-CD。后续将通过体内药动学研究来验证制剂在体内吸收以及生物利用度情况。

参考文献

[1] Shi L，Chen L，Qi G，et al. Effects of intracoronary nicorandil on myocardial microcirculation and clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction：a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Am J Cardiovasc Drugs，2020，20（2）：191-198.

[2] 张紫萍，方广，郭秀彩 . 从《冠心病合理用药指南》看尼可地尔在冠心病治疗中的作用 [J]. 实用医学杂志，2020，36（22）：3033-3037.

[3] 朱文玲 . 具有独特双重作用机制的抗心绞痛新药：尼可地尔 [J]. 临床药物治疗杂志，2012，10（6）：1-4，38.

[4] Laffleur F，Bauer B. Progress in nasal drug delivery systems [J]. Int J Pharm，2021，607：120994.

[5] 樊慧敏，谷福根 . 鼻腔给药新剂型研究及临床应用的进展 [J]. 华西药学杂志，2018，33（5）：548-554

[6] 黄晶，李爽，吴春芝，等 . pH 值依赖的帕瑞昔布钠溶液化学稳定性、溶解度和油水分配系数研究 [J]. 中南药学，2022，20（1）：99-103.

[7] 罗平，冯敏，林宁 . 高效液相色谱法测定尼可地尔缓释片的含量 [J]. 湖北中医药大学学报，2015，17（1）：42-44.

[8] 熊婧，张涛，许明哲，等 . 平衡溶解度实验基本程序和技术要求 [J]. 中国药学杂志，2019，54（16）：1349-1354.

[9] 丛志新，李爽，黄晶，等 . 氢溴酸西酞普兰鼻用温敏凝胶的处方优化及体外性质评价 [J]. 中国药学杂志，2020，55（5）：375-382.

[10] 赵丽辉，张雯，范若颖，等 . 活络效灵凝胶贴膏剂的制备及体外透皮吸收研究 [J]. 中国中药杂志，2023，48（5）：1238-1248.

[11] Mukhopadhyay S，Kolte R，Sawant L，et al. A validated，stability-indicating HPLC method for the determination of nicorandil related substances from nicorandil tablet dosage form [J]. Int J Pharm Tech Res，2011，3（1）：397-404.

[12] Bachert EL，Fung HL. High-performance liquid chromatographic method for stability and pharmacokinetic studies of nicorandil [J]. J Chromatogr，1993，619（2）：336-341.

[13] 金诚，陈丽英，吴飞，等 . HPLC 法测定胡黄连苷 I 的表观油水分配系数和平衡溶解度 [J]. 药物分析杂志，2019，39（4）：744-748.

[14] 杨丽，吴东泽，吴莉芳，等 . 盐酸阿替卡因的平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. 暨南大学学报（自然科学与医学版），2016，37（5）：394-397.

[15] 茹则妮萨 • 阿卜杜拉，高惠静，衣来努尔 • 吐依哄，等 . 去氢骆驼蓬碱衍生物 DH-004 在不同介质中平衡溶解度、油水分配系数及解离常数的测定 [J]. 中国新药杂志，2020，29（14）：1660-1665.

[16] Bitter C，Suter-Zimmermann K，Surber C. Nasal drug delivery in humans [J]. Curr Probl Dermatol，2011，40：20-35.

[17] 李爽，谷福根，丛志新，等 . 左乙拉西坦 pH 敏感鼻用凝胶的制备及体外质量评价 [J]. 中国药学杂志，2021，56（7）：559-566.

[18] Washington N，Steele RJC，Jackson SJ，et al. Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers [J]. Int J Pharm，2000，198：139-146.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-03-05）

基于 UPLC-Q-TOF HRMS 技术建立逍遥丸指纹图谱及化学成分鉴定

王雅静[1]，周思倩[1, 2]，冯敏[1]，潘吕婷[1]，赵洪庆[1]，吴娟[1, 2]，邵乐[2]，龙红萍[2*]（1. 湖南中医药大学，长沙　410208；2. 湖南中医药大学第一附属医院，长沙　410007）

摘要：目的　建立逍遥丸的 UPLC-Q-TOF HRMS 指纹图谱并对其主要化学成分进行分析鉴定。**方法**　制备 12 批逍遥丸醇提物样品，采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18（3.0 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱，流动相为乙腈（A）-0.1% 甲酸溶液（B）梯度洗脱，流速为 0.4 mL • min^{-1}，进样量为 2 μL。利用中药色谱指纹图谱相似度评价软件计算 12 批次逍遥丸样品指纹图谱相似度，评价不同批次样品间的质量差异，并对 UPLC-Q-TOF HRMS 技术采集的分子离子峰信息进行分析，通过化合物的精确相对分子质量、保留时间、质谱碎片信息以及对照品比对，分析逍遥丸中主要化学成分。**结果**　建立 12 批逍遥丸 LC-MS 指纹图谱的共有模式，各共有峰间分离度好，12 批逍遥丸指纹图谱相似度均在 0.982 以上，说明不同批次制备工艺较为稳定。采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定了逍遥丸指纹图谱的 35 个共有峰的化学成分，并指认了 11 个成分，其中包括芍药内酯苷、芍药苷、绿原酸等。**结论**　该方法的精密度、准确度、稳定性和重复性良好，建立的 LC-MS 指纹图谱为逍遥丸进一步质量控制和药效物质基础研究提供理论依据。

关键词：逍遥丸；UPLC-Q-TOF HRMS；指纹图谱；化学成分鉴定
中图分类号：R284.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2597-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.008

Fingerprint and identification of chemical constituents in Xiaoyao pills based on UPLC-Q-TOF HRMS

WANG Ya-jing[1], ZHOU Si-qian[1, 2], FENG Min[1], PAN LYU-ting[1], ZHAO Hong-qing[1], WU Juan[1, 2], SHAO Le[2], LONG Hong-ping[2*] (1. *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 2. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410007)

Abstract: Objective To establish the fingerprints of Xiaoyao pills and identify its main chemical components based on UPLC-Q-TOF HRMS. **Methods** Twelve batches of alcohol extract samples of Xiaoyao pills were prepared. The separation was performed on Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (3.0 mm×100 mm, 1.8 μm), and the gradient elution of acetonitrile-methanol-0.1% formic acid was used as the mobile phase at a flow rate of 0.4 mL • min^{-1}. The sample injection volume was 2 μL. Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM was used to evaluate the similarity of 12 batches of sample fingerprints. The chemical components were analyzed by the liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF HRMS). The compounds were identified by relative molecular mass, retention time, mass spectrometry fragmention and comparison with standards. **Results** The similarity of 12 batches of Xiaoyao pills was over 0.982, indicating stable preparation process for different batches. Totally 35 compounds were identified by UPLC-Q-TOF-HRMS, the fingerprints of Xiaoyao pills were established with 11 common peaks,

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2023JJ60489，No.2022JJ40309）；湖南省中医药管理局科研项目（No.B2023135）；湖南省教育厅优秀青年基金（No.21B0371）；湖南中医药大学“双一流”学科建设项目（No.22JBZ025）。
作者简介：王雅静，女，助教，主要从事中药活性成分与新药研究，email：441850457@qq.com　*通信作者：龙红萍，女，副研究员，主要从事中药药效物质基础和新药开发，email：longhongping84@163.com

including albiflorin, paeoniflorin and chlorogenic acid, etc. **Conclusion** The established reference fingerprints of Xiaoyao pills are highly accurate and well separated, which can provide an important basis for the quality control and pharmacodynamic material basis study of Xiaoyao pills.

Key words: Xiaoyao pill; UPLC-Q-TOF HRMS; chromatographic fingerprint; component identification

逍遥丸出自《太平惠民和剂局方》，由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓等 8 味中药组成，有疏肝健脾、养血调经之功效，常用于治疗神经疾病、免疫疾病和妇科疾病，是主治“肝郁脾虚”证候的经典名方[1-3]。目前，对于逍遥丸的研究主要集中在对抑郁、妇科疾病、免疫疾病等患者临床疗效的探讨以及作用机制的研究[4-5]，而关于其质量控制方面的文献报道较少，且逍遥丸在《中国药典》2020 年版中仅以芍药苷作为指标性成分，其质量标准中指控成分单一，缺乏能表征其化学轮廓特征的指纹图谱相关研究，不足以全面反映逍遥丸制剂的整体质量。中药指纹图谱将中药与中药制剂主要成分、组成特征进行系统展示，是中药质量控制的重要手段，已广泛应用于中药多组分复杂体系的质量评价研究[6-9]。基于此，本研究通过建立逍遥丸的指纹图谱，同时应用超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间高分辨质谱（UPLC-Q-TOF-HRMS）对逍遥丸指纹图谱中共有峰的化学成分进行全面表征，以期为其质量控制和评价提供参考。

1　材料

1.1　仪器

Agilent 1290UPLC-6540 Q-TOF 色谱 - 质谱联用仪（美国安捷伦 Agilent 科技公司，配置 MassHunter 质谱工作站和 Mass analysis 质谱数据处理系统），超声仪（上海科导超声仪器有限公司），S-23 高速台式离心机（湖南湘仪仪器有限公司），AUW120D 电子分析天平（日本 SHIMADZU 公司）。

1.2　试药

对照品腺苷（上海同田生物技术有限公司，批号：3080-29-3），芍药苷（批号：107D021）、芍药内酯苷（批号：20200419）、阿魏酸（批号：1135-24-6）、白术内酯Ⅰ（批号：73069-13-3）、Z-藁本内酯（批号：903C021）（北京索莱宝科技有限公司）；柴胡皂苷 a（批号：A20736-09-8）、绿原酸（批号：327-97-9）、甘草苷（批号：551-15-5）（中国食品药品检定研究院），苯甲酰芍药苷（北京亚希尔科技有限公司，批号：38642-49-8）、白术内酯Ⅱ（上海源叶生物科技有限公司，批号：73069-14-4），所有对照品质量分数均大于 98.0%。

逍遥丸（仲景宛西制药股份有限公司，批号为 200423、200511、200530、200714、201031、201104、210308、210322、210415、210529、210722、210914，分别编号为 S1 ～ S12）；色谱甲醇、质谱乙腈（德国 Merck Millipore 公司）；蒸馏水（深圳屈臣氏蒸馏水有限公司）；甲酸（质谱级，美国 Fisher 公司）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18（3.0 mm×100 mm，1.8 μm），流动相由乙腈（A）和水（含 0.05 mmol•L^{-1} 甲酸）（B），梯度洗脱：0 ～ 10 min，5% ～ 15%A；10 ～ 20 min，15% ～ 35%A；20 ～ 30 min，35% ～ 55%A；30 ～ 40 min，35% ～ 85%A；40 ～ 50 min，85% ～ 95%A）；流速：0.4 mL • min^{-1}，进样量：2 μL。

2.2　质谱条件

采用正离子分析模式，离子化方式为电喷雾离子化（ESI），进样分析前采用安捷伦标准调谐液 ESI-L Low Concentration Tuning Mix（G1969-85000）进行准确质量数的校正。一级质谱扫描检测范围：*m/z* 100 ～ 1700，采用氮气为干燥气体，温度为 325 ℃，流速为 6.8 L • min^{-1}；鞘气温度为 350 ℃；毛细管电压为 4.0 kV，Fragment 电压为 30、20、10 eV。

2.3　逍遥丸溶液的制备

2.3.1　供试品溶液的制备　精密称取 12 批逍遥丸粉末各 3.0 g，置于 50 mL 的具塞锥形瓶中，精密加入 30 mL 的甲醇溶液，称重，超声处理 30 min，放冷，加甲醇补足失重，8000 r • min^{-1} 离心 5 min，吸取样品上清液，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得逍遥丸供试品溶液。

2.3.2　对照品溶液的制备　精密称取对照品腺苷、芍药苷、芍药内酯苷、绿原酸、阿魏酸、甘草苷、Z-藁本内酯、苯甲酰芍药苷、柴胡皂苷 a、白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ 11 个对照品各 10 mg，置于 25 mL 量瓶中，加入甲醇 25 mL，超声溶解，静置后定容至刻度，即得质量浓度为 0.4 mg • mL^{-1} 对照品溶液储备液。分别从各量瓶中

取 50 μL 对照品溶液混匀，即得混合对照品溶液。

2.4　方法学考察

2.4.1　精密度试验　取同一供试品溶液（S1），连续进样 6 次，记录色谱图。选择 6 号峰（芍药内酯苷）为参照峰，计算 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差（*RSD*），结果分别为 *RSD* ＜ 0.2% 和 *RSD* ＜ 4.5%，表明仪器精密度良好。

2.4.2　稳定性试验　取 S1 号样品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录色谱图。选择 6 号峰（芍药内酯苷）保留时间和相对峰面积为参考，12 个共有峰相对保留时间的 *RSD* ＜ 1.2% 和相对峰面积的 *RSD* ＜ 4.7%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3　重复性试验　取样品 S1 粉末适量，精密称定 3 份，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图。以 6 号峰（芍药内酯苷）保留时间和相对峰面积为参考，计算 12 个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*，分别为 0.02% ～ 0.68% 和 2.6% ～ 5.0%，表明该方法的重复性良好。

2.5　指纹图谱的建立

2.5.1　共有峰标记　按“2.3.1”项下方法制备的 12 批逍遥丸供试品溶液（样品 S1 ～ S12），进样测定，将数据导入 2012 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行分析，对照图谱采用“中位数”法生成，使用多点校正对色谱峰进行匹配。12 批逍遥丸供试品溶液的指纹图谱见图 1，11 个混合对照品溶液色谱图见图 2。

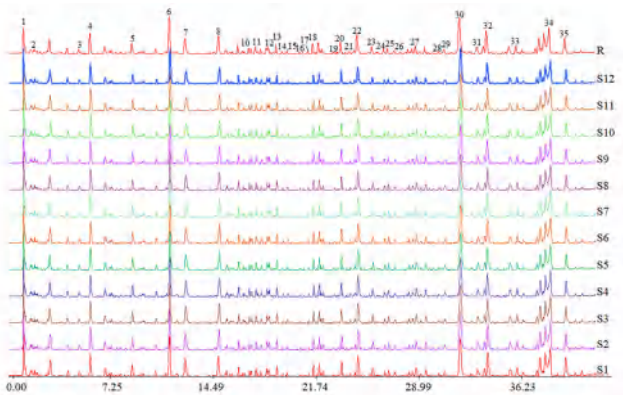


图 1　12 批逍遥丸的指纹图谱（S1 ～ S12）及其对照图谱（R）

Fig 1　Fingerprint map（S1 ～ S12）and reference map（R）of Xiaoyao pills

2.5.2　相似度评价及共有峰归属　选择样品 S1 的谱图作为参照谱图，时间窗宽度设为 0.1 min，选取多个特征峰进行多点校正，自动峰匹配，共标定 35 个共有峰。对 12 批逍遥丸供试品溶液色谱图和对照谱图进行相似度评价，S1 ～ S12 相似度均大于 0.982，表明 12 批次逍遥丸样品制备工艺较为稳定，结果见表 1。对逍遥丸指纹图谱中的 35 个特征峰进行归属，并与混合对照品溶液比对，确定了其中 11 个成分，其中 **2**（腺苷）、**25**（柴胡皂苷 a）号峰来源于柴胡；**5**（绿原酸）、**8**（阿魏酸）、**32**（Z- 藁本内酯）号峰来源于当归；**6**（芍药内酯苷）、**7**（芍药内酯苷）、**18**（苯甲酰芍药苷）号峰来源于白芍；**12**（甘草苷）号峰来源于甘草；**31**（白术内酯Ⅱ）、**33**（白术内酯Ⅰ）号峰来源于白术。

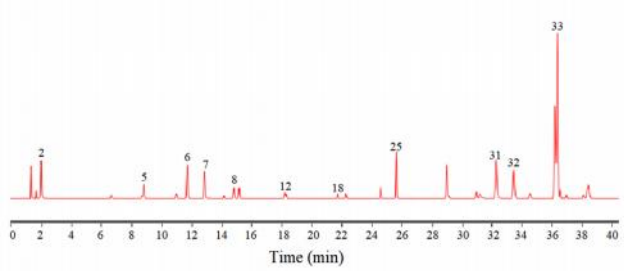


图 2　11 个对照品总离子流图

Fig 2　Total ion flow diagram of 11 reference substance

2. 腺苷（adenosine）；5. 绿原酸（chlorogenic acid）；6. 芍药内酯苷（albiflorin）；7. 芍药苷（paeoniflorin）；8. 阿魏酸（ferulic acid）；12. 甘草苷（liquiritin）；18. 苯甲酰芍药苷（benzoylpaeoniflorin）；25. 柴胡皂苷 a（saikosaponin A）；31. 白术内酯Ⅱ（atractylenolide Ⅱ）；32. *Z*- 藁本内酯（*Z*-ligustilide）；33. 白术内酯Ⅰ（atractylenolide Ⅰ）

2.6　UPLC-Q-TOF HRMS 对共有峰化学成分定性分析

通过使用 Agilent TCM-DATA 中药成分数据库生成分子式、依照误差小于 5×10^{-6} 的原则进行筛选，同时检索中国知网（CNKI），PubMed、Massbank 等数据库，建立逍遥丸药材的化学成分信息库。根据化合物的精确相对分子质量、保留时间及二级质谱信息，以及比对自建中药成分化合物库，并结合文献数据在逍遥丸溶液中共确定 35 个化学成分，其中包括萜类 9 个、黄酮类 7 个、皂苷类 5 个、苯丙素类 3 个、苯酞类 2 个、核苷类 1 个、酚类 1 个、其他类化合物 7 个，结果见表 2。

3　讨论

3.1　色谱条件的考察

在指纹图谱的研究中，色谱条件考察了乙腈 - 甲酸水溶液、甲醇 - 甲酸水溶液、甲醇 - 乙酸水溶液等流动相系统，结果流动相为乙腈 - 甲酸水溶液的梯度洗脱基线平稳，色谱峰分离效果最佳。在色谱柱考察中，分别对比了 3 个不同生产厂家的色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、Waters BEH C18 和 Diamonsil C18，发现 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱分离效果最好。另外，检

表 1　12 批样品峰及其对照峰的相似度表

Tab 1　Similarity of 12 batches sample peaks and their reference peaks

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	R
S1	1.000	0.990	0.989	0.987	0.986	0.987	0.987	0.985	0.983	0.985	0.984	0.984	0.990
S2	0.990	1.000	0.997	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.994	0.995	0.995	0.994	0.998
S3	0.989	0.997	1.000	0.997	0.996	0.998	0.997	0.996	0.996	0.996	0.995	0.995	0.999
S4	0.987	0.996	0.997	1.000	0.997	0.998	0.997	0.997	0.993	0.997	0.996	0.997	0.998
S5	0.986	0.996	0.996	0.997	1.000	0.997	0.997	0.997	0.994	0.995	0.997	0.996	0.998
S6	0.987	0.996	0.998	0.998	0.997	1.000	0.997	0.996	0.995	0.997	0.997	0.996	0.999
S7	0.987	0.996	0.997	0.997	0.997	0.997	1.000	0.996	0.994	0.997	0.997	0.997	0.999
S8	0.985	0.995	0.996	0.997	0.997	0.996	0.996	1.000	0.992	0.995	0.996	0.996	0.998
S9	0.983	0.994	0.996	0.993	0.994	0.995	0.994	0.992	1.000	0.994	0.994	0.993	0.996
S10	0.985	0.995	0.996	0.997	0.995	0.997	0.997	0.995	0.994	1.000	0.997	0.996	0.998
S11	0.984	0.995	0.995	0.996	0.997	0.997	0.997	0.996	0.994	0.997	1.000	0.997	0.998
S12	0.984	0.994	0.995	0.997	0.996	0.996	0.997	0.996	0.993	0.996	0.997	1.000	0.998
R	0.990	0.998	0.999	0.998	0.998	0.999	0.999	0.998	0.996	0.998	0.998	0.998	1.000

表 2　逍遥丸共有峰的 UPLC-Q-TOF-HRMS 化学成分鉴定分析

Tab 2　UPLC-Q-TOF-HRMS chemical composition identification analysis of common peaks

No.	t_R/min	离子模式	分子量	误差 /（$\times 10^{-6}$）	分子式	碎片离子	化合物名	归属	参考文献
1	1.128	M＋H	704.1800	2.32	$C_{29}H_{36}O_{20}$	543.1334，381.0403，248.1137，104.1071	当归多糖	当归	[10]
2*	1.854	M＋H	267.0968	－1.00	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	224.0520，180.1056，161.0290，136.0608	腺苷	柴胡	[11]
3	5.05	M＋H	126.0318	－0.24	$C_6H_6O_3$	109.0285，97.0294，71.0136，53.0388	间苯三酚	当归	[12]
4	5.832	M＋H	152.1201	4.14	$C_{10}H_{16}O$	125.0245，107.0138，97.0636，79.0173	薄荷酮	薄荷	[13]
5*	8.596	M＋H	354.0951	－0.55	$C_{16}H_{18}O_9$	338.1284，332.1448，283.1353，253.1120	绿原酸	当归	[12]
6*	11.434	M＋H	480.1632	1.52	$C_{23}H_{28}O_{11}$	319.1181，197.0804，179.0695，151.0754	芍药内酯苷	白芍	[14]
7*	12.541	M＋NH_4	480.1632	－0.89	$C_{23}H_{28}O_{11}$	357.0658，323.0441，285.0962，197.0809	芍药苷	白芍	[14]
8*	14.525	M＋H	194.0579	－2.27	$C_{10}H_{10}O_4$	177.0544，145.0209，117.0346，79.0512	阿魏酸	当归	[10]
9	15.873	M＋NH_4	632.1738	0.52	$C_{30}H_{32}O_{15}$	564.7287，488.2103，362.1211，315.0722	没食子酰芍药苷	白芍	[14]
10	17.208	M＋H	480.1625	1.31	$C_{23}H_{28}O_{11}$	418.1313，362.1507，310.1060，249.0768	牡丹皮苷Ⅰ	白芍	[14]
11	17.886	M＋H	206.0943	－0.92	$C_{12}H_{14}O_3$	189.0896，179.1040，161.0957，147.0853	4- 羟基 -3- 丁基苯酞	当归	[10]
12*	18.405	M＋H	418.1264	－2.42	$C_{21}H_{22}O_9$	257.0814，239.0507，147.0440，137.0230	甘草苷	甘草	[15]
13	19.035	M＋NH_4	446.2152	－2.03	$C_{21}H_{34}O_{10}$	267.1593，241.0707，145.0494，115.0385	*β*- 蒎 -10- 烯基 -*β*- 巢菜苷	白芍	[14]
14	19.402	M＋H	592.1792	－1.27	$C_{28}H_{32}O_{14}$	447.1282，285.0762，231.1740，129.0546	蒙花苷	薄荷	[13]
15	19.747	M＋H	256.0736	－0.07	$C_{15}H_{12}O_4$	211.0744，183.0804，163.0381，147.0446	甘草素	甘草	[15]
16	20.629	M＋H	284.0686	－0.42	$C_{16}H_{12}O_5$	270.0524，253.0476，225.0549，197.0552	刺槐素	薄荷	[13]
17	20.892	M＋H	984.4566	0.18	$C_{48}H_{72}O_{21}$	809.4372，615.3910，453.3301，266.0614	甘草皂苷 A3	甘草	[15]
18*	21.779	M＋NH_4	584.1894	－1.82	$C_{30}H_{32}O_{12}$	455.0512，371.1777，267.0885，179.0706	苯甲酰芍药苷	白芍	[14]
19	23.013	M＋H	284.0686	－0.93	$C_{16}H_{12}O_5$	270.0524，253.0476，225.0549，197.0552	毛蕊异黄酮	白芍	[14]
20	23.527	M＋H	838.3999	－1.42	$C_{42}H_{62}O_{17}$	645.3617，565.1700，487.3425，469.3320	羟基甘草酸	甘草	[15]
21	24.147	M＋NH_4	926.5239	0.46	$C_{48}H_{78}O_{17}$	909.5225，745.4496，585.4093，421.3451	柴胡皂苷 c	柴胡	[11]
22	24.808	M＋H	822.4038	－4.13	$C_{42}H_{62}O_{16}$	647.3756，453.3353，357.2421，165.1622	甘草酸	甘草	[15]
23	25.727	M＋H	454.3447	－1.15	$C_{30}H_{46}O_3$	437.3398，67.2100，231.1741，189.1636	松苓新酸	茯苓	[16]
24	26.604	M＋H	824.4194	－1.59	$C_{42}H_{64}O_{16}$	613.3746，567.3678，455.3510，409.3455	甘草皂苷 J2	甘草	[15]
25*	26.805	M＋H	780.466	－2.2	$C_{42}H_{68}O_{13}$	603.4099，583.3995，455.3527，437.3421	柴胡皂苷 a	柴胡	[11]
26	27.349	M＋H	176.0837	－2.85	$C_{11}H_{12}O_2$	162.0680，145.0646，137.0592，117.0698	乙酸肉桂酯	白术	[17]
27	28.821	M＋H	368.1263	－0.59	$C_{21}H_{20}O_6$	337.0722，309.0408，297.0406，284.0335	姜黄素	生姜	[18]
28	30.407	M＋H	338.1518	－2.35	$C_{21}H_{22}O_4$	297.1418，245.1167，191.1076，147.0426	甘草查尔酮 A	甘草	[15]
29	30.828	M＋H	354.1104	－0.08	$C_{20}H_{18}O_6$	299.0555，271.0632，229.0891，179.0337	甘草黄酮醇	甘草	[15]
30	31.93	M＋H	366.1103	0.81	$C_{21}H_{18}O_6$	323.0796，309.0453，281.0469，253.0501	甘草酚	甘草	[15]
31*	33.099	M＋H	232.1463	－1.82	$C_{15}H_{20}O_2$	215.1482，187.1492，151.0747，131.0844	白术内酯Ⅱ	白术	[17]
32*	33.82	M＋H	190.0994	1.06	$C_{12}H_{14}O_2$	173.0907，143.0959，130.0723，105.0650	*Z*- 藁本内酯	当归	[12]
33*	35.881	M＋H	230.1307	0.05	$C_{15}H_{18}O_2$	185.1305，161.0579，143.0853，119.0847	白术内酯Ⅰ	白术	[17]
34	38.285	M＋H	190.0994	－1.32	$C_{12}H_{14}O_2$	173.0957，149.0596，115.0535，91.0543	正丁基苯酞	当归	[10]
35	39.345	M＋H	380.1985	0.71	$C_{24}H_{28}O_4$	335.1993，191.1066，145.1015，117.0687	欧当归内酯 A	当归	[12]

注（Note）：“*”为通过与对照品比对（Compared with standards）。

测波长考察了 254 nm 和 300 nm，结果在 254 nm 波长处各成分色谱峰分离较好，且基线峰平稳，故选择其作为检测波长。

3.2　逍遥丸指纹图谱共有峰的鉴定

在 UPLC-Q-TOF HRMS 定性分析研究中，对于质谱条件进行了优化，由于中成药中成分较为复杂，课题组前期采用正、负离子模式对逍遥丸的化学成分进行系统分析，发现逍遥丸中的化学成分在正离子模式下质谱有响应且信号较好，因此，本文的指纹图谱和化合物鉴定均采用正离子模式。本研究采用 UPLC-Q-TOF HRMS 技术共鉴定出逍遥丸指纹图谱中 35 个化学成分，柴胡中以皂苷类成分为主，当归中的成分以单萜类和苯丙素类为主，甘草中的成分多为黄酮类化合物，白术中的成分以倍半萜类为主，白芍中以单萜类为主。现代研究表明逍遥丸中的君药柴胡中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 能显著下调白细胞介素表达水平，减轻 HPA 轴功能障碍的作用 [19]；臣药白芍中的芍药苷和芍药内酯苷能调节神经递质释放、可显著抑制脑内单胺氧化酶的活性，当归中的 Z- 藁本内酯发挥神经保护作用，同时对单胺氧化酶具有一定的抑制作用 [20]，白术、茯苓、甘草、薄荷佐药中薄荷酮能抑制 HPA 轴过度活化，甘草苷、异甘草苷、茯苓多糖能调节单胺类神经递质 [21]。中药复方发挥药效作用是多个成分共同起效的结果，本研究通过采用 UPLC-Q-TOF HRMS 技术，对其指纹图谱共有峰进行精准指认，为后续逍遥丸指标成分的选择提供参考依据。

本研究建立了 12 批逍遥丸指纹图谱，发现了 35 个共有峰，同时结合 UPLC-Q-TOF HRMS 技术快速、准确地分析其化学成分，进一步阐明了逍遥丸的药效物质基础，为建立逍遥丸质量标准提供方法和参考依据。

参考文献

[1] 管庆霞，杨志平，赵梦瑶，等 . 逍遥丸药理研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（7）：228-234.

[2] 胡丽彬，黄胜，颜冬兰，等 . 逍遥丸质量控制技术研究进展 [J]. 中国药业，2021，30（13）：126-128.

[3] 徐少华，宫文霞，秦雪梅 . 逍遥散类制剂质量评价方法的研究进展 [J]. 药物评价研究，2021，44（4）：885-893.

[4] 马晓丽，李莲英 . 逍遥丸联合文拉法辛对气血亏虚型产后抑郁患者的临床疗效 [J]. 中成药，2019，41（9）：2261-2263.

[5] Shi B，Luo J，Fang Y，et al. Xiaoyao pills prevent lipopolysaccharide-induced depression by inhibiting inflammation and protecting nerves [J]. Front Pharmacol，2019，10：1324.

[6] 郭继龙，李若瑜，关伟，等 . 基于血清代谢组学探究逍遥丸干预肝郁脾虚非酒精性脂肪肝的作用机制 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（11）：5446-5450.

[7] 孙耕，徐浩然，于庚原，等 . 基于高效液相色谱的消痞和胃胶囊指纹图谱研究及多组分含量测定 [J]. 中南药学，2023，21（4）：1049-1055.

[8] 肖建才，闫滨滨，万修福，等 . 基于指纹图谱和 UPLC-MS/MS 定量测定对不同产地陈皮的质量评价研究 [J]. 中草药，2023，54（10）：3302-3311.

[9] 赵剑锋，张雪，祁进，等 . 指纹图谱与特征图谱技术在中药配方颗粒国家标准中的应用回顾性分析 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（9）：1278-1281.

[10] 赵雪娇，王海峰，赵丹奇，等 . 当归化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报，2013，30（3）：182-185，221.

[11] 陈亚双，孙世伟 . 柴胡的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 黑龙江医药，2014，27（3）：630-633.

[12] 李曦，张丽宏，王晓晓，等 . 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材，2013，36（6）：1023-1028.

[13] 杨睿，陈炫好，李晋，等 . 薄荷化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天津中医药大学学报，2022，41（1）：4-13.

[14] 任浚萁，刘春明，王乐奇，等 . 白芍化学成分的高效液相色谱 - 电喷雾质谱研究 [J]. 药物分析杂志，2014，34（10）：1727-1731.

[15] 赵艳敏，刘素香，张晨曦，等 . 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药，2016，47（12）：2061-2068.

[16] 赵秋龙，张丽，卞晓坤，等 . UPLC-QTRAP-MS 分析不同产地茯苓药材中 8 个三萜酸类成分 [J]. 药物分析杂志，2020，40（7）：1169-1177.

[17] 刘振浩，王艳萍，朱萍，等 . 滇产白术的化学成分研究 [J]. 中药材，2022，45（8）：1871-1876.

[18] 赵文竹，张瑞雪，于志鹏，等 . 生姜的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技，2016，37（11）：383-389.

[19] 刘敏，孙亚南，于春月，等 . 柴胡皂苷 a 抗抑郁作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2019，34（3）：867-871.

[20] 潘菊华，李多娇，郑军，等 . 当归抗抑郁作用及配伍应用 [J]. 世界中医药，2015，10（2）：290-292，296.

[21] 张碧涛，李媛媛，辛泰然，等 . 逍遥散治疗抑郁症的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，49（4）：112-116.

（收稿日期：2023-06-05；修回日期：2023-07-03）

铝碳酸镁咀嚼片及铝碳酸镁颗粒动态抑酸曲线研究

兰文[1, 3]，王皖[1, 3]，刘雁鸣[1, 3]，刘文利[2]，王彬[2]，谢丽芳[2]，郑金凤[1, 3*]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 天地恒一制药股份有限公司，长沙　410331；3. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点试验室，长沙　410001）

摘要：目的　建立铝碳酸镁制剂动态抑酸曲线的检测方法，评价仿制制剂与参比制剂体外抗酸性能的一致性。**方法**　采用《中国药典》溶出度与释放度测定第三法装置，转速为 150 r • min^{-1}，以水 -0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液（30∶70）100 mL 为初始介质，介质温度为 37.0 ℃；取 6 个制剂单位的样品，分别投入溶出杯中，开启搅拌，并用恒流泵以 1.0 mL • min^{-1} 的流速加入 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液；同时用 pH 计记录杯内溶液 pH 值的变化。**结果**　获得铝碳酸镁制剂的 pH- 时间变化曲线，以 pH 值达 3.0 时间、最大 pH 值和维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 时间三项指标综合评价仿制制剂与参比制剂相似性。**结论**　建立的方法简便、专属性强、可控性好，能较好地区分不同生产工艺产品抗酸行为的差异，在一定程度上反映了该产品的内在质量。

关键词：铝碳酸镁；动态抑酸曲线；一致性评价
中图分类号：R927，R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2602-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.009

Dynamic acid-neutralizing curve of hydrotalcite chewable tablets and particles

LAN Wen[1, 3], WANG Wan[1, 3], LIU Yan-ming[1, 3], LIU Wen-li[2], WANG Bin[2], XIE Li-fang[2], ZHENG Jin-feng[1, 3*] (1. *Hunan Institute for Food and Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *Hinye Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha* 410331; 3. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To establish a method to determine dynamic acid-neutralizing curves of hydrotalcite preparations, and to evaluate the consistency of acid resistance between generic preparations and reference preparations in vitro. **Methods** The dissolution and release determination methods (ChP 2020. Vol Ⅳ 0931 the third method) device was used. The rotation speed was 150 r • min^{-1}, the water-0.1 mol • L^{-1} hydrochloric acid solution (30∶70) 100 mL was used as the initial medium, and the medium temperature was 37.0 ℃ . The samples of 6 preparation units were taken and put into the dissolution cup respectively. The stirring started, and 0.1 mol • L^{-1} hydrochloric acid solution was added at a flow rate of 1.0 mL • min^{-1} with a constant flow pump. At the same time, the change of pH value of the solution in the cup was recorded by pH meter. **Results** The pH-time curves of hydrotalcite preparation was obtained. The similarity between the generic preparations and the reference preparations was comprehensively evaluated with three indexes: the time for pH value to reach 3.0, maximum pH value and time of maintaining pH value at 3.0 ～ 5.0. **Conclusion** This method is simple, specific and controllable, which can distinguish the difference of acid resistance behaviors of products from different process, and reflect the quality of the products.

Key words: hydrotalcite; dynamic acid-neutralizing curve; consistency evaluation

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金项目（No.2021JJ80031）。
作者简介：兰文，女，主任药师，主要从事药品检验工作，email：lan-wen@qq.com　*通信作者：郑金凤，女，副主任药师，主要从事化学药品及药用辅料质量控制与研究，email：332410419@qq.com

铝碳酸镁化学名为碳酸十六羟二铝六镁水合物，分子式为 $Al_2Mg_6(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$，是新型长效抗酸药，其活性成分按层状晶格结构排列[1-2]，为独特的网状结构，具有多种药理作用，最主要的作用为中和胃酸，可使胃 pH 值维持在 3 ～ 5，使 99% 的胃酸被中和，80% 的胃蛋白酶失去活性。该产品具有抗酸作用，且作用迅速，效果温和，作用时间持久[3-4]。

铝碳酸镁为无机化合物，不溶于水，溶于稀盐酸，其进入人体胃肠道后的药效情况主要受限于其中和酸的能力。本文参考并优化了 Rossett-Rice 体外抗酸试验方法[5-7]，以原研地产铝碳酸镁咀嚼片为参比制剂，建立了本品的动态抑酸曲线检测方法，考察其抑酸速率、酸中和能力和酸缓冲容量，以动态抑酸曲线来综合评价国产仿制制剂与原研参比制剂体外抗酸性能的一致性。

1　仪器与试药

ZRS-8GD 型智能溶出仪（天津天大天发科技有限公司）；XP205 电子分析天平（METTLER TOLEDO，精度：十万分之一）；PB-10 型 pH 计（赛多利斯科学仪器有限公司）；BT100-L 型智能恒流泵（常州市科健蠕动泵厂）。

参比制剂：铝碳酸镁咀嚼片（拜耳医药保健有限公司，批号为 JS10103、JS11340、JS12271、JS12272、JS12009 及 JS12062，规格：0.5 g）。

仿制制剂：铝碳酸镁颗粒（A 公司，批号为 210701、210702、210703，规格：0.5 g）；铝碳酸镁咀嚼片（B 公司，批号为 210502、210601；C 公司，批号为 200323；D 公司，批号为 2203252，规格：0.5 g）。

盐酸为分析纯，水为自制超纯水。

2　方法与结果

2.1　动态抑酸曲线试验方法的确定

采用《中国药典》溶出度与释放度测定第三法装置[8]，转速为 150 r • min^{-1}，以水 -0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液（30 ： 70）100 mL 为初始介质，介质温度为 37.0 ℃；取 6 个制剂单位的样品，分别投入溶出杯中，开启搅拌，并用恒流泵以 1.0 mL • min^{-1} 的流速加入 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液；同时用 pH 计记录杯内溶液 pH 值的变化。前 2 min 以 10 s 为单位记录溶液的 pH 值，2 min 后以 1 min 为单位持续记录溶液的 pH 值，记录至溶液 pH 值小于 3.0 之后的 5 min 即可结束。方法开发过程如下。

2.1.1　仪器的选择　采用 Rossett-Rice 体外抗酸试验方法，磁力搅拌，转速为 400 r • min^{-1}，考虑到磁力搅拌设备无法进行转速确认，同时搅拌转速过快可能导致反应过快，影响评价指标的区分能力。因此，本文参考相关文献[6]将仪器调整为溶出仪，采用溶出度与释放度测定法第三法装置进行测定。

2.1.2　盐酸溶液加入速度考察　在 Rossett-Rice 体外抗酸试验方法中，0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液的加入速度为 2.0 mL • min^{-1}，但其样品加量为 2 个制剂单位，考虑到单位制剂之间可能存在差异，且加入速度过快可能导致反应过快，影响评价指标的区分能力，故本文考察了不同盐酸溶液加入速度（2.0、1.0 mL • min^{-1}）对检测结果的影响。取参比制剂（批号：JS10103），除盐酸溶液加入速度外，按“2.1”项下方法测定，结果表明，当 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液的加入速度由 2.0 mL • min^{-1} 降低为 1.0 mL • min^{-1} 时，溶液 pH 值达 3.0 的时间均为 53 s，最大 pH 值分别为 3.79 及 3.83，无明显差异；但维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间由 19 min 显著延长为 43 min，为了更有利于区分不同产品间的差异，故拟订加入速度为 1.0 mL•min^{-1}。

2.1.3　溶出仪转速考察　考虑到搅拌转速过快可能导致反应过快，影响评价指标的区分能力，故本文考察了不同转速（200、150 及 100 r • min^{-1}）对检测结果的影响。取参比制剂（批号：JS10103），除溶出仪转速外，按“2.1”项下方法测定，结果表明，当转速由 200 r • min^{-1} 降低为 100 r•min^{-1}时，溶液最大 pH 值分别为 3.83、3.85 及 3.80，无明显差异；pH 值达 3.0 的时间略有增加，分别为 53 s、57 s 及 70 s；维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间延长，分别为 43 min、48 min 及 55 min；转速为 100 r • min^{-1} 时杯底样品存在堆积的现象。考虑到在溶出杯底无明显颗粒堆积的情况下，降低转速可在一定程度上延长溶液维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间，从而更有利于区分不同产品间的差异，故拟订转速为 150 r • min^{-1}。

2.1.4　盐酸溶液加入时的恒流泵管径考察　考虑到在流速较小时，恒流泵管径过大可能会影响盐酸溶液加入速度的控制精度，故本文考察了不同内径（0.5 cm 和 0.8 mm）对检测结果的影响。取参比制剂（批号：JS10103），按“2.1”项下方法测定，结果表明，蠕动泵管内径由 5 mm 和 0.8 mm 时，溶液 pH 值达 3.0 的时间分别为 60 s 及 63 s，最大 pH 值分别为 3.85 及 3.79，无明显差异；但维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间由 47 min 延长为 57 min。考虑到蠕动泵长时间运行时，泵管内径越小，流速的波动

越小且控制精度越高，故拟订 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液加入时使用的蠕动泵管内径为 0.8 mm。

2.1.5　投样方式考察　Rossett-Rice 体外抗酸试验投样方式为整片完整制剂，但参比制剂为片剂，而仿制制剂有片剂、颗粒剂，两者存在剂型差异；参考《中国药典》2020 年版二部铝碳酸镁咀嚼片制酸力检查法 [9]，考虑将完整制剂研磨成细粉过 5 号筛再投样可排除剂型差异对检测结果的影响，故本文对两种投样方式进行了考察。取参比制剂（批号：JS10103），按“2.1”项下方法测定，结果表明，整片完整制剂及细粉投样时，最大 pH 值分别为 3.80 及 3.92，溶液 pH 值维持 3.0 ～ 5.0 的时间分别为 57 min 及 56 min，无明显差异；溶液 pH 值达 3.0 的时间分别为 61 s 及 25 s，存在一定差异，与咀嚼片存在一定的崩解时间有关。由此可知，参比制剂为速崩制剂，咀嚼后咽下或直接吞服在临床上应无明显差异。考虑到研细后投样会破坏制剂的完整性，掩盖部分处方工艺信息，本文采用完整制剂投样方式进行动态抑酸曲线考察。

2.1.6　记录时间点考察　由“2.1.2 ～ 2.1.5”项下考察结果可知，前 2 min 样品溶液 pH 值变化显著，故拟订记录时间点前 2 min 以 10 s 为单位进行记录；此外还需考察样品溶液 pH 值维持 3.0 ～ 5.0 的时间，2 min 后以 1 min 为单位持续记录至溶液 pH 值小于 3.0 后的 5 min，可有效监测溶液 pH 值变化，从而可有效记录溶液 pH 值降至约为 3.0 的时间点，也可有效确定溶液 pH 值降至小于 3.0 后是否会再回升，进而可准确统计溶液 pH 值维持 3.0 ～ 5.0 的时间。综上，确定动态抑酸力法的记录时间点为 0 ～ 2 min 以 10 s 为单位连续记录，2 min 后以 1 min 为单位连续记录，记录至溶液 pH 值小于 3.0 之后的 5 min 即可结束。

2.1.7　专属性考察　取空白介质及空白辅料混粉，依法测定，结果显示空白介质的 pH 值保持在 1.15 ～ 1.04，空白辅料混粉的 pH 值保持在 1.10 ～ 1.06，与 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液的 pH 值基本一致，空白介质和空白辅料对试验结果无影响。

2.2　一致性评价指标的确定

临床上理想的抗酸药应符合下列条件：① 具有较快的中和速度和较长的作用时间，控制胃液 pH 的时间应达 1 h；② 控制胃液 pH 值在 3 ～ 5，因 pH 值过高，会引起胃酸反弹；③ 无腹泻、便秘等不良反应 [10-11]。因此，抑酸速率、酸缓冲容量及酸中和能力是评价抗酸药物的重要参数 [12]。本文以动态抑酸力 pH 值达 3.0 的时间、最大 pH 值和维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间为考察指标，以维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间为关键评价指标，采用独立样本 *t* 检验对仿制制剂和参比制剂维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间进行比较。动态抑酸曲线 pH 值达 3.0 的时间不慢于参比制剂、最大 pH 值不小于参比制剂、维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 的时间不显著短于参比制剂（$P > 0.05$），即认为仿制制剂与参比制剂相似。

2.3　样品的测定

取 1 家公司的铝碳酸镁颗粒及 3 家公司的铝碳酸镁咀嚼片共 7 批样品，依法测定动态抑酸曲线，并与 6 批参比制剂比较，结果见图 1 及表 1。

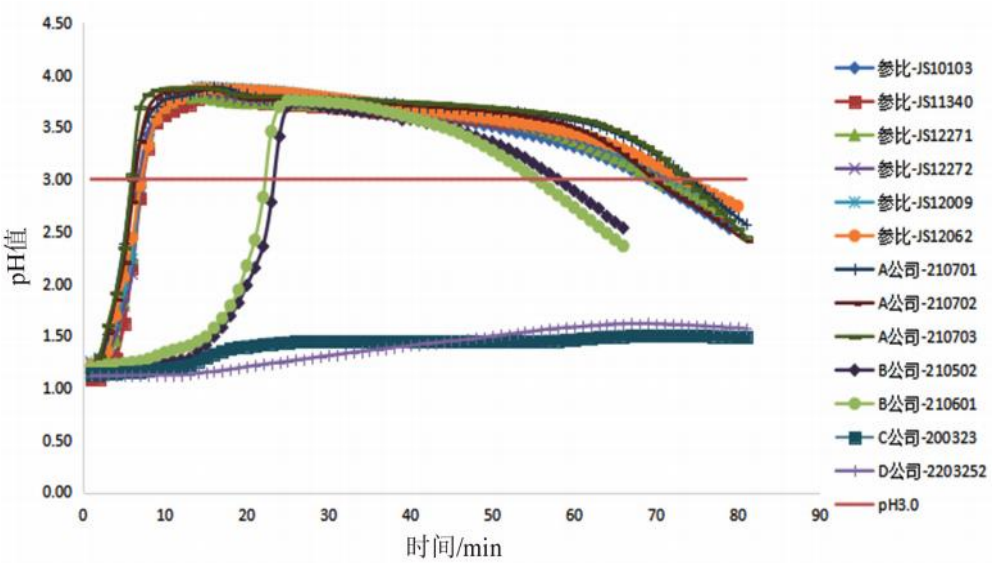


图 1　动态 pH 值 - 时间曲线图

Fig 1　Dynamic pH-time curve

表 1　不同生产企业仿制制剂与参比制剂动态抑酸曲线结果

Tab 1　Dynamic acid-neutralizing curve of generic and reference preparations from different manufacturers

生产企业		批号	实验现象	动态抑酸曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）			P 值
				pH 值达 3.0 时间 /s	最大 pH 值	维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 时间 /min	
参比制剂		JS10103	1 min 内完全崩散	60.8±5.6	3.80±0.05	57.3±4.0	0.11
		JS11340		61.8±2.7	3.79±0.03	59.1±1.7	0.76
		JS12271		60.0±2.8	3.82±0.03	58.2±2.9	0.30
		JS12272		59.2±5.1	3.85±0.02	60.7±1.8	0.35
		JS12009		62.0±2.8	3.89±0.02	60.3±2.3	0.53
		JS12062		61.5±8.3	3.87±0.02	61.5±3.0	0.14
仿制制剂	A 公司	210701	迅速完全崩散	51.2±8.3	3.90±0.04	62.1±3.9	0.06
		210702		55.0±7.1	3.87±0.03	58.6±6.1	0.55
		210703		50.8±3.1	3.89±0.03	61.8±2.9	0.08
	B 公司	210502	先溶胀，再溶蚀型溶散，完全崩散时间为 11 ～ 14 min	738.0±31.3	3.74±0.02	34.4±1.2	0.00
		210601		681.7±25.6	3.76±0.02	32.6±1.5	0.00
	C 公司	200323	先溶胀，再溶蚀型溶散，记录至 70 min 时仍有少部分片子未完全崩散	0	1.54±0.07	0	0.00
	D 公司	2203252	呈溶蚀型溶散，记录至 70 min 时仍有少部分片子未完全崩散	0	1.62±0.07	0	0.00

3　讨论

3.1　试验结果分析

从以上动态抑酸曲线试验结果中可以得出以下结论：① 参比制剂铝碳酸镁咀嚼片起效快，约 1 min，作用持久，pH 值在 3.0 ～ 5.0 约为 1 h，且批间差异小，是很好的抗酸药；② A 公司仿制的铝碳酸镁颗粒的 pH 值达 3.0 时间、最大 pH 值和维持 pH 值 3.0 ～ 5.0 时间三项指标与参比制剂基本一致；③ B 公司仿制的铝碳酸镁咀嚼片起效相对较慢，约 12 min，作用时间明显短于参比制剂；④ C、D 公司的产品 70 min 内 pH 值均未达到 3.0，与参比制剂存在显著差异。

3.2　产品差异原因分析

本次试验中观察到不同厂家的制剂在介质中 1 min 内的崩散的情况有很大差别，参比制剂与 A 公司产品 1 min 内迅速崩散，而 B、C、D 公司产品先溶胀，再呈溶蚀型溶散，无法达到快速溶出的效果，从而影响到药物起效的速度及有效药物浓度的持续时间。虽然咀嚼片是咀嚼服用，但服药人的咀嚼程度不同，而崩解速度可以在一定程度上反映产品在体内的崩解情况，与药物的疗效有直接的相关性。

3.3　小结

本文建立的动态抑酸曲线方法简便、专属性强、可控性好，能较好地区分不同生产工艺产品抗酸行为的差异，可用于抗酸药物的比较、产品的处方工艺筛选和仿制药物体外质量一致性评价。

参考文献

[1] 孙儒品，薛淑英，于中麟，等 . 铝碳酸镁——新一代抗酸药 [J]. 中国药学杂志，1995，30（2）：122-123.

[2] 杨波，王国清 . 抗酸药研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报，2001，18（2）：148-151.

[3] 梅勇，王国华，刘萍，等 . 一种铝碳酸镁片及其制备方法：CN 102151286 B [P]. 2012-09-05.

[4] 张壹，苏跃林，沈浩，等 . 一种铝碳酸镁片：CN 102813634 B [P]. 2013-06-12.

[5] 刘迎春，王国清，张辉，等 . 几种无机抗酸剂体外抗酸性能的测试及评价 [J]. 中国医院药学杂志，2006，26（3）：357-358.

[6] 刘天扬，杨杨，吴雨川，等 . 铝碳酸镁片及咀嚼片的制酸速度研究 [J]. 药物分析杂志，2017，37（11）：2087-2092.

[7] 吴雨川，于新颖，刘天扬，等 . 碳酸钙胶囊制酸力检测方法的建立 [J]. 黑龙江医药，2014，27（3）：480-483.

[8] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：132-137.

[9] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：1461.

[10] Nail SL，White JL，Hem SL. I R Studies of development of order in aluminum hydroxide gel [J]. J Pharm Sci，1976，65：231-234.

[11] 张筱红，刘天扬 . 抗酸药制酸力检验项目的规范化 [J]. 中国药品标准，2011，12（5）：323-325.

[12] 刘天扬，于新颖，寻延滨，等 . 抗酸药关键质属性表征与质量评价 [J]. 中国药品标准，2017，18（1）：13-15.

（收稿日期：2023-06-14；修回日期：2023-07-26）

基于 TLR4、NF-κB 信号通路探讨当归拈痛汤治疗痛风性关节炎的作用机制

刘毓，杨钊田*，孙理军（陕西中医药大学，陕西　咸阳　712046）

摘要：目的　通过网络药理学方法探讨当归拈痛汤改善痛风性关节炎（GA）的作用机制，并通过动物体内实验验证分析。**方法**　通过 TCMSP 数据库筛选当归拈痛汤的活性成分，并检索对应靶点，在 GeneCards、OMIM 等数据库检索 GA 的相关靶点。利用韦恩图得到药物 - 疾病交集靶点，用 Cytoscape 3.6.1 软件分别构建“中药 - 活性成分 - 靶点”作用网络及 PPI 蛋白互作网络。用 R 语言对交集靶点进行 GO 和 KEGG 分析。结合网络药理学分析结果，采用注射尿酸钠晶体溶液诱导建立 GA 大鼠模型，验证当归拈痛汤改善 GA 可能的分子机制。**结果**　确定当归拈痛汤治疗 GA 的活性成分 315 个，治疗靶点 110 个，PPI 网络筛选得到 20 个核心靶点。GO 分析表明靶点主要涉及 DNA 结合转录因子结合、磷酸酶结合和 RNA 聚合酶Ⅱ特异性 DNA 结合转录因子结合等多种生物过程；KEGG 分析提示 NF-κB、Toll 样受体及 TNF 信号通路在当归拈痛汤治疗 GA 过程中起着关键作用。动物实验表明，与空白对照组相比，模型对照组关节肿胀度显著升高，血清中 IL-1β、TNF-α、IL-13 水平升高；血清 UREA、CREA 无明显差异；关节滑膜组织 HE 染色显示模型对照组滑膜细胞增生，局部细胞变性坏死，大量炎性细胞浸润；TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达明显上调。与模型对照组相比，各给药组关节肿胀度均有降低；血清中 IL-1β、TNF-α 水平均降低，IL-13 差异无统计学意义；关节滑膜组织 HE 染色显示双氯芬酸钠组与当归拈痛汤组较模型对照组炎性细胞浸润明显减少。TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达双氯芬酸钠组、当归拈痛汤组较模型对照组明显降低。**结论**　当归拈痛汤可能通过调节 NF-κB、Toll 样受体及 TNF 等信号通路上相关蛋白表达改善 GA。

关键词：当归拈痛汤；痛风性关节炎；作用机制；网络药理学
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2606-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.010

Mechanism of Danggui Niantong decoction for gouty arthritis based on TLR4 and NF-κB signaling pathway

LIU Yu, YANG Zhao-tian*, SUN Li-jun (*Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective　To determine the mechanism underlying the therapeutic effect of Danggui Niantong decoction on gouty arthritis (GA) with network pharmacological methods and validate it via in vivo animal experiments. **Methods**　The active components of Danggui Niantong decoction were screened in the TCMSP database, and their corresponding targets were identified. Relevant targets for GA were searched in GeneCards, OMIM, and other databases. Drug-disease intersection targets were obtained with a Wayne diagram, and an interaction network between traditional Chinese medicine active ingredients and their targets as well as a protein-protein interaction network were established with Cytoscape 3.6.1 software. GO and KEGG analysis was performed on intersection targets by R language. Based on the network pharmacological analysis, we established a rat model of GA by

基金项目：陕西中医药大学附属医院青年培育项目（No.2020QN014）；陕西省教育厅重点研究项目（No.SMZX202102）；陕西省教育厅重点实验室项目（No.19JS014）。
作者简介：刘毓，男，硕士研究生，主要从事中医体质理论的实验及临床应用研究，email：liuyu971215@163.com　*通信作者：杨钊田，男，博士，主要从事风湿病的中医药防治研究，email：gsqybh@163.com

injecting sodium urate crystal solution to verify the possible molecular mechanism of the efficacy of Danggui Niantong decoction for GA. **Results** Totally 315 active ingredients and 110 therapeutic targets were identified. Additionally, a protein-protein interaction (PPI) network was established to select 20 core targets. Gene ontology (GO) analysis revealed that these targets primarily participated in various biological processes, including DNA binding transcription factor binding, phosphatase binding, and RNA polymerase Ⅱ specific DNA binding transcription factor binding. Furthermore, KEGG analysis indicated that the NF-*κ*B, Toll-like receptors, and TNF signaling pathways played pivotal roles in the therapeutic effect of Danggui Niantong decoction on GA. Animal experiments demonstrated significant joint swelling and elevated levels of serum IL-1*β*, TNF-*α*, and IL-13 in the model group as compared with those in the blank group. Histological examination with HE staining revealed synovial cell proliferation as well as degeneration and necrosis of local cells accompanied by infiltration from numerous inflammatory cells in the model group. Moreover, upregulation of TLR4 and NF-*κ*B-p65 protein expression levels was significantly. Compared with the model group, each medication group demonstrated a reduction in the degree of joint swelling. Levels of IL-1*β*, TNF-*α* decreased in the serum, while there was no significant difference in IL-13. HE staining revealed reduced inflammatory cell infiltration in both the diclofenac sodium group and Danggui Niantong decoction group as compared with the model group. Expression levels of TLR4 and NF-*κ*B-p65 protein in the model group were significantly lower than both the sodium bifenate group and Danggui Niantong decoction groups. **Conclusion** Danggui Niantong decoction may modulate the expression of relatd proteins in signaling pathways to ameliorate GA, including NF-*κ*B, Toll-like receptor, and TNF pathways. These findings provide a theoretical and practical foundation for the clinical application of Danggui Niantong decoction.

Key words: Danggui Niantong decoction; gouty arthritis; mechanism of action; network pharmacology

痛风性关节炎（gouty arthritis，GA）是由于嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄减少致使尿酸盐在关节囊、滑膜囊、软骨、骨质等处沉积结晶而引起的慢性关节炎[1]，证属中医学“痹证”范畴，发作时关节红肿热痛，湿热蕴结、阻滞关节等是其基本病机[2-4]。目前，GA急性发作期的主要治疗方法包括抑制炎症反应、促进尿酸排泄，但临床效果不理想，不良反应明显[5]。当归拈痛汤具有清热利湿、疏风止痛的效果，治疗GA有较好的疗效[6]。基于此，本研究利用网络药理学方法挖掘当归拈痛汤改善GA的潜在作用靶点及信号通路，结合体内实验验证，探讨当归拈痛汤对GA的作用机制，为当归拈痛汤用于临床治疗提供理论基础和依据。

1　材料

1.1　试药

当归拈痛汤组成为羌活15 g，防风9 g，升麻3 g，葛根6 g，麸炒白术3 g，当归9 g，党参6 g，甘草15 g，苦参6 g，黄芩3 g，盐知母9 g，茵陈15 g，猪苓9 g，盐泽泻9 g，苍术9 g（陕西中医药大学第二附属医院）。双氯芬酸钠缓释片（规格：75 mg/片，北京诺华制药有限公司，批号：H10980297）。尿酸钠盐（MSU，美国Sigma公司，货号：U2875-5G），HE染液（珠海BASO公司，货号BA4025），Anti-NF*κ*Bp65（RELA）抗体（武汉boster公司，货号A00284-1），抗兔/抗小鼠二抗（上海威奥公司，货号WB0177/WB0176），IL-1*β*、IL-13 ELISA试剂盒（武汉boster公司，货号分别为EK0393、EK0900），TNF-*α* ELISA试剂盒（NOVUS公司，货号VAL902）。

1.2　动物

SPF级雄性SD大鼠24只，体重（200±20）g [成都达硕实验动物有限公司，动物生产许可证号：SCXK（川）2020-030]，22～27℃饲养于陕西中医药大学中药药理实验室动物房，动物自由饮水摄食。本研究中动物实验经陕西中医药大学动物伦理委员会批准同意（批件号：SUCMDL20210305006）。

1.3　仪器

BX51显微镜（日本奥林巴斯），165-8001电泳仪、170-3930转膜仪（美国Bio-Rad），TL-2010S组织匀浆器（北京鼎昊源公司），Fresco21台式高速冷冻离心机、MutiskanTM GO全波长酶标仪（美国Thermo），TGL-16B高速台式离心机（上海安

亭公司），BS-220 生化分析仪（深圳迈瑞公司）。

2　方法

2.1　网络药理学预测

2.1.1　当归拈痛汤方有效成分及靶点的筛选　当归拈痛汤由羌活、防风、升麻、葛根、白术、当归、党参、甘草、苦参、黄芩、知母、茵陈、猪苓、泽泻、苍术十五味药组成，通过 TCMSP（https://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php）数据库获得方中各中药的化学成分，并以口服生物利用度（OB）≥ 30% 及类药性（DL）≥ 0.18 进行活性成分筛选。

2.1.2　GA 的候选靶点的筛选　分别在 OMIM（https：//www.omim.org/）和 GeneCards（https：//www.genecards.org/）数据库以“gouty arthritis”为检索词进行检索，获得 GA 的相关靶点基因。对两数据库检索结果进行筛选合并去重，得到疾病相关靶点。

2.1.3　PPI 蛋白相互作用网络构建　将当归拈痛汤与 GA 的共同靶点导入 STRING（https：//string-db.org/cgi/input.pl）数据库中，以人为目标物种，生成 TSV 文件。最终将其导入 Cytoscape 3.6.1 软件中构建蛋白互作网络（PPI）。

2.1.4　关键靶点 GO 分析及 KEGG 富集分析　为了探究当归拈痛汤在治疗 GA 过程中涉及到的生物学功能和途径，本研究使用 R 语言对候选靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析，*P* 值小于 0.05 的 GO 术语或 KEGG 通路被认为是有显著意义的。

2.2　实验用药制备

2.2.1　MSU 溶液的制备　将 1000 mg MSU，充分研磨后，加入 36 mL 0.9% 氯化钠溶液，再加入 4 mL 吐温 -80（两者体积比为 9∶1），再加入 1 mL 1.5 mol • L^{-1} NaOH，加热搅拌，配制成 25 mg•mL^{-1} 的 MSU 混悬液，4 ℃保存，用前摇匀。

2.2.2　双氯芬酸钠混悬液的制备　将 200 mg 双氯芬酸钠缓释片溶于 299 mL 超纯水中，制成质量浓度为 0.67 mg • mL^{-1} 的双氯芬酸钠混悬液，密封。

2.2.3　当归拈痛汤制备　称取处方量中药饮片，于煎药煲中加入 800 mL 蒸馏水将各味药物浸泡 30 min。武火煮沸后转文火煎煮 40 min，将药液倒出备用。往药煲中加入 600 mL 蒸馏水进行二次煎煮，武火煮沸后文火煎煮 30 min。将两次煎煮所得药液混合，纱布过滤后转移至旋转蒸发仪中浓缩至 0.56 g • mL^{-1}。冷却后装入灭菌 50 mL 离心管中－ 20 ℃保存备用。

2.3　实验分组及造模

将 24 只雄性 SPF 级 SD 大鼠标准饲料适应性喂养 1 周后进行编号（1 ～ 24 号），采用随机数字表法分为空白对照组、模型对照组、双氯芬酸钠组、当归拈痛汤中药组，每组各 6 只。除空白对照组外，其余 3 组大鼠参照 Coderre 等 [7] 造模方法予大鼠右后侧踝关节一次性注射 25 mg•mL^{-1} MSU 溶液 0.2 mL，建立急性 GA 模型，以关节囊对侧鼓起为注入标准。空白对照组大鼠右后侧踝关节注射 0.2 mL 生理盐水。于造模后开始灌胃给药，每日 1 次，灌药周期参照临床治疗周期，共 7 d。

验证造模成功的标准：肉眼观察造模后大鼠右踝关节明显红肿、行走缓慢。炎症高峰时可见造模关节较健侧关节红肿明显，皮温升高，骨性标志消失，足爪卷曲、行走迟缓，严重者后肢过度俯曲跛行，甚则表现为三足步态，提示造模成功。

2.4　实验给药

双氯芬酸钠组按成人每日双氯芬酸钠缓释片常用量 150 mg，依据人与大鼠的体表面积转换系数，按照成人体重 70 kg 换算得出每日药物用量为 13.39 mg • kg^{-1}；大鼠当归拈痛汤组药量为每日 11.25 g • kg^{-1}；空白对照组与模型对照组予 0.9% 氯化钠溶液灌胃。各组灌胃量均为 20 mL/（kg • d）(5 mL）。

2.5　实验取材与检测

2.5.1　一般情况　观察大鼠精神、毛发、行动、饮食、排便、死亡等情况。

2.5.2　关节肿胀度测定　造模前，在大鼠右踝关节上方 0.5 mm 处用记号笔划一条清晰的直线，用自制简易足趾容积测量装置分别于造模前（0 h）、造模后 4、8、24、48、72 h 测定大鼠关节容积（将 10 mL 针筒和 2.5 mL 针筒相连接，将大鼠右后肢按照划线放入 10 mL 针筒内，读数，另一侧 2.5 mL 针筒液面的前后差值即为足趾容积值）。

关节肿胀度＝造模后各时间点关节容积－造模前关节容积。

2.5.3　样本采集　给药结束后所有大鼠禁食 12 h，不禁水，随后处死取材，腹腔注射水合氯醛麻醉，麻醉剂量为 9 mg • kg^{-1}，腹主动脉取血，血液静置 1 ～ 2 h，离心 15 min（4 ℃、3500 r • min^{-1}，离心半径 15.7 cm），吸取上层血清，分装，－ 20 ℃保存。以大鼠受试踝关节为中心，常规备皮、消毒，切取关节囊，分离滑膜组织，保存所需组织。

2.5.4　肝功能、肾功能、IL-1*β*、IL-13、TNF-*α* 检测　以全自动生化分析仪检测大鼠肝功能 [谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）]、肾功能 [尿素（UREA）和肌酐（CREA）] 水平。按试

剂盒说明，常规方法测定大鼠血清中 IL-1β、IL-13、TNF-α 的浓度。

2.5.5　关节滑膜组织病理学观察　取各组大鼠关节滑膜组织多聚甲醛固定 24 h 后脱水，依次进行脱水、石蜡包埋、切片，载玻片固定后脱蜡、乙醇梯度脱水、蒸馏水浸洗后苏木素浸染 3 min，伊红浸染 1 s，脱水烘干后中性树胶封片，于光学显微镜下观察。

2.5.6　关节滑膜组织 TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达检测　提取关节滑膜组织总蛋白，BCA 法测定组织蛋白浓度，将所有样本蛋白调整至同一浓度后，100 ℃使蛋白变性，5 min 后放置于冰上冷却，离心取上清液。以每孔 10 μL 上样，进行电泳，待指示剂到达距凝胶下端约 0.5 cm 处时取出胶板，并在低温条件下转膜，转膜结束立即取出 PVDF 膜，放置于 5%BSA 室温封闭，2 h 后，用 1×TBST 洗膜 3 次，5 次 • min^{-1}。加入抗体 TLR4（1∶1000）、NF-κB（1∶1000）、β-actin（1∶2000），4 ℃孵育过夜，1×TBST 清洗 3 次，5 次 • min^{-1}。加入 HRP 标记的山羊抗鼠二抗（1∶2000），室温孵育 2 h，1×TBST 清洗 5 次，15 次 • min^{-1}。配制化学发光检测试剂（试剂 A∶试剂 B ＝ 1∶1）并与膜孵育 2 min，曝光显影。以 β-actin 蛋白表达量进行校正，借助 Image J 软件分析各蛋白灰度值。

2.6　统计分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，计量资料呈正态分布，用平均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组数据比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间两两比较，若方差齐，采用 LSD 法；方差不齐，采用 Tamhane’s T2 法。偏态分布资料以中位数（四分位数间距）[M（Q_{25}，Q_{75}）] 表示，采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学研究

3.1.1　当归拈痛汤活性成分及候选靶点的筛选　从 TCMSP 数据库中筛选出来自 15 种中药的 315 个活性成分。检索结果表明羌活中活性成分 15 个，防风中 18 个、升麻中 17 个、葛根中 4 个、白术中 7 个、当归中 2 个、党参中 21 个、甘草中 92 个、苦参中 45 个、黄芩中 36 个、知母中 15 个、茵陈中 13 个、猪苓中 11 个、泽泻中 10 个、苍术中 9 个。通过 TCMSP 数据库检索并删除重复靶点后，共获得 253 种活性成分的潜在作用靶点。同时，从 GeneCards 及 OMIM 数据库中共获得疾病靶点 1762 个，并将活性成分潜在作用靶点和 GA 相关靶点均转换成标准基因名。Venn 交集处理之后获得两者的共同靶点 110 个，这些靶点被认为是当归拈痛汤治疗 GA 的候选靶点。“中药 - 活性成分 - 靶点”网络中含有 311 个节点和 1194 条边。在该网络中，从活性成分角度来看，甘草异黄酮（licoisoflavone，63343-94-2）、汉黄芩素（wogonin，632-85-9）、磷脂查尔酮（glypallichalcone，146763-58-8）、鳞叶甘草素 A（glepidotin A，42193-83-9）、粗毛甘草素 C（glyasperin C，142474-53-1）等可能是当归拈痛汤治疗 GA 的关键活性成分。

3.1.2　当归拈痛汤治疗 GA 的 PPI 网络分析　为了探究共同靶点之间的互作关系，将其导入 STRING 数据分析平台，以人为目标物种，生成 TSV 文件。用 Cytoscape 3.6.1 软件构建 PPI，如图 1 所示共得到 108 个有效节点，1867 条边，节点越大表明靶点 degree 值（度值）越高，在 PPI 网络中，度值较高的蛋白在中心关联中起着重要的作用。以度值大小作为评价指标，获得排名前 20 的候选靶点，分别是 VEGFA、STAT3、PTGS2、PPARG、VCAM1、RELA、MMP9、MYC、NFKBIA、STAT1、SERPINE1、PPARA、MMP2、MTOR、IL-6、NOS3、SELE、JUN、SPP1、MAPK3。

3.1.3　高频药物的 GO 分析和 KEGG 分析　通过使用 R4.1.1 数据包对所筛选出的基因列表进行 GO 富集分析功能，选取 $P < 0.01$ 的 20 条通路得到气泡图，见图 2。分子功能中排名前 3 的分别是 DNA 结合转录因子结合、磷酸酶结合和 RNA 聚合酶Ⅱ特异性 DNA 结合转录因子结合。生物过程排名前 3 的分别是对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应和对营养水平的反应。细胞成分排名前 3 的是膜筏、膜微区和囊泡腔。

通过 KEGG 通路富集筛选得到 175 条信号通路，故选取 $P < 0.01$ 的 30 条通路，见图 3。经过 KEGG 通路富集筛选，选取与 GA 相关的通路，发现疾病相关基因在 NF-κB 信号通路（NF-κB signaling pathway）、Toll 样受体信号通路（Toll-like receptor signaling pathway）及 TNF 信号通路（TNF signalingpathway）上富集的较多。

3.2　动物实验验证

3.2.1　一般情况　造模前各组大鼠精神良好，反应迅捷，毛发有光泽，饮食排便正常。造模后，除空白对照组外，其余各组大鼠均出现不同程度的右踝关节红肿、足爪卷曲、行走迟缓、跛行，甚至表现为三足步态。模型对照组与给药组大鼠

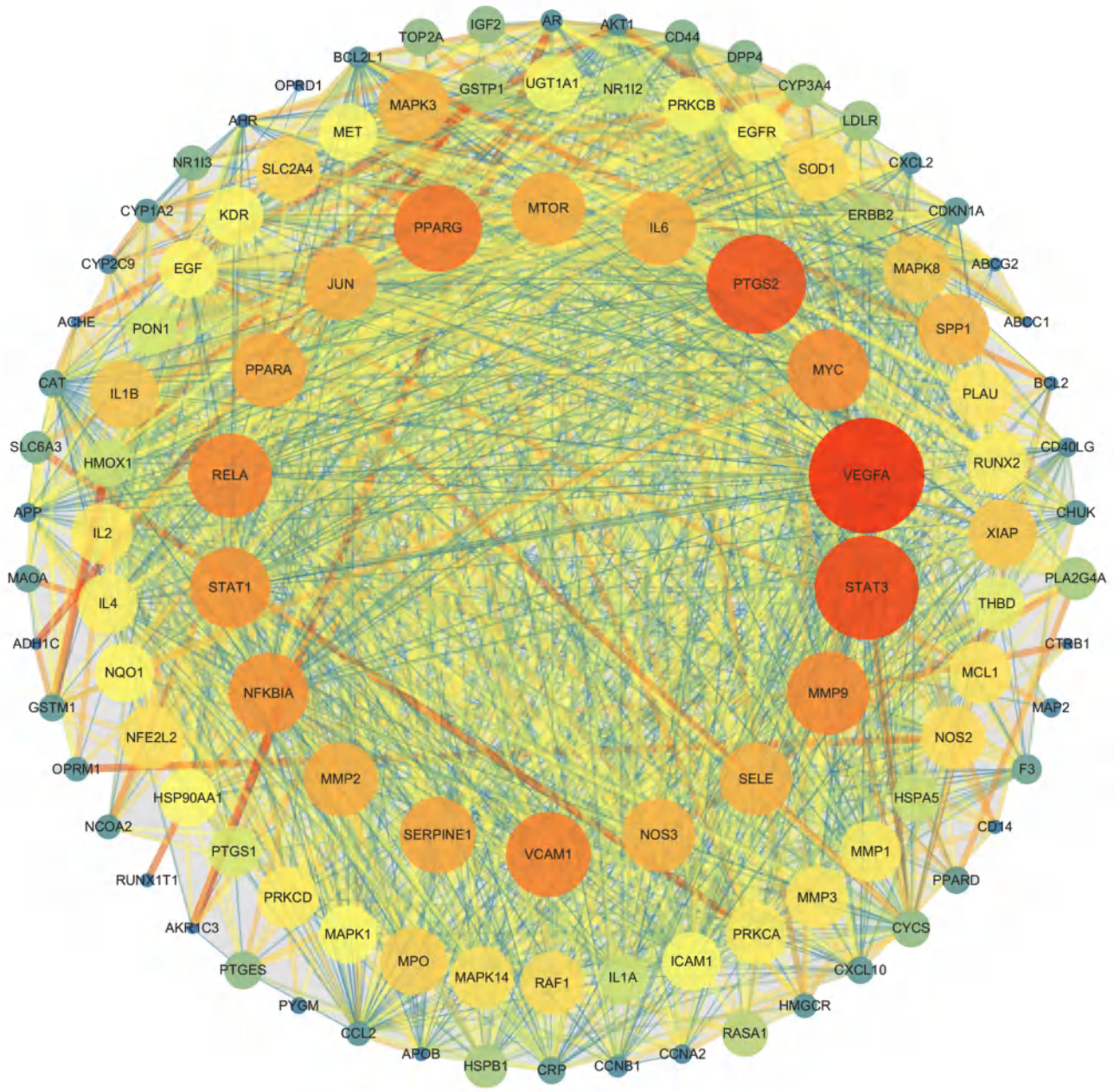


图 1　当归拈痛汤治疗 GA 的蛋白互作网络

Fig 1　Protein interaction network of Danggui Niantong decoction for gouty arthritis

均出现活动量及饮食量减少，体重减轻。模型对照组大鼠出现精神倦怠，反应迟钝，毛发枯槁，大便稀溏；给药组大鼠精神欠佳，皮毛欠光泽，好于模型对照组。实验期间未出现大鼠死亡。

3.2.2　当归拈痛汤对 GA 大鼠型空关节肿胀度的影响　造模后 4 h，模型对照组踝关节肿胀度较空白对照组显著升高（$P < 0.01$）；造模后 8 h，模型对照组较空白对照组相比差异有统计学意义（$P < 0.01$），各给药组关节肿胀度均有降低，双氯芬酸钠组较模型对照组相比差异有统计学意义（$P < 0.05$）；造模后模型对照组较空白对照组差异有统计学意义（$P < 0.01$），给药组关节肿胀度持续降低，造模后 48、72 h 与模型对照组相比差异有统计学意义（$P < 0.01$，$P < 0.05$），见表 1。

3.2.3　当归拈痛汤对 GA 大鼠血清炎症因子水平的影响　血清炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-13 在模型对照组中较空白对照组均显著升高（$P < 0.01$），IL-1β、TNF-α 各给药组中均有降低，与模型对照组相比差异有统计学意义（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。IL-13 给药组较模型差异无统计学意义。具体见表 2。

3.2.4　当归拈痛汤对 GA 大鼠肝肾功能的影响　如表 3 所示，与空白对照组相比，模型对照组 ALT、AST 差异无统计学意义；除双氯芬酸钠组 ALT 较模型对照组下降外，其余各给药组 ALT、

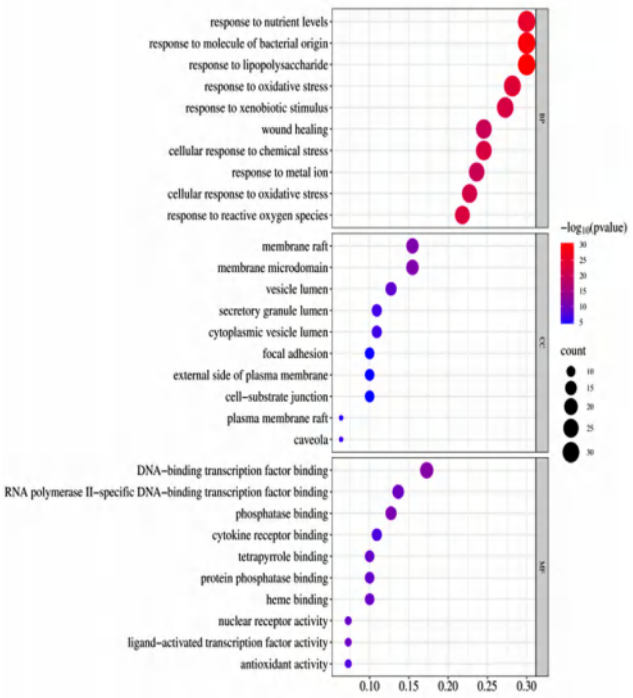


图 2　当归拈痛汤治疗 GA 的 GO 富集分析

Fig 2　GO enrichment analysis of Danggui Niantong decoction in GA treatment

图 3　当归拈痛汤作用靶点的 KEGG 富集分析

Fig 3　KEGG enrichment analysis of the target of Danggui Niantong decoction

表 1　当归拈痛汤对 GA 大鼠踝关节肿胀度的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=6$，mL)

Tab 1　Effect of Danggui Niantong decoction on ankle swelling in GA rats ($\bar{x}\pm s$，$n=6$，mL)

组别	剂量 / (g • kg^{-1})	造模后时间				
		4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组		0.16±0.04	0.14±0.04	0.08±0.05	0.05±0.05	0.03±0.04
模型对照组		0.66±0.10$^{\#\#}$	0.64±0.10$^{\#\#}$	0.57±0.10$^{\#\#}$	0.50±0.09$^{\#\#}$	0.41±0.04$^{\#\#}$
双氯芬酸钠组	0.000 67	0.63±0.07	0.47±0.09*	0.36±0.07**	0.28±0.05**	0.14±0.04**
当归拈痛汤组	0.56	0.67±0.13	0.50±0.14	0.46±0.13	0.38±0.10*	0.21±0.05**

注：与空白对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

表 2　当归拈痛汤对 GA 大鼠血清 IL-1*β*、IL-13、TNF-*α* 的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 2　Effect of Danggui Niantong decoction on the serum IL-1*β*，IL-13 and TNF-*α* in GA rats ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

组别	剂量 / (g • kg^{-1})	IL-1*β*/ (pg • mL^{-1})	IL-13/ (pg • mL^{-1})	TNF-*α*/ (pg • mL^{-1})
空白对照组		24.32±1.39	8.17±0.43	68.44±3.10
模型对照组		31.82±2.10$^{\#\#}$	17.99±1.08$^{\#\#}$	83.21±3.20$^{\#\#}$
双氯芬酸钠组	0.000 67	25.51±0.82**	16.38±1.23	67.95±0.89**
当归拈痛汤组	0.56	26.80±1.28**	16.34±1.04	79.24±1.83*

注：与空白对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

AST 水平与模型对照组相比差异均无统计学意义。提示各组药物未对大鼠肝功能造成不良损害。

如表 4 所示，与空白对照组相比，模型对照组 UREA、CREA 差异无统计学意义；除双氯芬酸钠组 UREA 较模型对照组有所下降（$P<0.05$），其余各组 UREA、CREA 与模型对照组相比差异均无统计学意义。提示各组药物未对大鼠肾功能造成不良损害。

表 3　当归拈痛汤对 GA 大鼠 ALT、AST 的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 3　Effect of Danggui Niantong decoction on ALT and AST in GA rats ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

组别	剂量 / (g•kg^{-1})	ALT/ (U • L^{-1})	AST/ (U • L^{-1})
空白对照组		33.24±1.51	137.87±27.18
模型对照组		34.59±2.40	138.33±31.57
双氯芬酸钠组	0.000 67	26.50±4.33*	158.02±45.26
当归拈痛汤组	0.56	33.82±4.36	103.05±10.60

注：与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$。

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

表 4　当归拈痛汤对 GA 大鼠 UREA、CREA 的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab 4　Effect of Danggui Niantong decoction on UREA and CREA of GA rats（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	剂量 /（g・kg^{-1}）	UREA/（mmol・L^{-1}）	CREA/（μmol・L^{-1}）
空白对照组		6.19±1.09	43.61±5.61
模型对照组		7.03±1.30	43.78±6.64
双氯芬酸钠组	0.000 67	4.28±0.88*	41.01±4.54
当归拈痛汤组	0.56	4.95±0.6	41.08±4.93

注：与模型对照组比较，*$P<0.05$。

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

3.2.5　当归拈痛汤对 GA 大鼠踝关节组织病理学的影响　根据大鼠踝关节 HE 染色结果可知，空白对照组大鼠踝关节滑膜组织的细胞结构完整，层次清晰，无肿胀增生，未见或仅见极少量炎性细胞浸润；模型对照组滑膜细胞增生，局部可见细胞变性坏死，大量炎性细胞浸润。双氯芬酸钠组相比于模型对照组，炎性细胞明显减少，部分滑膜细胞增生，当归拈痛汤组见少量炎性细胞浸润，局部有滑膜轻度增生。见图 4。

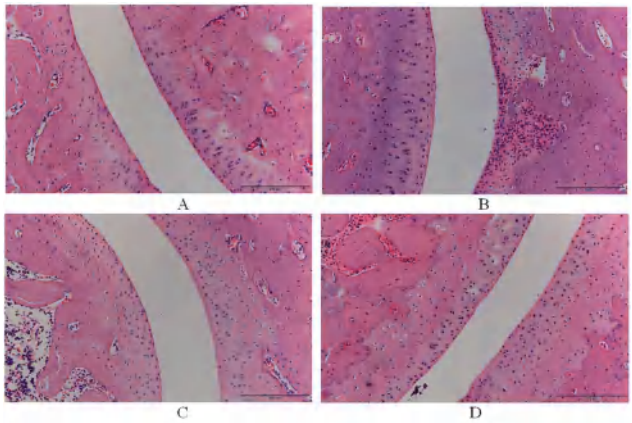


图 4　当归拈痛汤对 GA 大鼠踝关节滑膜组织病理变化的影响（HE，×200）

Fig 4　Effect of Danggui Niantong decoction on pathological changes of ankle synovium in GA rats（HE，×200）

A. 空白对照组（blank control group）；B. 模型对照组（model control group）；C. 双氯芬酸钠组（diclofenac sodium group）；D. 当归拈痛汤组（Danggui Niantong decoction group）

3.2.6　当归拈痛汤对 GA 大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达的影响　由图 5 ～ 6 可知，TLR4 蛋白在模型对照组中表达较空白对照组升高（$P<0.01$），双氯芬酸钠组、当归拈痛汤组表达较模型对照组降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。NF-κB-p65 蛋白在模型对照组中表达较空白对照组升高（$P<0.01$），双氯芬酸钠组与当归拈痛汤组表达较模型对照组降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。

4　讨论

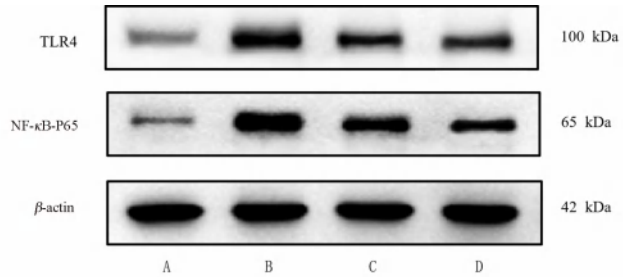


图 5　各组 TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达电泳

Fig 5　Electrophoresis of TLR4，NF-κB-p65 protein expression in each group

A. 空白对照组（blank control group）；B. 模型对照组（model control group）；C. 双氯芬酸钠组（diclofenac sodium group）；D. 当归拈痛汤组（Danggui Niantong decoction group）

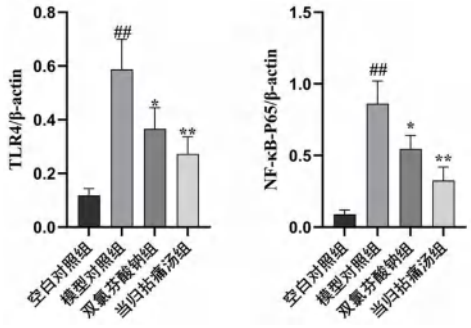


图 6　当归拈痛汤对 GA 大鼠 TLR4/β-actin、NF-κB-P65/β-actin 的影响

Fig 6　Effect of Danggui Tiantong decoction on TLR4/β-actin and NF-κB-P65/β-actin in GA rats

注：与空白对照组比较，##$P<0.01$；与模型对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$。

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

当归拈痛汤出自《医学启源》，是清热利湿、疏风止痛之名方，方中君药羌活透利关节、防风祛风胜湿止痛；臣药升麻、葛根引阴中之阳上行以解表疏风，白术、苍术燥湿健脾以化湿；方中所用除湿药性偏苦燥，易伤气血津液，故以党参、当归益气养血，并取当归活血散瘀止痛之效，苦参、黄芩、知母、茵陈泄湿热、除烦痛，且知母能防苦燥之药伤阴，祛邪不伤正；猪苓、泽泻淡渗利湿，导其留饮，共为佐药；使药（炙）甘草调和诸药。大量实验与临床研究证明了当归拈痛汤治疗 GA 的有效性，其能够改善骨损伤和滑膜纤维化、抑制滑膜增生、炎性细胞浸润[8-18]。痛风和高尿酸血症病证结合诊疗指南也指出当归拈痛汤治疗 GA 的作用已被认可[19]。双氯芬酸钠在临床上使用较为广泛，是治疗 GA 的首选非甾体类药物，故本实验选用双氯芬酸钠作为阳性对照药物。此次实验中模型大鼠踝关节出现红肿热痛等急性炎症表现，病理组织切片显示的炎性细胞浸润、关节腔赘生物和滑膜增生等，宏观角度

证明了当归拈痛汤能减轻大鼠关节肿胀与疼痛，减轻炎性浸润与滑膜增生，初步验证了当归拈痛汤的有效性。

既往对当归拈痛汤治疗 GA 抗炎有效性的研究很多，但对其机制方面的研究较少。为深入研究当归拈痛汤治疗 GA 的作用机制，本文采用网络药理学方法筛选出当归拈痛汤治疗 GA 的 315 个活性成分、30 条通路和 110 个靶点。基于网络药理学获取的多种活性成分，甘草异黄酮、汉黄芩素、磷脂查尔酮、鳞叶甘草素 A、粗毛甘草素 C 等对应靶点较多，可能是治疗 GA 的主要活性成分。甘草异黄酮为甘草黄酮中的其中一类，其中以异甘草素为代表。异甘草素能抑制巨噬细胞的极化，下调前列腺素和 IL-6 的表达 [20-21]。痛风患者体内高水平的尿酸钠和炎症因子能够刺激巨噬细胞表面的 CD14、TLR4，在细胞内激活 IL-1 受体相关激酶 2（IRAK2），进而上调 NF-κB 信号，促进巨噬细胞向 M1 型极化，引起 IL-1β、IL-6 等促炎因子分泌，且 M1 型巨噬细胞的过度积聚会加剧炎症反应 [22-27]。异甘草素还能抑制 TLR4 的二聚化，阻滞炎性信号传导而减少炎性因子和炎症介质的合成释放 [28]。更有研究发现，异甘草素通过阻止 NF-κB 抑制因子（IκB）的磷酸化和降解，抑制了 TNF-α 诱导的中性粒细胞对内皮细胞层的黏附和 NF-κB 的激活，从而抑制炎症反应。管燕等 [29] 也从基因与蛋白水平证明了甘草黄酮可降低 TNF-α mRNA 和 IL-1β mRNA 的转录水平并抑制 TNF-α 的蛋白表达，有明显的抗炎活性；并且验证了甘草查尔酮 A 对 NF-κB 活性的抑制作用。汉黄芩素在获取的活性成分中位列第二，其不仅能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路，发挥抗炎作用 [30-32]，还能抑制炎性因子、黏附分子、趋化因子等聚集于关节滑膜处 [33]。有学者认为其机制可能是汉黄芩素在结晶表面形成保护膜从而减少结晶黏附 [34]。

基于 GO 富集与 KEGG 富集分析筛选出 3 条重要通路：Toll 样受体、NF-κB 及 TNF 信号通路。Toll 样受体（TLR）是膜结合受体，在先天免疫细胞（如巨噬细胞和树突状细胞）上表达，TLRs 通过诱导促炎细胞因子的产生和共刺激分子的上调来引起先天免疫的快速激活。TLR 最常见的为可溶性的 TLR4，大量研究表明 TLR4/NF-κB 信号传导通路在 GA 的炎症反应中起着重要作用 [35]。MSU 结晶能直接激活 TLR4，其通过 MyD88 依赖途径可与 MyD88 相互作用，使活化的 MyD88 募集下游丝 / 苏氨酸蛋白激酶 IRAK Ⅰ和 IRAKⅡ，随后 IRAK4 将 IRAKI 磷酸化并使之分离，分离出的 IRAK Ⅰ与 TNF 受体相关蛋白 6（TRAF6）结合，激活转化生长因子激活性激酶 1（TAK1），磷酸化了 B 细胞 k 轻肽基因增强子抑制剂（IKK）复合体，从而释放 NF-κB，调控下游炎症因子 IL-1、lL-6、TNF-α 等的释放，介导痛风炎症反应 [36]。

TNF 也是介导炎症的重要通路，其能诱导巨噬细胞向 M1 型极化，分泌促炎因子 [37]。活化的 TNF 与其主要受体结合，介导下游 NF-κB 信号通路的信号传导，以促进炎症反应。此次研究结果显示，TLR4、NF-κB-p65 蛋白在模型对照组中表达较空白对照组升高，当归拈痛汤干预后两者表达较模型对照组降低，证明当归拈痛汤能够有效抑制 TLR4、NF-κB 的信号传导，抑制炎症反应。

基于 PPI，筛选并分析发现 Rel A（P65）和 PTGS2 是两个较为重要的靶点。Rel A（P65）亚基是 NF-κB 家族 5 个成员之一，NF-κB 是其亚基的同源 / 异源二聚体，NF-κB 作为二聚体调节与免疫、炎症相关的基因。NF-κB 可由 TNF-α、IL-1 诱导激活，其依赖于 IKK 介导的 Ser32 和 36 上的 NF-kB 抑制剂（IκBα）磷酸化和降解的途径，使 p50/p65 NF-κB 二聚体进入细胞核并激活基因转录，这在炎症反应和细胞凋亡过程中起重要作用。PTGS2 即前列素内环氧化物合成酶 2（COX-2），是炎症反应的另一重要因素。研究显示，在炎性环境下，关节中的滑膜组织会产生前列腺素，增加 COX-2 活性，而引起关节疼痛 [38]。双氯芬酸钠能抑制环氧化酶活性，从而阻断前列腺素的生成以治疗 GA[39]。通过网络药理学预测分析，当归拈痛汤可能也存在与双氯芬酸钠相似的作用机制。

研究显示 GA 患者会出现血清 IL-1β、TNF-α 等炎症因子含量升高，滑膜组织不连续，炎性细胞浸润及关节腔赘生物等表现 [40-42]。关节炎发作期间，大量中性粒细胞向关节浸润聚集并受 MSU 晶体激活，随之活化的中性粒细胞与 MSU 晶体接触产生和释放活化的 IL-1β，形成网状沉淀 [43-44]；同时也会释放 TNF-α、IL-6 等进一步激活局部炎症，加剧疼痛 [45-47]。在炎性滑膜组织中，MSU 向关节软骨表面迁移，侵蚀关节软骨，破坏关节组织。IL-13 在 GA 治疗过程中表现出较强的抗炎活性，能有效下调 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等促炎因子生成 [48-51]。但 IL-13 与 IL-4、IL-10 等抗炎因子不同，其在 GA 急性期表现为低水平，在 GA 缓解期则处于高水平 [52]。本研究采集大鼠样

本时已过 GA 急性发作期，模型对照组大鼠血清炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-13 显著升高，与 GA 炎症反应特点一致。证明通过当归拈痛汤的干预，明显减少了 GA 模型大鼠体内及组织中炎性介质的释放。

有学者对当归拈痛汤干预后的 GA 模型进行了体重的组间和组内比较，均未发现显著差异，提示当归拈痛汤对体重无明显影响，安全、可行[53]，网络药理学方法筛选出的重要化学成分，甘草异黄酮与汉黄芩素均有护肝的功效[54-56]，本实验结果也证实了当归拈痛汤对 GA 大鼠模型没有造成肝损伤。

根据网络药理学中通路、靶点以及活性成分的筛选结果，本实验认为当归拈痛汤通过调控 TLR4、NF-κB、TNF-α 等相关通路，增加抑炎因子 IL-13 水平，减少 TNF-α、IL-1β 等炎性因子释放，从而干预 GA，且甘草异黄酮、汉黄芩素可能为发挥抗炎作用的关键成分。本研究证明了当归拈痛汤能通过多靶点、多途径实现抗痛风作用，并结合动物实验初步验证了当归拈痛汤干预 GA 的效果。然而当归拈痛汤中药成分较多且有效物质基础复杂，因此在未来研究中，本课题将继续完善当归拈痛汤的有效成分研究，进一步明确其治疗 GA 的物质基础。此外，本实验仅从蛋白水平阐明了当归拈痛汤的作用效果，其基因水平是否发生变化还有待验证。

参考文献

[1] 卢俊光，梁建亮，郑宝林 . 当归拈痛汤联合双氯芬酸钠对痛风性关节炎患者关节肿痛指数及肌骨超声结果的影响 [J]. 中国民间疗法，2021，29（7）：93-95.

[2] 程智玲，周莎，易童，等 . 急性痛风性关节炎的中医诊疗进展 [J]. 中国中医急症，2019，28（12）：2250-2252，2256.

[3] 党万太，周京国，谢文光，等 . 不同中医证型痛风患者的临床指标对比分析及其意义 [J]. 中国中西医结合杂志，2013，33（10）：1323-1327.

[4] 刘振葳，曲凡，牛莉，等 . 痛风中医证候学研究现状 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（6）：2626-2628.

[5] 吴佳瑛，顾颖杰 . 秋水仙碱治疗痛风性关节炎的疗效及对患者红细胞沉降率、C 反应蛋白、尿酸水平的影响 [J]. 中国基层医药，2018，25（11）：4.

[6] 葛林，石志敏 . 不同剂型当归拈痛汤治疗类风湿关节炎的临床疗效比较 [J]. 山东中医杂志，2017，36（1）：17-19.

[7] Coderre TJ，Wall PD. Ankle joint urate arthritis（AJUA）in rats：an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund’s adjuvant [J]. Pain，1987，28（3）：379-393.

[8] 周晔，张玉萍 . 当归拈痛汤研究进展 [J]. 广西中医药大学学报，2022，25（2）：61-64.

[9] 马世伟 . 当归拈痛汤加减治疗高尿酸血症的效果及对炎症因子水平影响 [J]. 中医临床研究，2022，14（23）：64-66.

[10] 王清全，汤秀华 . 当归拈痛汤治疗糖尿病周围神经病变临床观察 [J]. 中国中医药现代远程教育，2023，21（4）：95-97.

[11] 张有为，李小宏，李凯 . 当归拈痛汤调控 PERK/Bip 通路减轻膝关节骨性关节炎大鼠软骨损伤的实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2023，25（5）：34-38，221.

[12] 赵帆，李佳钰，陆麒瑾，等 . 当归拈痛汤调控 Fas/caspase-8 通路促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡 [J]. 南方医科大学学报，2020，40（8）：1119-1126.

[13] 胡南松，胡志彦，夏臣杰 . 当归拈痛汤加减联合洛索洛芬钠对类风湿性关节炎（湿热痹阻型）患者关节疼痛及 MMP-3、ESR 的影响 [J]. 健康研究，2020，40（6）：668-672.

[14] 柳至如 . 当归拈痛汤联合西药治疗活动期类风湿关节炎湿热痹阻证患者的临床疗效观察 [D]. 兰州：甘肃中医药大学，2020.

[15] 钟义兰，刘尚丽，史雅锋 . 归经当归拈痛汤联合西药治疗风湿性关节炎疗效及对患者类风湿因子的影响 [J]. 陕西中医，2021，42（7）：918-921.

[16] 任金晴，徐照，赵晶晶，等 . 当归拈痛汤治疗类风湿关节炎活动期临床效果研究 [J]. 临床军医杂志，2023，51（2）：166-169.

[17] 崔占举 . 当归拈痛汤辅助治疗湿热痹阻证活动期类风湿性关节炎的临床疗效分析 [J]. 医学理论与实践，2022，35（7）：1161-1163.

[18] 许腾飞 . 张元素学术贡献探讨及张氏当归拈痛汤治疗急性痛风性关节炎临床观察 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2022.

[19] 姜泉，韩曼，唐晓颇，等 . 痛风和高尿酸血症病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志，2021，62（14）：1276-1288.

[20] 赵秀荣，侯绍郅，皇甫通，等 . 异甘草素改善 RAW 264.7 细胞线粒体生物发生抑制 LPS 诱导的炎症反应 [J]. 烟台大学学报（自然科学与工程版），2022，35（1）：60-69.

[21] 王文萱，张云封，罗扬淦，等 . 血人参中分离的异甘草素对巨噬细胞的影响及其抗炎作用机制研究 [J]. 环球中医药，2022，15（6）：976-983.

[22] Yen CK，Guliang Y，Ching SL，et al. Chemopreventive effects of phytochemicals and medicines on M1/M2 polarized macrophage role in inflammation-related diseases [J]. Int J Mol Sci，2018，19（8）：2208.

[23] Zhang W，Zhang YT，HE YX，et al. Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/Galectin-9 signalling pathway [J]. Exp Cell Res，2019，376（2）：124-132.

[24] Huang FN，Zheng W，Xu Z，et al. RBM4 regulates M1 macrophages polarization through targeting STAT1-mediated glycolysis [J]. Int Immunopharmacol，2020，83：106432.

[25] Sang Y，Miller LC，Blecha F. Macrophage polarization in virus-host interactions [J]. J Clin Cell Immunol，2015，6（2）：1-10.

[26] Oh H，Park SH，Kang MK，et al. Asaronic acid attenuates macrophage activation toward M1 phenotype through inhibition of NF-κB pathway and JAK-STAT signaling in glucose-loaded murine macrophages [J]. J Agric Food Chem，

2019，67（36）：10069-10078.
[27] Liu B，Xia W，Chen TZ，et al. Polarization of M1 tumor associated macrophage promoted by the activation of TLR3 signal pathway [J]. Asian Pac J Trop Med，2016，9（5）：484-488.
[28] 张明发，沈雅琴 . 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2011，26（4）：261-268.
[29] 管燕，谢强敏 . 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用 [J]. 中草药，2009，40（8）：1254-1259.
[30] 侯亚莉，梅稳，郭菲菲，等 . 汉黄芩素对糖尿病肾病大鼠的血糖及肾组织 TLR4、NF-κBp65 水平的影响 [J]. 中医药导报，2021，27（4）：5-9.
[31] 韦磊，王绚，陈雄，等 . 汉黄芩素缓解高脂饮食喂养 $ApoE^{-/-}$ 小鼠的动脉粥样硬化和 NF-κB 介导的动脉炎症反应 [J]. 天然产物研究与开发，2021，33（5）：750-757.
[32] 贺德华，张华，王以兵，等 . 汉黄芩素对肾结石大鼠肾损伤修复作用及 JNK 信号通路的调节作用研究 [J]. 中南药学，2020，18（11）：21-25.
[33] 王栋 . 汉黄芩素对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞作用的初步研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2013.
[34] 刘敬峰，张峰，曲志梅 . 汉黄芩素对肾结石大鼠生化指标、肾组织病理及 TGF-β1 的研究 [J]. 辽宁中医杂志，2022，49（12）：149-153，224.
[35] 刘剑刚，杨钊田，杨卫彬 . 急性痛风性关节炎模型大鼠炎性反应及 Toll 样受体通路相关蛋白表达 [J]. 中华风湿病学杂志，2021，25（11）：8.
[36] Gurung P，Fan G，Lukens JR，et al. Tyrosine kinase SYK licenses MyD88 adaptor protein to instigate IL-la-mediated inflammatory disease [J]. Immunity，2017，46（4）：635-648.
[37] 韦佳圻，苏嘉清 . 巨噬细胞极化在代谢性疾病防治中的作用研究进展 [J]. 广西医学，2023，45（1）：82-87.
[38] Peng AP，Lu XY，Huang J，et al. Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promote TREM-1 expression in monocytes via COX-2/PGE2 pathway [J]. Arthritis Res Ther，2019，21（1）：169.
[39] Zhao HX，Zhang XH，Chen XW，et al. Isoliquiritigenin，a flavonoid from licorice，blocks M2 macrophage polarization incolitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6 [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2014，279（3）：311-321.
[40] 南晓强，杨浩峰，雷鹏 . 息痛散通过富含半胱氨酸蛋白 61 对痛风性关节炎大鼠炎症反应的干预机制 [J]. 陕西中医，2022，43（12）：1659-1663.
[41] 黄金凤 . 猪苓汤加减治疗痛风性关节炎的疗效及对肝肾功能、炎症因子表达及中医证候积分的影响 [J]. 医学理论与实践，2023，36（1）：84-86.
[42] 杜佳蓉，李楠，吴威，等 . 基于网络药理学探讨加减木防己汤抗大鼠痛风性关节炎机制研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2022，24（11）：30-39.
[43] 李芨慧，李玉宏，葛丽丽 . 急性痛风性关节炎患者肌骨超声半定量评分与红细胞沉降率、白细胞介素 -6 水平及疾病活动度相关性分析 [J]. 陕西医学杂志，2022，51（3）：318-321.
[44] Mitroulis I，Kambas K，Chrysanthopoulou A，et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1β and autophagy-related signaling in gout [J]. PLoS One，2011，6（12）：e29318.
[45] Amaral FA，Costa VV，Tavares LD，et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B（4）in a murine model of gout [J]. Arthritis Rheum，2012，64（2）：474-84.
[46] 范艳，管小青，许钒 . 养阴活血通络汤治疗类风湿性关节炎疗效及对患者关节液 TNF-α、IL-1 和 PGE2 的影响 [J]. 陕西中医，2020，41（8）：1098-1100.
[47] 唐铭翔，彭翔，颜素岚 . 前列腺素 E1 注射液联合通心络胶囊对 PCI 术后炎症因子及再狭窄的影响 [J]. 湖南中医药大学学报，2015，35（6）：54-56.
[48] 李长超，柴艳梅，刘丹，等 . 类风湿关节炎患者血清 IL-13 水平表达及对外周血单个核细胞中 Th17 细胞亚群分化的影响 [J]. 陕西医学杂志，2021，50（2）：197-200.
[49] Rifas L，Chen SL. IL-13 regulates vascular cell adhesion of molecule-11 expression in human osteoblasts [J]. J Cell Biochem，2003，89（2）：213-219.
[50] 王海波，史有阳，冯俊，等 . 中药复方对高尿酸血症大鼠相关免疫炎症因子的影响 [J]. 中国免疫学杂志，2019，35（24）：2953-2957.
[51] 蒋恬，朱婉华，彭江云，等 . 痛风颗粒对高尿酸血症模型大鼠的作用机制研究 [J]. 中国中医基础医学杂志，2022，28（7）：1077-1080.
[52] 杨烨晗 . 痛风性关节炎中医证型与促炎 / 抗炎因子失调状态相关性的初步探讨 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2018.
[53] 陈绍华，王沁筠，吴昌桂，等 . 当归拈痛汤治疗急性痛风性关节炎疗效和作用机制的小鼠实验研究 [J]. 中国全科医学，2021，24（24）：3116-3121，3128.
[54] 吴绮丽，袁晓峰，陈静柔，等 . 汉黄芩素诱导中性粒细胞凋亡保护免疫性肝损伤 [J]. 热带医学杂志，2021，21（12）：1512-1516，1640.
[55] 王立明，张如松，方瑞英，等 . 黄芩有效成分对四氯化碳致伤的原代培养大鼠肝细胞的作用 [J]. 浙江医科大学学报，1996，25（6）：241-244.
[56] 贾世亮，武雪玲，李筱筱，等 . 甘草中黄酮类物质的功能研究进展 [J]. 北京联合大学学报，2016，30（4）：67-73.

（收稿日期：2023-05-27；修回日期：2023-07-28）

艳山姜挥发油调控 CaMKⅡ信号改善糖尿病诱导视网膜 Müller 细胞自噬障碍

陈冰[1, 2]，杨红[1, 2]，杨惠[4]，陈永鑫[2]，甘诗泉[2]，文波[2]，蒋朝晖[3]，沈祥春[2*]，李悦[1*]（1.贵阳市妇幼保健院药学部，贵阳　550003；2. 贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室，贵阳　550025；3. 贵阳市第一人民医院检验科，贵阳　550002；4. 济宁医学院临床医学院，山东　济宁　272067）

摘要：目的　探讨艳山姜挥发油（EOFAZ）对糖尿病诱导视网膜 Müller 细胞功能障碍的保护作用及机制。**方法**　视网膜 Müller 细胞使用不同剂量的 EOFAZ 进行预处理 1 h 后，采用高糖（30 mmol • L^{-1}）孵育 48 h，Western blot 法检测细胞中自噬信号 Beclin1、LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 蛋白的表达水平；qRT-PCR 分析细胞中 P62 mRNA、Beclin1 mRNA 的转录水平，免疫荧光实验分析 LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 的表达。并进一步使用钙离子螯合剂 BAPTA-AM 及 CaMKⅡ特异性抑制剂 KN93 孵育细胞，检测自噬信号 LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin1、P62 蛋白表达水平。使用自噬抑制剂氯喹（CQ）孵育细胞，检测细胞中 CaMKⅡ及自噬信号 LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 蛋白的表达。**结果**　与高糖组相比，EOFAZ 可明显上调 Beclin1、LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 的表达水平；使用 BAPTA-AM 及 KN93 孵育细胞与 EOFAZ 的作用类似。同时观察到 EOFAZ 与 BAPTA-AM 或 KN93 联合应用后，与 EOFAZ 单独作用的结果无明显差异。当 EOFAZ 与 CQ 共同孵育细胞后，EOFAZ 对自噬相关蛋白下调的改善作用可被抑制，对 CaMKⅡ的磷酸化水平无明显影响。**结论**　EOFAZ 对高糖诱导的视网膜 Müller 细胞自噬障碍具有明显的改善作用，其作用可能是通过抑制 CaMKⅡ信号发挥的。

关键词：艳山姜挥发油；糖尿病；视网膜 Müller 细胞；自噬障碍；CaMKⅡ

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2616-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.011

Protection effect of essential oil from *Fructus Alpiniae* zerumbet on the autophagy dysfunction of retinal Müller cells induced by diabetes via CaMKⅡ signaling pathways

CHEN Bing[1, 2], YANG Hong[1, 2], YANG Hui[4], CHEN Yong-xin[2], GAN Shi-quan[2], WEN Bo[2], JIANG Zhao-hui[3], SHEN Xiang-chun[2*], LI Yue[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Guiyang Maternal and Child Health Care Hospital*, *Guiyang* 550003; 2. *Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources*, *School of Pharmaceutical Sciences*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 550025; 3. *Department of Clinical Laboratory*, *Guiyang First people's Hospital*, *Guiyang* 550002; 4. *College of Clinical Medicine*, *Jining Medical Institute*, *Ji'ning Shandong* 272067)

Abstract: Objective To determine the protective effect and mechanism of essential oil from *Fructus Alpiniae* zerumbet (EOFAZ) on retinal Müller cell dysfunction induced by diabetes. **Methods** Retinal Müller cells were treated with high glucose for 48 hours, and different doses of EOFAZ were used as intervention. Expressions of Beclin1, LC3Ⅱ/Ⅰ and P62 protein were detected by Western blot.

基金项目：贵州省科技计划项目（黔科合基础 -ZK[2022] 一般 005；黔科合基础 -ZK[2021] 一般 566）；贵阳市卫生健康局科学技术计划项目（【2022】筑健卫科技合同字第 005 号）；国家自然科学基金项目（No.82060772）；贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题项目（No. QZYY-2022-032）。

作者简介：陈冰，女，副主任药师，主要从事心血管药物药理活性研究，email：270938048@qq.com　*通信作者：沈祥春，男，教授，博士研究生导师，主要从事心血管药物药理活性研究，email：shengxiangchun@126.com；李悦，女，副主任药师，主要从事心血管药物药理活性研究，email：948703579@qq.com

Expression of P62 mRNA and Beclin1 mRNA in the cells was analyzed by qRT-PCR. Expression of LC3Ⅱ/Ⅰ and P62 was analyzed by immuno-fluorescence. After calcium chelating agent BAPTA-AM and CaMKⅡ specific inhibitor KN93 were used as intervention. The expression of Beclin1, LC3Ⅱ/Ⅰ, and P62 protein were analyzed by Western blot. Autophagy inhibitor chloroquine (CQ) was used to detect the expression of CaMKⅡ, LC3Ⅱ/Ⅰ, and P62. **Results** Compared with the high glucose group, EOFAZ significantly up-regulated the level of Beclin1, LC3Ⅱ/Ⅰ and P62; the effect of BAPTA-AM and KN93 on the cells was similar to that of EOFAZ. Combined EOFAZ with BAPTA-AM or KN93, there was no significant difference in the results of EOFAZ alone. When cells were treated with CQ, there was no significant effect on the phosphorylation of CaMKⅡ. **Conclusion** EOFAZ can significantly improve the autophagy disorder of retinal Müller cells induced by high glucose, which may be related to the inhibition of CaMKⅡ signals.

Key words: essential oil from *Fructus Alpiniae* zerumbet; diabetes; retinal Müller cell; autophagy dysfunction; CaMKⅡ

糖尿病视网膜病变（diabetic retinopathy，DR）是糖尿病常见且严重的微血管并发症之一，是导致糖尿病患者视力障碍和失明的最主要原因[1-3]。

研究表明，DR早期，视网膜Müller细胞（RMCs）功能异常是诱发DR患者失明的关键因素[4]。在DR发病早期，RMCs已先于视网膜血管内皮细胞、周细胞出现病理改变[5]。

自噬在细胞内环境稳态的维持中发挥着重要作用，在病理条件下，自噬功能紊乱可诱导细胞功能障碍，最终诱导包括心肌病、DR等多种疾病的发生[6]。DR应激下RMCs损伤与自噬障碍密切相关[7]。视网膜神经细胞的正常存活依赖于RMCs，深入探讨RMCs在DR中的发病机制，对早期诊断、治疗DR具有重大意义。

研究表明，钙依赖蛋白调节激酶Ⅱ（Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinases Ⅱ，CaMKⅡ）是治疗糖尿病引起的神经病变所致视力丧失的潜在靶点，是介导DR的主要因子[8-9]。前期课题组研究证实在糖尿病大鼠或是高糖应激下的RMCs中，CaMKⅡ的磷酸化明显增加，参与了神经元的生理和病理事件[10]。抑制CaMKⅡ的磷酸化可改善血管性痴呆诱导大鼠海马神经元自噬功能障碍[11]。但CaMKⅡ的磷酸化是否介导高糖诱导的RMCs自噬功能障碍尚不明确。

贵州地产民族药艳山姜为姜科山姜属植物艳山姜*Alpinia zerumbet*（Pers.）Burttet Smith的干燥成熟果实，具有温中燥湿、行气止痛、截疟之功效[12-13]。前期课题组研究证实，艳山姜的主要有效成分为挥发油（essential oil from *Fructus Alpiniae* zerumbet，EOFAZ）。前期体内外研究显示EOFAZ对DR具有显著的改善作用[10，13]，但EOFAZ对高糖诱导的RMCs自噬功能障碍的作用以及作用机制尚不明确。本研究以RMCs为研究对象，研究EOFAZ对高糖诱导RMCs自噬功能障碍的保护作用，为临床防治DR提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞

大鼠RMCs（上海胤曦生物技术有限公司）。

1.2 试药

艳山姜采自贵州省贞丰县，经贵州医科大学药学院生药学与药用植物学教研室龙庆德副教授鉴定为姜科植物*Alpinia zerumbet* Pers. Burttet Smith的干燥成熟果实（凭证标本号：No.20151018），采用水蒸气蒸馏法提取EOFAZ，收率为1.3%。准确称取EOFAZ，将其溶于适量二甲基亚砜溶液中，配制母液浓度为1×10^7 μg·L^{-1}，过滤除菌，分装冻存于－20 ℃。D-无水葡萄糖（批号为405A0918）、D-甘露醇（批号为1126F038）(北京索莱宝科技有限公司)，LC3抗体（批号为14600-1-AP）、P62抗体（批号为18420-1-AP）、p-CaMKⅡ抗体（批号为#12716）、CaMKⅡ抗体（批号为#3362）（武汉三鹰生物技术有限公司）。Beclin1抗体（Abcam公司，批号为ab207612）。

1.3 仪器

3020-426多功能全波长酶标仪（美国Thermo公司），WAC-60灭菌锅（韩国DAIHAN Scientific公司），5810R型冷冻离心机（德国Eppendorf公司），Universal Hood Ⅱ型实时荧光定量PCR系统仪、CFX型凝胶成像系统仪（美国Bio-Rad公司），免疫荧光显微镜（德国徕卡公司）。

2　方法

2.1　细胞培养及分组

RMCs 培养于含 10% 胎牛血清及 1% 青链双抗的低糖 DMEM 培养基中，置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。培养瓶中的细胞融合至 85% 时，按常规胰酶消化后进行细胞传代，待细胞融合至 70% ～ 80%，即可进行给药干预。

2.1.1　细胞药效实验分组　分为正常对照组（含糖量 5.5 mmol•L^{-1}）、甘露醇组（24.5 mmol•L^{-1}）、高糖组（HG，含糖量 30 mmol • L^{-1}）、EOFAZ 低剂量（0.25 μg • L^{-1}）＋ HG 组、EOFAZ 中剂量（0.5 μg • L^{-1}）＋ HG 组、EOFAZ 高剂量（1.0 μg • L^{-1}）＋ HG 组、阳性对照罗格列酮（RGZ，20 μmol • L^{-1}）＋ HG 组；RMCs 先用不同剂量的 EOFAZ 或 RGZ 预处理 1 h，再用 HG 孵育 48 h。其中甘露醇组用作 HG 组的渗透压对照。

2.1.2　机制作用实验分组　分为正常对照组（含糖量 5.5 mmol • L^{-1}）、高糖组（HG，含糖量 30 mmol•L^{-1}）、EOFAZ 高剂量（1 μg•L^{-1}）＋ HG 组、BAPT-AM（5 μmol • L^{-1}）或 KN93（5 μmol • L^{-1}）或氯喹（CQ）（10 μmol • L^{-1}）＋ HG 组、EOFAZ 高剂量（1 μg • L^{-1}）＋ HG ＋ BAPT-AM 或 KN93 或 CQ 组。RMCs 先用 EOFAZ、BAPT-AM、KN93 或 CQ 预处理 1 h，再用 HG 孵育 48 h。

2.2　免疫荧光实验

在六孔板中放入盖玻片后将细胞接种于板中，在细胞融合至 60% 时给药。药物作用结束后将盖玻片取出置于 PBS 中静置 10 min，4% 多聚甲醛于室温固定 15 min，0.2% Triton-100 透化 10 min，山羊血清封闭 30 min，一抗 4 ℃过夜。次日将荧光二抗和 DAPI 按比例混合在一起后滴加到盖玻片上避光孵育 1 h 后，用 PBS 避光洗 3 次后，封片。于倒置荧光显微镜下采集照片。

2.3　免疫印迹分析

给药时间末，加入预冷 PBS 润洗 3 次，加入细胞裂解液提取细胞总蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 将蛋白样品（25 μg）进行电泳分离并将蛋白转移至 PVDF 膜。膜用含 5% 的 BSA 的 TBST 溶液封闭 1 h 后与所需的一抗在 4 ℃下过夜孵育。第 2 日，膜用 1×TBST 洗 3 次后与二抗室温孵育 1 h。膜洗 3 次后用 ECL 化学发光试剂盒进行显色，用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行曝光，用 Image-Lab 软件对数字图像进行量化。实验独立重复 3 次。

2.4　实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）

使用 RNA 提取试剂盒从 RMCs 中提取总 RNA。mRNA 被逆转录成 cDNA，cDNA 使用 SYBR Green PCR 试剂扩增。使用循环阈值法（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）进行分析。

2.5　统计学方法

实验数据均是从 3 个及以上独立的实验中获得，所有数据用 GraphPad Prism 7.0（La Jolla，CA，USA）软件进行分析，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　EOFAZ 对高糖诱导 RMCs 自噬功能障碍的影响

免疫印迹分析、qRT-PCR 分别分析 P62、Beclin1、LC3Ⅱ/Ⅰ蛋白及 P62、Beclin1 mRNA 表达，结果见图 1。与正常对照组比较，高糖孵育 RMCs 48 h 后，细胞中自噬信号中 Beclin1、LC3Ⅱ/Ⅰ、P62 蛋白及 P62、Beclin1 mRNA 水平降低。EOFAZ 预处理后可上调以上蛋白及 mRNA 的表达水平。

3.2　EOFAZ 对高糖诱导 RMCs 中 LC3、P62 蛋白表达的影响

为了进一步研究 EOFAZ 对高糖诱导 RMCs 自噬功能障碍的影响，采用免疫荧光实验分析 LC3、P62 蛋白表达，结果见图 2，与免疫印迹分析结果一致。EOFAZ 可明显上调 LC3 水平，上调 P62 蛋白的表达水平，提示 EOFAZ 可明显改善高糖诱导的 RMCs 自噬功能障碍。

3.3　EOFAZ 调控 CaMKⅡ信号改善高糖诱导 RMCs 自噬功能障碍

前期课题组研究显示，在高糖应激下，RMCs 中 CaMKⅡ的磷酸化水平明显增加，抑制 CaMKⅡ的磷酸化可改善血管性痴呆诱导大鼠海马神经元自噬功能障碍[11]。但 CaMKⅡ的磷酸化是否介导 HG 诱导的 RMCs 自噬功能障碍尚不明确。为了研究 CaMKⅡ的磷酸化是否介导 HG 诱导的 RMCs 自噬功能障碍，使用钙螯合剂（BAPTA-AM）及 CaMKⅡ特异性抑制剂（KN93）进行实验。结果如图 3 所示，与 EOFAZ 的作用类似，使用 BAPTA-AM 及 KN93 作用细胞可明显上调 Beclin1、LC3 Ⅱ/Ⅰ、P62 的表达水平。同时观察到 EOFAZ 与 BAPTA-AM 或 KN93 联合应用后，与 EOFAZ 单独孵育组无明显差异。

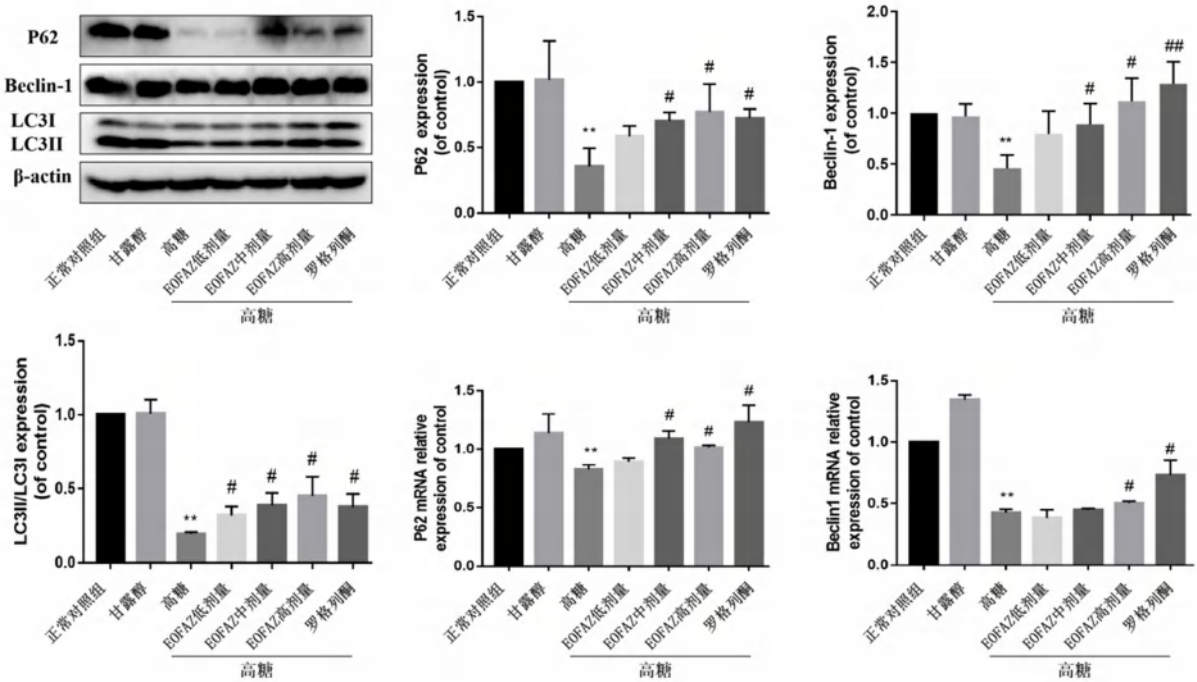


图 1　EOFAZ 对高糖诱导 RMCs 自噬功能障碍的影响

Fig 1　Effect of EOFAZ on high glucose-induced autophagy dysfunction in RMCs

注：与正常对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与 HG 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

Note：Compared with the normal control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the HG group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

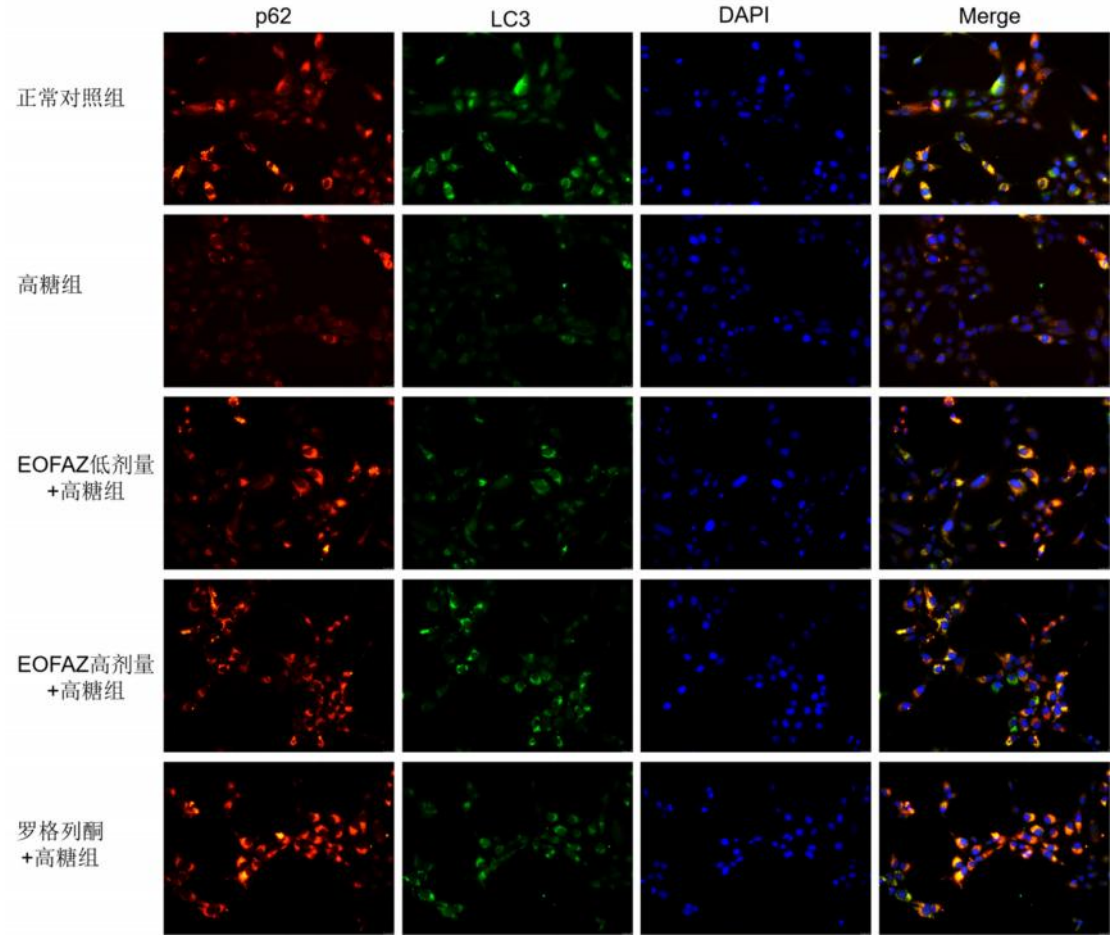


图 2　EOFAZ 对高糖诱导 RMCs 中 LC3、P62 蛋白表达的影响（×400）

Fig 2　Effect of EOFAZ on the expression of LC3 and P62 protein in RMCs induced by high glucose（×400）

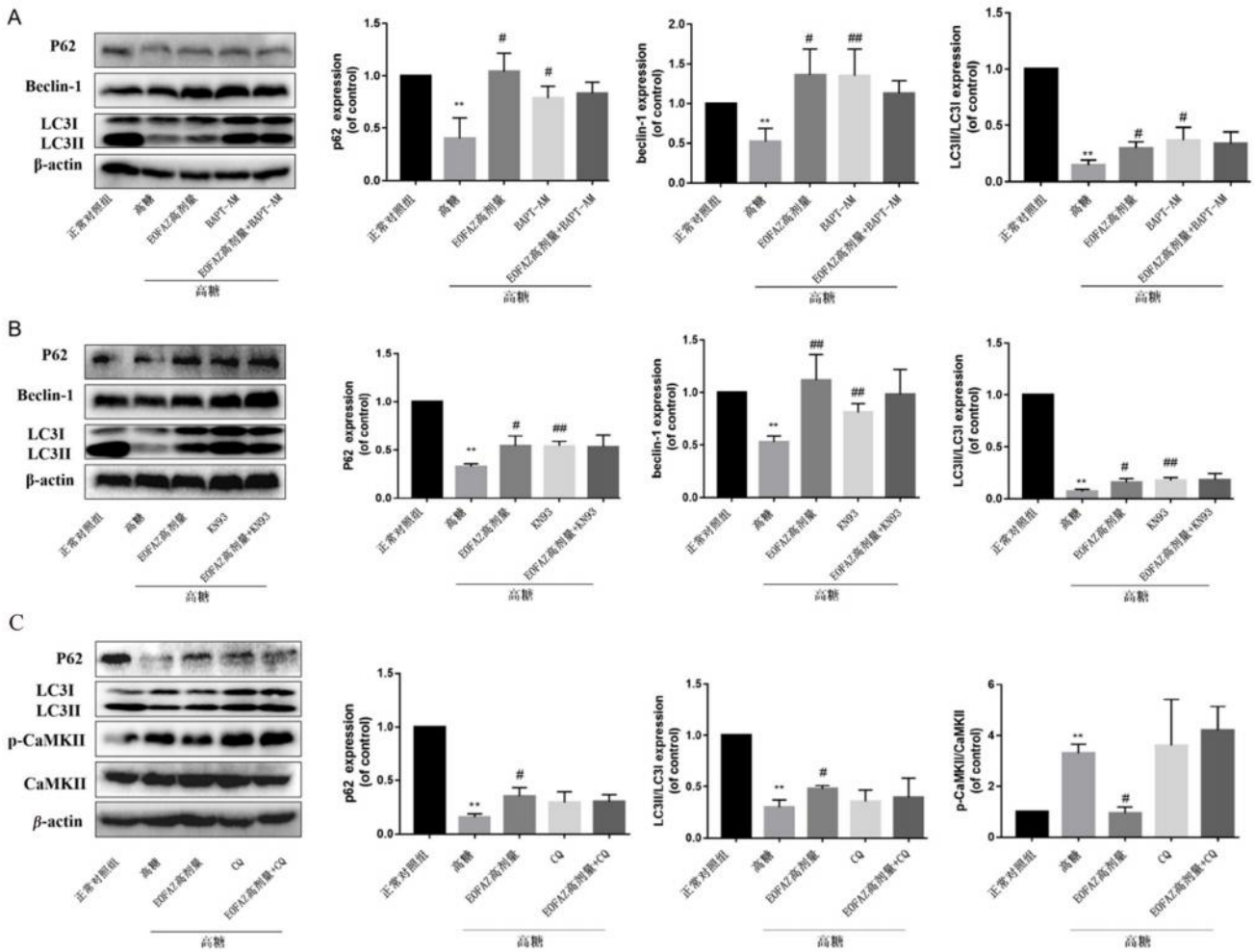


图 3　EOFAZ 对高糖诱导的 RMCs 自噬功能障碍的影响

Fig 3　Effect of EOFAZ on ameliorated autophagy dysfunction induced by HG in RMCs

注：与正常对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与高糖组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

Note：Compared with the normal control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the HG group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

使用自噬抑制剂 CQ 孵育细胞，检测细胞中 CaMKⅡ磷酸化水平及自噬信号 Beclin1、LC3、P62 蛋白的表达。结果如图 3C 所示，使用 CQ 可进一步抑制自噬，但对 CaMKⅡ的磷酸化水平无明显影响。提示 EOFAZ 对高糖诱导的 RMCs 自噬功能障碍具有明显的改善作用，其作用可能与抑制 CaMKⅡ信号相关。

4　讨论

DR 是糖尿病的一种微血管并发症，是成人视力丧失的主要原因。糖尿病中的 RMCs 损伤被认为是导致 DR 致病的主要因素，靶向 RMCs 损伤是预防早期 DR 的治疗策略 [14]。

自噬是一种细胞内自我降解过程，负责去除、降解和回收细胞质蛋白和细胞器，涉及一系列连续的事件，Beclin1 介导自噬的起始，LC3Ⅰ向 LC3Ⅱ的转化参与自噬溶酶体膜的延伸直至自噬溶酶体的形成，P62 与 LC3Ⅱ蛋白结合形成复合物，并最终在溶酶体内降解。自噬在维持视网膜功能方面起着重要作用 [15]。自噬功能障碍加速了 RMCs 损伤，自噬抑制 DR 的形成 [6，14]。RMCs 自噬异常在 DR 的发病机制及病程进展中起着关键作用。改善 RMCs 自噬功能障碍成为防治 DR 的研究焦点。本研究以自噬为切入点，以民族药活性成分 EOFAZ 为研究对象。在体外建立高糖诱导 RMCs 自噬功能障碍模型，探索 EOFAZ 的保护作用及其对自噬的调控作用。结果显示高糖作用后，细胞中 Beclin1、P62 表达水平显著降低，LC3Ⅱ/Ⅰ水平降低，提示 RMCs 自噬功能障碍，EOFAZ 预处理可明显改善以上蛋白的异常表达。

前期课题组研究显示，在糖尿病应激作用下，RMCs 中 CaMKⅡ的磷酸化水平明显增加 [10]，抑制 CaMKⅡ的磷酸化可改善血管性痴呆诱导大鼠海马神经元自噬功能障碍 [11]。但 CaMKⅡ的

磷酸化在高糖诱导的 RMCs 自噬功能障碍中的作用尚不明确。为了研究 CaMKⅡ的磷酸化与自噬之间的关系，采用钙螯合剂（BAPTA-AM）及 CaMKⅡ特异性抑制剂（KN93）进行实验。结果表明，BAPTA-AM 及 KN93 作用细胞后，可明显改善高糖诱导的 RMCs 自噬障碍。同时观察到两者分别与 EOFAZ 联合应用后，与单独的 EOFAZ 孵育组无明显差异。提示 EOFAZ 可能是通过调控 CaMKⅡ信号改善高糖诱导的 RMCs 自噬功能障碍。为了进一步证实该结论，使用自噬抑制剂 CQ 孵育细胞，分析 CaMKⅡ磷酸化水平及自噬信号蛋白的表达。结果如图 3 所示，CQ 可进一步抑制自噬，但对 CaMKⅡ的磷酸化水平无明显影响。

综上所述，EOFAZ 对高糖诱导的 RMCs 自噬功能障碍具有明显改善作用，其作用与调控 CaMKⅡ信号相关，本研究为后期进一步研究 EOFAZ 改善糖尿病相关并发症提供实验依据，为民族药艳山姜防治糖尿病开拓新的理论指导与实验基础。

参考文献

[1] Lu L，Lu QY，Chen W，et al. Vitamin D_3 protects against diabetic retinopathy by inhibiting high-glucose-induced activation of the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway [J]. J Diabetes Res，2018（10）：1-11.

[2] Sun Y，Ju MH，Lin ZQ，et al. SOCS3 in retinal neurons and glial cells suppresses VEGF signaling to prevent pathological neovascular growth [J]. Sci Signal，2015，8（395）：ra94.

[3] Qian C，Wan GM，Yan PS，et al. Correlation between cystatin C and retinopathy of type-two diabetes mellitus patients [J]. J Biol Reg Homeos Ag，2017，31（3）：99.

[4] 张敏，周佳，沈玺，等 . TXNIP 在高糖诱导的小鼠视网膜 Müller 细胞自噬中的作用及相关机制 [J]. 现代生物医学进展，2020，20（3）：408-412.

[5] Eastlake K，Banerjee PJ，Angbohang A，et al. Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy [J]. Glia，2016，64（4）：495-506.

[6] 王立 . EGCG 激活自噬对高糖视网膜 Müller 细胞保护作用 [D]. 苏州：苏州大学，2019.

[7] 王立，颜世传，牛兰俊，等 . 高糖对体外培养视网膜 Müller 细胞自噬及凋亡的影响 [J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志，2022，24（1）：17-26.

[8] Li J，Wang PP，Ying J，et al. Curcumin attenuates retinal vascular leakage by inhibiting calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in streptozotocin-induced diabetes [J]. Cell Physiol Biochem，2016，39（3）：1196-1208.

[9] Li J，Zhao SZ，Wang PP，et al. Calcium mediates high glucose-induced HIF-1α and VEGF expression in cultured rat retinal Müller cells through CaMKⅡ-CREB pathway [J]. Acta Pharmacol Sin，2012，33：1030-1036.

[10] Yang H，Gan SQ，Jiang ZH，et al. Protection effects of essential oil from *Fructus Alpiniae* zerumbet on retinal Müller gliosis via PPAR-γ-p-CREB signaling pathway[J]. Chin Med-UK，2020，15：4.

[11] Chen TT，Zhou X，Xu YN，et al. Gastrodin ameliorates learning and memory impairment in rats with vascular dementia by promoting autophagy flux via inhibition of the Ca^{2+}/CaMKⅡ signal pathway [J]. Aging（Albany NY），2021，13（7）：9542-9565.

[12] 张秀实 .《贵州植物志》[M]. 成都：四川民族出版社，1989.

[13] 杨红，林丹，李晨，等 . 艳山姜挥发油对高糖诱导大鼠视网膜 Müller 细胞 VEGF 表达的调控作用 [J]. 中药材，2018，41（3）：686-690.

[14] Luo Y，Dong X，Lu S，et al. Gypenoside ⅩⅦ alleviates early diabetic retinopathy by regulating Müller cell apoptosis and autophagy in db/db mice [J]. Eur J Pharmacol，2021，895：173893.

[15] 唐霞，代艳，杨效竹 . 丹酚酸 B 对高糖诱导的视网膜 Müller 细胞凋亡、自噬及 AMPK 信号通路的影响 [J]. 眼科新进展，2022，42（2）：122-127.

（收稿日期：2023-04-03；修回日期：2023-05-17）

基于网络药理学的余甘子有效部位调控巨噬细胞极化机制研究

陈尹心，常子豪，胡倩，刘宇琦，高晔，黄雅，雒晓卫，王树楷，周立鹏，王保锦，王朝慧，崔艺彤，刘越*，张兰珍*（北京中医药大学 中药学院，北京　102488）

摘要：目的　筛选余甘子鞣质调控巨噬细胞极化的活性部位，探讨其调控巨噬细胞极化的主要化学成分和作用机制。**方法**　采用 CCK-8 细胞增殖实验检测细胞活力；荧光定量 PCR（qPCR）检测 M2 巨噬细胞标志物 *Arg-1*、*CD206*、*TNF-α* mRNA 表达水平以筛选有效部位；UPLC-Q-Exactive-MS/MS 表征其化学成分。利用 SwissADME 和 SwissTargetPrediction 数据库筛选活性成分并获取其对应靶点，与 GEO 数据库中筛选的 M1-M2 型巨噬细胞差异基因取交集，运用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“药物成分 - 潜在靶点”网络图，并在 STRING 数据库进行蛋白互作关系分析，并进行基因本体（GO）和京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析。**结果**　基于体外巨噬细胞极化模型，发现余甘子鞣质 20% 甲醇洗脱部位可显著抑制 M2 巨噬细胞标志物 *Arg-1* 和 *CD206* mRNA 的表达，升高 M1 巨噬细胞标志物 *TNF-α* mRNA 的表达（$P < 0.001$），且活性明显强于其他洗脱部位。通过比对余甘子鞣质与 20% 甲醇洗脱部位 UPLC-MS 总离子流图，鉴定出 20% 甲醇洗脱部位中化学成分 29 个，筛选出有效成分 11 个，对应靶点 94 个，药物 - 巨噬细胞相关交集靶点 37 个；KEGG 富集分析结果显示，余甘子鞣质 20% 甲醇洗脱部位调控巨噬细胞极化相关靶点主要为 HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NF-kappaB 信号通路等，涉及有机物的反应、对含氧化合物的反应、对化学刺激的细胞反应等显著相关生物过程。**结论**　本研究基于巨噬细胞极化模型筛选出余甘子鞣质中调控巨噬细胞极化的主要活性部位，借助网络药理学初步证明了余甘子鞣质 20% 甲醇洗脱部位可以多成分、多靶点、多通路共同调控巨噬细胞极化，为进一步阐明余甘子鞣质调控巨噬细胞极化的药效物质和作用机制提供依据。

关键词：余甘子；鞣质部位；巨噬细胞；UPLC-Q-Exactive-MS/MS；网络药理学
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2622-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.012

Regulation of macrophage polarization by effective part of *Phyllanthus emblica* L. and related mechanism based on network pharmacology

CHEN Yin-xin, CHANG Zi-hao, HU Qian, LIU Yu-qi, GAO Ye, HUANG Ya, LUO Xiao-wei, WANG Shu-kai, ZHOU Li-peng, WANG Bao-jin, WANG Zhao-hui, CUI Yi-tong, LIU Yue*, ZHANG Lan-zhen* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing*　102488)

Abstract: Objective　To screen the effective part of tannins in *Phyllanthus emblica* L. that can modulate macrophage polarization and to determine its major chemical constituents and mechanism. **Methods**　The cell vitality was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). qPCR experiments were conducted to detect the mRNA expression of *Arg-1, CD206* and *TNF-α* to screen the effective part; UPLC-Q-Exactive-MS/MS was used to identity the chemical compositions. SwissADME, SwissTargetPrediction, and GEO database were used to obtain the active components and potential targets in the regulation of macrophags. Component-potential targets network was established with Cytoscape 3.7.2. The protein interaction was analyzed with STRING database. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

基金项目：科技部重大专项重大新药创制项目（No.2018ZX09711001-003-025）；国家自然科学基金面上项目（No.81274187）。
作者简介：陈尹心，女，在读硕士研究生，主要从事药效物质基础及药理作用研究，email：chenchenyx007@163.com　*通信作者：张兰珍，女，研究员，主要从事中药药效物质与质量控制研究，email：zhanglanzhen01@126.com；刘越，男，讲师，主要从事中药药效物质基础及质量控制研究，email：liuyuebei_002@163.com

pathways enrichment analysis were conducted. **Results** Based on the M2 macrophage cell model, the 20% methanol eluted part of tannins in *Phyllanthus emblica* L. significantly inhibited the mRNA expression of *Arg-1* and *CD206* and promoted the mRNA expression of *TNF-α* ($P < 0.001$), as compared with other eluted parts. Totally 29 components in the 20% methanol elution were identified, 11 active components, 94 targets and 37 drug disease intersection targets were screened. KEGG enrichment analysis indicated that mainly PI3K-Akt signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and NF-Kappa B signaling pathway were involved. The main biological processes related to GO enrichment analysis included responses to organic substances, cellular responses to organonitrogen compounds and cellular responses to chemical stimulus and so on. **Conclution** The 20% methanol eluted fraction of tannins in *Phyllanthus emblica* L. can act together in multiple components, multiple targets and multiple pathways to modulate macrophage polarization, which provides a reference for further research on the material basis and mechanism of the effect of tannins in *Phyllanthus emblica* L. on the regulation of macrophage polarization.

Key words: *Phyllanthus emblica* L.; tannin; macrophage; UPLC-Q-Exactive-MS/MS; network pharmacology

肿瘤相关巨噬细胞（TAMs）是肿瘤微环境中最丰富的免疫细胞。一般来说，在不同生理病理因素刺激下，巨噬细胞可分化成两种极化状态，即经典活化的 M1 型和替代活化的 M2 型。其中，M1 型参与促炎反应的同时也发挥抗肿瘤活性，而 M2 型则参与抗炎反应，并能通过肿瘤免疫抑制等作用促进肿瘤发展。调控 M2 型巨噬细胞向 M1 型极化能够增强肿瘤免疫反应、抑制肿瘤生长、转移和肿瘤血管生成[1]。因此，调控肿瘤相关巨噬细胞极化已经成为一种多机制、多功能的高效免疫治疗策略。

余甘子为大戟科叶下珠属植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实，具有清热凉血、消食健胃、生津止咳之功效[2]。现代研究表明，余甘子主要含有酚酸类、鞣质类成分。课题组前期研究发现余甘子鞣质在体外能诱导人肝癌细胞 BEL-7402 早期凋亡和 G_2/M 期阻滞[3]，通过调节 MAPK 通路，降低 MPPs 的表达，诱导肿瘤细胞凋亡[4]。临床研究表明余甘子鞣质具有潜在的免疫调节作用[5]。但其是否具有重塑免疫抑制微环境抑制肿瘤生长的作用以及其物质基础和作用机制尚不清楚。因此，本研究以 M2 型巨噬细胞为对象筛选抑制 M2 型巨噬细胞极化调节肿瘤微环境的余甘子活性部位，并结合 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 技术和网络药理学分析其物质基础和作用机制。

1　材料

1.1　仪器

超高效液相色谱仪和 Q-Exactive 高分辨质谱仪、CO_2 细胞培养箱、超低温冰箱（Thermo Scientific 公司）；十万分之一分析天平（Sartorius 公司）；KQ-500DE 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；超净工作台（北京半导体设备一厂）；DT5-6A 型台式离心机（北京时代北利离心机有限公司）；PCR 扩增仪（德国 Eppendorf 公司）；QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 仪（CFX 96，Biorad 公司）。

1.2　试药

乙腈、甲酸（质谱纯，Thermo Fisher 公司）；蒸馏水 [屈臣氏集团（香港）有限公司]；MCI 小孔吸附树脂（日本三菱化学公司）；胎牛血清、DMEM 培养基（Biological Industries 公司）；RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒以及 SYBR qPCR Master Mix（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；重组小鼠白细胞介素 -4（IL-4）、重组小鼠白细胞介素 -13（IL-13）（PeproTech 公司）；余甘子鞣质部位（江西青峰药业有限公司）。

1.3　细胞

小鼠 RAW264.7 单核巨噬细胞（北京协和细胞库）冻存于北京中医药大学中药学院细胞平台。细胞复苏后在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，于 37 ℃，5%CO_2 的恒温培养箱中培养。

2　方法与结果

2.1　余甘子鞣质不同洗脱部位对 RAW264.7 细胞活性的影响

2.1.1　样品的制备　取余甘子鞣质部位（鞣质含量 58%），加去离子水使溶解，经 MCI 小孔树脂柱色谱吸附，依次用不同浓度的甲醇（20%、

30%、40%、50%、100%）梯度洗脱，每步洗脱至洗脱液近无色时更换为下一洗脱梯度。合并相同洗脱液，低温浓缩，干燥成粉。

2.1.2　CCK-8 法检测细胞增殖　将 RAW264.7 细胞铺于 96 孔板中，用不同浓度的不同余甘子鞣质洗脱部位（5、10、20、40、80、160、320 μg • mL^{-1}）100 μL 培养 24 h 后，加入 CCK-8 试剂，检测各孔吸光度值（*OD* 值），计算细胞存活率：细胞存活率（%）=（实验组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）/（对照组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）×100%。结果见图 1，当药物质量浓度≤ 40 μg • mL^{-1}，对 RAW264.7 细胞存活率均在 85% 以上，无明显抑制作用，说明质量浓度≤ 40 μg • mL^{-1} 时对巨噬细胞无明显细胞毒作用。因此，本研究选取 40 μg • mL^{-1} 的浓度用于后续对不同洗脱部位筛选的研究。

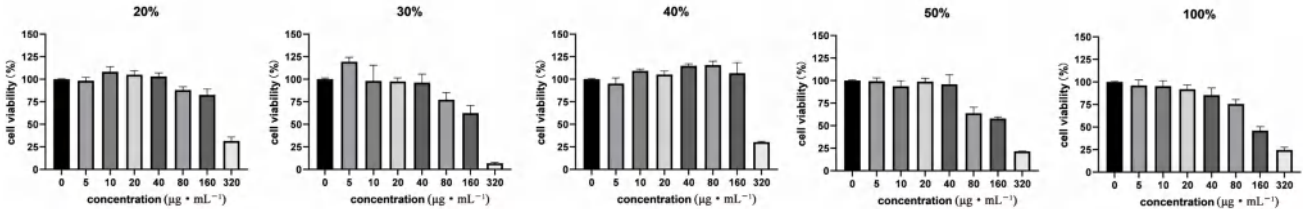


图 1　不同质量浓度的余甘子鞣质对巨噬细胞活性的影响（$n = 3$）

Fig 1　Effect of different concentration of tannins in *Phyllanthus emblica* L. on the proliferation of RAW264.7 cells（$n = 3$）

2.1.3　qPCR 实验检测 M2 巨噬细胞中 *Arg-1*、*CD206*、*TNF-α* mRNA 表达　将 RAW264.7 细胞接种于 12 孔板中，不进行 M2 型诱导的为空白组（ctrl 组）、用 IL-4 和 IL-13 诱导而不给药干预的为 M2 组，用 IL-4 和 IL-13 诱导后余甘子鞣质不同洗脱部位干预 24 h 为给药组，收集细胞，提取 RNA，逆转录 cDNA，进行 qPCR 检测。设计合成 *Arg1*、*CD206*、*TNF-α* 基因引物，以 *Hprt1* 为内参，设置反应程序，目标基因的表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较法进行评估，结果见图 2。模型组 RAW264.7 细胞表达更高水平的 *Arg-1* 和 *CD206*（$P < 0.05$，$P < 0.0001$），表明 IL-4 和 IL-13 作用后成功诱导巨噬细胞向 M2 型极化。各个洗脱部位对 M2 型标志基因的 mRNA 表达均有一定的抑制作用。除 100% 甲醇洗脱部位外，不同的洗脱部位对 *Arg-1* 的表达均有抑制作用，其中 20% 甲醇洗脱部位具有极显著的抑制作用（$P < 0.001$）。同样的，20% 甲醇洗脱部位显著降低 *CD206* mRNA 的表达，升高 *TNF-α* mRNA 的表达（$P < 0.001$），其调控巨噬细胞极化的活性明显强于其他洗脱部位，是余甘子鞣质调控巨噬细胞极化的主要活性部位（EFP）。因此，接下来对 20% 甲醇洗脱部位所含化学成分进行进一步研究。

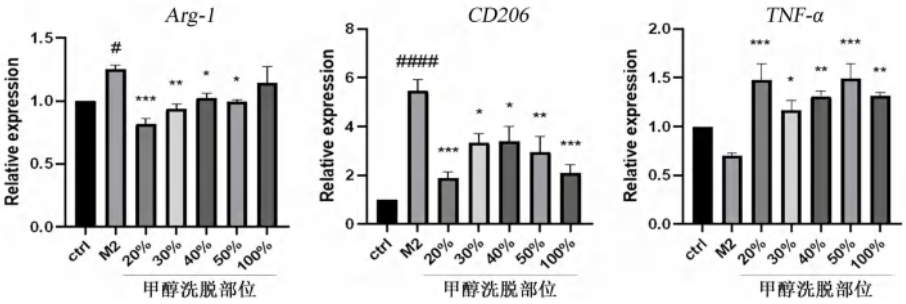


图 2　余甘子鞣质不同洗脱部位对 M2 巨噬细胞极化的影响（$n = 3$）

Fig 2　Effect of different elution parts of tannins in *Phyllanthus emblica* L. on the polarization of M2 macrophages（$n = 3$）

注：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#\#\#}P < 0.0001$；与 M2 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the ctrl group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#\#\#}P < 0.0001$；compared with the M2 group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

2.1.4　统计学方法　结果采用 Graphpad prism 8.4.3 软件进行统计分析，各组间的比较采用单因素方差分析，所有数据以平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2　UPLC-Q-Exactive-MS/MS 分析条件

2.2.1　色谱条件　色谱柱：ACE Excel 3 C18-PFP（150 mm×4.6 mm，3 μm）；流动相：0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 3 min，6% ～ 12%B；3 ～ 18 min，12% ～ 20% B；18 ～ 28 min，20% ～ 30%B；28 ～ 30 min，30%B；30 ～ 34 min，30% ～ 95%B）；流速：0.5 mL • min^{-1}；进样量：5 μL；柱温：30 ℃。

2.2.2　质谱条件　配有热喷雾离子源（HESI），负离子模式检测，离子源参数设置如下：毛细管和辅助气体加热器温度分别为 300 和 350 ℃；喷雾电压为 3.2 kV；鞘气（N_2）流量为 35 arb，辅助气体（N_2）流量为 15 arb。归一化碰撞能量（NCE）为 ±35 V。在 Full-MS/dd-MS^2 条件下，扫描范围为 *m/z* 100 ～ 1500。采用 Xcalibur 3.0 软件进行数据分析。

2.2.3　20% 甲醇洗脱部位化学成分分析　采用上述分析条件，对 20% 甲醇洗脱部位的化学成分进行定性分析。在负离子模式下 20% 甲醇洗脱部位总离子流图如图 3 所示。通过参考相关文献 [6-14]、对比保留时间、精确质谱信息等，对 EFP 的化学成分进行确认，鉴定出 29 个可能的化学成分，包括 7 个酚酸类、12 个简单没食子酰类、9 个鞣花鞣质类、1 个其他类。UPLC-Q-Exactive-MS/MS 数据见表 1。

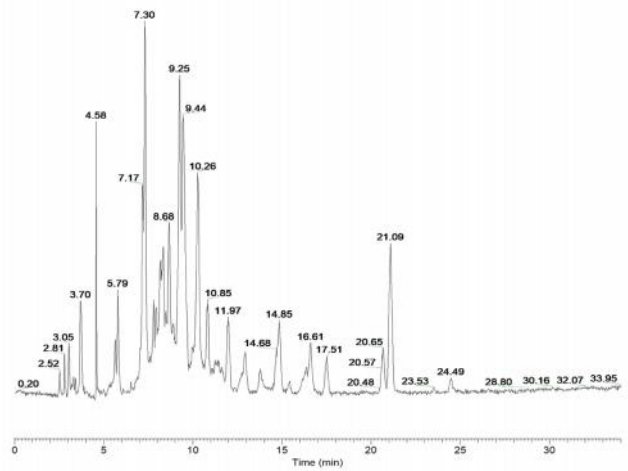


图 3　负离子模式下 20% 洗脱部位的总离子流图

Fig 3　Total ion flow chromatogram of 20% methanol eluted part in negative ion mode

2.2.4　化合物分析

① 酚酸类：共鉴定出 7 个酚酸类化合物成分。酚酸类化合物是一类含酚环的有机酸，含有较多的酚羟基和羧基，其质谱裂解特点是容易失去 H_2O、CO_2 和 CO 等基团。化合物 **9** 的保留时间是 7.30 min，准分子离子峰为 *m/z* 169.0142 $[M-H]^-$，分子式为 $C_7H_6O_5$。经碰撞解离，失去一个 CO_2 产生碎片 *m/z* 125.0254 $[M-H-CO_2]^-$，结合文献 [7] 推测为没食子酸；化合物 **29** 的保留时间为 24.49 min，准分子离子峰为 *m/z* 300.9993 $[M-H]^-$，分子式为 $C_{14}H_6O_8$。经碰撞产生二级碎片 *m/z* 283.9963 $[M-H-OH]^-$；或失去一个 CO_2 产生碎片 *m/z* 257.0081 $[M-H-CO_2]^-$，再失去一个 CO 产生 229.0145 $[M-H-CO_2-CO]^-$，再失去 CO 产生 201.0200 $[M-H-CO_2-2CO]^-$，结合文献 [7] 推测该化合物为鞣花酸。

② 简单没食子酰类：共鉴定出 12 个简单没食子酸酰类化合物成分。简单没食子酸酰类化合物主要为没食子酸衍生物，较易脱去没食子酰基（-galloyl）。化合物 **14**、**20** 的保留时间分别为 9.42 min、11.95 min，准分子离子峰分别为 *m/z* 483.0782 $[M-H]^-$、*m/z* 483.0780 $[M-H]^-$，拟合分子式均为 $C_{20}H_{20}O_{14}$，两者为同分异构体，裂解方式相同。以化合物 **20** 为例，该化合物经碰撞失去一个没食子酰基，得到 *m/z* 331.0677 $[M-H-Gal]^-$，再失去一个 H_2O 得到 *m/z* 313.0566 $[M-H-Gal-H_2O]^-$，失去一个中性碎片 $C_4H_8O_4$ 得到 *m/z* 211.0252$[M-H-Gal-C_4H_8O_4]^-$，或失去一分子葡萄糖得到 *m/z* 169.0149 $[M-H-Gal-Glu]^-$，再失去一个 CO_2 得　到 *m/z* 125.0251 $[M-H-Gal-Glu-CO_2]^-$，结合文献 [8] 推测该化合物为二没食子酰葡萄糖苷 digalloylglucose。

③ 鞣花鞣质类：共鉴定出 9 个鞣花鞣质类成分。鞣花鞣质是一类含六羟基联苯二酸或与其有生源关系的酚羧酸与多元醇缩合形成的酯，较易失去六羟基二苯甲酰基（HHDP）基团、没食子酰基，水解后可生成鞣花酸。余甘子中主要含有的与 HHDP 有生源关系的酚羧酸酰基主要是诃子酰基（Che）。化合物 **27** 的保留时间为 16.61 min，准分子离子峰为 *m/z* 633.0743 $[M-H]^-$，拟合分子式为 $C_{27}H_{22}O_{18}$，脱去一个没食子酸，得到 *m/z* 463.0520，该碎片再丢失一分子葡萄糖（glu），得到 *m/z* 300.9993 $[M-H-Gal-Glu]^-$，继续失去 CO_2 得到 *m/z* 257.0089 $[M-H-Gal-H_2O-Glu-CO_2]^-$，再脱去 CO 得到 *m/z* 229.0154 $[M-H-Gal-H_2O-Glu-CO_2-CO]^-$，没食子酸自母离子脱去产生特征碎片离子 *m/z* 169.0150 $[gallic\ acid]^-$，结合文献 [14] 推测其为柯里拉京。

2.3　网络药理学

2.3.1　活性成分的筛选及靶点的预测　将液质鉴定出的化合物输入 SwissADME 平台（http：//www.swissadme.ch/），以胃肠道吸收得分为“high”，类药性至少通过 2 个“Yes”进行筛选，并结合课题组前期研究 [6] 余甘子鞣质入血成分获得潜在化合物。共筛选出 11 种活性成分，分别为鞣花酸、没食子酸乙酯、没食子酸甲酯、没食子酸、柯里拉京、1，4，6-tri-*O*-galloyl-glucose、3，4，6-tri-*O*-galloyl-glucose、mucic acid 2-*O*-gallate、诃子次酸、特里马苏 I、诃子宁。在 SwissTargetPrediction（http：//www.swisstargetprediction.ch/）数据库中预测不同成分的靶点基因，筛选 probability ＞ 0 的靶点，得到成分的预测靶点。从 GEO 数据库（https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）中查找并筛选差异表达基因，将

表 1　EFP 化学成分结构鉴定

Tab 1　Structure identification of chemical components in EFP

No.	t_R/min	推测原型化合物名称	分子式	理论值（*m/z*）	测得值（*m/z*）	误差/×10^{-6}	MS^2 数据
1[a]	3.20	喹啉酸（quinic acid）	$C_7H_{12}O_6$	191.0550	191.0564	7.304	173.0464，127.0459
2[e]	3.66	mucic acid[6]	$C_6H_{10}O_8$	209.0292	209.0304	5.771	191.0204，147.0305
3[c]	4.19	HHDP-glucose [7]	$C_{20}H_{18}O_{14}$	481.0613	481.063	3.614	481.0613，300.9993
4[b]	4.60	mucic acid 2-*O*-gallate[8]	$C_{13}H_{14}O_{12}$	361.0402	361.0418	4.592	209.0308，191.0204
5[b]	4.73	6-*O*-galloylglucose[9]	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0665	331.0670	5.639	271.0459，211.0253，169.0152，125.0252
6[a]	4.99	诃子次酸（chebulic acid）[9]	$C_{14}H_{12}O_{11}$	355.0295	355.0317	5.894	337.0139，249.0406，205.0511
7[b]	5.66	2-*O*-galloylglucose[9]	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0665	331.0676	4.612	271.0457，211.0253，169.0150，125.0252
8[b]	7.17	mucic acid 1，4-lactone 5-*O*-gallate /mucic acid 1，4-lactone 3-*O*-gallate[8]	$C_{13}H_{12}O_{11}$	343.0296	343.0314	5.371	191.0204
9[a]	7.30	没食子酸（gallic acid）[7]	$C_7H_6O_5$	169.0131	169.0142	5.977	125.0254，97.0298，81.0350，69.0344
10[b]	6.63	1-methyl 2-galloylgalactarate	$C_{14}H_{16}O_{12}$	375.0558	375.0583	6.633	375.0578，223.0463，169.0149
11[b]	7.71	6-methyl 2-galloylgalactarate	$C_{14}H_{16}O_{12}$	375.0558	375.0581	6.233	375.0578，343.0310，223.0463，169.0149
12[b]	8.16	mucic acid digallate[8]	$C_{20}H_{18}O_{16}$	513.0511	513.0521	1.967	361.0408，209.0307
13[c]	9.28	phyllanemblinin D[10]	$C_{27}H_{26}O_{20}$	669.0933	669.0985	7.683	337.0204，249.0405，205.0512，169.0140
14[b]	9.42	digalloylglucose[8]	$C_{20}H_{20}O_{14}$	483.0769	483.0782	2.543	331.0674，313.0562，271.0456，169.0149，125.0251
15[b]	9.50	1-*O*-galloylglucose[9]	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0665	331.0676	4.522	271.0457，211.0254，169.0150，125.0251
16[c]	9.68	地榆酸双内酯（sanguisorbic acid dilactone）[11]	$C_{21}H_{10}O_{13}$	469.0037	469.0060	4.911	299.0415，270.0439，169.0149
17[a]	9.74	特里马素Ⅰ（tellimagrandin Ⅰ）[9]	$C_{34}H_{26}O_{22}$	785.0831	785.0834	0.308	633.0796，615.0288，483.0708，275.2010
18[c]	10.78	castalin/vescalin[11]	$C_{27}H_{20}O_{18}$	631.0565	631.0573	2.884	461.0355，300.0958，169.0150
19[c]	11.55	phyllanemblinin A	$C_{27}H_{21}O_{17}$	615.0617	615.0604	2.041	463.0100，169.0150
20[b]	11.95	二没食子酰葡萄糖苷（digalloylglucose）[8]	$C_{20}H_{20}O_{14}$	483.0769	483.0780	2.274	331.0677，313.0566，271.0456，211.0252，169.0149，125.0251
21[c]	13.14	methyl neochebulanin[12]	$C_{28}H_{28}O_{20}$	683.1090	683.1155	9.458	481.0260，300.3356，275.0192，169.0417
22[a]	14.68	没食子酸甲酯（methyl gallate）	$C_8H_8O_5$	183.0287	183.0299	3.124	168.0070，140.0121，124.0121，111.0093
23[a]	14.72	短叶苏木酚酸（brevifolin carboxylic acid）[13]	$C_{13}H_8O_8$	291.0142	291.0151	3.395	247.0249，203.0569，175.0619，147.0669，191.0365
24[b]	16.37	3，4，6-tri-*O*-galloyl-glucose[9]	$C_{27}H_{24}O_{18}$	635.0878	635.0850	4.519	483.0786，465.0577，377.0159，330.9970
25[c]	16.40	诃子宁（chebulanin）[7]	$C_{27}H_{24}O_{19}$	651.0828	651.0847	2.957	499.7005，481.0593，275.0175，247.0252，169.0150
26[b]	16.50	1，4，6-tri-*O*-galloyl-glucose [9]	$C_{27}H_{24}O_{18}$	635.0878	635.0850	4.519	483.0787，465.0667，377.0159，330.9999
27[c]	16.61	柯里拉京（corilagin）[14]	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633.0722	633.0743	3.222	463.0520，300.9993，257.0089，229.0154，169.0150，125.0246
28[a]	16.98	没食子酸乙酯（ethyl gallate）	$C_9H_{10}O_5$	197.0444	197.0457	6.091	153.9054，197.8953，168.9270
29[a]	24.49	鞣花酸（ellagic acid）[7]	$C_{14}H_6O_8$	300.9978	300.9993	2.784	283.9963，257.0081，229.0145，201.0200

注（Note）：a. 酚酸类（phenolic acids）；b. 简单没食子酰类（simple gallic acid class）；c. 鞣花鞣质类（tannin tannins）；e. 其他类（other classes）。

巨噬细胞差异靶点基因与 20% 甲醇洗脱部位相关成分预测靶点进行比对，取交集作为潜在靶点基因。结果预测得 94 个靶点基因。从 GEO 数据库中下载编号为 GSE5099 的人类基因芯片，通过 GEO2R 功能以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 0.5$ 为标准，筛选去重后得到巨噬细胞相关的靶点共 5391 个。对活性成分信息和巨噬细胞相关靶点进行分析，得到交集靶点 37 个，将其视为 20% 甲醇洗脱部位调控巨噬细胞的潜在靶点。

2.3.2　“药物成分 - 潜在靶点”网络的构建　利用 Cytoscape 3.7.2 软件的“Merge”工具构建“药物成分 - 潜在靶点 - 巨噬细胞”网络（见图 4），共包括 49 个节点，126 条边。根据度值排序得到主要的活性成分为鞣花酸、没食子酸甲酯、1，4，6-tri-*O*-galloyl-glucose、没食子酸、没食子酸乙酯等；这些成分作用的靶点有高角鲨烯环氧化酶（SQLE）、蛋白质酪氨酸磷酸酶 1（PTPN1）、*β* 分泌酶 1（BACE1）、蛋白质酪氨酸磷酸酶 2（PTPN2）、重组人醛糖还原酶（AKR1B1）等，揭示其或许与余甘子鞣质调控巨噬细胞的过程密切相关。

2.3.3　蛋白质 - 蛋白质相互作用（PPI）网络的构建与分析　在 STRING 平台（https：//STRING-db.org/）输入交集靶点，限定物种为“智人”，获得 PPI 网络。利用 Cytoscape 3.7.2 软件，对 PPI 网络进行可视化操作。结果见图 5，通过 Network Ana-

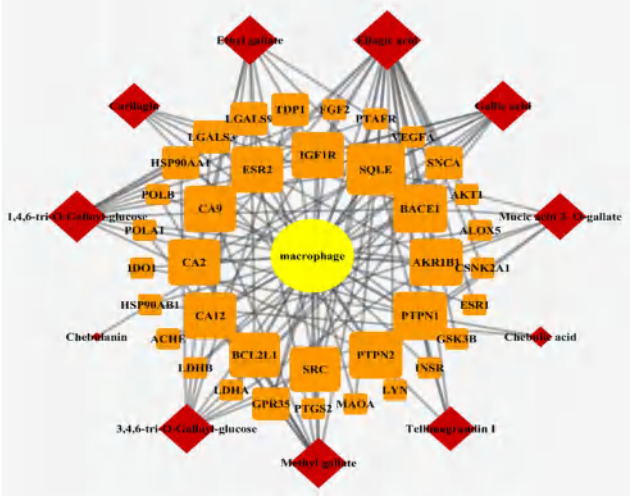


图 4　20% 甲醇洗脱部位调控巨噬细胞细胞的“药物成分 - 潜在靶点”网络

Fig 4　Network of “component-potential target” of 20% methanol eluted part

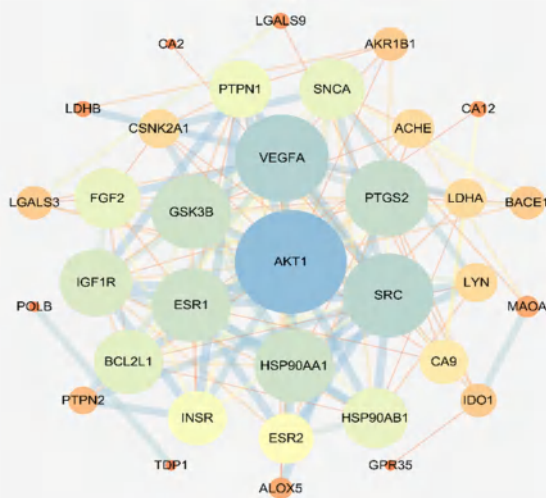


图 5　交集靶点 PPI 网络

Fig 5　PPI network of potential targets

lyzer 插件分析其拓扑学特征，筛选关键靶点主要为丝氨酸 / 苏氨酸激酶（AKT1）、血管内皮生长因子 A（VEGFA）、和酪氨酸专一性蛋白激酶（Src）、前列腺素过氧化物合成酶 2（PTGS2）、雌激素受体 1（ESR1）、糖原合成酶激酶（GSK3B）等。

2.3.4　靶点功能富集分析与网络构建　通过 Sangerbox 平台（http：//sangerbox.com/）对交集靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析，并对排名前 20 的通路进行结果可视化。

对 37 个交集靶点进行 GO 功能富集分析（$P < 0.05$），共获得 2438 个 GO 条目，包括生物过程（BP）条目 2096 个、细胞组成（CC）条目 146 个、分子功能（MF）条目 196 个，对排名前 10 的各类 GO 条目进行可视化处理，结果见图 6A。BP 主要涉及对有机物的反应、对含氧化合物的反应、对化学刺激的细胞反应等；CC 主要涉及囊泡、膜筏、膜微区等；MF 主要涉及一氧化氮合酶活性、酶结合、激酶结合等。

KEGG 富集相关通路 76 条（$P < 0.05$），对排名前 20 的通路进行可视化展示（见图 6B），包括 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药信号通路、缺氧诱导因子 1 信号通路、癌症信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NF-kappaB 信号通路等。

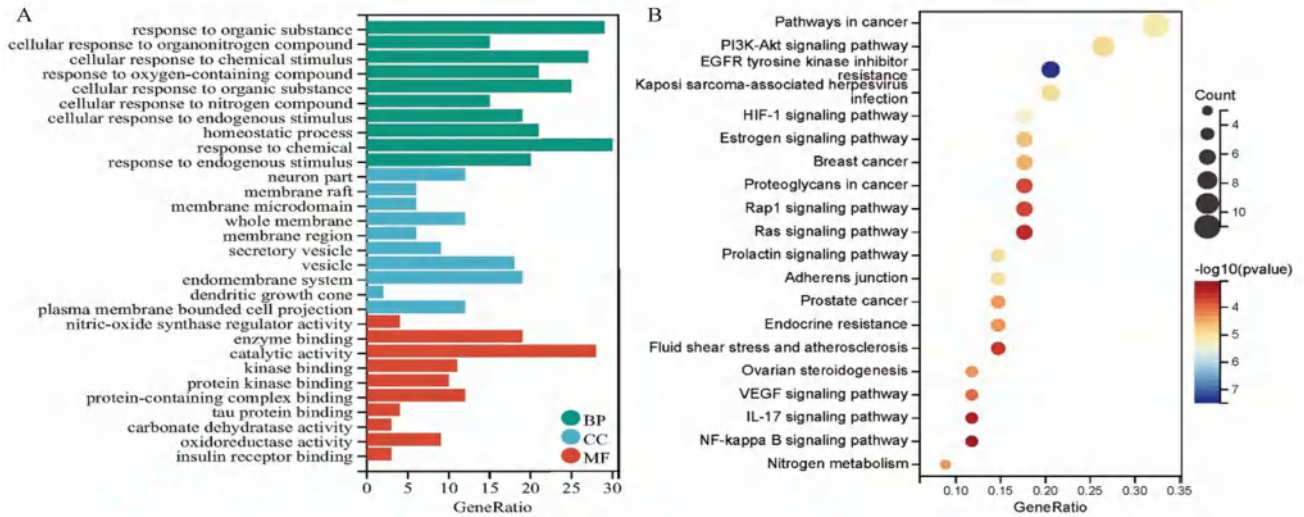


图 6　GO 富集分析条形图（A）和 KEGG 富集分析气泡图（B）

Fig 6　GO enrichment analysis（A）and KEGG pathways enrichment analysis（B）of potential targets

3　讨论

精氨酸酶 -1（Arg-1）和甘露糖受体（CD206）是 M2 巨噬细胞的识别标志物。Arg-1 与 iNOS 竞争 L- 精氨酸作为底物，生成胶原蛋白前体 L- 鸟氨酸，形成促进肿瘤生长的纤维化微环境 [15]。此外，Arg-1 通过代谢 L- 精氨酸直接影响 $CD8^+$ T 细胞 [16]，CD206 可通过抑制 CD45 磷酸酶活性损害 $CD8^+$ T 细胞的细胞毒性 [17]，导致肿瘤细胞免

疫逃逸。因此，本研究利用 M2 型 RAW264.7 细胞模型筛选出余甘子鞣质 20% 甲醇洗脱部位，发现其能够显著抑制 M2 型巨噬细胞识别标志物 *Arg-1*、*CD206* 的表达，同时促进 M1 型标志物 *TNF-α*，提升其抗肿瘤免疫活性。

利用 UPLC-MS 分析 20% 甲醇洗脱部位定性鉴别出 29 个化学成分，主要为酚酸类化合物和鞣质类化合物。进一步根据课题组前期研究 [6] 和 SwissADME 平台获得 11 个活性成分进行网络药理学分析。“药物成分 - 潜在靶点” 网络图中度值靠前的成分分别有没食子酸、柯里拉京、鞣花酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯等。毛赫新等 [18] 发现没食子酸能够降低 M1 型巨噬细胞阳性表达率，抑制 *iNOS* 和 *IL-1β* mRNA 表达水平，抑制 IFN-*γ*/LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型的极化。柯里拉京可以通过抑制 IL-13Ralpha1 信号通路抑制 M2 巨噬细胞极化 [19]。此外，鞣花酸通过 ERK1/2/RSK 信号通路抑制肿瘤细胞功能 [20]，没食子酸甲酯、没食子酸乙酯能够通过抑制肿瘤细胞中 Akt 和 ERK1/2 活性、ERK1/2/RSK 信号通路来发挥抗肿瘤作用 [21-22]，但对于这些成分的研究主要集中在对肿瘤细胞的直接作用，对其抗肿瘤免疫的作用却鲜有报道。

通过 KEGG 富集分析可推断，20% 甲醇洗脱部位调控巨噬细胞的信号通路主要与炎症反应、免疫反应相关，例如 PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、NF-*κ*B 信号通路等。

PI3K/Akt 信号通路上汇集多种胞内和胞外信号，可以调节巨噬细胞的迁移、增殖、自噬、极化、代谢功能和炎症反应 [23]。PI3K 由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成，能够诱发其底物磷酸化为 3，4，5- 三磷酸磷脂酰肌醇（PIP3）。Akt 是 PI3K/Akt 通路中调节巨噬细胞功能的最重要的效应分子，Akt2 能促使巨噬细胞向 M1 型极化 [24]；敲除 Akt2 使 miR-155 水平降低，C/EBP*β*（M2 极化的调节因子）表达增加 [25]。此外，Akt2 缺陷的巨噬细胞能够上调 miR-164a 导致 TLR4 信号通路的负调控，促进 M2 型极化 [23]。研究表明，可以通过调节 PI3K-p110 蛋白表达，Akt 磷酸化水平，调节巨噬细胞极化的作用，从而干预肿瘤微环境发挥抗肿瘤作用 [26]。mTOR 是 PI3K/Akt 的下游信号，在协调代谢和炎症信号来调节巨噬细胞表型方面也发挥作用 [27]。

HIF-1 信号通路是生物处于低氧状态下的应激信号通路，它由氧调节的 *α* 亚基和组成型表达的 *β* 亚基组成的异源二聚体。根据 *α* 亚基的不同，又分为 3 种亚型，分别是 HIF-1*α*、HIF-2*α* 和 HIF-3*α*，其中 HIF-1*α* 是介导缺氧信号的转导中枢 [28-29]。当 PI3K/Akt 信号通路的激活后，Akt 磷酸化，能够增强 HIF-1*α* 的活性，抑制其蛋白酶体降解 [30]。HIF-*α* 亚基可在巨噬细胞中被差异激活，Th1 细胞因子能够通过诱导 HIF-1*α* 调控巨噬细胞向 M1 型极化，相反，Th2 细胞因子通过诱导 HIF-2*α* 调控 M2 型极化 [31]，也有研究表明，通过作用于 HIF-1*α* 和 HIF-1*β* 的共有靶点 IL-1*β* 能够影响巨噬细胞 M1 型极化和炎症反应 [32]。此外，HIF-1 通路与细胞的代谢，尤其是糖酵解水平有关。LDHA、GLUT1、PDK1 等均为 HIF-1*α* 的作用靶点。HIF-1*α* 激活会增加巨噬细胞的迁移活性并影响巨噬细胞的代谢功能，巨噬细胞的代谢改变与其表型和功能密切相关 [28，33]。研究表明，经泛素 - 蛋白酶体途径促进 HIF-1*α* 蛋白降解，抑制糖酵解通路，能够影响 M1 型巨噬细胞极化，抑制结肠炎发生 [34]；抑制 M2 巨噬细胞线粒体氧化磷酸化，能够抑制 M2 巨噬细胞极化，增强抗肿瘤效能 [35]。

NF-*κ*B 信号通路是 PI3K/Akt 信号通路的下游通路之一，是调节炎症因子产生的重要通路。I*κ*B 激酶被激活后，诱导 NF-*κ*B 抑制蛋白磷酸化并降解，激活 NF-*κ*B，暴露出核定位序列，与细胞核内特定位点结合，启动多种靶基因的转录，产生并释放细胞因子 [36]。脂多糖（LPS）诱导的巨噬细胞 M1 极化依赖于 NF-kBp65 的激活 [37]。姚静静 [38] 提出通过 NF-*κ*B 信号通路诱导 M2 巨噬细胞清道夫受体 MSR1、CD36 和内质网应激 GRP78 的表达，能够影响巨噬细胞的极化。

本实验基于 M2 巨噬细胞模型筛选的有效部位可能通过调控 TAMs 的免疫抑制活性在抗肿瘤治疗中发挥作用。基于 LC-MS 结合网络药理学探讨了 20% 甲醇洗脱部位调控巨噬细胞极化的物质基础及分子机制，其分子机制可能是与 PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、NF-*κ*B 信号通路有关。本研究为后续深入验证余甘子鞣质调控巨噬细胞的作用机制奠定基础。

参考文献

[1] 褚旭新，卜凡雪，殷婷婕，等 . 基于肿瘤相关巨噬细胞靶向调控的抗肿瘤策略 [J]. 中国药科大学学报，2021，52（3）：261-269.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：186.

[3] 陈静，冯光远，李登科，等 . 藏药余甘子鞣质部位对人肿瘤细胞凋亡与周期的影响 [J]. 中国药物警戒，2016，13（4）：193-196.

[4] Zhao HJ，Liu T，Mao X，et al. Fructus phyllanthi tannin fraction induces apoptosis and inhibits migration and invasion of human lung squamous carcinoma cells in vitro via MAPK/MMP pathways [J]. Acta Pharmacol Sin，2015，36（6）：758-768.

[5] Jantan I，Haque MA，Ilangkovan M，et al. An insight into

the modulatory effects and mechanisms of action of phyllanthus species and their bioactive metabolites on the immune system [J]. Front Pharmacol，2019，10：878.

[6] Wu L，Zhang Q，Liang W，et al. Phytochemical analysis using UPLC-MSn combined with network pharmacology approaches to explore the biomarkers for the quality control of the anticancer tannin fraction of *phyllanthus emblica* L. Habitat in Nepal [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：6623791.

[7] 简平，亓旗，周坤，等 . 藏药诃子化学成分的高效液相色谱 - 质谱联用技术快速鉴定研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2018，20（9）：1627-1637.

[8] 张秋楠，常子豪，叶婷，等 . 基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 整合网络药理学研究藏药大三果化学成分及作用机制 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（6）：1850-1866.

[9] 周坤，简平，梁文仪，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析藏药诃子与毛诃子化学成分 [J]. 质谱学报，2020，41（3）：254-267.

[10] Zhang YJ，Abe T，Taanaka T，et al. Phyllanemblinins A-F，new ellagitannins from *Phyllanthus emblica* [J]. J Nat Prod，2001，64（12）：1527-1532.

[11] 刘月程，戴衍朋，王变利，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 结合诊断离子过滤技术快速分析石榴皮的鞣质类成分 [J]. 中华中医药学刊，2023，41（5）：71-79.

[12] Li S，Ye T，Liang L，et al. Anti-cancer activity of an ethyl-acetate extract of the fruits of *Terminalia bellerica*（Gaertn.）Roxb. through an apoptotic signaling pathway in vitro [J]. Journal of Traditional Chinese Medical Sciences，2018，5（4）：370-379.

[13] 许维桐，霍志鹏，雷磊，等 . HPLC-IT-TOF/MS 分析地榆水煎液的化学成分群 [J]. 中草药，2018，49（6）：1277-1288.

[14] Yisimayili Z，Guo X，Liu H，et al. Metabolic profiling analysis of corilagin in vivo and in vitro using high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal，2019，165：251-260.

[15] Qian BZ，Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis [J]. Cell，2010，141（1）：39-51.

[16] Grohmann U，Bronye V. Control of immune response by amino acid metabolism [J]. Immunol Rev，2010，236：243-264.

[17] Schuette V，Embgenbroich M，Ulas T，et al. Mannose receptor induces T-cell tolerance via inhibition of CD45 and up-regulation of CTLA-4 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2016，113（38）：10649-10654.

[18] 毛赫新，王琳源，关宁，等 . 没食子酸对 M1 型巨噬细胞极化的影响 [J]. 吉林大学学报（医学版），2021，47（5）：1139-1145.

[19] Li YQ，Chen YF，Dang YP，et al. Corilagin counteracts IL-13Rα1 signaling pathway in macrophages to mitigate schistosome egg-induced hepatic fibrosis [J]. Front Cell Infect Microbiol，2017，7：443.

[20] 张玉梅，王家晓 . 石榴皮鞣花酸对 4T1 乳腺癌小鼠免疫功能的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2014，23（15）：1597-1599，1602.

[21] 李启凤，李一凡，张金芳，等 . 没食子酸甲酯抑制胶质瘤细胞中 Akt 和 ERK1/2 活性发挥抗肿瘤作用 [J]. 宁夏医科大学学报，2020，42（8）：757-764.

[22] Liu FF，Zu XY，Xie XM，et al. Ethyl gallate as a novel ERK1/2 inhibitor suppresses patient-derived esophageal tumor growth [J]. Mol Carcinog，2019，58（4）：533-543.

[23] Vergadi E，Ieronymaki E，Lyroni K，et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. J Immunol，2017，198（3）：1006-1014.

[24] Xu F，Kang YH，Zhang H，et al. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of staphylococcus aureus pulmonary infection [J]. J Infect Dis，2013，208（3）：528-538.

[25] Arranz A，Doxaki C，Vergadi E，et al. Akt1 and akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2012，109（24）：9517-9522.

[26] 彭博，练东银，张广平，等 . 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨小金丹对巨噬细胞极化的调控作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（9）：36-42.

[27] 宋银辉，王敬琪，包和义，等 . FOXF2 通过 Akt/mTOR 信号通路影响乳腺癌肿瘤相关巨噬细胞极化 [J]. 免疫学杂志，2023，39（2）：157-163.

[28] Corrado C，Fontana S. Hypoxia and HIF signaling：one axis with divergent effects [J]. Int J Mol Sci，2020，21（16）：5611.

[29] 杨梦思，周娜，王志钢，等 . 转录因子 HIF-1α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展 [J]. 生物技术通报，2016，32（8）：8-13.

[30] Zhang Z，Yao L，Yang JH，et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia（review）[J]. Mol Med Rep，2018，18（4）：3547-3554.

[31] Takeda N，O'dea EL，Doedens A，et al. Differential activation and antagonistic function of HIF-α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis [J]. Genes Dev，2010，24（5）：491-501.

[32] Lee KE，Simon MC. SnapShot：hypoxia-inducible factors [J]. Cell，2015，163（5）：1288.

[33] Vitale I，Manic G，Coussens LM，et al. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment [J]. Cell Metab，2019，30（1）：36-50.

[34] Zhuang HD，Lv Q，Zhong C，et al. Tiliroside ameliorates ulcerative colitis by restoring the M1/M2 macrophage balance via the HIF-1α/glycolysis pathway [J]. Front Immunol，2021，12：649463.

[35] 侯亚琴，李明，岳利多，等 . 黄精对白细胞介素 -4 诱导 M2 巨噬细胞能量代谢和极化的作用与机制 [J]. 中华中医药杂志，2022，37（8）：4400-4404.

[36] Vallabhapurapu S，Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [J]. Annu Rev Immunol，2009，27：693-733.

[37] Maehara T，Fujimori K. Contribution of FP receptors in M1 macrophage polarization via IL-10-regulated nuclear translocation of NF-κB p65 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids，2020，1865（5）：158654.

[38] 姚静静 . 6- 姜辣素调控巨噬细胞防治肺癌的作用机制研究 [D]. 郑州：河南大学，2019.

（收稿日期：2023-03-16；修回日期：2023-04-23）

UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 结合网络药理学分析泻肺利水汤的化学成分及治疗心力衰竭的作用机制

周德勇[1, 2]，龚韬[1, 2*]，佟彤[2]，娄妍[2]，杨薇[1, 2]，胡银燕[1, 2]，刘红旭[1*]（1.首都医科大学附属北京中医医院，北京　100010；2.北京市中医药研究所，北京　100010）

摘要：目的　通过 UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 结合网络药理学和分子对接方法探讨泻肺利水汤治疗心力衰竭的主要活性成分、靶点及作用机制。**方法**　利用 UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 快速鉴定泻肺利水汤水提物的化学成分，SwissADME 筛选可能具有活性的成分，SwissTargetPrediction 数据库预测成分潜在的作用靶点，GeneCards、OMIM、DrugBank、TTD 等数据库筛选心力衰竭疾病相关靶点。将药物靶点与疾病靶点取交集，构建“药物 - 活性成分 - 靶点”调控图，构建蛋白互作网络，筛选出核心基因，利用 R 语言对核心作用靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析，最后利用分子对接技术进行初步验证。**结果**　共鉴定化合物 82 个，黄酮类 37 个，酚酸类 10 个，香豆素类 7 个，生物碱类 5 个，皂苷类 5 个，其他类 18 个；网络药理学研究筛选出活性成分 37 个，药物 - 疾病共同靶点 135 个；PPI 及网络分析显示 TNF、AKT1、EGFR、VEGFA、ESR1 等 5 个靶点为主要作用靶点，PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、癌症中的蛋白聚糖、Rap1 信号通路为主要信号通路。分子对接结果表明，主要活性成分及核心靶点之间具有良好的亲和力。**结论**　本研究初步揭示了泻肺利水汤是通过多成分、多靶点、多通路的机制治疗心力衰竭，为其进一步开发利用及临床应用提供了生物学信息基础。

关键词：泻肺利水汤；网络药理学；心力衰竭；分析对接；UHPLC-Q-Exactive-MS/MS
中图分类号：R284.1，R285　**文献标识码：**A　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2630-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.013

Active components and mechanism of Xiefei Lishui decoction for heart failure based on UHPLC-Q-Exactive-MS/MS combined with network pharmacology

ZHOU De-yong[1, 2], GONG Tao[1, 2*], TONG Tong[2], LOU Yan[2], YANG Wei[1, 2], HU Yin-yan[1, 2], LIU Hong-xu[1*] (1. *Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100010; 2. *Beijing Research Institute of Chinese Medicine*, *Beijing* 100010)

Abstract: Objective To determine the main active ingredients, targets, and mechanism of Xiefei Lishui decoction for heart failure by UHPLC-Q-Exective-MS/MS combined with network pharmacology and molecular docking methods. **Methods** UHPLC-Q-Exective-MS/MS was used to rapidly identify the chemical components of the water extract of Xiefei Lishui decoction. Swiss ADME was used to screen the active components. Swiss Target Prediction database was used to predict potential action targets of the components, GeneCards, OMIM, DrugBank, TTD and other databases were used to screen targets related to cardiac diseases. The drug targets and disease targets were intersected to construct a “drug-active component-target” regulatory map. A protein interaction network was built, core genes were screened out, GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis was performed, and finally preliminary verification was conducted with molecular docking technology. **Results** Totally 82 compounds were identified,

基金项目：北京市中医药研究所市财政专项（No.YJS-2022-21）；北京市医院管理局重点医学专业发展计划（No.ZYLX201817）。
作者简介：周德勇，男，助理研究员，主要从事中药药效成分研究及药物创制，email：zhoudeyong92@163.com　*通信作者：龚韬，女，副研究员，主要从事中药制剂研究及质量分析，email：hellogt@sina.com；刘红旭，男，主任医师，博士研究生导师，主要从事中医药防治心血管病的临床与基础研究，email：lhx_@263.net

including 37 flavonoids, 10 phenolic acids, 7 coumarins, 5 alkaloids, 5 saponins, and 18 others. Network pharmacology screened 37 active ingredients and 135 common drug-disease targets. PPI and network analysis showed that TNF, AKT1, EGFR, VEGFA, and ESR1 were the main targets of action. The main signal pathways included PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, proteoglycans in cancer, and Rap1 signaling pathway. Molecular docking showed good affinity between the main active components and the core targets. **Conclusion** Xiefei Lishui decoction functions via multi-components, multi-targets, and multi-pathways in the treatment of heart failure, providing a biological information basis for its further development, utilization, and clinical application.

Key words: Xiefei Lishui decoction; network pharmacology; heart failure; molecular docking technology; UHPLC-Q-Exactive-MS/MS

心力衰竭是各种心脏疾病严重或晚期的表现，是由多种原因导致的心脏或（及）心室结构、功能的异常改变或（及）障碍，从而引起主要表现为呼吸困难、疲乏和体液潴留等的复杂临床综合征[1]。好发于中老年人，且发病率呈逐年上升趋势[2]。中医药在稳定病情、改善功能和提高患者生活质量方面具有独特的优势[3]。泻肺利水汤是国家名老中医许心如教授根据《金匮要略》中葶苈大枣泻肺汤和防己黄芪汤主方加减而来的临床经验方[4-6]，通过调节全身气机、推动调节血液的运行，通调水道，治理调节津液的代谢。泻肺利水汤由黄芪、葶苈子、防己、桑白皮、香加皮组成，方中黄芪补益元气，扶正固本，该药补而不滞，兼有行湿之功；桑白皮、葶苈子、香加皮泻肺气行水，除胸中痰饮，化痰平喘利水；防己益气利水；诸药合用既能益气养阴，又能泻肺利水，化痰平喘。临床研究表明，泻肺利水汤能有效改善心力衰竭患者的临床症状、心功能和生活质量，但其治疗心力衰竭的活性成分及作用机制尚不清楚，故本研究采用 UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 分析泻肺利水汤的化学成分，借助网络药理学构建“药物 - 疾病 - 靶点”相互作用网络，初步探究其治疗心力衰竭的主要活性成分及作用机制，为今后的临床研究和药物制剂开发提供参考。

1　材料

1.1　仪器

赛默飞 Q-Exactive Orbitrap 四极杆 - 静电场轨道阱质谱仪（美国 Thermo Scientific 公司）；Xcalibur 4.2 化学工作站，XP105DR 十万分之一天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1.2　试药

甲醇、乙腈为色谱纯（赛默飞世尔科技有限公司）；磷酸（色谱纯，天津市光复科技发展有限公司）；水为超纯水。4- 甲氧基水杨醛（批号：DSTDJ015801）、杠柳毒苷（批号：DSTDG00401）、槲皮素 -3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖 -7-*O*-*β*- 龙胆二糖苷（批号：DSTDH008301）、防己诺林碱（批号：DST210829-005）、桑皮苷 A（批号：DSTDS006801）（成都德思特生物技术有限公司，纯度均大于 98%），黄芪甲苷（批号：0781-9706，纯度≥ 98%，中国食品药品检定研究院）。

2　方法与结果

2.1　混合对照品溶液的制备

精密称取 4- 甲氧基水杨醛、山柰酚、杠柳毒苷、槲皮素 -3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖 -7-*O*-*β*- 龙胆二糖苷、防己诺林碱、桑皮苷 A、黄芪甲苷等对照品适量，加入甲醇分别制成质量浓度为 20.03、21.47、25.15、26.09、25.17、23.14、21.96 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2　供试品溶液的制备

按照泻肺利水汤处方组成称取黄芪 12 g、南葶苈子 12 g、桑白皮 6 g、防己 6 g、香加皮 12 g 于 1000 mL 圆底烧瓶中，加入 10 倍量水，提取 2 次，每次 1 h，取续滤液，合并，减压浓缩干燥，即得。精密称定上述干燥粉末 50 mg 于 10 mL 量瓶中，加入适量甲醇，超声处理（功率 250 W，频率 30 kHz）30 min，放冷，加甲醇至刻度线，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得泻肺利水汤供试品溶液。

2.3　UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 分析条件

2.3.1　色谱条件　Agilent ZORBAX SB-C18 液相色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以甲醇（A）-0.1% 甲酸水溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0 ～ 20 min，3% → 30%A；20 ～ 30 min，30% → 40%A；30 ～ 45 min，40% → 60%A；45 ～ 50 min，60%A；50 ～ 80 min，60% → 90%A；80 ～ 85 min，90%A；85 ～ 86 min，90% → 3%A；86 ～ 100 min，3% A），流速 0.4 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。

2.3.2　质谱条件　热喷雾离子源（HESI）；离子源温度 450 ℃，喷雾电压 3.5 kV，S-LensRF 电压 50 V，毛细管温度 350 ℃，鞘气和辅助气均为高纯氮气（纯度大于 99.99%），鞘气流速：30 arb，辅助

气流速：12 arb。质谱采集范围为 *m/z* 100 ～ 1500，采集时间 0 ～ 90 min，与数据依赖性二级质谱扫描 $ddMS^2$；分辨率：70 000（Full Scan），17 500（MS/MS）；碰撞模式：高能量碰撞解离（HCD），碰撞能量：NCE 30，Stepped NCE 50%。

2.4　泻肺利水汤水提液化学成分分析与鉴定

采用 UHPLC-Q-Exactive-MS，对泻肺利水汤水提物样品进行正负离子全扫描，获得正负离子模式下的 TIC 图（见图 1），通过与对照品的相对保留时间、准分子离子峰、MS/MS 碎片离子信息等信息对比确认，结合参考文献 [7-15]，共鉴定化合物 82 个，包括黄酮类 37 个，酚酸类 10 个，香豆素类 7 个，生物碱类 5 个，皂苷类 5 个，其他类 18 个。正负离子模式下均鉴定出的成分，表中仅列出负离子模式下化合物的离子碎片信息，具体结果见表 1。

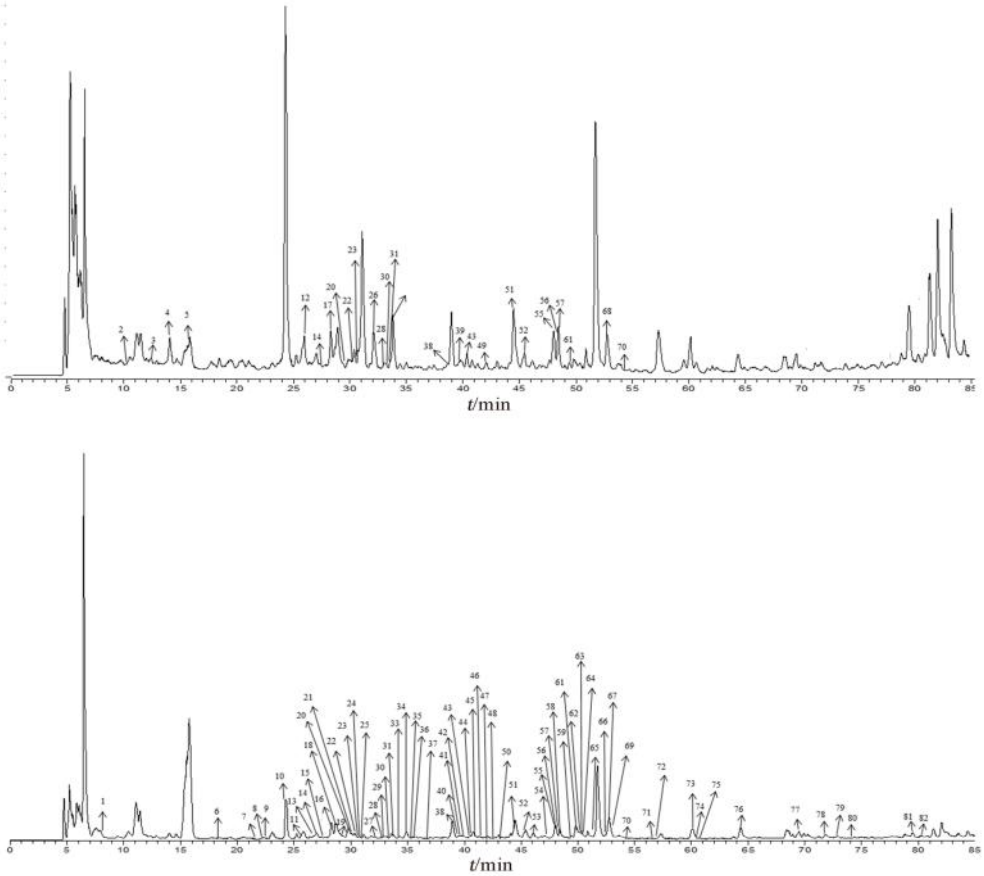


图 1　泻肺利水汤水提物正（上图）、负（下图）离子模式下的 TIC 图

Fig 1　TIC diagram of Xiefei Lishui decoction in positive ion（up）and negative ion（down）mode

2.5　网络药理学分析

2.5.1　药物活性成分及靶点收集　以胃肠道吸收（GI absorption）得分为“high”，类药性（druglikeness）至少得到 2 个“Yes”为依据，借助 Swiss ADME 平台对筛选出的化学成分进行筛选；将筛选出的化合物导入 SwissTargetPrediction 数据库预测各化学成分的作用靶点，以 Probability 大于 0.1 为筛选条件，共筛选得到活性成分 37 个，靶点 1603 个，删除重复靶点后共有 470 个。

2.5.2　疾病靶点预测筛选　以“heart failure”为关键词，在 GeneCard、OMIM、DrugBank、TTD 4 个数据库中检索，获取心力衰竭相关靶点，分别得到靶点 5237、130、54、30 个，在 Genecard 数据库中筛选得到的靶点过多，以大于 2 倍中位数的得分数为条件进行筛选后得到靶点 1312 个，将 4 个数据库的目标靶点合并，删除重复值。使用 R 语言将药物靶点与获得的疾病靶点进行整合，删除重复值后合并得到共同靶点 1412 个，取交集得 135 个。

2.5.3　药物 - 活性成分 - 疾病 - 靶点互作网络　将获得的交集靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件，构建“药物 - 活性成分 - 疾病 - 靶点”的调控图，共得到节点 177 个和关系 603 条，结果见图 2，经计算 degree 值较高的化学成分分别是山柰素、甘草素、7- 羟基香豆素、防己菲碱、黄芪紫檀烷苷。

2.5.4　PPI 网络构建和核心基因预测　应用 STRING 网络平台，构建交集基因的 PPI 网络图，将其进一步利用 Cytoscape 3.9.0 构建网络分析图，

表 1　泻肺利水汤中化学成分分析与鉴定

Tab 1　Analysis and identification of chemical components of Xiefei Lishui decoction

No.	t_R/min	离子类型	*m/z* 检测值	*m/z* 理论值	误差/$\times10^{-6}$	主要碎片离子	分子式	化合物名称	来源
1	8.15	$[M-H]^-$	116.0706	116.0705	0.9	116.07，71.01	$C_5H_{11}NO_2$	缬氨酸	黄芪
2	10.53	$[M+H]^+$	124.0394	124.0393	0.8	124.03，96.04，80.05，78.03	$C_6H_5O_2N$	烟酸	黄芪
3*	12.32	$[M+H]^+$	182.0814	182.0812	1.1	182.08，165.05，136.07	$C_9H_{11}NO_3$	酪氨酸	黄芪
4	14.09	$[M+H]^+$	268.1043	268.1040	1.1	268.10，136.06	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	腺苷	黄芪
5	15.31	$[M+H]^+$	284.0990	284.0995	−1.8	284.12，152.05	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	鸟苷	黄芪
6	18.56	$[M-H]^-$	433.1340	433.1346	−1.4	301.09，139.03	$C_{18}H_{26}O_{12}$	markhamioside F	黄芪
7	22.67	$[M-H]^-$	463.1458	463.1446	2.6	233.06，169.04，154.02，139.00	$C_{19}H_{28}O_{13}$	arctiiphenolglycoside A	香加皮
8*	23.06	$[M-H]^-$	153.0183	153.0182	0.7	153.01，109.02	$C_6H_6O_2$	2，4-二羟基苯甲酸	防己
9	23.11	$[M-H]^-$	353.0877	353.0867	2.8	353.08，191.05，179.03，135.04	$C_{16}H_{18}O_9$	4-*O*-咖啡酰奎宁酸	香加皮
10*	24.44	$[M-H]^-$	197.0450	197.0445	2.5	197.04，182.02，166.99，138.03	$C_9H_{10}O_5$	丁香酸	葶苈子
11	25.77	$[M-H]^-$	567.1725	567.1708	3.0	567.17，405.11，243.06.225.05	$C_{26}H_{32}O_{14}$	桑皮苷 A	桑白皮
12*	26.00	$[M+H]^+$	342.1683	342.1700	−5.0	342.17，297.12，297.11，282.08，2265.08，237.09	$C_{20}H_{23}O_4N$	去甲海罂粟碱	防己
13	26.73	$[M-H]^-$	485.1311	485.1290	4.3	485.13，339.07，219.02，177.01		7-羟基香豆素-6-*O*-*α*-*L*-鼠李糖-（1→6）-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖糖苷	桑白皮
14#	27.03	$[M-H]^-$	787.1945	787.1927	2.3	787.19，625.14，463.08，301.03	$C_{33}H_{40}O_{22}$	槲皮素-3-*O*-*β*-*D*-葡萄糖-7-*O*-*β*-*D*-龙胆二糖苷	葶苈子 防己
15	27.44	$[M-H]^-$	471.1143	471.1133	2.1	471.11，307.27，177，01，133.02	$C_{20}H_{24}O_{13}$	5-羟基香豆素-7-*O*-*β*-*D*-呋喃芹菜糖-（1→6）-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖糖苷	桑白皮
16*	28.07	$[M-H]^-$	137.0232	137.0233	−0.7	137.02，119.01，93.03	$C_7H_6O_3$	水杨酸	葶苈子
17*	28.35	$[M+H]^+$	194.0575	194.0579	−2.1	194.05，179.03，133.02	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸	黄芪
18	28.66	$[M-H]^-$	353.0886	353.0867	5.4	191.05，179.03，161.02，135.04	$C_{16}H_{18}O_9$	1-*O*-咖啡酰奎宁酸	香加皮
19*	29.11	$[M-H]^-$	417.1170	417.1180	−2.4	417.10，255.06，152.01	$C_{21}H_{22}O_9$	4'-羟基黄酮-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷	黄芪
20#	29.80	$[M-H]^-$	625.1415	625.1399	2.6	625.14，463.08，301.03	$C_{27}H_{30}O_{17}$	槲皮素-7-*O*-*β*-*D*-龙胆二糖苷	葶苈子
21*	29.80	$[M-H]^-$	353.0857	353.0867	−2.8	191.05，179.03，173.04，161.02，135.04	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸	香加皮 桑白皮 防己
22#	30.04	$[M-H]^-$	771.1949	771.1978	−3.8	447.09，285.04	$C_{33}H_{40}O_{21}$	山柰酚-3-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖-7-*O*-*β*-龙胆草苷	葶苈子
23#	30.37	$[M-H]^-$	801.2109	801.2084	3.1	477.10，315.05	$C_{34}H_{42}O_{22}$	异鼠李素-3-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖-7-*O*-*β*-龙胆二糖苷	葶苈子
24	30.69	$[M-H]^-$	993.2528	993.2507	2.1	993.25，831.19，787.19，625.14，463.08，301.03，271.02，178.99，151.00	$C_{44}H_{50}O_{26}$	apetalumoside B8/apetalumoside B10/isomer	葶苈子
25*	30.78	$[M-H]^-$	151.0390	151.0390	0.0	151.03，136.01，123.04，108.02	$C_8H_8O_3$	异香草醛	香加皮
26*	32.08	$[M+H]^+$	609.2959	609.2959	0.0	609.29，578.25，367.16，192.10	$C_{37}H_{40}N_2O_6$	防己诺林碱	粉防己
27*	32.19	$[M-H]^-$	177.0185	177.0182	1.7	177.01，149.02，133.02，105.03	$C_9H_6O_4$	秦皮乙素	防己 桑白皮
28#	32.82	$[M-H]^-$	977.2560	977.2557	0.3	814.19，529.15，477.09，285.04，205.05，151.00	$C_{44}H_{50}O_{25}$	山柰酚-3-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖-7-*O*-[（2-*O*-反式芥子酰基）-*β*-*D*-吡喃葡萄糖-（1→6）]-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷	葶苈子
29	32.99	$[M-H]^-$	445.1143	445.1129	3.1	445.11，283.06，253.05，151.03	$C_{22}H_{22}O_{10}$	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	黄芪
30#	33.19	$[M-H]^-$	609.1464	609.1450	2.3	609.14，447.09，285.04，151.00	$C_{27}H_{30}O_{16}$	山柰酚-3-*O*-葡萄糖-（1→2）-鼠李糖苷	黄芪
31#	33.70	$[M-H]^-$	639.1558	639.1556	0.3	639.15，477.10，315.05，300.02	$C_{28}H_{32}O_{17}$	异鼠李素-7-*O*-*β*-龙胆二糖苷/异鼠李素-3，7-*O*-二葡糖苷	葶苈子
32*#	33.82	$[M+H]^+$	623.3116	623.3116	0.0	623.31，592.26，381.18，191.09	$C_{38}H_{42}N_2O_6$	粉防己碱	粉防己
33	34.29	$[M-H]^-$	121.0282	121.0284	−1.7	121.0283	$C_7H_6O_2$	对羟基苯甲醛	葶苈子
34	34.98	$[M-H]^-$	581.2236	581.2229	1.2	581.22，419.17，404.14，386.13	$C_{28}H_{38}O_{13}$	tortoside B	香加皮
35	35.29	$[M-H]^-$	993.2528	993.2507	2.1	993.25，831.20，787.19，625.14，463.08，301.03，271.02，178.99，151.00	$C_{44}H_{50}O_{26}$	apetalumoside B8/apetalumoside B10/isomer	葶苈子
36	35.81	$[M-H]^-$	461.1091	461.1078	2.8	461.10，299.05，284.03	$C_{22}H_{22}O_{11}$	红车轴草素-7-*O*-*D*-葡萄糖苷	黄芪
37	36.93	$[M-H]^-$	993.2528	993.2507	2.1	831.19，787.19，625.14，463.08，301.03，271.02，178.99，151.00	$C_{44}H_{50}O_{26}$	apetalumoside B8/apetalumoside B10/isomer	葶苈子

续表 1

No.	t_R/min	离子类型	m/z 检测值	m/z 理论值	误差/$\times10^{-6}$	主要碎片离子	分子式	化合物名称	来源
38[*#]	38.97	[M-H]$^-$	445.1139	445.1129	2.2	445.11，283.06，268.03	$C_{22}H_{22}O_{10}$	3'- 甲氧基 -5'- 羟基异黄酮 -7-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷 / 鹰嘴豆芽素苷	黄芪
39[*#]	39.69	[M-H]$^-$	191.0342	191.0339	1.6	176.01，163.00，148.01，135.00	$C_{10}H_8O_4$	东莨菪碱	香加皮
40[*]	39.83	[M-H]$^-$	313.0720	313.0706	4.5	298.04，283.02	$C_{17}H_{14}O_6$	8，3'- 二羟基 -7，4'- 二甲氧基异黄酮	黄芪
41[*]	39.86	[M-H]$^-$	221.0451	221.0444	3.2	221.04，206.02，190.99	$C_{11}H_{10}O_5$	异秦皮素	葶苈子
42[*]	39.96	[M-H]$^-$	161.0234	161.0233	0.6	161.02，133.02，117.03	$C_9H_6O_3$	7- 羟基香豆素	防己
43[*#]	40.77	[M-H]$^-$	223.0607	223.0601	2.7	223.06，208.03，193.01，164.04，149.02	$C_{11}H_{12}O_5$	芥子酸	葶苈子
44	40.89	[M-H]$^-$	241.0504	241.0495	3.7	241.05，199.03，172.93	$C_{14}H_{10}O_4$	桑辛素 M	桑白皮
45[*]	40.90	[M-H]$^-$	243.0662	243.0652	4.1	243.06，225.05，199.07，175.07，146.96，109.01	$C_{14}H_{12}O_4$	氧化白藜芦醇	桑白皮
46[*]	41.51	[M-H]$^-$	299.0562	299.0550	4.0	299.05，284.03	$C_{16}H_{12}O_6$	3'，7，8- 三羟基 -4'- 甲氧基异黄酮 /4'，5，7- 三羟基 -3'- 甲氧基异黄酮 / 山柰素 / 鼠李柠檬素 / 红车轴草素	黄芪
47	43.03	[M-H]$^-$	831.1994	831.1978	1.9	669.13，477.10，463.08，301.05	$C_{38}H_{40}O_{21}$	槲皮素 -3-*O*-*β*-*D*-[-6-*O*- 芥子酰基 -2-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基]- 葡萄糖苷	葶苈子
48[*]	43.36	[M-H]$^-$	299.0562	299.0550	4.0	299.05，284.03，	$C_{16}H_{12}O_6$	3'，7，8- 三羟基 -4'- 甲氧基异黄酮 /4'，5，7- 三羟基 -3'- 甲氧基异黄酮 / 山柰素 / 鼠李柠檬素 / 红车轴草素	黄芪
49[*]	43.54	[M+H]$^+$	296.1646	296.1645	0.3	296.16，251.10，219.08，191.08	$C_{19}H_{21}O_2N$	荷叶碱	防己
50	44.23	[M-H]$^-$	285.0769	285.0757	4.2	285.07，270.05	$C_{16}H_{14}O_5$	vesticarpan	黄芪
51[#]	44.49	[M-H]$^-$	463.0884	463.0871	2.8	463.08，301.03	$C_{21}H_{20}O_{12}$	槲皮素 -3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷 / 异槲皮苷 / 金丝桃苷	葶苈子
52[#]	45.46	[M-H]$^-$	447.1296	447.1286	2.2	447.08，285.07，270.05，151.00	$C_{22}H_{24}O_{10}$	licoagroside D	黄芪
53	46.02	[M-H]$^-$	445.1139	445.1129	2.2	445.11，283.06，268.03	$C_{22}H_{22}O_{10}$	3'- 甲氧基 -5'- 羟基 - 异黄酮 -7-*O*-*β*-*D*- 葡糖苷 /sissotrin	黄芪
54	47.87	[M-H]$^-$	447.0935	447.0922	2.9	447.09，285.03，227.03，151.00	$C_{21}H_{20}O_{11}$	山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 半乳糖苷	葶苈子 黄芪
55[*#]	48.02	[M-H]$^-$	429.1187	429.1180	1.6	429.19，267.06，252.04	$C_{22}H_{22}O_9$	芒柄花苷	黄芪
56[#]	48.08	[M-H]$^-$	477.1040	477.1028	2.5	315.04，314.04，299.01，285.04	$C_{22}H_{22}O_{12}$	异鼠李素 -3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷	葶苈子
57A[*#]	48.42	[M-H]$^-$	299.0924	299.0914	3.3	299.09，284.06，269.04	$C_{17}H_{16}O_5$	（6a*R*，11a*R*）-3，9- 二甲氧基 -10- 羟基异黄烷	黄芪
57B[*#]	48.42	[M-H]$^-$	299.0924	299.0914	3.3	299.09，284.06，269.04	$C_{17}H_{16}O_5$	黄芪紫檀烷苷	黄芪
58[*]	48.52	[M-H]$^-$	297.0769	297.0757	4.0	297.07，282.05，267.03	$C_{17}H_{14}O_5$	afrormosin	黄芪
59	48.97	[M-H]$^-$	695.3288	695.3273	2.2	695.32，533.27，385.20，221.06，161.04	$C_{35}H_{52}O_{14}$	糖芥苷	葶苈子
60[*]	49.41	[M+H]$^+$	294.1489	294.1488	0.3	294.14，249.09，219.08，191.08	$C_{19}H_{19}NO_2$	防己菲碱	防己
61A[*#]	49.79	[M-H]$^-$	255.0661	255.0652	3.5	255.06，227.07，153.01，135.00，119.04	$C_{15}H_{12}O_4$	甘草素	黄芪
61B[*#]	49.79	[M-H]$^-$	255.0661	255.0652	3.5	255.06，227.07，153.01，135.00，119.04	$C_{15}H_{12}O_4$	已甘草素	黄芪
62[*]	50.09	[M-H]$^-$	297.0389	297.0394	−1.7	137.0233，93.0333	$C_{16}H_{10}O_6$	槐酚酮	黄芪
63	50.54	[M-H]$^-$	445.0744	445.0765	−4.7	445.1596，269.0457	$C_{21}H_{18}O_{11}$	黄芩苷	黄芪
64	50.84	[M-H]$^-$	463.1578	463.1599	−4.5	301.10，286.08，271.06，179.07，135.04	$C_{23}H_{28}O_{10}$	黄芪异黄烷苷	黄芪
65	51.55	[M-H]$^-$	963.4809	963.4795	1.5	801.42，639.37	$C_{46}H_{76}O_{21}$	杠柳苷 D	香加皮
66[*]	52.51	[M-H]$^-$	167.0341	167.0339	1.2	167.03，152.01，123.04，108.02	$C_8H_8O_4$	4- 甲氧基水杨酸	香加皮
67[*]	52.74	[M-H]$^-$	267.0661	267.0652	3.4	267.06，252.04	$C_{16}H_{12}O_4$	刺芒柄花素 / 异构体	黄芪
68	52.75	[M+H]$^+$	517.1342	517.1340	0.4	517.13，269.08	$C_{25}H_{24}O_{12}$	6'-malonyl ononin	黄芪
69	52.89	[M-H]$^-$	457.1473	457.1493	−4.4	325.10，253.05，208.72，116.10	$C_{24}H_{26}O_9$	mulberroside C	桑白皮
70[*#]	54.38	[M-H]$^-$	315.0876	315.0863	4.1	315.08，285.04，242.71，109.02	$C_{17}H_{16}O_6$	pendulone	黄芪
71[*]	56.63	[M-H]$^-$	299.0562	299.0550	4.0	299.05，284.03	$C_{16}H_{12}O_6$	3'，7，8- 三羟基 -4'- 甲氧基异黄酮 /4'，5，7- 三羟基 -3'- 甲氧基异黄酮 / 山柰素 / 鼠李柠檬素 / 红车轴草素	黄芪

续表 1

No.	t_R/min	离子类型	*m/z* 检测值	*m/z* 理论值	误差 / $\times 10^{-6}$	主要碎片离子	分子式	化合物名称	来源
72*	56.78	$[M-H]^-$	299.0562	299.0550	4.0	299.05，284.03	$C_{16}H_{12}O_6$	3'，7，8- 三羟基 -4'- 甲氧基异黄酮 /4'，5，7- 三羟基 -3'- 甲氧基异黄酮 / 山柰素 / 鼠李柠檬素 / 红车轴草素	黄芪
73	60.08	$[M-H]^-$	695.3637	695.3637	0.0	695.36，533.31，389.23，161.04	$C_{36}H_{56}O_{13}$	杠柳毒苷	香加皮
74*	60.70	$[M-H]^-$	299.0562	299.0550	4.0	299.05，284.03	$C_{16}H_{12}O_6$	3'，7，8- 三羟基 -4'- 甲氧基异黄酮 /4'，5，7- 三羟基 -3'- 甲氧基异黄酮 / 山柰素 / 鼠李柠檬素 / 红车轴草素	黄芪
75	60.89	$[M-H]^-$	681.3500	681.3481	2.8	681.34，519.29，373.23，302.35	$C_{35}H_{54}O_{13}$	伊夫双苷	葶苈子
76	64.35	$[M-H]^-$	267.0661	267.0652	3.4	267.06，252.04	$C_{16}H_{12}O_4$	刺芒柄花素 / 异构体	黄芪
77	69.5	$[M-H]^-$	1121.5748	1121.5738	0.9	1121.57，959.52，797.47，653.39，509.31	$C_{54}H_{90}O_{24}$	杠柳次苷 B	香加皮
78	72.96	$[M-H]^-$	785.4696	785.4682	1.8	785.46，623.41，491.37，415.32，161.04	$C_{41}H_{70}O_{14}$	cyclocanthoside E/astramembranoside B	黄芪
79	73.34	$[M-H]^-$	945.5081	945.5054	2.9	945.50，860.41，783.45，657.39，621.40，489.35	$C_{47}H_{78}O_{19}$	黄芪甲苷 Ⅵ / 黄芪甲苷 Ⅴ	黄芪
80	74.58	$[M-H]^-$	785.4700	785.4682	2.3	785.46，623.41，491.37，415.32，240.92，161.04	$C_{41}H_{70}O_{14}$	cyclocanthoside E/astramembranoside B	黄芪
81	79.68	$[M-H]^-$	945.5063	945.5054	1.0	945.50，783.45，489.35，384.95，350.05，161.04	$C_{47}H_{78}O_{19}$	黄芪甲苷 Ⅵ / 黄芪甲苷 Ⅴ	黄芪
82*	80.2	$[M-H]^-$	783.4547	783.4525	2.8	783.45，621.40，557.75，489.35，422.32，345.42，161.04	$C_{41}H_{68}O_{14}$	黄芪甲苷 Ⅲ / 黄芪甲苷	黄芪

注：* 表示经过 SwissADME 预测，具有活性的化合物；# 表示正负离子模式下均鉴定出的化合物。

Note：*Denotes active compounds predicted by SwissADME；#represents the compounds identified in positive and negative ion mode.

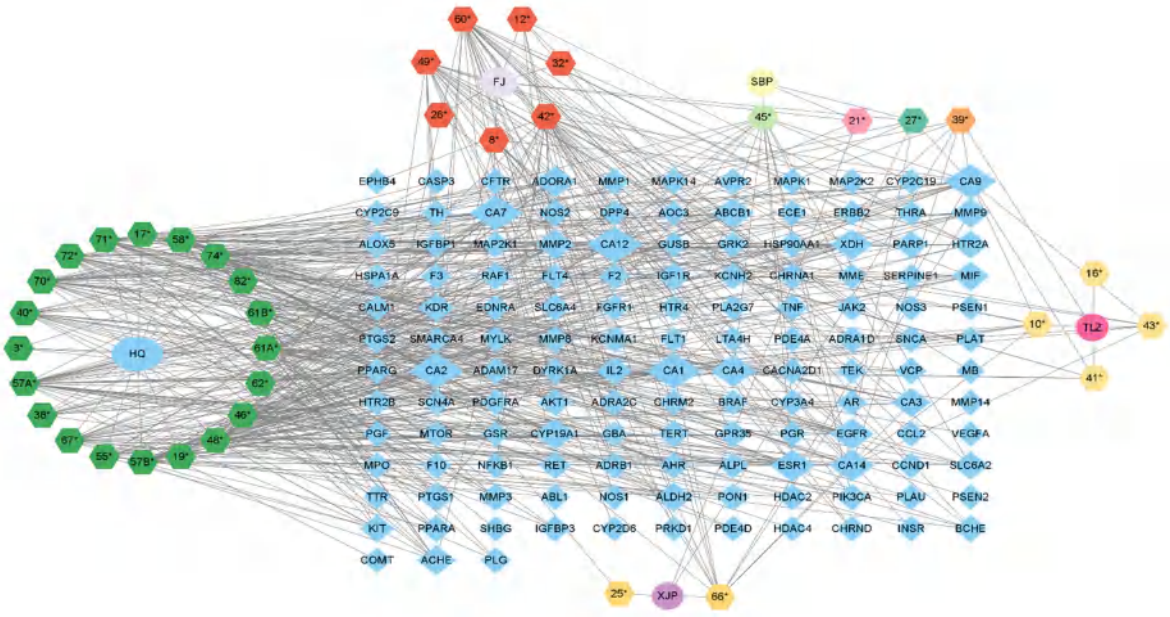


图 2　泻肺利水汤“活性成分 - 靶点”网络图

Fig 2　“Active ingredient-target” network diagram of Xiefei Lishui decoction

并筛选关键靶点（见图 3），图中共有节点 140 个，边 1437 条，根据 degree 值排序，处于核心位置的靶点为 TNF、AKT1、EGFR、VEGFA、ESR1，提示这些靶点在泻肺利水汤治疗心力衰竭中发挥了关键作用。

2.5.5　GO 功能富集和 KEGG 通路富集　通过 Cytoscape 3.9.0 软件计算活性成分 - 核心靶点及运行相关脚本后，进行基因功能注释（GO）富集分析和京都基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，GO 中包括 3 个模块：生物过程（BP）、细胞成分（CC）和分子功能（MF），筛选条件为 $P < 0.05$；同样，$Q < 0.05$ 时获得的 KEGG 通路被认为是最重要的信号通路。通过 GO 富集分析共获得 2329 个富集结果，包括 2084 个 BP，主要

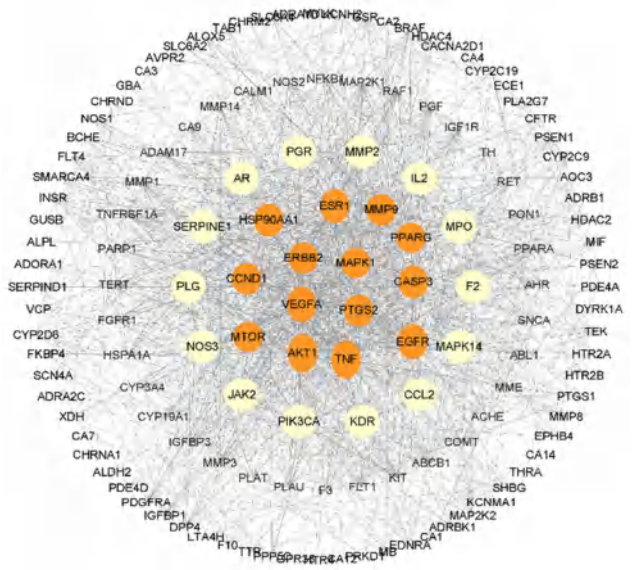


图 3　泻肺利水汤治疗心衰相关靶点的 PPI 网络

Fig 3　PPI network of the relevant targets of Xiefei Lishui decoction in the treatment of heart failure

涉及激酶活性的正向调节、对 MAPK 级联的正向调节、对外源性刺激物的反应、上皮细胞增殖等；共 91 个 CC，主要涉及膜筏、膜微区、神经元细胞体、囊泡腔、分泌颗粒腔等；有 154 个 MF，主要涉及内肽酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、丝氨酸水解酶活性、蛋白质丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性等（见图 4）。KEGG 富集分析后，得到 154 条通路富集结果，主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、癌症中的蛋白聚糖、Rap1 信号通路等。提示泻肺利水汤可能通过上述信号通路对心力衰竭起到治疗作用（见图 5）。

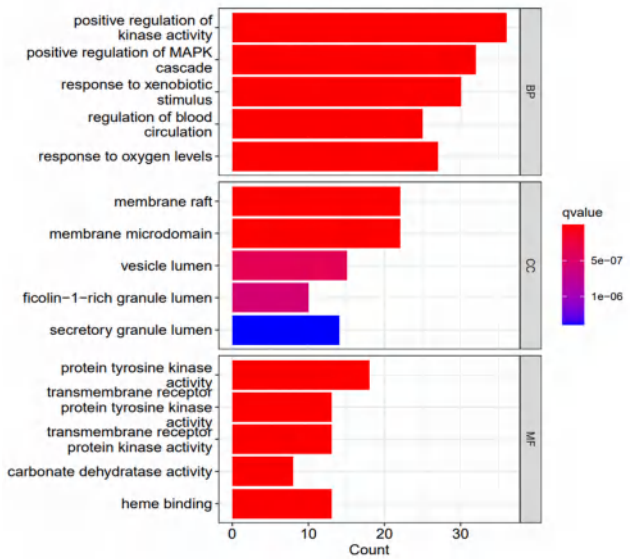


图 4　GO 富集分析

Fig 4　GO enrichment analysis

2.5.6　潜在核心活性成分 - 核心靶点分子对接预测　根据“药物 - 活性成分 - 疾病 - 靶标”网络中的 degree 值排序，结合文献，选取化合物中 degree ＞ 20 的山柰素、甘草素、7- 羟基香豆素、防己菲碱、黄芪紫檀烷苷等 5 个主要成分，分别与 5 个核心基因进行分子对接。一般认为结合能小于－ 5.0 kJ • mol^{-1}，就表明分子与靶点之间有良好的结合活性，若小于－ 7.0 kJ • mol^{-1}，则说明结合活性很强 [16]，结果表明 5 个成分与核心基因均有良好的结合力，具体见表 2。

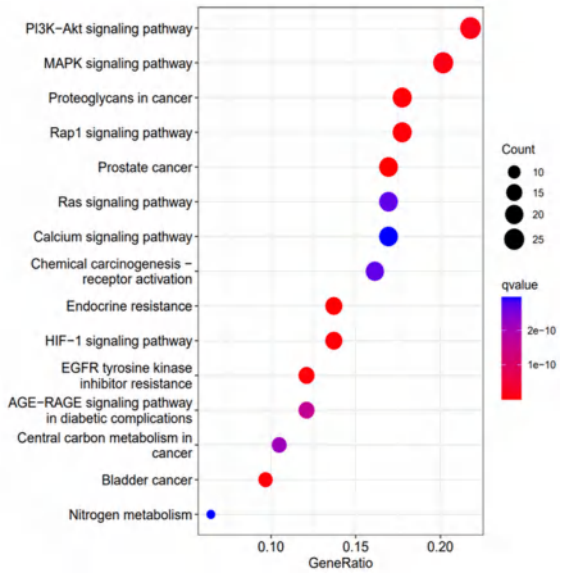


图 5　KEGG 富集分析

Fig 5　KEGG enrichment analysis

表 2　分子对接

Tab 2　Molecular docking

No.	成分	结合能 /（kJ • mol^{-1}）				
		AKT1	*EGFR*	*TNF*	*EGR1*	*VEGFA*
1	山柰素	－ 25.10	－ 23.85	－ 26.36	－ 35.98	－ 28.87
2	甘草素	－ 25.10	－ 23.85	－ 26.36	－ 35.98	－ 28.87
3	7- 羟基香豆素	－ 23.01	－ 20.92	－ 30.54	－ 27.20	－ 23.43
4	防己菲碱	－ 27.20	－ 23.01	－ 35.56	－ 33.05	－ 28.45
5	黄芪紫檀烷苷	－ 27.61	－ 24.27	－ 24.27	－ 30.54	－ 26.36

3　讨论

心力衰竭是各种心脏病发病末期或严重临床阶段，主要表现为呼吸困难、心悸、疲乏、体液潴留等症状，充分缓解水钠潴留有效减轻患者症状、降低患者再住院率、提高生活质量的重要措施 [1]。中医认为，其主要病机多为心肺气虚，气化不利，导痰湿内阻，治疗多以益气利水为法 [17]。在此基础上，北京中医医院许心如教授提出“泻肺利水”法治疗心力衰竭的学术观点，并取得了良好的临床疗效 [18]。为了进一步阐明泻肺利水对心力衰竭的治疗作用，本研究采用 UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 方法结合网络药理学方法，鉴定出泻肺利水汤水提物的化学成分 82 个，其中山

柰素、甘草素、7-羟基香豆素、防己菲碱、黄芪紫檀烷苷等活性成分具有较多的作用靶点，是泻肺利水合剂治疗心力衰竭的主要活性成分，具有抗炎、抗氧化、抗病毒等药理作用；现代研究表明，下调炎症因子的表达、减少氧化应激反应、调控细胞凋亡在心力衰竭的治疗中具有重要意义[19]。

通过 PPI 网络拓扑分析预测到 *AKT1*、*IL1B*、*TP53*、*TNF*、*VEGFA* 等 5 个核心基因。GO 分析显示，泻肺利水治疗心力衰竭的生物过程集中在激酶活性的正向调节、对 MAPK 级联的正向调节，其中还涉及对外源性刺激物的反应、对上皮细胞增殖的反应的调节等。KEGG 通路分析表明，内肽酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、丝氨酸水解酶活性、蛋白质丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性，可能是治疗机制中的重要通路。另外 TNF 信号通路是重要的炎症通路[17]。TNF-α 广泛存在于心力衰竭患者活检组织中，被认为是心力衰竭疾病发生发展过程中的重要因子[20]。实验证明，抑制 TNF-α 信号通路表达能够改善心力衰竭大鼠的心功能，对心力衰竭的防治具有重要意义[21]。

综上所述，本研究充分考虑药物煎煮过程中可能发生的化学成分变化，采用 UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 技术对泻肺利水汤化学成分进行了鉴定，并通过网络药理学和分子对接技术探讨了其治疗心力衰竭的主要活性成分及作用机制。研究结果表明泻肺利水汤可能是通过山柰素、甘草素、7-羟基香豆素、防己菲碱、黄芪紫檀烷苷等成分作用于 *AKT1*、*IL1B*、*TP53*、*TNF*、*VEGFA* 等靶点，进一步通过调控内肽酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、丝氨酸水解酶活性、蛋白质丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性等信号通路发挥多成分、多靶点治疗心力衰竭的作用。

参考文献

[1] 中华医学会心血管病学分会，中华心血管病杂志编辑委员会 . 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014 [J]. 中华心血管病杂志，2014，42（2）：98-122.

[2] 周京敏，崔晓通，葛均波 . 中国心力衰竭的流行病学概况 [J]. 中华心血管病杂志，2015，43（12）：1018-1021.

[3] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组，中国医师协会心力衰竭专业委员会，中华心血管病杂志编辑委员会 . 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志，2018，46（10）：760-789.

[4] 杨雪卿，王巍，周琦 . 心衰合剂对射血分数保留心力衰竭患者心肌纤维化的影响 [J]. 北京中医药，2020，39（7）：731-734.

[5] 杨雪卿，王巍，周琦 . 心衰合剂对射血分数保留心衰患者无创血流动力学参数的影响 [J]. 北京中医药，2018，6：496-499.

[6] 来晓磊，邢文龙，刘红旭，等 . 泻肺利水法治疗心力衰竭的研究进展 [J]. 北京中医药，2018，37（6）：507-509.

[7] Chen JF，Zhao Q，Si DD，et al. Comprehensive profiling of Stephania tetrandra（Fangji）by stepwise DFI and NL-dependent structure annotation algorithm-based UHPLC-Q-TOF-MS and direct authentication by LMJ-HRMS [J]. J Pharmaceut Biomed，2020，185：113225.

[8] 刘杨，杨玉佩，沈冰冰 .HPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析防己茯苓汤的化学成分 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1563-1569.

[9] 陈婷，田丰，唐跃年，等 .HPLC-ESI-TOF/MS 对黄芪药材中 24 种化学成分的快速分离与鉴别 [J]. 中国药师，2014，17（4）：593-596.

[10] Du HW，Zhao XL，Zhang A，et al. Rapid separation，identification and analysis of *Astragalus membranaceus* Fisch using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci，2014，52（3）：226-231.

[11] 郑甜碧，万晶琼，杨翠云，等 . 基于 HPLC-ESI-MS 技术的桑白皮、桑根皮及外粗皮主要成分定性与定量研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46（9）：2237-2244.

[12] 丁倩云，马双成，许风国，等 . 桑白皮的化学成分、药理及质量控制研究进展 [J]. 药物分析杂志，2021，41（7）：1114-1124.

[13] Meng ZH，Qiao L，Wang ZQ，et al. Analysis of the constituents in Semen Descurainiae by UPLC/QTOFMS/MS [J]. J Chinese Pharm Sci，2015，24（5）：303-309.

[14] Han LF，Shi PP，Dong YZ，et al. New rare sinapoyl acylated flavonoid glycosides obtained from the seeds of *Lepidium apetalum* Willd [J]. Molecules，2015，20（8）：13982-13996.

[15] Li Z，Li Y，Li J，et al. An LC-MS/MS method for simultaneous determination of the toxic and active components of cortex periplocae in rat plasma and application to a pharmacokinetic study [J]. Int J Anal Chem，2019，2019（Ptal）：1-10.

[16] 罗玉婷，林龙飞，刘宇灵，等 . 基于网络药理学及分子对接技术探讨半夏泻心合剂治疗结肠癌潜在分子机制 [J]. 中国中药杂志，2020，45（23）：5753-5761.

[17] 张垚，杨继，宋嘉懿，等 . 基于网络药理学探讨麻黄治疗心力衰竭的作用机制 [J]. 药物评价研究，2021，44（10）：2189-2202.

[18] 彭伟 . 许心如学术思想与临床经验总结及益气活血、泻肺利水法治疗充血性心力衰竭的临床探讨 [D]. 北京：北京中医药大学，2011.

[19] 乔利杰，朱明军，李彬，等 . 基于网络药理学研究葶苈大枣泻肺合剂治疗心力衰竭的作用机制 [J]. 沈阳：辽宁中医杂志，2021，48（7）：147-152，256.

[20] Shao TG，Zhang YQ，Tang RB，et al. Effects of milrinone on serum IL-6，TNF-α，Cys-C and cardiac functions of patients with chronic heart failure [J]. Exp Ther Med，2018，16（5）：4162-4166.

[21] Chen ZS，Yan WW，Mao Y，et al. Effect of aerobic exercise on Treg and Th17 of rats with ischemic cardiomyopathy [J]. J Cardiovasc Transl Res，2018，11（3）：230-235.

（收稿日期：2023-03-21；修回日期：2023-04-26）

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的脉络宁注射液酯提废渣大孔树脂富集液的化学成分鉴定和含量测定

鲁正熹[1]，姚静远[2]，印敏[2]，李林蔚[2]，何晓东[3]，刘群[4]，李剑[3]，陈雨[2*]（1. 江苏卫生健康职业学院，南京　210029；2. 江苏省中国科学院植物研究所/江苏省中药材生态种植与高值化利用工程研究中心，南京　210014；3. 南京金陵药业股份有限公司，南京　210009；4. 河南金陵金银花药业有限公司，河南　新乡　453300）

摘要：目的　利用超高效液相 - 四极杆串联飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS）技术分析脉络宁注射液酯提废渣的化学成分，为酯提废渣资源的再利用提供科学依据。**方法**　利用 ASD-7 大孔树脂柱富集脉络宁注射液酯提废渣化学成分，采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对脉络宁注射液酯提废渣大孔树脂富集液进行数据采集和化学成分鉴定，采用定量软件对绿原酸、异绿原酸、异绿原酸 C、灰毡毛忍冬皂苷甲和灰毡毛忍冬皂苷乙进行含量测定。**结果**　共鉴定出脉络宁注射液酯提废渣中 42 个化学成分，包括 9 个酚酸类化合物、9 个黄酮类化合物、10 个环烯醚萜类化合物、8 个三萜皂苷类化合物、5 个苯丙素类化合物和 1 个联苄类化合物，定量分析结果显示绿原酸、异绿原酸、异绿原酸 C、灰毡毛忍冬皂苷甲和灰毡毛忍冬皂苷乙在考察的浓度范围内与峰面积线性关系良好（$r > 0.9990$），精密度、重复性和稳定性良好，加样回收率为 95.38% ～ 103.06%，*RSD* 为 0.76% ～ 1.8%。**结论**　本研究可用于脉络宁注射液酯提废渣大孔树脂富集液中化学成分的鉴定以及 5 种有效成分的准确定量分析，为脉络宁注射液酯提废渣的再利用和制备工艺奠定基础。

关键词：脉络宁注射液酯提废渣；超高效液相 - 四极杆串联飞行时间质谱；化学成分鉴定；含量测定

中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2638-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.014

Chemical composition and content determination in macroporous resin enrichment solution from ester extraction residue of Mailuoning injection based on UPLC-Q-TOF-MS

LU Zheng-xi[1], YAO Jing-yuan[2], YIN Min[2], LI Lin-wei[2], HE Xiao-dong[3], LIU Qun[4], LI Jian[3], CHEN Yu[2*] (1. *Jiangsu Health Vocational College, Nanjing* 210029; 2. *Jiangsu Province Engineering Research Center of Eco-cultivation and High-value Utilization of Chinese Medicinal Materials, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing* 210014; 3. *Jinling Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing* 210009; 4.*Henan Jinling Honeysuckle Pharmaceutical Co., Ltd., Xinxiang Henan* 453300)

Abstract: Objective To identify chemical components and determine the content in macroporous resin enrichment solution from ester extraction residue of Mailuoning injection by ultraperformance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technology, and to provide a scientific basis for the reuse of ester extraction residue of Mailuoning injection. **Methods** Mailuoning injection ester extraction residues were enriched by ASD-7 macroporous resin columns. UPLC-Q-TOF-MS technology was used to collect the data and identify chemical components in it, and the content were determined by quantitative software. **Results** Totally

基金项目：江苏省高等学校自然科学研究面上项目（No.19KJB360008）；江苏省林业科技创新与推广项目（No.LYKJ[2021]18）。

作者简介：鲁正熹，男，硕士，讲师，主要从事药物分析、药物化学研究，email：luzhengxi@163.com　*通信作者：陈雨，男，研究员，博士研究生导师，主要从事天然药物化学研究，email：ychen@jib.ac.cn

42 chemical components were identified, including 9 phenolic acids, 9 flavonoids, 10 iridoids, 8 triterpenoid saponins, 5 phenylpropanoids, and 1 dibenzyl. UPLC-Q-TOF-MS was used to quantitatively analyze the contents of chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, macranthoidin A and macranthoidin B. The linearity was good (r ＞ 0.9990), the precision, repeatability and stability were good, the recovery ranged 95.38% ～ 103.06%, and the *RSD* was 0.76% ～ 1.8%. **Conclusion** The method for the chemical components can identify the chemical components and accurately quantify the 5 effective components in macroporous resin enrichment solution from Mailuoning injection ester extraction residues, laying a foundation for the reuse and preparation of Mailuoning injection ester extraction residues.

Key words: Mailuoning injection ester extraction residue; ultraperformance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry; chemical component identification; content determination

脉络宁注射液，为黄棕色至红棕色的澄清液体，由金银花、山银花、牛膝、玄参、石斛等组成，有清热养阴、活血化瘀的功效，临床上用于治疗血栓闭塞性脉管炎[1]、急性缺血性脑血管病[2]、急性脑梗死[3]、静脉血栓形成[4]、动脉硬化性闭塞症[5]、脑血栓形成及后遗症[6]。有研究表明，脉络宁注射液在一定程度上对治疗急性缺血性卒中[7]、腰椎间盘突出症[8]、非酒精性脂肪肝[9]、急性肺损伤[10]，喉头水肿[11]等也有效。

脉络宁注射液采用水煎煮提取药效物质，经乙醇沉淀、乙酸乙酯萃取、浓缩等精制而得[12]，导致在生产过程中产生了大量废渣。中药废渣的处理一直是我国医药行业和环境行业所关注的问题，通常采用填埋、焚烧、固定区域堆放等措施处理，但会对周围的水质、土壤和空气造成严重的污染，影响环境质量，且耗费大量资金[13]，因此对中药废渣的资源再利用极其重要。到目前为止，有关脉络宁注射液废渣的资源再利用，主要是对水提和醇沉物的研究[12, 14-16]。乙酸乙酯萃取后的母液废渣，为生产脉络宁注射液过程中的废弃物之一，如不进行资源化再次利用，不仅造成浪费，而且作为废渣排放还会造成二次污染。本研究运用超高效液相 - 四极杆串联飞行时间质谱技术（ultraperformance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry，UPLC-Q-TOF-MS）对脉络宁注射液酯提废渣化学成分进行鉴定，并对其中的酚酸类成分（绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C）和三萜皂苷类成分（灰毡毛忍冬皂苷甲和灰毡毛忍冬皂苷乙）进行定量分析，以期为脉络宁注射液酯提废渣资源再利用提供科学参考，从而为后续中药渣的回收利用和环境保护奠定基础。

1　材料

1.1　仪器

Agilent 1260 UPLC-DAD-6530 ESI-Q-TOF-MS 液质联用仪（美国 Agilent 公司）；KQ-400KDE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；JY/YP 型电子天平（上海良平仪器仪表有限公司）；SPING-S5i 超纯水仪（南京妙之仪电子科技有限公司）；OSB-2200 型旋转蒸发仪（日本 EYELA 公司）；Q-TOF Quantitative Analysis 定量软件；Molecular Structure Correlator 结构鉴定软件。

1.2　试药

甲醇（色谱纯，美国 TEDIA 公司）；无水乙醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；甲酸（色谱纯，美国 ROE SCIENTIFIC INC 公司）；蒸馏水（屈臣氏）；ASD-7 大孔吸附树脂（郑州和成新材料科技有限公司）；硅胶（青岛海洋化工厂）；绿原酸（批号：0753-9607）、异绿原酸 A（批号：111782-201807）、异绿原酸 C（批号：111894-202104）（中国食品药品检定研究院）；灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙来自本课题组分离，所有对照品纯度均大于 95%。

本研究所用脉络宁注射液酯提废渣来自金陵药业股份有限公司，共 8 个批次，分别为 20210228、20210301、20210302、20210303、20210312、201210313、20210314、20210315。

2　方法与结果

2.1　溶液的制备

2.1.1　供试品溶液的制备　称取一定质量的脉络宁注射液酯提废渣，废渣 - 水为 1∶10 稀释，稀释液经 ASD-7 大孔树脂柱梯度洗脱，洗脱剂为 0%、

10%、90%、100% 乙醇水溶液，取 90% 乙醇水溶液洗脱部位 500 μL，氮吹至干，1 mL 甲醇溶解，甲醇稀释 10 倍，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。其中 90% 乙醇水溶液部位大孔树脂得率为 43.31% ～ 60.77%，8 批脉络宁注射液酯提浸膏过大孔树脂后 90% 乙醇水溶液部分干燥质量分别为 11.5、12.0、12.1、12.4、18.5、17.9、22.4、28.5 mg。

2.1.2　对照品储备溶液的制备　精密称定绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、灰毡毛忍冬皂苷甲和灰毡毛忍冬皂苷乙，制成 33.33、16.67、33.33、16.67、66.67 μg • mL^{-1} 的对照品储备溶液，冷藏备用。

2.2　色谱条件

色谱柱 Agilent Poroshell 120 SB-AQ C_{18}（3.0 mm×100 mm，2.7 μm）；柱温 0 ～ 20 min，20 ℃；20 ～ 75 min，40 ℃；流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0 ～ 20 min，20% ～ 25%B；20 ～ 25 min，25% ～ 35%B；25 ～ 40 min，35% ～ 50%B；40 ～ 75 min，50% ～ 70%B）；流速为 0.3 mL • min^{-1}；进样量为 5 μL。

2.3　质谱条件

采用 ESI 离子源，离子化模式为负离子模式，毛细管电压为 3.5 kV，干燥气温度 350 ℃，裂解电压为：酚酸、黄酮和环烯醚萜 90 V，三萜皂苷 210 V，碰撞能量为 195 V，雾化气体为 N_2，离子扫描范围为 *m/z* 100 ～ 1700，雾化气压力 50 psi，干燥气流速 10.0 L • min^{-1}，Skimmer 电压 65 V。

2.4　UPLC-Q-TOF-MS 定量方法学考察

2.4.1　专属性试验　精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液适量，进样分析，各成分出峰位置无干扰组分，表明本法专属性良好，符合液质定量分析要求，典型色谱图见图 1。

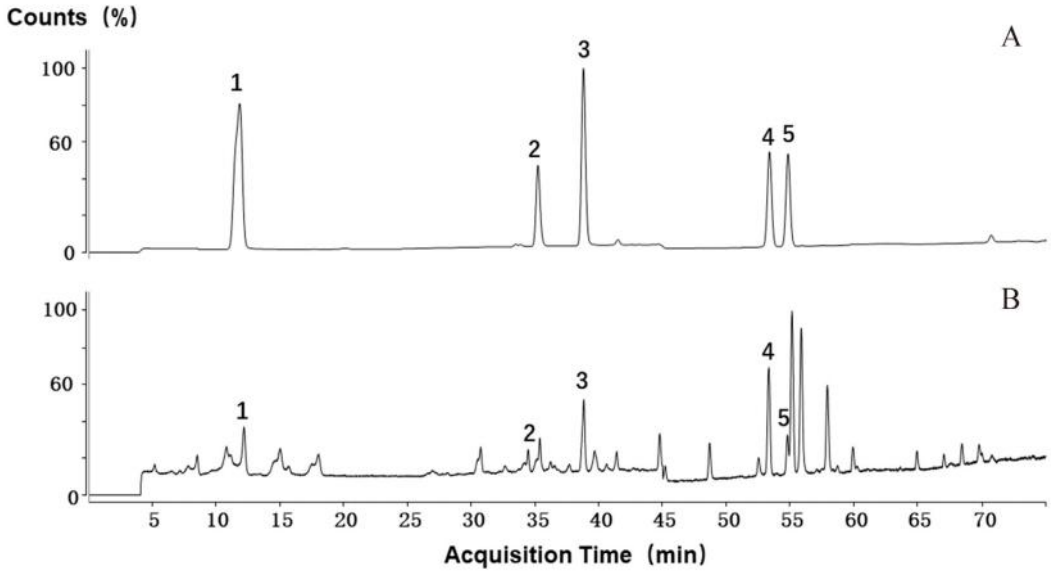


图 1　混合对照品（A）和脉络宁注射液酯提废渣（B）UPLC-Q-TOF-MS 图

Fig 1　UPLC-Q-TOF-MS of mixed control（A）and Mailuoning injection ester extraction residue（B）

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 异绿原酸 A（isochlorogenic acid A）；3. 异绿原酸 C（isochlorogenic acid C）；4. 灰毡毛忍冬皂苷乙（macranthoidin B）；5. 灰毡毛忍冬皂苷甲（macranthoidin A）

2.4.2　线性关系、检测限和定量限　分别精密吸取对照品储备液适量于 5 mL 具塞棕色量瓶中，以甲醇逐步稀释配成系列混合对照品溶液，进样测定峰面积，以峰面积（*Y*）对对照品质量浓度（*X*）进行线性回归，计算 5 种分析物的回归方程，结果见表 1。

表 1　5 种分析物的线性范围、回归方程、相关系数、检测限和定量限

Tab 1　Linear ranges，calibration curves，coefficients，limit of quantitation and detection of 5 analytes

化合物	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	回归方程	*r*	检测限 /（ng • mL^{-1}）	定量限 /（ng • mL^{-1}）
绿原酸	2.3598 ～ 33.9970	$Y = 1.1130\times10^6X - 6.6088\times10^5$	0.9997	7.50	37.50
异绿原酸 A	1.2632 ～ 16.6984	$Y = 7.0403\times10^5X - 4.0870\times10^5$	0.9994	13.02	32.55
异绿原酸 C	2.3240 ～ 33.2974	$Y = 7.5510\times10^5X - 9.9470\times10^5$	0.9997	15.00	44.50
灰毡毛忍冬皂苷乙	4.1397 ～ 66.3830	$Y = 9.7132\times10^4X - 7.3283\times10^4$	0.9997	2.75	6.25
灰毡毛忍冬皂苷甲	1.2035 ～ 16.6982	$Y = 2.4360\times10^5X - 7.3284\times10^4$	0.9997	3.75	9.37

2.4.3　精密度试验　取供试品溶液，连续进样 6 次，分别计算 5 种分析物峰面积的 *RSD*，结果峰面积的日内精密度 *RSD* 在 2.3% ～ 4.5%，表明仪器精密度良好。

2.4.4　稳定性试验　取供试品溶液，分别于 0、4、8、12、24 h 进样分析，分别计算 5 种分析物峰面积的 *RSD*，结果峰面积的 *RSD* 分别在 0.60% ～ 4.6%，表明测定成分在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5　重复性试验　取平行制备的 6 份供试品溶液（批号：20210303），进样测定峰面积，计算得绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、灰毡毛忍冬皂苷甲和灰毡毛忍冬皂苷乙的质量分数分别为 10.98、3.92、8.06、36.90、3.87 mg • g^{-1}，峰面积的 *RSD* 分别为 0.80%、1.7%、1.6%、0.60%、1.0%，表明方法重复性良好。

2.4.6　加样回收试验　取已知含量的脉络宁注射液酯提废渣处理液 9 份（批号：20210314），分别加入低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液，进行含量测定，计算得 5 个成分的加样回收率为 95.38% ～ 103.06%，*RSD* 为 0.76% ～ 1.8%，表明本方法准确性良好。

2.5　UPLC-Q-TOF-MS 定性分析脉络宁注射液酯提废渣

经过色谱条件优化，供试品溶液在负离子模式下的色谱图得到了良好的分离效果及离子化效率，其 TIC 图见图 2。

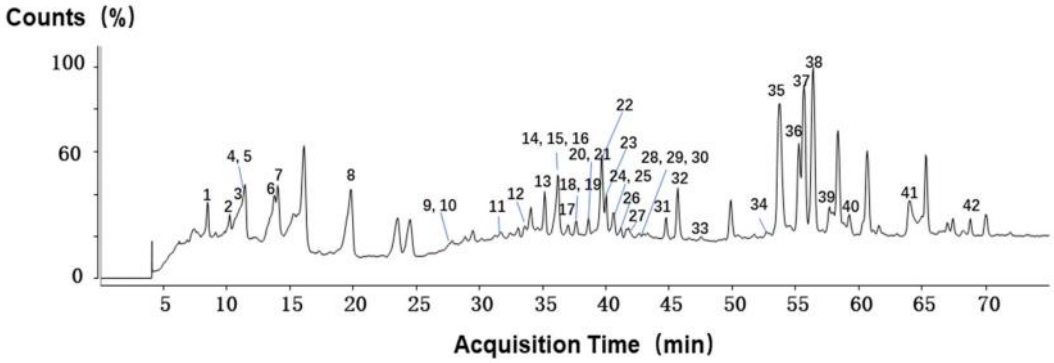


图 2　负离子模式下的脉络宁注射液酯提废渣 TIC 图

Fig 2　Total ion chromatogram of Mailuoning injection ester extract ion residues at the negative ion mode

样品经 UPLC-Q-TOF-MS 进行一级及二级质谱采集，获得提取液中各色谱峰的保留时间、准分子离子峰及 MS/MS 碎片离子的精确相对分子质量信息。若目标成分与其对照品（无对照品的与参考文献数据比对 [17-18]）的保留时间、准分子离子峰和二级特征离子吻合，以及 Agilent 定性软件推断碎片离子破碎规律，据此鉴定色谱峰。推断出脉络宁注射液酯提废渣中 42 个化合物的结构，包括 9 个酚酸类化合物、9 个黄酮类化合物、10 个环烯醚萜类化合物、8 个三萜皂苷类成分化合物、5 个苯丙素类化合物和 1 个联苄类化合物，结果见表 2。

2.6　各类化合物结构解析规律

2.6.1　酚酸类化合物的结构鉴定　本文从脉络宁注射液酯提废渣中鉴定了 9 个绿原酸类化合物。通过 MS^1 图谱确定化合物 **5** 的准分子离子峰为 *m/z* 353.0866 $[M-H]^-$，预测分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$。MS^2 图谱中主要的碎片离子为 *m/z*191.0551、179.0321、173.0448、161.0225、127.0384、93.0327，分别计算其元素组成为 $C_7H_{11}O_6^-$、$C_9H_7O_4^-$、$C_7H_9O_5^-$、$C_9H_6O_3^-$、$C_6H_7O_3^-$ 和 $C_6H_5O^-$。绿原酸准分子离子峰 *m/z* 353.0866 脱去一分子咖啡酰基形成 *m/z* 191.0511 或者脱去一分子奎宁酰基形成 *m/z* 179.0321，*m/z* 179.0321 再脱去一分子 H_2O 形成 *m/z* 161.0225，*m/z* 191.0511 再脱去一分子 H_2O 形成 *m/z* 173.0448，再脱去一分子 HCOOH 形成 *m/z* 127.0384 或者脱去两分子 H_2O 和一分子 CO_2 形成 *m/z* 93.0327，与对照品比对后推断为绿原酸。其 MS^2 质谱和具体的质谱裂解行为见图 3。

双取代酚酸类化合物，通过 MS^1 图谱确定化合物 **13** 的准分子离子峰为 *m/z* 515.1165 $[M-H]^-$，预测分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$。MS^2 图谱中主要的碎片离子为 *m/z* 353.0827、335.0734、191.0540、179.0323、173.0427、135.0426，分别计算其元素组成为 $C_{16}H_{17}O_9^-$、$C_{16}H_{15}O_8^-$、$C_7H_{11}O_6^-$、$C_9H_7O_4^-$、$C_7H_9O_5^-$、$C_8H_7O_2^-$。其中碎片离子 *m/z* 353.0827 是由准分子离子峰 *m/z* 515.1165 脱去一分子咖啡酰基（$C_9H_6O_3$）形成，*m/z* 335.0734 是由碎片离子 *m/z* 353.0827 脱去一分子 H_2O 形成，*m/z* 191.0540 是由碎片离子 *m/z* 353.0827 脱去一

表 2　脉络宁注射液酯提废渣中的成分鉴定和分析

Tab 2　Identification and analysis of compounds in Mailuoning injection ester extraction residue

No.	t_R/min	分子式	离子类型	实测值（*m/z*）	理论值（*m/z*）	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子（*m/z*）	鉴定化合物名称	CAS 号	类型
1	8.39	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0876	353.0878	− 0.57	191.0547/179.0344/135.0435	1-*O*- 咖啡酰奎宁酸	1241-87-8	酚酸
2	10.29	$C_{16}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	375.1274	375.1297	− 6.05	213.0761/169.0853/113.0244/59.0137	马钱苷酸	22255-40-9	环烯醚萜苷
3	11.24	$C_{16}H_{22}O_{10}$	$[M-H]^-$	373.1127	373.1140	− 3.54	193.0480/149.0594/119.0335/89.0235/59.0137	獐芽菜苦苷	17388-39-5	环烯醚萜苷
4	11.37	$C_{16}H_{22}O_{11}$	$[M-H]^-$	389.1077	389.1078	− 0.26	345.1176/209.0453/165.0553/139.0022/121.0646/89.0236/69.0343/59.0138/	裂环马钱苷	59472-23-0	环烯醚萜苷
5	11.98	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0866	353.0878	− 3.41	191.0551/179.0321/173.0448/161.0225/127.0384/93.0327	绿原酸 *	327-97-9	酚酸
6	13.20	$C_{21}H_{32}O_{14}$	$[M-H]^-$	507.1713	507.1719	− 1.24	375.0716/301.0552/177.0546/89.0234/59.0133	裂环马钱子苷 A	/	环烯醚萜苷
7	14.02	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0866	353.0878	− 3.41	191.0550/179.0339/173.0445/135.0437	新绿原酸	906-33-2	酚酸
8	19.84	$C_{17}H_{24}O_{11}$	$[M-H]^-$	403.1249	403.1246	0.78	371.0926/223.0582/179.0660/165.0534/121.0270	断氧化马钱子苷 *	58822-47-2	环烯醚萜苷
9	27.36	$C_{18}H_{26}O_{11}$	$[M-H]^-$	417.1374	417.1391	− 4.08	237.0377/191.0328/141.0517/89.0258	loniceranan B	/	环烯醚萜
10	27.63	$C_{17}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	367.1021	367.1035	− 3.69	191.0553/173.0498/134.0353/93.0343	阿魏酰基奎宁酸	1899-29-2	酚酸
11	33.12	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^-$	623.1894	623.1981	− 14.03	461.1559/161.0218/113.0222	阿格托苷	/	苯丙素
12	34.61	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^-$	623.1900	623.1981	− 13.07	461.1595/315.1048/161.0222	异阿格托苷	/	苯丙素
13	35.08	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.1165	515.1195	− 5.82	353.0827/335.0734/191.0540/179.0323/173.0427/135.0426	异绿原酸 A*	89919-62-0	酚酸
14	35.94	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.1414	609.1461	− 7.73	301.0237/271.0185/151.0037	芦丁	153-18-4	黄酮
15	36.10	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.1176	515.1195	− 3.69	353.0839/191.0543/179.0328/135.0429	异绿原酸 B	14534-61-3	酚酸
16	36.37	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.0854	463.0871	− 3.67	377.8726/301.0225/271.0156	金丝桃苷	482-36-0	黄酮
17	37.04	$C_{34}H_{46}O_{19}$	$[M-H]^-$	757.2476	757.2561	− 11.16	595.2035/525.1575/493.1656/293.0718/119.0352	centauroside/aldosecologanin	82474-97-3/471271-55-3	苯丙素
18	37.25	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M-H]^-$	593.1453	593.1501	− 8.09	285.0376	木犀草素 -7-*O*- 芸香糖苷	20633-84-5	黄酮
19	37.52	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	447.0908	447.0933	− 5.56	285.0381	木犀草苷 *	5373-11-5	黄酮
20	38.47	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M-H]^-$	593.1479	593.1501	− 5.55	447.0853/285.0381	忍冬苷	25694-72-8	黄酮
21	38.67	$C_{25}H_{24}O_{11}$	$[M-H]^-$	499.1221	499.1246	− 4.98	353.0809/337.0845/173.0432	对香豆酰基咖啡酰奎宁酸	/	酚酸

续表 2

No.	t_R/min	分子式	离子类型	实测值（*m/z*）	理论值（*m/z*）	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子（*m/z*）	鉴定化合物名称	CAS 号	类型
22	39.69	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.1189	515.1195	− 1.16	353.0863/191.0553/179.0346/135.0444/	异绿原酸 C*	57378-72-0	酚酸
23	39.96	$C_{36}H_{48}O_{19}$	$[M-H]^-$	783.2668	783.2717	− 6.26	607.2151/461.1614/329.1203/175.0393	安格洛苷 C	115909-22-3	苯丙素
24	40.30	$C_{27}H_{31}NO_{12}$	$[M-H]^-$	560.1722	560.1773	− 9.19	328.0762/284.0842/252.0718/101.0231	金银花螺苷 A	/	环烯醚萜苷
25	40.36	$C_{25}H_{31}NO_{10}$	$[M-H]^-$	504.1854	504.1875	− 4.20	342.1351/324.1224/272.0909/228.1020/147.0418/59.0130	L- 苯丙氨酸裂环马钱素 B	/	环烯醚萜苷
26	41.45	$C_{27}H_{30}O_{14}$	$[M-H]^-$	577.1530	577.1563	− 5.72	269.0453	芹菜素 -7-*O*- 芸香糖苷	552-57-8	黄酮
27	41.52	$C_{27}H_{30}O_{14}$	$[M-H]^-$	577.1520	577.1563	− 7.41	269.0439	野漆树苷	17306-46-6	黄酮
28	42.60	$C_{28}H_{32}O_{15}$	$[M-H]^-$	607.1618	607.1668	− 8.31	299.0520	金圣草素 -7-*O*- 新橙皮糖苷	/	黄酮
29	43.01	$C_{23}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	491.1179	491.1195	− 3.26	476.0999/461.0670/313.0313/217.0288	苜蓿素 -7-*O*- 葡萄糖苷	32769-01-0	黄酮
30	43.55	$C_{26}H_{26}O_{12}$	$[M-H]^-$	529.1300	529.1351	− 9.73	353.0869/191.0570/179.0327/173.0431/135.0431	甲基二咖啡酰奎宁酸	188742-80-5/114637-83-1	酚酸
31	44.70	$C_{25}H_{32}O_{13}$	$[M-H]^-$	539.1734	539.1770	− 6.70	345.1179/193.1003/147.0435/103.053	6"-*O*- 阿魏酸哈巴苷	/	苯丙素
32	44.83	$C_{24}H_{30}O_{11}$	$[M-H]^-$	493.1680	493.1715	− 7.17	147.0425/103.0531/59.0139	哈巴俄苷 *	19210-12-9	环烯醚萜苷
33	47.63	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M-H]^-$	285.0385	285.0405	− 6.88	199.0380/151.0035/133.0238	木犀草素	491-70-3	黄酮
34	52.17	$C_{17}H_{20}O_5$	$[M-H]^-$	303.1239	303.1238	0.34	221.1564/80.9637	杓唇石斛素或其同分异构体	108853-14-1	联苄类
35	53.79	$C_{65}H_{106}O_{32}$	$[M-H]^-$	1397.6427	1397.6594	− 11.98	1073.5338/911.4834	灰毡毛忍冬皂苷乙 *	136849-88-2	三萜皂苷
36	55.21	$C_{59}H_{96}O_{27}$	$[M-H]^-$	1235.5866	1235.6066	− 16.20	911.4871/749.4366/603.3842/471.3439	灰毡毛忍冬皂苷甲 *	140360-29-8	三萜皂苷
37	55.62	$C_{58}H_{94}O_{26}$	$[M-H]^-$	1205.5825	1205.5961	− 11.24	881.4795/749.4386/603.3839/471.3436	黄褐毛忍冬皂苷甲	150107-44-1	三萜皂苷
38	56.23	$C_{54}H_{88}O_{24}$	$[M-H]^-$	1119.5413	1119.5593	− 16.06	1073.5413/749.4391/603.3895/471.3374/323.0968	西南忍冬皂苷 C/D	/	三萜皂苷
39	57.86	$C_{48}H_{78}O_{20}$	$[M-H]^-$	973.4868	973.5014	14.97	927.4788/603.3836/323.0941/179.0549	积雪草苷 B	125265-68-1	三萜皂苷
40	60.70	$C_{53}H_{86}O_{23}$	$[M-H]^-$	1089.5280	1089.5487	− 18.99	955.4735/881.4734/750.4288/603.3792/471.3472	木通皂苷 F	/	三萜皂苷
41	63.75	$C_{47}H_{70}O_{20}$	$[M-H]^-$	953.4243	953.4388	− 15.18	909.4309/793.4237/631.3657/569.3744	二齿皂苷 I	/	三萜皂苷
42	68.69	$C_{47}H_{76}O_{17}$	$[M-H]^-$	911.4915	911.5010	− 10.39	749.4396/603.3883/471.3472	灰毡毛忍冬次皂苷甲 *	128730-82-5	三萜皂苷

注：* 该化合物的鉴定通过与对照品比对。

Note：*Means the compound was identified by comparison with the reference standards.

分子咖啡酰基（$C_9H_6O_3$）形成的奎宁酸负离子，*m/z* 179.0323 是碎片离子 *m/z* 353.0827 脱去一分子奎宁酰基（$C_7H_{10}O_5$）形成的咖啡酸负离子，*m/z* 173.0448 是 *m/z* 191.0540 脱去一分子 H_2O 形成，*m/z* 135.0426 是由碎片离子 *m/z* 179.0323 脱去一分子 CO_2 形成，与对照品比对后推断为异绿原酸 A。其 MS^2 质谱和具体的质谱裂解行为见图 4。

2.6.2　黄酮类化合物的结构鉴定　本文从脉络

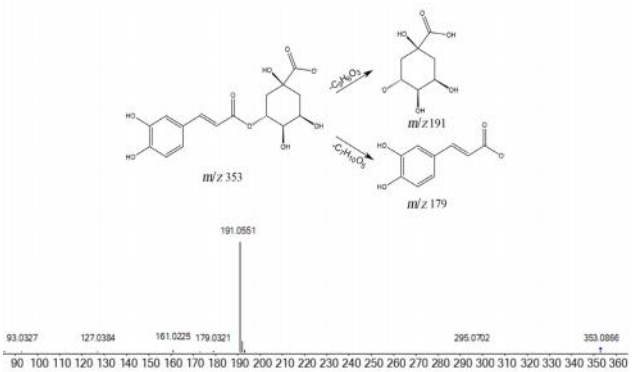


图 3　绿原酸的二级质谱图和质谱裂解途径推断

Fig 3　MS/MS spectra and MS fragmentation pathway deduction of chlorogenic acid

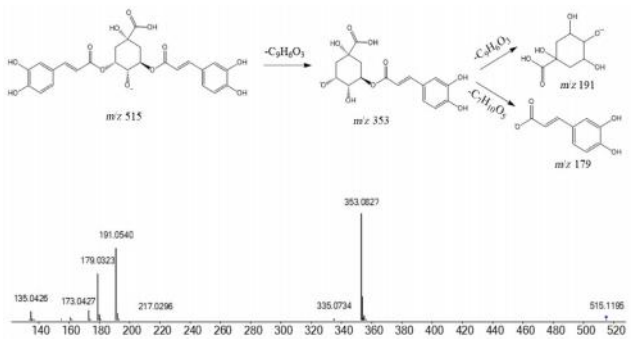


图 4　异绿原酸 A 的二级质谱图和质谱裂解途径推断

Fig 4　MS/MS spectra and MS fragmentation pathway deduction of isochlorogenic acid A

宁注射液酯提废渣中鉴定了 9 个黄酮类化合物。通过 MS^1 图谱确定化合物 **19** 的准分子离子峰为 *m/z* 447.0908 $[M-H]^-$，预测分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$。MS^2 图谱中，主要的碎片离子为 *m/z* 285.0381，是由木犀草苷的准分子离子峰 447.0908 脱去一分子葡萄糖（$C_6H_{10}O_5$）形成。与对照品比对后推断为木犀草苷。其 MS^2 质谱和具体的质谱裂解行为见图 5。

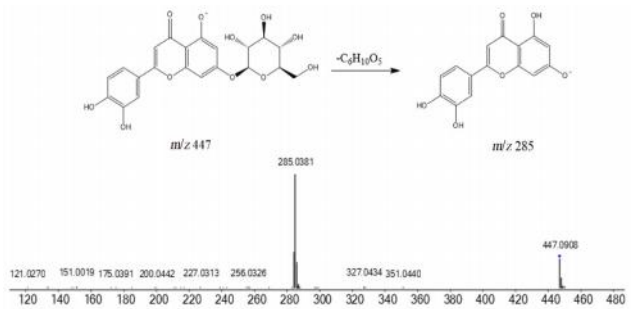


图 5　木犀草苷的二级质谱图和质谱裂解途径推断

Fig 5　MS/MS spectra and MS fragmentation pathway deduction of cynaroside

2.6.3　环烯醚萜苷类化合物的结构鉴定　本文从脉络宁注射液酯提废渣中鉴定了 10 个环烯醚萜苷类化合物。通过 MS^1 图谱确定化合物 **8** 的准分子离子峰为 *m/z* 403.1249 $[M-H]^-$，预测分子式为 $C_{17}H_{24}O_{11}$。MS^2 图谱中主要的碎片离子为 *m/z* 371.0926、223.0582、179.0660、165.0534、121.0270，分别计算其元素组成为 $C_{16}H_{19}O_{10}^-$、$C_{11}H_{11}O_5^-$、$C_6H_{11}O_6^-$、$C_9H_{12}O_3^-$、$C_7H_{10}O_2^-$，其中碎片离子 *m/z* 371.0926 是由准分子离子峰 *m/z* 403.1249 脱去一分子 CH_3OH 形成，碎片离子 *m/z* 223.0582 是由准分子离子峰 *m/z* 403.1249 脱去一分子葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$）形成，碎片离子 *m/z* 179.0660 是脱去一分子葡萄糖形成的碎片离子，碎片离子 *m/z* 165.0534 是由碎片离子 *m/z* 223.0582 脱去 $COOCH_2$ 形成，碎片离子 *m/z* 165.0534 脱去一分子 CO_2 形成碎片离子 *m/z* 121.0270。与对照品比对后推断为断氧化马钱子苷。其 MS^2 质谱和具体的质谱裂解行为见图 6。

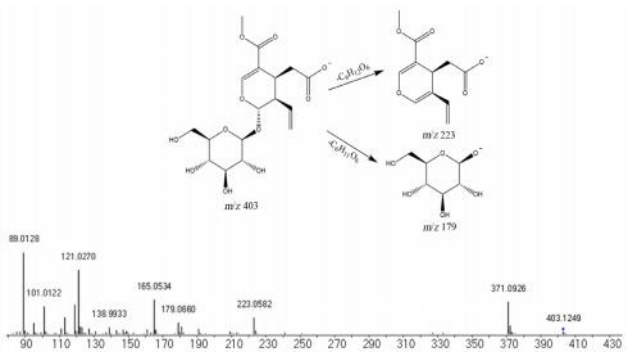


图 6　断氧化马钱子苷的二级质谱图和质谱裂解途径推断

Fig 6　MS/MS spectra and MS fragmentation pathway deduction of secoxyloganin

2.6.4　三萜皂苷类化合物的结构鉴定　本文从脉络宁注射液酯提废渣中鉴定了 8 个三萜皂苷类化合物。通过 MS^1 图谱确定化合物 **35** 的准分子离子峰为 *m/z* 1397.6427 $[M-H]^-$，预测分子式为 $C_{65}H_{106}O_{32}$。MS^2 图谱中主要的碎片离子为 *m/z* 1073.5338、911.4834，分别计算其元素组成为 $C_{53}H_{85}O_{22}^-$、$C_{47}H_{75}O_{17}^-$，其中相对丰度最高的碎片离子 *m/z* 1073.5338 是由准分子离子峰 *m/z* 1397.6427 脱去两分子葡萄糖（$C_{12}H_{20}O_{10}$）形成，*m/z* 1073.5338 脱去一分子鼠李糖形成碎片离子 *m/z* 911.4834。与对照品比对后推断为灰毡毛忍冬皂苷乙。其 MS^2 质谱和具体的质谱裂解行为见图 7。

2.6.5　苯丙素类化合物的结构鉴定　本文从脉络宁注射液酯提废渣中鉴定了 5 个苯丙素类化合物。通过 MS^1 图谱确定化合物 **23** 的准分子离子峰为 *m/z* 783.2668 $[M-H]^-$。MS^2 图谱中主要的碎片离子为 *m/z* 607.2151、461.1614、329.1203、175.0393，分别计算其元素组成为 $C_{26}H_{39}O_{16}^-$、$C_{20}H_{29}O_{12}^-$、$C_{15}H_{21}O_8^-$、$C_{10}H_7O_3^-$。其中碎片离子 *m/z* 607.2151 是分子离子峰脱去阿魏酰基（$C_{10}H_8O_3$）所形成，

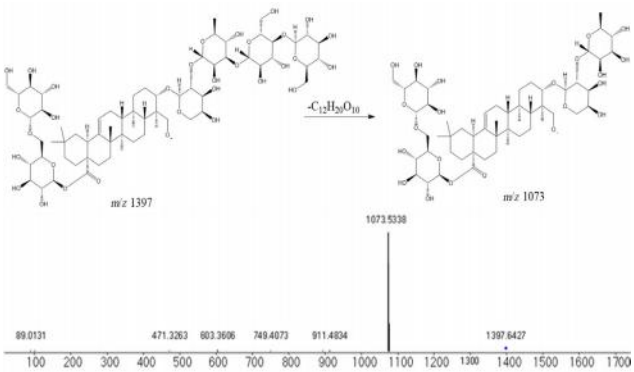


图 7　灰毡毛忍冬皂苷乙的二级质谱图和质谱裂解途径推断

Fig 7　MS/MS spectra and MS fragmentation pathway deduction of macranthoidin B

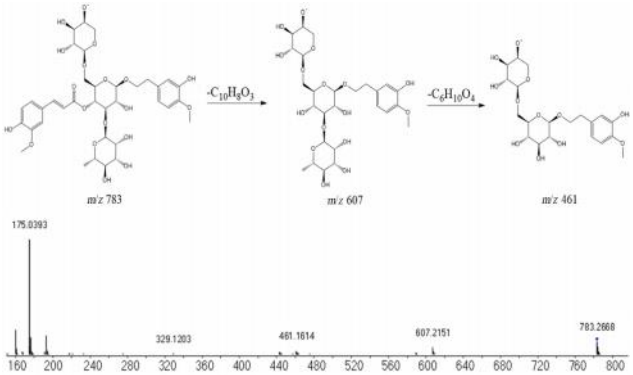


图 8　安格洛苷 C 的二级质谱图和质谱裂解途径推断

Fig 8　MS/MS spectra and MS fragmentation pathway deduction of angoroside C

m/z 607.2151 脱去一分子鼠李糖基（$C_6H_{10}O_4$）形成碎片离子 *m/z* 461.1614，碎片离子 *m/z* 329.1203 是碎片离子 *m/z* 461.1614 脱去 $C_5H_8O_4$ 形成，碎片离子 *m/z* 175.0393 是碎片离子 *m/z* 329.1203 脱去 $C_5H_{14}O_5$ 形成，其 MS^2 质谱和具体的质谱裂解行为见图 8。

2.6.6　联苄类化合物的结构鉴定　本文从脉络宁注射液酯提废渣中鉴定了 1 个联苄类化合物。通过 MS^1 图谱确定化合物 **34** 的准分子离子峰为 *m/z* 303.1239 $[M-H]^-$。MS^2 图谱中主要的碎片离子为 *m/z* 221.1564，分别计算其元素组成为 $C_{13}H_{17}O_3^-$。其中碎片离子 *m/z* 221.1564 是碎片离子 *m/z* 303.1239 脱去 $C_4H_3O_2$ 形成，其 MS^2 质谱和具体的质谱裂解行为见图 9。

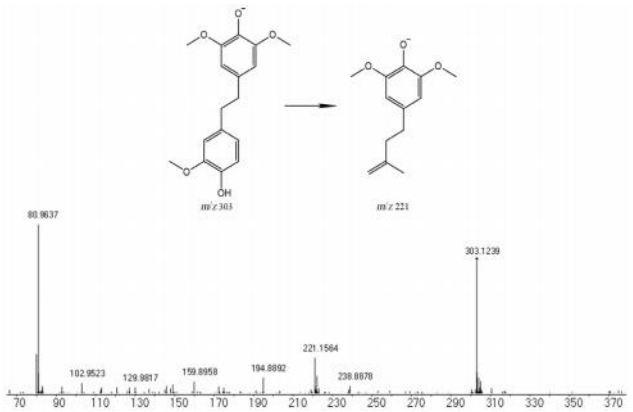


图 9　杓唇石斛素的二级质谱图和质谱裂解途径推断

Fig 9　MS/MS spectra and MS fragmentation pathway deduction of moscatilin

2.7　样品含量测定

取 8 批脉络宁注射液酯提废渣制备供试品溶液，对 8 批脉络宁注射液酯提废渣大孔树脂富集液的 5 种有效成分进行含量测定，结果见表 3。

表 3　脉络宁注射液酯提废渣 90% 乙醇富集液供试品中化合物的含量 (n = 3，mg・g^{-1})

Tab 3　Content of compound content in 90% ethanol solution from Mailuoning injection ester extraction residue (n = 3，mg・g^{-1})

批次	绿原酸		异绿原酸 A		异绿原酸 C		灰毡毛忍冬皂苷乙		灰毡毛忍冬皂苷甲	
	醇提液	废渣	醇提液	废渣	醇提液	废渣	醇提液	废渣	醇提液	废渣
20210228	11.37	2.46	2.66	0.58	5.65	1.22	42.16	9.13	5.54	1.20
20210301	7.49	2.27	1.78	0.54	3.28	1.00	13.49	4.10	1.72	0.52
20210302	8.72	2.10	2.33	0.56	4.26	1.03	18.78	4.53	2.28	0.55
20210303	10.98	2.56	3.92	0.91	8.06	1.88	36.90	8.62	3.87	0.90
20210312	18.98	3.10	2.17	0.39	4.29	0.75	45.02	7.83	6.13	0.86
20210313	18.84	3.04	5.42	0.87	10.35	1.67	49.79	8.03	5.53	0.89
20210314	8.95	2.87	3.34	1.07	5.89	1.89	13.08	4.20	1.49	0.48
20210315	8.76	2.97	2.10	0.71	3.96	1.34	15.73	5.34	1.86	0.63

3　讨论

本试验对大孔树脂富集（0%→10%→100% 乙醇水溶液洗脱）脉络宁注射液酯提废渣化学成分的程度进行了考察，洗脱剂分别为 0%→10%→50%→100% 乙醇水溶液；0%→20%→50%→100% 乙醇水溶液和 0%→10%→60%/70%/80%/90% 乙醇水溶液；经液相色谱结果分析，结果发现洗脱剂为 0%→10%→90% 乙醇水溶液梯度洗脱时，90% 乙醇部位主要化学成分富集程度最大。

由脉络宁注射液酯提废渣鉴定结果表明，其中环烯醚萜苷类成分最多，推测脉络宁酯提废渣中可能含有较多的金银花和山银花原药材成分；含量测定结果显示，脉络宁注射液酯提废渣大孔

树脂富集液中三萜皂苷类成分（灰毡毛忍冬皂苷甲和灰毡毛忍冬皂苷乙）的含量最高，其次为酚酸类成分（绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C），表明废渣中含有丰富的原药材活性成分，尤其是酚酸类和三萜皂苷类成分含量较高。

以往的中药废弃物的主要用途是作为有机肥料[19]、微生物发酵产物[20]、燃料和饲料添加剂，以及开发高附加值的资源产品[21]。该研究采用 ASD-7 大孔树脂柱富集方法和 UHPLC-Q-TOF-MS 技术建立了脉络宁注射液酯提废渣大孔树脂富集液中化学成分的鉴定以及 5 种有效成分的含量测定方法，通过液相色谱的分离和质谱的检测，推断了脉络宁注射液酯提废渣的主要化学成分组成，并对其中酚酸类和三萜皂苷类成分进行含量测定，结果明确了多种中药材活性成分在废渣中的含量，首次实现了脉络宁注射液酯提废渣化学成分的鉴定和有效成分的含量测定，为脉络宁注射液酯提废渣后续再利用提供了科学依据。

参考文献

[1] 黄平，张静，刘婷婷 . 脉络宁注射液治疗血栓闭塞性脉管炎 30 例临床观察 [J]. 中医药导报，2016，22（1）：74-77.

[2] 刘宏斌，陈丽莉，孙兴元，等 . 脉络宁注射液治疗不同中医证型急性缺血性脑血管病 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（14）：298-300.

[3] 尹文伟，陈思，裴璐，等 . 脉络宁注射液辅助治疗急性脑梗死的临床观察 [J]. 中国药房，2017，28（20）：2834-2837.

[4] 张斌，姚影珍，张立兴，等 . 脉络宁联合利伐沙班对脊柱术后下肢深静脉血栓及安全性的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2018，27（30）：3344-3346.

[5] 张春光，石振东 . 贝前列素联合脉络宁治疗老年下肢动脉硬化闭塞症的临床观察 [J]. 中国疗养医学，2016，25（3）：306-308.

[6] 魏锋 . 尼莫地平合用脉络宁治疗脑血栓形成临床分析 [J]. 健康之友，2018（14）：36.

[7] Yang W，Shi Z，Yang HQ，et al. Mailuoning for acute ischaemic stroke [J]. Cochrane Database Syst Rev，2015，1：Cd007028.

[8] Zhi MX，Zhang GB，Hou JC，et al. Peridural injection of Mailuoning compound liquor for treatment of prolapse of lumbar intervertebral disc in 100 cases [J]. J Tradit Chin Med，2009，29（1）：6-8.

[9] Jia WY，Wang KK，Zhang SB，et al. Integrating network pharmacology and in vivo experimental validation to reveal the alleviation of Mailuoning oral liquid on non-alcoholic fatty liver disease [J]. Phytomedicine，2022，104：154326.

[10] Miao JQ，Shen J，Yan CQ，et al. The protective effects of Mai-Luo-Ning injection against LPS-induced acute lung injury via the TLR4/NF-κB signalling pathway [J]. Phytomedicine，2022，104：154290.

[11] 冷毓青 . 脉络宁注射液致喉头水肿 1 例 [J]. 时珍国医国药，2007，18（4）：932.

[12] 肖秋萍，何成华，朱华旭，等 . 脉络宁注射液醇沉废弃物对雏鸡免疫系统和生长性能的影响 [J]. 中药新药与临床药理，2017，28（1）：41-45.

[13] 李峰，王娜，张师愚，等 . 中药药渣的综合利用及其研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2016，47（10）：1322-1326.

[14] 刘双双，刘丽芳，朱华旭，等 . 酶解等 4 种方法用于中药废弃物资源化研究初探（Ⅰ）- 以脉络宁注射液生产中石斛药渣的多糖资源化研究为例 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（22）：34-40.

[15] 刘双双，刘丽芳，朱华旭，等 . 超滤膜技术用于脉络宁注射液废弃物中多糖分离及其活性筛选研究 [J]. 中草药，2016，47（13）：2288-2293.

[16] 聂林峰 . 脉络宁注射液生产过程废弃物资源化利用研究 [D]. 南京：南京农业大学，2019.

[17] 孙克寒，杨会，王淑琪，等 . 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析四妙勇安汤的化学成分 [J]. 中国中药杂志，2022，47（10）：2658-2667.

[18] 龚兴成，刘文静，曹丽波，等 . DI-MS/MS^{ALL} 法快速定性分析金银花的化学成分 [J]. 中国中药杂志，2021，46（9）：2220-2228.

[19] 秦梦，崔施展，何培，等 . 中药废渣生物有机肥对北沙参产量和品质的影响 [J]. 时珍国医国药，2022，33（3）：695-697.

[20] 吕丽静，屈青松，周晴，等 . 甘草药渣发酵工艺优化及成分分析、抗氧化活性的研究 [J]. 中南药学，2022，20（10）：2312-2317.

[21] 胡露，柯军 . 中药废弃物综合利用研究进展 [J]. 甘肃科技，2020，36（24）：39-40，125.

（收稿日期：2023-02-05；修回日期：2023-04-08）

左氧氟沙星联合芪归银方对铜绿假单胞菌生物膜和绿脓菌素的影响

赖晓静[1]，李颜伶[1]，吴珺[2]，徐广[1]，刘滔[1]，王凯赫[1]，母磊鑫[1]，刘清泉[3*]，马群[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 北京中医药大学生命科学学院，北京　102488；3. 首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所，中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室，北京　100010）

摘要：目的　基于中药提取物和含药血清两个层次研究左氧氟沙星（LEV）联合芪归银方（QGYD）对铜绿假单胞菌标准菌株及耐药菌株生物膜和绿脓菌素的影响，为中药联合抗菌药物防治生物膜感染的临床用药提供参考。**方法**　制备药液（LEV 组、LEV ＋ QGYD 组）和 LEV 组、LEV ＋ QGYD 组系列含药血清，分别干预铜绿假单胞菌标准菌株和临床多重耐药菌株，测定铜绿假单胞菌生长量、生物膜形成量和绿脓菌素分泌量。测定 LEV 组、LEV ＋ QGYD 组含药血清中 LEV 的含量和各组大鼠血清中 TNF-*α* 和 IL-2 的水平。**结果**　LEV 组和 LEV ＋ QGYD 组（药液 / 血清）均能抑制铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）的生长、生物膜的形成和绿脓菌素的分泌；LEV 组与 LEV ＋ QGYD 组血清中 LEV 含量分别为 6.14 μg • mL^{-1} 和 5.12 μg • mL^{-1}。与空白对照组相比，LEV 组 TNF-*α* 表达水平明显升高，IL-2 表达水平无明显变化；QGYD 组、QGYD ＋ LEV 组 TNF-*α* 和 IL-2 均无明显变化。与 LEV 组相比，QGYD ＋ LEV 组 TNF-*α* 和 IL-2 表达水平均明显降低。**结论**　体外和半体内研究均表明，联用 QGYD 能增强 LEV 的抗菌活性，有效抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成和绿脓菌素的分泌。

关键词：左氧氟沙星；芪归银方；联合用药；铜绿假单胞菌；生物膜；血清药理学
中图分类号：R285.5，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2647-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.015

Effect of levofloxacin combined with Qiguiyin decoction on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and pyocyanin

LAI Xiao-jing[1], LI Yan-ling[1], WU Jun[2], XU Guang[1], LIU Tian[1], WANG Kai-he[1], MU Lei-xin[1], LIU Qing-quan[3*], MA Qun[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488; 2. *School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488; 3. *Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Basic Research of Infectious Diseases of TCM in Beijing Key Laboratory, Beijing* 100010)

Abstract: Objective　To determine the effect of levofloxacin (LEV) combined with Qiguiyin decoction (QGYD) on the biofilm and pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* of standard and drug-resistant strains, and to provide reference for the treatment of biofilm infection with traditional Chinese medicine combined with antibiotics. **Methods**　The solution (an LEV group and an LEV ＋ QGYD group) and series of medicated serum of the LEV group, and the LEV ＋ QGYD group were prepared to interfere with the standard strains of *Pseudomonas aeruginosa* and multi-drug resistant strains, respectively. The growth amount of *Pseudomonas aeruginosa*, the formation biofilm and the secretion pyocyanin was measured. The content of the LEV in LEV group and the LEV ＋ QGYD group and the levels of TNF-*α* and IL-2 in the serum of each group were determined. **Results**

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81873127）。
作者简介：赖晓静，女，硕士研究生，主要从事中药复方干预细菌耐药研究，email：lxj15880955292@163.com　*通信作者：马群，女，研究员，博士研究生导师，主要从事中药复方干预细菌耐药研究，email：maqun99@126.com；刘清泉，男，主任医师，博士研究生导师，主要从事中医药防治急危重症研究，email：liuqingquan2003@126.com

The LEV group and LEV ＋ QGYD group (liquid/serum) inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* (standard/drug-resistant), the formation of biofilm and the secretion of pyocyanin. The serum LEV content in the LEV group and the LEV ＋ QGYD group was 6.14 μg • mL $^{-1}$ and 5.12 μg • mL $^{-1}$, respectively. Compared with the control group, the expression level of TNF-*α* was much increased in the LEV group, and the expression level of IL-2 was not obviously changed. Compared with the control group, there was no significant change in TNF-*α* and IL-2 in the QGYD group and the QGYD ＋ LEV group. Compared with the LEV group, the expression levels of TNF-*α* and IL-2 in the QGYD ＋ LEV group were greatly decreased. **Conclusion** The antibacterial activity of LEV is enhanced when combining with QGYD, and the formation of biofilm and secretion of pyocyanin in pseudomonas aeruginosa are effectively inhibited.

Key words: levofloxacin; Qiguiyin decoction; combination therapy; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; pyocyanin; serum pharmacology

铜绿假单胞菌是医院内感染中常见的革兰氏阴性病原菌，耐药机制复杂[1]。其中生物膜（biofilm，BF）是其典型的适应性耐药机制之一，生物膜能帮助铜绿假单胞菌躲避人体免疫系统清除和抗菌药物攻击，对常用抗菌药物产生耐药性[2]；随着生物膜的形成，铜绿假单胞菌的重要毒力因子绿脓菌素的分泌水平将显著提高[3]，导致细菌的致病性和感染性增强[4-5]，病情迁延反复[6]，给临床治疗带来了极大的挑战。

随着临床单用抗菌药物治疗生物膜感染的效果越来越不尽如人意，联合用药的给药策略获得了广泛的认可[6-8]。多项研究表明抗菌药物联合中药能有效抑制生物膜耐药机制，提高疗效[9-11]。芪归银方（Qiguiyin decoction，QGYD）由黄芪、金银花、当归、青蒿、虎杖 5 味中药配伍组成，联合广谱抗菌药物使用具有良好的抗感染效果[11-12]，目前关于 QGYD 干预铜绿假单胞菌生物膜形成的研究还未见报道。本论文基于提取物和含药血清两个层次，研究芪归银方（QGYD）联合左氧氟沙星（LEV）对敏感 / 耐药铜绿假单胞菌生物膜和绿脓菌素的影响，为中药联合抗菌药物防治生物膜感染的临床用药提供参考。

1　材料

1.1　菌株来源

标准铜绿假单胞菌 ATCC27853 一代菌株（编号：BNCC337940，北京北纳创联生物技术研究院）；多重耐药铜绿假单胞菌临床分离株（样本号：19PXSP2218，北京中医药大学东直门医院检验科）。

1.2　试药

中药饮片黄芪 600 g、金银花 150 g、当归 100 g、青蒿 150 g、虎杖 100 g（批号分别为 90541102、93451002、90280901、93051001、90510501，北京三和药业有限公司），经北京中医药大学杨瑶君教授鉴定均为正品。左氧氟沙星对照品（批号：Y02N7C23971，HPLC ≥ 99%，上海源叶生物技术有限公司）。左氧氟沙星片 [批号：BX00A1，第一三共制药（北京）有限公司]。

M-H 琼脂、M-H 肉汤（青岛高科技工业园海博生物技术有限公司，批号分别为 20210124、20201202）；0.4% 草酸铵结晶紫染液（批号：R20710）、2.5% 戊二醛固定液（批号：L26O11G12-8919）、氯化镁、甘油、硫酸钾（分析级，上海源叶生物技术有限公司）；蛋白胨（批号：20190102，北京博奥拓达科技有限公司）；浓盐酸，氯仿（分析级，北京中医药大学危化品管理仓库）。

1.3　实验动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 80 只，体重 240 ～ 280 g，许可证号：SCXK（京）2016-0006，动物批号：No.111011211101075631，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，饲养于北京中医药大学动物房，饲养条件为恒温（24±2）℃，相对湿度为 40% ～ 70%，12 h 光照和黑暗循环模拟正常昼夜周期。动物实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准（No.4-2021113001-4079）。

1.4　仪器

立式压力蒸汽灭菌器（型号：YXQ-100A，上海博迅实业有限公司）；电热恒温鼓风干燥箱（型号：DHG-9070A，上海一恒科学仪器有限公司）；电热恒温水浴锅（型号：HH-S6，北京科伟永兴仪器有限公司）；高速冷冻离心机 [型号：Sorvall ST 8R，赛默飞世尔（苏州）仪器有限公司]；生物安全柜 [型号：1374，赛默飞世尔（苏州）仪器有限公司]；气浴恒温振荡仪（型号：ZD-85，济宁市翰业机械设备有限公司）；微生物可编程培养箱 [型号：LT-IBX120N，立德泰勉（上海）科学仪器有限公司]；酶标分析仪（型号：DNM-9602，北京朗新技术有限公司）。

2　方法与结果

2.1　药物的制备

2.1.1　药液的制备　采用课题组前期工艺优化选定的提取方法[13]制备生药质量浓度为 2 g • mL^{-1} 的 QGYD 药液。参照临床和实验室标准化协会（CLSI）（2019 版）文件配制 LEV 对照品储备液，无菌分装－20 ℃冻存。课题组前期体外抑菌研究表明，单用 LEV 对照品药液对铜绿假单胞菌标准菌株（ATCC27853）和耐药菌株（19PXSP2218）的 *MIC* 分别为 0.8 μg • mL^{-1}、8 μg • mL^{-1}；参照 CLSI（2019 版）中的二倍稀释法，用 MHB 培养基将 LEV 对照品溶液稀释至 2、1、1/2、1/4、1/8 最低抑菌浓度（*MIC*）。根据 QGYD 临床人日处方量（110 g 生药 /60 kg）和 LEV 临床人日处方量（0.6 g/60 kg），用 MHB 培养基将 2 g • mL^{-1} 的 QGYD 药液配制得 293.3、146.7、73.3、36.7 μg • mL^{-1} 或 2933.3、1466.7、733.3、366.7 μg • mL^{-1} 的 QGYD 药液。依次将 LEV（除 1/8 *MIC*）和 QGYD 药液从高浓度到低浓度配对等体积混合，制备 LEV ＋ QGYD 组药液。LEV 组药液 LEV 终质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8 μg • mL^{-1} 或 1.0、2.0、4.0、8.0 μg • mL^{-1}（1/8、1/4、1/2、1 *MIC*），LEV ＋ QGYD 组药液 LEV 终质量浓度同 LEV 组，QGYD 终质量浓度分别为 146.7、73.3、36.7、18.3 μg • mL^{-1}（或 1466.7、733.3、366.7、183.3 μg • mL^{-1}）。

2.1.2　含药血清的制备　Wistar 雄性大鼠 80 只，随机分为 4 组，分别是 LEV 组、QGYD 组、LEV ＋ QGYD 组和空白对照组，每组 20 只。根据 LEV 说明书日给药剂量、QGYD 临床日给药剂量和大鼠等效剂量系数折算，LEV 组大鼠 LEV 给药剂量为 0.0625 g/（kg • d）；QGYD 组大鼠 QGYD 给药剂量为 11.5 g/（kg • d）；LEV ＋ QGYD 组大鼠 LEV 给药剂量为 0.0625 g/（kg • d），QGYD 给药剂量为 11.5 g/（kg • d）；空白对照组大鼠灌胃等剂量的生理盐水，每日 2 次，连续 5 d。

末次给药前 12 h 禁食不禁水，灌胃后 1 h 经腹主动脉无菌手法采血，4 ℃离心分离血清（2500 r • min^{-1}，20 min），同组血清混合，56 ℃水浴 30 min 灭活，－80 ℃保存。课题组前期血清药理学研究表明，LEV 组含药血清对铜绿假单胞菌标准菌株和耐药菌株的 MIC_{90} 依次为 15%、55%[14]。用 MHB 培养基分别将各组血清稀释到 1 *MIC* 后，采用二倍稀释法制备 1/2、1/4、1/8 *MIC* 的含药血清，血清终浓度为 1.9%、3.8%、7.5%、15.0% 或 6.9%、13.8%、27.5%、55.0%（1/8、1/4、1/2、1 *MIC*）。

2.2　铜绿假单胞菌生长曲线的测定

吸取 0.5 MCF 铜绿假单胞菌（ATCC27853）或耐药菌株（19PXSP2218）菌液加入药液或含药血清（1/8、1/4、1/2、1 *MIC*）中，充分吹打混匀。吸取 200 μL 加入 96 孔板中，每孔铜绿假单胞菌菌浓度为 1.5×10^6 CFU • mL^{-1}，各浓度设置 4 个平行孔，同时设置同稀释比例阴性对照孔（药液 / 血清）、MHB 肉汤培养基阳性对照孔、MHB 肉汤培养基阴性对照孔。将 96 孔板置于恒温震荡摇床中 37 ℃、220 r • min^{-1} 培养 24 h。每间隔 1 h 用酶标仪测定 96 孔板液体在波长 600 nm 下的吸光度值（*A*），重复以上实验 3 次。结果见图 1、2。药液部分结果表明，与阳性对照组相比，当 LEV 药物浓度为 1、1/2、1/4、1/8 *MIC* 时，LEV 组和 LEV ＋ QGYD 组铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）24 h 生长量均明显降低，铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）的生长均被明显抑制。与 LEV 组相比，LEV 联用 QGYD 后对铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）的抑制作用无明显变化。血清部分结果表明，当血清浓度为 1、1/2、1/4、1/8 *MIC* 时，与阳性对照组相比，LEV 组、QGYD 组、LEV ＋ QGYD 组和空白对照组铜绿假单胞菌标准菌株生长量均明显降低。血清浓度为 1/2 *MIC* 时，LEV 联用 QGYD 后对铜绿假单胞菌标准菌株的抑制作用增强。与阳性对照组相比，当血清浓度为 1、1/2 *MIC* 时，LEV 组、QGYD 组、LEV ＋ QGYD 组铜绿假单胞菌耐药菌株生长量均明显降低；当血清浓度为 1/4、1/8 *MIC* 时，LEV 组铜绿假单胞菌耐药菌株生长量明显提高。与 LEV 组相比，当血清浓度为 1/2、1/4 *MIC* 时，LEV 联用 QGYD 后对铜绿假单胞菌耐药菌株的抑制作用增强，血清浓度为 1/8 *MIC* 时，LEV 联用 QGYD 后对铜绿假单胞菌耐药菌株的抑制作用呈增强的趋势。

2.3　结晶紫染色法测定铜绿假单胞菌生物膜形成量

参照“2.1”项下方法制备药液和含药血清。吸取 0.5 MCF 铜绿假单胞菌（ATCC27853）或耐药菌株（19PXSP2218）菌液加入药液或含药血清（1/8、1/4、1/2、1 *MIC*）中，充分吹打混匀。吸取 200 μL 加入 96 孔板中，每孔铜绿假单胞菌浓度为 1.5×10^6 CFU • mL^{-1}，各浓度设置 4 个平行孔，同时设置 MHB 肉汤培养基阳性对照孔、MHB 肉汤培养基阴性对照孔。将 96 孔板置于恒温培养箱中 37 ℃培养 24 h（铜绿假单胞菌 ATCC27853）或 48 h（耐药菌株 19PXSP2218）。取出 96 孔板，小心倒掉孔内菌液，生理盐水洗涤 2 次。加入 200 μL 的 2.5% 戊二醛固定 20 min（避光），生理盐水洗涤 2 次。加入 200 μL 的 0.4% 结晶紫染色液染色 15 min（避光），生理盐水清洗 3 ～ 4 次。96 孔板室温下避光放置干燥，待孔内无明显液体，加入 200 μL 95% 乙醇脱色溶解 10 min，用酶标仪测定

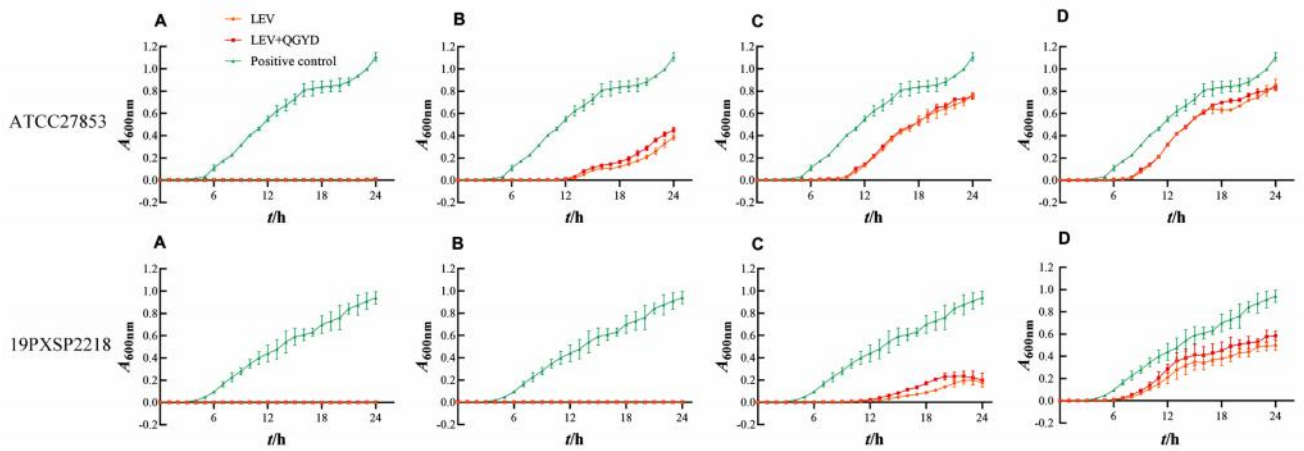


图 1　药液对铜绿假单胞菌菌株生长的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Fig 1　Effect of liquid medicine on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

A ～ D. LEV 药物浓度（LEV 组和 LEV ＋ QGYD 组）依次为 1、1/2、1/4、1/8 *MIC*（the concentration of LEV in the LEV group and LEV ＋ QGYD group was 1，1/2，1/4，and 1/8 *MIC*，respectively）

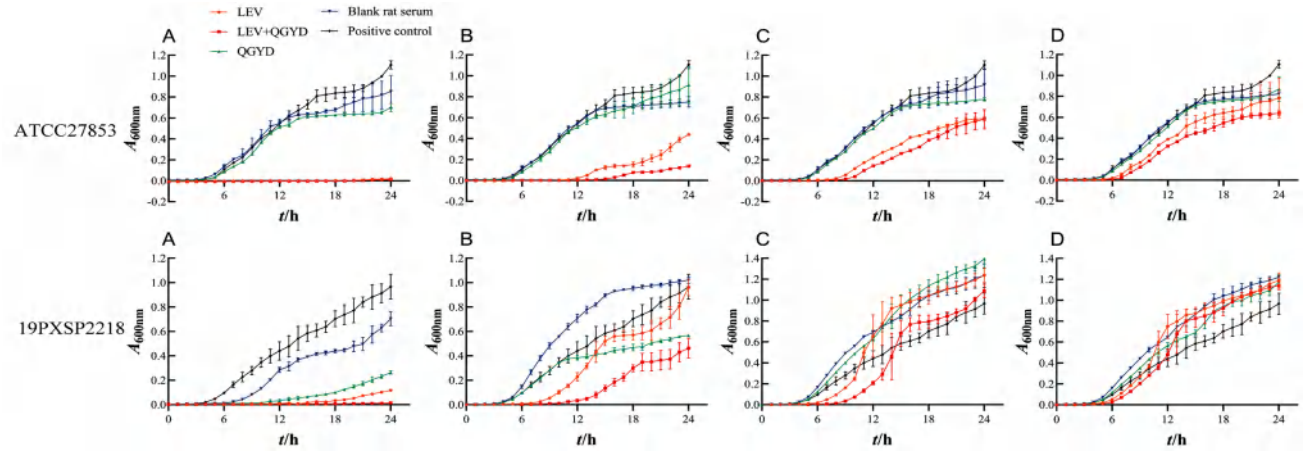


图 2　含药血清对铜绿假单胞菌菌株生长的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Fig 2　Effect of medicated serum on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

A ～ D. 血清浓度依次为 1、1/2、1/4、1/8 *MIC*（serum concentration was 1，1/2，1/4，1/8 *MIC*）

96 孔板液体 595 nm 波长下 *A* 值，结果如图 3 所示。

药液部分结果显示，与阳性对照组相比，1 *MIC* 的 LEV 组、LEV ＋ QGYD 组铜绿假单胞菌标准菌株生物膜形成量显著减少。与 LEV 组相比，LEV ＋ QGYD 组（1、1/2、1/4、1/8 *MIC*）铜绿假单胞菌标准菌株生物膜形成量无减少的趋势。与阳性对照组相比，LEV 组（1、1/2、1/4 *MIC*）和 LEV ＋ QGYD 组（1、1/2、1/4、1/8 *MIC*）铜绿假单胞菌耐药菌株生物膜形成量均显著减少。与 LEV 组相比，LEV ＋ QGYD 组（1/2、1/4、1/8 *MIC*）铜绿假单胞菌耐药菌株生物膜形成量均明显减少。

血清部分结果显示，与阳性对照组相比，血清浓度为 1、1/2 *MIC* 的 LEV 组、QGYD 组和空白对照组铜绿假单胞菌标准菌株生物膜形成量均明显减少。与 LEV 组相比，当血清浓度为 1/2、1/4 *MIC* 时，LEV ＋ QGYD 组铜绿假单胞菌标准菌株生物膜形成量明显减少。与阳性对照组相比，当血清浓度为 1、1/2*MIC* 时，QGYD 组、LEV ＋ QGYD 组和空白对照组铜绿假单胞菌耐药菌株生物膜形成量明显减少。与阳性对照组相比，LEV 组（1 *MIC*）铜绿假单胞菌耐药菌株生物膜形成量明显减少，LEV 组（1/8 *MIC*）生物膜形成量明显增加。与 LEV 组相比，LEV ＋ QGYD 组（1、1/2、1/4、1/8 *MIC*）、QGYD 组（1/2、1/4 *MIC*）和空白对照组（1/2、1/4 *MIC*）铜绿假单胞菌耐药菌株生物膜形成量明显减少。

2.4　氯仿萃取法测定铜绿假单胞菌的绿脓菌素含量

参照上述方法，用 PDP 培养基（不含琼脂）替代 MHB 培养基稀释药液和含药血清后，吸取 0.5 MCF 铜绿假单胞菌（ATCC27853）或铜绿假单胞菌（19PXSP2218）菌液加入药液或含药血清（终浓度为 1/8、1/4、1/2、1 *MIC*）中，充分吹打混匀，每支摇菌管中铜绿假单胞菌菌浓度为

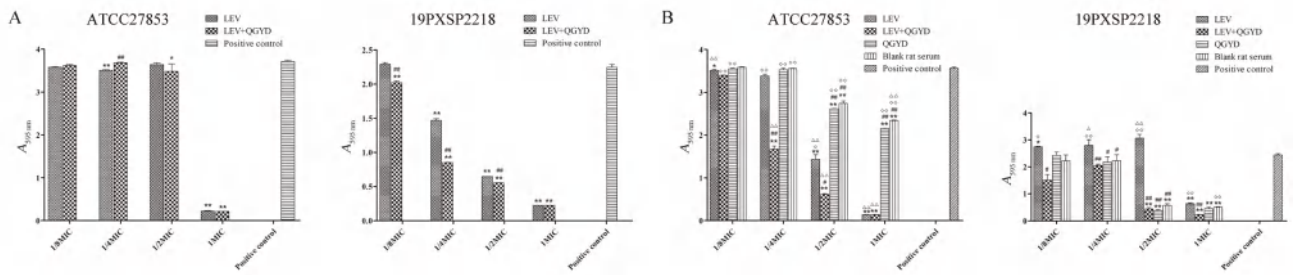


图 3　药液（A）和含药血清（B）对铜绿假单胞菌标准菌株（ATCC27853）和耐药菌株（19PXSP2218）生物膜形成量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 3　Effect of liquid medicine（A）and medicated serum（B）on the formation of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* standard strains（ATCC27853）and drug-resistant strains（19PXSP2218）（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注（Note）：与阳性对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 LEV 组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$（Compared with the positive control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the LEV group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$）。

1.5×10^{6} CFU • mL^{-1}，体系为 1 mL。将摇菌管放入恒温震荡摇床 37 ℃、220 r•min^{-1} 培养 24 h。实验设置阳性对照组和阴性对照组，每组设 5 个平行（血清 3 个平行），重复实验 3 次。吸取 860 μL 的含菌液体加入到 1.5 mL 的离心管中，12 000 r • min^{-1} 离心 1 min。吸取 800 μL 上清液转移至 2 mL 的离心管中，加入 800 μL 的氯仿，涡旋混匀后，4500 r • min^{-1} 离心 10 min，可观察到液体分层，上层为淡黄色，下层由无色变为淡蓝色或蓝绿色。吸取 700 μL 下层液体移至 1.5 mL 的离心管中，并加入 140 μL 的 0.2 mol•L^{-1} 稀盐酸，涡旋混匀后，4500 r • min^{-1} 离心 10 min。可观察到液体分层，上层液体由无色转为粉色或紫红色，下层液体变为无色。吸取 100 μL 上层液体加入 96 孔板，用酶标仪检测 520 nm 波长下吸光度值。结果如图 4 所示。

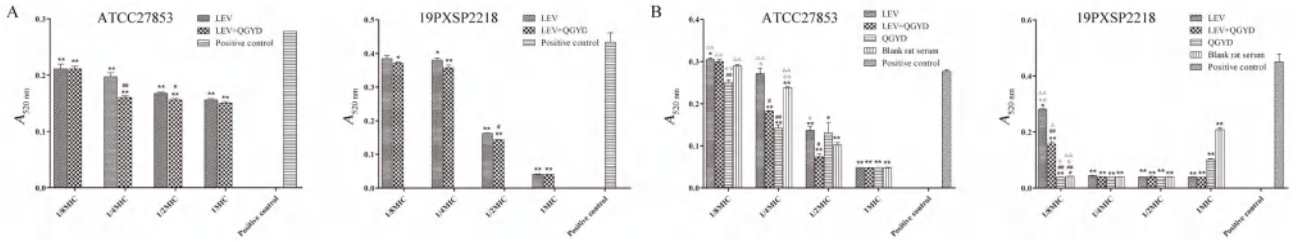


图 4　药液（A）和含药血清（B）对铜绿假单胞菌标准菌株（ATCC27853）和耐药菌株（19PXSP2218）绿脓菌素的影响

Fig 4　Effect of liquid medicine（A）and medicated serum（B）on the secretion of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* standard strain（ATCC27853）and drug-resistant strain（19PXSP2218）（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

注（Note）：与阳性对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 LEV 组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与 QGYD 组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与 LEV ＋ QGYD 组比较，$^{\diamond}P<0.05$，$^{\diamond\diamond}P<0.01$（Compared with the positive control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the LEV group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the QGYD group，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；compared with the LEV ＋ QGYD group，$^{\diamond}P<0.05$，$^{\diamond\diamond}P<0.01$）。

药液部分结果表明，当 LEV 药物浓度为 1、1/2、1/4、1/8 *MIC* 时，与阳性对照组相比，LEV 组和 LEV ＋ QGYD 组铜绿假单胞菌标准菌株绿脓菌素分泌量均明显减少。当 LEV 药物浓度为 1/2、1/4 *MIC* 时，LEV 联用 QGYD 后抑制铜绿假单胞菌标准菌株绿脓菌素产生的作用明显增强。与阳性对照组相比，LEV 组（1、1/2、1/4 *MIC*）和 LEV ＋ QGYD 组（1、1/2、1/4、1/8 *MIC*）铜绿假单胞菌耐药菌株绿脓菌素分泌量均明显减少。与 LEV 组相比，当 LEV 浓度为 1/2 *MIC* 时，LEV 联用 QGYD 后抑制铜绿假单胞菌耐药菌株产生绿脓菌素的作用明显增强。

血清部分结果表明，与阳性对照组相比，当血清浓度为 1、1/2、1/4 *MIC* 时，QGYD 组、LEV ＋ QGYD 组和空白对照组铜绿假单胞菌标准菌株绿脓菌素分泌量明显减少。与阳性对照组相比，LEV 组（1、1/2 *MIC*）铜绿假单胞菌标准菌株绿脓菌素分泌量明显减少；LEV 组（1/4 *MIC*）无明显变化；LEV 组（1/8 *MIC*）绿假单胞菌标准菌株绿脓菌素分泌量增加。与 LEV 组相比，LEV ＋ QGYD 组（1/2、1/4 *MIC*）和 QGYD 组（1/4、1/8 *MIC*）铜绿假单胞菌标准菌株绿脓菌素分泌量均明显减少，空白对照组（1、1/2、1/4、1/8 *MIC*）无明显变化。当血清浓度为 1、1/2、1/4、1/8 *MIC* 时，与阳性对照组相比，LEV 组、QGYD 组、LEV ＋ QGYD 组和空白对照组铜绿假单胞菌耐药菌株绿脓菌素分泌量均明显

减少。与 LEV 组相比，当血清浓度为 1/8 *MIC* 时，LEV ＋ QGYD 组、QGYD 组和空白对照组铜绿假单胞菌耐药菌株绿脓菌素分泌量均明显减少。

2.5　大鼠含药血清中 LEV 浓度的测定

本研究沿用课题组前期确定的 UPLC-MS/MS 测定大鼠含药血清中 LEV 的浓度[14]。用甲醇作溶剂制备 80、40、20、10、4、2、1、0.4 μg • mL^{-1} 的 LEV 系列对照溶液，同时制备环丙沙星（20 μg • mL^{-1}）内标溶液。取空白血清 20 μL，分别加入 LEV 系列溶液和内标溶液（20 μg • mL^{-1}）各 5 μL，加入 50 μL 甲醇沉淀蛋白，涡旋 1 min，4 ℃离心 15 min（14 000 r • min^{-1}），取上清液，氮气吹干后加入 1 mL 初始比例的流动相复溶，涡旋 30 s，4 ℃离心 15 min（14 000 r • min^{-1}）取上清液，进样 1 μL 分析测定，含药血清用相同方法处理并进样分析。

① 色谱条件：Waters Acquity TMUPLC 色谱柱 ACQUITYCSHC_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），流速 0.3 mL • min^{-1}，样品室温度 10 ℃，柱温 40 ℃，进样体积 1 μL。流动相 0.1% 甲酸水（A）- 乙腈（B），梯度洗脱：0 ～ 0.1 min，90%→ 85%A；0.1 ～ 3.0 min，85%→ 20%A；3.0 ～ 3.5 min，20%→ 90%A。② 质谱条件：Waters 三重四极杆串联质谱仪，采用电喷雾离子源，正离子检测模式，离子对选择 LVFX *m/z* 362.2395 ～ 261.1767，锥孔电压 44 V，碰撞能量 22 eV；CPFX *m/z* 332.1651 ～ 245.1919，锥孔电压 42 V，碰撞能量 20 eV。毛细管电压 2.5 kV，离子源温度 150 ℃，去溶剂气温度 350 ℃，去溶剂气流速 650 L • h^{-1}，多反应监测模式检测。测得 LEV 在大鼠血清中标准曲线方程为 $y = 0.057\,97x + 0.1266$（$r = 0.9991$）。LEV 在 2 ～ 400 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。含药血清中 LEV 的质量浓度结果如表 1 所示。

表 1　含药血清中左氧氟沙星的药物浓度 ($n = 6$)

Tab 1　Concentration of levofloxacin in the serum with drug ($n = 6$)

组别	LEV 质量浓度 /（μg • mL^{-1}）
LEV 组	6.14±0.36
LEV ＋ QGYD 组	5.12±0.37**

注（Note）：与 LEV 组比较，$^{**}P < 0.01$（Compared with the LEV group，$^{**}P < 0.01$）。

2.6　大鼠血清中 TNF-*α* 和 IL-2 的测定

测定结果见表 2，与空白对照组相比，LEV 组 TNF-*α* 表达水平明显升高，IL-2 表达水平无明显变化；QGYD 组、QGYD 联合 LEV 组 TNF-*α* 和 IL-2 均无明显变化。与 LEV 组相比，QGYD 联合 LEV 组 TNF-*α* 和 IL-2 表达水平均明显降低。

表 2　含药血清中 TNF-*α* 和 IL-2 表达水平 ($n = 5$，ng • mL^{-1})

Tab 2　TNF-*α* and IL-2 expression in the serum with drug ($n = 5$，ng • mL^{-1})

组别	TNF-*α*	IL-2
空白对照组	285.56±15.84	1626.71±320.75
LEV 组	452.88±19.04**	1572.14±205.21
QGYD 组	292.94±14.43$^{\#\#}$	1363.14±89.49
LEV ＋ QGYD 组	276.18±7.37$^{\#\#}$	1137.86±189.23$^{\#}$

注（Note）：与空白对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与 LEV 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the blank control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the LEV group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

2.7　数据处理

采用 SPSS Statistics 21.0、GraPhPad Prism 8.0.1 分别进行数据统计和作图，计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，符合正态分布且方差齐时采用单因素方差分析，组间比较采用 LSD-*t* 法，符合正态分布但方差不齐时采用单因素方差分析，组间比较采用 Dunnett-T3 法，对不符合正态分布的计量资料采用非参数检验。

3　讨论

LEV 是一种氟喹诺酮类抗菌药物，具有广谱和强效的抗菌特点，对铜绿假单胞菌的抗菌活性显著，中国成人社区获得性肺炎和治疗指南中推荐 LEV 与其他药物联合用于临床上耐药铜绿假单胞菌感染的治疗。目前国内外关于中药联合抗菌药物对细菌生物膜和绿脓菌素影响的研究多为体外研究[15-18]，但中药复方复杂的成分和理化性质，会对体外抑菌实验形成干扰，影响研究结果的准确性和科学性[19-20]。血清药理学为中药复方提供了新的思路[21]，中药含药血清不受无机盐、鞣质等化学成分，渗透压和 pH 值等物理因素的影响，更符合中药在体内代谢的实际情况，有利于中药复方的药效及作用机制研究[22-23]。本文针对铜绿假单胞菌标准菌株和耐药菌株两种菌株，基于 QGYD 中药提取物和含药血清两个层次开展生物膜和绿脓菌素的研究，同时实验测得 LEV 组与 LEV ＋ QGYD 组血清中 LEV 含量相近（分别为 6.14 μg • mL^{-1} 和 5.12 μg • mL^{-1}），避免了联用组血清中抗菌药物浓度高于单用组血清影响实验结果的现象，同时本研究测定了各组大鼠血清中炎症因子的表达量，探索 QGYD 增敏 LEV 的作用机制，可为中药联合抗菌药物防治生物膜感染的研究提供参考。

本文基于体外和半体内两个层次对 LEV 联合 QGYD 对铜绿假单胞菌生物膜和绿脓菌素的影响进行研究，体外实验表明：LEV 组和 LEV ＋ QGYD 组药液均能抑制铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）的生长；LEV 组、LEV ＋ QGYD 组药液对铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）生物膜的形成、绿脓菌素分泌量

均具有一定的抑制作用，LEV 联用 QGYD 后抑制作用增强。含药血清实验表明：LEV 组、LEV ＋ QGYD 组血清均能抑制铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）的生长，LEV ＋ QGYD 后对铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）的抑制作用增强；LEV 组、LEV ＋ QGYD 组均能抑制铜绿假单胞菌（标准 / 耐药）生物膜的形成和绿脓菌素的分泌，LEV 联用 QGYD 后抑制作用增强。体外和含药血清研究结果趋势一致，互相支持。进一步表明了联合 QGYD 能增强 LEV 的抗菌活性，有效抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成和绿脓菌素的分泌，为中药与抗菌药物联用防治细菌生物膜耐药提供可靠的科学依据。本论文采用 ELISA 分子生物学技术测定 LEV 单用及联用 QGYD 时大鼠血清免疫因子的变化，结果表明 QGYD 增强 LEV 抗菌活性的作用可能与免疫因子相关。课题组前期研究证实，QGYD 能通过下调 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路关键基因和蛋白的表达，调控 TNF-α、IL-6、IL-12 等炎性因子的表达，减轻炎症反应紊乱，维持机体免疫平衡 [12]，本实验与前期研究相一致。

本文基于药效学研究探讨中药与抗菌药物联用防治细菌生物膜耐药的作用，并进行相关机制初探，后期会继续探讨中药与抗菌药物联用防治细菌生物膜耐药的作用机制，为临床给药方案的优化提供支持。

参考文献

[1] 秦柯君，曹献芹，陈派强，等 . 铜绿假单胞菌临床分布及耐药机制研究 [J]. 中国病原生物学杂志，2021，16（2）：224-227.

[2] 韩飞，袁子添，梁新丽，等 . 细菌生物膜耐药机制及天然药物干预的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2021，46（14）：3560-3565.

[3] 谭芳，佘鹏飞，李诗佳，等 . 铜绿假单胞菌生物膜和浮游菌的毒力表达差异 [J]. 中国微生态学杂志，2020，32（6）：646-650.

[4] Mcdermott C，Chess WR，Grant GD，et al. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin on human erothelial cell function and viability [J]. J Urol，2012，187（3）：1087-1093.

[5] 孟小斌，古汉福，雷南凤，等 . 下呼吸道感染铜绿假单胞菌产绿脓菌素及生物膜形成能力与耐碳青霉烯类抗菌药物相关性分析 [J]. 中华医院感染学杂志，2015，25（19）：4336-4338.

[6] 吴春，孙永宁，金波娜，等 . 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜研究进展 [J]. 中华医院感染学杂志，2019，29（13）：2069-2074.

[7] 姚科，许琳 . 多种抗菌药物联合应用对耐碳青霉烯酶类肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性研究 [J]. 临床合理用药杂志，2018，11（5）：80-81.

[8] 杨偲睿，任彪，彭显，等 . 药物联用逆转白色念珠菌唑类耐药机制的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志，2022，49（5）：511-520.

[9] 解寻，孔晋亮，罗劲，等 . 中药对耐药菌生物膜抑制作用的研究进展 [J]. 实用医学杂志，2021，37（21）：2813-2816.

[10] 彭勤，凌保东，蔺飞，等 . 中药单体与抗菌药物联合应用对抗泛耐药鲍曼不动杆菌的作用研究 [J]. 中药药理与临床，2020，36（2）：140-145.

[11] Kim YG，Lee JH，Kim SI，et al. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production [J]. Int J Food Microbiol，2015，195：30-39.

[12] Chen GC，Zhang WQ，Kong LB，et al. Qiguiyin decoction improves multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in rats by regulating inflammatory cytokines and the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway [J]. Biomed Res Int，2022：5066434.

[13] Kong LB，Ma Q，Gao J，et al. Effect of Qiguiyin decoction on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in rats [J]. Chin J Integr Med，2015，21（12）：916-921.

[14] 赖晓静，张婉乔，李颜伶，等 . 芪归银方联合左氧氟沙星对铜绿假单胞菌体外抑菌及血清药理学试验 [J]. 中国药理学通报，2023，39（6）：1182-1189.

[15] 石航，白洁，冯欣，等 . 多指标优选芪归银方的水提醇沉工艺 [J]. 中华中医药学刊，2015，33（4）：813-816.

[16] 石岩，杨伟峰，齐文升 . 新加达原散联用亚胺培南西司他定钠对临床分离多重耐药大肠埃希菌生物膜作用实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（19）：73-80.

[17] 邢亚君，杨伟峰，孙娅楠，等 . 痰热清注射液与亚胺培南西司他丁联用对广泛耐药铜绿假单胞菌的抑菌作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（11）：60-66.

[18] Gong Y，Yin SL，Sun SJ，et al. Chelerythrine reverses the drug resistance of resistant Candida albicans and the biofilm to fluconazole [J]. Future Microbiol，2022，17（16）：1325-1333.

[19] 徐英莉，庞博，曹姗，等 . 中药防治耐药铜绿假单胞菌肺炎感染机制研究进展 [J]. 中国药物警戒，2023，20（1）：57-60.

[20] 国锦，高燕，赵渤年 . 中药复方血清药理学研究方法进展 [J]. 中华中医药杂志，2017，32（4）：1656-1658.

[21] 董凤彩 . 中药含药血清的临床应用效果 [J]. 中医临床研究，2015，7（17）：23-25.

[22] Iwama H，Amagaya S，Ogihara Y. Effect of shosaikoto，a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopoly saccharide：a new pharmacological testing method [J]. J Ethnopharmacol，1987，21（1）：45-53.

[23] 张灵娜，林兵，宋洪涛 . 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望 [J]. 中草药，2015，46（17）：2662-2666.

（收稿日期：2023-04-05；修回日期：2023-06-07）

莪术醇片剂的制备及大鼠在体肠吸收研究

李林峻[1]，刘国翔[1]，刘张驰[1]，王炎[1]，张玮[1]，王娟[1, 2*]（1. 桂林医学院药学院生药学重点实验室，广西　桂林　541199；2. 桂林医学院药学院基础医学院，广西　桂林　541199）

摘要：目的　探索莪术醇片剂的处方及其在大鼠体内的小肠动力学特征。**方法**　采用湿法制粒压片法制备莪术醇片剂，通过单因素实验筛选处方，并测定体外累计溶出度，考察药物释放情况；通过大鼠在体肠循环实验，比较莪术醇原料药和片剂在大鼠小肠中的吸收情况。**结果**　筛选出莪术醇片剂的适宜处方为莪术醇 2 g、羟丙甲纤维素 0.225 g、玉米淀粉 1.5 g、硬脂酸镁 0.225 g、一水合乳糖 11.05 g。片剂在溶出介质中 60 min 的溶出度大于 80%。莪术醇片剂在大鼠小肠中的吸收速率高于莪术醇原料药。**结论**　莪术醇片剂组成合理，工艺简单，体外累计溶出速率符合要求。与莪术醇原料药相比，莪术醇片剂能改善大鼠的小肠吸收。

关键词：莪术醇；片剂；单因素实验；溶出度；在体肠循环
中图分类号：R943.4，R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2654-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.016

Prescription selection and in vivo intestinal absorption of curcumol tablets

LI Lin-jun[1], LIU Guo-xiang[1], LIU Zhang-chi[1], WANG Yan[1], ZHANG Wei[1], WANG Juan[1, 2*] (1. *Laboratory of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin　Guangxi* 541199; 2. *Faculty of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin　Guangxi* 541199)

Abstract: Objective　To explore the formulation of curcumol tablets and the dynamic characteristics of small intestine in rats. **Methods**　Curcumol tablets were prepared with wet granule compression. The formulation was screened with single factor experiment, and the cumulative dissolution in vitro was measured to determine the drug release, based on the experiment of in situ method in rats. The absorption of curcumol and its tablets in the small intestine of rats was compared. **Results**　The suitable formulation of curcumol tablets included 2 g curcumol, 0.225 g hydroxypropyl methylcellulose, 1.5 g corn starch, 0.225 g magnesium stearate and 11.05 g lactose monohydrate. The dissolution rate of the tablets in the dissolution medium for 60 min was over 80%. The absorption rate of curcumol tablets in the small intestine of rats was higher than that of curcumol raw material. **Conclusion**　The composition of curcumol tablets is reasonable, the process is simple, and the cumulative dissolution rate in vitro meets the requirements. In comparison to curcumol raw material, curcumol tablets can promote the intestinal absorption in rats.

Key words: curcumol; tablet; complete randomalized design; dissolution; in situ circulation

莪术醇为姜科植物莪术中的特征性成分[1]，现代药理学研究证实莪术醇对多种癌症具有抑制作用[2]，例如卵巢癌[3]、结直肠癌[4]、鼻咽癌[5]、胃癌[6]和乳腺癌[7]等，这表明莪术醇在癌症治疗中具有巨大潜力。一方面，莪术醇作为倍半萜类化合物[1]，在水中的溶解率低[8]，这导致其存在吸收不完全或生物利用度差等问题，从而限制了莪术醇的临床应用；另一方面，虽然目前有含莪术成分的中成药上市，但针对莪术醇单体，尚无相关剂型上市。因此开发莪术醇新剂型，对推进

基金项目：广西科技计划项目（桂科 ZD20302006）；国家自然科学基金项目（No.81760663，No.82160768，No.82002822）；中国博士后科学基金项目（No.2020M683630XB）。
作者简介：李林峻，男，在读硕士研究生，主要从事药物研发与转化，email：912144867@qq.com　*通信作者：王娟，女，研究员，主要从事天然药物抗肿瘤的分子机制及药物靶标筛选，email：407271431@qq.com

莪术醇的临床应用及相关研究具有重要意义。针对以上问题，目前已有研究将莪术醇制备成脂质体[9]、固体分散体[10]、纳米混悬剂[11]等剂型，但尚未见将莪术醇制备为片剂的相关报道。

片剂是由药物成分和相关辅料混合均匀后压合而成的片状剂型，是活性药物成分成药的首选和最常用的药物剂型。相较于其他药物剂型，例如脂质体、固体分散体等，片剂具有制备简单、成本低和便于携带等优点[12]，并且制剂所用的亲水性高分子辅料在胃液中形成胶体使药物较为均匀地分散在胃液中[13]，一定程度上解决了莪术醇吸收不完全或生物利用度差的问题。本课题组通过湿法制粒压片法将莪术醇制备成片剂剂型，通过对莪术醇片剂性能和体外累计溶出的考察以及大鼠在体肠循环的实验，初步建立莪术醇片剂的制备工艺并探索了其在大鼠小肠中的吸收速率，以期为莪术醇片剂向工业化生产的转化提供参考。

1　材料

1.1　仪器

高效液相 Waters e2695（沃特世科技有限公司）；YC-5 单冲压片机（广州金本机械设备有限公司）；片剂四用测定仪、智能药物溶出度仪（上海黄海药检仪器有限公司）；NanoQuant 酶标仪（瑞士帝肯）；pH 计（梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；千分之一电子天平（岛津企业管理有限公司）；RO 反渗透净水器（台湾力宵泵业有限公司）；超纯水机（广西南宁市博美生物科技有限公司）。

1.2　试药

莪术醇（纯度：99%，自制）；一水合乳糖（安徽山河药用辅料股份有限公司）；玉米淀粉、羟丙基甲基纤维素、滑石粉（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；聚维酮、硬脂酸镁（安徽山河药用辅料股份有限公司）；盐酸、磷酸二氢钠、氢氧化钠、冰醋酸、乙醇（西陇科学股份有限公司）；乙酸钠（成都市科龙化工试剂厂）；十二烷基硫酸钠（北京索莱宝科技有限公司）；乙腈（安徽天地高纯溶剂有限公司）。

1.3　动物

SPF 级 SD 大鼠 6 只，雄性，体重（200±20）g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，合格证号：SCXK（湘）2019-0004，动物使用证号：SYXK（桂）2020-0005]。

2　方法与结果

2.1　莪术醇片剂体外累计溶出度分析方法的建立

2.1.1　色谱条件　色谱柱为 ODS 柱（Atlantis d C_{18}，4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相为水 - 乙腈（30∶70）；流速为 1.0 mL • min^{-1}；检测波长为 210 nm；柱温为 30 ℃；进样量为 20 μL。

2.1.2　方法学考察　精密称取莪术醇对照品 20 mg，于 1 mL 无水乙醇中溶解得到 20 mg • mL^{-1} 的莪术醇对照品母液，精密吸取 0、0.625、1.25、2.5 和 5 μL 的莪术醇对照品溶液于 1 mL 无水乙醇中混匀，得到质量溶度分别为 0、0.125、0.025、0.05 和 0.1 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。以峰面积（A）对质量浓度（C）进行线性回归，得回归方程 $A = 1.756\times10^4C + 1.178\times10^4$（$R^2 = 0.9989$），莪术醇在 0 ～ 0.1 mg • mL^{-1} 时与峰面积线性关系良好；供试品中其他成分对目标峰没有干扰，见图 1。说明该方法专属性良好；平行配制 6 份对照品溶液进行重复性测试，$RSD = 0.85\%$，表明该方法重复性较好。

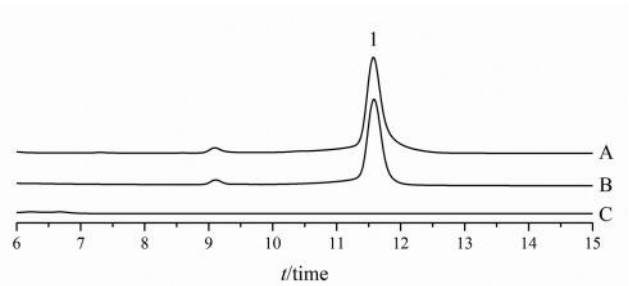


图 1　莪术醇体外溶出的 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatography of in vitro dissolution of curcumol

A. 对照品（reference solution）；B. 供试品（test solution）；C. 阴性样品（negative sample）；1. 莪术醇（curcumol）

2.2　莪术醇 XRD 分析

取莪术醇对照品研磨后进行 XRD 分析，检测条件为步长 0.02°，扫描范围 5° ～ 90°，电压 40 kV，电流 40 mA。结果显示，本实验室纯化的莪术醇在 8.238°、14.280°、16.516° 和 21.897° 处有较为明显的衍射峰，说明其以晶体形式存在，后续实验都使用该晶型的莪术醇。

2.3　莪术醇粒径分析

使用研钵对莪术醇晶体进行研磨，采用筛分法对莪术醇的粒径进行分析，选择孔径分别为 25、45、75、88 和 125 μm 的筛网，按照孔径从小到大依次摞起，最下面为筛底，手动震动若干小时后，记录每层筛网中莪术醇粉末的质量，并由此求得莪术醇粒径的累计分布函数。经过分析，莪术醇晶体研磨后的粒径主要集中在 45 μm，质量分数为 57.66%，$\sigma g = 0.707$，表示粒径比较集中。$R^2 = 0.991$，表示对数正态拟合的相关性较好。

2.4　莪术醇片剂的制备

将处方中各组分及辅料过筛备用。称取处方

量的主药、填充剂及崩解剂混匀，加入黏合剂制软材。过筛制湿颗粒，干燥，整粒。加入处方量的填充剂及润滑剂混匀，压片，即得。

2.5　处方单因素考察

2.5.1　黏合剂和润滑剂种类的考察　选择聚维酮和羟丙甲纤维素为黏合剂筛选对象，硬脂酸镁和滑石粉为润滑剂筛选对象。分别以聚维酮 & 硬脂酸镁、聚维酮 & 滑石粉、羟丙甲纤维素 & 硬脂酸镁以及羟丙甲纤维素 & 滑石粉作为黏合剂或润滑剂制备得到片剂，以片剂性能（外观、片重差异、硬度和脆碎度）以及体外累计溶出度为考察指标，初步确定制剂所用的黏合剂及润滑剂种类，结果见表 1。当润滑剂选用滑石粉时，得到的片剂有裂片现象，推测以润滑剂为滑石粉时片剂压合效果不好导致，所以初步确定处方润滑剂选用硬脂酸镁。由聚维酮 & 硬脂酸镁所制得的片剂脆碎度较高，且有破碎现象，推测选用黏合剂为聚维酮时片剂黏合效果不好导致，所以初步确定处方中黏合剂选用羟丙甲纤维素。

表 1　不同黏合剂和润滑剂对莪术醇片的影响

Tab 1　Effect of different adhesives and lubricants on curcumol tablets

黏合剂 & 润滑剂	外观	片重差异	硬度 /N	脆碎度 /%
聚维酮 & 硬脂酸镁	色泽均匀	合格	62.9±4.3	1.1
聚维酮 & 滑石粉	有裂片现象	合格	70.7±5.6	1.1
羟丙甲纤维素 & 硬脂酸镁	色泽均匀	合格	57.9±10.5	0.5
羟丙甲纤维素 & 滑石粉	有裂片现象	合格	54.6±2.0	0.7

2.5.2　主药和黏合剂用量考察　考察不同比例的主药和黏合剂对片剂性能和体外累计溶出度的影响，初步确定最适的主药和黏合剂用量，结果见表 2 和图 2。改变主药的含量对片剂性能的影响并不大，片剂的片重差异、硬度和脆碎度等指标都符合标准。进一步检测片剂累计溶出度，发现主药含量会影响体外累计溶出度，只有主药含量为 13.3% 时，其 60 min 的体外累计溶出度达到了 80% 以上，所以最终确定主药含量为 13.3%（见图 2A）。

由表 2 可知，黏合剂用量改变，虽然片剂的重量、硬度和脆碎度等有差异，但总体均符合标准。图 2B 片剂溶出度结果表明，黏合剂含量的不同能显著影响片剂的体外累计溶出度，2.0% 和 2.5% 含量的黏合剂制备出来的片剂，其在 60 min 时的体外累计溶出度仅为 60% 左右，相比较下，1.5% 含量的黏合剂时其在 60 min 时的体外累计溶出度达到了 80% 以上，溶出效果较好。所以选择 1.5% 黏合剂为最适用量。

表 2　主药和黏合剂不同用量对莪术醇片的影响

Tab 2　Effect of different dosages of main drug and adhesive on curcumol tablets

主药用量 /%	黏合剂用量 /%	片重差异	硬度 /N	脆碎度 /%
13.3	1.5	合格	57.6±4.2	0.3
16.7	1.5	合格	53.6±6.9	0.4
20.0	1.5	合格	55.4±8.6	0.2
13.3	2.0	合格	51.6±4.2	0.6
13.3	2.5	合格	55.4±7.4	0.6

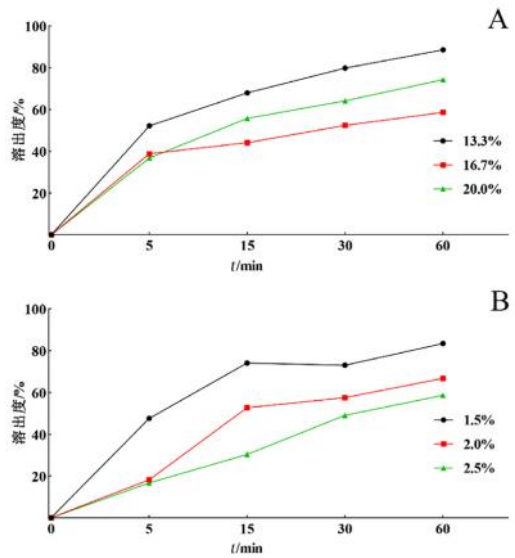


图 2　主药（A）与黏合剂（B）用量对莪术醇片的影响

Fig 2　Effect of different dosages of main drug（A）and adhesive（B）on curcumol tablets

2.6　体外累计溶出度评价

取自制的莪术醇片剂，参照《中国药典》溶出度与释放度测定法，选择第二法桨法体外累计溶出度的测定。分别以 2 mg • mL^{-1} 十二烷基硫酸钠（SDS）的水溶液 900 mL，2 mg • mL^{-1} SDS 的 pH 6.8 磷酸缓冲液 900 mL，2 mg • mL^{-1} SDS 的 pH 4.5 乙酸缓冲液 900 mL 和 2 mg • mL^{-1} SDS 的 0.1 mol • mL^{-1} 盐酸溶液 900 mL 作为溶出介质，转速为 100 r • min^{-1}，不同时间点取溶液 2 mL，同时补充同温的溶出介质 2 mL，经 0.45 μm 滤膜过滤，利用 HPLC 进行测定。计算莪术醇在不同溶出介质中

的累计释放百分率，结果见图 3，莪术醇片剂在不同溶出介质中 60 min 内溶出率达到 80%，溶出率均符合要求。

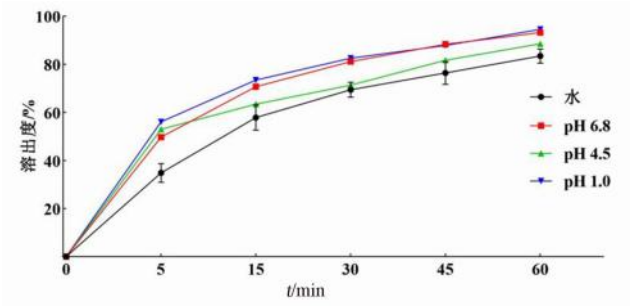


图 3　莪术醇片在不同溶出介质中的溶出曲线

Fig 3　Dissolution curves of curcumol tablets in different dissolution media

2.7　大鼠在体肠循环实验

2.7.1　酚红浓度的测定　精密称定酚红 25 mg 于 250 mL 量瓶中，用蒸馏水定容，作为储备液备用。依次取母液 1、2、3、4、5、6 mL 于 10 mL 量瓶中用蒸馏水定容，分别取上述溶液 0.5 mL 加 0.2 mol • L^{-1} 的 NaOH 5 mL 混匀，得到标准溶液。利用酶标仪在 555 nm 的波长下测定吸光度（A）。以 A 对酚红质量浓度（C）进行线性回归，得回归方程 $A = 53.02C + 0.0356$（$R^2 = 0.9994$），结果表明酚红在 0.0009 ～ 0.0054 mg • mL^{-1} 与 A 有较好的线性关系。

2.7.2　方法学考察　精密量取 20 mg • mL^{-1} 的莪术醇对照品溶液适量，用乙醇稀释成 0 ～ 0.1 mg • mL^{-1} 的系列溶液，以峰面积（A）对质量浓度（C）进行线性回归，得回归方程 $A = 6383.3C + 6909.7$；供试品中其他成分对目标峰没有干扰，见图 4；6 份样品测得重复性 RSD 为 1.3%，表明方法重复性良好。

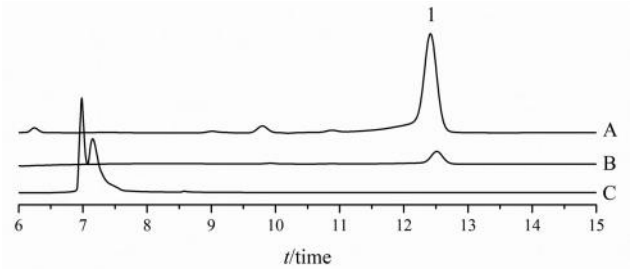


图 4　莪术醇肠灌注液的 HPLC 图

Fig 4　HPLC chromatography of curcumol intestinal perfusion

A. 对照品（reference）；B. 供试品（sample）；C. 阴性样品（negative sample）；1. 莪术醇（curcumol）

2.7.3　大鼠在体肠循环　配制 K-R 肠循环液：称取 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、$CaCl_2$ 1.37 g、$NaHCO_3$ 1.37 g、NaH_2PO_3 0.32 g、$MgCl_2$ 20.02 g、葡萄糖 1.4 g，加水定容至 1000 mL。K-R 酚红试剂：精密称取酚红 20 mg，用 K-R 肠循环液定容至 1000 mL。供试液：精密称取适量莪术醇原料药和莪术醇片剂，用 K-R 酚红试剂溶解，配制成含莪术醇 20 mg • mL^{-1} 的供试液。

大鼠在体肠循环实验准备工作：将健康的 SD 雄性大鼠禁食 12 h，可自由饮水；将配制好的 K-R 酚红试液、供试液和生理盐水放置于 37 ℃的恒温水浴锅内备用；矫正流动泵流速，使其达到 2.5 mL • min^{-1} 或 5 mL • min^{-1}。取实验用 SD 大鼠称重，以 4 mL • kg^{-1} 的剂量腹腔注射 10% 的水合氯醛，麻醉后固定于手术台板上，腹部剃毛，沿腹中线切开约 3 cm 的切口。找到十二指肠上端和回肠下端，两端各开一个小口，用准备好的生理盐水冲洗肠道内异物。将橡胶管插入肠道两端并连接流动泵和 K-R 酚红试液形成闭合回路，开启流动泵，以 5 mL • min^{-1} 的流速平衡 10 min。将 K-R 试液换成 100 mL 的供试液，以 5 mL • min^{-1} 的流速循环 5 min，接着取样 2 mL，记为 0 h，并补充同体积等温度的 K-R 酚红试液，此后每 15 min 取样 2 mL 并补充同体积等温度的 K-R 酚红试液，循环 2 h，处死大鼠。利用酶标仪和 HPLC 检测样品中酚红和莪术醇的含量，以剩余药量的对数对相应时间作图，由直线的斜率求出吸收速率常数（K_a），并计算吸收半衰期（$t_{1/2}$）和表观吸收系数（P_{app}），结果见表 3。与莪术醇原料药相比，莪术醇片剂的 K_a 值和 P_{app} 值高于莪术醇原料药，$t_{1/2}$ 值低于莪术醇原料药，采用 SPSS 26 统计软件，对莪术醇片剂及原料药在小肠的吸收速率常数 K_a 进行配对样本 t 检验分析，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义，说明莪术醇成片后在大鼠小肠内的吸收速率得到改善。

表 3　莪术醇原料药和片剂的大鼠在体肠循环比较 ($n = 3$)

Tab 3　In situ circulation between curcumol raw material and its tablets in vivo ($n = 3$)

制剂	K_a/（$\times 10^{-2}$ min^{-1}）	$t_{1/2}$/min	P_{app}/（$\times 10^{-8}$ cm • min^{-1}）
片剂	1.0*	69.3	2.5
原料药	0.9	77.0	2.2

注：与莪术醇原料药比较，*$P < 0.05$。

Note：Compared with the curcumol raw material，*$P < 0.05$。

3　讨论

本实验将单体莪术醇制备成片剂，通过单因素考察初步优化处方辅料种类以及主药和辅料用量，并以片剂性能、体外累计溶出度为考察指标，

评价不同处方的差异。最终得到主药莪术醇 2 g、黏合剂羟丙甲纤维素 0.225 g、崩解剂玉米淀粉 1.5 g、润滑剂硬脂酸镁 0.225 g、填充剂一水合乳糖 11.05 g 为最佳处方，莪术醇片质量暂定为每片 300 mg，制得莪术醇片 50 片。玉米淀粉作为经典的崩解剂，适用于溶解性低的药物制备成片剂 [14]，低溶解性药物在遇水崩解过程中不会产生浓度差，可使玉米淀粉迅速吸水膨胀发生崩解，由于生产中已经确定崩解剂玉米淀粉的最佳含量为 10%[15]，因此本实验中固定了崩解剂玉米淀粉的用量，并在筛选过程中随时调整填充剂一水合乳糖的用量以保证处方总量不变。关于体外累计溶出度的考察，溶出介质的选择十分关键，直接影响药物溶出。实验所用的 4 种溶出介质分别模拟人体内的胃液和肠液，且人体内的胃肠液中存在大量相关蛋白质，为天然的表面活性剂 [16]，所以我们向 4 种溶出介质中加入表面活性剂 SDS 以达到模拟人体内环境的目的 [17]。莪术醇微溶于水，为亲脂性化合物，但当 pH 降低时，溶解度呈现增大的趋势 [18]，所以在处方筛选时，测定体外累计溶出度时选用 0.2 mg • mL^{-1} SDS 的水溶液作为溶出介质，以此评价莪术醇片剂的体外溶出百分率。

动物实验部分采用大鼠在体肠循环法评价莪术醇原料药和莪术醇片剂在肠道中的吸收情况。在该实验中，由于肠道吸收会对溶液体积产生影响，因此用酚红作为参照对溶液体积进行矫正，并加入 Ca^{2+} 以减少肠道对酚红的吸收 [19]。结果显示莪术醇片剂在大鼠体内吸收更快，这可能与辅料的影响有关。该方法保证了体内各个器官和系统的完整性，尽可能地模拟了口服药物后胃肠道的生物环境，可为莪术醇片剂进一步的临床试验提供参考。

本实验证明莪术醇片剂质量符合规定标准，具有可行性和实用性。这不仅扩大了莪术醇的应用范围，而且提供了莪术醇相关研究的部分数据支撑，为莪术醇的应用和开发提供新途径和新思路。

参考文献

[1] Wei W，Rasul A，Sadiqa A，et al. Curcumol：from plant roots to cancer roots [J]. Int J Biol Sci，2019，15（8）：1600-1609.

[2] Hashem S，Nisar S，Sageena G，et al. Therapeutic effects of curcumol in several diseases：an overview [J]. Nutr Cancer，2021，73（2）：181-195.

[3] Liu CH. Curcumol targeting PAX8 inhibits ovarian cancer cell migration and invasion and increases chemotherapy sensitivity of niraparib [J]. J Oncol，2022，2022：3941630.

[4] Yu D，Liu HP，Qin JL，et al. Curcumol inhibits the viability and invasion of colorectal cancer cells via miR-30a-5p and Hippo signaling pathway [J]. Oncol Lett，2021，21（4）：299.

[5] Yan DZ，Deng SS，Gan WG，et al. Curcumol attenuates epithelial-mesenchymal transition of nasopharyngeal carcinoma cells via TGF-β_1 [J]. Mol Med Rep，2018，17（6）：7513-7520.

[6] Hu Y，Xu RT，Ma JX，et al. Curcumol enhances cisplatin sensitivity of gastric cancer：involvement of microRNA-7 and the nuclear factor-kappa B/snail family transcriptional repressor 1 axis [J]. Bioengineered，2022，13（5）：11668-11683.

[7] Zeng C，Fan D，Xu Y，et al. Curcumol enhances the sensitivity of doxorubicin in triple-negative breast cancer via regulating the miR-181b-2-3p-ABCC3 axis [J]. Biochem Pharmacol，2020，174：113795.

[8] 邓嵘，陈济民，姚崇舜，等 . 莪术醇的研究进展 [J]. 辽宁药物与临床，2001，4（1）：37-39.

[9] 李文杰 . 莪术醇肝靶向脂质体的制备及其抗肿瘤研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2014.

[10] 王朝勃，赵京华，张金凤，等 . 莪术醇固体分散体的制备及体外评价 [J]. 中草药，2017，48（22）：4655-4660.

[11] 吴浩天，赵京华，贾德超，等 . 莪术醇纳米混悬剂的制备和体外释药研究 [J]. 沈阳药科大学学报，2017，34（8）：623-628.

[12] Mangal S，Meiser F，Morton D，et al. Particle engineering of excipients for direct compression：understanding the role of material properties [J]. Curr Pharm Des，2015，21（40）：5877-5889.

[13] 张施琪，何雨薇 . 中药新剂型发展概述 [J]. 求医问药（下半月），2013，11（7）：145-146.

[14] 李玉红 . 玉米淀粉在医药片剂中的应用 [J]. 工企医刊，2014，27（4）：961-962.

[15] 孙小芬，刘汉清，李婧 . 健肾片中崩解剂与崩解时间及溶出度相关性研究 [J]. 中成药，2011，33（6）：969-972.

[16] 吕长淮 . 我国药物溶出度检查方法的现状与展望 [J]. 安徽医药，2006，10（7）：537-538.

[17] 高永荣，张丹参，王凤英 . 蛇床子素及其 β- 环糊精包合物在不同溶出介质中的溶出速率研究 [J]. 中国药师，2005（11）：924-925.

[18] 马喆，王芳，金鑫，等 . 莪术醇的处方前研究 [J]. 国际药学研究杂志，2016，43（3）：562-565.

[19] 徐海燕，覃勤，葛月宾，等 . 大麻药总皂苷中大麻药苷 B 的含量测定及其在体肠吸收特性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（20）：21-24.

（收稿日期：2023-02-25；修回日期：2023-06-12）

桃红四物颗粒对原发性痛经模型大鼠下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴功能的影响

唐林峰[1, 2]，聊晓玉[1, 2]，常昊[1, 2]，赵梦蝶[1, 2]，王丹丹[1]，刘竹青[1, 2]，韩岚[1, 2*]（1. 安徽中医药大学药学院，现代中药安徽省重点实验室，合肥　230012；2. 安徽省中药复方重点实验室，合肥　230012）

摘要：目的　从下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴（HPOA）的角度探讨桃红四物颗粒对原发性痛经（PD）模型大鼠的影响。**方法**　采用戊酸雌二醇联合缩宫素构建 PD 模型大鼠。将大鼠随机分为空白组，模型组，桃红四物颗粒高、中、低剂量组（18、9、4.5 g • kg^{-1}），阳性对照组（0.08 g • kg^{-1} 妇科千金片）。使用酶联免疫吸附法检测血清中促卵泡素（FSH）、黄体生成素（LH）、雌二醇（E_2）、孕酮（P）、β- 内啡肽（β-EP）含量。通过免疫组化和 Western blot 法检测子宫组织中雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）和催产素受体（OTR）的表达。通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测下丘脑和卵巢中促性腺激素释放激素（GnRH）和促性腺激素释放激素受体（GnRH-R）的基因和蛋白表达。**结果**　与正常组相比，模型组大鼠扭体反应次数明显增加，扭体潜伏期明显缩短，表明 PD 模型构建成功。与模型组相比，桃红四物颗粒可显著降低痛经大鼠血清中的 FSH、LH、E_2 表达水平，同时显著升高 P、β-EP 水平。免疫组化和 Western blot 结果表明，与模型组相比，桃红四物颗粒显著降低了痛经大鼠子宫组织中 ER 和 OTR 蛋白的表达，可显著提高 PR 蛋白表达水平。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 实验结果显示，与模型组相比，桃红四物颗粒可显著降低痛经大鼠中下丘脑与卵巢中的 GnRH 和 GnRH-R 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结论**　桃红四物颗粒对 PD 模型大鼠有良好的治疗作用，这可能与调控 HPOA 轴功能有关。

关键词：桃红四物颗粒；原发性痛经；下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2659-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.017

Effect of Taohong Siwu granules on the function of hypothalamic-pituitary-ovarian axis in rats with primary dysmenorrhea

TANG Lin-feng[1, 2], LIAO Xiao-yu[1, 2], CHANG Hao[1, 2], ZHAO Meng-die[1, 2], WANG Dan-dan[1], LIU Zhu-qing[1, 2], HAN Lan[1, 2*] (1. *Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, School of Pharmacy*, *Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compound*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the effect of hypothalamic-pituitary-ovarian axis (HPOA) on primary dysmenorrhea (PD) model rats. **Methods** Estradiol valerate combined with indocin was used to construct PD rat model. The rats were randomly divided into a blank group, a model group, high, medium and low dose groups (18, 9 and 4.5 g • kg^{-1}) of Taohong Siwu granule, and a positive control group (0.08 g • kg^{-1} Fuke Qianjin tablets). The levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E_2), progesterone (P) and β-endorphin (β-EP) in the serum were measured with enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and oxytocin receptor (OTR) in uterine tissues was detected by immunohistochemistry and Western blot. Gene and protein expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-

基金项目：国家自然科学基金项目（No.8207142977，No.81903953）。
作者简介：唐林峰，男，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：tanglinfeng56@163.com　*通信作者：韩岚，女，教授，主要从事中药药理学研究，email：hanlan56@ahtcm.edu.cn

releasing hormone receptor (GnRH-R) in the hypothalamus and the ovary were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. **Results** Compared with the normal group, the number of torsional reactions in the model group was obviously increased and the torsional latency period was much shortened, indicating that the PD model was successfully established. Compared with the model group, Taohong Siwu granules obviously reduced the expression levels of FSH, LH and E_2 in the serum of dysmenorrheic rats, while also increased the levels of P and β-EP. Immunohistochemistry and Western blot showed that compared with the model group, Taohong Siwu granules obviously reduced the expression of ER and OTR proteins in the uterine tissues of dysmenorrheic rats, and increased the expression level of PR protein. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot showed that the mRNA and protein expression levels of GnRH and GnRH-R in the hypothalamus and the ovary in dysmenorrheic rats were obviously reduced by Taohong Siwu granule compared with those in the model group. **Conclusion** The therapeutic effect of Taohong Siwu granules on PD model rats may be related to the modulation of HPOA axis function.

Key words: Taohong Siwu granule; primary dysmenorrhea; hypothalamic-pituitary-ovarian axis

原发性痛经（primary dysmenorrhea，PD）是指患者在月经期间出现下腹部剧烈疼痛，伴有出汗、头痛、恶心等症状，无器质性病变，无其他妇科疾病发生，严重者发生休克、昏厥，严重影响患者的生活、工作和学习质量[1]。流行病学调查结果表明，原发性痛经具有覆盖面广、发病率高等特点[2-7]。因此，针对性治疗 PD 已成为临床研究热点之一。PD 的发病机制与下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴（hypothalamic-pituitary-ovarian axis，HPOA）的功能紊乱密切相关[8]。PD 发生时可促进下丘脑分泌促性腺激素释放激素（gonadotropin-releasing hormone，GnRH）[9]，GnRH 与促性腺激素释放激素受体（gonadotropin-releasing hormone-report，GnRH-R）结合后，刺激垂体黄体生成素（luteinizing hormone，LH）和促卵泡素（follicle-stimulating hormone，FSH）大量分泌，从而促进雌二醇（estradiol，E_2）产生[10]，抑制孕酮（progesterone，P）分泌，导致细胞膜磷脂中花生四烯酸的大量释放，引发子宫内前列腺素（prostaglandins，PG）等一系列致痛物质的产生[11-13]。

另一方面，PD 引起的 E_2 和 P 的分泌紊乱，可导致下丘脑 GnRH 脉冲分泌过多，形成恶性循环。β- 内啡肽（β-endorphin，β-EP）可参与下丘脑 - 垂体功能调控，当 β-EP 水平降低时可诱发子宫收缩，引起痛经症状[14]。已有大量研究表明，药物可通过改善 HPOA 功能恢复起到治疗 PD 的作用[15-16]。

《素问 • 举痛论》曾记载“不通则痛”为 PD 的主要病机，“瘀血”为其主要病理改变，以“通”瘀血为主要治法，故活血化瘀为 PD 的重要治则[17]。桃红四物汤（Taohong Siwu decoction，THSWD）是出自《医宗金鉴》里的一味经典祛瘀生新方剂，全方由经典四物汤（熟地黄、川芎、当归、白芍）配伍红花、桃仁共奏养血补血、活血化瘀之功效[18]，是治疗妇科瘀血症的常用方剂。在临床实践中，桃红四物汤对痛经有较好的治疗效果，其中桃红四物汤的总有效率为 91.05%，在治疗痛经方面有较高的应用率，且无明显不良反应[19-21]。课题组前期研究表明，桃红四物汤对产后血瘀大鼠有明显的治疗作用，能明显减轻子宫的炎症反应，抑制全血黏度和血浆黏度[22]，抑制血清溶血磷脂酸的含量[23]，并通过调节 PI3K/Akt 信号通路促进一氧化氮（NO）和血管内皮生长因子（VEGF）的产生，起到“祛瘀生新”的作用，促进子宫修复[24-25]。与痛经相关的研究中发现桃红四物汤有明显的镇痛作用，其机制可能与调节性激素水平有关[26]；同时，桃红四物汤通过调节血瘀综合征大鼠的雌激素及其受体水平来调节花生四烯酸的代谢[27-28]。与传统煎药相比，颗粒剂具有携带方便、便于保存和运输的优点。课题组前期对桃红四物颗粒剂制备工艺进行了探索和优化[29-30]，在增加桃红四物颗粒的稳定性基础上，更加便于其临床应用。但桃红四物颗粒能否通过调控 PD 模型大鼠 HPOA 功能起到缓解痛经的治疗作用是值得深究的。本文通过建立 PD 模型大鼠，探讨了桃红四物颗粒对 PD 模型大鼠 HPOA 功能的影响，为其新药研发和现代临床应用提供参考。

1　材料

1.1　*动物*

健康的雌性 Sprague-Dawley 大鼠，体重 200 ～ 240 g [安徽医科大学实验动物中心，伦理委员会批准文件号为 No.AHUCM-2017001]。所有的大鼠都被安置在聚丙烯笼子里 [温度（25±5）℃，

相对湿度 50% ～ 60%]，允许自由获取食物和水。

1.2　试药

采用课题组前期优化后的制备工艺制备桃红四物颗粒剂[30]，并交由合肥华方医药公司进行批量生产（批号：190805）。戊酸雌二醇片（拜耳医药保健有限公司，批号：J20171038）；妇科千金片（株洲千金药业有限公司，批号：Z43020027）；催产素注射液（上海和丰药业，批号：J20171038）；苏木精、伊红（珠海贝索生物技术有限公司）；FSH、LH、E_2、P、β-EP ELISA 试剂盒（武汉基因美技术有限公司）；β-actin 抗体（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号：19C10509）；雌激素受体（estrogen receptor，ER）抗体（批号：0E00185623）、孕激素受体（progestogen receptor，PR）抗体（批号：AI12197160）；缩宫素受体（oxytocin receptor，OTR）抗体（批号：AI08281924）、GnRHR 抗体（批号：AF08042244）（北京博奥森生物技术有限公司）；GnRH 抗体（Santa Cruz，批号：K2403）。Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus（北京安诺论生物科技有限公司，批号：0516511）；PrimeScript 抗体 RT 试剂盒与 gDNAEraser（日本 TaKaRa 公司，批号：AJ51485A）。

1.3　仪器

EPS300 型电泳仪、VE-186 型转膜仪、PIKO-REAL96 型荧光定量 PCR 仪（上海天能科技有限公司）；JS-1070P 型自动曝光仪（上海培清科技有限公司）；GT9612 型基因扩增仪（杭州百恒科技有限公司）；AF-10 型自动制冰机（美国 Scottsmann 公司）；HistoCore Arcadia 型自动包埋机、CM1860 型病理切片机（德国 Leica 公司）；CX43 型显微镜（深圳 OLYMPUS 公司）；Bioprep-24 型生物样品匀浆器（杭州澳盛仪器有限公司）；Multiskan Spectrum 型全波长酶标仪（美国 Thermo Fisher 公司）。

2　方法与结果

2.1　大鼠 PD 模型的建立[31]

通过阴道涂片法选择成熟雌性 SD 大鼠。除空白对照组外，连续灌胃戊酸雌二醇片 10 d，1 次 • d^{-1}（第 1 日与第 10 日给药 0.2 mg，第 2 ～ 9 日给药 0.1 mg），末次给药 1 h 后，除对照组大鼠外均腹腔注射催产素（2 U/ 只），观察各组大鼠在 20 min 内的扭体反应，记录大鼠首次发生扭体反应的潜伏期与扭体次数，并计算扭体次数抑制率，扭体次数抑制率（%）＝（模型组扭体次数－给药组扭体次数）/ 模型组扭体次数 ×100%。其中发生扭体反应标准为：腹部内凹，后肢与躯干伸展，臀部抬高，并伴有一侧肢体内旋。

2.2　分组与给药

将大鼠随机分为正常组（Normal），模型组（Model），桃红四物颗粒高、中、低剂量组（18、9、4.5 g • kg^{-1}），阳性药组 [妇科千金片（FKQJ，0.08 g • kg^{-1}）][32]，每组 10 只。从造模的第 5 日起，按照 10 mL•kg^{-1} 的体积灌胃给药，1 次•d^{-1}。正常组与模型组大鼠灌胃等量生理盐水。

2.3　样品采集

麻醉后迅速采集腹主动脉血液，放置 20 min，以 3000 r • min^{-1} 离心 15 min，然后保留上清液置于－ 80 ℃保存。在冰浴环境下迅速分离大鼠子宫、下丘脑和卵巢组织，在－ 80 ℃冰箱中保存。同时将部分新鲜子宫组织保存在 4% 多聚甲醛溶液中，用于制作病理切片。

2.4　大鼠血清 FSH、LH、E_2、P 和 β-EP 含量检测

按照“2.3”项下血清样本处理步骤，使用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中 FSH、LH、E_2、P 和 β-EP 的含量，操作步骤参考说明书。

2.5　Western blot 法检测子宫中 ER、PR、OTR 及下丘脑与卵巢中 GnRH、GnRHR 蛋白表达水平

精密称取子宫、下丘脑和卵巢组织各 80 mg，加入 720 mL 预冷的 RIPA 裂解液和 PMSF 混合物（RIPA ∶ PMSF ＝ 100 ∶ 1）。冰上裂解 30 min 后，低温离心（12 000 r • min^{-1}，4 ℃）15 min，取 20 mL 上清液，使用 BCA 法测定蛋白浓度；剩余上清液加入 5× 上样缓冲液中，100 ℃煮沸 10 min。样品变性后，使用不同浓度的十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白缓冲液，随后在低温下将蛋白转移到 0.22 mm 的 NC 膜上。用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 2 h 后，将膜与抗 ER（1 ∶ 1000）、PR（1 ∶ 1000）、OTR（1 ∶ 1000）、GnRH（1 ∶ 2000）、GnRH-R（1 ∶ 1000）抗体在 4 ℃下孵育过夜。将 NC 膜与 HRP 标记的山羊抗兔（1 ∶ 10 000）与山羊抗鼠（1 ∶ 10 000）抗体在室温下孵育 2 h，TBST 清洗结束后，使用超敏化学发光试剂显色，并使用 Image J 软件进行半定量分析。

2.6　免疫组化法检测子宫中 ER、PR、OTR 蛋白表达水平

采用石蜡包埋法制备子宫组织的病理切片。切片经程序脱水后加入 0.1% Triton X-100 进行破膜处理，滴加适量内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min，随即加入山羊血清室温封闭 15 min，滴加抗 ER（1 ∶ 200）、PR（1 ∶ 200）、OTR（1 ∶ 200）抗体湿盒 4 ℃过夜。经 PBS 清洗后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG，37 ℃孵育 10 min 后，用 PBS 液清洗，加入 DAB 显色剂，在显微镜下观察，终止显色后用蒸馏水冲洗。随后采用苏木精染色 1 min，清洗；1% 盐酸酒精分化数秒，清洗；碳酸锂蓝 1 min，清

洗。最终脱水至透明，封片处理。使用 CX43 显微镜采集照片，并使用 Image J 软件进行分析。

2.7　荧光定量 PCR 检测下丘脑与卵巢中 GnRH、GnRH-R mRNA 表达水平

准确称取下丘脑和卵巢组织各 80 mg，分别加入 1 mL Trizol 进行裂解匀浆处理。低温离心（12 000 r • min^{-1}，4 ℃）10 min 后，取上清液与 0.2 mL 氯仿混匀，冰上放置 5 min。再次低温离心（12 000 r • min^{-1}，4 ℃）10 min 取上清液，加入相同体积的异丙醇，混合均匀，冰上孵育 30 min。低温离心（12 000 r • min^{-1}，4 ℃）15 min 后，留取沉淀加入 75% 乙醇离心（12 000 r • min^{-1}，4 ℃）5 min。冰上干燥 RNA 沉淀，加入 50 μL DEPC 水促溶，同时使用 Nanodrop2000 测定 RNA 浓度与纯度（A_{260nm}/A_{280nm} = 1.8 ～ 2.0）。参照试剂盒说明书进行逆转录 cDNA 合成与荧光定量 PCR 反应。其中引物序列信息详见表 1。

表 1　引物序列信息

Tab 1　Primer sequence information

基因	Forward primer（5'→3'）	Reverse primer（5'→3'）
β-actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTC
GnRH	AATGGCAGAACCCCAGAACT	GCCCAGCTTCCTCTTCAATC
GnRH-R	TGCCTGTTCATCATCCCTCT	GCAAATGCCACTGTCATCTTT

2.8　统计学方法和处理

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理，连续变量用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）进行统计学描述。两组数据的比较采用独立样本 t 检验，多组平均值的比较采用单因素方差分析（$P < 0.05$）。

3　结果

3.1　对 PD 模型大鼠扭体反应的影响

子宫强烈收缩引发的扭体反应是评判 PD 模型大鼠造模成功的经典指标 [31]。如图 1 所示，与正常组相比，模型组大鼠扭体次数明显增加，扭体潜伏时间也明显缩短，提示造模成功。与模型组相比，桃红四物颗粒各剂量组可明显降低扭体次数，提高扭体次数抑制率，同时延长扭体潜伏时间。阳性药组同样可显著改善 PD 模型大鼠扭体反应。这提示桃红四物颗粒对 PD 模型大鼠具有良好的镇痛作用，且具备一定的剂量依赖性。

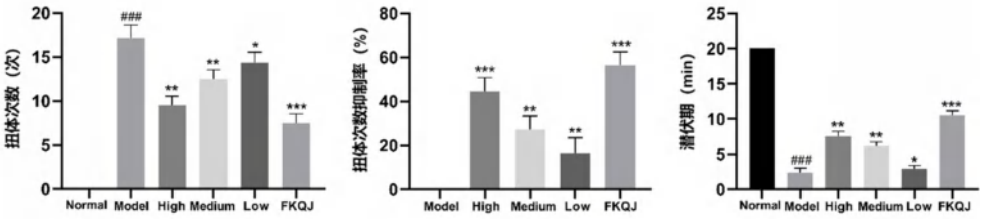


图 1　桃红四物颗粒对 PD 模型大鼠扭体反应的影响（n = 6）

Fig 1　Effect of Taohong Siwu granules on the torsional responses in PD model rats（n = 6）

注：与正常组相比，$^{###}P < 0.001$；与模型相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

3.2　对 PD 模型大鼠血清中 FSH、LH、E_2、P 和 *β*-EP 含量的影响

如图 2 所示，与正常组相比，模型组血清中的 FSH、LH 与 E_2 含量增加，相反，P 和 *β*-EP 的含量则下调。与模型组相比，桃红四物颗粒高、中剂量组及阳性药组均可显著降低痛经大鼠血清中 FSH、LH、E_2 水平，同时提高 P 及 *β*-EP 的表达水平。

3.3　对 PD 模型大鼠 ER、PR、OTR、GnRH、GnRH-R 蛋白表达量的影响

PR、OTR、ER 分别能够识别和结合孕激素、缩宫素、雌激素及其类似物，从而发挥相应的生理效应。同时，激素水平的高低可直接或间接的调控激素受体水平 [33]。为进一步阐释上述性激素与激素受体之间关系，我们检测了子宫组织中 PR、OTR、ER 蛋白表达水平。如图 3 所示，与正常组相比，模型组 PR 表达量下降，OTR 和 ER 蛋白的表达量增加。与模型组相比，桃红四物颗粒高剂量组与阳性药组可有效提高 PR 表达量，同时降低痛经大鼠子宫组织中 OTR 和 ER 蛋白的表达。

作为 HPOA 轴的上游，在 PD 模型中下丘脑与卵巢中的 GnRH 2 与 GnRH-R 结合，可进一步促进上述性腺激素的释放 [34]。如图 4 所示，与正常组相比，模型组下丘脑和卵巢中 GnRH 2 及其受体 GnRH-R 的蛋白表达显著增加。与模型组相比，桃红四物颗粒高剂量组可有效降低痛经大鼠下丘脑和卵巢中 GnRH 和 GnRH-R 的蛋白表达。

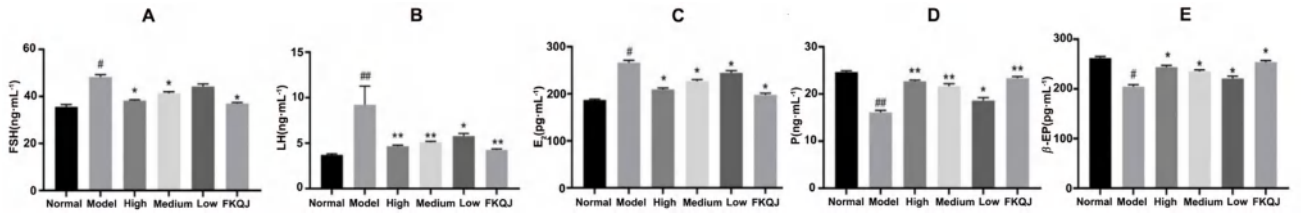


图 2　大鼠血清中 FSH（A）、LH（B）、E_2（C）、P（D）及 β-EP（E）的含量（$n = 6$）

Fig 2　Serum levels of FSH（A），LH（B），E_2（C），P（D），and β-EP（E）in the rats（$n = 6$）

注：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

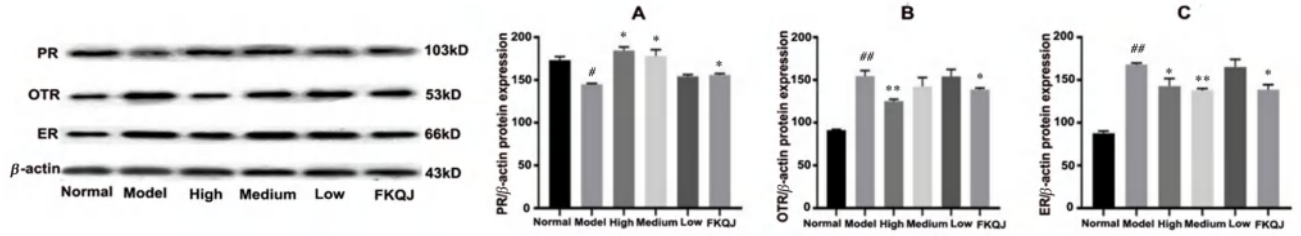


图 3　子宫中 PR（A）、OTR（B）及 ER（C）蛋白的表达（$n = 3$）

Fig 3　Expression of PR（A），OTR（B），and ER（C）proteins in the uterus（$n = 3$）

注：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

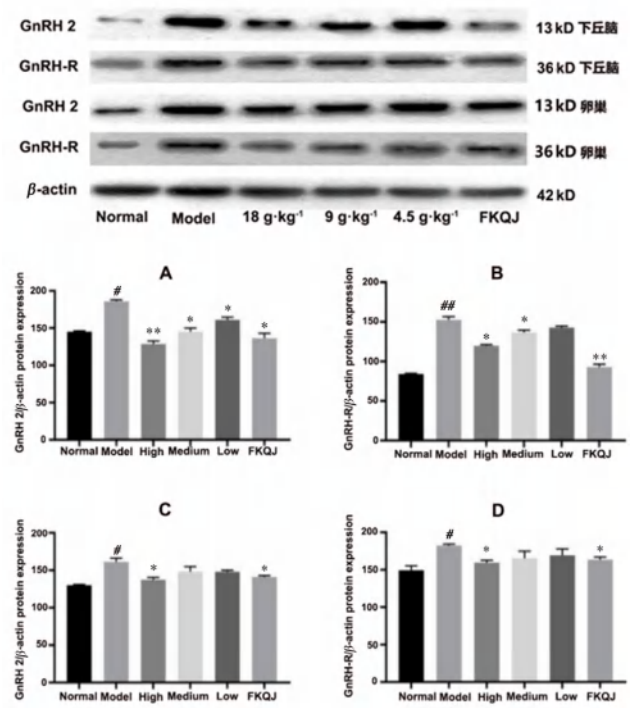


图 4　下丘脑（A、B）与卵巢（C、D）中 GnRH 2、GnRH-R 蛋白的表达（$n = 3$）

Fig 4　Expression of GnRH 2 and GnRHR proteins in the hypothalamus（A and B）and ovary（C and D）（$n = 3$）

注：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

桃红四物颗粒高剂量组的效果与阳性对照药物的效果相似。

3.4　免疫组化结果

为进一步观察子宫组织中 ER、OTR、PR 蛋白表达水平，本研究采用免疫组化评价上述指标。如图 5 与 6 所示，与正常组相比，模型组子宫组织中 ER 和 OTR 的阳性信号表达增加（$P < 0.01$，$P < 0.05$），PR 表达下降（$P < 0.01$）。与模型组相比，桃红四物颗粒高剂量组对痛经大鼠子宫组织中 ER 和 OTR 的阳性信号表达有显著抑制作用（$P < 0.05$），可显著升高 PR 表达（$P < 0.05$），且高剂量组桃红四物颗粒的效果与阳性对照组相似。

3.5　对 PD 模型大鼠下丘脑和卵巢中 *GnRH*、*GnRH-R* mRNA 的影响

下丘脑与卵巢中 GnRH 与 GnRH-R 含量检测常用 *GnRH* mRNA 与 *GnRH-R* mRNA 表达水平来表示。与正常组相比，模型组下丘脑（见图 7A、7B）和卵巢（见图 7C、7D）中 *GnRH* 及其受体 *GnRH-R* 的 mRNA 表达增加（$P < 0.01$），与模型组相比，桃红四物颗粒各剂量组及阳性药组均可显著降低痛经大鼠 *GnRH* 和 *GnRH-R* 的 mRNA 表达。

4　讨论

PD 是临床常见妇科疾病，研究表明其发病机制与 HPOA 功能紊乱密切相关[8]。下丘脑、垂体、卵巢及其分泌的激素之间的相互作用构成了 HPOA 系统，共同调节着身体的生理和病理状态[35-37]。下丘脑的神经内分泌细胞分泌 GnRH，通过血液脉冲，输送到腺体，与 GnRH-R 结合，从而刺激垂体分泌 FSH 和 LH，最后靶向卵巢，刺激卵巢分泌 P 和 E_2。同时，P 和 E_2 的分泌可以反馈调节下丘脑

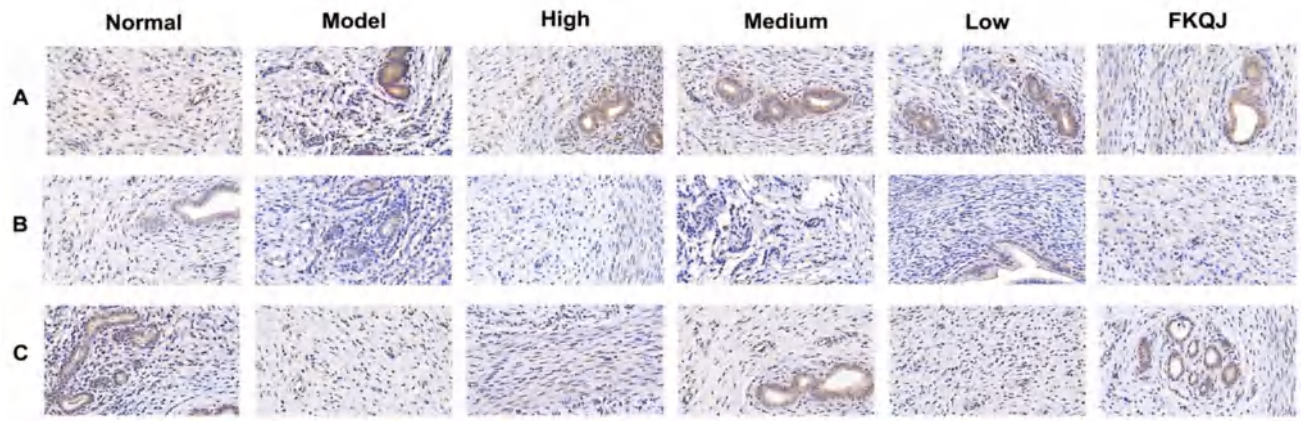


图 5　免疫组化法测定各组子宫组织中 ER、OTR 及 PR 蛋白的表达（×400）

Fig 5　Expression of ER，OTR，and PR proteins in the uterine tissues of each group by immunohistochemistry（×400）

A. ER 蛋白（ER protein）；B. OTR 蛋白（OTR protein）；C. PR 蛋白（PR protein）

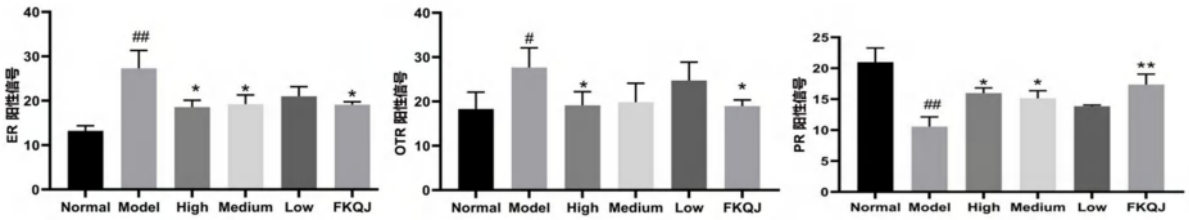


图 6　各组大鼠子宫组织中 ER、OTR 及 PR 的表达（$n = 3$）

Fig 6　Expression of ER，OTR，and PR in the uterine tissue of rats in each group（$n = 3$）

注：与正常组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

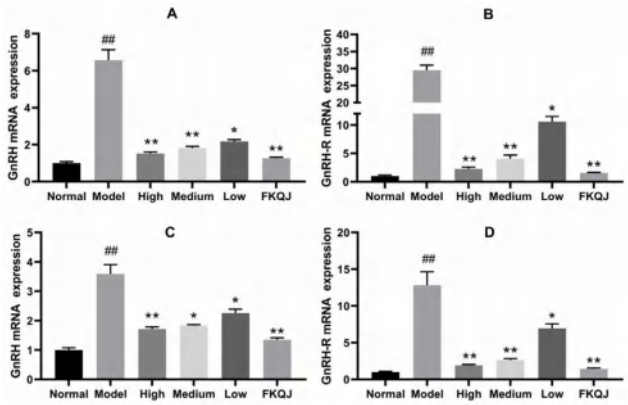


图 7　下丘脑（A 与 B）和卵巢组织（C 与 D）中 *GnRH*、*GnRH-R* mRNA 的表达（$n = 6$）

Fig 7　Expression of *GnRH*，*GnRH-R* mRNA in hypothalamus（A and B）and ovarian tissue（C and D）（$n = 6$）

注：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

和垂体，实现整个系统的动态平衡，共同调节女性身体的健康，形成一个封闭的循环[38]。PD 发生时，HPOA 系统功能紊乱，诱发卵巢中的 E_2 和 P 分泌紊乱，花生四烯酸经环氧化酶分解，于子宫处释放大量前列腺素等致痛物质，而引起痛经症状[39]。

本课题组前期研究表明，桃红四物汤具有良好的治疗痛经的效果，作用机制可能与调控 HPOA 性腺激素水平有关。本研究结果表明，桃红四物颗粒可有效改善 PD 模型大鼠扭体反应，有良好镇痛作用，其镇痛作用效果可能与降低下丘脑和卵巢 GnRH、GnRH-R 蛋白和基因表达，抑制垂体与卵巢 FSH、LH、E_2 的释放，升高 P、β-EP 含量有关。其中，E_2 含量的降低与 P 含量的增加可以有效缓解子宫痉挛和血管收缩，起到镇痛效果[40-42]。此外，β-EP 可以抑制 GnRH 脉冲发生器和 LH 的释放[43-45]。因此，下丘脑和卵巢中 GnRH 和 GnRH-R 的蛋白和基因表达的下降，可能与桃红四物颗粒增加 β-EP 的分泌有关。子宫内膜中含有丰富的 ER、PR、OTR，其含量变化与 PG 的合成释放密切相关，其中 ER 与 OTR 含量变化与 PG 合成释放成正相关[33]，而 PR 含量变化与 PG 合成释放成负相关[46]。桃红四物颗粒可显著降低子宫组织 ER、OTR 的蛋白表达量，升高 PR 蛋白表达量，可能抑制子宫内前列腺素的合成与释放降低，发挥缓解 PD 模型大鼠痛经作用。

综上所述，桃红四物颗粒对 PD 模型大鼠有良好的治疗作用，其作用机制可能是通过调控 HPOA 系统的激素释放，间接影响性腺受体的产生，从而缓解痛经的症状，这为桃红四物颗粒进入治疗痛经的市场导向奠定了部分实验基础。然而 PD 的发病机制非常复杂，仍需进一步深入研究。

参考文献

[1] 杜美容，刘秀敏，于恬，等 . 原发性痛经的研究现状及治疗进展 [J]. 中国民间疗法，2020，28（10）：113-117.

[2] Hu Z，Tang L，Chen L，et al. Prevalence and risk factors associated with primary dysmenorrhea among Chinese female university students：a cross-sectional study [J]. J Pediatr Adolesc Gynecol，2020，33（1）：15-22.

[3] Acheampong K，Baffour AD，Ganu D，et al. Prevalence and predictors of dysmenorrhea，its effect，and coping mechanisms among adolescents in shai osudoku district，Ghana [J]. Obstet Gynecol Int，2019，2019：5834159.

[4] Burnett MA，Antao V，Black A，et al. Prevalence of primary dysmenorrhea in Canada [J]. J Obstet Gynaecol Can，2005，27：765-770.

[5] Patel V，Tanksale V，Sahasrabhojanee M，et al. The burden and determinants of dysmenorrhoea：a population-based survey of 2262 women in Goa，India [J]. Int J Obstet Gy，2006，113：453-463.

[6] Tavallaee M，Joffres MR，Corber SJ，et al. The prevalence of menstrual pain and associated risk factors among Iranian women [J]. J Obstet Gynaecol Res，2011，37：442-451.

[7] Söderman L，Edlund M，Marions L. Prevalence and impact of dysmenorrhea in Swedish adolescents [J]. Acta Obstet Gynecol Scand，2019，98：215-221.

[8] Walters KA，Edwards MC，Tesic D，et al. The role of central androgen receptor actions in regulating the hypothalamic-pituitary-ovarian axis [J]. Neuroendocrinology，2018，106：389-400.

[9] 徐丁洁 . 妇科实寒症与虚寒症代谢组学及证候形成过程中相关网络调控的比较研究 [D]. 石家庄：河北医科大学，2012.

[10] Liu F，Xiong J，Huang GY，et al. Effects of acupuncture on the hypothalamus-pituitary-ovary axis in rats with dysmenorrhea [J]. World J Acumoxi，2008，18（3）：26-35.

[11] Alvin PE，Litt IF. Current status of the etiology and management of dysmenorrhea in adolescence [J]. Pediatrics，1982，70：516-525.

[12] Iacovides S，Avidon I，Baker FC. What we know about primary dysmenorrhea today：a critical review [J]. Hum Reprod Update，2015，21：762-778.

[13] Dawood MY. Primary dysmenorrhea：advances in pathogenesis and management [J]. Obstet Gynecol，2006，108：428-441.

[14] He Y，Lu Y，Shen Y，et al. Transgenic increase in the β-endorphin concentration in cerebrospinal fluid alleviates morphine-primed relapse behavior through the μ opioid receptor in rats [J]. J Med Virol，2019，91：1158-1167.

[15] 陈贵芹，董黎，冯燕，等 . 舒尔经胶囊对原发性痛经模型大鼠下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴功能的影响及机制研究 [J]. 医学理论与实践，2021，34（21）：3684-3688.

[16] 王瑞琼，王志旺，杜丽东，等 . 当归有效组分对原发性痛经模型小鼠下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴的调控作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2023，39（5）：708-712.

[17] 吴增光，胡鹏，范柏爽，等 . 少腹逐瘀汤对寒凝血瘀型原发性痛经大鼠活血作用研究 [J]. 天津中医药，2020，37（8）：929-935.

[18] 聂欣，成颜芬，王琳，等 . 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（4）：226-234.

[19] 李琼 . 桃红四物汤治疗痛经的临床价值 [J]. 中国处方药，2017，15（8）：97-98.

[20] 叶利萍，蔡建浩，蒋阿丹 . 加味桃红四物汤敷脐结合艾灸治疗运动员原发性痛经的临床研究 [J]. 中国运动医学杂志，2018，37（12）：1011-1016.

[21] 李成男 . 桃红四物汤配合毫火针治疗原发性痛经临床疗效观察 [J]. 中国处方药，2018，16（5）：96-97.

[22] 周伟彩，张玲非 . 桃红四物汤治疗女性月经不调临床疗效评价 [J]. 中外女性健康研究，2018（4）：33-38.

[23] 李白坤，朱继民，梁杰，等 . 桃红四物汤对产后血瘀证大鼠 Rho/ROCK 通路 RhoA、P-RhoA 及 PAI-1 蛋白表达的影响 [J]. 安徽中医药大学学报，2014，33（1）：60-63.

[24] 李白坤，梁杰，朱继民，等 . 桃红四物汤对产后血瘀证大鼠血清溶血磷脂酸的影响 [J]. 安徽中医学院学报，2013，32（1）：50-52.

[25] 张琪，李白坤，朱继民，等 . 桃红四物汤促进产后血瘀大鼠子宫修复的作用 [J]. 安徽中医药大学学报，2019，38（4）：72-75.

[26] 韩岚，梁杰，张艳艳，等 . 桃红四物汤对产后血瘀大鼠血清 NO、子宫组织 VEGF 的表达及对 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志，2016，31（5）：1625-1629.

[27] 刘冬，谭秦莉，李玉宝，等 . 桃红四物汤治疗原发性痛经实验研究 [J]. 安徽中医学院学报，2009，28（2）：46-48.

[28] Zhang YY，Wang JC，Zuo CJ，et al. Protective effect of Taohong Siwu decoction on abnormal uterine bleeding induced by incomplete medical abortion in rats during early pregnancy [J]. Chem Pharm Bull（Tokyo），2018，66：708-713.

[29] 王辰雯 . 桃红四物颗粒剂制备工艺优化及其质量控制的研究 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2013.

[30] 李珊珊 . 桃红四物颗粒的制备工艺、质量控制及初步药效学研究 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2015.

[31] 聊晓玉，方静，方媛，等 . 黄精对原发性痛经大鼠药效作用初步研究 [J]. 中南药学，2022，20（5）：1023-1027.

[32] 阳华 . 妇科千金片治疗原发性痛经的应用效果研究 [J]. 当代医学，2018，24（31）：40-42.

[33] 徐影 . 探讨 OTR、ER、PR 在子宫腺肌病组织中的表达与痛经关系的研究 [D]. 长春：吉林大学，2008.

[34] 尹蔚萍，李小丝，等 . 疏肝泻火方对雌性性早熟大鼠性腺、雌激素和下丘脑 GnRH、垂体 GnRH-R 表达的影响 [J]. 中药药理与临床，2018，34（3）：150-153.

[35] 宋卓敏，屈彩芹，张远，等 . 痛经宁颗粒对痛经大鼠子宫雌、孕激素受体的影响 [J]. 中华中医药杂志，2006，21（1）：35-38.

[36] Levin JH，Stanczyk FZ，Lobo RA，et al. Estradiol stimulates the secretion of prostacyclin and thromboxane from endometrial stromal cells in culture [J]. Fertil Steril，1992，58：530-536.

[37] 范郁山，苗芙蕊，廖爱妮，等 . 隔药灸“命门”穴对痛经模型大鼠血清雌激素、孕激素水平及其受体表达的影响 [J]. 针刺研究，2013，38（5）：352-357.

[38] Liu YJ，Huang GY，Yang MW，et al. Effects of Jiantaiye on estrogen receptor and mRNA expressions in uterus of mice with embryo implantation dysfunction [J]. Chin J Integr Med，2005，11：41-46.

[39] Lattuada D，Viganò P，Somigliana E，et al. Androgen recep-

tor gene cytosine，adenine，and guanine trinucleotide repeats in patients with endometriosis [J]. J Soc Gynecol Investig，2004，11：237-240.
[40] 李大剑，周军，刘春丽，等 . 自拟痛经宁对气滞血瘀型原发性痛经血清性激素、前列腺素及钙、镁的影响 [J]. 中医药临床杂志，2012，24（10）：949-952.
[41] 金若敏，陈兆善，陈长勋，等 . 益母草治疗痛经机制探索 [J]. 中国现代应用药学，2004，21（2）：90-93.
[42] Simmons CF，Clancy TE，Quan R，et al. The oxytocin receptor gene（OXTR）localizes to human chromosome 3p25 by fluorescence in situ hybridization and PCR analysis of somatic cell hybrids [J]. Genomics，1995，26：623-625.
[43] Akerlund M. Targeting the oxytocin receptor to relax the myometrium [J]. Expert Opin Ther Targets，2006，10：423-427.
[44] Tasende C，Meikle A，Rodríguez-PM，et al. Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anestrous ewes [J]. Theriogenology，2002，57：1719-1731.
[45] 夏良君，夏有兵 . 近 20 年针灸治疗卵巢早衰的临床研究及作用机制进展 [J]. 中国针灸，2018，38（5）：565-570.
[46] 李大剑，周军，刘春丽，等 . 自拟痛经宁对气滞血瘀型原发性痛经血清性激素、前列腺素及钙、镁的影响 [J]. 中医药临床杂志，2012，24（10）：949-952.

（收稿日期：2023-01-05；修回日期：2023-03-04）

基于 Zeta 电位表征血小板因子 4/ 依诺肝素钠复合物的方法学研究

赵婧雯[1]，欧阳艺兰[1]，钱玉兰[2]，刘志[3]，易琳[1*]，张真庆[1*]（1. 苏州大学药学院，江苏　苏州　215006；2. 苏州大学附属第一医院，江苏　苏州　215129；3.苏州二叶制药有限公司，江苏　苏州　215002）

摘要：目的　建立 Zeta 电位法研究血小板因子 4/ 依诺肝素钠（PF4/Eno）复合物表面电荷的方法，以比较和评价肝素类样品潜在的免疫原性。**方法**　考察不同孵育时间、不同 PF4/Eno 摩尔比例对 PF4/Eno 复合物表面电荷的影响，并对方法的精密度和专属性进行分析验证。**结果**　孵育时间在 10 ～ 30 min 时 PF4/Eno 复合物较为稳定；PF4/Eno 复合物的 $PHR_{\zeta=0}$ 值约为 12，PF4/Hp 复合物的 $PHR_{\zeta=0}$ 值约为 48，差异有统计学意义（$P < 0.001$），表明方法具有较好的专属性；日内精密度 *RSD* ＜ 8.0%，日间精密度 *RSD* 为 8.2%，表明方法精密度良好。**结论**　建立的方法可以用于比较和评价肝素类样品潜在的免疫原性，并为依诺肝素钠仿制药的免疫原性一致性评价提供理论和方法上的参考。

关键词：肝素诱导的血小板减少症；血小板因子 4；依诺肝素钠；Zeta 电位法
中图分类号：R917，R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2666-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.018

Development of a Zeta potential method to characterize platelet factor 4-enoxaparin complex

ZHAO Jing-wen[1], OU-YANG Yi-lan[1], QIAN Yu-lan[2], LIU Zhi[3], YI Lin[1*], ZHANG Zhen-qing[1*] (1. *College of Pharmaceutical Sciences*, *Soochow University*, *Suzhou Jiangsu* 215006; 2. *The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou Jiangsu* 215129; 3.*Suzhou Erye Pharmaceutical Co.*, *Ltd*，*Suzhou Jiangsu* 215002)

Abstract: Objective　To develop a Zeta potential method to characterize the surface charge of platelet factor 4/enoxaparin (PF4/Eno) sodium complex, and to compare and evaluate the potential immunogenicity of heparin samples. **Methods**　The effect of different incubation time and PF4/Eno

基金项目：江苏省研究生科研与实践创新计划项目（No.SJCX21_1357）。
作者简介：赵婧雯，女，硕士，主要从事肝素类药物的免疫原性研究，email：zhaojingwen2020@outlook.com　*通信作者：易琳，女，助理研究员，主要从事肝素类药物、天然多糖等糖类化合物的结构和活性研究，email：yilin@suda.edu.cn；张真庆，男，教授，主要从事糖药物研究，email：z_zhang@suda.edu.cn

molar ratios on the surface charge of PF4/Eno sodium complex was determined. The precision and specificity of the method were verified. **Results** The PF4/Eno was relatively stable within 10 ～ 30 min of incubation. The $PHR_{\zeta=0}$ of PF4/Eno complex was about 12, and the $PHR_{\zeta=0}$ of PF4/Hp complex was about 48, with a significant difference ($P < 0.001$), indicating good specificity of the method. The within-day precision *RSD* was less than 8.0%, and the inter-day precision *RSD* was 8.2%, demonstrating proper precision of the method. **Conclusion** This method can be used to compare and evaluate the potential immunogenicity of heparin samples, and provide a theoretical and a methodological reference for the consistent evaluation of immunogenicity of enoxaparin sodium generics.

Key words: heparin induced thrombocytopenia; platelet factor 4; enoxaparin sodium; Zeta potential method

肝素治疗中常伴有血小板减少症（heparin induced thrombocytopenia，HIT），HIT 分为两种：一种是无免疫机制参与的 HIT-Ⅰ型，症状轻微，病程呈自限性 [1]；另一种是 HIT-Ⅱ型，是一种免疫反应，常伴有血栓发生 [2]。临床上，HIT 通常是指 HIT-Ⅱ型。HIT 是肝素治疗过程中的严重并发症，据临床统计，肝素引发 HIT 的发生率约为 3%[3-5]，低分子量肝素（low molecular weight heparin，LMWHs）引发 HIT 的发生率约为 0.2%。虽然肝素类药物引起的 HIT 发生率并不高，但由 HIT 引发的血栓概率却达 30% ～ 70%，HIT 导致的截肢和死亡概率更是分别达 10% 和 20% ～ 30%[6-8]，这些严重威胁患者的健康与生存。

大量研究表明由肝素（heparin，Hp）、血小板因子 4（PF4）、它们的复合物（PF4/Hp）以及复合物的反应性抗体组成的超大复合物（ultra large complex，ULC）是诱发 HIT 的关键 [9-12]。血小板 α 颗粒释放的 PF4 与 Hp 有较强的结合能力，它们的复合物能够刺激免疫细胞释放 IgG 抗体，IgG 通过 Fab 片段与 PF4/Hp 复合物特异性结合，形成 PF4/Hp/IgG 三元复合物，即 HIT 抗体。HIT 抗体通过 IgG 上的 Fc 片段，与血小板上的 FcγRIIa 受体结合，进一步激发机体的免疫反应：一方面，激活的 Fc 片段介导巨噬细胞的吞噬作用，使 HIT 抗体连同血小板被巨噬细胞清除，引起血液中血小板减少；另一方面，激活血小板，使活化的血小板释放更多的凝血因子，并促使血小板聚集而形成动静脉血栓，这种伴有凝血级联反应的免疫原性反应，称为肝素引起的血小板因子减少综合征，即 HIT 综合征 [13-18]。

LMWHs 是由未分级肝素经酶解、化学降解等方式制备的产品，不同的生产工艺产生不同种类的 LMWHs，如目前临床应用最广泛的依诺肝素钠（enoxaparin sodium，Eno）是肝素苄酯化后再碱解制备而来 [19]。与 Hp 相比，LMWHs 具有出血不良反应小、生物利用度高、半衰期长、患者依从性好等优点 [8，20-21]，在临床上 LMWHs 正在逐渐替代 Hp，成为治疗深度血栓等疾病的主要产品。LMWHs 具有更低的分子量，其引起的 HIT 综合征发生率明显低于肝素，但鉴于 HIT 引发血栓、坏死等严重不良反应的风险，LMWHs 的免疫原性评估依然是业界关注的重点 [22]。

2016 年，美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）将 LMWHs 免疫原性研究列入仿制药生产指导原则，即 *Immunogenicity Related Considerations for Low Molecular Weight Heparin*[23]；同年欧洲医药管理局（European Medicines Agency，EMC）同样强调了 LMWHs 类免疫原性评估的必要性，并发表了相应的指导原则，即 *Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low molecular-weight-heparins*[24]；2020 年国家药监局药品审评中心进一步规范了国内 LMWHs 类仿制药一致性评价过程中的免疫原性评估要求 [25]。以上指导原则均将评估 PF4-LMWHs 复合物的表面电荷作为重要工作内容之一。带有强正电荷的蛋白 PF4 与带有强负电荷的 LMWHs 通过静电相互作用形成 PF4-LMWHs 复合物，复合物表面强正电荷或强负电荷使复合物在溶液中稳定分散，而当复合物表面电荷表现出减少或是呈中性状态时，复合物倾向于聚集 [26]，因此评估 LMWHs 对 PF4 的电中和能力，即不同摩尔比下 PF4 与 LMWHs 形成复合物的表面电荷高低，对反映 LMWHs 潜在的免疫原性至关重要。溶液中颗粒表面的电荷会引起附近粒子不同程度的聚集，这种聚集会在粒子表面产生一定的电势，该电势可以通过测量颗粒 - 液体界面处的电位差来反映，实际工作中以测定体系的 Zeta 电位值来反映 [27-28]，即 PF4 与 LMWHs 混合体系中，PF4-LMWHs 复合物总表面电荷可以通过测定体系的 Zeta 电位反映。

本文以 LMWHs 中应用最广泛的 Eno 为研究

对象，建立并验证 Zeta 电位法表征 PF4/Eno 复合物形成的情况，为 Eno 仿制药的质量评价以及提升提供一定的参考。

1　材料

Eno 对照品（欧洲药典标准品，批号：6.0）；Hp 对照品（欧洲药典对照品，批号：2.0）；Eno 原研药（商品名：克赛，北京赛诺菲制药有限公司，规格：0.6 mL/6000 AxaIU，批号：8S313、9S14PA、AS184A）；Eno 仿制药（规格：0.6 mL/6000 AxaIU，批号：Y9200701、Y9200702、Y9200703，苏州二叶制药有限公司）；重组人源 PF 4（批号：101543，纯度：98%，Sigma-Aldrich 公司）；PBS 缓冲液（包含 10 mmol • L^{-1} Na_2HPO_4，1.75 mmol • L^{-1} KH_2PO_4，137 mmol • L^{-1} NaCl，2.65 mmol • L^{-1} KCl；pH 7.4；批号：B540626，上海生工生物工程股份有限公司）；ELGA 超纯水机（型号：PURELAB Option-S7/15，电阻率≥ 18.2 MΩ • cm，英国埃尔格公司）；Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电位仪（英国 Malvern Panalytical 公司）。

2　方法

2.1　样品的制备

取 Eno 对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释成 10.00 mg • mL^{-1} 的储备液，用超纯水稀释摩尔浓度分别为 0.13、0.25、0.50、1.00 和 2.00 μmol • L^{-1} 的溶液。PF4 用 PBS 缓冲液配制成 128 μmol • L^{-1} 的储备液；储备液用超纯水稀释至 4.00 μmol • L^{-1}，现配现用。

2.2　方法的建立与验证

2.2.1　Zeta 电位测定　使用 Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电位仪，模型为 Smoluchowski 模型，设定温度为 25 ℃，平衡时间为 120 s，样品池类型为 DTS1070。取 1 mL 待测液，并以缓慢均匀的速度注入样品池，检查是否除去所有气泡，并用擦镜纸擦干溅在外部电极的液体，将样品池插入样品槽中检测。

2.2.2　孵育时间的考察　取 4.00 μmol • L^{-1} PF4 溶液与 0.25 μmol • L^{-1} 的 Eno 等体积混合均匀，室温条件下分别孵育 0、10、20、30、40、50、60 min 后按“2.2.1”项下方法进行检测，每个孵育时间点设置 3 个平行实验。

2.2.3　PF4/Eno 摩尔比的考察　取 4.00 μmol • L^{-1} PF4 溶液分别与不同浓度的 Eno 溶液等体积混合均匀，使混合体系中 PF4/Eno 的摩尔比分别 32∶1、16∶1、8∶1、4∶1、2∶1，室温条件下孵育 10 min 后按“2.2.1”项下方法进行检测，每个比例下设置 3 个平行实验。

2.2.4　方法专属性考察　取 Hp 对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释成 10.00 mg • mL^{-1} 储备液，用超纯水将该储备液分别稀释成 0.04、0.06、0.08、0.13 和 0.25 μmol•L^{-1} 的溶液。取现配的 4.00 μmol • L^{-1} PF4 溶液分别与上述不同浓度的 Hp 样品溶液等体积混合均匀，使 PF4/Hp 摩尔比分别为 96∶1、64∶1、48∶1、32∶1 和 16∶1，并于室温条件下孵育 10 min 后按“2.2.1”项下方法进行检测，每个比例设置 3 个平行实验。

2.2.5　方法精密度考察　取 PF4/Eno 的摩尔比为 16∶1，室温条件下孵育 10 min 后按“2.2.1”项下方法进行检测，储备液配制当日、次日以及第 5 日分别稀释 9 次后进行测定。

2.3　利用 Zeta 电位法比较不同批次 Eno 样品对 PF4 电荷中和能力

取 Eno 样品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释成 10.00 mg • mL^{-1} 的储备液，用超纯水分别稀释成 0.13、0.25、0.40、0.50 和 1.00 μmol • L^{-1} 的溶液。取现配的 4.00 μmol • L^{-1} PF4 溶液分别与上述不同浓度的 Eno 样品溶液等体积混合均匀，使 PF4/Eno 摩尔比分别为 32∶1、16∶1、10∶1、8∶1 和 4∶1，并于室温条件下孵育 10 min，按“2.2.1”项下进行检测，每个样品设置 3 个平行实验。

2.4　数据分析及统计分析

采用的数据分析软件为 Zetasizer software version 7.11（Malvern，Worcestershire，United Kingdom），统计评估软件为 Origin。将 PF4/Hp（PF4/Eno）样品复合物的 Zeta 数据与其摩尔比例（PHR）的对数进行 S 型（Logistic）方程拟合得到 Sigmoidal 回归曲线，根据 S 型方程计算复合物表面电荷为零时的摩尔比例（$PHR_{\zeta=0}$）。

3　结果

3.1　方法的建立与验证

3.1.1　孵育时间的考察　图 1 显示，混合体系的 Zeta 电位随孵育时间延长有先增大后变小的趋势。混合体系的 Zeta 电位在 10 ～ 30 min 内呈现增加的趋势且整体大于 15 mV，其颗粒静电排斥力较大，复合物粒子稳定性较好，而过长的孵育时间导致复合物 Zeta 电位下降，呈现不稳定现象。不稳定的原因可能是由于随着孵育时间的延长，PF4/Eno 复合物粒子之间的静电排斥力降低，以致混合体系的颗粒倾向于聚集，从而影响复合物悬浮颗粒在溶液中的电泳行为。

3.1.2　PF4/Eno 摩尔比的考察　当 PF4 与 Eno 以不同的摩尔比混合时，将 Zeta 电位（ζ）数据与 PHR 的对数进行 S 型方程拟合得到 Sigmoidal 回归曲线，见图 2，在一定的摩尔比范围内该曲线

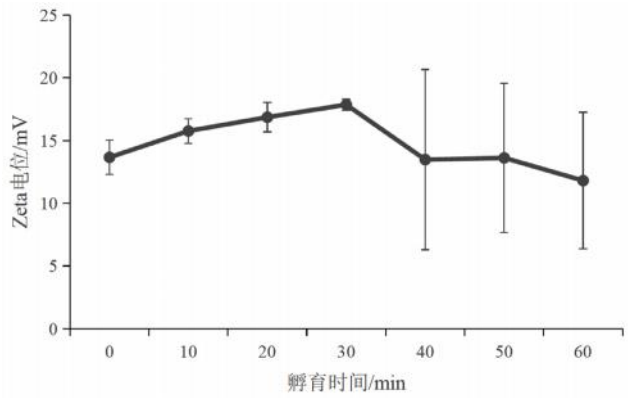


图 1　混合体系的 Zeta 电位随孵育时间变化图（$n = 3$）

Fig 1　Zeta potential of the mixed system changes with the incubation time（$n = 3$）

反映 Eno 对 PF4 的电荷中和情况。

该曲线显示随 PHR 增大混合体系的 Zeta 电位由负向正转变，Zeta 平均电位从－（51.67±0.65）mV 逐渐升高至（14.77±0.64）mV，经计算，$PHR_{\zeta=0}$ 为 12.14，即 PHR 大约在 12∶1 时，PF4/Eno 复合物颗粒表面净电荷趋近零，复合物呈中性状态。如果忽略体内外环境差异，在此摩尔比下 Eno 发生免疫原性的风险较高。该实验进一步说明 PF4/Eno 的摩尔比对于复合物的形成至关重要。

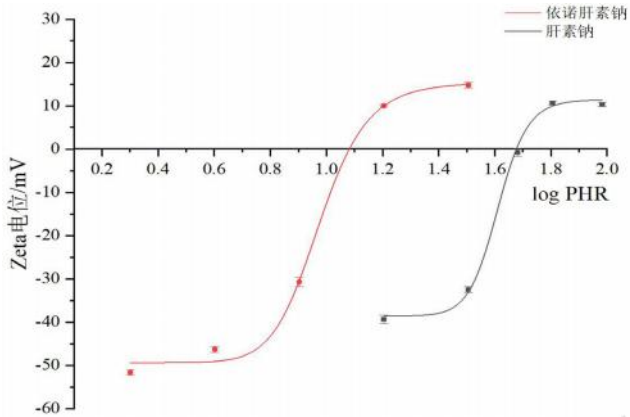


图 2　PF4 分别与肝素钠和依诺肝素钠样品混合体系的 Zeta 电位随 log PHR 变化图（$n = 3$）

Fig 2　Change of Zeta potential of PF4 mixed with heparin and enoxaparin samples with log PHR（$n = 3$）

3.1.3　方法专属性考察　基于上述 Zeta 电位法方法学的考察，进一步验证该方法测定未分级肝素对 PF4 的电荷中和能力，以便阐明该方法对不同肝素产品的专属性。结果见图 2，PF4 与 Hp 按不同比例混合，其混合体系的 Zeta 电位随 PF4/Hp 摩尔比变化趋势与 PF4/Eno 混合体系变化趋势基本一致，即随 log PHR 的增大 Zeta 电位由负电位向正电位转变。PF4/Hp 的混合体系电位随着 PHR 的变化从－（39.37±0.96）mV 逐渐升高至（10.31±0.44）mV。然而，Hp 的 Sigmoidal 回归曲线相对于 Eno 的曲线显著向右偏移，这表明仅需要较低浓度的 Hp 即可中和 PF4，使复合物呈中性状态，即在相同浓度下 Hp 较 Eno 具有更高的潜在免疫原性。PF4/Eno 复合物 $PHR_{\zeta=0}$ 值为（12.14±0.12），PF4/Hp 复合物的 $PHR_{\zeta=0}$ 值为（48.25±0.60），通过 t 检验分析，两组数据总体均数差异存在统计学意义（差值为 36.11，95%CI 34.80 ～ 37.43，$P < 0.001$）。该实验进一步证实了 Zeta 电位方法能有效地应用于不同肝素类药物对 PF4 的电荷中和能力的研究，以区分不同肝素类药物的潜在免疫原性。

3.1.4　方法精密度考察　精密度结果显示，PF4/Eno 的 Zeta 电位分布较稳定，具有较窄的分布范围，且重现性良好，当日和次日分别混匀测样，Zeta 电位平均值均在 19 mV 左右，日内精密度 RSD 值均小于 8.0%，日间精密度 RSD 为 8.2%，说明该方法稳定性良好。

3.2　不同批次 Eno 样品对 PF4 的电荷中和能力的比较

在 PF4/Eno 的比例探索过程中，发现 Zeta 电位在复合物 PHR 为 4∶1 ～ 16∶1 内变化较大，因此按“2.3”项下方法调整了 PF4/Eno 比例。如图 3 所示，原研、仿制药 Eno 各 3 批样品分别与 PF4 按不同比例混合，其混合体系的 Zeta 电位随 log PHR 变化趋势基本一致，Sigmoidal 回归曲线基本在同一位置，且与 Hp 的 Sigmoidal 回归曲线有显著性差异。经计算，PF4 和 3 批原研 Eno 复合物的 $PHR_{\zeta=0}$ 范围为 8.68 ～ 10.59，平均值为 9.61±0.84；3 批仿制药的 $PHR_{\zeta=0}$ 值范围为 8.96 ～ 9.30，通过单因素方差分析，原研药与仿制药差异无统计学意义，结果见表 1。由此数据可以推断该 3 批仿制药与 3 批原研药对 PF4 的电荷中和能力相当。

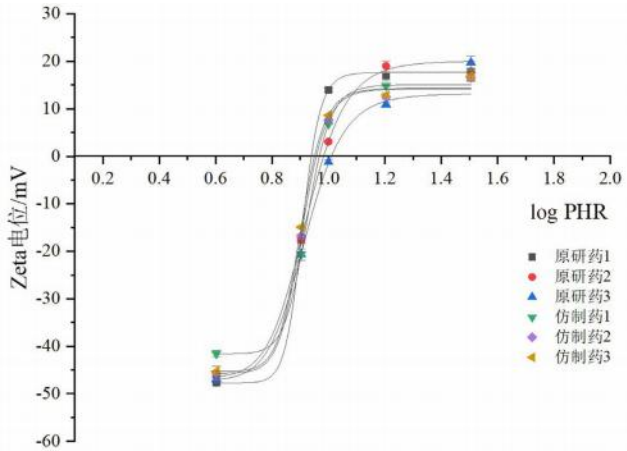


图 3　6 批依诺肝素钠样品复合物 Zeta 电位随 log PHR 变化的回归曲线（$n = 3$）

Fig 3　Sigmoidal curve of 6 batches of enoxaparin sodium samples complex Zeta potential changes with log PHR

表 1　依诺肝素钠样品的 $PHR_{\zeta=0}$ 比较

Tab 1　$PHR_{\zeta=0}$ of enoxaparin sodium samples

分组	$PHR_{\zeta=0}$	*F* 值	*P* 值
原研药	9.61±0.84	1.084	0.388
仿制药 1	9.30±0.02		
仿制药 2	9.08±0.01		
仿制药 3	8.96±0.02		

4　讨论

PF4 和 Eno 的相互作用受动态平衡的调节，其中 PF4 和 Eno 的孵育时间以及摩尔比是影响复合物形成的重要因素。本文首先建立了 Zeta 电位测定 PF4/Eno 复合物表面电荷的方法，考察了孵育时间以及摩尔比对复合物表面电荷的影响。结果表明，PF4 和 Eno 孵育时间不宜过长，否则影响复合物在溶液中的稳定分布。当 Eno 不足时，PF4/Eno 复合物表面呈正电荷模式，复合物稳定分散，随着 Eno 浓度的增加，PF4/Eno 复合物的表面正电荷不断被中和，当 PF4/Eno 的摩尔比在 8 ～ 12 内，复合物表面净电荷接近零，当 Eno 的浓度继续增加时，所形成的复合物表面净电荷变为负，相互排斥作用又占主导地位，导致较小粒子又稳定分散。所以该方法可以用复合物电位与 log PHR 的 Sigmoidal 回归曲线和 $PHR_{\zeta=0}$ 值来评价和表征 PF4/Eno 复合物的特性。

PF4 与 Hp 的相互作用规律与 Eno 类似，但是 Hp 对 PF4 的中和能力远大于 Eno，这反映了该方法能显著区分 Eno 与 Hp 的差异，有较强的专属性。在方法学建立和验证的过程中所有实验都是 3 个平行样，虽然精密度的 *RSD* 值比常规的 5% 要略大，但相对于大分子复合物，其 *RSD* 值是可被接受的。

总体而言，表征 PF4/Eno 复合物的表面电荷情况是比较样品之间免疫原性异同的重要指标之一。本文基于 Zeta 电位检测建立了评价 PF4/Eno 复合物表面电荷情况的方法，确认了两者的孵育时间，优化了两者摩尔比例范围，对比 Hp 明确了方法对 Eno 的专属性，从跨时间和多次重复检测的角度验证了方法的稳定性和精密度。最后在实际应用中可以确认该方法是一个有效和可靠的从分子水平分析、对比和评价 LMWHS 免疫原性的方法。

参考文献

[1] Franchini M. Heparin-induced thrombocytopenia：an update [J]. Thromb J，2005，3：14.

[2] Rice L. Heparin-induced thrombocytopenia-myths and misconceptions（that will cause trouble for you and your patient）[J]. Arch Intern Med，2004，164（18）：1961-1964.

[3] Schmitt BP，Adelman B. Heparin-associated thrombocytopenia-a critical-review and pooled analysis [J]. Am J Med Sci，1993，305（4）：208-215.

[4] Vermylen J，Van Geet C，Arnout J. Antibody-mediated thrombosis：relation to the antiphospholipid syndrome [J]. Lupus，1998，7：S63-S66.

[5] Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia：a ten-year retrospective [J]. Annu Rev Med，1999，50：129-147.

[6] Boshkov LK，Warkentin TE，Hayward CP，et al. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis-clinical and laboratory studies [J]. Br J Haematol，1993，84（2）：322-328.

[7] Warkentin TE，Kelton JG. Heparin-induced thrombocytopenia [J]. Annu Rev Med，1989，40：31-44.

[8] Warkentin TE，Levine MN，Hirsh J，et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin [J]. N Engl J Med，1995，332（20）：1330-1335.

[9] Chong BH，Fawaz I，Chesterman CN，et al. Heparin-induced thrombocytopenia-mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets [J]. Br J Haematol，1989，73（2）：235-240.

[10] Greinacher A，Gopinadhan M，Gunther JU，et al. Close approximation of two platelet factor 4 tetramers by charge neutralization forms the antigens recognized by HIT antibodies [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2006，26（10）：2386-2393.

[11] Rauova L，Poncz M，McKenzie SE，et al. Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia [J]. Blood，2003，102（11）：126A-127A.

[12] Zheng Y，Wang AW，Yu M，et al. B-cell tolerance regulates production of antibodies causing heparin-induced thrombocytopenia [J]. Blood，2014，123（6）：931-934.

[13] Greinacher A，Eichler P，Lubenow N，et al. Heparin-induced thrombocytopenia with thromboembolic complications：Meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic aPTT range [J]. Blood，2000，96（3）：846-851.

[14] Kasthuri RS，Glover SL，Jonas W，et al. PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI [J]. Blood，2012，119（22）：5285-5293.

[15] Khandelwal S，Lee GM，Hester CG，et al. The antigenic complex in HIT binds to B cells via complement and complement receptor 2（CD21）[J]. Blood，2016，128（14）：1789-1799.

[16] Pouplard C，Iochmann S，Renard B，et al. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia [J]. Blood，2001，97（10）：3300-3302.

[17] Reilly MP，Sinha U，André P，et al. PRT-060318，a novel Syk inhibitor，prevents heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis in a transgenic mouse model. Blood. 2011，117（7）：2241-2246.

[18] Warkentin TE，Hayward CP，Boshkov LK，et al. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate plate-

let-derived microparticles with procoagulant activity：an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia [J]. Blood，1994，84（11）：3691-3699.

[19] Xie SS，Guan YD，Zhu PP，et al. Preparation of low molecular weight heparins from bovine and ovine heparins using nitrous acid degradation [J]. Carbohydr Polym，2018，197：83-91.

[20] Chevalier J，Ducasse E，Dasnoy D，et al. Heparin-induced thrombocytopenia with acute aortic and renal thrombosis in a patient treated with low-molecular-weight heparin [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg，2005，29（2）：209-212.

[21] Liu YJ，Lu H，Xu HL，et al. Heparin-induced thrombocytopenia and acute colonic pseudo-obstruction after therapeutic anticoagulation in a very elderly patient with hip fracture：a case report [J]. BMC Musculoskelet Disord，2020，21（1）：85.

[22] Krauel K，Fuerll B，Warkentin TE，et al. Heparin-induced thrombocytopenia-therapeutic concentrations of danaparoid，unlike fondaparinux and direct thrombin inhibitors，inhibit formation of platelet factor 4-heparin complexes [J]. J Thromb Haemost，2008，6（12）：2160-2167.

[23] Lee S，Raw A，Yu L，et al. Scientific considerations in the review and approval of generic enoxaparin in the United States [J]. Nat Biotechnol，2013，31（3）：220-226.

[24] European Medicines Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low molecular-weight-heparins [EB/OL]. https：//www. ema. europa. eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing_en-0. pdf，2016-11-10.

[25] 国家药品监督管理局药品审评中心. 低分子量肝素类仿制药免疫原性基本技术要求（征求意见稿）[EB/OL]. https：//www. ccfdie. org/cn/yjxx/yphzp/webinfo/2020/09/1601217968092900. htm（2020-9-15）.

[26] Suvarna S，Espinasse B，Qi R，et al. Determinants of PF4/heparin immunogenicity [J]. Blood，2007，110（13）：4253-4260.

[27] Narkis N，Rebhun M. Stoichiometric relationship between humic and fulvic acids and flocculants [J]. J. Am Water Works Assn，1977，69（6）：325-328.

[28] Xia T，Kovochich M，Liong M，et al. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs [J]. ACS Nano，2009，3（10）：3273-3286.

（收稿日期：2023-01-05；修回日期：2023-03-20）

综述

金属药物在肿瘤免疫原性细胞死亡中的研究进展

王欣如，郝炳荣，孙丽新*，李欣*（中国药科大学江苏省药效研究与评价服务中心，南京　210009）

摘要：随着肿瘤治疗方法的不断发展，免疫疗法在临床实践中展现了良好的优势，已成为目前最有潜力的肿瘤治疗方法之一。其中，诱导肿瘤细胞发生免疫原性细胞死亡（ICD）是一种新型的免疫疗法，具有明显抑制肿瘤的治疗效果。近年来，有研究发现金属配合物除了发挥细胞毒性作用外，还具备诱导免疫原性细胞死亡的作用。本文综述了免疫原性细胞死亡的分子机制及 ICD 诱导剂的研究现状，并总结了诱导 ICD 的金属药物研究进展，讨论了可诱导 ICD 的金属药物所面临的挑战，以期为诱导 ICD 的金属药物的开发提供参考。

关键词：免疫原性细胞死亡；金属药物；诱导剂；免疫治疗
中图分类号：R392　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2672-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.019

Research progress in metal drugs for tumor immunogenic cell death

WANG Xin-ru, HAO Bing-rong, SUN Li-xin*, LI Xin* (*Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing* 210009)

Abstract: With the continuous development of tumor treatment methods, immunotherapy has shown advantages in clinical practice and has become a promising tumor treatment method at present. Among them, induction of immunogenic cell death (ICD) is a new immunotherapy, with a significant therapeutic effect on tumor suppression. In recent years, metal complexes have been found to be able to induce immunogenic cell death besides their cytotoxic effect. This paper reviewed the molecular mechanism of immunogenic cell death and current research status of ICD inducers. We summarized the progress in metal drugs for ICD induction and the challenges in metal drugs for ICD induction.
Key words: immunogenic cell death; metal drug; inducer; immunotherapy

恶性肿瘤已成为全球主要的致死性疾病之一，对人类的生命健康构成了严重的威胁，为全球经济带来了沉重的负担[1-2]。目前，恶性肿瘤的治疗手段以手术切除、化学疗法、放射疗法等常规方法为主，而这些方法具有副作用大、疗效差、易转移和复发率高等缺点，容易导致患者预后不良甚至死亡[3]。免疫疗法是一种新兴的治疗手段，弥补了传统治疗方法的不足[4]。其中，诱导肿瘤细胞发生免疫原性细胞死亡（immunogenic cell death，ICD）是免疫疗法的一种类型。该疗法表现为化疗在非特异性杀伤肿瘤细胞时可以通过多种机制增强肿瘤细胞的免疫原性，肿瘤细胞在发生死亡的同时，由非免疫原性转化为免疫原性而介导抗肿瘤免疫应答，激活免疫系统攻击肿瘤细胞，从而抑制肿瘤生长甚至根除肿瘤。

以往的观点认为金属药物主要通过非特异性细胞毒性作用杀死肿瘤细胞。然而，越来越多的证据表明，顺铂、奥沙利铂、三氧化二砷等经典金属化疗药物和新型金属配合物在发挥细胞毒性的同时，还可以诱导机体产生抗肿瘤免疫反

基金项目：江苏省自然科学基金项目（No.BK20170746）；中央高校基本科研业务费（No.2632021PY02）；中国药科大学“双一流”建设项目（No.CPU2018GY20）。
作者简介：王欣如，女，硕士研究生，主要从事肿瘤药理学方面的研究，email：wangxinru1027@126.com　*通信作者：李欣，女，助理研究员，主要从事金属抗肿瘤药物的设计与开发，email：lixin@cpu.edu.cn；孙丽新，女，副研究员，主要从事免疫药理学方面的研究，email：slxcpu@126.com

应[5-6]。金属药物诱导抗肿瘤免疫反应的作用涉及免疫效应器的直接激活或失活、肿瘤细胞的免疫识别以及诱导 ICD 等多个方面[7]。

本文就 ICD 的作用机制、分子标记及 ICD 诱导剂的研究现状进行综述，并在此基础上总结可诱导 ICD 的金属药物的研究进展，以期为开发诱导 ICD 的金属药物提供参考。

1　诱导肿瘤细胞发生 ICD 的分子机制

ICD 是一种调节性细胞死亡（regulated cell death，RCD），也是一种新型的肿瘤免疫治疗方法[8]。在放疗和部分类别化疗药物的作用下，垂死的肿瘤细胞可产生大量的活性氧（reactive oxygen species，ROS），产生的 ROS 通过激活特定的信号通路或直接作用于内质网，引发内质网应激。在内质网应激的驱动下，许多 ICD 相关的损伤相关分子模式（damage associated molecular patterns，DAMPs）[如钙网蛋白（calreticulin，CRT）、高迁移率族蛋白 1（high mobility group protein 1，HMGB1）、腺苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP）等] 被运输或分泌到细胞外，这些 DAMPs 会促进树突状细胞（dentritic cell，DC）的成熟活化，成熟的树突状细胞通过活化 $\gamma\delta$ T 细胞使其产生白细胞介素 -17（IL-17），增加细胞毒性 T 细胞（cytotoxic T lymphocytes，CTLs）对肿瘤组织的杀伤，或者直接将抗原呈递给 CTLs[9]，CTLs 被招募到肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）后，在肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、干扰素 -γ（interferon-γ，IFN-γ）等各种促炎细胞因子的作用下杀伤残留的肿瘤细胞[10]（见图 1）。

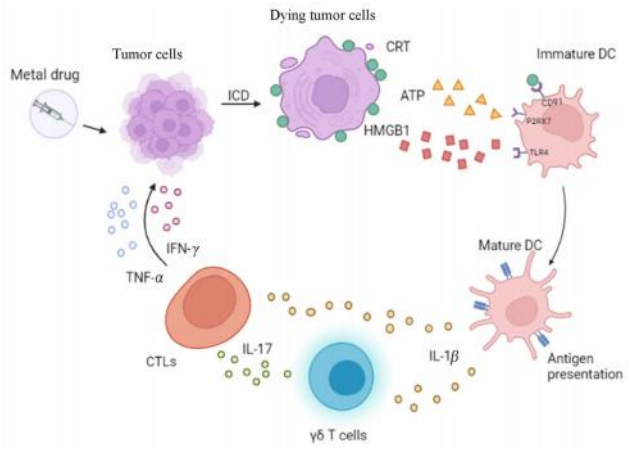


图 1　ICD 死亡机制的示意图

Fig 1　Scheme of mechanism of ICD

当肿瘤细胞发生 ICD 时，释放的 DAMPs 除了 CRT、HMGB1 和 ATP 之外，还包括热休克蛋白（heat shock protein，HSP）、Ⅰ型干扰素（type 1 IFN）和膜联蛋白 A1（annexin A1，ANXA1）等。下文将综述这些与 ICD 相关的 DAMPs 激活免疫系统的作用机制。

1.1　CRT 在 ICD 中的作用机制

CRT 是一种 46 kDa 的 Ca^{2+}结合蛋白，是内质网腔中最丰富的蛋白质之一，具有分子伴侣活性和调节 Ca^{2+}稳态的功能[11]。在 ICD 发生早期，诱导剂激活蛋白激酶 R 样内质网激酶（protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase，PERK），导致真核起始因子 2α（eukaryotic initiation factor 2 alpha，eIF2α）被磷酸化，进而募集转录激活因子 4（activating transcription factor 4，ATF4），最终使内质网发生应激反应[12]。在应激作用下，CRT 通过胞吐的形式转运到细胞膜外，内质网蛋白 57（endoplasmic reticulum protein 57，ERp57）重新定位，一旦 CRT 与 ERp57 复合物暴露在细胞表面，就会发出“Eat me”信号，诱导肿瘤抗原呈递并刺激机体发生特异性免疫反应，杀伤细胞[13]。

1.2　HMGB1 在 ICD 中的作用机制

HMGB1 是一种染色质结合蛋白。在 ICD 发生后期，由于细胞膜透化，HMGB1 被释放到细胞外，可与抗原呈递细胞上的模式识别受体结合[14]。HMGB1 与 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）结合后会活化髓样分化因子（myeloid differentiation primary response gene 88，MyD88），抑制吞噬体和溶酶体的融合，从而加速树突状细胞的成熟和对抗原成分的吞噬[15-16]。

1.3　ATP 在 ICD 中的作用机制

ICD 发生过程中分泌 ATP 需要自噬的调控，这意味着自噬缺陷的肿瘤细胞将无法引发相关的免疫反应[17]。ATP 被分泌后，作为“Find me”信号与嘌呤受体 P2Y2 相互作用，将未成熟的树突状细胞、巨噬细胞和中性粒细胞吸引到垂死肿瘤细胞部位[18]。此外，ATP 还可介导核苷酸与嘌呤受体 P2X7 的相互作用，引起 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）炎症小体的激活，从而使促炎细胞因子分泌增加[19]。

1.4　HSPs 在 ICD 中的作用机制

HSP70 和 HSP90 在垂死肿瘤细胞膜上的表达具有免疫刺激特性[20]。在发生 ICD 时，HSP70 转移到细胞膜上，与共刺激分子 CD40 相互作用从而促进包括 CTLs 在内的 $CD8^{+}$ T 细胞的活

化[21]；HSP90 与树突状细胞上的 CD91 相互作用从而促进肿瘤抗原向 CTLs 的交叉呈递。这些过程促进了机体免疫系统的激活，对治愈肿瘤具有重要意义。

1.5　Type 1 IFN 在 ICD 中的作用机制

Type 1 IFN 是启动免疫应答、激活效应 T 细胞和自然杀伤细胞的关键细胞因子，具有抗病毒和免疫调节作用[22-23]。当肿瘤细胞发生 ICD 时，胞质核酸分泌到胞外，内源性 RNA 激活 Toll 样受体 3（Toll-like receptor 3，TLR3）产生 Type 1 IFN，导致 CXC-趋化因子配体 10（CXC chemokine ligand-10，CXCL10）释放，从而发挥免疫刺激作用[24]。同时，胞质 DNA 的积累会通过激活 cGAS-STING 通路诱导树突状细胞分泌 Type 1 IFN，进而增强 $CD8^+$ T 细胞和自然杀伤细胞（NK 细胞）的杀伤作用，并提高记忆 T 细胞的活力[25-26]。

1.6　ANXA1 在 ICD 中的作用机制

ANXA1 在中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞等多种细胞中存在[27]。ANXA1 与磷脂结合并影响类花生酸的产生[28]，对炎症的调节和消退具有重要作用。在 ICD 发生过程中，垂死肿瘤细胞释放 ANXA1，激活抗原呈递细胞并促使其向肿瘤细胞迁移，促进免疫细胞对肿瘤细胞的吞噬[29]。

2　ICD 诱导剂研究现状

自首次发现阿霉素具有 ICD 诱导能力之后，多种临床药物也被发现可以诱导 ICD，这些药物被统称为 ICD 诱导剂。在体外检测肿瘤细胞经药物处理后 ICD 相关 DAMPs 只能确定药物是否具有诱导 ICD 的潜力，因此还需进行小鼠疫苗接种实验来进一步评价其是否为 ICD 诱导剂。小鼠疫苗接种实验模型（见图 2）于 2005 年由 Casares 等[30]首次提出，在体外用受试化合物诱导小鼠肿瘤细胞死亡，然后将处理过的垂死肿瘤细胞接种到具有免疫活性的同源小鼠的一侧，一周后，将相同类型的未处理的肿瘤细胞接种到小鼠的另一侧。接种后，监测无瘤小鼠的比例，能够显著减少肿瘤发生的化合物即可被认为是 ICD 诱导剂。这是由于被 ICD 诱导剂处理过的垂死肿瘤细胞可作为“无毒抗原”，注射时激活小鼠免疫系统，当表达相同抗原的肿瘤细胞再次被接种后，免疫系统原有的记忆再次激活，产生强烈的免疫应答来阻止肿瘤细胞的生长，发挥“肿瘤疫苗”的作用。因此，诱导肿瘤细胞发生 ICD 具有提高肿瘤治疗效果和改善患者预后的潜力。

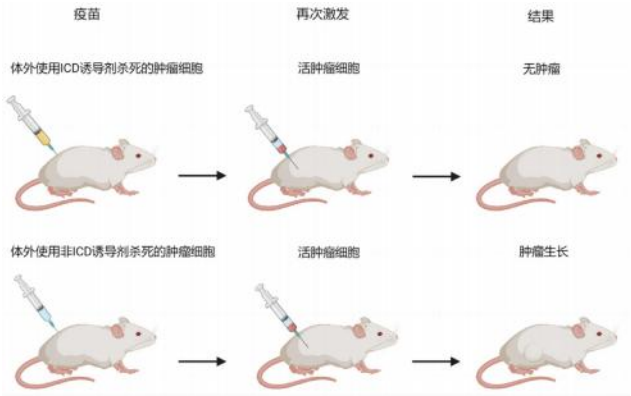


图 2　ICD 的实验性定义

Fig 2　Experimental definition of ICD

除了小鼠疫苗接种实验之外，涉及 ICD 发生过程的多种相关指标也用于 ICD 诱导剂的评估标准，包括各种 DAMPs 的水平、T 细胞的数量、T 细胞的免疫表型（如确定 CTLs 的表型）、相关细胞因子的水平（如 IFN-γ、TNF-α），通过检测这些指标可提示 ICD 诱导剂作用的可能位点[31]。

研究发现 ICD 诱导剂主要作用于各种细胞器，例如内质网、溶酶体、线粒体和细胞核[32]。内质网应激被认为是触发 ICD 的关键事件。Vanmeerbeek 等[33]发现大多数 ICD 诱导剂具有诱导内质网应激的能力。因此，根据 ICD 诱导剂诱发肿瘤细胞内质网应激机制的差异对其进行分类。ICD 诱导剂被分为Ⅰ型、Ⅱ型两种类型（见表 1），其中Ⅰ型是 ICD 诱导剂的主要类型[34]。Ⅰ型诱导剂作用于肿瘤细胞后，通过靶向细胞溶质蛋白、影响 DNA 复制、干扰质膜和线粒体膜通道等间接介导内质网应激，导致细胞发生氧化应激从而诱导 ICD[35]。Ⅱ型诱导剂与Ⅰ型的不同之处在于它直接选择性地作用于内质网，改变其稳态使内质网应激从而诱导 ICD。与Ⅰ型诱导剂相比，Ⅱ型诱导剂可增加 DAMPs 的分泌，具有更强的 ICD 诱导能力，在抗肿瘤免疫方面更有优势[36]。

已知的临床 ICD 药物大都属于Ⅰ型诱导剂，这些 ICD 诱导剂可能依赖于特定的肿瘤类型，即一种肿瘤的 ICD 诱导剂可能对另一种肿瘤无效，因此现有的药物无法满足临床需求[37]。通过表型筛选，已经发现了一些具有 ICD 诱导能力的天然产物，如辣椒素、紫草素、白藜芦醇等[38]。

与此同时，除了奥沙利铂，多种直接作用于内质网的金属配合物也被发现可以诱导 ICD，提示金属配合物除了具有细胞毒性作用之外，还可以通过诱导 ICD 发挥抗肿瘤作用，这可以提升金属配合物的临床使用价值，也为 ICD 诱导剂的开

表 1　常见的Ⅰ型和Ⅱ型 ICD 诱导剂

Tab 1　Commonly used type Ⅰ and type Ⅱ ICD

分类	ICD 诱导剂	抗肿瘤分子机制	ICD 诱导机制
Ⅰ型	细胞毒性药物（奥沙利铂、蒽环类药物等）	细胞核（DNA 或 DNA 相关蛋白）	CRT 外翻，ERp57、HMGB1 和 ATP 的释放
	环磷酰胺（CTX）	细胞核（DNA）	CRT 外翻，HMGB1 的释放
	硼替佐米	胞质溶胶（26S 蛋白酶体）	HSP90 暴露
	强心苷	靶向 Na^+/K^+泵，抑制 DNA 拓扑异构酶	CRT 外翻，ATP 和 HMGB1 的释放
	紫草素	胞质溶胶（丙酮酸激酶 -M2 蛋白）	CRT 外翻，HSP70 暴露
	紫外线（UV）	DNA 损伤	CRT 外翻，HSP70 暴露和 HMGB1 释放
Ⅱ型	金丝桃素光动力疗法	内质网相关的 ROS 产生	CRT 外翻，HSP70、HSP90 暴露，HMGB1 和 ATP 释放
	Pt-*N*- 杂环卡宾（Pt-NHC）	内质网相关的 ROS 产生	CRT 外翻，ATP 和 HMGB1 的释放
	柯萨奇病毒 B3	内质网应激和内质网中病毒蛋白的积累	CRT 外翻，ATP 和 HMGB1 的释放

发提供了一个丰富的资源库。

3　金属配合物在诱导 ICD 中的作用

与有机化合物相比，金属配合物具有结构多样性、配体交换、氧化还原特性和催化特性等性质[39]，因此能够实现独特的作用机制。越来越多的金属配合物被证明具有诱导 ICD 的能力，下面将系统概述金属配合物作为 ICD 诱导剂的研究进展。

3.1　铂类药物在诱导 ICD 中的作用

顺铂、卡铂和奥沙利铂等铂类配合物用于全世界超过 50% 癌症患者的治疗[40]，是应用最广泛的抗肿瘤药物之一，对多种癌症具有公认的疗效。长期以来，人们普遍认为铂类药物的抗肿瘤机制是通过损伤 DNA 从而引起肿瘤细胞死亡[41]。然而，最近发现此类药物还可以通过诱导肿瘤细胞发生 ICD，进而增强免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用，实现更优的抗肿瘤效果。

3.1.1　经典铂类药物　在诱导 ICD 方面，不同的铂类药物之间表现出很大差异。Tesniere 等[42]发现奥沙利铂可以在结肠癌细胞中引发 ICD 介导免疫反应，顺铂则不能，其原因可能是奥沙利铂会引起结肠癌细胞强烈的内质网应激反应。另一项研究评估了一线抗肿瘤药物卡铂的免疫原性作用，结果显示，与奥沙利铂、顺铂不同，卡铂在多种非小细胞肺癌细胞系中可以引发 CRT 易位，但在非小细胞肺癌细胞系 A549 中却不能引发 CRT 易位，且不能促使 ATP 和 HMGB1 释放[43]。这提示了经典铂类药物的 ICD 诱导能力可能具有一定的肿瘤细胞选择性，但目前的研究仍较少。

3.1.2　新型 Pt（Ⅱ）配合物　除了经典的铂类药物，一些通过结构修饰开发出的 Pt（Ⅱ）配合物，也表现出了很强的 ICD 诱导效应。Wong 等[44]报道了除 FDA 批准的铂类药物外第一个可引起 ICD 的金属配合物 Pt-NHC。后续研究发现，Pt-NHC 诱导 ICD 是通过直接触发内质网应激产生 ROS 介导的，属于Ⅱ型 ICD 诱导剂[45]。对 Pt-NHC 结构进行修饰得到 Platin-ER[46]，发现其是通过促进小鼠结肠癌细胞 CT26 中 HSP90 的释放从而诱导肿瘤细胞发生 ICD。Huang 等[47]报道了一种含有氨基磷酸盐配体的新型铂（Ⅱ）配合物 Pt-1，Pt-1 可以诱导人膀胱癌细胞发生 ICD，同时还可促进树突状细胞成熟以及 IFN-γ、TNF-α 分泌增加。Yamazaki 等[48]报道了一种含焦磷酸盐配体的铂（Ⅱ）配合物 PT-112，它可与免疫检查点阻断（immune checkpoint blockade，ICB）疗法协同作用诱导更强的免疫反应。PT-112 与 PD-L1 阻断剂联用还可促进 CTLs 浸润，这种 ICD 和 ICB 协同作用的新方法，有望在结直肠癌的治疗中产生更好的疗效。这些新型的 Pt（Ⅱ）药物，都是在发挥原有的化疗作用的同时，引发了 ICD 反应，提示其具有化疗与免疫治疗相结合的能力，该类药物具有良好的开发前景。

3.1.3　新型 Pt（Ⅳ）药物　相较于 Pt（Ⅱ）配合物，新型 Pt（Ⅳ）药物具有配体交换惰性的特点，且易进行功能化修饰，同时新颖的结构和多样化的活性机制使其拥有了更多优异的性质。Sabbatini 等[49]报道了一种以组蛋白脱乙酰酶抑制剂为配体的 Pt（Ⅳ）配合物，可促进结肠癌细胞的免疫调节作用，诱导强大的 ICD 反应。Groer 等[50]将 Pt（Ⅳ）- 生育酚与透明质酸纳米载体络合，开发了一种 ICD 诱导剂 HA-Pt（Ⅳ），在口腔鳞状细胞癌细胞中可促进 CRT 外翻，在小鼠疫苗接种实验的免疫健全小鼠中观察到良好的肿瘤抑制效果。Sun 等[51]设计合成了辣椒素衍生物修饰的铂（Ⅳ）化合物，该化合物不仅会导致 DNA 损伤，还可引发人胰腺癌细胞 PANC-1 细胞 CRT 的易位，并伴随 ATP 和 HMGB1 的释放，

对人胰腺癌细胞表现出有效的 ICD 诱导作用。目前 Pt（Ⅳ）配合物诱导 ICD 的构效关系尚未明确，推测轴向上接入的配体的化学结构和生理功能可能是 Pt（Ⅳ）配合物诱导 ICD 的关键因素。因此，进一步探寻其构效关系将有助于新型可诱发 ICD 的 Pt（Ⅳ）配合物的设计开发。

合理设计的光笼铂配合物，可以用光实时控制并激活，有助于避免“脱靶”效应并可以引发 ICD 介导的抗肿瘤反应。基于这些潜在的益处，Deng 等 [52] 报道了一种基于奥沙利铂的光笼 Pt（Ⅳ）前药，它可实现有效地核仁积累以及“按需”激活。在光激活后，可诱导顺铂耐药肺癌细胞发生 ICD，以独特的作用方式逆转耐药，这为设计可控激活和靶向核仁的 Pt（Ⅳ）前药提供了一种新方向。Novohradsky 等 [53] 报道了一种可被光活化的 Pt（Ⅳ）配合物，在被可见光激活后具有强细胞毒性，能产生 Pt（Ⅱ）并释放叠氮基和羟基自由基，同时通过引发自噬促进释放 DAMPs 从而诱导 ICD。这种独特的免疫调节特性使光笼铂配合物有别于其他铂类药物，可能会显著增强抗肿瘤功效，同时也证实自噬在促进垂死细胞释放 ATP，增加免疫原性方面发挥重要作用。

3.2　铱配合物在诱导 ICD 中的作用

铱（Ⅲ）配合物由于具有强大的抗肿瘤活性而被关注并进行研究。近年来，有文献报道铱（Ⅲ）配合物具有诱导 ICD 的作用。

Wang 等 [54] 研究设计了一个含有环磷酰胺类似物的 Ir（Ⅲ）配合物，其在 A549 细胞中选择性定位于内质网并引起 CRT 外翻、促进 HMGB1 和 ATP 释放。但在人乳腺癌细胞（MDA-MB-231）中 ICD 诱导效率低下，说明该铱配合物诱导 ICD 依赖于特定的肿瘤类型，但具体机制尚不清楚。Vigueras 等 [55] 报道了一种光活化的 Ir（Ⅲ）配合物，其作用于人黑色素瘤细胞 A375 后选择性定位于线粒体和内质网并引发 ICD，提示该 Ir（Ⅲ）光敏剂作为 ICD 诱导剂开发具有良好的前景。Wang 等 [56] 最新报道了一种可高效诱导 ICD 的光敏剂 Ir（Ⅲ）复合物 Ir-pbt-Bpa，在光照射下产生单线态氧和超氧阴离子自由基，通过同时诱导铁死亡和 ICD 的方式杀伤黑色素瘤细胞，从而实现长期的抗肿瘤作用。综上，这些 Ir（Ⅲ）配合物具有复合功能，在直接作用于肿瘤细胞时，还可通过 ICD 抑制肿瘤，综合发挥药效，为后续铱配合物的开发提供了参考。

3.3　钌配合物在诱导 ICD 中的作用

由于钌（Ru）配合物不仅可以与 DNA 结合，还具有较强的蛋白结合能力，因此基于钌的金属配合物很早就开展了抗肿瘤活性研究。目前，已有四种钌基配合物作为抗肿瘤药物进入临床研究 [57]。然而，直到近些年，钌配合物作为 ICD 诱导剂的潜力才开始得到关注。

Wernitznig 等 [58] 对一种已进入临床研究的钌基药物 KP1339 进行了 ICD 诱导能力研究。通过人结肠癌细胞 HCT116 细胞球体模型研究发现，KP1339 可以介导结肠癌细胞产生 CRT 易位以及其他 ICD 相关的标志物。他们还设计了一种 Ru（Ⅱ）芳烃配合物 plecstatin-1[59]，在人结肠癌细胞中可以使 ROS 增加，刺激 CRT 暴露，介导伴侣蛋白 HSP70 和 HSP90 的表达增加，从而诱导 ICD。许多基于钌的金属配合物是高效的光敏剂，Konda 等 [60] 设计了两种具有双重抑制模式的 Ru-PDT 复合物 ML19B01 和 ML19B02 可以在黑色素瘤细胞中通过光动力疗法（photodynamic therapy，PDT）诱导 ICD，并激活炎症通路，使肿瘤生长延迟、肿瘤负荷减少，提示了钌类药物有望通过联合 PDT 提高抗肿瘤效果，甚至防止肿瘤复发。

3.4　金配合物在诱导 ICD 中的作用

金配合物作为潜在的抗肿瘤剂越来越受到关注。金配合物主要是通过抑制硫氧还蛋白还原酶（thioredoxin reductase，TrxR）活性发挥细胞毒性作用。直到最近，有研究发现金配合物可刺激免疫系统发生免疫反应，诱导肿瘤细胞发生 ICD [61]。

Sen 等 [62] 报道了一种含萘醌结构的化合物 Au（Ⅰ）-NHC，它可通过升高 ROS 的水平和减少 ROS 的失活来诱导肿瘤细胞死亡，其中大多是通过诱导 ICD 导致的肿瘤细胞死亡。Mule 等 [63] 研究了一种具有强效抗肿瘤效果的新型 Au（Ⅰ）配合物 BQ-AurIPr，能够有效促进 DAMPs 的产生，显著增加肿瘤细胞的免疫原性，与 FDA 批准的诱导 ICD 的药物阿霉素和奥沙利铂相比，具有更高的 ICD 诱导效率。金诺芬（auranofin，AF）是一种金配合物，1985 年被批准用于风湿性关节炎的治疗。AF 是一种 TrxR 抑制剂，Van 等 [64] 报道了一种将 AF 和低温常压等离子体联合处理的策略，联合治疗后发现，胶质母细胞瘤细胞中 TrxR 活性降低、ROS 水平升高，ICD 相关的 DAMPs 分泌显著增加，提示 AF 具备 ICD 诱导能力。综上，这些金配合物都表现出了强大的 ICD 诱导能力，大多通过升高细胞内 ROS 的水平介导内质网应激来触发 ICD。

3.5　铜配合物在诱导 ICD 中的作用

铜（Cu）是一种内源性金属，当其与适当的配体形成铜配合物时，可用于提高细胞内的 ROS 水平。这为设计铜配合物的 ICD 诱导剂提供了思路。Kaur 等[65]研究了一种靶向内质网并产生 ROS 的铜配合物，该配合物在乳腺癌干细胞中可以诱导 ICD，从而有效抑制乳腺癌干细胞的增殖。Wang 等[66]报道了一种可有效诱导 ICD 的铜基纳米级配合物 Cu-NCPs，其在与放射治疗联用时显示出协同作用，结合 PD-L1 阻断疗法可增强免疫反应，提示 Cu-NCPs 作为 ICD 诱导剂在肿瘤治疗中具有应用前景。

除了以上几类常见的具有抗肿瘤活性的金属配合物可诱导 ICD 外，最近一些含其他金属（如砷[67]、铁[68]、锇[69]等）的配合物也被证实具有诱导 ICD 的能力，其诱导机制包括介导 ROS 产生、内质网应激等，说明金属药物诱导肿瘤细胞发生 ICD 的研究受到了更多的关注，这有助于提高金属药物 ICD 诱导剂的研究水平和后续的开发研究。

4　总结与展望

现有的研究表明从垂死肿瘤细胞中释放的 DAMPs 可以激活特定抗肿瘤免疫反应的能力，诱导 ICD 从而发挥抗肿瘤作用。诱导 ICD 是一种新型肿瘤免疫疗法，具有良好的临床应用前景。

在确认 ICD 的研究中，还有很多需要继续解决的问题，如导致某种细胞死亡方式具有免疫原性的因素尚不清楚，对影响垂死肿瘤细胞免疫原性的因素也了解不多。目前的 ICD 研究主要是在肿瘤细胞和肿瘤疫苗接种模型（小鼠疫苗接种实验）中进行的，但小鼠疫苗接种实验具有明显的限制性且只有少量同基因肿瘤模型；更重要的是，由于不同物种间的不相容性，也无法评估人类肿瘤细胞在小鼠体内的免疫作用，因此构建合适的体内筛选与验证模型变得尤为重要，如开发原位和基因工程小鼠模型以测试 ICD。

了解肿瘤治疗药物诱导释放 DAMPs 和激活机体免疫系统的分子途径和分子机制可评估其将细胞死亡的非免疫原性诱导剂转化为 ICD 诱导剂的潜力，也可为改进肿瘤疫苗接种策略提供理论参考。相比于其他类型的 ICD 诱导剂，金属 ICD 诱导剂的开发具有作用强的特点，但仍然存在一些亟待解决的问题。金属药物诱导 ICD 的能力目前还不能根据其化学结构或性质来预测，因此确定金属药物与诱导 ICD 之间的构效关系是目前亟待解决的问题。确定合适的剂量和给药时间以实现最优的免疫治疗效果是金属 ICD 诱导剂临床研究的重要挑战。

总之，诱导 ICD 的金属药物是抗肿瘤药物研究的一个快速发展的领域，已经显示出良好的应用前景。随着研究的深入和研究水平的提高，具有 ICD 作用的金属药物将获得更多的关注和研究，并为临床肿瘤的免疫治疗提供新的治疗药物。

参考文献

[1] Siegel RL，Miller KD，Wagle NS，et al. Cancer statistics，2023 [J]. CA Cancer J Clin，2023，73（1）：17-48.

[2] Cao MM，Li H，Sun DQ，et al. Cancer burden of major cancers in China：a need for sustainable actions [J]. Cancer Commun（Lond），2020，40（5）：205-210.

[3] Stone JB，DeAngelis LM. Cancer-treatment-induced neurotoxicity——focus on newer treatments [J]. Nat Rev Clin Oncol，2016，13（2）：92-105.

[4] Hamilton PT，Anholt BR，Nelson BH. Tumour immunotherapy：lessons from predator-prey theory [J]. Nat Rev Immunol，2022，22（12）：765-775.

[5] Englinger B，Pirker C，Heffeter P，et al. Metal drugs and the anticancer immune response [J]. Chem Rev，2019，119（2）：1519-1624.

[6] Terenzi A，Pirker C，Keppler BK，et al. Anticancer metal drugs and immunogenic cell death [J]. J Inorg Biochem，2016，165：71-79.

[7] Sen S，Karoscik K，Maier E，et al. Immunogenic cell death-inducing metal complexes：from the benchtop to the clinic [J]. Curr Opin Chem Biol，2023，73：102277.

[8] Galluzzi L，Kepp O，Hett E，et al. Immunogenic cell death in cancer：concept and therapeutic implications [J]. J Transl Med，2023，21（1）：162.

[9] Xie DQ，Wang QF，Wu GZ. Research progress in inducing immunogenic cell death of tumor cells [J]. Front Immunol，2022，13：1017400.

[10] Zhu SX，Wang YM，Tang J，et al. Radiotherapy induced immunogenic cell death by remodeling tumor immune microenvironment [J]. Front Immunol，2022，13：1074477.

[11] Zhang ML，Xiao J，Liu JR，et al. Calreticulin as a marker and therapeutic target for cancer [J]. Clin Exp Med，2023，23（5）：1393-1404.

[12] Rufo N，Yang YH，De Vleeschouwer S，et al. The “Yin and Yang” of unfolded protein response in cancer and immunogenic cell death [J]. Cells，2022，11（18）：2899.

[13] Song DY，Liu H，Wu J，et al. Insights into the role of ERp57 in cancer [J]. J Cancer，2021，12（8）：2456-2464.

[14] Zhou JY，Wang GY，Chen YZ，et al. Immunogenic cell death in cancer therapy：present and emerging inducers [J]. J Cell Mol Med，2019，23（8）：4854-4865.

[15] Aria H，Rezaei M. Immunogenic cell death inducer peptides：a new approach for cancer therapy，current status

and future perspectives [J]. Biomed Pharmacother，2023，161：114503.

[16] Dong HN，Zhang L，Liu SL. Targeting HMGB1：an available therapeutic strategy for breast cancer therapy [J]. Int J Biol Sci，2022，18（8）：3421-3434.

[17] Kepp O，Bezu L，Yamazaki T，et al. ATP and cancer immunosurveillance [J]. EMBO J，2021，40（13）：e108130.

[18] Elliott MR，Chekeni FB，Trampont PC，et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance [J]. Nature，2009，461（7261）：282-286.

[19] Bao XH，Xie LY. Targeting purinergic pathway to enhance radiotherapy-induced immunogenic cancer cell death [J]. J Exp Clin Cancer Res，2022，41（1）：222.

[20] Galluzzi L，Buque A，Kepp O，et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease [J]. Nat Rev Immunol，2017，17（2）：97-111.

[21] Ashrafizadeh M，Farhood B，Eleojo Musa A，et al. Damage-associated molecular patterns in tumor radiotherapy [J]. Int Immunopharmacol，2020，86：106761.

[22] Serrano-Del Valle A，Naval J，Anel A，et al. Novel forms of immunomodulation for cancer therapy [J]. Trends Cancer，2020，6（6）：518-532.

[23] Minute L，Teijeira A，Sanchez-Paulete AR，et al. Cellular cytotoxicity is a form of immunogenic cell death [J]. J Immunother Cancer，2020，8（1）：e000325.

[24] Sistigu A，Yamazaki T，Vacchelli E，et al. Cancer cell-autonomous contribution of type Ⅰ interferon signaling to the efficacy of chemotherapy [J]. Nat Med，2014，20（11）：1301-1309.

[25] Woo SR，Fuertes MB，Corrales L，et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors [J]. Immunity，2014，41（5）：830-842.

[26] Diamond JM，Vanpouille-Box C，Spada S，et al. Exosomes shuttle TREX1-sensitive IFN-stimulatory dsDNA from irradiated cancer cells to DCs [J]. Cancer Immunol Res，2018，6（8）：910-920.

[27] Gavins FN，Hickey MJ. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity [J]. Front Immunol，2012，3：354.

[28] Bruschi M，Petretto A，Vaglio A，et al. Annexin A1 and autoimmunity：from basic science to clinical applications [J]. Int J Mol Sci，2018，19（5）：1348.

[29] Kroemer G，Galassi C，Zitvogel L，et al. Immunogenic cell stress and death [J]. Nat Immunol，2022，23（4）：487-500.

[30] Casares N，Pequignot MO，Tesniere A，et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death [J]. J Exp Med，2005，202（12）：1691-1701.

[31] Garg AD，More S，Rufo N，et al. Trial watch：immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics [J]. Oncoimmunology，2017，6（12）：e1386829.

[32] Zhang LP，Montesdeoca N，Karges J，et al. Immunogenic cell death inducing metal complexes for cancer therapy [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2023，62（21）：e202300662.

[33] Vanmeerbeek I，Sprooten J，De Ruysscher D，et al. Trial watch：chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology [J]. Oncoimmunology，2020，9（1）：1703449.

[34] Fabian KP，Kowalczyk JT，Reynolds ST，et al. Dying of stress：chemotherapy，radiotherapy，and small-molecule inhibitors in immunogenic cell death and immunogenic modulation [J]. Cells，2022，11（23）：3826.

[35] Iulianna T，Kuldeep N，Eric F. The Achilles' heel of cancer：targeting tumors via lysosome-induced immunogenic cell death [J]. Cell Death Dis，2022，13（5）：509.

[36] Krysko DV，Garg AD，Kaczmarek A，et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer，2012，12（12）：860-875.

[37] Xiong XL，Wang Y，Zou TT. Towards understanding the molecular mechanisms of immunogenic cell death [J]. Chem Bio Chem，2023，24（6）：e202200621.

[38] Dong ST，Guo XN，Han F，et al. Emerging role of natural products in cancer immunotherapy [J]. Acta Pharm Sin B，2022，12（3）：1163-1185.

[39] Karges J，Stokes RW，Cohen SM. Metal complexes for therapeutic applications [J]. Trends Chem，2021，3（7）：523-534.

[40] Armstrong-Gordon E，Gnjidic D，McLachlan AJ，et al. Patterns of platinum drug use in an acute care setting：a retrospective study [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2018，144（8）：1561-1568.

[41] Wang D，Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs [J]. Nat Rev Drug Discov，2005，4（4）：307-320.

[42] Tesniere A，Schlemmer F，Boige V，et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin [J]. Oncogene，2010，29（4）：482-491.

[43] Flieswasser T，Van Loenhout J，Freire BL，et al. Clinically relevant chemotherapeutics have the ability to induce immunogenic cell death in non-small cell lung cancer [J]. Cells，2020，9（6）：1474.

[44] Wong DY，Ong WW，Ang WH. Induction of immunogenic cell death by chemotherapeutic platinum complexes [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2015，54（22）：6483-6487.

[45] Bian ML，Fan R，Yang ZB，et al. Pt（Ⅱ）-NHC complex induces ROS-ERS-related DAMP balance to harness immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. J Med Chem，2022，65（3）：1848-1866.

[46] Tham MJR，Babak MV，Ang WH. PlatinER：a highly potent anticancer platinum（Ⅱ）complex that induces endoplasmic reticulum stress driven immunogenic cell death [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2020，59（43）：

19070-19078.

[47] Huang KB，Wang FY，Feng HW，et al. An aminophosphonate ester ligand-containing platinum（Ⅱ）complex induces potent immunogenic cell death in vitro and elicits effective anti-tumour immune responses in vivo [J]. Chem Commun（Camb），2019，55（87）：13066-13069.

[48] Yamazaki T，Buqué A，Ames TD，et al. PT-112 induces immunogenic cell death and synergizes with immune checkpoint blockers in mouse tumor models [J]. Oncoimmunology，2020，9（1）：1721810.

[49] Sabbatini M，Zanellato I，Ravera M，et al. Pt（Ⅳ）bifunctional prodrug containing 2-（2-Propynyl）octanoato axial ligand：induction of immunogenic cell death on colon cancer [J]. J Med Chem，2019，62（7）：3395-3406.

[50] Groer C，Zhang T，Lu RL，et al. Intratumoral cancer chemotherapy with a carrier-based immunogenic cell-death eliciting platinum（Ⅳ）agent [J]. Mol Pharm，2020，17（11）：4334-4345.

[51] Sun YW，Yin EM，Tan YH，et al. Immunogenicity and cytotoxicity of a platinum（Ⅳ）complex derived from capsaicin [J]. Dalton T，2021，50（10）：3516-3522.

[52] Deng ZQ，Wang N，Liu YY，et al. A photocaged，water-oxidizing，and nucleolus-targeted Pt（Ⅳ）complex with a distinct anticancer mechanism [J]. J Am Chem Soc，2020，142（17）：7803-7812.

[53] Novohradsky V，Pracharova J，Kasparkova J，et al. Induction of immunogenic cell death in cancer cells by a photoactivated platinum（Ⅳ）prodrug [J]. Inorg Chem Front，2020，7：4150-4159.

[54] Wang LL，Guan RL，Xie LN，et al. An ER-targeting iridium（Ⅲ）complex that induces immunogenic cell death in non-small-cell lung cancer [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2021，60（9）：4657-4665.

[55] Vigueras G，Markova L，Novohradsky V，et al. A photoactivated Ir（Ⅲ）complex targets cancer stem cells and induces secretion of damage-associated molecular patterns in melanoma cells characteristic of immunogenic cell death [J]. Inorg Chem Front，2021，8（21）：4696-4711.

[56] Wang LL，Karges J，Wei FM，et al. A mitochondria-localized iridium（Ⅲ）photosensitizer for two-photon photodynamic immunotherapy against melanoma [J]. Chem Sci，2023，14（6）：1461-1471.

[57] Kenny RG，Marmion CJ. Toward multi-targeted platinum and ruthenium drugs-a new paradigm in cancer drug treatment regimens? [J]. Chem Rev，2019，119（2）：1058-1137.

[58] Wernitznig D，Kiakos K，Del Favero G，et al. First-in-class ruthenium anticancer drug（KP1339/IT-139）induces an immunogenic cell death signature in colorectal spheroids in vitro [J]. Metallomics，2019，11（6）：1044-1048.

[59] Wernitznig D，Meier-Menches SM，Cseh K，et al. Plecstatin-1 induces an immunogenic cell death signature in colorectal tumour spheroids [J]. Metallomics，2020，12（12）：2121-2133.

[60] Konda P，Roque IJA，Lifshits LM，et al. Photodynamic therapy of melanoma with new，structurally similar，NIR-absorbing ruthenium（Ⅱ）complexes promotes tumor growth control via distinct hallmarks of immunogenic cell death [J]. Am J Cancer Res，2022，12（1）：210-228.

[61] Yue S，Luo M，Liu HG，et al. Recent advances of gold compounds in anticancer immunity [J]. Front Chem，2020，8：543.

[62] Sen S，Hufnagel S，Maier EY，et al. Rationally designed redox-active Au（Ⅰ）N-heterocyclic carbene：an immunogenic cell death inducer [J]. J Am Chem Soc，2020，142（49）：20536-20541.

[63] Mule RD，Kumar A，Sancheti SP，et al. BQ-AurIPr：a redox-active anticancer Au（i）complex that induces immunogenic cell death [J]. Chem Sci，2022，13（36）：10779-10785.

[64] van Loenhout J，Freire BL，Quatannens D，et al. Auranofin and cold atmospheric plasma synergize to trigger distinct cell death mechanisms and immunogenic responses in glioblastoma [J]. Cells，2021，10（11）：1597.

[65] Kaur P，Johnson A，Northcote-Smith J，et al. Immunogenic cell death of breast cancer stem cells induced by an endoplasmic reticulum-targeting copper（Ⅱ）complex [J]. Chembiochem，2020，21（24）：3618-3624.

[66] Wang YX，Ding YW，Yao D，et al. Copper-based nanoscale coordination polymers augmented tumor radioimmunotherapy for immunogenic cell death induction and T-cell infiltration [J]. Small，2021，17（8）：e2006231.

[67] Kepp O，Pan H，Liu P，et al. Arsenic trioxide as an inducer of immunogenic cell death [J]. Oncoimmunology，2023，12（1）：2174723.

[68] Kaneko M，Yamaguchi A，Ito A. Induction of immunogenic cell death in murine colon cancer cells by ferrocene-containing redox phospholipid polymers [J]. Cancer Sci，2022，113（10）：3558-3565.

[69] Lu N，Deng ZH，Gao J，et al. An osmium-peroxo complex for photoactive therapy of hypoxic tumors [J]. Nat Commun，2022，13（1）：2245.

（收稿日期：2023-03-09；修回日期：2023-05-23）

植物来源大环二萜类化合物的研究进展

付嘉[1]，刘楠[2*]，颜晓晖[1*]（1. 天津中医药大学中医药研究院 组分中药国家重点实验室，天津　301617；2. 天津中医药大学中药学院，天津　301617）

摘要：大环二萜类化合物是一类具有独特的骨架结构和生理活性的天然产物，植物是这类化合物的主要来源之一。大环二萜结构的复杂性使其具有独特且优异的生物活性，如抗肿瘤、抗炎、抗人类免疫缺陷病毒等，目前已有部分大环二萜类化合物被开发成药品应用于临床。随着植物药材的长期开发，大环二萜的生物合成途径也逐渐受到人们的关注。本文从结构类型、生物活性和生物合成等方面详细介绍了植物源大环二萜类化合物，阐述了一些代表性大环二萜的结构和活性，并总结了目前已被报道的大环二萜的生物合成途径的研究，以期为今后植物中大环二萜的开发应用提供更多的见解。

关键词：大环二萜；化学结构；生物活性；生物合成途径
中图分类号：R284.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2680-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.020

Advances in the studies on plant macrocyclic diterpenoids

FU Jia[1], LIU Nan[2*], YAN Xiao-hui[1*] (1. *State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin* 301617; 2. *School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin* 301617)

Abstract: Macrocyclic diterpenoids are natural products with unique skeletal structures and physiological activities. Plants are the main sources of these compounds. The complexity of macrocyclic diterpene structure confers them with unique and excellent biological activities, such as anti-cancer, anti-inflammatory, anti-HIV virus effect etc. Some macrocyclic diterpenes have been developed into drugs. With the exploitation of phytomedicinal herbs, the biosynthetic pathways of macrocyclic diterpenes are attracting much attention. This paper reviewed plant-derived macrocyclic diterpenoids in terms of structure type, biological activity, and biosynthesis. We summarized the structures and activities of some representative macrocyclic diterpenes and their biosynthetic pathways to facilitate future research and development of plant macrocyclic diterpenes.

Key words: macrocyclic diterpenoid; chemical structure; biological activity; biosynthetic pathway

大环二萜是指由 4 个异戊二烯基单位构成分子骨架，且结构中存在六元环以上环状结构的二萜类化合物。该类化合物结构新颖复杂，且一般具有多种功能团，具有独特的生物活性和药理作用，如细胞毒性、抗肿瘤、抗病毒和抗炎活性等。该类化合物在植物、海洋生物中分布广泛，在植物中主要存在于大戟属和瑞香科植物中，少部分大环二萜也存在于橄榄科和金松科植物中。如从大戟属植物甘遂或千金子中提取的化合物巨大戟醇具有显著的抗肿瘤、抗病毒活性[1]，其衍生物巨大戟醇甲基丁烯酸酯于 2012 年被 FDA 批准用于日光性角化病的治疗[2]。Prostratin 是从新西兰特有的小型灌木中分离出来的一种大环二萜类化合物，它可以抑制 HIV-1 的感染，并减少 HIV-1 的潜伏期[3]。

获取大环二萜的方式通常有 3 种，分别为植物提取、化学合成和生物合成。植物提取的工艺较复杂，一般收率较低，且对环境的破坏较为严重；由于大环二萜结构的复杂性，所以化学合成

基金项目：国家重点研发计划“合成生物学”重点专项（No. 2020YFA0907900）。
作者简介：付嘉，女，硕士研究生，主要从事天然产物的合成生物学研究，email：fujiajiajiajia@163.com　*通信作者：颜晓晖，男，研究员，博士研究生导师，主要从事天然产物的合成生物学研究，email：yanxh@tjutcm.edu.cn；刘楠，女，助理实验师，主要从事天然产物的合成生物学研究，email：liunanLNn@163.com

较难实现；生物合成主要是利用合成生物学，构建微生物细胞工厂来合成天然产物，这种方法生产周期短，且收率稳定，符合绿色可持续的生产理念。但这种生产方式需要掌握化合物完整的生物合成途径，对其中关键酶基因了解透彻。

目前对于大环二萜类的相关研究并不多，尤其是在化学结构和生物合成方面，本篇综述以介绍大环二萜的骨架类型为基础，总结了近年来研究报道的大环二萜类化合物的生物活性及其生物合成途径中的关键酶基因和通路解析进展，以期为今后大环二萜类化合物在特定结构、生理活性及合成生物学等方面的研究提供参考。

1　大环二萜的骨架类型

大环二萜的骨架类型较为丰富，常见的主要包括紫杉烷型（taxane）、西松烷型（cembrane）、巴豆烷型（tigliane）、瑞香烷型（daphnane）、巨大戟烷型（ingenane）、假白榄烷型（jatrophane）、续随子烷型（lathyrane）和卡司烷型（casbane）等（见图 1）。

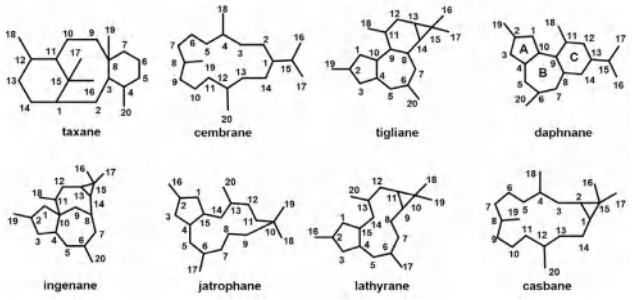


图 1　植物中大环二萜的骨架类型

Fig 1　Skeleton types of macrocyclic diterpenes in plants

1.1　紫杉烷型二萜（taxane）

紫杉烷型二萜主要由一个紫杉烷环及 C4、C5 所连四元环氧丙烷组成，在 C13 处另有庞大的酯侧链相连，该酯链为紫杉烷类化合物的主要活性部分。该类化合物被分为 4 个亚家族，即 taxanes，secotaxanes，abeotaxanes 和 cyclotaxanes，这 4 种亚家族由 11 种（Ⅰ～Ⅺ）不同的骨架组成 [4]。紫杉烷型二萜主要来源于红豆杉科红豆杉属植物，紫杉醇（taxol，见图 2）是当前最受关注的明星抗肿瘤产品，对各种临床型恶性肿瘤具有广泛的药理学活性。2008 年，美国 Phyton Biotech 公司通过培养红豆杉的树皮细胞完成紫杉醇的生物合成，年产量可超过 100 kg。2021 年 Hu 等 [5] 通过 21 步完成了紫杉醇的合成，合成效率为 0.118%，是目前最短的全合成路线。

紫杉醇的副作用较强，水溶性不好，所以近年来关于其结构修饰的研究较多。Bouchet 等 [6] 将紫杉醇的苯甲酰苯基和乙酰基分别改造为烷氧基和羟基得到多西他赛（docetaxel，见图 2），由于其空间位阻小且极性基团亲水性强，所以其与微管蛋白的亲和力是紫杉醇的两倍。

1.2　西松烷型二萜（cembrane）

西松烷二萜是由 4 个异戊二烯单元首尾相连形成的大环二萜，是一类母体骨架具有十四元环和 3 个对称分布的甲基及一个异丙基的天然产物，包括异丙基型，五元、六元、七元、八元内酯环型，开环型，降碳型等几种结构类型。从结构上看西松烷型二萜是多种大环二萜的前体化合物，在生源上具有重要意义。这类化合物主要分布在烟草和海洋生物，在植物中较少存在。化合物（－）-1*S*-15-hydroxy-18-carboxycembrene（见图 2）是从大戟科植物大戟中提取到的第一个西松烷型二萜，体外细胞毒实验表明，该化合物对乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、大肠癌、皮肤癌等 5 种肿瘤细胞有一定的抑制作用 [7]。从胡杨中发现的 populusin A（见图 2）是一个具有独特二氧三环 [6.6.1.12，5] 十六烷支架的西松烷型二萜化合物 [8]。

1.3　巴豆烷型二萜（tigliane）

在植物体内巴豆烷型二萜是瑞香烷型和巨大戟烷型二萜生物合成途径的中间体，结构中含有一个 5/7/6/3 的四环体系，其中 A/B 环大多为反式稠合，B/C 环为反式稠合，C/D 环为顺式稠合，且结构中具有多个取代基。该家族大多数成员都表现出重要的生物活性，如抗肿瘤、抗病毒等 [9]。

佛波醇（见图 2）是一种重要的巴豆烷型二萜化合物，该化合物的结构中含有 5 个羟基。其 C-12 位、13 位或 20 位的羟基被不同官能团取代时可以得到数百种佛波醇酯类化合物 [10]。佛波醇衍生物中最具代表性的化合物是佛波酯（PMA）（见图 2），该化合物目前正处于治疗急性髓系白血病（AML）的Ⅱ期临床试验中。PMA 和维生素 D_3 通过诱导髓系转录因子的表达，可以促进 AML 细胞晚期分化 [11]。佛波醇作为这些活性化合物的共同中间体，引起了研究者的广泛关注。有研究者通过 14 步反应，合成了佛波醇的类似物 ingenol（见图 2），在此基础上又继续进行 19 步反应，成功合成了佛波醇 [12]，Wender 教授 [13] 以佛波醇为原料，通过 5 步反应合成 prostrain（见图 2），总收率为 15% 左右。

1.4　瑞香烷型二萜（daphnane）

瑞香烷型二萜在大戟科和瑞香科植物中都存在，其结构与巴豆烷型二萜结构相似，有复杂的 5/7/6 三环骨架，这类天然产物的发掘提供了多种具有活性的先导药物。瑞香烷型二萜化合物在抗 HIV、抗肿瘤、抗白血病等方面均显示出了生物活性。化合

物结构会对其生物活性产生一定的影响，当 A 环的 C-1 和 C-2 位的双键被还原为单键，化合物的活性会降低，但如果被羰基取代将提高其活性；当 B 环的双键被变成环氧基或苯甲酰基时，均可以使化合物的活性增强；若 C 环上有原酸酯基团、苯甲酰基或苯乙酰基也可以显著增强化合物的细胞毒性。

Resiniferatoxin（RTX，见图 2）是从大戟类树胶植物的乳汁中分离出来的刺激性香草酸类分子。研究发现 RTX 是一种强效 TRPV1 通道激动剂，可用于治疗慢性疾病 [14]，除此之外，RTX 也可治疗尿失禁 [15]。Vasilev 等 [16] 通过立体选择性的 Aldol 缩合、Sml2 介导的自由基环化 /HAT 串联以及环氧化物离子化串联等 15 步反应完成了 RTX 的全合成。

Gnidimacrin（见图 2）是一种从 *Gnidia subcordata* 中分离得到的一种脂溶性的瑞香烷型二萜类化合物 [17]。研究发现 gnidimacrin 及其衍生物对抗 HIV 病毒具有良好的活性，通过评估它们的活性以及构效关系发现，C-5 和 C-20 上的羟基是该类化合物保持活性必须的，用芳香族酯修饰 C-3 位羟基也可以保持该类化合物的活性，且结构中含有的酯键可以使这类化合物的半衰期延长 [18]。

1.5　巨大戟烷型二萜（ingenane）

巨大戟烷型二萜是巴豆烷型二萜重排形成的，结构中含有 5/7/7/3 四环系，其中 C-8 和 C-10 通过酮桥相连，A/B 环和 C/D 环均为顺式，多数巨大戟烷型二萜结构在 C-6 和 C-7 间还存在一个双键，这类化合物主要存在于大戟科大戟属等植物中。巨大戟烷型二萜酯是该类化合物中数目较多的一类，它们具有结构不稳定、亲脂性的特点，大多数具有强刺激性，同时也是肿瘤促进剂 [19]。

这类化合物中比较有代表性的是巨大戟醇甲基丁烯酸酯（见图 2），它是从澳大利亚植物 *Euphorbia peplus* 的汁液中提取的活性成分，且巨大戟醇甲基丁烯酸酯凝胶已于 2012 年 1 月 25 日获美国 FDA 批准，用于光化性角化病的局部治疗。Ingenol 是从大戟属植物中分离出的一种高含氧的巨大戟烷型二萜，Winkler 等 [20] 首次报道了 ingenol 的全合成方法，合成路线共 45 步，每步反应的平均收率在 80% 左右。Baran 团队 [21] 从天然的（＋）-carene 出发，通过 7 步反应完成了 ingenol 的骨架的组装，又通过 7 步反应构建碳氧键和立体中心最终完成了 ingenol 的全合成。

1.6　假白榄烷型二萜（jatrophane）

假白榄烷型二萜是一类具有 5/12 碳环骨架的大环二萜化合物，双键的位置、氧化修饰和酰基取代等对化合物的结构有一定的影响，且该类化合物的 12 元柔性碳环非常容易发生重排或环化转变为其他骨架结构。

1970 年，有学者从棉叶珊瑚中分离出第一个假白榄烷型二萜 jatrophone（见图 2），该化合物可以通过抑制肿瘤细胞增殖发挥抗肿瘤作用 [22]。Zhou 等 [23] 从泽漆中分离到了 17 个新的假白榄烷型二萜，分别命名为 heliojatrone D 和 helioscopids A ～ P（见图 2），通过 HR-ESI-MS、NMR 和 X-ray 等方法确定了上述化合物的化学结构，其中化合物 helioscopid D 还含有稀有双环 [8.3.0] 十三烷骨架。

1.7　续随子烷型二萜（lathyrane）

续随子烷型二萜是一类含有 5/11/3 三环系碳骨架的天然化合物，结构中存在环丙烷并与 11 元环呈顺式稠合。天然存在的续随子烷型二萜结构中通常被各种酰基取代，其中最常见的是乙酰基、苯甲酰基和苯乙酰基，如 C-16 位被苯甲酰基取代后得到了化合物 latilagascene D（见图 2）；C-16 位被乙酰基取代得到化合物 latilagascene A（见图 2）[24]。大戟因子是从续随子中分离得到的一类结构独特新颖的化合物，其中大戟因子 L1（见图 2）可以诱导细胞自噬，具有抗肿瘤、抗脂肪生成等多种生物活性。Wang 等 [25] 发现大戟因子 L3（见图 2）可以很好地抑制脂多糖（LPS）诱导的 RAW264.7 巨噬细胞产生 NO，而且细胞毒性很低。

1.8　卡司烷型二萜（casbane）

卡司烷型二萜具有十四元碳环骨架，在生源上续随子烷型、假白榄烷型、巨大戟烷型和瑞香烷型等多种大环二萜都被认为是卡司烷型二萜进一步环化衍生而形成的 [26]。天然存在的卡司烷型二萜数量很少，目前仅有 100 多个结构被分离鉴定出来，这些化合物主要集中在大戟属植物中。

Wang 等 [27] 从大戟的根中提取到的 6 个大环二萜类化合物，其中包括一种新卡司烷二萜类化合物，通过 HR-ESI-MS、IR 和 NMR 确定该化合物的结构，发现该化合物含有 6 个不饱和键，将该化合物命名为 pekinenin G（见图 2）。通过比较该化合物与其他几种卡司烷二萜类化合物对人类肿瘤细胞的细胞毒性发现，结构中含有环氧基团会降低化合物的生物活性；而 C-5 位被羟基或羰基取代会增加化合物的活性。

本文对近年来在植物中发现的大环二萜类化合物的结构、来源、生物活性以及作用机制进行了总结，详见表 1 及图 2。

2　大环二萜的生物活性

大环二萜类化合物因其结构的复杂多样性而具有丰富的生物学活性，该类化合物在治疗癌症、炎症和 HIV 等方面都有广泛应用，且目前已有相

表 1　植物中代表性大环二萜类化合物归纳总结

Tab 1　Summary of representative macrocyclic diterpenoids in plants

类型	生物活性	化合物名称	植物来源	作用机制
紫杉烷型	降糖作用	taxumarienes A 和 F	南方红豆杉	抑制肠黏膜上的 α- 葡萄糖苷酶，使淀粉分解为葡萄糖的速度减缓，减少和延缓小肠对葡萄糖的吸收，以降低血糖 [28]
西松烷型	抗肿瘤活性	deheiculatins M ～ O	泡腺血桐	对人癌细胞系 CNE1、CNE2 和 HCT 116 有细胞毒性 [29]
	抗炎活性	boscartins AO 和 AP	卡氏乳香胶树脂	抑制一氧化氮（NO）产生 [30-31]
	神经保护作用	boscartins AR 和 AU	卡氏乳香树	对谷氨酸诱导的原代培养胎鼠皮质神经元产生的毒性有保护作用 [32]
	肝脏保护活性	boscartins P、U、V、W、X、Y、AA 和 AB	乳香胶树脂	对 D- 半乳糖胺诱导的 HL-7702 细胞损伤具有一定的肝脏保护活性 [33]
	降低胰岛素水平	jatrophainolides A ～ C	南洋樱花	对人类蛋白酪氨酸磷酸酶 1B（PTP1B）的潜在抑制作用 [34]
	促进细胞增殖分化	populusone	胡杨	促进脐带间质干细胞的增殖，并分化为角质细胞样细胞 [35]
巴豆烷型	抗肿瘤活性	crotonol A	巴豆	裂解 PARP、积累 Bax 以及降解 Bcl-2 促进 K562 细胞的凋亡 [36]
	抗炎活性	euphkanoids A、C、F	甘肃大戟	对 RAW264.7 细胞中 LPS 诱导的 NO 产生有抑制作用 [37]
	抗 HIV 活性	chamaedaphnelide B	河朔荛花	通过激活 STAT1 活性逆转 HIV 潜伏期 [38]
瑞香烷型	抗肿瘤活性	daphgenkin A	芫花	诱导 G_0/G_1 细胞周期停滞，增加 Bax/Bcl-2，激活裂解的 caspase-3 和 caspase-9，抑制 SW620 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号传导 [39]
	抗 HIV 活性	yuanhuacine A	*Gnidia sericocephala*	抑制 HIV 复制 [40]
		wikstroechuins A ～ C	河朔荛花	抗 HIV-1 逆转录酶（RT）[41]
	抗病毒活性	codiapeltines A 和 B	*Codiaeum peltatum*	抑制病毒复制 [42]
	神经保护作用	euphorwallsides B、C、E 和 G	*Euphorbia wallichii*	调节 PC-12 细胞的 Nrf2 信号通路，抑制活性氧（ROS）的积累并恢复线粒体膜电位 [43]
巨大戟烷型	抗肿瘤活性	euphorkanlide A	甘肃大戟	诱导产生 ROS，导致耐药癌细胞系 HCT-15/5-FU 的细胞周期停止和细胞凋亡 [44]
	降脂活性	euphorstranoids A 和 B	高山大戟	在早期阶段延缓细胞的脂肪生成抑制 3T3-L1 脂肪细胞的三酰甘油（TG）水平 [45]
假白榄烷型	抗肿瘤活性	euphoresulane H	乳浆大戟	对依赖 P- 糖蛋白（P-gp）的癌细胞系 HepG2/ADR 的多药耐药性（MDR）逆转活性 [46]
		jatrogossone A	棉叶珊瑚花	在线粒体中诱导 ROS，并诱导线粒体自噬；在 G_2/M 阶段引起细胞停滞，通过活化半胱天冬酶和切割 PARP-1 来促进体外细胞死亡 [47]
	多药耐药调节剂	euphosorophanes H 和 I	对叶大戟	抑制 ABCB1 药物外流功能 [48]
	抗骨质疏松活性	euphoesulatin A	乳浆大戟	下调 NFATc1 和 NF-κB 以及 MAPKs 信号途径的激活 [49]
	降脂活性	euphylonoid B	湖北大戟	通过激活 AMP- 激活蛋白激酶信号，促进 3T3-L1 脂肪细胞的早期脂肪生成 [50]
	抗炎活性	euphopias A ～ C	泽漆	显著抑制 NLRP3 炎症体的激活，并阻断 NLRP3 炎症体诱导的细胞焦亡；改善线粒体的损伤，从而中断 NLRP3 炎症体的激活 [51]
续随子烷型	抗炎活性	euplarisans A、B 和 D	续随子	抑制 NO 的产生 [52]
卡司烷型	抗肿瘤活性	pekinenins A	大戟	对人癌细胞系 Hela 和 C6 细胞显示出细胞毒性 [53]
		pekinenins C ～ F	大戟	对人癌细胞系 MGC-803、SW620、SMMC-7721、Ketr-3、MCF-7、HL-60 和 A549 显示出细胞毒性 [54]
		pekinenin A	大戟	对人癌细胞系 NCI-H460、KB、SGC7901 和 HO-8910 显示出细胞毒性 [55]

关药物用于临床治疗。本部分对大环二萜类化合物的生物活性进行了总结（见图 3）。

2.1　抗肿瘤活性

大戟科植物五点草中分离出的 3 个假白榄烷型大环二萜类化合物 euphoscopin C、euphorbiapene D 和 euphoheliosnoid A，对耐紫杉醇的 A549 人肺癌细胞系均显示出细胞毒性，IC_{50} 值分别为 6.9、7.2 和 9.5 μmol • L^{-1}[56]。从麻疯树树干中分离得到的 jatromultone D 对 A549、HELA、HEPG2、MDAMB231 和 HEPG2/DOX 等 5 种人肿瘤细胞系均具有细胞毒性，IC_{50} 值均在 2.69 ～ 6.44 μmol • L^{-1}。研究表明，该化合物通过使细胞停滞于 G_2/M 期来诱导 A549 细胞凋亡 [57]。

Ovatodiolide 是从中药防风中提取到的一种大环二萜类化合物，该化合物在单独或联合抗肿瘤药物顺铂共同作用下均显示出显著的抑制口腔肿瘤细胞生长或繁殖的活性。Ovatodiolide 主要通过提高顺铂的敏感性，抑制肿瘤细胞的生长，使 JAK2/STAT3 信号通路失调从而发挥抗肿瘤作用 [58]。宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤，研究表明 ovatodiolide 对所有的宫颈癌细胞均有抑制活性。其中对 DoTC2 细胞的抑制作用最强，且在此过程中使调节细胞凋亡的 Bcl-2 和 Bax 表达量的比值下降，由此可知 ovatodiolide 可以通过促进细胞凋亡而发挥活性，还可以使 DoTC2 细胞停滞在 G_2/M 细胞周期，从而抑制细胞周期 B1 的表达，因此该化合物可以作为治

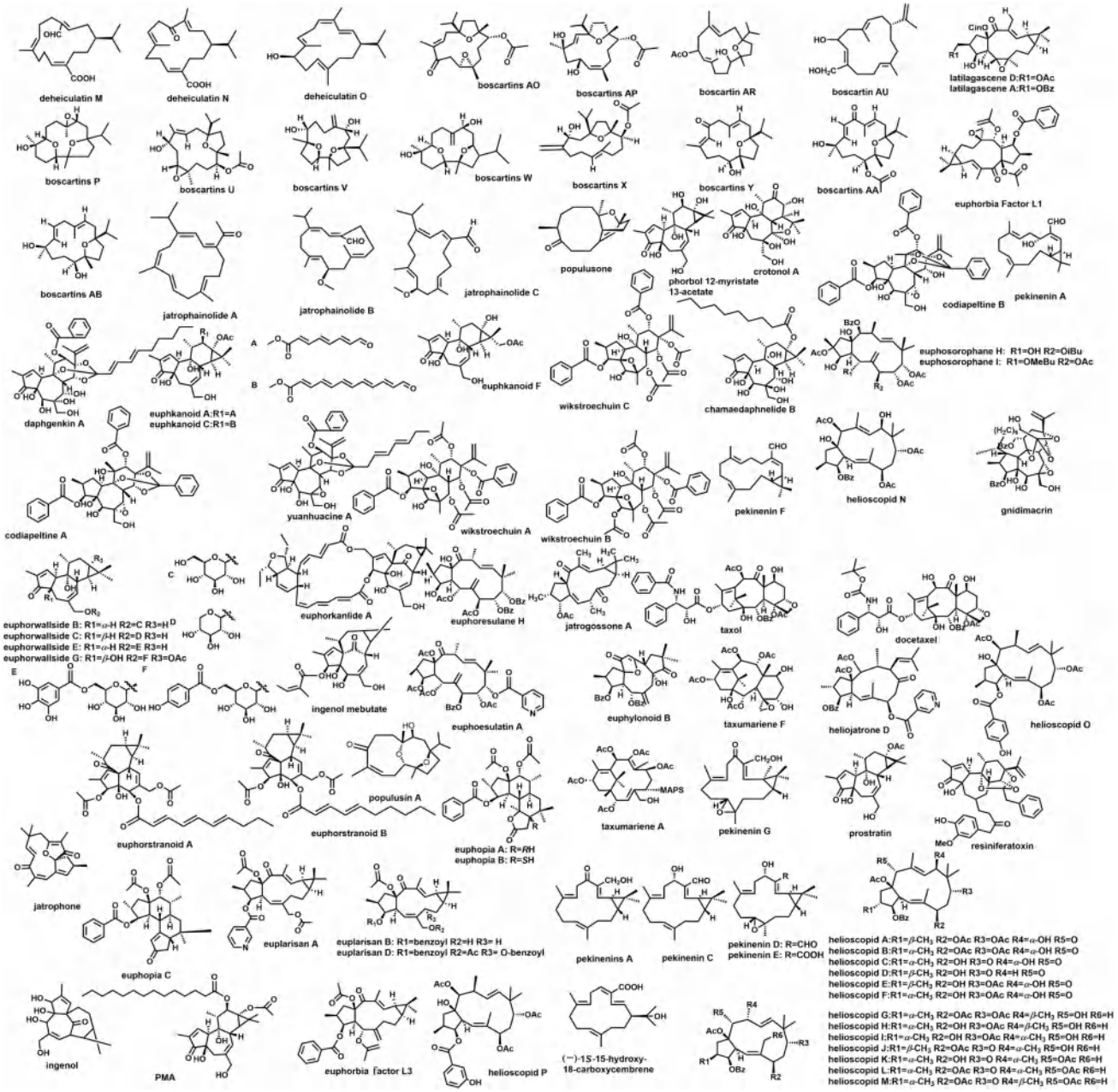


图 2　植物中代表性大环二萜类化合物的化学结构

Fig 2　Chemical structures of representative macrocyclic diterpenes in plants

疗宫颈癌的先导分子[59]。此外，ovatodiolide 对胰腺癌细胞也有细胞毒性，实验研究证明它可以通过降低 STAT3 磷酸化和抑制 NF-κB 通路来诱导肿瘤细胞凋亡[60]。

2.2　抗炎活性

从泽漆中提取到的 11 种大环二萜，通过评估这些化合物对 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞白血病细胞（RAW 264.7）产生 NO 的影响，判断这些化合物的抗炎活性。其中化合物 heliojatrone C 显示出最强的抗炎活性，IC_{50} 值为（7.4±0.6）μmol • L^{-1}。通过对白细胞介素（IL）-6 和肿瘤坏死因子（TNF）-α 进行酶联免疫吸附测定发现该化合物可剂量依赖性抑制这两种炎症介质。免疫荧光检测结果表明，高剂量时，该化合物对 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞中转录因子 P65 的移位显示出较好的抑制作用。因此抗炎作用的机制可能是通过抑制炎症介质 IL-6 和 TNF-α 与 P65 亚基的移位来调控 NF-κB 信号通路从而产生抗炎活性[61]。除此之外，Zhang 等[62]从该植物中提取到的大环二萜类化合物 euphzycopias A、B、C、D、E、F 和 I 对炎症小体 NLRP3 均有较强的抑制作用，IC_{50} 值在 3.34 ～ 14.92 μmol • L^{-1}。

哮喘是一类慢性炎症疾病，病发时主要使用药物控制，具有停药后复发快的特点。化合物 ovatodiolide 不仅具有抗肿瘤作用，对于哮喘的治疗也有一定作用。把经过支气管肺泡灌洗液处理的鸡卵蛋白免疫小鼠作为过敏性炎症模型，通过酶联免

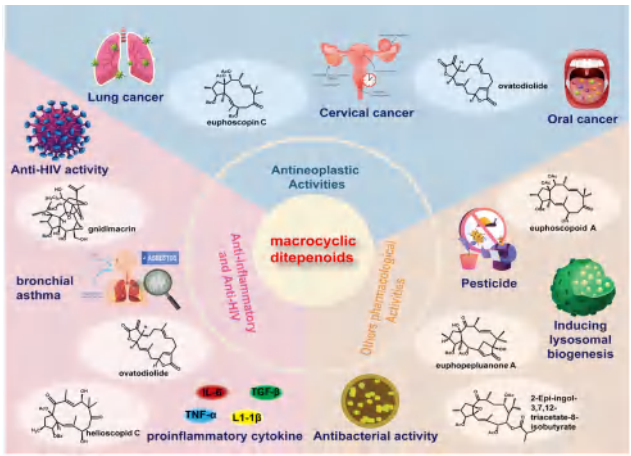


图 3　大环二萜的生物活性

Fig 3　Biological activity of macrocyclic diterpenes

疫吸附测定、免疫抑制实验、测定麻醉小鼠气道阻力等方法，分析 ovatodiolide 发挥抗炎活性的机制。结果显示该化合物通过下调哮喘小鼠模型中 Th2 细胞因子的表达来抑制过敏性哮喘 [63]。

2.3　抗 HIV 活性

瑞香烷型二萜原酸酯是从瑞香科和大戟科植物中分离得到的一类天然产物，具有优异的抗 HIV 活性。Gnidimacrin 最初是从瑞香科植物 *Gnidia subcordate* 中分得的，该化合物能在皮摩尔浓度下杀死持续感染的细胞，是一种很好的先导化合物 [64]。李巍课题组 [65] 从金边瑞香中提取到了 gnidimacrin 以及 3 个新的与 gnidimacrin 类似的瑞香烷型二萜化合物，在 MT4 细胞测试中化合物 daphneodorins A 和 B 和均显示出微纳摩尔级别的抑制活性。Asada 从结香中分离得到瑞香烷型二萜原酸酯 edgeworthianins A ～ E，其中 edgeworthianins B、D 和 E 均显示出显著的抗 HIV 活性 [66]。

2.4　其他

病虫害常对农牧业造成不良影响，目前植物杀虫剂是国内外研究的重点。Hua 等 [67] 从泽漆中提取到了 3 种新的大环二萜类化合物，包括 2 个假白榄烷型二萜 euphoscopoids A 和 B 和续随子烷型二萜 euphoscopoid C。这几种化合物对棉铃虫均显示出了较强的拒食活性，EC_{50} 值在 2.05 ～ 4.34 μg • cm^{-2}。

溶酶体是细胞的降解中心和信号枢纽，其生成和活性会受到各种信号的调节，在细胞生长、发育和衰老中起着重要作用。从南欧大戟种子中提取到了 5 种新的大环二萜化合物，分别为 euphopepluanones A ～ E，其中化合物 euphopepluanones A、B 和 C 的结构中有一个罕见的 5/11/5 的三环结构。通过溶酶体红色荧光探针评估 3 种化合物诱导溶酶体生成的活性，其中 euphopepluanones A 和 C 的活性最强。研究显示它们可以促进溶酶体关键转录因子 TFEB 的核移位，通过激活 TFEB 来诱导溶酶体生成 [68]。

Carneiro 等 [69] 评估了从大戟科植物 *Croton nepetaefolius* 中分离到的卡司烷型二萜对细菌或酵母等微生物生长和生物膜形成的抑制能力，结果显示它们对 *Staphylococcus aureus* 和 *Staphylococcus epidermidis* 等多种致病菌都表现出抑制活性，最低抑菌浓度在 125 ～ 500 μg • mL^{-1}。

3　大环二萜的生物合成研究进展

萜类化合物的生成是植物体内最重要的次生代谢过程之一，这类化合物以五碳单元异戊二烯作为前体，经过进一步的修饰降解最终生成各种萜类化合物及其衍生物。大环二萜的生物合成途径目前仅在蓖麻子、续随子、麻疯树、米花团等几种植物中有相关的研究。异戊烯基焦磷酸酯（isopentenyl diphosphate，IPP）及其异构体二甲基丙烯基焦磷酸酯（dimethylallyl diphosphate，DMAPP）是这类化合物的共同前体，在植物中主要通过细胞质中的甲羟戊酸（mevalonic acid pathway，MVA）途径和质体中的 2-*C*- 甲基 -*D*- 赤藓醇 -4- 磷酸（2-*C*-methyl-*D*-erythritol-4-phosphate pathway，MEP）途径产生，且两者可以通过质膜进行互换。MVA 途径和 MEP 途径已被广泛报道，在本综述中不再详述 [70]。

在植物次生代谢途径中 IPP 和 DMAPP 在牻牛儿牻牛儿基焦磷酸合酶（GGPPs）的作用下进行首尾相连，生成香叶基香叶基焦磷酸酯（geranyl-geranyl diphosphate，GGPP）。GGPP 是二萜类化合物的直接前体，在不同二萜合酶的作用下生成大环二萜类化合物的二萜骨架。然后在 P450 氧化酶等的作用下对二萜骨架进行修饰生成结构不同的大环二萜类化合物及其衍生物。

3.1　二萜合酶

二萜合酶是参与大环二萜生物合成途径中的关键酶，它可以将二萜类化合物的共同前体 GGPP 转化成不同的大环二萜骨架。1994 年，Mau 等 [71] 从大戟科植物蓖麻子中发现了蓖麻烯合酶（casbene synthase，CS），该酶可以催化 GGPP 生成蓖麻烯（casbene，见图 4）。蓖麻烯被认为是大戟科植物来源的多种大环二萜类化合物中间体。Kirby 等 [72] 选择了包括蓖麻子在内的 5 种大戟科植物，对不同来源的 CS 进行筛选，并将酿酒酵母作为底盘菌株验证酶的功能，发现来源于乌桕的 TPS10，乳浆大戟的 TPS2 和蓖麻的 CAS3 都可以将 GGPP 转化生成蓖麻烯，通过发酵富集蓖麻烯，产量最高可以达到 31 mg • L^{-1}。通过序列比对发现白角麒麟来源的 TPS6 和下垂澳杨来源的 TPS4 分别与 TPS2 有高达 95% 和 70% 的相似性。而来自蓖麻的 CAS2 可以催化 GGPP 生成 neocembrene（见图 4）。

Chen 等[73]从米团花腺毛的转录组数据中发现了一个 TPS-*α* 家族的萜类合酶 *Lc*TPS2，通过在大肠埃希菌和本氏烟草中进行异源表达发现其可以催化 GGPP 转化生成两种不同的 14- 元碳环的西松烷型二萜。这两种西松烷型二萜可以在米花团植物的叶中检测到，并且经过 qRT-PCR 分析发现，*Lc*TPS2 也在米花团的叶中特异性高表达。

Wang 等[74]从哥伦比亚和佛得角来源的拟南芥中克隆得到了 *TPS20* 基因，将它们分别与 GGPP 合酶一起在大肠埃希菌中进行表达，发酵实验的结果显示来源于佛得角的拟南芥的 TPS20 可以转化 GGPP 生成一种大环朵蕾烷二萜醇，而哥伦比亚来源的拟南芥 TPS20 并不发挥作用。通过对两个基因的 cDNA 序列进行对比，发现后者比前者多了一个内含子，并且缺失了一个碱基，这使两者的氨基酸序列存在较大的差异，功能也发生改变。

3.2　细胞色素 P450 加氧酶和脱氢酶

植物中大环二萜生物合成途径中的氧化反应多数是由细胞色素 P450 氧化酶（cytochrome P450 oxygenase，CYP）催化进行的，多种氧化还原过程使得大环二萜类化合物的结构类型丰富多样。由于之前有研究报道南欧大戟中 CYP71D 和 CYP726A 亚家族的酶参与二萜类化合物的生物合成[75]，因此 Luo 等[76]利用续随子转录组对这两个 P450 家族的基因进行筛选，发现 CYP71D445 和 CYP26A27 的表达量最高。通过体内和体外实验对这两个酶进行功能验证，发现蓖麻烯在 CYP71D445 和 CYP26A27 的交叉作用下可以在 C-5、C-6 和 C-9 位各添加一分子羟基。通过对基因的表达量进行分析，推测乙醇脱氢酶 *El*ADH1 可能也参与了该类化合物的生物合成途径。将 CYP71D445、CYP26A27 和 ADH1 进行共表达，以蓖麻烯为底物进行体外酶促反应，得到了化合物 jolkinol C（见图 4）。而麻疯树来源的 CYP726A35 或 CYP726A20，在与 CYP71D495 的共同作用下，可以使蓖麻烯在 C-5 和 C-9 位分别添加一分子羰基，在 C-6 位添加一分子羟基，最终得到化合物 6- 羟基 -5，9- 酮基 - 蓖麻子，该化合物可以自发转化生成化合物 jolkinol C 或 *epi*-jolkinol C[77]（见图 4）。

Zhao 等[78]以成熟续随子中参与大环二萜合成途径的 *El*GGPPs、*El*CS、*El*CYP726A27、*El*ADH-1 和 *ElCYP71D445* 等 5 个基因的表达量作为参考，对各个组织中基因表达情况进行分析，选择出了 5 个候选基因，分别为 *Unigene*14844、*Unigene*16270、*Unigene*41114、*Unigene*13099 和 *Unigene*33555。 其中 *Unigene*41114 和 *CYP726A27* 属于同一家族的成员，推测 *Unigene*41114 也参与了大环二萜类化合物的生物合成，且两者的功能可能相同。

彭健等[79]从续随子转录组数据中挖掘到一个新的 CYP726A 亚家族的萜类合成酶，将其命名为 *El*CYP726A30。通过多重序列比对和聚类分析发现，该蛋白与同科植物南欧大戟的 CYP726A6 氨基酸序列高度相似。通过 qRT-PCR 检测其在不同组织中的分布情况，结果表明根中的表达量最高，种子其次，叶中的表达量最低。该结果表明根可能是续随子二萜合成的主要组织部位。除此之外，在其他几种大戟科植物中也有相关的氧化酶被鉴定出来。King 等[80]发现来源于蓖麻的 CYP726A14、CYP726A17 和 CYP726A18 可以使蓖麻烯的 C-5 位发生氧化，该类产物是大多数药用大环二萜类化合物的中间体；CYP726A16 可以催化 5- 酮基 - 蓖麻烯的 7，8 位发生环氧化；CYP726A15 可以催化 neocembrene 的 C-5 位发生氧化（见图 4）。

4　总结与展望

萜类化合物是自然界中存在的一大类天然产物，其结构种类丰富，且大多具有广泛的生物活性。大环二萜类化合物是萜类化合物中重要的组成部分，这类化合物大多分布于植物或海洋生物中，具有结构新颖复杂、活性广泛的特点，因此受到人们的广泛关注。虽然大环二萜类化合物具有较为丰富的药理活性，但大多数化合物的药理机制尚不清楚。目前，大环二萜类化合物的开发和临床应用还存在一些限制性因素，如植物中化学成分复杂，不利于单一化合物的提取，也不利于发现新结构类型的大环二萜类化合物。化学合成虽然可以有效提高化合物结构的多样性，但这种方法存在原料昂贵、工艺复杂和对环境破坏严重等问题。合成生物学是指通过解析植物中大环二萜生物合成途径，挖掘关键酶基因，并对其催化机制和功能进行解析，最后在微生物底盘菌株中构建目标化合物完整的生物合成途径，实现高价值化合物的生产，目前该种方法是生产化合物最高效、绿色稳定的方式之一。

目前已有少数几种大环二萜类化合物的生物合成途径被解析，并且实现了异源生产，然而大多数大环二萜类化合物的生物合成途径仍然是未知的，可以通过基因组测序和生物信息学分析等方法对大环二萜类化合物的生物合成途径进行推测和解析来解决这一问题。在异源宿主中构建化合物的生物合成途径来获得目标产物具有产量稳定、分离简单的特点，该过程也可能会获得新型结构的大环二萜类化合物，对增加大环二萜类化合物结构多样性也有一定的帮助。因此对大环二

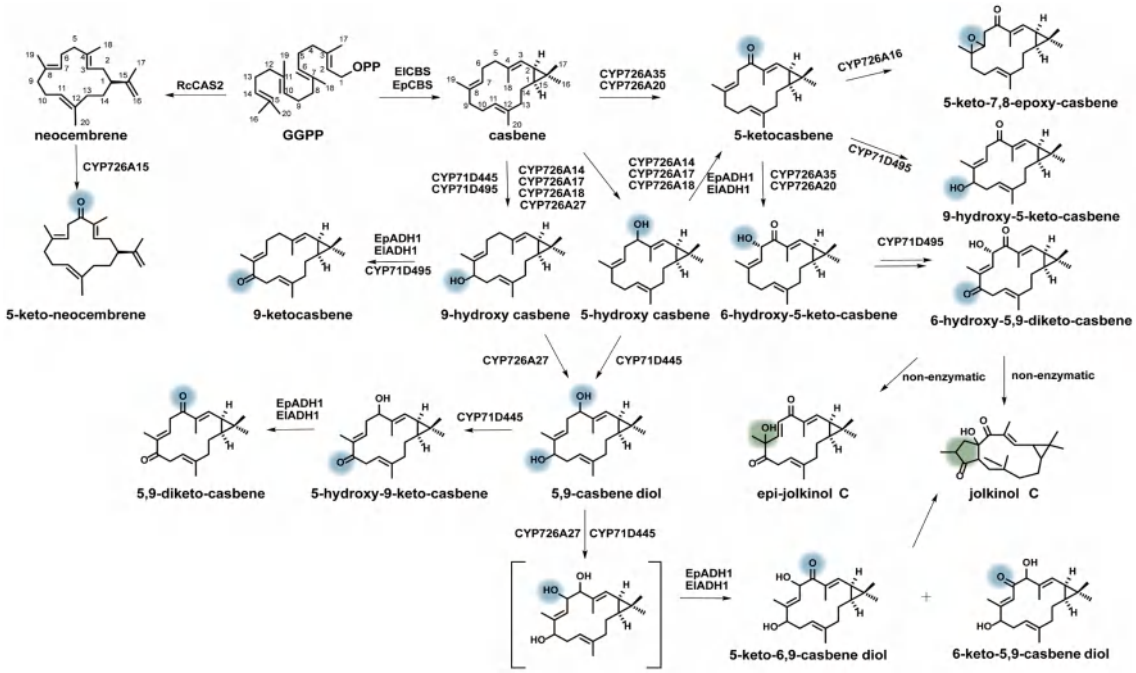


图 4　大环二萜的生物合成途径

Fig 4　Biosynthetic pathways of macrocyclic diterpenes

萜生物合成途径进行研究并通过合成生物学等方法对其进行生产已成为研究热点，合成生物学在大环二萜的大规模生产应用方面具有广泛前景。

总之，大环二萜类化合物来源广泛，结构复杂丰富，具有多种生物活性，在治疗肿瘤、获得性免疫缺陷综合征等多种疾病方面具有重要意义，也可为开发新型药物提供新的思路。但在大环二萜类化合物的结构研究、活性发掘、生源机制和高效生产等方面仍值得进一步探索。

参考文献

[1] Halaweish FT，Kronberg A，Hubert MB，et al. Toxic and aversive diterpenes of *Euphorbia esula* [J]. J Chem Ecol，2002，28（8）：1599-1611.

[2] Anderson L，Schmieder GJ，Werschler WP，et al. Randomized，double-blind，double-dummy，vehicle-controlled study of ingenol mebutate gel 0.025% and 0.05% for actinic keratosis [J]. J Am Acad Dermatol，2009，60（6）：934-943.

[3] Miana GA，Riaz M，Shahzadul-Hussan S，et al. Prostratin：an overview [J]. Mini Rev Med Chem，2015，15（13）：1122-1130.

[4] Schneider F，Pan L，Ottenbruch M，et al. The chemistry of nonclassical taxane diterpene [J]. Acc Chem Res，2021，54（10）：2347-2360.

[5] Hu YJ，Gu CC，Wang XF，et al. Asymmetric total synthesis of taxol [J]. J Am Chem Soc，2021，143（42）：17862-17870.

[6] Bouchet BP，Galmarini CM. Cabazitaxel，a new taxane with favorable properties [J]. Drugs Today（Barc），2010，46（10）：735-742.

[7] Hou PY，Yan Z，Ma BJ，et al. A new cytotoxic cembrane diterpene from the roots of Euphorbia pekinensis Rupr [J]. Fitoterapia，2013，90：10-13.

[8] Liu YY，Yan YM，Wang DW，et al. Populusene A，an Anti-inflammatory diterpenoid with a bicyclo[8，4，1]pentadecane scaffold from *Populus euphratica* resins [J]. Org Lett，2021，23（22）：8657-8661.

[9] Liu Z，Ding ZW，Chen K，et al. Balancing skeleton and functional groups in total syntheses of complex natural products：a case study of tigliane，daphnane and ingenane diterpenoids [J]. Nat Prod Rep，2021，38（9）：1589-1617.

[10] 王婷 . 佛波醇及佛波醇酯的研究与开发 [J]. 乐山师范学院学报，2016，31（8）：13-17.

[11] Lam CF，Yeung HT，Lam YM，et al. Reactive oxygen species activate differentiation gene transcription of acute myeloid leukemia cells via the JNK/c-JUN signaling pathway [J]. Leuk Res，2018，68：112-119.

[12] Kawamura S，Chu H，Felding J，et al. Nineteen-step total synthesis of（＋）-phorbol [J]. Nature，2016，532（7597）：90-93.

[13] Wender PA，Kee JM，Warrington JM. Practical synthesis of prostratin，DPP，and their analogs，adjuvant leads against latent HIV [J]. Science，2008，320（5876）：649-652.

[14] Brown DC. Resiniferatoxin：the evolution of the “Molecular Scalpel” for chronic pain relief [J]. Pharmaceuticals（Basel），2016，9（3）：47-57.

[15] 文博，黄小佳，李晓铭，等 . RTX 膀胱灌注治疗氯胺酮相关性下尿路症状的临床研究 [J]. 临床泌尿外科杂志，2013，28（2）：139-141，144.

[16] Vasilev VH，Speeesrt L，Yu K，et al. Total synthesis of resiniferatoxin [J]. J Am Chem Soc，2022，144（36）：16332-16337.

[17] 王园园，王鑫，王义善 . 瑞香狼毒提取物尼地吗啉的抗肿瘤研究概况 [J]. 药学实践杂志，2011，29（5）：328-330，335.

[18] Liu QB，Cheng YY，Li W，et al. Synthesis and structure-ac-

tivity relationship correlations of gnidimacrin derivatives as potent HIV-1 inhibitors and HIV latency reversing agents [J]. J Med Chem，2019，62（15）：6958-6971.

[19] Appendino G. Ingenane diterpenoids [J]. Prog Chem Org Nat Prod，2016，102：1-90.

[20] Winkler JD，Rouse MB，Greaney MF，et al. The first total synthesis of（＋/－）-ingenol [J]. J Am Chem Soc，2002，124（33）：9726-9728.

[21] Jørgensen L，Mckerrall SJ，Kuttruff CA，et al. 14-step synthesis of（＋）-ingenol from（＋）-3-carene [J]. Science，2013，341（6148）：878-882.

[22] Kupchan SM，Sigel CW，Matz MJ，et al. Jatrophone，a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypiifolia* [J]. J Am Chem Soc，1970，92（14）：4476-4477.

[23] Zhou CG，Xiang ZN，Zhao N，et al. Jatrophane diterpenoids with Kv1.3 ion channel inhibitory effects from *Euphorbia helioscopia* [J]. J Nat Prod，2022，85（4）：815-827.

[24] Vela F，Ezzanad A，Hunetr AC，et al. Pharmacological potential of lathyrane-type diterpenoids from phytochemical sources [J]. Pharmaceuticals（（Basel），2022，15（7），780-813.

[25] Wang W，Wu YL，Li C，et al. Synthesis of new lathyrane diterpenoid derivatives from *Euphorbia lathyris* and evaluation of their anti-inflammatory activities [J]. Chem Biodivers，2020，17（2）：e1900531.

[26] Löffler LE，Wirtz C，Fürstner A. Collective total synthesis of casbane diterpenes：one strategy，multiple targets [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2021，60（10）：5316-5322.

[27] Wang K，Wirtz C，Fürstner A. A new casbane diterpene from *Euphorbia pekinensis* [J]. Nat Prod Res，2015，29（15）：1456-1460.

[28] Chen K，Liu XQ，Wang WL，et al. Taxumarienes A-G，seven new *α*-glucosidase inhibitory taxane-diterpenoids from the leaves of Taxus mairei [J]. Bioorg Chem，2020，94：103400.

[29] Luo P，Yin ZY，Sun ZJ，et al. Cembrane-type diterpenoids from *Macaranga pustulata* [J]. Fitoterapia，2018，129：162-166.

[30] Sun X，Geng YL，Wang X，et al. Cembrane-type diterpenoids from the gum resin of *Boswellia carterii* and their biological activities [J]. RSC Adv，2020，10（2）：746-755.

[31] Yu J，Zhao L，Sun XW，et al. Bioactive cembrane diterpenoids from the gum resin of *Boswellia carterii* [J]. Fitoterapia，2020，146：104699.

[32] Wang JJ，Sun HR，Suo XY，et al. Ten undescribed cembrane-type diterpenoids from the gum resin of Boswellia sacra and their biological activities [J]. Phytochemistry，2020，177：112425.

[33] Wang YG，Ren J，Ma J，et al. Bioactive cembrane-type diterpenoids from the gum-resin of *Boswellia carterii* [J]. Fitoterapia，2019，137：104263.

[34] Zhang DB，Wang Z，Liang YN，et al. Jatrophainolides A-C，new cembrane-type diterpenoids with PTP1B inhibitory activity from the root bark of Jatropha integerrima [J]. Phytochem Lett，2020，36：166-170.

[35] Liu KX，Zhu YX，Yan YM，et al. Discovery of populusone，a skeletal stimulator of umbilical cord mesenchymal stem cells from Populus euphratica Exudates [J]. Org Lett，2019，21（6）：1837-1840.

[36] Wang J，Qin L，Zhao BQ，et al. Crotonols A and B，two rare tigliane diterpenoid derivatives against K562 cells from *Croton tiglium* [J]. Org Biolol Chem，2018，17（1）：195-202.

[37] Yan XL，Chen BL，Yuan FY，et al. Six new tigliane diterpenoids with anti-inflammatory activity from *Euphorbia kansuensis* [J]. Arab J Chem，2022，15（6）：103807.

[38] Li SF，Wnag XY，Li GL，et al. Potential HIV latency-reversing agents with STAT1-activating activity from the leaves of *Wikstroemia chamaedaphne* [J]. Phytochemistry，2022，203：113395.

[39] Pan RR，Zhang CY，Yuan L，et al. Daphnane diterpenoids from *Daphne genkwa* inhibit PI3K/Akt/mTOR signaling and induce cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells [J]. J Nat Prod，2020，83（4）：1238-1248.

[40] Tembeni B，Sciorillo A，Lnvernizzi L，et al. HPLC-based purification and isolation of potent anti-HIV and latency reversing daphnane diterpenes from the medicinal plant *Gnidia sericocephala*（Thymelaeaceae）[J]. Viruses，2022，14（7）：1437.

[41] Liu YY，Liu YP，Wang XP，et al. Bioactive daphnane diterpenes from *Wikstroemia chuii* with their potential anti-inflammatory effects and anti-HIV activities [J]. Bioorg Chem，2020，105：104388.

[42] Olivon F，Remy S，Grelier G，et al. Antiviral compounds from codiaeum peltatum targeted by a multi-informative molecular networks approach [J]. J Nat Prod，2019，82（2）：330-340.

[43] Yuan FY，Tnag ZY，Huang D，et al. Tigliane and rhamnofolane glycosides from *Euphorbia wallichii* prevent oxidative stress-induced neuronal death in PC-12 cells [J]. Bioorg Chem，2022，128：106103.

[44] Yan XL，Sang J，Chen SX，et al. Euphorkanlide A，a highly modified ingenane diterpenoid with a C（24）appendage from *Euphorbia kansuensis* [J]. Org Lett，2019，21（11）：4128-4131.

[45] Yuan FY，Pan YH，Yin AP，et al. Euphorstranoids A and B，two highly rearranged ingenane diterpenoids from *Euphorbia stracheyi*：structural elucidation，chemical transformation，and lipid-lowering activity [J]. Org Chem Front，2022，9（3）：775-780.

[46] Xie XL，Fan RZ，Hu R，et al. Euphoresulanes A-M，structurally diverse jatrophane diterpenoids from *Euphorbia esula* [J]. Bioorg Chem，2020，98：103763.

[47] Ling T，Lang WH，Craig J，et al. Studies of jatrogossone A as a reactive oxygen species inducer in cancer cellular models [J]. J Nat Prod，2019，82（5）：1301-1311.

[48] Yang HQ，Mamatjan A，Tang D，et al. Jatrophane diterpenoids as multidrug resistance modulators from *Euphorbia sororia* [J]. Bioorg Chem，2021，112：104989.

[49] Zhang YT，Hu C，Zhang SX，et al. Euphoesulatin A prevents osteoclast differentiation and bone loss via inhibiting RANKL-induced ROS production and NF-*κ*B and MAPK signal pathways [J]. Bioorg Chem，2022，119：105511.

[50] Wu SQ，Fan RZ，Yuan FY，et al. Euphylonoids A and B，

two highly modified jatrophane diterpenoids with potent lipid-lowering activity from *Euphorbia hylonoma* [J]. Org Lett，2022，24（48）：8854-8858.

[51] Shi QQ，Zhang XJ，Wang TT，et al. Euphopias A-C：three rearranged jatrophane diterpenoids with tricyclo[8.3. 0.0（2，7）]tridecane and tetracyclo[11.3. 0.0（2，10）. 0（3，7）] hexadecane cores from *Euphorbia helioscopia* [J]. Org Lett，2020，22（20）：7820-7824.

[52] Wang YL，Song ZR，Guo YY，et al. Diterpenoids from the seeds of *Euphorbia lathyris* and their anti-inflammatory activity [J]. Bioorg Chem，2021，112：104944.

[53] Shao FG，Bu P，Zhang C，et al. Two new casbane diterpenoids from the roots of *Euphorbia pekinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res，2011，13（9）：805-810.

[54] Tao WW，Duan JA，Tang YP，et al. Casbane diterpenoids from the roots of *Euphorbia pekinensis* [J]. Phytochemistry，2013，94：249-253.

[55] Liang QL，Dai CC，Jiang JH，et al. A new cytotoxic casbane diterpene from *Euphorbia pekinensis* [J]. Fitoterapia，2009，80（8）：514-516.

[56] Zhou D，Zhang FJ，Kikuchi T，et al. Lathyrane and jatrophane diterpenoids from *Euphorbia helioscopia* evaluated for cytotoxicity against a paclitaxel-resistant A549 human lung cancer cell line [J]. J Nat Prod，2022，85（4）：1174-1179.

[57] Zhang JS，Zhang Y，Li S，et al. Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from *Jatropha multifida* [J]. Bioorg Chem，2018，80：511-518.

[58] Lin CS，Bamodu OA，Kuo KT，et al. Investigation of ovatodiolide，a macrocyclic diterpenoid，as a potential inhibitor of oral cancer stem-like cells properties via the inhibition of the JAK2/STAT3/JARID1B signal circuit [J]. Phytomedicine，2018，46：93-103.

[59] Ou J，Mmeng FX，Liu JY，et al. Ovatodiolide exerts anticancer effects on human cervical cancer cells via mitotic catastrophe，apoptosis and inhibition of NF-κB pathway [J]. J buon，2020，25（1）：87-92.

[60] Hsieh YJ，Tseng SP，Kuo YH，et al. Ovatodiolide of anisomeles indica exerts the anticancer potential on pancreatic cancer cell lines through STAT3 and NF-κB regulation [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2016，2016：8680372.

[61] Su JC，Cheng W，Song JG，et al. Macrocyclic diterpenoids from Euphorbia helioscopia and their potential anti-inflammatory activity [J]. J Nat Prod，2019，82（10）：2818-2827.

[62] Zhang Y，Xiong F，Zhang JJ，et al. Euphzycopias A-I，macrocyclic diterpenes with NLRP3 inflammasome inhibitory activity from *Euphorbia helioscopia* L [J]. Fitoterapia，2022，157：105139.

[63] Wang CN，Lee YL，Lin YP，et al. Ovatodiolide suppresses allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma [J]. Eur J Pharmacol，2017，812：9-17.

[64] 付志鹏，周忠霞，刘新泳，等 . 天然产物抗病毒药物的研究进展 [J]. 药学学报，2020，55（4）：703-719.

[65] Otsuki K，Li W，Asada，Y，et al. Daphneodorins A-C，anti-HIV gnidimacrin related macrocyclic daphnane orthoesters from *Daphne odora* [J]. Org Lett，2020，22（1）：11-15.

[66] Asada Y，Otsuki K，Morooka M，et al. Anti-HIV macrocyclic daphnane orthoesters with an unusual macrocyclic ring from *Edgeworthia chrysantha* [J]. J Nat Prod，2022，85（10）：2399-2405.

[67] Hua J，Luo SH，Liu Y，et al. New bioactive macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia helioscopia* [J]. Chem Biodivers，2017，14（10）：e1700327.

[68] Chen YN，Ding X，Lu QY，et al. Macrocyclic diterpenoids from the seeds of Euphorbia peplus with potential activity in inducing lysosomal biogenesis [J]. Bioorg Chem，2020，105：104464.

[69] Carneiro VA，Santos HSD，Arruda FVS，et al. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections [J]. Molecules，2010，16（1）：190-201.

[70] Vranová E，Coman D，Gruissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis [J]. Annu Rev Plant Biol，2013，64：665-700.

[71] Mau CJ，West CA. Cloning of casbene synthase cDNA：evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1994，91（18）：8497-501.

[72] Kirby J，Nishimoto M，Park JG，et al. Cloning of casbene and neocembrene synthases from *Euphorbiaceae* plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Phytochemistry，2010，71（13）：1466-1473.

[73] Chen YG，Li DS，Ling Y，et al. A cryptic plant terpene cyclase producing unconventional 18-and 14-membered macrocyclic C（25）and C（20）terpenoids with immunosuppressive activity [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2021，60（48）：25468-25476.

[74] Wang Q，Jia M，Huh JH，et al. Identification of a dolabellane type diterpene synthase and other root-expressed diterpene synthases in Arabidopsis [J]. Front Plant Sci，2016，7：1761.

[75] Zerbe P，Hamberger B，Yuen MMS，et al. Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems [J]. Plant Physiol，2013，162（2）：1073-1091.

[76] Luo D，Callari R，Hamberger B，et al. Oxidation and cyclization of casbene in the biosynthesis of *Euphorbia* factors from mature seeds of Euphorbia lathyris L [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2016，113（34）：E5082-E5089.

[77] King AJ，Brown GD，Gilday AD，et al. A cytochrome P450-mediated intramolecular carbon-carbon ring closure in the biosynthesis of multidrug-resistance-reversing lathyrane diterpenoids [J]. Chembiochem，2016，17（17）：1593-1597.

[78] Zhao WL，Peng J，Wang F，et al. Integrating metabolomics and transcriptomics to unveil the spatiotemporal distribution of macrocyclic diterpenoids and candidate genes involved in ingenol biosynthesis in the medicinal plant *Euphorbia lathyris* L [J]. Ind Crop Prod，2022，184：115096.

[79] 彭健，田梅，赵万里，等 . 续随子 CYP726A30 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种，2021，19：1-9.

[80] King AJ，Brown GD，Gilday AD，et al. Production of bioactive diterpenoids in the euphorbiaceae depends on evolutionarily conserved gene clusters [J]. Plant Cell，2014，26（8）：3286-3298.

（收稿日期：2023-03-05；修回日期：2023-04-09）

酸枣仁中黄酮类成分的研究进展

李宝剑[1]，杨远贵[1*]，宋忠兴[1]，唐志书[1, 2*]（1.陕西中医药大学/陕西省中药资源产业化协同创新中心/秦药特色资源研究开发国家重点实验室（培育），陕西　咸阳　712083；2.中国中医科学院，北京　100700）

摘要：酸枣仁具有养心补肝、宁心安神的功效，为治虚烦不眠的要药，主要含有黄酮、皂苷、生物碱、脂肪酸等成分，其中黄酮类化合物是主要药效成分之一。本文拟从化学结构、提取方法、分析方法和生物活性四个方面对酸枣仁中黄酮类成分进行归纳。酸枣仁中黄酮类成分的提取方法主要有浸提法、加热回流法、超声波辅助提取法、酶提取法等；酸枣仁已发现黄酮类成分 44 个，包括 31 个黄酮、8 个黄酮醇、2 个二氢黄酮和 3 个异黄酮；分析方法主要有紫外分光光度法、高效液相色谱法、超临界流体色谱法、色谱 - 质谱联用等；药理作用研究表明，酸枣仁中黄酮类成分具有镇静安眠抗抑郁、抗氧化、改善记忆、保护心脏、抗肿瘤等生物活性。本文通过对酸枣仁中黄酮类成分的化学结构、提取、分析和生物活性进行总结，以期为酸枣仁中黄酮类成分的深入开发利用提供参考。

关键词：酸枣仁；黄酮；提取方法；分析方法；生物活性；化学结构

中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2690-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.021

Research progress of flavonoids in Ziziphi Spinosae Semen

LI Bao-jian[1], YANG Yuan-gui[1*], SONG Zhong-xing[1], TANG Zhi-shu[1, 2*] (1. *Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Shaanxi Collaborative Innovation Center for the Industrialization of Traditional Chinese Medicine Resources*, *State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Qin Medicine Resources* (*Cultivation*), *Xianyang Shaanxi* 712083; 2. *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700)

Abstract: Ziziphi Spinosae Semen (ZSS) is an essential medicine for agitated insomnia, which can nourish the heart, invigorate the liver, calm the heart and tranquilize the mind. It mainly contains flavonoids, saponins, alkaloids, fatty acids and other components, with flavonoids being the main pharmacodynamic component. This paper summarized the flavonoids in ZSS from four aspects: extraction methods, chemical structures, analytical methods, and biological activities. The main methods for extracting flavonoids from ZSS include immersion, heating reflux, ultrasound, enzyme extraction, etc. Totally 44 flavonoids were found in ZSS, including 31 flavones, 8 flavonols, 2 dihydroflavonoids, and 3 isoflavones. Currently, ultraviolet spectrophotometry, high performance liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, and liquid chromatography-mass spectrometry are the main analytical methods. Pharmacological studies have shown that flavonoids from ZZS have biological activities such as sedation, antidepressant, anti-oxidant, memory improvement, heart protection, and anti-tumor effect. The extraction, analysis, chemical structure, and biological activities of flavonoids in ZSS were summarized to provide reference for further development and utilization of flavonoids in ZSS.

Key words: Ziziphi Spinosae Semen; flavonoid; extraction procedure; analytic procedure; bioactivity; chemical structure

基金项目：中央本级重大增减支项目（No.2060302）；现代农业产业技术体系建设专项（No.CARS-21）；咸阳市 2020 重大科技专项（No.2020K01-20）。

作者简介：李宝剑，男，硕士研究生，主要从事中药资源开发与中药制剂研究，email：lbj17690949096@163.com　*通信作者：唐志书，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药制剂新技术与中药质量分析研究，email：tzs6565@163.com

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣的干燥成熟种子，有生、炒两种用法，主要分布在我国陕西、山西、河北等地[1]。《本草纲目》记载："枣仁，味酸性收，故主肝病，寒热结气，酸痹久泄，脐下满痛之症。"研究发现，酸枣仁成分多达 130 余种，包括黄酮类、皂苷类、生物碱类、脂肪酸类等，具有镇静安眠、抗抑郁、抗氧化、抗炎、改善学习记忆等药理作用[2]。临床广泛应用于酸枣仁汤、归脾汤、天王补心汤、枣仁安神颗粒、天王补心丸、柏子养心丸等中成药。

酸枣仁总黄酮质量分数为 3.94%，是酸枣仁的主要活性成分之一，其结构主要有黄酮、二氢黄酮、黄酮醇和异黄酮等。黄酮是广泛存在于自然界、种类繁多且具有广泛生物活性的成分，是中药中一类重要的有效成分[3]。研究表明，酸枣仁中黄酮类成分具有镇静安眠、抗焦虑、抗氧化、改善记忆障碍、保护心脏等生物活性[4]。近年来，已有酸枣仁化学成分的化学结构、分析方法和生物活性的相关报道，本文通过对酸枣仁中黄酮类成分化学结构、提取方法、分析方法和生物活性进行归纳，以期为其开发利用提供参考。

1　酸枣仁中的黄酮类成分

黄酮类化合物是一种多酚类化合物，其化学结构多样，但总体骨架由 15 个碳原子（C_6-C_3-C_6）组成 A、B 环，通过杂环吡喃环连接[5]。截至目前，共从酸枣仁中发现报道了 44 个黄酮类成分（见表 1 和图 1），其中黄酮 31 个（化合物 **1** ～ **31**），黄酮醇 8 个（化合物 **32** ～ **39**），二氢黄酮 2 个（化合物 **40** ～ **41**），异黄酮 3 个（化合物 **42** ～ **44**）[6-26]。这些黄酮类成分大多以黄酮苷的形式存在，主要为碳苷和氧苷，此外，还有少量氮苷。葡萄糖主要与黄酮类成分中 3 位和 7 位羟基脱水缩合成氧苷，与 3 位、6 位和 8 位碳脱水缩合成碳苷。研究发现，B 环中的羟基结构可以促进活性氧（ROS）和活性氮（RNS）清除，发挥抗氧化作用[27]。此外，黄酮的特殊结构还可以减少高度氧化的自由基，从而减少 ROS 形成，减少氧化应激反应。这一特性使其成为有效的过氧自由基、超氧化物和过氧亚硝酸根自由基清除剂，并进一步发挥多方面疾病的药理活性[5]。

2　酸枣仁中黄酮类成分的提取方法

高效的提取方式，对酸枣仁化学成分及其药理作用的研究具有重要意义。目前酸枣仁中黄酮类成分的提取方法主要有浸提法、加热回流法、超声波辅助提取法、酶提法和其他提取方法（见表 2）[28-46]。

浸提法和加热回流法作为酸枣仁中黄酮类成分传统提取方法，研究多采用单因素法与正交试验或与响应面法相结合，以酸枣仁中总黄酮提取率为指标，对其提取工艺进行优化。研究发现，影响加热回流提取工艺时的因素作用大小的顺序为：醇浓度＞提取时间＞回流次数＞加醇量[33]。

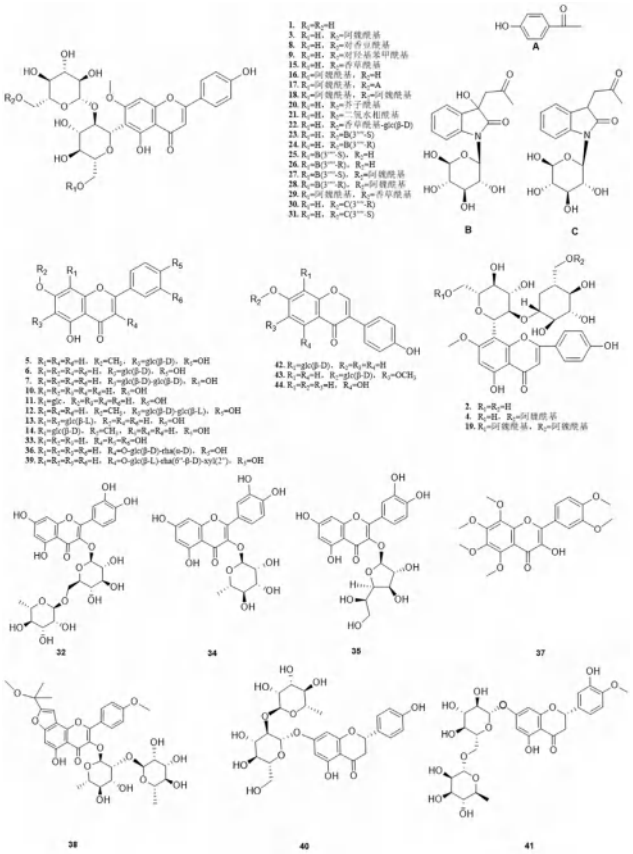


图 1　酸枣仁中黄酮类成分化学结构

Fig 1　Chemical structures of the flavonoids in Ziziphi Spinosae Semen

超声波辅助提取法是指中药材被提取溶剂浸润和渗透，使有效成分析出并溶解于提取溶剂，通过组织细胞内外的浓度差和渗透压差进行扩散，进一步得到浸提液的一种提取方法，具有节能、高效等优点[47]。近年来有学者采用响应面法对提取酸枣仁中黄酮类物质的方法进行了优化，进一步提高了提取效率[36-37，39-42]。采用正交试验优化超声辅助提取时，发现各因素作用大小的顺序为：液固比＞乙醇浓度＞提取时间＞提取温度＞功率[38]。

酶提取法是指通过酶类物质破坏植物细胞壁结构使其有效成分从细胞质中溶解分离出来的一种提取方法，常用的酶主要有纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等。近些年关于酸枣仁中黄酮类成分提取工艺研究发现，采用纤维素酶和复合酶作为提取用酶，在复合酶的工艺改进研究中，其提取率相比于水提法效率提高了 54.67%[46]。酶提法具有高效、环保、便利等优点，具有较大的开发潜力。

酸枣仁中黄酮类成分提取方法研究较多，其

表 1　酸枣仁中黄酮类成分

Tab 1　Composition of flavonoids in Ziziphi Spinosae Semen

No.	名称	文献
1	斯皮诺素（spinosin）	[6]
2	异斯皮诺素（isospinosin）	[7]
3	6'''- 阿魏酰斯皮诺素（6'''-feruloylspinosin）	[7]
4	6'''- 异阿魏酰斯皮诺素（6'''-feruloylisospinosin）	[7]
5	当药黄素（swertish）	[8]
6	异牡荆素（isovitexin）	[7]
7	异牡荆素 -2''-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（isovitexin-2''-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside）	[7]
8	6'''- 对香豆酰斯皮诺素（6'''-p-coumaroylspinosin）	[9]
9	6'''- 对羟基苯甲酸斯皮诺素（6'''-p-hydroxybenzoylspinosin）	[10]
10	芹菜素（apigenin）	[11]
11	牡荆素（vitexin）	[7]
12	酸枣黄素（zivulgarin）	[12]
13	维采宁Ⅱ（vicenin Ⅱ）	[13]
14	异当药黄素（isoswertisin）	[14]
15	6'''- 香草酰斯皮诺素（6'''-vanilloylspinosin）	[15]
16	6''-*O*- 阿魏酰斯皮诺素（6''-*O*-feruloylspinosin）	[16]
17	6''-*O*- 阿魏酰 -6'''-*p*- 羟基苯甲酰斯皮诺素（6''-*O*-feruloyl-6'''-*p*-hydroxybenzoylspinosin）	[16]
18	6''，6'''- 二阿魏酰斯皮诺素（6''，6'''-diferuloylspinosin）	[17]
19	6''，6'''- 二异阿魏酰斯皮诺素（6''，6'''-diferuloylisospinosin）	[18]
20	6'''- 介子酰斯皮诺素（6'''-sinapoylspinosin）	[9]
21	6'''- 二氢水相酰斯皮诺素（6'''-dihydrophaseoylspinosin）	[17]
22	6'''-（4''''-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基）- 香草酰斯皮诺素 [6'''-（4''''-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl）-vanilloylspinosin]	[8]
23	6'''-*O*-（3*S*-1-*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -2- 氧 -3- 羟基 - 吲哚 -3- 乙酰基）斯皮诺素 [6'''-*O*-（3S-1-*N*-*β*-*D*-glucopyranosyl-2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetyl）spinosin]	[19]
24	6'''-*O*-（3*R*-1-*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -2- 氧 -3- 羟基 - 吲哚 -3- 乙酰基）斯皮诺素 [6'''-*O*-（3*R*-1-*N*-*β*-*D*-glucopyranosyl-2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetyl）spinosin]	[19]
25	6''-*O*-（3S-1-*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -2- 氧 -3- 羟基 - 吲哚 -3- 乙酰基）斯皮诺素 [6''-*O*-（3S-1-*N*-*β*-*D*-glucopyranosyl-2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetyl）spinosin]	[19]
26	6''-*O*-（3*R*-1-*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -2- 氧 -3- 羟基 - 吲哚 -3- 乙酰基）斯皮诺素 [6''-*O*-（3*R*-1-*N*-*β*-*D*-glucopyranosyl-2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetyl）spinosin]	[19]
27	6''-*O*-（3*S*-1-*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -2- 氧 -3- 羟基 - 吲哚 -3- 乙酰基）-6'''- 阿魏酰斯皮诺素 [6''-*O*-（3*S*-1-*N*-*β*-*D*-glucopyranosyl-2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetyl）-6'''-feruloylspinosin]	[19]
28	6''-*O*-（3*R*-1-*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -2- 氧 -3- 羟基 - 吲哚 -3- 乙酰基）-6'''- 阿魏酰斯皮诺素 [6''-*O*-（3*R*-1-*N*-*β*-*D*-glucopyranosyl-2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetyl）-6'''-feruloylspinosin]	[19]
29	6''- 阿魏酰 -6'''- 香草醇斯皮诺素（6''-feruloyl-6'''-vanillyolspinosin）	[20]
30	6'''-（*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基）-2''''，3''''- 二氢 -2''''- 氧 -3''''- 乙酸酯斯皮诺素（2''''，3''''-dihydro-2''''-oxo-3''''-yl-acetatespinosin）	[10]
31	epi-6'''-（*N*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基）-2''''，3''''- 二氢 -2''''- 氧 -3''''- 乙酸酯斯皮诺素 [epi-6'''-（*N*-*β*-*D*-glucopyranosyl）-2''''，3''''-dihydro-2''''-oxo-3''''-yl-acetatespinosin]	[10]
32	芦丁（rutin）	[21]
33	槲皮素（quercetin）	[22]
34	槲皮苷（quercitrin）	[23]
35	槲皮素 -3-*O*- 葡萄糖苷（quercetin 3-*O*-glucoside）	[23]
36	烟花苷（nicotiflorine）	[18]
37	5，6，7，8，3'，4'- 甲氧基黄酮（5，6，7，8，3'，4'-hexamethoxyflavone）	[24]
38	斯皮诺素鼠李糖苷（spinorhamnoside）	[25]
39	山茶苷 B（camelliaside B）	[26]
40	柚皮苷（naringin）	[11]
41	橙皮苷（hesperidin）	[24]
42	葛根素（puerarin）	[7]
43	黄豆苷（glycitin）	[24]
44	染料木素（genistin）	[24]

中浸提法和加热回流法中影响提取率的因素主要是溶剂的浓度、料液比、提取时间、提取次数等；超声波辅助提取法缩短了提取时间，相比于加热回流更节能环保，其提取率主要受超声功率、溶剂浓度、提取时间、料液比影响；酶提法提取率主要受酶的种类、pH 值、提取时间等影响。在酸枣仁中黄酮类成分提取工艺改进中，超声波辅助提取法应用最为广泛，提取率高且适合进一步大

表 2　不同方法提取酸枣仁中黄酮类成分的工艺参数

Tab 2　Process parameters for extracting flavonoids from Ziziphi Spinosae Semen using different methods

提取方法	工艺优化方法	优化的提取工艺	提取率 /%	提取对象
浸提法	单因素结合正交试验法 [28]	料液比 1∶9、乙醇浓度 60%、提取时间 60 min、提取次数 2 次	3.65	总黄酮
	单因素结合正交试验法 [29]	乙醇浓度 70%、料液比 1∶24、提取时间 3 h、提取次数 2 次		总黄酮
	单因素结合响应面法 [30]	提取时间 1.7 h、提取温度 74 ℃、料液比 1∶27	0.14	总黄酮
加热回流法	单因素结合响应面法 [31]	乙醇浓度 70%、料液比 1∶20、提取温度 80 ℃，提取时间 60 min	2.48	总黄酮
	单因素结合响应面法 [32]	料液比 1∶57、乙醇浓度 74%、提取温度 93 ℃、提取时间 4.2 h、提取次数 3 次	1.68	总黄酮
	单因素结合正交试验法 [33]	料液比 1∶10、乙醇浓度 70%、提取时间 60 min、提取次数 1 次	0.50	总黄酮
	单因素结合正交试验法 [34]	乙醇浓度 75%、料液比 1∶30、提取温度 80 ℃、提取时间 2.0 h	0.12	斯皮诺素
	单因素结合正交试验法 [34]	乙醇浓度 75%、料液比 1∶30、提取温度 80 ℃、提取时间 2.0 h	0.10	6'''- 阿魏酰斯皮诺素
	单因素法 [35]	乙醇浓度 70%、料液比 1∶30、提取温度 80 ℃、提取时间 3 h	2.44	总黄酮
超声波辅助提取法	单因素结合响应面法 [36]	乙醇浓度 64.46%、浸泡时间 12 h、超声温度 62.86 ℃、超声时间 44.02 min	1.01	总黄酮
	单因素结合正交试验法 [34]	乙醇浓度 70%、料液比 1∶20、温度 40 ℃、超声功率 500 W、提取时间 2.0 h	0.14	斯皮诺素
	单因素结合正交试验法 [34]	乙醇浓度 70%、料液比 1∶20、温度 40 ℃、超声功率 500 W、提取时间 2.0 h	0.13	6'''- 阿魏酰斯皮诺素
	单因素结合星点设计 - 效应面法 [37]	乙醇浓度 84%、料液比 1∶40、提取时间 35 min	0.653	总黄酮
	单因素结合正交试验法 [38]	乙醇浓度 70%、料液比 1∶30、提取时间 50 min、提取次数 2 次		总黄酮
	单因素结合响应面法 [39]	乙醇浓度 70.6%、料液比 1∶15.02、提取时间 60 min、超声功率 404 W	1.59	总黄酮
	单因素结合响应面法 [40]	乙醇浓度 71.5%、料液比 1∶15.75、提取时间 61.5 min、超声功率 415 W	0.45	阿魏酰斯皮诺素
	正交试验法结合响应面法 [41]	乙醇浓度 73.7%、料液比 1∶16、提取时间 61 min、超声功率 419 W	0.24	异牡荆素
	单因素结合响应面法 [42]	乙醇浓度 50%、料液比 1∶50、提取时间 60 min、超声功率 270 W	0.64	总黄酮
	单因素结合回归模型法 [43]	乙醇浓度 64.46%、浸泡时间 12 h、超声温度 62.86 ℃、超声时间 44.02 min	0.742	总黄酮
	单因素法 [44]	提取溶剂 1- 己基 -3- 甲基咪唑溴盐（[Hmim]Br）、提取剂浓度 $V_{[Hmim]Br}$∶$V_{乙醇}$＝1∶6、超声时间 30 min、料液比 1∶50	0.03	总黄酮
酶提法	单因素结合响应面法 [45]	酶用量 0.6%、酶解温度 47 ℃、酶解时间 3.5 h、pH 4.5	2.06	总黄酮
	单因素结合正交试验法 [46]	酶解温度 50 ℃、pH 值 4.0、纤维素酶与果胶酶比为 1∶1、酶用量 30 U·g^{-1}、酶解时间 5 h	1.39	总黄酮

规模应用于工业化提取，可进一步对其在酸枣仁中黄酮类成分的提取工艺优化进行深入研究，为工业化提取和产业化应用提供便利。

3　酸枣仁中黄酮类成分的分析方法

酸枣仁中黄酮类成分的分析测定已有较多相关研究，主要方法有紫外分光光度法、高效液相色谱法和色谱 - 质谱联用技术等。本文对几种方法进行总结归纳（见表 3）[29，48-64]。

3.1　紫外分光光度法

紫外分光光度法是常用的一种分析方法，具有应用广泛、灵敏度高、选择性好、准确度高、适用浓度范围广、分析成本低、操作简便且快速等优点 [65]。此方法已广泛应用于酸枣仁中总黄酮的分析定量，为提取工艺改进提供了依据 [29，48-50]。由于紫外分光光度法无法对单一的黄酮类化合物含量进行检测，因此限制了其进一步应用。

3.2　HPLC 法

HPLC 法是一种重要的定性定量分析方法，具有高速、高效、高灵敏度、应用范围广、样品量少等优点 [66]。杨旭等 [67] 建立了酸枣仁黄酮的 HPLC 指纹图谱，并鉴定出其中的 8 个特征峰成分为维采宁 -Ⅱ、牡荆素葡萄糖苷、异斯皮诺素、斯皮诺素、6'''-pyridyloylspinosin、6'''- 对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''- 阿魏酰斯皮诺素、6'''- 对香豆酰斯皮诺素。此外，HPLC 也应用于酸枣仁中药复方的含量测定，其中以斯皮诺素和 6'''- 阿魏酰斯皮诺素含量为代表，HPLC 在相关成分的体内代谢分布研究方面也取得了很大进展，为临床用药提供了理论支持 [51-53]。HPLC 在酸枣仁中黄酮类成分分析中发挥着重要作用，并在药动学研究中可高效快速地对目标成分进行定性定量分析。

3.3　SFC 法

SFC 法是以超临界流体作为流动相的一种色谱方法，具有高效、经济环保、黏度低、流动速度快等优点，相比于 HPLC、SFC 柱效更高，分离时间更短，效率更高 [68]。酸枣仁中黄酮类成分槲皮素、异槲皮苷等也有一些采用 SFC 分析的少量报道。作为一种新兴分析方法，在酸枣仁中黄酮类成分的分析中应用较少，但此方法因为其节

表 3　酸枣仁中黄酮类成分的不同分析方法

Tab 3　Different methods for the analysis of flavonoids in Ziziphi Spinosae Semen

分析方法	分析物质	应用	文献
紫外分光光度法	总黄酮	酸枣仁中总黄酮的含量测定	[29]
	总黄酮	酸枣仁中总黄酮的含量测定	[48]
	总黄酮	建立酸枣仁中总黄酮的含量测定方法	[49]
	总黄酮	测定酸枣仁中总黄酮的含量	[50]
HPLC	化合物 **1**	测定复方枣参片中斯皮诺素的含量	[51]
	化合物 **1**	测定麦冬安神合剂中斯皮诺素的含量	[52]
	化合物 **1**、**3**	测定酸枣仁总黄酮中斯皮诺素和 6'''- 阿魏酰斯皮诺素的含量	[42]
	化合物 **1**、**3**	建立酸枣仁 2 个黄酮活性成分的高效液相色谱一测多评法	[53]
	化合物 **1**、**3**	测定枣仁安神颗粒中斯皮诺素和 6'''- 阿魏酰斯皮诺素的含量	[54]
	化合物 **1**、**2**、**3**、**8**、**9**、**11**、**13**	酸枣仁黄酮 HPLC 指纹图谱的建立	[55]
	化合物 **1**、**3**、**11**	建立测定酸枣仁提取物中生物碱和黄酮的含量测定方法	[56]
	化合物 **1**	酸枣仁黄酮片剂中斯皮诺素含量的测定	[57]
LC-MS	化合物 **1**、**2**、**3**、**13**	通过 LC-MS 表征酸枣仁	[58]
	化合物 **1**、**3**、**8**、**9**、**15**	建立分析酸枣仁成分的 LC-MS 方法	[59]
	化合物 **1**、**3**、**5**、**6**、**8**、**9**、**20**、**32**	基于 LC-MS 技术对酸枣仁中化学成分进行定性分析	[60]
	化合物 **1**、**10**、**32**、**40**、**41**	建立 LC-MS 同时测定酸枣仁中化学成分的方法	[61]
	化合物 **13**、**1**、**5**、**20**、**3**、**7**	运用 LC-MS 技术分析酸枣仁中化合物结构	[62]
	化合物 **1**、**3**、**5**、**6**、**11**、**13**、**32**	建立测定酸枣仁中黄酮的 LC-MS 分析方法	[63]
SFC	化合物 **33**	建立中药黄酮类成分的分离和鉴定方法	[64]

能高效的优点，可作为酸枣仁黄酮类成分分离分析的重要工具。

3.4　LC-MS 法

LC-MS 具有进样量少、灵敏度高、分析速度快等优点，此外，该方法结合了色谱分离能力强和质谱定性能力强的优点，可准确测定分子量，确定分子式，对化合物的结构鉴定至关重要 [69]。

酸枣仁中黄酮类成分多，单一成分含量较少。质谱具有高灵敏度，可以对酸枣仁中含量低的黄酮类成分进行准确定性定量分析，并分析出结构信息等，提高分析效率 [70]。在液质联用法研究中，建立了 UPLC/ESI-Q-Orbitrap、HPLC-MS、HPLC-ESI-MS/MS、HPLC-DAD 等多种方法 [61-68]。LC-MS 法因高效、准确的优点，将逐渐成为酸枣仁中黄酮类成分分析的主要方法。

4　酸枣仁中黄酮类成分的生物活性

酸枣仁中黄酮类成分具有镇静安眠、抗焦虑、抗氧化、改善记忆、保护心脏、抗肿瘤等多种生物活性，相关作用机制方面研究也取得很大进展，对酸枣仁中黄酮类成分的药用价值提供了充分的理论支持。

4.1　镇静安眠、抗抑郁

镇静安眠、抗抑郁是酸枣仁在传统中医应用中最主要的功效。关于失眠和抑郁的发病机制目前主要有以下几种假说：单胺类及其受体假说、神经内分泌假说、神经元损伤假说和细胞分子机制假说等，其中“神经递质假说”得到研究者的普遍认可 [71]。研究发现，酸枣仁中黄酮类成分主要通过调节 5- 羟色氨（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）、γ- 氨基丁酸（GABA）三种神经递质发挥镇静安眠、抗抑郁的药理作用 [72]。Zhang 等 [73] 研究发现，斯皮诺素可能通过下调 C-Fos 表达，从而降低神经元放电发挥镇静催眠的生物活性。研究发现，酸枣仁总黄酮可以下调谷氨酸（GLU）、上调脑源性神经营养因子（BDNF）发挥解郁安神的药理活性 [55]。此外，Jiang 等 [74] 研究发现，酸枣仁中黄酮的镇静安眠能力弱于酸枣仁皂苷，酸枣仁多糖无镇静安眠作用。

4.2　抗氧化

氧化应激是指在正常生理状态下，机体氧化与抗氧化系统失衡 [75]。相关研究得出酸枣仁中黄酮类成分如斯皮诺素、当药黄素、异牡荆素、6'''- 阿魏酰斯皮诺素等具有显著的抗氧化活性 [5]，其主要是通过清除和减少自由基产生，可进一步应用于药品和护肤品中。薛晓芳等 [76] 对酸枣不同部位的抗氧化活性进行研究发现，酸枣仁中黄酮成分抗氧化能力最强，其他部位抗氧化能力依次是：叶片＞果皮＞花＞果实＞果肉。

4.3　改善记忆

记忆障碍是一种发生于中枢神经的退行性疾病，以阿尔茨海默病为代表。相关的发病机制主要有以下几种假说：细胞凋亡假说、神经突触假说、胆碱能神经递质假说、氧化应激损伤假说 [77]。

研究发现，该类成分对由 β- 淀粉样蛋白（Aβ）诱导的记忆障碍具有明显改善作用，这可能是通过上调海马组织中磷酸化细胞外调节蛋白激酶（ERK）、细胞环磷酸腺苷应答元件结合蛋白（CREB）和 BDNF 水平发挥改善认知功能障

碍的作用[78]。研究发现，斯皮诺素可能是通过激活核转录因子 E2 相关因子（Nrf2），上调血红素加氧酶 1（HO-1）表达，抑制 ROS 产生，进而减少 β- 淀粉样蛋白 -42（A$\beta_{1\text{-}42}$）产生和聚集发挥改善记忆的药理作用[79]。总之，酸枣仁中黄酮类成分对认知障碍的改善功能显著，研究其作用机制，可为阿尔茨海默病等记忆疾病的药物开发奠定基础。

4.4 保护心脏

心脏疾病是导致人类死亡的主要原因之一，已经成为全球的主要公共卫生问题。研究显示，斯皮诺素和 6'''- 阿魏酰斯皮诺素可减少心肌酶释放和细胞凋亡，保护心肌细胞急性心脏缺血再灌注损伤[80]。任静娜等[81]研究发现，异牡荆素可以降低大鼠心室肌细胞瞬时外向钾电流，对急性心肌梗死、心律失常等疾病具有很好的心脏保护功能。研究发现，酸枣仁中的斯皮诺素和 6'''- 阿魏酰斯皮诺素对心脏保护的作用机制可能与其降低糖原合成酶激酶 3β（GSK3β）在 Tyr216 处的磷酸化有关，从而发挥保护心肌细胞的活性[82]。

4.5 抗肿瘤

癌症已经成为威胁人类生命的头号杀手，在我国以肺癌、胃癌、肠癌等为主要代表的相关肿瘤发病率逐年升高。研究发现，异牡荆素具有抗非小细胞肺癌（NSCLC）的活性，其可能是通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路来抑制 NSCLC 细胞活性和自我更新，促进其凋亡[83]。异牡荆素还可以抑制癌症干细胞并诱导骨肉瘤细胞凋亡，可能是通过抑制肿瘤细胞存活，诱导细胞凋亡实现的[84]。Cao 等[85]研究发现，酸枣仁中黄酮类成分可以通过抑制锰超氧化物歧化酶（MnSOD）和 FoxM1 的表达，从而降低肝癌干细胞样细胞（HCSLC）的致癌性，并且显著抑制携带 HCSLC 裸鼠的肿瘤生长。以上研究表明酸枣仁中黄酮类成分具有显著抗肿瘤活性，对其作用机制的深入研究可为抗肿瘤药物开发奠定基础。

4.6 其他方面

近年来酸枣仁中黄酮类成分在其他方面的生理活性也有研究，如抑制黑色素、减轻糖尿病肾损伤、减缓骨质疏松、保肝等。研究发现，6'''- 阿魏酰斯皮诺素可以抑制小眼相关转录因子（MITF）和酪氨酸酶表达、抑制总 MITF 磷酸化的 MITF 蛋白表达和抑制环磷酸腺苷（cAMP）介导的 CREB 磷酸化，通过 cAMP-CREB-MITF 轴转导从而抑制黑色素生成[86]。有研究表明，斯皮诺素在细胞和人类皮肤模型中都具有抑制黑色素的生物活性，其作用机制可能是通过与酪氨酸酶结合并竞争性抑制[87]。高群等[88]研究发现，酸枣仁黄酮可通过调节肾组织氧化应激与抗氧化系统的平衡失调，抑制肾细胞凋亡而减轻糖尿病大鼠的肾损伤，从而延缓糖尿病肾病进展。肖凤琴等[89]通过对全氟辛烷磺酸（PFOS）诱导的氧化性肝损伤小鼠模型研究发现，酸枣仁黄酮通过上调小鼠肝组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平，发挥其保肝的药理活性。

5 结语

酸枣仁在中医中应用十分广泛，黄酮作为其主要活性成分，具有镇静安眠抗抑郁、改善记忆、抗氧化、抗肿瘤、保护心脏等多种药理活性，在药物、保健品、食品等领域的开发和研究都具有巨大潜力。尽管对于酸枣仁中黄酮类成分的提取工艺、分析方法、化学结构及生物活性方面研究较多，但在酸枣仁中黄酮类成分的剂型开发、药动学、生物化学合成等方面研究还不够深入。由于酸枣仁中黄酮类成分多样，发挥生物活性的成分复杂，可能是多种成分共同发挥某一种生物活性，也可能是一种成分发挥多种生物活性，因此，有必要对其成分和生物活性之间相互关系进行研究。

参考文献

[1] 阮凯华，唐志书，刘红波，等 . 不同产地酸枣果肉的品质评价研究 [J]. 中南药学，2021，19（5）：896-901.

[2] Wang D，Ho CT，Bai N. Ziziphi Spinosae Semen：an updated review on pharmacological activity，quality control，and application [J]. J Food Biochem，2022：e14153.

[3] Wen KQ，Fang X，Yang J，et al. Recent research on flavonoids and their biomedical applications [J]. Curr Med Chem，2021，28（5）：1042-1066.

[4] 张婷，张岩，王文彤，等 . 酸枣仁中黄酮成分及其药理作用研究进展 [J]. 天津药学，2018，30（1）：69-74.

[5] Dias MC，Pinto DC，Silva AMS. Plant flavonoids：chemical characteristics and biological activity [J]. Molecules，2021，26（17）：5377.

[6] Woo WS，Kang SS，Shim SH，et al. The structure of spinosin（2''-O-β-glucosylswertisin）from *Zizyphus vulgaris* var. Spinosus [J]. Phytochemistry，1979，18（2）：353-355.

[7] Cheng G，Bai YJ，Zhao YY，et al. Flavonoids from *Ziziphus jujuba Mill* var. *spinosa* [J]. Tetrahedron，2000，56（45）：8915-8920.

[8] Xie YY，Xu ZL，Wang H，et al. A novel spinosin derivative from Semen *Ziziphi Spinosae* [J]. J Asian Nat Prod Res，2011，13（12）：1151-1157.

[9] Woo WS，Kang SS，Wagner H，et al. Acylated flavone-C-glycosides from the seeds of *Zizyphus jujuba* [J]. Phytochemistry，1980，19（12）：2791-2793.

[10] Wu Y，Zhang J，Chen M，et al. C-glucosyl flavones from *Ziziphus jujuba* var. spinosa [J]. Chem Nat Compd，2015，51

（2）：247-251.
[11] 张巧月，杨浩天，史贺，等 . HPLC-MS 法同时测定酸枣仁中 9 种成分 [J]. 中草药，2015，46（1）：123-127.
[12] 曾路，张如意，王序 . 酸枣仁化学成分研究Ⅱ[J]. 药学学报，1987，35（2）：114-120.
[13] Yan Y，Shen C，Pei X，et al. Compare the chemical profiling of *Ziziphi Spinosae* Semen and *Ziziphi Mauritianae* Semen using untargeted metabolomics [J]. J Food Compost Anal，2020，94：103635.
[14] 王贱荣，张健，殷志琦，等 . 酸枣仁的化学成分 [J]. 中国天然药物，2008，6（4）：268-270.
[15] Wu Y，He F，Pan Q，et al. C-glucosyl flavones from the seeds of *Ziziphus jujuba* var. spinosa [J]. Chem Nat Compd，2011，47（3）：369-372.
[16] Fu Q，Ma Y，Chen J，et al. Two new C-glucosyl flavonoids from *Ziziphus jujube* and their anti-inflammatory activity [J]. J Asian Nat Prod Res，2017，19（5）：462-467.
[17] Zhang L，Xu ZL，Wu CF，et al. Two new flavonoid glycosides from Semen *Ziziphi Spinosae* [J]. J Asian Nat Prod Res，2012，14（2）：121-128.
[18] 李敏，王宇，李畅，等 . 酸枣仁中 1 个新的黄酮碳苷成分 [J]. 中草药，2014，45（18）：88-92.
[19] Li M，Wang Y，Tsoi B，et al. Indoleacetic acid derivatives from the seeds of *Ziziphus jujuba* var. spinosa [J]. Fitoterapia，2014，(99)：48-55.
[20] 陈科先，赵丽梅，嵇长久，等 . 酸枣仁中的黄酮碳苷类成分研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（8）：1503-1507.
[21] 杨龙飞，田伟，郑倩，等 . 基于 UPLC/ESI-Q TRAP-MS/MS 技术分析酸枣仁中黄酮类化合物 [J]. 特产研究，2022，44（3）：91-100.
[22] 曹琴，王凯伟 . 中药酸枣仁的化学成分研究 [J]. 药学实践杂志，2009，27（3）：209-210.
[23] 王相，杨梦婷，高乐，等 . 酸枣不同部位提取物指标成分测定及体外抗氧化活性研究 [J]. 现代中医药，2020，40（4）：13-19.
[24] Li LM，Liao X，Peng SL，et al. Chemical constituents from the seeds of *Ziziphus jujuba* var. spinosa（Bunge）Hu [J]. J Integr Plant Biol，2005，47（4）：494-498.
[25] Wang SM，Bi ZM，Li P，et al. A new angular furano fl avonol rhamnoside from seeds of *Ziziphus jujuba var*. s pinosa（Bunge）Hu [J]. Chem Ind Forest Prod，2005，25（1）：37.
[26] Lee S，Lee J，Kim J，et al. Flavonoids from the seeds of *Zizyphus jujuba* var. spinosa [J]. Saengyak Hakhoe Chi，2012，43（2）：127-136.
[27] Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids [J]. Pharmacol Ther，2002，96（2-3）：67-202.
[28] 王勇，魏娜，朱智云 . 酸枣仁药材总黄酮提取工艺研究 [J]. 海南医学院学报，2011，17（7）：882-885.
[29] 高剑峰，张朝华，周福勤，等 . 酸枣仁中总黄酮的含量测定及提取工艺研究 [J]. 现代中药研究与实践，2004，18（4）：52-54.
[30] 苗薇薇，伊力亚尔 • 尼加提，杨涛，等 . 响应面法优化提取卡西卡甫枣总黄酮的工艺 [J]. 上海中医药杂志，2018，52（1）：99-103.
[31] 王艳艳，汪郁琦，闫金铭，等 . Box-Behnken 响应曲面法优化药对生 - 炒酸枣仁中总黄酮及总皂苷的提取工艺 [J]. 化学工程师，2020，34（1）：10-15.
[32] 吴修利，姜雪，郭春香，等 . 响应面法优化溶剂热法提取酸枣仁总黄酮工艺 [J]. 食品安全导刊，2016，10（36）：133-134.
[33] 张野，杨世海 . 酸枣仁总黄酮成分的提取工艺及其含量分析 [J]. 人参研究，2012，24（2）：28-30.
[34] 丁轲，谷禹，陆晶晶，等 . 酸枣仁黄酮组分提取纯化工艺的研究 [J]. 中国食品学报，2011，11（4）：62-70.
[35] 李小梅，杨冬雪，李忠琴 . 乙醇回流法提取野生酸枣黄酮工艺研究 [J]. 山东化工，2020，49（2）：48-50.
[36] 蔡雨晴，贾棹东，吴茜茜，等 . 响应面法优化野生酸枣仁中总黄酮的提取工艺 [J]. 中国饲料，2016，27（3）：23-27.
[37] 李游，靳爱仙，梁宗锁，等 . 酸枣仁总黄酮提取工艺及其预测模型研究 [J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版），2009，37（10）：193-198.
[38] 李慎欧，郝庆红，王常富，等 . 超声波提取酸枣仁总黄酮工艺研究 [J]. 安徽农业科学，2009，37（28）：3790-3792.
[39] 杨婷婷 . 酸枣仁黄酮的超声辅助提取及抗 Aβ_{1-42} 损伤的机制研究 [D]. 天津：天津商业大学，2019.
[40] 杨婷婷，房雷雷，辛慧洁，等 . 响应面法优化超声辅助提取酸枣仁中阿魏酰斯皮诺素 [J]. 食品工业，2019，40（4）：151-155.
[41] 杨婷婷，李佳怡，张彦青，等 . 响应面法优化超声辅助提取酸枣仁异牡荆素工艺 [J]. 食品工业科技，2019，40（15）：143-147.
[42] 张亚青，李莎，汪洋，等 . 生酸枣仁总黄酮的提取及 HPLC 法同时测定斯皮诺素和 6'''- 阿魏酰斯皮诺素 [J]. 江苏农业科学，2017，45（23）：198-202.
[43] 蔡雨晴，贾棹东，吴茜茜，等 . 野生酸枣仁中总黄酮的提取及其抗氧化活性 [J]. 塔里木大学学报，2016，28（3）：46-51.
[44] 王秀玲，李敏，王僧虎，等 . 超声辅助咪唑离子液提取酸枣仁中黄酮的探索 [J]. 邢台学院学报，2015，30（4）：183-186.
[45] 陈巍，秦凤贤，姜云瑶，等 . 纤维素酶法提取酸枣仁总黄酮工艺的研究 [J]. 粮食与油脂，2018，31（8）：87-91.
[46] 张明春，解军波，李婷，等 . 复合酶法提取酸枣仁黄酮研究 [J]. 食品科学，2008，29（9）：174-177.
[47] Yusoff IM，Taher ZM，Rahmat Z，et al. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds：phenolics，flavonoids，thymols，saponins and proteins [J]. Food Res Int，2022，11（12）：6-8.
[48] 梁柱华，杨建设，杨艺虹，等 . 酸枣仁中总黄酮的含量测定研究 [J]. 分析测试技术与仪器，2008，17（1）：34-37.
[49] 刘明霞 . 酸枣仁中总黄酮的含量测定 [J]. 内蒙古中医药，2011，30（1）：74-75.
[50] 李会军，李萍 . 紫外分光光度法测定酸枣仁中总黄酮的含量 [J]. 中国药科大学学报，2001，46（1）：75-76.
[51] 郑峰，阙晓，苏靖，等 . HPLC 法和 UV 法测定复方枣参片中斯皮诺素和总皂苷含量 [J]. 药学实践杂志，2017，35（2）：134-137.
[52] 卢文华，邓光明，杨凤全，等 . HPLC 法测定麦冬安神合剂中斯皮诺素含量 [J]. 亚太传统医药，2021，17（8）：59-63.
[53] 倪慧，李会军 . 高效液相色谱—测多评法测定酸枣仁中的 2 个黄酮活性成分含量 [J]. 药学与临床研究，2021，29（1）：15-18.

[54] 苏彦奇，肖咪，于宏珠，等 . 酸枣仁黄酮对照提取物的制备及其在枣仁安神颗粒含量测定中的方法学验证 [J]. 食品工业科技，2020，41（2）：233-237.
[55] 杨旭 . 酸枣仁黄酮质量控制方法及其配伍发挥解郁安神功效的作用机制研究 [D]. 天津：天津医科大学，2017.
[56] 李冰洁，宋伟，宋方芹，等 . HPLC-DAD 同时测定酸枣仁提取物中生物碱与黄酮类成分 [J]. 中药材，2017，40（10）：2376-2379.
[57] 解军波，刘艳，张彦青，等 . HPLC 法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素 [J]. 中草药，2010，41（10）：1653-1655.
[58] Zhang FX，Li M，Qiao LR，et al. Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae* Semen by UPLC/Qtof MS. with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from Ziziphus species [J]. J Pharm Anal，2016，122：59-80.
[59] Zhu XC，Liu X，Pei K，et al. Development of an analytical strategy to identify and classify the global chemical constituents of *Ziziphi Spinosae* Semen by using UHPLC with quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with multiple data-processing approaches [J]. J Sep Sci，2018，41（17）：3389-3396.
[60] 毛怡宁，武文奇，康莹，等 . 酸枣仁中化学成分的 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 快速分析 [J]. 中国中药杂志，2018，43（24）：4884-4891.
[61] 张巧月，杨浩天，史贺，等 . HPLC-MS 法同时测定酸枣仁中 9 种成分 [J]. 中草药，2015，46（1）：123-127.
[62] 王卫记，罗建光，孔令义 . HPLC-ESI-MS 分析酸枣仁有效部位的化学成分 [J]. 中国中药杂志，2009，34（21）：2768-2773.
[63] 王爽，闫艳 . 酸枣仁总黄酮的制备及质量控制研究 [J]. 山西医科大学学报，2022，53（2）：232-238.
[64] Huang Y，Feng Y，Tang GY，et al. Development and validation of a fast SFC method for the analysis of flavonoids in plant extracts [J]. J Pharm Biomed Anal，2017，140：384-391.
[65] 翟晓霏 . 紫外可见分光光度法在食品检测中的应用研究进展 [J]. 山东化工，2021，50（7）：76-78.
[66] Gumustas M，Kurbanoglu S，Uslu B，et al. UPLC versus HPLC on drug analysis：advantageous，applications and their validation parameters [J]. Chromatographia，2013，76（21）：1365-1427.
[67] 杨旭，冉瑞雪，宋伟，等 . 酸枣仁黄酮 HPLC 指纹图谱建立及 2 种成分测定 [J]. 中成药，2017，39（5）：989-992.
[68] Tarafder A. Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC：an overview [J]. Trac-trend Anal Chem，2016，81：3-10.
[69] Steinmann D，Ganzera M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis [J]. J Pharm Biomed Anal，2011，55（4）：744-757.
[70] 马聪玉，生宁，李元元，等 . 中药成分质谱分析新技术和新策略进展 [J]. 质谱学报，2021，42（5）：709-717.
[71] 湛清扬，孔繁一，吕亚男，等 . 综述脑卒中后抑郁发病机制的研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志，2022，39（4）：369-371.
[72] Liu J，Zhai WM，Yang YX，et al. GABA and 5-HT systems are implicated in the anxiolytic-like effect of spinosin in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav，2015，128：41-49.
[73] Zhang JP，Liao DQ，Li L，et al. Reduced c-Fos expression in orexin neurons of the lateral hypothalamic area and the locus coeruleus following injection of spinosin into mice [J]. Folia Morphol（Warsz），2020，79（3）：429-437.
[74] Jiang JG，Huang XJ，Chen J，et al. Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids，saponins，and polysaccharides extracted from Semen *Ziziphus jujube* [J]. Nat Prod Res，2007，21（4）：310-320.
[75] 马浩月 . 氧化应激与多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗的相关性研究进展 [J]. 中医药临床杂志，2022，34（5）：981-984.
[76] 薛晓芳，弓桂花，赵爱玲，等 . 枣和酸枣不同器官黄酮含量比较及抗氧化能力分析 [J]. 中国果树，2020，201（1）：59-63.
[77] 许玉珉 . 开心散对东莨菪碱致认知障碍模型小鼠学习记忆的影响及机制研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2018.
[78] Ko SY，Lee HE，Park SJ，et al. Spinosin，a C-glucosylflavone，from *Zizyphus jujuba* var. spinosa ameliorates Aβ1-42 oligomer-induced memory impairment in mice [J]. Biomol Ther（Seoul），2015，23（2）：156.
[79] Zhang XY，Wang JY，Gong GW，et al. Spinosin inhibits Aβ1-42 production and aggregation via activating Nrf2/HO-1 pathway [J]. Biomol Ther（Seoul），2020，28（3）：259.
[80] Gu MH，He PK，Lyu CF，et al. Spinosin and 6'''-Feruloylspinosin protect the heart against acute myocardial ischemia and reperfusion in rats [J]. Mol Med Rep，2019，20（5）：4253-4261.
[81] 任静娜，饶本龙，马宏昕，等 . 异牡荆素对大鼠心室肌细胞瞬时外向钾电流的影响 [J]. 中国中药，2017，42（24）：4864-4869.
[82] 顾民华 . 酸枣仁黄酮碳苷通过抑制 GSK3β 减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤及机制研究 [D]. 广州：南方医科大学，2019.
[83] 赵富周，丁成智，李晓明 . 异牡荆素对非小细胞性肺癌细胞自我更新和凋亡的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2022，38（3）：219-223.
[84] 袁庆 . 异牡荆素调控 MnSOD/p-CaMKⅡ表达抑制 NCI-H460 细胞致瘤性的研究 [D]. 长沙：湖南师范大学，2018.
[85] Cao X，Liu L，Yuan Q，et al. Isovitexin reduces carcinogenicity and stemness in hepatic carcinoma stem-like cells by modulating MnSOD and FoxM1[J]. J Exp Clin Cancer Res，2019，38（1）：264.
[86] Molagoda IMN，Lee K，Athapaththu AMGK，et al. Flavonoid glycosides from *Ziziphus jujuba* var. inermis（Bunge）rehder seeds inhibit α-melanocyte-stimulating hormone-mediated melanogenesis [J]. Int J Mol Sci，2021，22（14）：7701.
[87] Moon KM，Hwang Y，Yang J，et al. Spinosin is a flavonoid in the seed of *Ziziphus jujuba* that prevents skin pigmentation in a human skin model [J]. J Funct Foods，2019，54：449-456.
[88] 高群 . 酸枣仁黄酮对糖尿病大鼠肾损伤的保护作用 [J]. 安徽农业科学，2013，41（6）：2355-2357.
[89] 肖凤琴，张红印，韩荣欣，等 . 酸枣仁黄酮减轻全氟辛烷磺酸诱导小鼠肝脏氧化损伤 [J]. 基础医学与临床，2021，41（2）：184-188.

（收稿日期：2023-05-09；修回日期：2023-06-26）

ALK5 小分子抑制剂生物活性研究进展

李倩倩[1]，薛晓文[1, 2*]（1. 中国药科大学药学院，南京　211100；2. 中国药科大学药物化学教研室，南京　211100）

摘要：转化生长因子 -β（TGF-β）是一种具有广泛生物活性的细胞因子，被激活后与 TGF-β 受体结合，通过 TGF-β/Smad 与非 Smad 信号通路介导诸多生物学效应。ALK5 为该受体家族研究最为广泛的亚型之一，近年来其生物活性研究也取得了一些进展。本文就 ALK5 抑制剂在抗肿瘤、抗纤维化、促进肠神经胶质细胞转化为神经元、血脑屏障保护以及降低眼压等生物活性方面的研究进展进行简要综述。

关键词：转化生长因子 -β；ALK5；生物活性
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2698-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.022

Advances in biological activities of ALK5 small molecule inhibitors

LI Qian-qian[1], XUE Xiao-wen[1, 2*] (1. *School of Pharmacy, China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211100; 2. *Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211100)

Abstract: Transforming growth factor-β (TGF-β) is a cytokine with many biological activities. After activation, it could bind its receptors and mediate many biological effects through TGF-β/Smad and non-Smad signaling pathways. As one of the most widely studied subtypes of the receptor family, some progress has been made in the biological activities of ALK5 inhibitors in recent years. The paper reviewed the biological activities of ALK5 inhibitors in anti-tumor, anti-fibrosis, promoting the transformation of intestinal glial cells into neurons, blood-brain barrier protection and reducing intraocular pressure.

Key words: transforming growth factor-β; ALK5; biological activity

转化生长因子 -β（transforming growth factor-β，TGF-β）是一种多功能细胞因子，广泛存在于哺乳动物的组织细胞和转化细胞中，自 20 世纪 70 年代末被发现以来，已在哺乳动物中发现了 33 个该家族成员配体，包括 TGF-β、骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）、激活素、抗缪勒式管激素（anti-Müllerian hormone，AMH）、生长分化因子（growth and differentiation factors，GDF）和结节素（nodal）等。这些配体具有相似的结构，并共享信号转导的基本机制，在生物体生殖细胞、胚胎和各种组织或器官中广泛表达，与细胞增殖、分化、转分化、细胞外基质（extracellular matrix，ECM）重塑、衰老和细胞凋亡等多种细胞行为密切相关[1]。TGF-β 配体通过与细胞膜表面的特异性受体（即 TGF-β 受体）结合才能发挥生理效应。ALK5 为 TGF-β Ⅰ型受体中研究最为广泛的一个亚型，抑制该亚型可以产生抗肿瘤等作用。本文在介绍 TGF-β、相应受体及相关信号通路的基础上，对近年来报道的 ALK5 抑制剂的各种生物活性进行梳理，希望为今后的 ALK5 抑制剂研究提供有益参考。

1　TGF-β、TGF-β 受体及相关信号通路

TGF-β 是一种由两个含有 112 个氨基酸的单体通过二硫键连接的蛋白质，目前已发现 6 种亚型，其中 TGF-β1（占 90% 以上，活性最强）、TGF-β2 和 TGF-β3 3 种亚型常见于哺乳动物体内，它们能够通过与 TGF-β Ⅰ型受体（TβR Ⅰ，也称为作为激活素受体样激酶，ALK）和 Ⅱ型受体（TβR Ⅲ）这两种类型的跨膜受体的结合来触发细胞内信号[2-3]。目前，已经鉴定出 7 个 TβR Ⅰ亚型（ALK1 ～ ALK7）和 5 个 TβR Ⅱ亚型，这两种受体在所有细胞中均能表达，它们可以与相应的 TGF-β 超家族成员形成特

作者简介：李倩倩，女，硕士，主要从事抗纤维化 ALK5 小分子抑制剂研究，email：3220010083@stu.cpu.edu.cn　*通信作者：薛晓文，男，副教授，主要从事药物化学以及有机合成领域的研究，email：xwenxue@cpu.edu.cn

定的异性复合物进行信号传递，从而发挥相应的细胞功能。初始合成的 TGF-β 是以非活性前体的形式存在（即潜伏期 TGF-β），需要通过潜伏 TGF-β 结合蛋白（latent TGF-β binding protein，LTBP）和潜伏期相关肽（latency-associated peptide，LAP）组成的复合物激活后才能发挥相应的生物效应 [4]。激活后的 TGF-β 首先与 TβR Ⅱ结合进行信号传导，将 ALK5 募集到高度保守的富含 Gly-Ser 的近膜区域（GS 区）使其发生构象调节并激活 [5]。然后，被激活的 ALK5 将信号进一步传递给其下游底物 SMAD 蛋白——SMAD2 和 SMAD3，便完成了经典的 SMAD 信号通路传导（见图 1）[6]。

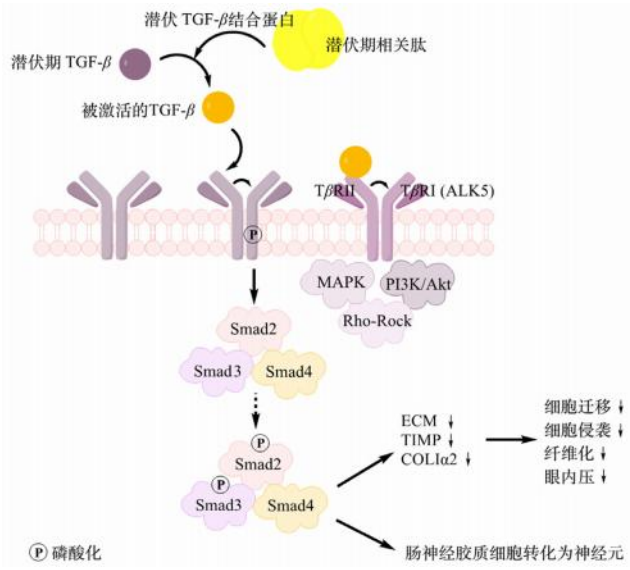


图 1　TGF-β/Smad 信号通路

Fig 1　TGF-β/Smad signaling pathway

除了经典的 SMAD 信号通路，TGF-β 还可以通过丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）、磷脂酰肌醇 -3- 激酶 / 蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）、Rho-Rock 等激活非 SMAD 途径，从而影响 TGF-β 因子下游的一些关键细胞的生长发育过程 [7]。由于 ALK5 在 TGF-β 信号通路中起着至关重要的作用，因此被视为治疗多种癌症、纤维化疾病的重要靶点。近年来，ALK5 抑制剂在治疗其他疾病如青光眼、血脑屏障损伤及肠道疾病等方面也取得了一定的进展 [8]。

2　ALK5 抑制剂的生物活性

2.1　抗肿瘤作用

TGF-β 是一种众所周知的肿瘤促进因子，如何通过抑制其活性而发挥抗肿瘤作用一直都是研究热点。体外研究显示，ALK5 抑制剂能够有效阻断 SMAD 蛋白的磷酸化，从而减少肿瘤的转移，抑制肿瘤细胞的增殖。此外，ALK5 抑制剂还可以通过阻断癌细胞的免疫逃逸来防止肿瘤侵袭 [9]。到目前为止，进行临床试验的 ALK5 小分子抑制剂有化合物 Vactosertib（EW-7197，**1**）、Galunisertib（LY-2157299，**2**）、LY-3200882（**3**）和 PF-06952229（**4**）（见图 2），且临床试验均为实体瘤方向。其中，LY-3200882 因公司战略调整，于 2019 年停止产品开发（NCT04158700）。另一产品 PF-06952229 早先用于治疗具有高 TGF-β 特征和上皮 - 间充质转化（EMT）表达的晚期或转移性癌症患者（NCT03685591），作为单一疗法并与其他治疗药物联合使用，后也因公司的战略调整，于 2021 年停止了该产品的开发。

Vactosertib 是一种口服的可逆性 TGF-β Ⅰ型受体酪氨酸激酶抑制剂，IC_{50} 为 13 nmol • L^{-1}[10]，用于治疗晚期 / 转移性癌症等。目前，针对晚期 / 转移性非小细胞肺癌（NSCLC）、转移性胰腺导管腺癌和骨髓增生异常综合征等多种实体瘤的临床试验正在展开。2017 年，该化合物在美国被授予孤儿药称号，用于治疗肝细胞癌。2020 年，Vactosertib/ 紫杉醇联合用药在美国获得孤儿药资质，用于治疗转移性胃腺癌。2021 年，该产品被指定为孤儿药，用于治疗胰腺癌。最近，Park 等 [11] 研究表明，口服 Vactosertib 可以通过抑制氧化应激、EMT、癌症干细胞（CSC）和纤维化来克服放疗在乳腺癌治疗中的局限性，因此，Vactosertib 联合放疗在临床上可能更适用于乳腺癌患者。

目前礼来公司对于 Galunisertib（IC_{50} = 56 nmol • L^{-1}）的研究正处于Ⅱ期临床开发阶段（NCT01246986），用于治疗肝细胞癌、胶质瘤和多形性胶质母细胞瘤，而该药物用于骨髓增生异常综合征治疗的Ⅱ/Ⅲ期临床试验已经完成 [12]。用于治疗转移性胰腺癌、神经胶质瘤、结直肠癌、乳腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌和子宫或卵巢癌肉瘤等的早期临床试验也已经或正在进行中。2013 年，作为欧盟指定孤儿药，Galunisertib 用于治疗肝细胞癌和神经胶质瘤。

目前处于临床前研究的 ALK5 抑制剂较多，其中有 3 个结构值得关注。Zhang 等 [13] 利用基于分子对接的虚拟筛选对商业天然产物库进行筛选，发现黄酮苷山柰酚 3-*O*- 龙胆双糖苷（KPF 3-O-G，**5**）（见图 2，IC_{50} = 2.589 mol • L^{-1}）是一种有效的 ALK5 抑制剂，这是近年来发现的为数不多的天然产物类 ALK5 抑制剂。该化合物能够通过直接与 ALK5 的 ATP 位点结合，抑制

Smad2 的磷酸化以及 Smad4 的表达，从而减少细胞增殖并抑制 TGF-β 诱导的细胞迁移和侵袭。体内研究表明，KPF 3-O-G 给药（40 mg • kg^{-1}）能够减少人卵巢癌异种移植小鼠模型中的肿瘤生长，且无明显毒副作用，表明 KPF3-O-G 具有开发成为肿瘤治疗药物的潜力。Xu 等[14]以 LY-3200882 为先导，通过对其进行药效团分析和分子对接研究，对分子中的连接环进行替换，得到了一系列 4-（吡啶 -4- 氧基）-3-（3，3- 二氟环丁基）吡唑衍生物，其中活性最好的化合物 **6**（见图 2）（IC_{50} = 30 nmol • L^{-1}）的体外、体内活性及药代动力学特征均优于 LY-3200882，表现出良好的抗肿瘤疗效。此外，由于 p38α 丝裂原活化蛋白激酶（p38αMAPK）对肿瘤坏死因子 -α 具有重要调控作用，因此，抑制 p38αMAPK 被视为治疗肿瘤的一种有效手段[15-16]。近年来，对于 ALK5 及 p38αMAPK 双靶点抑制剂的研究，也取得了较好的结果。Liu 等[17]在前人研究的基础上，设计合成了 4-（1H- 吲唑 -5- 基）-5-（6- 甲基吡啶 -2- 基）-1H- 咪唑和 4-（1- 甲基 -1H- 吲唑 -5- 基）-5-（6- 甲基吡啶 -2- 基）-1H- 咪唑两个系列的化合物，并评估了它们对 ALK5 和 p38αMAPK 的抑制作用，结果显示，化合物 J-1090（**7**，见图 2）对两者均表现出了强大的抑制作用，IC_{50} 值均为 4 nmol • L^{-1}。进一步的体外研究表明，该化合物能够通过抑制 TGF-β 诱导的 EMT 来抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。

2.2　抗纤维化作用

TGF-β1 最初被发现时，便因其能够刺激软琼脂中培养的大鼠成纤维细胞的生长，而被认为是纤维化的主要细胞因子[18]。研究表明，在多种 ECM 积累引起纤维化的器官中都能够观察到 TGF-β 的过表达[19-20]。因此，抑制 ALK5 不失为对抗各种器官纤维化的有效策略。目前，抗纤维化作用的 ALK5 小分子抑制剂均处于临床前研究阶段，尚未有药物进入临床研究阶段。

Yue 等[21]在 MPLW515L 和 JAK2V617F 小鼠模型中，发现 Galunisertib 无论在体内还是体外，均能够消除由于骨髓纤维化引起的胶原蛋白Ⅰ和胶原蛋白Ⅲ的持续过量产生，明显改善了小鼠的骨髓纤维化程度，为阻断 ALK5 作为骨髓纤维化治疗策略提供了临床前依据。Ferreira 等[22]使用 GW-788388（**8**，见图 2）对克氏锥虫（来自哥伦比亚毒株的 102 种寄生虫）感染后的小鼠进行口服治疗（3 mg • kg^{-1}），发现 GW-788388 有效逆转了富含连接蛋白 -43 的细胞间斑块的损伤，并减少了心脏组织的纤维化，因此，抑制 TGF-β 通路可能是美洲锥虫病心脏病慢性期心脏纤维化治疗的重要且可靠的策略。

Rezníckova 等[23]设计并合成了一系列以 2，3，4- 取代的 5，5- 二甲基 -5，6- 二氢 -4H- 吡咯并 [1，2-b] 吡唑结构为核心的衍生物，其中化合物 **9**（见图 2）活性最好，对 ALK5 的 IC_{50} 值为 80 nmol • L^{-1}。细胞研究表明，这些化合物能够通过引起 Smad2/3 的剂量依赖性去磷酸化，阻断 Smad2/3 向 TGF-β 刺激的细胞核的转位，呈现出抗纤维化作用。Zhu 等[24]报道了一系列含有 [1，2，4] 三唑并 [1，5-a] 吡啶 -6- 基部分的化合物，并评估了这些化合物对 ALK5 和 p38α 激酶的抑制活性，发现在吡唑环的 4- 位插入苯并 [c][1，2，5] 噻二唑 -5- 基部分可显著提高 ALK5 激酶的活性。其中最有效的化合物 **10**（见图 2）的 IC_{50} 值为 30 nmol • L^{-1}，对 p38α 激酶的选择性指数为 235，是 LY-2157299 的 59 倍，与 EW-7197 相当。免疫细胞化学染色、蛋白质印迹和 RT-PCR 测定结果均显示化合物 **10** 有效抑制了 TGF-β 诱导的肝星状细胞（HSC）活化，对肝纤维化治疗表现出极高的治疗潜力，有望成为治疗肝纤维化的临床前候选药物。Zheng 等[25]设计合成了多种噻吩并 [3，2-c] 吡啶 -2- 基吡唑衍生物，并评价了它们对 ALK5 的抑制活性，发现化合物 J-1063（**11**，见图 2）（IC_{50} = 30 nmol • L^{-1}）能够有效抑制 TGF-β 诱导的活化 HSC 的纤维化和炎症，减少硫代乙酰胺诱导的小鼠肝纤维化中巨噬细胞和中性粒细胞的浸润，其延缓肝纤维化的进展及抑制伴随的炎症的能力明显优于 Galunisertib。该化合物不仅具有优越的药理作用，而且合成相对简单，是治疗和预防肝纤维化的有希望的候选药物。

Xie 等[26]通过虚拟筛选和药效团构建设计并合成了一种新型 ALK5 小分子抑制剂 Cpd-0225（**12**，见图 2），生物活性研究表明该化合物能够通过阻断 Smad 依赖性和非 Smad 依赖性信号通路，发挥肾保护作用，在体外或体内均能发挥作用，且在相同剂量下，比 SB-431542（**13**，见图 2）具有更好的抗纤维化作用，有望成为治疗慢性肾病的有效临床候选药物。此外，由于对成纤维细胞具有较好的抑制作用，SB-431542 最新用于青光眼小梁切除术后滤过泡瘢痕化的防治，且有望替代早先使用的丝裂霉素 C 等细胞毒类药物，因为 ALK5 抑制剂具有更低的细胞毒性[27]。

2.3　促进肠神经胶质细胞转化为神经元

肠神经系统（enteric nervous system，ENS）由肠壁中的肌间神经丛和黏膜下神经丛组成，该系统主要包含肠胶质细胞和肠神经元。多种不良因素，如炎症、衰老、饮食改变、代谢紊乱等，都可能导致肠神经元损伤或 ENS 功能失调，从而引起胃肠动力和感觉功能障碍，如胃轻瘫、肠易激综合征和先天性巨结肠等[28-30]。对于患有先天性巨结肠的儿童，手术切除整个肠道结肠或部分结肠仍然是治疗的主要选择，但这种治疗不能预防生命后期发生的小肠结肠炎、便秘或失禁等终生并发症。尽管在成人肠道中产生新神经元的手段相对有限，但添加新的肠神经元来替代受损的神经元将仍是修复 ENS 功能障碍的解决方案。

Medina 等[31]研究发现，SD-208（**14**，见图 2）能够通过 TGF-β/ALK5/SMAD 通路参与实验性肠纤维化的发病机制，在厌氧菌和三硝基苯磺酸诱导的结肠炎的动物模型中，有效抑制由于 Smad2 和 Smad3 的磷酸化以及 ALK5 蛋白、组织金属蛋白酶抑制剂 -1（tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP）和 Ⅰ 型胶原 α2（α2 type 1 collagen, COL1α2）重组蛋白表达上调产生的纤维化。Shi 等[32]发现在正常成年小鼠模型中，用 RepSox（**15**，见图 2）3 及 10 mg/（kg • d）灌胃，持续给药 2 周，结果显著促进了 ENS 中肠神经胶质细胞向神经元的转化，并对小鼠的胃肠道运动产生了一定的影响。EW-7197 和 LY-257299 也能产生与 SD-208 相似的效果，并且利用 shRNA 下调肠神经胶质细胞中 ALK5 的表达也会产生类似效果，进一步证实了 ALK5 信号通路在肠神经胶质细胞向神经元的转变中发挥了重要作用。这些结果表明，抑制 ALK5 可能是一种有前途的治疗肠道疾病的有效策略。

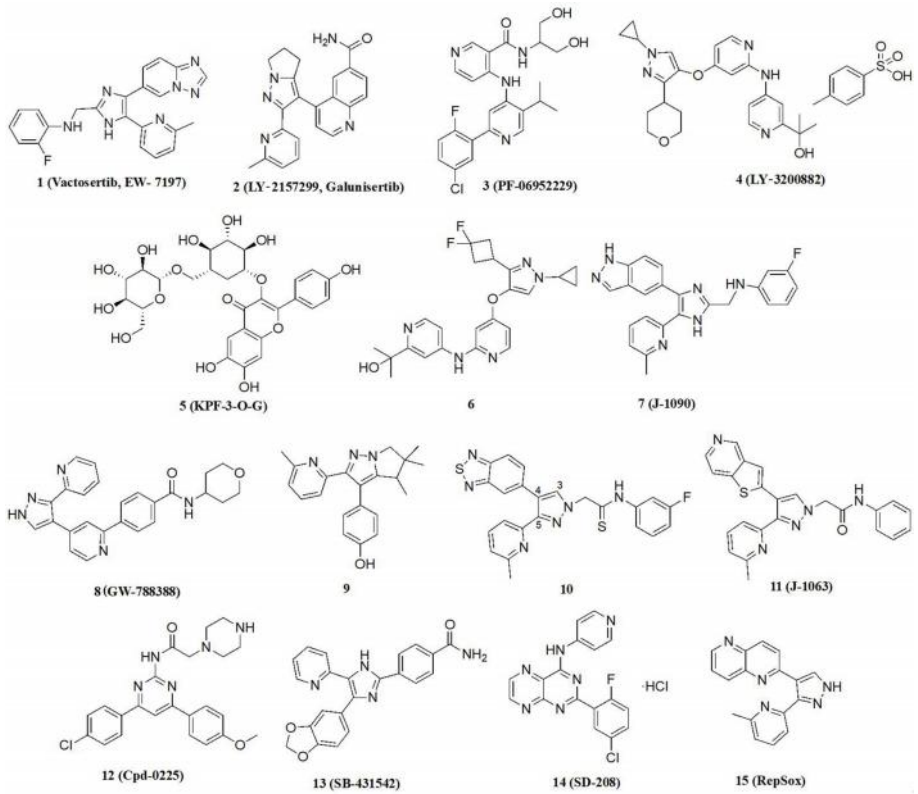


图 2　ALK5 小分子抑制剂

Fig 2　ALK5 small molecule inhibitors

2.4　血脑屏障保护作用

研究表明，星形胶质细胞中 TGF-β 受体的条件性基因敲除或 TGF-β 信号传导的药理学抑制均能够逆转老年小鼠的血脑屏障受损（blood brain barrier disruption，BBBD）。同时，在接受 TGF-β 抑制治疗的患有血脑屏障（blood brain barrier，BBB）的老年人群受试者中，发现同样的信号通路被激活[33]。

Atis 等[34]通过使用 SB-431542 对血管紧张素（angiotensin，ANG）Ⅱ 诱导的高血压小鼠进行治疗，发现 SB-431542 能够降低由于 ANGⅡ 输注引起的 BBB 对白蛋白 Alexa fluor 594 的渗透性

的增加，因此抑制 TβR Ⅰ可以防止高张力条件下 BBBD，可作为一种新的治疗方式来保护高血压患者的大脑。Preininger 等[35]使大鼠海马体长期暴露于血清白蛋白，通过 TGF-β 信号传导诱导星形胶质细胞应激诱导的早衰，发现在对 BBBD 大鼠模型每日使用 ALK5 抑制剂 IPW-53715（结构未见公布）进行给药后，海马组织中衰老星形胶质细胞的负担显著减轻，这也进一步验证了 ALK5 抑制剂 IPW-5371 能够有效预防 BBBD。

2.5　降低眼压作用

青光眼是一种进行性眼部疾病，可导致不可逆的视网膜神经节细胞死亡，是全球视力丧失的主要原因。由于现有药物或治疗方法均会产生耐药性或者不同程度的不良反应如心律失常和支气管收缩等，因此亟需开发治疗青光眼的新疗法[36-37]。

眼内压（intra-ocular pressure，IOP）升高是青光眼发生和发展最重要的危险因素，降低 IOP 已被证明可有效治疗青光眼。IOP 由房水的产生和流出控制，小梁网是房水从眼睛排出的主要途径。Aoshima 等[38]研究表明，ALK5 抑制剂 SB-431542 能够通过抑制小梁网中 ECM 的产生达到降低 IOP 的目的，并且其作用优于 Rho 相关的卷曲蛋白激酶抑制剂 Y-27632，每日一次重复使用可增强小鼠的 IOP 降低效果。因此，ALK5 抑制剂或许可以作为治疗青光眼的新疗法进行开发。

3　小结与展望

TGF-β 几乎渗透到人体内各生物学过程中的方方面面，形成了一个巨大的信号网络，其生物活性的研究一直都在进行中。ALK5 作为 TGF-β/Smad 信号通路中不可或缺的一环，其抑制剂在 TGF-β 抑制剂中占据着举足轻重的地位。虽然至今尚未有 ALK5 小分子抑制剂被批准上市，但目前在研药物中，EW-7197 和 LY-2157299 在临床试验中均有良好的表现，并且不少活性好的新型小分子抑制剂也不断被发现。尤其是具有 ALK5 抑制活性的天然产物也逐渐被发现，对其进行结构改造也呈现出广阔的前景。在生物活性方面，ALK5 小分子抑制剂除了具有抗肿瘤和纤维化作用以外，在肠道疾病、BBBD 和青光眼治疗等方面也有一定的价值。总之，随着对 ALK5 小分子抑制剂的研究深入，更多安全有效的 ALK5 小分子抑制剂将进入临床发挥治疗作用。

参考文献

[1] Jia S，Meng A. TGFβ family signaling and development [J]. Development，2021，148（5）：dev188490.

[2] Chen S，Mamai O，Akhurst RJ. TGFβ：signaling blockade for cancer immunotherapy [J]. Annu Revi Cancer Biol，2022，6（1）：123-146.

[3] Heldin CH，Moustakas A. Signaling receptors for TGF-β family members [J]. CSH Perspect Biol，2016，8（8）：a005900.

[4] Tzavlaki K，Moustakas A. TGF-β signaling [J]. Biomolecules，2020，10（3）：487.

[5] Groppe J，Hinck CS，Samavarchi-Tehrani P，et al. Cooperative assembly of TGF-β superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding [J]. Mol Cell，2008，29（2）：157-168.

[6] Wrana JL，Attisano L，Wieser R，et al. Mechanism of activation of the TGF-β receptor [J]. Nature，1994，370（6488）：341-347.

[7] Moustakas A，Heldin CH. Non-smad TGF-β signals [J]. J Cell Sci，2005，118（16）：3573-3584.

[8] 盖小雄，周启璠，陈国良 . 转化生长因子 -β 抑制剂研究进展 [J]. 药学学报，2015，50（4）：413-418.

[9] Derynck R，Turley SJ，Akhurst RJ. TGFβ biology in cancer progression and immunotherapy [J]. Nat Rev Clin Oncol，2021，18（1）：9-34.

[10] Jin CH，Krishnaiah M，Sreenu D，et al. Discovery of *N*-（（4-（[1，2，4] triazolo[1，5-a]pyridin-6-yl）-5-（6-methylpyridin-2-yl）-1H-imidazol-2-yl）methyl）-2-fluoroaniline（EW-7197）：a highly potent，selective，and orally bioavailable inhibitor of TGF-β type Ⅰ receptor kinase as cancer immunotherapeutic/antifibrotic agent [J]. J Med Chem，2014，57（10）：4213-4238.

[11] Park J，Choi J，Cho I，et al. Radiotherapy-induced oxidative stress and fibrosis in breast cancer are suppressed by vactosertib，a novel，orally bioavailable TGF-β/ALK5 inhibitor [J]. Sci Rep-Uk，2022，12（1）：16104.

[12] Santini V，Valcárcel D，Platzbecker U，et al. Phase Ⅱ study of the ALK5 inhibitor galunisertib in very low-，low-，and intermediate-risk myelodysplastic syndromes [J]. Clin Cancer Res，2019，25（23）：6976-6985.

[13] Zhang ZH，Qiao Y，Yang L，et al. Kaempferol 3-*O*-gentiobioside，an ALK5 inhibitor，affects the proliferation，migration，and invasion of tumor cells via blockade of the TGF-beta/ALK5/Smad signaling pathway [J]. Phytother Res，2021，35（11）：6310-6323.

[14] Xu GF，Zhang Y，Wang H，et al. Synthesis and biological evaluation of 4-（pyridin-4-oxy）-3-（3，3-difluorocyclobutyl）-pyrazole derivatives as novel potent transforming growth factor-β type 1 receptor inhibitors [J]. Eur J Med Chem，2020，198：112354.

[15] Zhang ZH，Mi C，Wang KS，et al. Chelidonine inhibits TNF-α-induced inflammation by suppressing the NF-κB pathways in HCT116 cells [J]. Phytother Res，2018，32（1）：65-75.

[16] Xing Y，Mi CL，Wang Z，et al. Fraxinellone has anticancer activity in vivo by inhibiting programmed cell death-ligand 1 expression by reducing hypoxia-inducible factor-1α and STAT3 [J]. Pharmacol Res，2018，135：166-180.

[17] Liu YY，Guo Z，Wang JY，et al. Synthesis and evaluation of the epithelial-to-mesenchymal inhibitory activity of indazole-derived imidazoles as dual ALK5/p38α MAP inhibitors [J]. Eur J Med Chem，2021，216：113311.

[18] Xu FY，Liu CW，Zhou DD，et al. TGF-β/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. J Histochem Cytochem，2016，64（3）：157-167.

[19] Zhao MY，Wang LQ，Wang MZ，et al. Targeting fibrosis：mechanisms and clinical trials [J]. Signal Transduct Tar，2022，7（1）：206.

[20] Ma LM，Li XY，Bai ZS，et al. AdipoRs-a potential therapeutic target for fibrotic disorders [J]. Expert Opin Ther Tar，2019，23（2）：93-106.

[21] Yue LZ，Bartenstein M，Zhao WK，et al. Efficacy of ALK5 inhibition in myelofibrosis [J]. JCI Insight，2017，2（7）：e90932.

[22] Ferreira RR，da Silva Abreu R，Vilar-Pereira G，et al. TGF-β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic Chagas' heart disease [J]. PLoS Neglect Trop D，2019，13（7）：e0007602.

[23] Rezníckova E，Tenora L，Pospisilova P，et al. ALK5 kinase inhibitory activity and synthesis of 2，3，4-substituted 5，5-dimethyl-5，6-dihydro-4H-pyrrolo[1，2-b]pyrazoles [J]. Eur J Med Chem，2017，127：632-642.

[24] Zhu WJ，Cui BW，Wang HM，et al. Design，synthesis，and antifibrosis evaluation of 4-（benzo-[c][1，2，5] thiadiazol-5-yl）-3（5）-（6-methyl-pyridin-2-yl）pyrazole and 3（5）-（6-methylpyridin-2-yl）-4-（thieno-[3，2，-c]pyridin-2-yl）pyrazole derivatives [J]. Eur J Med Chem，2019，180：15-27.

[25] Zheng GH，Liu J，Guo FY，et al. The in vitro and in vivo study of a pyrazole derivative，J-1063，as a novel anti-liver fibrosis agent：synthesis，biological evaluation，and mechanistic analysis [J]. Bioorg Chem，2022，122：105715.

[26] Xie SS，Dong ZH，He Y，et al. Cpd-0225 attenuates renal fibrosis via inhibiting ALK5 [J]. Biochem Pharmacol，2022，204：115240.

[27] Teplitsky JE，Vinokurtseva A，Armstrong JJ，et al. ALK5 inhibition of subconjunctival scarring from glaucoma surgery：effects of SB-431542 compared to mitomycin c in human tenon's capsule fibroblasts [J]. Transl Vis Sci Techn，2023，12（2）：31.

[28] Amiel J，Sproat-Emison E，Garcia-Barcelo M，et al. Hirschsprung disease，associated syndromes and genetics：a review [J]. J Med Genet，2008，45（1）：1-14.

[29] Tang DM，Friedenberg FK. Gastroparesis：approach，diagnostic evaluation，and management [J]. Dm-Dis Mon，2011，57（2）：74-101.

[30] Verheijden S，Boeckxstaens GE. Neuroimmune interaction and the regulation of intestinal immune homeostasis [J]. Am Physio Gastrointest Liver Physiol，2018，314（1）：G75-G80.

[31] Medina C，Santos-Martinez MJ，Santana A，et al. Transforming growth factor-beta type 1 receptor（ALK5）and Smad proteins mediate TIMP-1 and collagen synthesis in experimental intestinal fibrosis [J]. J Pathol，2011，224（4）：461-472.

[32] Shi CJ，Lian JJ，Zhang BW，et al. TGFβR-1/ALK5 inhibitor RepSox induces enteric glia-to-neuron transition and influences gastrointestinal mobility in adult mice [J]. Acta Pharmacologica Sinica，2023，44（1）：92-104.

[33] Senatorov VV，Friedman AR，Milikovsky DZ，et al. Blood-brain barrier dysfunction in aging induces hyperactivation of TGFβ；signaling and chronic yet reversible neural dysfunction [J]. Sci Transl Med，2019，11（521）：eaaw8283.

[34] Atis M，Akcan U，Altunsu D，et al. Targeting the blood–brain barrier disruption in hypertension by ALK5/TGF-β type I receptor inhibitor SB-431542 and dynamin inhibitor dynasore [J]. Brain Res，2022，1794：148071.

[35] Preininger MK，Zaytseva D，Lin JM，et al. Blood-brain barrier dysfunction promotes astrocyte senescence through albumin-induced TGFβ signaling activation [J]. Aging Cell，2023，22（2）：e13747.

[36] Rocha-Sousa A，Rodrigues-Araújo J，Gouveia P，et al. New therapeutic targets for intraocular pressure lowering [J]. ISRN Ophthalmol，2013，2013：261386.

[37] Kaufman PL，Mohr ME，Riccomini SP，et al. Glaucoma drugs in the pipeline [J]. Asia-Pac J Ophthalmo，2018，7（5）：345-351.

[38] Aoshima K，Inagaki S，Takagi Y，et al. ALK5 inhibitor acts on trabecular meshwork cell and reduces intraocular pressure [J]. Exp Eye Res，2023，227：109382.

（收稿日期：2023-03-06；修回日期：2023-05-18）

中药资源开发与利用

基于传承创新的中医药与现代科学结合路径探析——以砷剂治疗白血病为例

张玲玲[1, 2]，丰志培[1, 2*]，王良悦[1, 2]，向宇辰[1, 2]（1. 安徽中医药大学医药经济管理学院，合肥　230012；2. 数据科学与中医药创新发展安徽省哲学社会科学重点实验室，合肥　230012）

摘要：运用现代科学解读中医药原理，推动中医药与现代科学结合，已经成为中医药现代化的发展趋势。但当前传统中医药与现代科学结合不够，中医理论、作用机制的解释能力还不足。本文从传承创新视角出发，基于技术生命周期理论，采用案例研究方法，围绕继承创新、发展创新和集成创新三个阶段构建中医药与现代科学结合的演进路径分析框架。通过探讨砷剂治疗白血病的三阶段特点和发展规律，验证该分析框架，提出中医药与现代科学有效结合的发展路径。基于传承创新视角解释中医药如何与现代科学有效结合，既可以挖掘中医药潜在价值，也能为中医药现代化发展提供借鉴。

关键词：中医药产业；传承创新；案例研究；砷剂；白血病
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2704-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.023

Combination of Chinese medicine and modern science via inheritance and innovation——taking arsenic for leukemia as an example

ZHANG Ling-ling[1, 2], FENG Zhi-pei[1, 2*], WANG Liang-yue[1, 2], XIANG Yu-chen[1, 2] (1. *School of Pharmaceutical Economics and Management*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Data Science and Innovative Development of Chinese Medicine of Anhui Province*, *Anhui Provincial Key Laboratory of Philosophy and Social Sciences*, *Hefei* 230012)

Abstract: To use modern science to explain and clarify the clinical efficacy and principles of Chinese medicine has become a trend in the modernisation of Chinese medicine. But at present, traditional Chinese medicine is not sufficiently integrated with modern science, and the explanatory power of Chinese medical theories and mechanisms of action is lacking. From the perspective of inheritance and innovation, this paper adopted a case study approach based on the technology life cycle theory to establish an analytical framework for the evolution of combining Chinese medicine with modern science from three stages: inheritance innovation, development innovation and integrated innovation. By exploring the characteristics and development patterns of the three stages of arsenic treatment for leukaemia, we validated the analytical framework and proposing a pathway for effective integration of Chinese medicine with modern science. Through inheritance and innovation, we explained how Chinese medicine could be effectively integrated with modern science, which not only reveals the potential value of Chinese medicine, but also provides reference for the development of Chinese medicine.

Key words: traditional Chinese medicine industry; inheritance and innovation; case study; arsenic; leukemia

基金项目：安徽省哲学社会科学规划项目（No.AHSKY2021D143）；安徽省高等学校科学研究项目（哲学社会科学）（No.2022AH050436）。
作者简介：张玲玲，女，在读硕士研究生，主要从事中医药产业经济研究，email：2399633255@qq.com　*通信作者：丰志培，男，教授，博士研究生导师，主要从事中医药产业经济研究，email：zhipeif@126.com

2019 年发布的《中共中央国务院关于促进中医药传承创新发展的意见》中指出“要挖掘和传承中医药宝库中的精华精髓，促进中医药传承与开放创新发展”[1]。中医药与现代科学的结合是促进中医药传承创新的必由之路。如今，中医药与现代科学结合已经取得了一系列优秀成果。例如：我国发现砷剂治疗急性早幼粒细胞白血病（APL）并成功解析其作用机制，是世界抗肿瘤史上的重大突破；我国原创治疗糖尿病的唯一有效组分天然药物“桑枝总生物碱片”，是十几年来我国首个获批的中药创新药[2-3]；中药连花清瘟在新型冠状病毒感染的治疗中得到广泛应用，多次被列为呼吸系统传染性疾病治疗的推荐药物[4]。

中医药与现代科学结合在疾病防治、保障人类生命健康方面发挥出独特优势，是中医药现代化发展的关键一步。但是目前中医药与现代科学交叉融合还不够，因此，为了加快传统中医药与现代科学的结合，本文选取砷剂治疗白血病为代表性案例，从传承创新视角出发，基于“肯定疗效，规范标准，发现机制”的科学范式，构建中医药与现代科学结合的演进路径分析框架，探究传统中医药与现代科学结合的演进规律和发展路径，以期为推动中医药科学化、现代化发展提供借鉴。

1　文献综述与分析框架

1.1　文献综述

当前，关于中医药传承创新的研究主要聚焦于中医药理论传承创新和中医药临床传承创新两部分：

一是对中医药理论传承创新的探讨。李雅方等[5]通过梳理中医药理论发展脉络，提出要用现代科学推进中医药理论传承集成研究。丁书文等[6]认为中医经典理论应在传承中创新，在创新中发展，理论创新最终要能解决临床问题。孙荣国等[7]指出，丰富中医药理论应避免生搬硬套，要以中医药理论与辨证施治实践为主体，在充分消化、吸收的基础上推动中医药理论与实践的进步。杨金生[8]强调要运用现代科技在临床实践中解读中医药作用机制与运行机制。

二是对中医药临床传承创新的研究。陶立元等[9]从不同角度分析了近 20 年中国中医药传承创新方面的科研成果，为促进中医药临床创新研究提供了参考。江佳林等[10]采用现代科研评价方法，建立了“理论体系 - 治则治法 - 疗效机制 - 药物开发 - 试验 - 临床运用”的中医药发展新模式。罗才贵[11]基于中医临床疗效提出，要从认清继承和创新的关系、培养创新思维、创新能力和中医基础理论创新三个方面实现中医药创新发展。

关于中医药与现代科学结合的研究以两者结合的意义和路径较多。首先，关于中医药与现代科学结合的意义，薛晓娟等[12]认为，以现代科学技术为支撑做好中医药领域工程科技发展战略和规划，是发展中医药事业的关键一步。罗国安等[13]提出，精准医学将推动中医药现代化研究，也将为创建新医药学提供推力。徐安龙等[14]认为，传承中医精华，融合现代科技，构建中医生命科学学科，对于推动医学理论创新有重要意义。其次，关于中医药与现代科学结合路径，李红梅[15]认为要充分借鉴科学成果，寻求中医学与现代技术的融合，建立兼具中医药特色和现代科技成果的心血管急危重症防治新格局。陶永鹏等[16]基于大数据背景提出，要结合中医药特点构建中医药大数据平台来推动中医药现代化。王良悦等[17]从中西医结合的内涵出发，认为中医与现代科技的融合将成为中西医发展的方向。

综上，这些研究成果很好地说明了中医药的发展离不开与现代科学技术的交叉融合，从现代科学的角度解读中医药学原理是推动中医药传承创新的重要途径。但是，目前有关中医药与现代科学结合的研究，在视角上大多着眼于中西医结合层面[17]、政策分析工具层面[18]和大数据分析层面[16]，缺少传承创新视角的研究；在研究对象上主要聚焦于中医药与现代科学结合意义[12-14]和结合路径[15-17]方面，缺少对典型中医药案例的研究。鉴于此，本文参考已有研究成果，从传承创新视角出发，构建中医药与现代科学结合的演进路径分析框架，分析砷剂治疗白血病案例的阶段特点及发展规律，进而提出中医药与现代科学有效结合的路径，旨在推进传统中医药科学性转化和现代化发展。

1.2　分析框架

本文将中医药与现代科学结合视为聚焦在继承创新、发展创新和集成创新三个阶段的发展过程。即首先在传统中医药理论指导下对古方二次开发实现继承创新，然后在继承创新的基础上进一步结合现代科技进行发展创新，最后通过解析作用机制并利用中西医结合互补优势进行集成创新。本研究着眼于传承创新视角下，建立中医药与现代科学结合的演进路径分析框架，如图 1 所示。

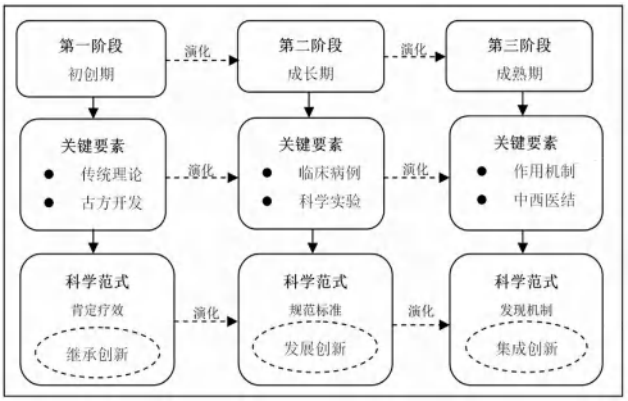


图 1　中医药与现代科学结合的演进路径分析框架

Fig 1　Analytical framework for the evolution of combining Chinese medicine with modern science

2　案例选择与介绍

2.1　案例选择

遵循案例选择的典型性和数据可获得性原则[19]，本文选取砷剂治疗白血病作为研究对象的理由如下：

首先，该案例具有典型性：砷剂治疗白血病是迄今中国对人类医学较为重要的贡献之一，该案例的实验结果代表性强；其次，案例的数据具有可获取性：该案例是中医药传承创新发展的重点案例，相关研究论文成果比较丰富，可借鉴的研究资料较多。本文的数据样本和案例文本资料均来自公开发布的信息，以中国知网文献、国家中医药管理局和各大正规新闻媒体官网报道为主要信息来源。通过不同来源的资料对同一事件的描述和报道来进行相互印证，在一定程度上保证了研究的信度。

2.2　案例介绍

2.2.1　初创期（1971—1979 年）　20 世纪 70 年代初，哈尔滨医科大学附属第一医院的韩太云医师在下乡巡回医疗时偶然发现了一个能治疗癌症的“民间偏方”，其中含有砒霜、轻粉、蟾酥等药物[20]。1971 年 3 月，韩太云医师将“偏方”做成肌内注射液，并命名为“713”溶液，亦称“癌灵”[21]。但是，碍于当时的技术和医疗条件并未解析出“癌灵”的具体有效成分，且该“偏方”多为剧毒药物，难以有效控制溶液毒性，所以并没有成为当时有效的抗癌药物。

2.2.2　成长期（1979—1996 年）　为解析出“癌灵”的有效成分，1972 年，张亭栋教授与韩太云医师合作研制出“癌灵注射液”[21]，并观察其治疗白血病的效果。1973 年，张亭栋等[22]发表了用“癌灵注射液”治疗 6 例慢性粒细胞白血病患者（4 例肌内注射，2 例静脉滴注）后改善的论文，并特别指出其中 1 例为急性变病例。1979 年，通过整理提高，张亭栋等[23]发文总结运用“癌灵 1 号”注射液治疗共计 55 例急性粒细胞型白血病，通过与其他疗法相结合治疗急性粒细胞型白血病的分析，明确提出了“癌灵 1 号”注射液的有效成分是三氧化二砷（As_2O_3）且对 APL 更敏感。1996 年张鹏等[24]通过临床病例研究得出“713”（As_2O_3）注射液对 APL 有较高疗效，毒副作用少而轻并与其他药物无交叉耐药性。

2.2.3　成熟期（1996—至今）　陈竺院士团队经过反复临床验证和对相关机理的深入研究，于 1996 年参加国际血液病学术大会并阐明了三氧化二砷治疗白血病作用机制，引起国际肿瘤界的高度重视[25]。随后，美国相关科学家对三氧化二砷治疗 APL 进行重复试验，验证了这一中国方案的可行性和有效性，并于 2001 年批准了三氧化二砷为治疗 APL 的新药[26]。至此砷剂治疗白血病的研究进入成熟期。

3　案例讨论

3.1　初创期：继承创新

3.1.1　中医药传统理论继承　首先是对“以毒攻毒”理论的继承。以毒攻毒是恶性肿瘤的治疗大法，亦是中医思维的体现，临床上使用的许多化疗药物如三尖杉酯碱、喜树碱、长春新碱等均借鉴了相关有毒性的中药。韩太云医师最早发明的“癌灵”中多含有砒霜（主要成分为三氧化二砷）等药物[27]，而白血病俗称血癌，主要是由于细胞内脱氧核糖核酸变异，使骨髓中造血组织产生过多不成熟的白细胞，导致骨髓产生其他血细胞的功能降低。而三氧化二砷正是通过促进细胞凋亡、诱导细胞不完全分化来治疗白血病[28]。癌症患者的临床治疗效果证明了以砷剂的“毒”来克服白血病细胞的“毒”，后续解析作用机制提供了更精准可信的分子细胞药理学证据，科学地继承了中医“以毒攻毒”的传统理论。

3.1.2　古方二次开发　韩太云医师在传统中医学理论的指导下，对民间古方进行筛选，发明了以砒霜、轻粉、蟾酥为主要成分的“癌灵”，当时部分患者的改善也肯定了其疗效，形成了砷剂治疗白血病的产品雏形。中医药的发展是从民间来并走向民间的继承发展过程，它承载着历代医家学术之精华，而传统古方更是许多疑难杂症的实践指南。正是因为对古方的不断收集和总结才能完善诊疗思路、健全中医理论体系。初创阶段正

是从继承“以毒攻毒”理论和古方的二次创新两个方面，实现了砷剂治疗白血病的第一次继承创新，该阶段中医药理论知识的积累也促进研究向着更加完善、多元的方向发展，同时为成长期的发展创新奠定了坚实基础。

3.2　成长期：发展创新

3.2.1　科学技术实验　中医药科学性、有效成分的检验需要现代科学技术来打开新的突破口。以初创期的“癌灵”为基础，张亭栋[29]为弄清其各成分的具体疗效，将原方分成两组做了体外抑瘤实验，研究发现，由砒霜、轻粉组成的“癌灵 1 号”注射液连续用药会出现蛋白尿，所以去除了轻粉；由砒霜、蟾酥组成的“癌灵 2 号”注射液，注射后会使血压升高，故再去掉蟾酥；最终仅保留少量的氯化汞，将三氧化二砷作为治疗药物的主要成分，并将原本的口服给药改为静脉注射给药，研制成可供肌内注射和静脉注射的“癌灵注射液”[22]。通过分析进一步说明，成长期发展要以初创期的传统理论为指导，再利用科学技术实验挖掘主要成分并解析作用机制。

3.2.2　临床病例分析　药物的疗效离不开临床实践结果的检验，“癌灵注射液”在成长期能够取得优秀的研究成果，也源于其充足的临床病例试验和分析。张亭栋教授与其同事从发掘一个民间药方开始，持续探索性研究达 24 年，经过 1200 多例各类白血病的临床试验研究，证实“癌灵 1 号”注射液的有效成分是三氧化二砷，且对治疗 APL 最敏感、效果最好[21]。经过初创期的理论沉淀和产品基础，张亭栋教授等经过反复充足的临床病例解析出“癌灵 1 号”注射液的有效成分，规范了配比技术，为后续单独运用三氧化二砷注射液治疗 APL 提供了明确指导，实现了砷剂治疗白血病第二阶段的发展创新，使传统的剧毒药砒霜成为可静脉滴注治疗白血病的有效药物。

3.3　成熟期：集成创新

3.3.1　解析作用机制　经过成长期的产品积累，以中医药疗效最大化为重点，用现代科学技术解析中医药原理，降低治疗的随机性、盲目性就成为了接下来研究的重点。为克服三氧化二砷毒性较大的副作用，王振义院士和陈竺院士团队进一步对“癌灵 1 号”注射液治病的作用机制进行解析，发现较高剂量的砷剂可诱导 APL 细胞凋亡；而在较低剂量但较长时间作用下则促进细胞不完全分化，主要取决于药物浓度和持续作用的时间[28]。因此证明了三氧化二砷是通过诱导白血病细胞凋亡和分化而发挥治疗作用，为三氧化二砷注射液作为治疗 APL 的有效药物提供了分子细胞药理学的证据，也打开了抗肿瘤中医药研究的全新思路。

3.3.2　中西医结合　针对重大疑难疾病、慢性病、病毒性疾病等，西医使用的化学药物会存在部分毒副作用影响部分治疗效果。而以中医药思维为指导，结合西医检测的准确性，就能快速、有效把握病理，抓住病源，对症下药。早期使用的全反式维甲酸诱导分化治疗 APL 存在维甲酸综合征及耐药性，后期治疗效果并不理想，而后期研究发现加入砷剂不仅能明显缓解维甲酸产生的耐药性，而且两者合用治疗效果更佳[30]。并且，维甲酸和三氧化二砷无交叉耐药[31]。中国在 APL 研究中取得的原创性成果：将三氧化二砷与西药结合治疗，提高了患者的五年无病生存率，并使得该联合治疗方法成为全世界治疗 APL 的标准疗法[32]。经过初创期的理论积累和成长期的关键成分识别，成熟期通过进一步解析砷剂治疗白血病的作用机制和首创中西医结合疗法实现了第三阶段的集成创新。

4　结论与建议

4.1　研究结论

本文基于传承创新视角，从继承创新、发展创新和集成创新三个阶段构建了中医药与现代科学结合的演进路径分析框架，以砷剂治疗白血病为例分析各阶段的特点和发展规律，进一步验证了分析框架，并得出以下结论：

其一，系统理论知识奠定中医药基础。在中医药与现代科学结合的各个环节当中，理论知识是技术突破的首要基础，传统中医理论能有效指导中医药与现代科学结合的发展方向。系统的理论知识从原理、治疗方法、配比技术等方面肯定了中医药疗效，为后期的技术突破和疗效提高提供方法论指导，并贯穿整个中医药与现代科学结合的整个过程。

其二，现代科学技术规范中医药标准。当理论知识积累到某种程度时，理论知识需要依托自身发展特点和实践经验，与现代科技结合，拓宽其应用范围，与不同行业和研究领域相融合。利用现代科学技术规范传统中医药疗法，验证与发展中医药理论体系中曾经无法解析的部分，是去伪存真、阐明中医药原理的有效手段。

其三，中西医结合提升中医药疗效。中西医结合恰好汲取中医、西医两者精华，将之融会贯通并服务于人类疾病防治，是具有中国特色的医

学发展模式。充分吸收中医药精华，以提高临床疗效为目标，借鉴西医现代科学技术，两者相互配合才能拓宽中医药与现代科学结合的道路。

4.2　建议

4.2.1　坚持中医药理论指导　在推进中医药传承创新的过程中，应当进一步坚持中医药理论的指导，实事求是地参照、更新与提高。坚持中医药理论指导，首先要加强中医药的基础理论学习。整理发掘中医药文献资料和经典古籍是我国中医药进行自主创新的独特优势，要高度重视挖掘和传承中医药宝库中的知识、诊疗技术，开办名老中医学术经验交流座谈会，积极收集筛选民间中医药秘方。其次，注重理论学习与临床实践相结合。利用交叉学科融合的优势建立中医药多层级研究中心，加强基础理论、诊疗规律及作用机制研究。最后，要客观评价传统中医药疗效。由于古今疾病的诊断内涵差异，应正确区分中医药的个别案例与经验总结，客观看待中医药治疗的有效性和安全性，对其现代应用的可能性作出理性判断。

4.2.2　综合运用现代科技成果　首先，可利用现代科技将中医古今医案和文献资料数据化、可视化。通过云计算技术整理经典医学著作中的治疗方法，提炼临床经验和治疗病例，解析诊疗规律，形成关于不同病例通识性的诊疗思路与规范措施；利用大数据技术梳理各家医学派思想和发展史，建立国医大师、中医药专家学术思想和临床实践案例数据库。其次，可借鉴现代物理学、生命科学等多学科最新研究成果来解析中医药原理和作用机制，客观、真实分析现代科学技术与中医药相互配合的有效途径与方式，科学开发中医药资源。最后，可突破相关技术将中医药传统化语言转换为现代中药数字化语言，解决中医药生产加工过程中信息识别的难题，推进中医药数字化、信息化与工业化研究。

4.2.3　重视中西医结合研究　首先，建立中医医院与西医医院协同联动的中西医科研交流平台。依托中西医结合在临床上的特殊疗效，完善跨学科、交叉学科的疾病会诊方案，建立中西医联合诊疗制度，促进中西医开放合作。以西医的实验分析方法来验证中医治疗原理和途径；以中医的系统论方法来缓解西医化学药物毒性，更好地发挥中西医结合在疾病诊治方面的独特优势。其次，构建具有中西医结合特色的人才培训制度。采取“实验＋临床”结合形式，开展中西医系统培训学习，完善中西医结合人才培养方案和管理制度。最后，加大对中医药创新型人才和团队的资助力度，鼓励高校毕业生到中医药各行业中创业就业，拓宽中医药人才培养通道，打造一批具有综合素质和能力的中医药人才。

参考文献

[1] 中共中央国务院关于促进中医药传承创新发展的意见 [EB/OL]. https：//www. gov. cn/zhengce/2019-10/26/content_5445336. html.

[2] 用现代科学解读中医药学原理 [EB/OL]. https：//www. cntcm. com. cn/2021-05/24/content_90249. html.

[3] 刘率男，刘泉，刘玉玲，等 . 桑枝总生物碱片研发历程回顾（二）：现代药理学理念诠释中药的药效特点及药理作用机制 [J]. 中国糖尿病杂志，2020，28（8）：635-640.

[4] 贾振华，李红蓉，常丽萍，等 . 中医学应对疫病的历史回顾与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（11）：1-7.

[5] 李雅方，梁瑞琼，邱鸿钟 . 中医理论研究现状分析及发展对策研究 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（11）：5280-5283.

[6] 丁书文，李晓，杨金龙 . 从心系疾病热毒学说的建立论中医药传承创新思路 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（6）：2355-2358.

[7] 孙荣国，贾晓蓉 . 论中医药学的理论、实证与应用 [J]. 华西医学，2021，36（10）：1469-1473.

[8] 杨金生 . 守疗效之正，创共识之新——对中医理论现代传承创新发展研究的思考 [J]. 中国中医基础医学杂志，2022，28（1）：6-8.

[9] 陶立元，冯玉婷，商洪才 . 近 20 年中医药临床研究创新发展 [J]. 科技导报，2022，40（23）：24-29.

[10] 江佳林，赵丽娴，汤慧敏，等 . 基于从理论到循证的创新中医药发展新模式探析 [J]. 时珍国医国药，2019，30（7）：1699-1700.

[11] 罗才贵 . 中医临床疗效与中医药创新发展 [J]. 中国医院管理，2007，27（2）：43-46.

[12] 薛晓娟，郑文科，黄明，等 . 中医药领域工程科技发展中的问题与思考 [J]. 天津中医药大学学报，2022，41（2）：137-140.

[13] 罗国安，谢媛媛，王义明，等 . 精准医学与中医药现代化研究——五论创建新医药学 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2017，19（1）：19-29.

[14] 徐安龙，史渊源，卢涛，等 . 中医生命科学的构思 [J]. 北京中医药大学学报，2020，43（8）：623-629.

[15] 李红梅 . 心血管急危重症中医药现代化防治模式创新与全链条干预策略 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（12）：5935-5940.

[16] 陶永鹏，刘朝霞，项聪 . 大数据背景下有关中医药现代化思路的探讨 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（2）：470-473.

[17] 王良悦，丰志培，申国明，等 . 基于“双＋”模型的中西医结合路径探析 [J]. 中国卫生事业管理，2022，39（2）：89-92.

[18] 邓月明，聂海洋 . 基于政策工具的我国中医药传承创新政策分析 [J]. 中国药房，2021，32（1）：1-5.

[19] 樊天，樊春良 . 社会资本视角下大学衍生企业的创业发

展——对科大讯飞的案例研究 [J]. 中国科技论坛，2021（9）：62-70.
[20] 饶毅，黎润红，张大庆 . 化毒为药：三氧化二砷对急性早幼粒白血病治疗作用的发现 [J]. 中国科学：生命科学，2013，43（8）：700-707.
[21] 陈士奎 . 我国开创的中西医结合科研及其启示（九）——张亭栋教授等与中药砒霜治疗急性早幼粒细胞白血病的中西医结合研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2017，37（11）：1292-1296.
[22] 张亭栋，张鹏飞，王守仁，等 .“癌灵注射液”治疗 6 例白血病初步临床观察 [J]. 黑龙江医药，1973（3）：66-67.
[23] 张亭栋，荣福祥 . 癌灵一号注射液与辨证论治治疗急性粒细胞型白血病 [J]. 黑龙江医药，1979（4）：7-11.
[24] 张鹏，王树叶，胡龙虎，等 .“713”治疗急性早幼粒细胞白血病 117 例临床观察及机制探讨（摘要）[J]. 哈尔滨医科大学学报，1995，29（3）：243.
[25] 王守东，孟凡红，陈淑娟等 . 基于实例分析的中药产品拓展美国市场的启示 [J]. 环球中医药，2012，5（7）：532-535.
[26] 李永明 . 砒霜治疗白血病的三次高潮和创新点 [J]. 中国中西医结合杂志，2017，37（4）：401-405.
[27] 赵明强 . 中药创新的典范：砒霜抗癌的专利故事 [J]. 中国发明与专利，2012（4）：79-82.
[28] 陈国强，史桂英，贾培敏，等 . 三氧化二砷对急性早幼粒细胞性白血病细胞株的双重效应研究 [J]. 中华医学杂志，1997，77（7）：30-33.
[29] 张亭栋 . 含砷中药治疗白血病研究——谈谈癌灵 1 号注射液对白血病的治疗 [J]. 中国中西医结合杂志，1998，18（10）：581.
[30] 吴晓丹 . 全反式维甲酸联合三氧化二砷治疗初发急性早幼粒细胞白血病的近期疗效分析 [J]. 中国医药指南，2018，16（1）：96-97.
[31] 王振义 . 白血病靶向治疗的应用 [J]. 中国实用内科杂志，2005，25（6）：500-503.
[32] 中国科学家王振义、陈竺荣获第七届圣 • 乔奇癌症研究创新成就奖 [J]. 中国中西医结合杂志，2012，32（3）：293.

（收稿日期：2023-03-14；修回日期：2023-06-13）

《中南药学》2024 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学学术交流，我刊现在开始启动 2024 年“毕业季”论文征稿。凡在校全日制药学硕、博毕业研究生的研究论文、综述，一经录用，即可在我刊 2024 年 1 — 6 月刊刊出。

《中南药学》杂志是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊，被美国 CA 和波兰 IC 等国外知名数据库收录，被中国核心期刊（遴选）数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库和解放军医学图书馆数据库等收录。内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、医院药学、生化药物、中药与天然药物等各个方向。

具体征稿要求及处理如下：

1. 与药学相关的研究论文或综述；
2. 在论文正文标题前及注册投稿时标题前标注“毕业季”；
3. 全日制硕士、博士毕业研究生；
4. 文章将快速处理、优先刊登、按时出版；
5. 投稿时间：即日起至 2024 年 1 月底；
6. 出刊时间：2024 年 1 月 20 日、2 月 20 日、3 月 20 日、4 月 20 日、5 月 20 日和 6 月 20 日，共 6 期，带基金项目的文章优先刊登；
7. 投稿网址：http://znyx.cbpt.cnki.net，请注册投稿。

如有任何疑问可联系我们：

Tel：0731-82258487，0731-84895602

email：znyxzz2003@vip.163.com

药物分析与检验

超高效液相色谱串联质谱法测定除臭类化妆品中乌洛托品及 13 种喹诺酮类抗菌物质

涂晓琴[1, 2]，钟慧[1, 2]，吴姣娇[1, 2]，殷帅[1, 2]，黄海萍[1, 2]，潘小红[1, 2*]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙 410001；2. 湖南省药品质量评价工程技术研究中心，长沙 410001）

摘要：目的　建立同时测定化妆品中乌洛托品及 13 种喹诺酮类抗菌物质含量的超高效液相色谱 - 串联质谱（UPLC-MS/MS）方法，并用于实际样品的检测。**方法**　样品经饱和氯化钠作用，再加入 50% 乙腈（*V/V*）超声提取，以 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵 - 乙腈为流动相，梯度洗脱，在多反应离子监测（MRM）模式下以电喷雾离子源、正离子模式进行扫描，基质匹配标准曲线外标法定量。**结果**　14 种目标成分在 6.22 ～ 256.80 ng • mL^{-1} 内与测定值线性关系良好，相关系数均大于 0.994；加标回收率为 83.7% ～ 115.7%，相对标准偏差均小于 5.0%，检测限均低于 0.007 μg • kg^{-1}。**结论**　该方法简单、快速、灵敏，能够满足化妆品中乌洛托品及 13 种喹诺酮类抗菌物质的检测需求。

关键词：UPLC-MS/MS；化妆品；乌洛托品；喹诺酮类；抗菌物质
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2710-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.024

Determination of methenamine and 13 quinolone antibiotics in deodorizing cosmetics by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry

TU Xiao-qin[1, 2], ZHONG Hui[1, 2], WU Jiao-jiao[1, 2], YIN Shuai[1, 2], HUANG Hai-ping[1, 2], PAN Xiao-hong[1, 2*] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To determine methenamine and 13 quinolone antibiotics in cosmetics by UPLC-MS/MS. **Methods** The samples were treated with saturated sodium chloride, and extracted with ultrasonic by 50% acetonitrile (*V/V*). The target components were determined with electrospray ion source (ESI) in the positive ion multi reaction monitoring mode, and quantified by matrix matching standard curve external standard method. **Results** Good linearities of the 14 target components were obtained in the range of 6.22 ～ 256.80 ng•mL^{-1}, with the correlation coefficients greater than 0.994. The spiked recoveries ranged 83.7% ～ 115.7% with *RSD*s less than 5.0%. The limits of detection were all lower than 0.007 μg • kg^{-1}. **Conclusion** The method is simple, rapid and sensitive, which meets the detection requirements of methenamine and 13 quinolone antibiotics determination in cosmetics.

Key words: UPLC-MS/MS; cosmetics; methenamine; quinolone; antibiotics

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ80039）。
作者简介：涂晓琴，女，硕士，工程师，主要从事保健食品及化妆品检测分析，email：305178299@qq.com　*通信作者：潘小红，女，硕士，高级实验师，主要从事食品、药品及化妆品的检测与应用研究，email：txq18229874735@163.com

随着现代社会的发展和人们自我关注的增强，体味的遮盖和消除越来越受到重视，止汗除臭类化妆品作为个人卫生护理品市场的三大产品之一，其全球市场销售额居个人护理品的前列[1-2]。研究表明，除臭化妆品达到除臭效果通常有以下两种方式：① 通过强力的收敛作用来抑制汗液的过度排出，间接除臭；② 抑制微生物对汗液的降解减少恶臭物质的产生[3-4]。除臭产品的热销让商家看到了商机，为追求利益、达到良好的除臭效果，不法商家违法在化妆品中添加抗菌药物类抑菌剂，越来越多的化妆品中被检出此类违法添加物[5]。

乌洛托品一般作为防腐剂添加到化妆品中，在弱酸性条件下可分解产生甲醛和氨，起到杀菌作用[6]；喹诺酮类物质具有良好的抗菌性能，能有效抑制微生物分解汗液来减少不良气味。乌洛托品和喹诺酮类物质虽能有效减少臭气产生，但长期使用含此类物质的化妆品存在安全风险，可引起皮肤过敏、皮炎和湿疹，并伴有奇痒和脱皮等症状，同时也会导致对抗菌药物产生耐药性[7-8]。《化妆品安全技术规范》（2015 年版）[9] 中化妆品准用防腐剂列表删除了乌洛托品，且规定抗菌药物类药物不得作为原料或组分添加到化妆品中。2021 年 1 月 1 日开始施行的《化妆品监督管理条例》[10]，除臭化妆品不再作为特殊化妆品，而是作为普通化妆品管理，管理的松懈更是让不法商家看到可趁之机，该类化妆品中的非法添加物质风险仍然很高。

《化妆品安全技术规范》（2015 年版）[9] 仅规定了依诺沙星等 10 种组分的检测方法，乌洛托品也鲜少有与其他组分同时测定的报道。本文通过优化提取溶剂、流动相等关键因素，采用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱（UPLC-MS/MS）检测除臭化妆品中乌洛托品及 13 种喹诺酮类抗菌药物（依诺沙星、氟罗沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星、司帕沙星、莫西沙星、那氟沙星），并对市场上不同包装剂型的除臭化妆品进行检测，为除臭化妆品的质量安全监测提供技术支撑。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LC-30A 超高效液相色谱仪（日本岛津公司）；API5500 三重四极杆质谱仪，配电喷雾离子源（ESI）（美国 AB Science 公司）；PM5-2000TD 型超声波清洗仪（英国 PRIMA 公司）；Multifuge X1 型高速冷冻离心机（美国 Thermofisher 公司）。

1.2　试药

氯化钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；甲酸、乙腈、甲酸铵（色谱纯，德国 Merck 公司）；水为一级实验用水。

乌洛托品溶液（批号：2204556，质量浓度：1000 mg•L^{-1}，ANPEL）；双氟沙星盐酸盐（批号：D0017994，纯度：96.6%，BePure）；依诺沙星（批号：130453-201802，纯度：91.5%）、氟罗沙星（批号：130158-200902，纯度：99.2%）、诺氟沙星（批号：130450-201907，纯度：99.6%）、氧氟沙星（批号：130450-201907，纯度：99.5%）、培氟沙星（批号：130459-201402，纯度：71.3%）、环丙沙星（批号：130451-201904，纯度：83.1%）、洛美沙星（批号：130452-201603，纯度：90.4%）、恩诺沙星（批号：510117-201501，纯度：100%）、盐酸沙拉沙星（批号：510118-201501，纯度：100%）、司帕沙星（批号：130461-201502，纯度：99.4%）、莫西沙星（批号：510140-202003，纯度：95.6%）、那氟沙星（批号：130462-201001，纯度：97.0%）（中国食品药品检定研究院）。

样品来源于随机抽取市场和网络销售宣称具除臭作用的化妆品，共 126 批，采样区域覆盖省会城市、地级市、市县 / 区县；采样点涉及网购平台、批发市场、商场及小商店。

2　方法与结果

2.1　检测条件

2.1.1　色谱条件　色谱柱：十八烷基键合硅胶质谱柱（100 mm×2.1 mm，3 μm）；柱温：40 ℃；流动相：A 为 5 mmol•L^{-1} 甲酸铵溶液，B 为乙腈；流速：0.3 mL • min^{-1}；进样量：3 μL；梯度洗脱程序设置见表 1。

表 1　洗脱程序

Tab 1　Gradient elution program

时间 /min	流动相 A/%
0	95
4	85
12	50
13	5
17	5
18	95
20	95

2.1.2　质谱条件　MS 条件：电喷雾离子源；正离子多离子反应监测模式（ESI^{+}）；喷雾电压：4500 eV；离子源温度：500 ℃；离子源气体：50 psi；辅助气：25 psi；气帘气：35 psi；离子驻留时间：20 ms；相应的母离子、子离子、碎裂电压（DP）和碰撞电压（CE）等参数见表 2。

2.2　溶液制备

表 2　14 种目标化合物质谱检测条件

Tab 2　MS parameters of 14 target compounds

化合物	保留时间 / min	母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	DP/V	CE/V
乌洛托品	1.00	141.2	112.0	100	20
			85.1		22
依诺沙星	7.64	321.1	232.0	110	47
			303.1		32
氟罗沙星	7.84	370.2	269.1	50	34
			326.0		27
诺氟沙星	7.88	320.3	276.2	100	20
			233.2		30
氧氟沙星	7.92	362.0	318.1	100	20
			261.2		50
培氟沙星	8.01	334.2	233.1	110	37
			290.1		23
环丙沙星	8.02	332.2	231.0	100	20
			288.1		50
洛美沙星	8.17	352.4	265.2	100	30
			308.2		24
恩诺沙星	8.42	360.2	245.1	50	38
			342.2		29
沙拉沙星	8.93	386.3	299.1	110	38
			342.1		24
双氟沙星	9.05	400.2	299.1	100	39
			356.0		27
司帕沙星	9.09	393.3	349.2	100	29
			292.2		31
莫西沙星	9.36	402.2	261.1	100	34
			364.5		35
那氟沙星	11.92	361.1	343.2	100	33
			283.1		20

2.2.1　标准溶液配制

① 标准储备溶液：分别称取乌洛托品、依诺沙星、氟罗沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星、司帕沙星、莫西沙星、那氟沙星适量，用乙腈配制成 1 g • L^{-1} 的各单标标准储备溶液，于 4 ℃条件下保存。

② 混合标准品工作溶液：精密移取上述各单标标准储备液 0.1 mL，置 10 mL 量瓶中，用 50% 乙腈定容，摇匀，得 10 mg • L^{-1} 混合标准工作溶液，于 4 ℃条件下保存。

③ 系列标准曲线溶液：分别精密移取混合标准品工作溶液适量，用 50% 乙腈稀释成 10、25、50、75、100、150 ng•mL^{-1} 的系列对照品工作液。

2.2.2　供试品溶液的制备　准确称取化妆品样品（实际样品或空白样品）0.2 g（精确到 0.0001 g），置于 10 mL 离心管中，准确加入 3 mL 饱和氯化钠溶液，涡旋 30 s，分散均匀，加入乙腈 5 mL，涡旋 30 s，超声提取 20 min，静置至室温，加水定容至刻度，摇匀，以 8000 r•min^{-1} 离心 5 min，滤过 [必要时取上清液适量用 50% 乙腈稀释至标准曲线浓度范围内，稀释液经 0.22 μm 滤膜过滤] 后进样测定。

2.2.3　样品测定和结果计算　按上述条件测定加标标准溶液和待测溶液，采用特征离子丰度比进行定性，根据表 3 回归直线方程定量，按式（1）计算样品中目标组分的含量。

$$\omega = (\rho \times V \times D)/m \quad (1)$$

式中：ω 代表样品中待测组分的质量分数（μg • g^{-1}）；ρ 代表从标准曲线得到待测组分的质量浓度（ng•mL^{-1}）；V 代表样品定容体积（mL）；m- 样品取样量（g）；D- 稀释倍数（如未稀释则为 1）。

2.3　基质效应

基质效应是指样品中除分析物以外的其他成分对待测物测定值的影响 [11]，测定标准样品，尽可能保持样品中基质不变，建立一个校正曲线，用基质标准曲线与溶剂标准曲线的斜率比值进行评估 [12-13]。公式如下：

$$MF = K_a/K_b$$

式中，K_a 代表基质标准曲线的斜率；K_b 代表溶剂标准曲线的斜率；MF 代表基质效应，$MF < 1$ 表示基质抑制；$MF > 1$ 表示基质增强。

2.4　色谱条件的优化

使用十八烷基键合硅胶质谱柱，参考该类物质的常用流动相 [9]，水相通常选 0.1% 甲酸溶液或 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵，有机相选择甲醇和乙腈。试验结果表明，在 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵条件下，目标化合物色谱峰响应更高，依诺沙星的色谱峰峰形更好。有机相为乙腈时，峰形更好、柱压相对更低。综合考虑选 0.1% 甲酸溶液和乙腈作为流动相，在此条件下，14 种目标化合物能有效分离。

2.5　提取条件的优化

参考化妆品样品的常规处理方法 [9]，比较下列两种处理方式：① 50% 乙腈溶液直接超声提取；② 饱和氯化钠溶液处理后用乙腈提取。试验结果表明，加入饱和氯化钠溶液处理后样品溶液杂峰明显减少。最终确定样品前处理方式：准确称取化妆品样品 0.2 g（精确到 0.0001 g），置于 10 mL 离心管中，准确加入 3 mL 饱和氯化钠溶液，涡旋 30 s，再准确加入 5 mL 乙腈，超声提取 30 min，放至室温后，加水定容至刻度，混匀，过滤后作为供试品溶液备用。

2.6　方法性能评估

2.6.1　线性关系与检测限　在确定的最优色谱和质谱条件下，配制一系列不同浓度（6.22 ～ 256.80 ng • mL^{-1}）的混合标准溶液进行测定，以各成分的定量离子对峰面积（Y）对质量浓度（X）绘制标准曲线，结果见表 3。

2.6.2　基质效应　向水状及粉状阴性基质中分别加

表 3　14 种目标化合物的线性关系、相关系数、方法检出限和定量限

Tab 3　Calibration curves，correlation coefficients，limit of detection and limit of quantification of 14 target compounds

化合物	标准曲线	范围 /（ng • mL^{-1}）	相关系数	检测限 /（μg • kg^{-1}）	定量限 /（μg • kg^{-1}）
乌洛托品	$Y = 2.965\times10^4X - 4.267\times10^4$	10.00 ～ 150.00	0.9992	0.0061	0.020
依诺沙星	$Y = 1.140\times10^5X + 2.056\times10^5$	16.28 ～ 244.17	0.9962	0.0039	0.013
氟罗沙星	$Y = 6.143\times10^4X + 6.954\times10^5$	10.60 ～ 158.92	0.9940	0.0024	0.0079
诺氟沙星	$Y = 1.393\times10^4X + 9.734\times10^4$	10.98 ～ 164.64	0.9966	0.0043	0.014
氧氟沙星	$Y = 5.480\times10^4X + 5.582\times10^5$	12.64 ～ 189.55	0.9948	0.0042	0.014
培氟沙星	$Y = 3.695\times10^4X + 2.373\times10^5$	12.11 ～ 181.71	0.9975	0.0057	0.019
环丙沙星	$Y = 1.481\times10^4X + 7.580\times10^5$	6.22 ～ 93.37	0.9995	0.0011	0.0037
洛美沙星	$Y = 5.787\times10^4X + 1.370\times10^5$	13.49 ～ 202.45	0.9971	0.0041	0.014
恩诺沙星	$Y = 7.552\times10^4X - 1.638\times10^5$	16.11 ～ 241.65	0.9967	0.0050	0.017
沙拉沙星	$Y = 3.014\times10^4X + 1.394\times10^5$	17.12 ～ 256.80	0.9961	0.0051	0.017
双氟沙星	$Y = 6.864\times10^4X - 1.849\times10^4$	9.22 ～ 138.36	0.9994	0.0034	0.011
司帕沙星	$Y = 1.415\times10^4X + 7.939$	12.41 ～ 186.23	0.9964	0.0026	0.0087
莫西沙星	$Y = 1.266\times10^4X - 2.825\times10^4$	10.07 ～ 151.05	0.9997	0.0037	0.012
那氟沙星	$Y = 1.393\times10^4X + 9.734\times10^4$	10.98 ～ 164.64	0.9966	0.0016	0.0052

入不同体积“2.2.1”项下混合标准品工作溶液，配制成 10、25、50、75、100、150 ng • mL^{-1} 的系列基质对照品工作液，进样测定，计算基质效应，结果司帕沙星为强基质效应，其余 13 种目标组分均为强抑制效应[14]。化妆品的水状和粉状基质的存在影响了色谱系统活性位点与待测物分子的作用，使得 14 种待测成分检测信号增强或减弱，在实际的样品含量测定中，为减轻基质效应的影响，均以基质标准曲线来计算实际含量。

2.6.3　加标回收率与重复性　取阴性的水状样品作为基质进行加标回收测定，精密称取 12 份于 10 mL 比色管中（0.2 g/ 份），分别加入适量混合标准品工作溶液，使其达到 10 ng • mL^{-1}（低浓度，3 份）、30 ng • mL^{-1}（中浓度，6 份）和 50 ng • mL^{-1}（高浓度，3 份），准确加入 3 mL 饱和氯化钠溶液，按“2.2.2”项下方法制备，进样测定，计算方法回收率和 *RSD*，结果见表 4，空白基质在低、中、高浓度的提取回收率在 83.7% ～ 115.7%，*RSD* 均小于 5.0%。

以阴性水状基质加标至中浓度（30 ng•mL^{-1}）的 6 份样品回收率结果计算重复性（见表 4），14 种目标化合物的回收率在 83.7% ～ 108.7%，*RSD* 均低于 4.5%。

2.6.4　准确度　为验证方法的准确度，精密称取水状基质和粉状基质阴性样品各 3 份于 10 mL 比色管中（0.2 g/ 份），分别加入适量混合标准品工作溶液，使其达到 30 ng • mL^{-1}，准确加入 3 mL 饱和氯化钠溶液，按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法处理，结果见表 5，不同基质提取回收率均在 83.0% ～ 115.3%，*RSD* 均小于 5.0%。

2.7　实际样品测定

共采集除臭化妆品 126 批，包含水状和粉状

表 4　14 种目标化合物的方法回收率结果 (水状基质)

Tab 4　Recovery of 14 target compounds (aqueous matrix)

化合物	低浓度		中浓度		高浓度	
	回收率 / %	*RSD*/ %	回收率 / %	*RSD*/ %	回收率 / %	*RSD*/ %
乌洛托品	85.7	4.3	108.7	2.2	99.7	2.1
依诺沙星	84.2	3.8	87.3	2.5	87.4	2.8
氟罗沙星	92.4	4.2	90.3	3.2	95.8	2.9
诺氟沙星	115.7	4.5	100.6	4.1	100.4	3.8
氧氟沙星	83.9	3.5	88.4	2.3	87.8	1.9
培氟沙星	102.4	3.8	91.7	2.8	93.1	3.1
环丙沙星	105.2	3.1	105.5	2.9	97.8	3.5
洛美沙星	90.1	4.8	90.6	3.9	87.4	4.2
恩诺沙星	91.3	2.9	89.3	3.1	100.4	2.4
沙拉沙星	86.2	3.3	91.4	4.2	93.3	2.8
双氟沙星	109.5	4.3	92.2	3.7	85.0	3.9
司帕沙星	86.4	4.2	83.7	4.5	92.1	4.1
莫西沙星	84.0	3.7	90.0	3.8	90.2	2.7
那氟沙星	91.0	4.8	86.2	3.6	86.4	3.2

表 5　14 种目标化合物的准确度结果

Tab 5　Method accuracy of 14 target compounds

化合物	水状基质		粉状基质	
	回收率 /%	*RSD*/%	回收率 /%	*RSD*/%
乌洛托品	107.4	2.6	99.7	3.8
依诺沙星	88.5	3.1	85.0	4.0
氟罗沙星	86.8	2.9	89.9	3.5
诺氟沙星	95.7	3.8	96.3	2.7
氧氟沙星	89.3	3.1	92.2	2.8
培氟沙星	90.6	2.9	85.8	3.1
环丙沙星	106.1	3.1	115.3	2.8
洛美沙星	92.1	3.7	97.8	3.2
恩诺沙星	90.5	2.8	96.6	2.5
沙拉沙星	92.5	3.4	89.0	3.7
双氟沙星	91.7	3.5	99.8	2.7
司帕沙星	84.3	4.1	83.0	3.1
莫西沙星	91.4	3.5	93.4	2.7
那氟沙星	87.1	3.9	88.4	3.3

样品，由于基质效应对结果影响较大，实际样品含量测定中，采用基质标准曲线计算。经检测，1 批样品检出乌洛托品 1.7 mg • g^{-1},《化妆品安全技术规范》（2015 年版）[9] 将乌洛托品从准用防腐剂目录中删除，但并未列入《已使用化妆品原料目录》（2021 年版），其安全性有待商榷；喹诺酮类物质为禁用组分，经检测，大部分喹诺酮类物质未检出，极少样品检出目标组分培氟沙星、恩诺沙星，但检出量均低于方法检测限（培氟沙星 0.0057 μg • kg^{-1}，恩诺沙星 0.0050 μg • kg^{-1}），无法准确定量，且由于检出峰较小，离子丰度比匹配不上，需进一步确证。《化妆品监督管理条例》[10] 规定除臭化妆品监管由注册转向备案，本次检测发现该类化妆品仍存在风险物质，建议化妆品监管部门适当增加该类化妆品的监督抽检，保障大众用妆安全。

3　讨论

3.1　分析方法优化

乌洛托品及喹诺酮类物质在除臭类化妆品中检出量较低，对分析方法的灵敏度要求较高。文献报道喹诺酮类物质多采用高效液相色谱 - 质谱法检测 [15-16]；乌洛托品可采用气相色谱法、液相色谱法、高效液相色谱 - 质谱联用法、气相色谱 - 质谱联用法等 [17]，都为单组分测定。本试验需要同时检测乌洛托品和喹诺酮类物质，综合考虑采用 UPLC-MS/MS 法。化妆品成分复杂，对目标组分易产生干扰，本试验样品处理过程中，加饱和氯化钠溶液破除基质乳化效应，沉淀部分杂质后，再以提取溶剂提取目标组分，能有效降低干扰，增强目标成分的响应值。在选择流动相时，充分考虑目标组分的理化性质，喹诺酮类物质酸度系数（p*K*a）在 5.5 ～ 6.9，在酸性介质中更易电离 [18]；乌洛托品作为甲醛缓释剂，酸性条件下易电离 [19]，选碱性甲酸铵缓冲盐溶液能有效避免其分解。有机相选择甲醇和乙腈时，目标化合物色谱峰响应值相当，但乙腈为流动相时，柱压相对更低，目标组分的峰形也更好。

3.2　研究结果分析

本研究发现，除臭化妆品中仍存在乌洛托品及个别抗菌成分检出的情况，化妆品安全风险依然存在，UPLC-MS/MS 同时测定乌洛托品及 13 种喹诺酮类抗菌检测方法可提高化妆品检测的工作效率，利于监测化妆品中抗菌物质的含量，对化妆品中抗菌药物的监管和监督具有重要意义。随着社会的发展和科技进步，化妆品中非法添加风险物质种类不断增加，多为目前标准体系外的组分，建议扩展化妆品非法添加物质库，建立统一的检验标准，降低化妆品中的高风险药物成分引发的风险；加强技术能力建设，开发高通量筛查系统，开展非法添加趋势分析等，提高监管系统打击非法添加的能力。

参考文献

[1] 裘炳红，高志红 . 现代化妆品科学与技术 [M]. 北京：中国轻工业出版社，2016：1446.

[2] 龚盛昭 . 止汗除臭剂研究进展 [J]. 香料香精化妆品，2004，10（5）：30-34.

[3] Callewaert C，Hutapea P，Van de Wiele T，et al. Deodorants and antiperspirants affect the axillary bacterial community [J]. Arch Dermatol Res，2014，306（8）：701-710.

[4] 崔小倩，赵梦恬，陈彦君，等 . 除臭剂与除臭化妆品的研究进展 [J]. 日用化学工业（中英文），2022，52（10）：1122-1127.

[5] 杨艳伟，刘思然，张卫强，等 . 化妆品中可能出现的禁用组分调查 [J]. 环境与健康杂志，2017，34（1）：48-52.

[6] 张爱芝，张书芬，王全林，等 . 超高压液相色谱 - 串联质谱法测定腐竹、米线、年糕中的乌洛托品 [J]. 食品安全质量检测学报，2013，4（2）：472-478.

[7] 贾雅莉，李杨，毛洪宾，等 . 631 例化妆品皮肤病回顾性分析 [J]. 皮肤性病诊疗学杂志，2021，28（3）：197-201.

[8] 张大燕 . 浅谈抗生素滥用的危害及预防对策 [J]. 心理月刊，2020，8（15）：230-236.

[9] 中华人民共和国国家食品药品监督管理总局 . 化妆品安全技术规范 [S]. 2015 年版 . 北京：中国标准出版社，2015.

[10] 中华人民共和国国务院 . 中华人民共和国国务院令第 727 号 [A].（2020-06-16）. https：//www. gov. cn/zhengce/2020-12/27/content_5573797. html.

[11] Chambers E，Wagrowski-Diehl DM，Lu Z，et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses [J]. J Chromatogr B，2007，852（1-2）：22-27.

[12] 王小乔，邱国玉，杨志敏，等 . 液质联用高通量检测技术基质效应评价与消除 [J]. 现代食品，2020（12）：44-46.

[13] 许晓敏，李凌云，林恒，等 . 基质效应对液相色谱串联质谱分析农药残留的影响研究 [J]. 农产品质量与安全，2019，6：11-15.

[14] 李道霞，黄丽娟，辜慧，等 . HPLC-MS/MS 法检测动物源性食品中喹诺酮类药物的基质效应及其补偿措施研究 [J]. 中国食品卫生杂志，2022，34（4）：693-699.

[15] 郑佳新，贾昌平 . 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定化妆品中 23 种抗生素 [J]. 日用化学工业，2021，51（12）：1250-1258.

[16] 陈静，郑荣，毛北萍，等 . 高效液相色谱 - 质谱联用法同时测定化妆品中 19 种喹诺酮类抗生素 [J]. 香料香精化妆品，2020，49（6）：80-86.

[17] 张文，陈晨，刘坤，等 . 乌洛托品检测中仪器分析技术研究新进展 [J]. 食品安全导刊，2019，9：105.

[18] 卢剑，寻知庆，汪晨霞，等 . 高效液相色谱串联质谱法测定化妆品中 15 种喹诺酮类抗生素 [J]. 日用化学工业，2019，49（6）：403-409.

[19] 敦萌，魏玉龙，陈雷 . 不同基质食品中乌洛托品残留量的检测方法研究 [J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（4）：1561-1565.

（收稿日期：2023-02-23；修回日期：2023-03-21）

蒙花锚肝宁片质量标准研究

问静，韩达斌，汪永明，王永晶，祁彦凯，刘海青，刘学良*（青海省药品审评核查中心，西宁　810007）

摘要：目的　建立蒙花锚肝宁片的鉴别及含量测定方法。**方法**　采用薄层色谱（TLC）法对椭圆叶花锚有效成分 1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮和熊果酸进行定性鉴别，采用高效液相色谱（HPLC）法测定蒙花锚肝宁片中有效成分木犀草素、1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮和当药苷的含量。**结果**　在 TLC 色谱中，1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮和熊果酸色谱鉴别斑点清晰，且阴性样品无干扰；HPLC 测定木犀草素、1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮和当药苷三种成分分别在 0.0028 ～ 0.0560 μg、0.0715 ～ 1.430 μg、0.0020 ～ 0.0402 μg 内与峰面积呈良好的线性关系，平均加样回收率在 96.76% ～ 99.26%（*RSD* ＜ 1.3%）。**结论**　该方法专属性强，简便可行，灵敏度高，能有效的控制蒙花锚肝宁片的内在质量。

关键词：蒙花锚肝宁片；薄层色谱法；高效液相色谱法；1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮；熊果酸；木犀草素；当药苷

中图分类号：R283，R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2715-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.025

Quality standard of Menghuamao Ganning tablets

WEN Jing, HAN Da-bin, WANG Yong-ming, WANG Yong-jing, QI Yan-kai, LIU Hai-qing, LIU Xue-liang* (*Qinghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Xining* 810007)

Abstract: Objective To improve the quality standards of Menghuamao Ganning tablets. **Methods** l-hydroxy-3, 4, 5-trimethoxyxanthon, and ursolic acid in Menghuamao Ganning tablets were identified by thin layer chromatography (TLC). Luteolin, l-hydroxy-3, 4, 5-trimethoxyxanthon, ursolic acid, and sweroside in Menghuamao Ganning tablets were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The spots in the thin layer chromatography were clear, and the negative control had no interference. The injection mass of luteolin, l-hydroxy-3, 4, 5-trimethoxyxanthon and sweroside showed a good linear relationship with the peak area in the range of 0.0028 ～ 0.0560 μg, 0.0715 ～ 1.430 μg and 0.0020 ～ 0.0402 μg, respectively. The average recoveries were 96.76% ～ 99.26% (*RSD* ＜ 1.3%). **Conclusion** The method is simple, accurate and sensitive, which can be used for the quality control of Menghuamao Ganning tablets.

Key words: Menghuamao Ganning tablet; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; l-hydroxy-3, 4, 5-trimethoxyxanthon; ursolic acid; luteolin; sweroside

蒙花锚肝宁片是由椭圆叶花锚（*Halenia elliptica* D.Don）的带花全草经 70% 乙醇提取、浓缩后加工制成的浸膏片，具有清“协日”，利胆退黄的功效，临床用于治疗“协日”热引起的肝胆热症，黄疸[1]。椭圆叶花锚，藏名甲地然果，为龙胆科植物椭圆叶花锚的干燥地上部分，花期采收，全草入药，产于西藏、青海、云南、贵州等地，文献记载该药材具有清热利湿，平肝利胆之功效[1-3]。目前，蒙花锚肝宁片收载于《卫生部药品标准 蒙药分册》[1]，只有性状、薄层鉴别及检查项（片剂制剂通则项目），专属性不强，无含量测定项目。为了更全面地控制该产品的内在质量，本试验将蒙花锚肝宁片进行定性定量研究，建立了椭圆叶花锚的薄层色谱鉴别方法，采用高

基金项目：青海省基础研究项目（No.2020-ZJ-747）。

作者简介：问静，女，主管药师，主要从事药品审评核查工作，email：412818388@qq.com　*通信作者：刘学良，男，副主任药师，主要从事药品审评核查工作，email：93684218@qq.com

效液相色谱法对椭圆叶花锚中主要成分进行了含量测定研究。研究证明，该方法简便快捷，专属性强，现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪，Waters 2998 型二极管阵列检测器（美国沃特世有限公司），ME204 电子天平 [感量 0.1 mg，梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]，XS105DU 型分析天平（感量 0.01 mg，瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司），SB25-12DT 超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司），Milli-Q2355 型超纯水机（美国密理博公司）。

1.2　试药

木犀草素（批号：111720-202111，含量：99.1%）、熊果酸（批号：110742-200517，含量：99.3%）、当药苷（批号：111742-200501，含量：99.27%）、1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮（批号：111744-200501，含量：100.0%）(中国食品药品检定研究院)。甲醇（色谱纯，德国默克股份两合公司）；磷酸（色谱纯，上海安谱试验科技股份有限公司）；水为超纯水。硅胶 G 薄层板、硅胶 GF_{254} 薄层板（青岛海洋化工有限公司）。5 批蒙花锚肝宁片样品（规格：0.25 g，批号：190803、190804、190805、190806、190807，三普药业有限公司）。椭圆叶花锚药材采自青海省互助县北山林场（2022 年 7 月 29 日花期采集），经青海省药品审评核查中心刘海青主任药师鉴定为椭圆叶花锚的干燥带花全草，在试验中作为对照药材使用。

2　方法与结果

2.1　薄层鉴别 [4-9]

2.1.1　1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮的鉴别　分别取 5 批次蒙花锚肝宁片，除去包衣，研细，各称取 0.2 g，置具塞锥形瓶中，加 10 mL 甲醇超声处理（频率 35 kHz，功率 350 W）30 min，滤过，滤液挥干，残渣加甲醇 1 mL 使溶解，作为供试品溶液。另取椭圆叶花锚对照药材 1 g，同法制成对照药材溶液。再取 1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮对照品，加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液，作为对照品溶液。阴性样品溶液按处方比例去除椭圆叶花锚，并按供试品溶液方法制备。照薄层色谱法（《中国药典》2020 年版四部通则 0502）试验，吸取上述 4 种溶液各 5 μL，分别点于硅胶 GF_{254} 薄层板上，以石油醚（60 ～ 90 ℃）- 丙酮（7∶3）作为展开剂，展开，取出，晾干。置紫外光灯（254 nm）下检视，供试品色谱中，在与对照药材、对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点，阴性样品无干扰（见图 1）。

2.1.2　熊果酸的鉴别　分别取 5 批次蒙花锚肝宁片，除去包衣，研细，各称取 0.25 g，置具塞锥形瓶中，加 5 mL 乙酸乙酯超声处理（频率 35 kHz，功率 350 W）15 min，滤过，取滤液作为供试品溶液。另取熊果酸对照品，加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液，作为对照品溶液。再取椭圆叶花锚对照药材 1 g，同法制成对照药材溶液。阴性样品溶液按处方比例去除椭圆叶花锚，并按供试品溶液方法制备。照薄层色谱法（《中国药典》2020 年版四部通则 0502）试验，吸取上述 4 种溶液各 4 μL，分别点于硅胶 G 薄层板上，以甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸（20∶4∶0.5）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以硫酸乙醇溶液（3 → 10），在 80 ℃加热至斑点显色清晰。在日光下检视，供试品在与对照色谱相应的位置上，显相同的紫红色斑点。后置紫外光灯（365 nm）下检视，显相同的橙黄色荧光斑点，阴性样品无干扰（见图 2）。

2.2　含量测定 [10-17]

2.2.1　色谱条件与系统适用性试验　色谱柱为 Waters SunFir ODS C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），用甲醇 -0.05% 磷酸溶液为流动相，进行梯度洗脱（见表 1），流速为 1.0 mL • min^{-1}；柱温为 30 ℃；检测波长为 254 nm；进样量为 5 μL。

表 1　梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution procedure

时间 /min	甲醇 /%
0 ～ 5	25 → 30
5 ～ 7	30
7 ～ 15	30 → 70
15 ～ 25	70 → 80
25 ～ 30	80 → 25
30 ～ 35	25

2.2.2　对照品溶液的制备　精密称取木犀草素对照品 7.13 mg，1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮对照品 14.30 mg，当药苷对照品 10.10 mg，分别置 100 mL、20 mL、100 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得 0.0707 mg • mL^{-1} 的木犀草素对照品溶液，0.7150 mg • mL^{-1} 的 1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮对照品溶液，0.1003 mg • mL^{-1} 的当药苷溶液。取上述 3 种对照品溶液 2 mL、5 mL、1 mL 置 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得含木犀草素 0.0028 mg • mL^{-1}、1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫

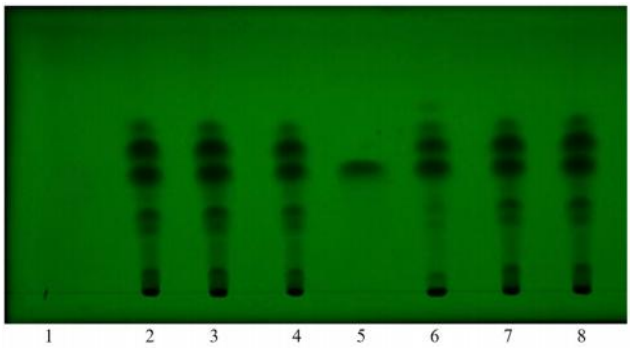


图 1　1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮 TLC 鉴别图（T：19 ℃，RH：43%）

Fig 1　TLC chromatography of l-hydroxy-3，4，5-trimethoxyxanthon（T：19 ℃，RH：43%）

1. 阴性样品（negative sample）；2 ～ 4、7 ～ 8. 蒙花锚肝宁片（Menghuamao Ganning tablets）；5.1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮对照品（l-hydroxy-3，4，5-trimethoxyxanthon reference substance）；6. 椭圆叶花锚对照药材（reference medicinal material）

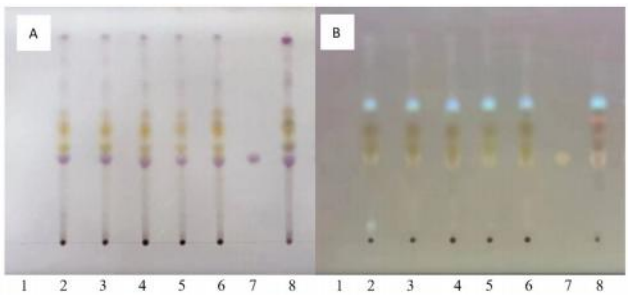


图 2　熊果酸 TLC 鉴别图（T：23 ℃，RH：38%）

Fig 2　TLC chromatography of ursolic acid（T：23 ℃，RH：38%）

A. 日光（sunlight）；B. 紫外光（ultraviolet，365 nm）；1. 阴性样品（negative sample）；2 ～ 6. 蒙花锚肝宁片（Menghuamao Ganning tablets）；7. 熊果酸对照品（ursolic acid reference substance）；8. 椭圆叶花锚对照药材（reference medicinal material）

酮 0.0715 mg • mL^{-1}、当药苷 0.0020 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液的制备　取蒙花锚肝宁片样品（批号：190803）适量，研细，取约 0.1 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定重量，超声（功率 250 W，频率 50 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，0.22 μm 滤过，取续滤液作为 HPLC 测定供试品溶液。

2.2.4　阴性样品溶液的制备　蒙花锚肝宁片由椭圆叶花锚单味药材制成，故阴性样品溶液为取辅料按供试品溶液的制备方法制得。

2.2.5　专属性试验　精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 5 μL，进样测定，采用外标两点法对峰面积和进样浓度进行计算。在本文色谱条件下木犀草素、1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮、当药苷与样品中其他成分分离良好，阴性样品无干扰，理论板数均不低于 3000，与样品中其他相邻成分分离度均大于 1.5（见图 3）。

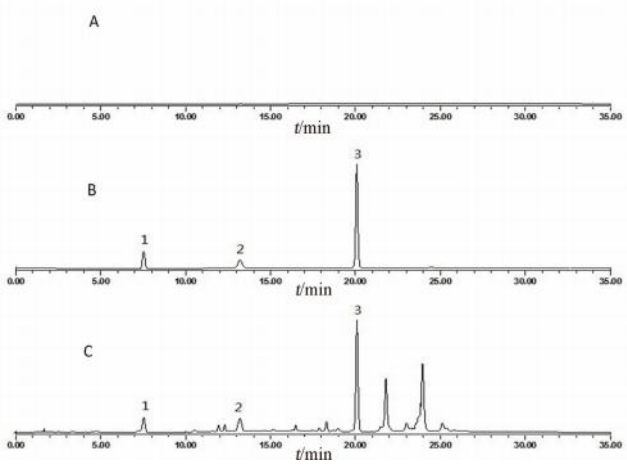


图 3　蒙花锚肝宁片 HPLC 色谱图

Fig 3　HPLC chromatograms of Menghuamao Ganning tablet

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；C. 供试品溶液（test solution）；1. 当药苷（sweroside）；2. 木犀草素（luteolin）；3. 1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮（l-hydroxy-3，4，5-trimethoxyxanthon）

2.2.6　线性关系考察　分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量，稀释成系列浓度对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，以进样量对峰面积进行回归，计算回归方程及线性范围，结果见表 2。3 种成分在相应范围内与峰面积线性关系良好。

表 2　3 种成分的回归方程、线性范围及相关系数

Tab 2　Regression equation，linearity and correlation coefficients of 3 components

成分	回归方程	范围 /μg	r
木犀草素	$y = 2.813\times10^6x - 234.7$	0.0028 ～ 0.0560	0.9998
1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮	$y = 6.473\times10^6x - 3.539\times10^4$	0.0715 ～ 1.430	0.9999
当药苷	$y = 1.496\times10^6x - 353.2$	0.0020 ～ 0.0402	0.9997

2.2.7　精密度试验　精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积，测得木犀草素、1- 羟基 -3，4，5- 三甲氧基呫酮、当药苷峰面积 *RSD* 分别为 1.4%、0.13%、1.2%，结果表明方法精密度良好。

2.2.8　稳定性试验　取“2.2.3”项下供试品溶液，

按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、8、16、24 h 进行测定，记录峰面积，测得木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮、当药苷峰面积 *RSD* 分别为 1.0%、0.57%、0.69%，结果表明供试品中木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮、当药苷在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9　重复性试验　取蒙花锚肝宁片样品（批号：190803）6 份，按“2.2.3”项下方法制备，按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，计算木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮、当药苷平均含量分别为 1.057 mg/ 片、4.936 mg/ 片、0.194 mg/ 片，其 *RSD* 分别为 0.49%、0.92%、0.86%。结果表明该方法重复性良好。

2.2.10　加样回收试验　精密称取木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮、当药苷对照品适量，经稀释得到质量浓度依次为 0.0419 mg • mL^{-1}、0.1964 mg • mL^{-1}、0.0079 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。称取蒙花锚肝宁片样品（批号：190803）9 份，每份 0.1 g，研细，精密称定，置锥形瓶中，3 份一组，每组分别精密加入上述混合对照品溶液 5、10、15 mL，再依次加甲醇 20、15、10 mL，按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液，进样测定，计算回收率。结果木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮、当药苷低、中、高平均回收率及 *RSD* 值分别为 98.92%（1.3%）、98.52%（0.97%）、98.28%（1.2%），97.15%（1.3%）、97.65%（1.0%）、96.76%（1.2%），99.26%（0.84%）、98.35%（1.1%）、97.65%（0.72%），表明该方法准确度良好。

2.2.11　样品含量测定　5 批次蒙花锚肝宁片粉末各取约 0.1 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，并计算各批次蒙花锚肝宁片中木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮、当药苷的含量。结果 5 批次蒙花锚肝宁片中木犀草素含量在 0.75 ～ 1.05 mg/ 片、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮含量在 3.88 ～ 5.02 mg/ 片、当药苷含量在 0.12 ～ 0.20 mg/ 片，见表 3。

表 3　样品含量测定结果 (n = 5)

Tab 3　Content of samples (n = 5)

批号	木犀草素		1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮		当药苷	
	含量 /（mg/ 片）	*RSD*/%	含量 /（mg/ 片）	*RSD*/%	含量 /（mg/ 片）	*RSD*/%
190803	1.05	0.82	4.95	0.20	0.19	0.13
190804	0.88	1.1	5.02	0.16	0.16	0.19
190805	0.95	0.38	4.69	0.01	0.13	0.20
190806	0.85	1.2	4.43	0.10	0.20	0.15
190807	0.75	1.4	3.88	0.20	0.12	0.29

3　讨论

3.1　薄层色谱展开剂的考察

蒙花锚肝宁片是由椭圆叶花锚提取制成的单方制剂，在《卫生部药品标准蒙药分册》中仅有对照药材的薄层鉴别方法，专属性不强。本试验在对照药材的基础上增加了 1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮对照品的鉴别，分别考察了石油醚（60 ～ 90 ℃）-乙酸乙酯（7∶3）、石油醚（60 ～ 90 ℃）-氯仿-乙酸乙酯-水（10∶4∶4∶1）、石油醚（60 ～ 90 ℃）-丙酮（7∶3）、环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯（15∶5∶2）等不同展开剂，最终选择石油醚（60 ～ 90 ℃）-丙酮（7∶3）作为展开剂。同时，参考《中国药典》2020 年版一部山楂项下鉴别方法及其他文献，以硅胶 G 板，甲苯-乙酸乙酯-甲酸（20∶4∶0.5）为展开剂，建立了蒙花锚肝宁片中熊果酸的薄层鉴别方法。经方法学验证，上述两个薄层色谱鉴别方法无阴性干扰，斑点清晰，分离良好，专属性、重复性、耐用性均符合要求，可以用于蒙花锚肝宁片的鉴别。

3.2　对照品的选择和色谱条件的确定

已报道文献椭圆叶花锚中的主要成分是呫酮及其苷、黄酮、环烯醚萜类和三萜类化合物等[18-20]，也是其发挥舒肝利胆药理作用的主要成分，故本试验选取了黄酮类化合物的代表木犀草素，三萜类化合物的代表熊果酸，环烯醚萜类化合物的代表当药苷，易购得的呫酮类的代表 1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮。

在含量测定预试验中，参考相关研究文献，结合木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮和当药苷 3 种对照品溶液的紫外光谱扫描结果，最终选择紫外检测波长为 254 nm。同时对甲醇-水，甲醇-冰醋酸溶液，甲醇-0.2% 磷酸，乙腈-水，乙腈-0.2% 磷酸溶液为流动相进行考察，结果以甲醇-0.05% 磷酸为流动相进行梯度洗脱时基

线较平稳，对待测组分峰无干扰。

3.3　样品结果分析

试验结果发现，蒙花锚肝宁片 5 批次样品之间被测成分木犀草素、1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮和当药苷含量差距较小，分析其原因，一方面因蒙花锚肝宁片为独家品种，从国家药品监督局网站查询显示，蒙花锚肝宁片只获批一个批准文号（国药准字 Z63020121），生产企业为三普药业有限公司，样本量较少；另一方面，经与企业质控人员进行沟通，得知企业所用椭圆叶花锚为青海地产药材，每年固定在青海省大通县境内、药材花期进行采集，产地和来源相对稳定，药品生产工艺简单，从而使得样品中有效成分含量相对稳定。

本试验首次建立了蒙花锚肝宁片 2 种有效成分的定性鉴别及 3 种有效成分的 HPLC 定量测定的方法，并进行了方法学考察，该方法简便、高效、准确，能够为蒙花锚肝宁片的质量控制提供参考依据。

参考文献

[1] 卫生部药品标准·蒙药分册 [S]. 中华人民共和国卫生部药典委员会，1995：45，105.

[2] 中国科学院西北高原生物研究所 . 藏药志 [M]. 西宁：青海人民出版社，1991：113-114.

[3] 罗达尚 . 中华臧本草 [M]. 北京：民族出版社，1997：187-188.

[4] 道日娜 . 蒙药材花锚的生药鉴定 [J]. 时针国医国药，2008，19（1）：25-27.

[5] 刘亚蓉 . 乙肝健片质量标准研究 [J]. 中成药，2009，31（7）：1049-1053.

[6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：33.

[7] 哈及尼沙，李改茹，马桂芝 . 榲桲委陵菜酸、熊果酸和齐墩果酸等三萜酸类薄层色谱分离鉴别 [J]. 食品安全质量检测学报，2020，11（7）：2116-2121.

[8] 阳勇，钟国跃，武小赟，等 . 常用藏药“蒂达（藏茵陈）”各品种的薄层色谱鉴别研究 [J]. 中国中药杂志，2013，38（5）：757-761.

[9] 严华，王宝栞，鲁静 . 薄层色谱法分离齐墩果酸和熊果酸 [J]. 药物分析杂志，2009，29（12）：2168-2170.

[10] 何羽，熊灿琼 . 黔产椭圆叶花锚 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国民族民间医药，2021，30（9）：46-49.

[11] 钟国跃，阳勇，冯婷婷，等 . 常用藏药“蒂达”（藏茵陈）基原物种药用合理性及资源利用价值评价 [J]. 中国中药杂志，2012，37（17）：2639-2645.

[12] 王洪玲，陈浩，耿长安，等 . 椭圆叶花锚的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2011，36（11）：1454-1457.

[13] 刘黄刚，张铁军，王丽莉，等 . 椭圆叶花锚的利胆有效成分分离与鉴定 [J]. 药物评价研究，2011，34（6）：448-450.

[14] 古锐，钟国跃，罗维早，等 . 藏药甲地然果（花锚）中呫酮成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志，2010，35（21）：2866.

[15] 王宏 . HPLC 测定乙肝健 A 片中花锚呫酮的含量 [J]. 中成药，2004，26（3）：257-258.

[16] 纪兰菊，吉文鹤，陈桂琛，等 . 藏药椭圆叶花锚中抗肝炎有效成分的含量测定 [J]. 武汉植物学研究，2004，22（5）：473-476.

[17] 王琼，李锡，倪林，等 . HPLC 测定花锚草及乙肝健片中 1-羟基-3，4，5-三甲氧基呫酮的含量 [J]. 青海医药杂志，2006，36（9）：90-91.

[18] 包保金，孙启时，保巴根那 . 花锚属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中药材，2003，26（5）：382-385.

[19] 覃筱燕，严莉，唐丽 . 花锚属植物的化学成分及药理活性的研究进展 [J]. 时针国医国药，2008，19（1）：25-27.

[20] 刘学良，陈鹏，韩达斌，等 . 藏药甲地然果中化学成分、微量元素及矿物元素含量测定方法研究进展 [J]. 中国药业，2021，30（19）：128-131.

（收稿日期：2023-03-06；修回日期：2023-06-04）

GC-MS/MS 法测定复方二甲双胍格列吡嗪胶囊中 *N*- 亚硝基二甲胺与 *N*- 亚硝基二乙胺

岳青阳[1, 2]，张耀文[1, 2]，徐万魁[1, 2*]（1. 辽宁省检验检测认证中心，沈阳　110036；2. 辽宁省药品检验检测院/国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室，沈阳　110036）

摘要：目的　建立复方二甲双胍格列吡嗪胶囊中 *N*- 亚硝基二甲胺（NDMA）与 *N*- 亚硝基二乙胺（NDEA）的检测方法。**方法**　色谱柱为 Agilent VF-WAXms，载气为氦气，流速为 1.2 mL • min^{-1}，进样口温度 250 ℃，柱温为程序升温。电子轰击电离方式，离子源温度：230 ℃；定量测定采用 MRM 模式。以 8 批复方盐酸二甲双胍格列吡嗪胶囊为测定对象，测定其 NDMA 和 NDEA 含量。**结果**　NDMA、NDEA 及相邻色谱峰之间的分离良好，分别在 0.1966 ～ 39.32 ng • mL^{-1}（r = 0.9990）和 0.1870 ～ 37.41 ng • mL^{-1}（r = 0.9995）内与峰面积线性关系良好，检测限分别为 0.0983 ng • mL^{-1} 和 0.0935 ng • mL^{-1}，加样回收率分别为 82.3% 和 85.4%。**结论**　该法分离效果好、操作简便、灵敏度高，可同时检测复方二甲双胍格列吡嗪胶囊中 NDMA 和 NDEA 的含量。

关键词：GC-MS/MS；*N*- 亚硝基二甲胺；*N*- 亚硝基二乙胺；复方二甲双胍格列吡嗪胶囊
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2720-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.026

Determination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in compound metformin hydrochloride and glipizide capsules by GC-MS/MS

YUE Qing-yang [1, 2], ZHANG Yao-wen[1, 2], XU Wan-kui[1, 2*] (1. *Liaoning Inspection, Examination and Certification Centre, Shenyang* 110036; 2. *Liaoning Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drug, Shenyang* 110036)

Abstract: Objective To establish a specific method to determine *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) in compound metformin hydrochloride and glipizide capsules. **Methods** The separation was performed on an Agilent VF-WAXms column in a temperature rising program. The carrier gas was helium with the flow rate of 1.2 mL • min^{-1}. The inlet temperature was 250 ℃ . The sample was ionized by electron ionization with multi reaction monitoring data acquisition mode. NDMA and NDEA were detected in 8 batches of compound metformin hydrochloride and glipizide capsules following based on the conditions. **Results** NDMA, NDEA and adjacent chromatographic peaks were separated well and showed good linearity at 0.1966 ～ 39.32 ng•mL^{-1} (r = 0.9990) and 0.1870 ～ 37.41 ng • mL^{-1} (r = 0.9995), respectively. The limit of detection was 0.0983 ng • mL^{-1} and 0.0935 ng • mL^{-1}. The sample recoveries were 82.3% and 85.4%. **Conclusion** The method separaties well, convenient and sensitive, which can be used in the simultaneous determination of NDMA and NDEA in compound metformin hydrochloride and glipizide capsules.

Key words: GC-MS/MS; *N*-nitrosodimethylamine; *N*-nitrosodiethylamine; compound metformin hydrochloride and glipizide capsule

基金项目：辽宁省自然科学基金项目（No.2020-MS-073）。
作者简介：岳青阳，女，副主任药师，主要从事药品质量标准研究，email：yqy0304@163.com　*通信作者：徐万魁，男，主任药师，主要从事药品质量标准研究与质量控制研究，email：xuwank@163.com

基因毒性杂质是指能够直接或间接损伤细胞DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能或者倾向的一类物质，对DNA的损害包括染色体断裂、DNA重组及复制过程中共价键的插入和修饰，也包括在细胞水平产生基因毒性物质而产生的突变[1-2]，如磺酸酯类、*N*-亚硝胺类、卤代烷烃类和肼类等，其中*N*-亚硝胺类基因毒性杂质是公认的强毒性的化合物之一。*N*-亚硝基二甲胺（NDMA）及*N*-亚硝基二乙胺（NDEA）均为常见的*N*-亚硝胺类化合物，不仅属于2A类致癌物质，而且属于三大“关注队列”的基因毒性杂质，在ICH M7指南中明确该类化合物具有较高致癌性[3-5]。

目前，我国高血糖发病率持续增长，其中2型糖尿病占糖尿病人群的近90%，二甲双胍产品作为治疗2型糖尿病的一线药物，有着稳定的市场需求[6]。糖尿病患者需要终身服药，且服用的剂量大、时间长，因此需要更加严格地控制杂质水平。2019年12月，FDA宣布从降糖药物盐酸二甲双胍制剂中检出杂质NDMA，随后我国药品监督管理部门也陆续开展了二甲双胍制剂中NDMA的监测工作[7-9]。复方二甲双胍格列吡嗪胶囊为盐酸二甲双胍与格列吡嗪的复方制剂，临床上用于改善2型糖尿病患者的血糖控制，由临床数据显示，使用该复方制剂比单独使用二甲双胍效果更佳，且患者依从性、耐受性好，因此该制剂在临床上使用较为广泛[10-11]。目前复方二甲双胍格列吡嗪胶囊在国内尚属独家品种，并未对其中的亚硝胺类杂质进行控制，国内未见复方二甲双胍格列吡嗪胶囊中NDMA和NDEA检测的有关文献。本文采用GC-MS/MS法同时测定盐酸二甲双胍格列吡嗪胶囊中的NDMA和NDEA，结果准确可靠，可为其质量控制提供依据。

1　材料

1.1　仪器

气相色谱-质谱联用仪（GC2030气相色谱仪，TQ8050NX质谱检测器，日本岛津公司）。XP205电子天平（美国METTLER TOLEDO公司，精度0.000 01 g）。

1.2　试药

NDMA对照品（纯度为99.5%，批号：510166-202104）、NDEA对照品（纯度为100.0%，批号：510168-202103）（中国食品药品检定研究院）。二氯甲烷（色谱纯，批号：22085094，美国Fisher公司）；盐酸（分析纯，批号：20210220，国药集团化学试剂有限公司）；氦气（纯度＞99.99%）。8批复方二甲双胍格列吡嗪胶囊均为辽宁修和药业有限公司生产。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱为Agilent VF-WAXms毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.50 μm）。柱温为程序升温：初始温度为40 ℃，维持0.5 min后，以20 ℃·min^{-1}的速率升至200 ℃，再以60 ℃·min^{-1}的速率升至240 ℃，维持5 min；进样口温度为250 ℃；进样量：1 μL；载气为氦气，流速1.2 mL·min^{-1}；电离方式：电子轰击源（EI）；离子源温度：230 ℃；采集模式：MRM；离子源电压0.99 kV。NDMA的定量离子对74/44，碰撞能量为6 V，定性离子对为74/42，碰撞能量为21 V；NDEA的定量离子对为102/85，碰撞能量为6 V，定性离子对为102/55，碰撞能量为21 V。

2.2　对照品储备液的制备

分别取NDMA与NDEA对照品各约10 mg，精密称定，置100 mL量瓶中，用二氯甲烷溶解并稀释至刻度，摇匀，作为混合对照品储备液。

2.3　供试品溶液的制备

精密称取本品内容物适量（约相当于盐酸二甲双胍500 mg），置50 mL离心管中，加1 mol·mL^{-1}盐酸溶液10 mL，涡旋1 min，再以350次·min^{-1}的频率振摇10 min，精密加入二氯甲烷10 mL，以1000 r·min^{-1}涡旋1 min，继续振摇10 min，然后以4000 r·min^{-1}离心10 min，小心抽取下层二氯甲烷层过滤，以0.45 μm滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液。

2.4　系统适用性试验

精密量取混合对照品储备液适量，用二氯甲烷稀释至质量浓度为40 ng·mL^{-1}的溶液作为系统适用性溶液，以二氯甲烷作为空白溶液，取系统适用性溶液和空白溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，见图1。结果表明，溶剂不干扰NDMA和NDEA的测定。

2.5　线性关系考察

精密量取混合对照品储备液适量，用二氯甲烷逐步稀释至0.2、0.5、1、2、5、10、20、40 ng•mL^{-1}，进样测定，结果见表1。各组分在0.1966～39.32 ng·mL^{-1}及0.1870～37.41 ng·mL^{-1}内与峰面积线性关系良好。

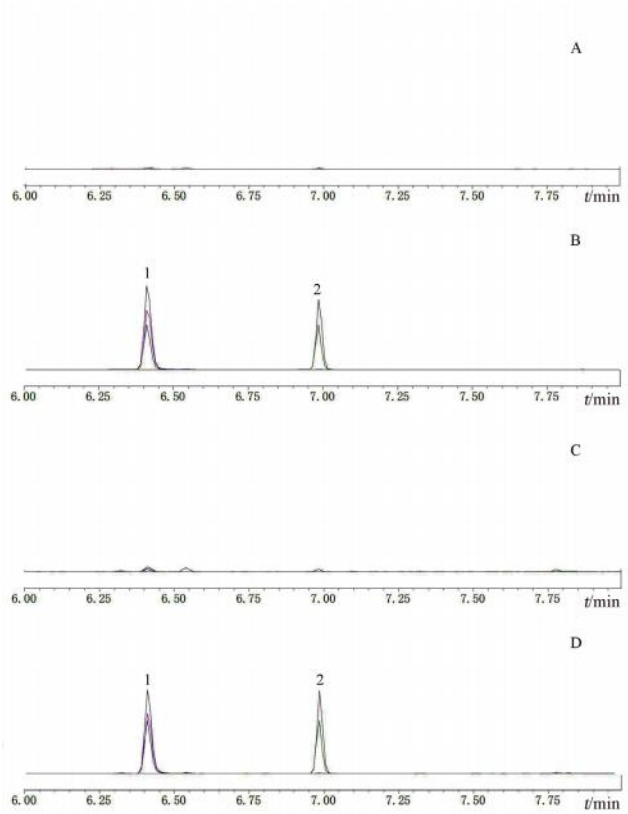


图 1　二甲双胍格列吡嗪胶囊代表性色谱图

Fig 1　Representative chromatogram of compound metformin hydrochloride and glipizide capsules

A. 溶剂（solvent）；B. 对照品（reference substances）；C. 供试品（sample）；D. 加标供试品（sample spiked reference）；1. NDMA；2. NDEA

2.6　检测限和定量限

精密量取对照品储备液，用二氯甲烷逐步稀释，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，以信噪比（*S/N*）≈ 3 时的浓度，为其检测限（LOD），*S/N* ≈ 10 时的浓度，为其定量限（LOQ），结果见表 1。

2.7　精密度

取 0.5 ng • mL^{-1} 对照品线性溶液，连续进样 6 次，记录色谱图，NDMA 的 *RSD* 为 1.8%（n = 6），NDEA 的 *RSD* 为 3.2%（n = 6），表明仪器的精密度良好。

2.8　加样回收试验

取同一批样品内容物 9 份，分别精密加入 20、25、30 ng • mL^{-1} 对照品溶液 1 mL，各 3 份，按“2.3”项下方法进行处理后进样测定，计算各浓度的回收率。结果 NDMA 和 NDEA 加样回收率在 82.3% ～ 85.4%，*RSD* 在 2.6% ～ 3.9%，结果表明该方法准确可靠。

2.9　重复性

取样品 4 粒内容物，精密加入 25 ng • mL^{-1} 对照品溶液 1 mL，按“2.3”项下方法进行处理后进样测定，同法配制 6 份，记录色谱图。结果 NDMA 和 NDEA 峰面积的 *RSD* 分别为 2.6% 和 4.1%，表明重复性良好（n = 6）。

2.10　稳定性

表 1　NDMA 和 NDEA 线性关系、检测限及定量限

Tab 1　Linearity，detection limit，and quantitation limit of NDMA and NDEA

化合物	线性方程	r	范围 /（ng • mL^{-1}）	检测限 /（ng • mL^{-1}）	定量限 /（ng • mL^{-1}）
NDMA	$Y = 6.233\times10^3X + 5.082\times10^3$	0.9990	0.1966 ～ 39.32	0.0983	0.1966
NDEA	$Y = 4.809\times10^3X + 851.2$	0.9995	0.1870 ～ 37.41	0.0935	0.1870

取重复性样品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、12 h 进样测定。结果表明，以二氯甲烷为溶剂，NDMA 和 NDEA 在 12 h 内稳定，峰面积的 *RSD* 分别为 2.4% 和 4.9%。

2.11　测定结果

取本品适量，按“2.3”项下方法处理后进样测定，将测定结果代入标准曲线计算 NDMA 和 NDEA 含量。结果表明，8 批复方二甲双胍格列吡嗪胶囊中均未检出 NDMA 和 NDEA。

3　讨论

3.1　检测方法的选择

目前，*N*- 亚硝胺杂质的定量分析方法主要有 GC-MS 法、GC-MS/MS 法、LC-MS/MS 法、LC-HRMS 法等 [12-15]，本文采用 GC-MS/MS 方法，检测专属性强，灵敏度高，操作简便。

3.2　质谱条件的选择

制备 10 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，使用全扫描模式对混合对照品溶液进行 *m/z* 40 ～ 200 内的扫描，使用谱库比对确定 NDMA 和 NDEA 的色谱峰，根据相对强度选择前体离子，NDMA 和 NDEA 均选择分子离子作为前体离子。再通过产物离子扫描对碰撞能量及二级碎片离子进行优化，选择响应最高的产物离子，作为定性离子和定量离子。

3.3　供试品提取方法的选择

中国食品药品检定研究院颁布的盐酸二甲双胍中 *N*- 亚硝基二甲胺推荐检测方法中盐酸二甲双胍不同制剂采用了不同提取溶剂，本研究分别

考察了二氯甲烷及盐酸加二氯甲烷两种提取方式，并考察了涡旋时间及振摇时间等因素。通过NDMA及NDEA的回收率对比试验，发现采用二氯甲烷提取，基质效应较大，辅料干扰测定，而采用1 mol • mL^{-1}盐酸加二氯甲烷作为提取溶剂时，辅料不干扰测定，且提取时涡旋1 min，振摇10 min，提取效果最佳。

3.4 假阳性结果的处理

在样品测定中发现在与NDMA对照品相同保留时间处出现色谱峰，且该色谱峰的定量与定性离子对均与对照品相同，但离子强度比与对照品相差较大，出现了假阳性现象。经优化质谱条件，将分辨率由“high”优化为“unit”后，假阳性现象消失。

根据美国致癌性数据库（CPDB）中化合物的TD_{50}值，NDMA和NDEA按每日注射最大日暴露量（PDE）96 ng • d^{-1}和26.5 ng • d^{-1}计，按照二甲双胍每日最大剂量2000 mg，NDMA和NDEA对应的分析评价阈值（AET）为48 ng • g^{-1}和13.25 ng • g^{-1}。通过对8批复方二甲双胍格列吡嗪胶囊中的NDMA和NDEA杂质进行检测，结果显示两种杂质含量均小于其AET。

参考文献

[1] Bouder F. Regulating impurities in pharmaceutical products：a tolerability of risk approach [J]. Expert Rev Clin Pharmacol，2008，1（2）：241.

[2] 葛雨琦，叶晓霞，乐健，等 . *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质与检测方法研究进展 [J]. 药物分析杂志，2020，40（1）：83-89.

[3] Pottegard Ottegard A，Kristensen KB，Ernst MT，et al. Use of N-nitrosodimethlyamine（NDMA）contaminated valsartan products and risk of cancer：danish nationwide cohortstudy [J]. BMJ，2018，362：k3851.

[4] ICH Harmonised Guideline. Assessment and control of DNA reactive（Mutagenic）impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7（R1）[S]. 2017-03-31.

[5] International Agency for rsearch on Cancer（IARC）. Agents Classified by IARC Monographs [S]. 2020-03-03

[6] 王慧，皇甫建，肖睿 . 二甲双胍降糖作用及降糖外作用的研究进展 [J]. 医学研究杂志，2018，47（4）：179-182.

[7] 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则（试行）[S]. 2020-05-08

[8] 文松松，牛冲，刘琦，等 . 气相色谱 - 质谱联用法测定盐酸二甲双胍及制剂中的痕量 *N*- 亚硝基二甲胺 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（2）：244-249.

[9] 叶晓霞，葛雨琦，乐健，等 . 缓释制剂辅料导致盐酸二甲双胍降解产生 *N*- 亚硝基二甲胺的影响因素研究 [J]. 药物分析杂志，2021，41（2）：293-299.

[10] 张海鹏 . 二甲双胍格列吡嗪胶囊治疗 2 型糖尿病有效性和安全性的临床观察 [D]. 长春：吉林大学，2009.

[11] 马智宇，曲斌，丁娅，等 . 盐酸二甲双胍格列吡嗪胶囊的健康人体药动学研究 [J]. 药物分析杂志，2012，32（1）：7-14.

[12] 李彩霞，朱坤丹，何佳佳，等 . GC-MS 法测定氯沙坦钾中痕量的 *N*- 亚硝基二甲胺和 *N*- 亚硝基二乙胺 [J]. 华西药学杂志，2022，37（4）：425-428.

[13] 杨越莛，郑枫，蔡浒，等 . LC-MS/MS 法测定三甲基间苯三酚原料药中 *N*- 亚硝基二甲胺和 *N*- 亚硝基二乙胺 [J]. 中南药学，2022，20（2）：405-409.

[14] 韦学明，丁文学，雷勇胜，等 . GC-MS/MS 法测定甲磺酸卡莫司他原料药中 *N*- 亚硝基二甲胺 [J]. 现代药物与临床，2021，36（5）：897-900.

[15] 郭常川，杨书娟，刘琦，等 . 超高效液相色谱 - 静电场轨道阱高分辨质谱法测定法莫替丁及其制剂中的痕量 *N*- 亚硝基二甲胺 [J]. 分析测试学报，2020，39（9）：1079.

（收稿日期：2023-03-17；修回日期：2023-06-06）

供透析用盐类药用辅料中铝含量通用石墨炉原子吸收光谱法的建立

张悦[1, 3]，谢莹莹[1, 2, 3*]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 湖南省药品审核查验中心，长沙　410001；3. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001）

摘要：目的　建立石墨炉原子吸收光谱法（AAS）测定透析用盐类药用辅料中铝元素的含量。**方法**　样品加硝酸超声处理，采用铝空心阴极灯，波长：309.3 nm，电流：15 mA，光谱狭缝宽度：0.5 nm，塞曼偏振背景校正，基体改进剂：0.1% 硝酸镁，进样测定，采用外标法计算。**结果**　铝离子在 5 ～ 40 ng • mL^{-1} 内与响应值线性关系良好（r = 0.9995）；检测限为 1 ng • mL^{-1}；乳酸钠、氯化钙、醋酸钠、氯化钾、氯化镁、氯化钠中铝平均回收率在 81.8% ～ 98.4%。**结论**　本方法准确度高、重现性好，可用于透析用盐类药用辅料中铝元素的含量测定。

关键词：石墨炉原子吸收光谱法；透析液；铝；药用辅料
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2724-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.027

Determination of aluminum content in salt pharmaceutical excipients for dialysis

ZHANG Yue[1, 3], XIE Ying-ying[1, 2, 3*] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha*　410001; 2. *Hunan Drug Inspection Center*, *Changsha*　410001; 3. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha*　410001)

Abstract: Objective　To determine the content of aluminum in salt pharmaceutical excipients for dialysis by graphite furnace atomic absorption spectrometry (AAS). **Methods**　The samples with nitric acid were ultrasonically treated, aluminum hollow cathode lamp was used. The measurement wavelength was 309.3 nm, the current was 15 mA, the spectral slit width was 0.5 nm, and the Zeeman polarization background was corrected. The matrix improver was 0.1% magnesium nitrate, measured and calculated with external standard method. **Results**　The linearity was good in the concentration range of 5 ～ 40 ng • mL^{-1} (r = 0.9995). The detection limit was 1 ng • mL^{-1}. The average recovery of aluminum in sodium lactate, calcium chloride, sodium acetate, potassium chloride, magnesium chloride, and sodium chloride was between 81.8% and 98.4%. **Conclusion**　The method is highly accurate and reproducible, and can be used for the determination of aluminum content in salt pharmaceutical excipients for dialysis.

Key words: graphite furnace atomic absorption spectrometry; dialysis; aluminum; pharmaceutical excipient

铝是人体非必需微量元素，可在人体内蓄积，产生慢性毒性。铝主要由肾脏排泄，透析患者肾脏排泄功能障碍，血清铝蓄积水平高出正常水平 14 倍，导致患者铝性脑病、铝性骨病，还会导致肾性贫血等，严重影响患者生存质量[1-2]。肾衰透析患者每周暴露于大量的透析液中（300 L/ 周），

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金项目（No.2022JJ80013）。
作者简介：张悦，女，主管药师，实验员，主要从事药用辅料检验检测，email：873813723@qq.com　*通信作者：谢莹莹，女，主管药师，实验员，主要从事药用辅料检验检测，email：276468687@qq.com

有效控制透析液中铝的含量，是减少透析患者不良反应，提升患者生存质量的关键[3-4]。

透析液的基本成分有钠、钾、钙、镁、氯、醋酸盐及碳酸氢盐等盐类电解质及葡萄糖。《中国药典》（ChP2020）盐类物质中铝盐常用的检测方法为荧光分光光度法[5]，而文献方法操作烦琐，检测条件苛刻，易受外界因素的影响，如显色温度、显色时间和溶液的酸碱度等[6]。本研究围绕常用供制备透析用盐类药用辅料中铝盐检测方法展开系统性研究，通过比较荧光分光光度法（fluorescence spectrophotometry，FS）、石墨炉原子吸收光谱法（graphite furnace atomic absorption spectrometry，GFAAS）、电感耦合等离子体发射光谱法（inductively coupledplasma atomic emission spectrometry，ICP-OES）及电感耦合等离子体质谱法（inductively coupled plasma mass spectrometry，ICP-MS），建立盐类药用辅料中铝含量测定的通用检测方法。

1　材料

1.1　仪器

原子吸收分光光度计型号（安捷伦公司，型号：AA240）；高温分解镀层石墨管（安捷伦公司，型号：6310001200）；ICP-MS 电感耦合等离子体质谱分析仪（Thermo 公司，型号：iCAPQc）；ICPE 电感耦合等离子体发射光谱仪（岛津公司，型号：ICPE-9000）；荧光分光光度计（上海棱光技术有限公司，型号：F98）；MS 205DU 分析天平（Mettler Toledo，精度：0.10 mg）。

1.2　试药

铝标准溶液（批号：216047-6，质量浓度：1000 μg・mL^{-1}，国家有色金属及电子材料分析测试中心）。硝酸（批号：20221004，优级纯）、硝酸镁（批号：20191101，分析级）（国药集团药业股份有限公司）；水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　仪器参数

铝空心阴极灯；测定波长：309.3 nm；电流：10 mA；塞曼偏振背景校正；光谱狭缝宽度：0.5 nm；测量模式：峰面积；热进样温度：60 ℃；基体改进剂：0.1% 硝酸镁；进样体积：20 μL；载气及冷却气：氩气；石墨炉升温程序见表 1。

2.2　溶液的制备

2.2.1　空白溶液　取硝酸适量，加水稀释成 4% 硝酸溶液，作为空白溶液。

2.2.2　供试品溶液　根据 ChP2020 各品种铝检查项限度，分别精密称取乳酸钠 20.0 g，氯化钙 2.0 g，醋酸钠 10.0 g，氯化钾 2.0 g，氯化镁 2.0 g，氯化钠 10.0 g，置 100 mL 量瓶中，加 4 mL 硝酸，超声 30 min 后，加水稀释至刻度，作为供试品溶液。

2.2.3　对照品溶液　精密量取铝标准溶液适量，用 4% 硝酸溶液稀释成每 1 mL 中含铝 1.0 μg 的溶液，精密量取适量，用 4% 硝酸溶液稀释成 5、10、20、30、40 ng・mL^{-1} 的系列对照品溶液。

表 1　石墨炉升温程序

Tab 1　Temperature rise procedure of graphite furnace

阶段	温度 /℃	时间 /s	气流 /（mL・min^{-1}）	气体
1	85	5	300	Ar
2	95	40	300	Ar
3	120	10	300	Ar
4	400	10	300	Ar
5	1400	5	300	Ar
6	1400	10	300	Ar
7	1400	2	0	Ar
8	2600	0.7	0	Ar
9	2600	2	0	Ar
10	2600	2	300	Ar

2.3　线性、检测限和定量限

取“2.2”项下系列对照品溶液，照“2.1”项下条件测定，以质量浓度为横坐标（X，ng・mL^{-1}）、吸光度为纵坐标（Y），得标准曲线 $Y = 0.003\,61X + 0.015\,57$，$r = 0.9995$。结果表明，铝元素在 5 ～ 40 ng・mL^{-1} 内与吸光度呈良好的线性关系。取空白溶液连续测定 11 次，计算相对标准偏差，以空白 3 倍标准偏差除以标准曲线斜率计算仪器检测限，约为 1 ng・mL^{-1}；以空白 10 倍标准偏差除以标准曲线斜率计算仪器定量限，约为 3 ng・mL^{-1}，方法检测限与定量限见表 2。

表 2　重复性试验结果

Tab 2　Repeatability

化合物	重复性		检测限 /（ng・g^{-1}）	定量限 /（ng・g^{-1}）
	含量 /（μg・g^{-1}）	*RSD*/%		
乳酸钠	0.01	7.5	5	15
氯化钙	0.09	8.5	50	150
醋酸钠	0.07	6.1	10	30
氯化钾	0.42	4.7	50	150
氯化镁	ND	/	50	150
氯化钠	ND	/	10	30

注：ND 表示未检出。

Note：ND means no detection.

2.4　重复性试验

分别取乳酸钠（批号：220609）20.0 g、氯化钙（批号 220622）2.0 g、醋酸钠（批号：220501）10.0

g、氯化钾（批号：K21046）2.0 g、氯化镁（批号：4221007）2.0 g、氯化钠（批号：20211222）10.0 g，各 6 份，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，平行配制 6 份，照“2.1”项下条件测定。结果见表 2，*RSD* 在 4.7% ～ 8.5%，表明方法重复性良好。

2.5　加样回收试验

取适量乳酸钠、氯化钙、醋酸钠、氯化钾、氯化镁、氯化钠，一共 9 份，每 3 份分别精密加入高、中、低浓度的铝对照品溶液，按照“2.2”项下方法配制，测定并计算回收率。结果各品种中铝回收率（$n = 3$）在 81.8% ～ 98.4%，*RSD* 在 1.8% ～ 13.4%，见表 3。

表 3　回收试验结果

Tab 3　Recovery

化合物	称样量 /g	原有量 /（μg • g^{-1}）	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	*RSD*/%
乳酸钠	20	0.01	0.3	0.46	86.7	98.2	11.6
			1.0	1.18	98.5		
			2.0	2.41	109.4		
氯化钙	2	0.09	0.3	0.43	83.3	91.1	7.4
			1.0	1.12	94.2		
			2.0	2.11	95.7		
醋酸钠	10	0.07	0.3	0.95	83.3	98.4	13.4
			1.0	1.74	104.2		
			2.0	2.91	107.8		
氯化钾	2	0.42	0.3	1.08	80.7	81.8	1.8
			1.0	1.64	81.2		
			2.0	2.51	83.5		
氯化镁	2	0	0.3	0.24	81.0	86.5	5.6
			1.0	0.90	90.0		
			2.0	1.80	88.4		
氯化钠	10	0	0.3	0.23	76.8	85.5	9.2
			1.0	0.92	92.1		
			2.0	1.80	87.7		

2.6　稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12 h 照“2.1”项下条件测定，以吸光度为考察指标，结果铝吸光度的 *RSD* 为 1.4% ～ 4.6%，表明供试品溶液在 12 h 内均较稳定。

2.7　样品测定结果

取 34 批样品，照“2.2”项下方法制备溶液，按“2.1”项下条件测定，结果见表 4。

3 批氯化镁中未检出铝，3 批氯化钠中铝含量范围为 0 ～ 0.10 μg • g^{-1}，8 批氯化钾中铝含量范围为 0 ～ 0.62 μg • g^{-1}，均能满足各国药典中铝规定限度 [ChP2020、欧洲药典（EP10.0）、美国药典（USP 现行版）现行版规定限度一致]。3 批乳酸钠中铝含量范围为 0 ～ 0.01 μg • g^{-1}，3 批氯化钙中铝含量范围为 0 ～ 0.09 μg • g^{-1}，14 批醋酸钠中铝含量为 0 ～ 0.33 μg • g^{-1}。ChP2020 乳酸钠、醋酸钠、氯化钙质量标准中缺乏铝盐的控制项目。根据 EP10.0、USP 现行版中乳酸钠（≤ 0.1 μg • g^{-1}）、氯化钙（≤ 1 μg • g^{-1}）、醋酸钠（≤ 0.2 μg • g^{-1}）含铝限度规定，3 批乳酸钠和氯化钙铝盐均符合规定，3 批醋酸钠样品中铝含量为 0.24 μg•g^{-1}、0.28 μg•g^{-1}、0.33 μg•g^{-1}，超过铝规定限度（≤ 0.2 μg • g^{-1}），说明我国部分药用辅料醋酸钠质量水平处于较低水平，用于制备透析液时存在较大风险。

3　讨论

透析液中常用的盐类辅料有乳酸钠、氯化钙、氯化镁、氯化钾、醋酸钠、氯化钠。EP10.0[7]、USP[8] 收载了上述品种，并设置了铝盐检查项；ChP2020 收载了上述品种，但乳酸钠、醋酸钠、氯化钙质量标准中缺乏铝盐的控制项目。铝盐项目的缺失一是会带来药用辅料自身可能带来的铝盐残留导致的质量安全隐患；二是导致生产企业对进口辅料的依赖，提高企业生产成本。本课题组前期考察了 FS、ICP-OES、ICP-MS 法测定高盐物质中铝的含量，并将上述 3 种方法与本研究的 ASS 法进行如下总结。

3.1　FS 法

FS 法利用 8- 羟基喹啉与游离铝生成荧光配合物进行检测。本次研究参照 ChP2020 氯化钾

表 4　样品测定结果

Tab 4　Sample determination

序号	化合物	企业	批号	测定结果 /（μg • g^{-1}）	ChP2020 或 EP10.0 或 USP 现行版规定限度（≤ μg • g^{-1}）
1	醋酸钠	A	104520221102	0.04	0.2
2	醋酸钠	A	104520221103	0.05	
3	醋酸钠	A	104520221104	低于定量限（0.02）	
4	醋酸钠	B	220501	0.07	
5	醋酸钠	C	220307	ND	
6	醋酸钠	A	20180101	0.28	
7	醋酸钠	D	20180202	0.24	
8	醋酸钠	E	20180302	0.33	
9	醋酸钠	F	20180304	0.04	
10	醋酸钠	F	20180501	0.13	
11	醋酸钠	F	CPC-025-170301	0.07	
12	醋酸钠	F	10452980301	ND	
13	醋酸钠	F	20221102	ND	
14	醋酸钠	F	20221101	低于定量限（0.02）	
15	氯化钾	G	K21046	0.42	1
16	氯化钾	G	K21048	0.62	
17	氯化钾	G	K21056	0.45	
18	氯化钾	H	20201006	0.16	
19	氯化钾	I	3420000684	0.15	
20	氯化钾	I	3420000678	0.21	
21	氯化钾	I	3420000696	0.23	
22	氯化钾	C	220908	ND	
23	氯化钠	J	20211222	ND	0.2
24	氯化钠	K	220114	0.06	
25	氯化钠	C	220825	0.10	
26	氯化镁	L	4221007	ND	1
27	氯化镁	F	20221207	ND	
28	氯化镁	F	20221208	ND	
29	氯化钙	C	220622	低于定量限（0.09）	1
30	氯化钙	F	20221206	低于定量限（0.01）	
31	氯化钙	F	20221205	ND	
32	乳酸钠	M	220609	低于定量限（0.01）	0.1
33	乳酸钠	M	220709	ND	
34	乳酸钠	M	220610	ND	

注：ND 表示未检出。

Note：ND means no detection.

质量标准中铝检查项操作，测定乳酸钠、醋酸钠、氯化钙加样回收率。结果氯化钙回收率为 136.4%，醋酸钠回收率为 200.3%，乳酸钠回收率样品的荧光强度小于供试品。提示这 3 个品种铝盐的测定干扰很大，FS 法不适合。

3.2　ICP-OES 法

由于 FS 法配制烦琐，检测过程极易受外界因素的影响等，该方法在食品检测中逐渐被 ICP-OES 法替代[9-10]。本次研究考察了 ICP-OES 法测定铝元素，结果在 60 ～ 200 μg • mL^{-1} 内铝含量与检测信号呈良好线性关系，仪器检测限为 20 μg • mL^{-1}。乳酸钠等药用辅料中铝限度为不得过 0.1 ～ 2 μg • g^{-1}，要求仪器检测能达到 ppb（ng • g^{-1}）级，说明 ICP-OES 灵敏度无法达到药用辅料中铝含量测定的要求。

3.3　ICP-MS 法

ICP-MS 法是目前最常用的痕量元素分析法，能同时测定多种元素，灵敏度较 ICP-OES 法高。本次研究考察了 ICP-MS 法测定铝元素，结果乳酸钠、氯化钙、醋酸钠、氯化钾、氯化镁、氯化

钠加样回收率在 80.74% ～ 125.4%。试验中发现，高盐溶液会在仪器炬管、采样锥、截取锥上沉积，造成离子炬熄灭或进样器锥孔堵塞 [11]。大批量测样时需要经常清洗炬管、采样锥、截取锥，或者在序列中插入水溶液，冲洗掉样品带入的盐。但这大大延长了试验时间，对仪器的灵敏度也产生了较大影响。

3.4　GFAAS 法

GFAAS 法是利用高温石墨管使样品完全蒸发，充分原子化，再测其吸光度的方法。与火焰法比较，石墨炉法灵敏度更高，但往往会存在较严重的基体干扰，通常需要添加合适的基体改进剂消除干扰，降低背景吸收。本研究发现加入 0.1% 硝酸镁的基体改进剂后，铝的吸收值增加，且当 0.1% 硝酸镁与样品进样量比例为 1∶5 时，方法检测限较低；增大硝酸镁比例，方法检测限增高。这可能是硝酸镁使铝变成难挥发性化合物，使背景干扰物质在原子化之前被挥发除去，提高测定铝的灵敏度，但过量硝酸镁中的金属离子也会干扰铝的测定 [11]。

采用 4% 硝酸直接稀释样品进行测定，结果样品的回收率极低，达不到 ChP2020 相关规定，而拟订方法测定的回收率在规定范围内。据文献报道，这可能是因为超声波在液体中产生气泡或将液体撕碎成极小的空穴，并在空穴闭合瞬间产生瞬间的高温高压，即“空化效应”[12]，这种空化作用可加速界面之间的传质、传热过程，使整个体系中的分子间作用力减小，液体黏度下降，从而使吸附于颗粒表面的 Al^{3+} 分离或以络合物形式存在的铝打散。

4　小结

34 批样品中 3 批醋酸钠铝含量超限，说明我国醋酸钠作为透析用时，部分产品达不到透析用的质量要求，因此，建立透析用药用辅料中铝元素的通用检测方法十分有意义。本研究建立的 AAS 法，操作简单、灵敏度高、重现性好，在一定程度上避免高盐物质对仪器测定干扰，可用于高盐物质中痕量铝元素的测定。

参考文献

[1] FDA. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [EB/OL].（2019-09-27）[2019-10-23]. https：//www.accessdata. fda. gov/scripts/cder/iig/index. cfm?event ＝ BasicSearch. page

[2] 徐诗梦，张云玮，巨晓芬，等 . 职业铝暴露对工人认知功能影响的因子分析 [J]. 环境与职业医学，2020，37（1）：30-35.

[3] 张慧惠 . 透析“铝及其化合物”[J]. 中学化学，2021（9）：25-26.

[4] 范蓓，冯云安，王振海，等 . 模制瓶及盐水透析对人血白蛋白制品中铝离子残留量的影响 [J]. 中国生物制品学杂志，2022，35（1）：4-8.

[5] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020.

[6] 陈聪，谢聪，黄龙，等 . ICP-OES 检测宜昌茶叶及其浸泡液中铝含量 [J]. 安徽农学通报，2022，28（11）：122-124.

[7] 欧洲药典委员会 . 欧洲药典（EP. 10.0）[S]. 2020.

[8] 美国药典委员会 . 美国药典（USP 现行版）[S]. 2023.

[9] 安永鹏，杨彦丽，丁轲 . ICP-MS 和 ICP-OES 法检测粉条中铝含量的比较研究 [J]. 中国食品添加剂，2021，32（6）：6-9.

[10] 何健，李莉，唐晓琴，等 . 电感耦合等离子体发射光谱法测定油条中铝，磷元素的研究 [J]. 中国卫生检验杂志，2021，31（18）：4-7.

[11] 张悦，刘雁鸣，谢莹莹 . 原子吸收分光光度法测定醋酸钠中铝的含量 [J]. 中国医药科学，2022，12（8）：12-15.

[12] 谢莹莹，刘雁鸣，张悦，等 . ICP-MS 法测定透析用醋酸钠中铝元素的含量 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2406-2408.

（收稿日期：2023-03-17；修回日期：2023-05-17）

HPLC-ELSD 法和 UPLC-MS/MS 法评价石斛夜光丸中人参投料掺伪情况

朱韬，何颂华，李丽莉*，罗轶*（广西壮族自治区食品药品检验所 国家药品监督管理局中药材质量监测与评价重点实验室，南宁　530021）

摘要：目的　建立石斛夜光丸中人参混淆品（西洋参）掺伪的检测方法，考察样品中人参的投料情况。**方法**　分别采用 HPLC-ELSD 和 UPLC-MS/MS 法进行分析测定。HPLC-ELSD 法：采用 CAPCELL PAK C18 MGIII（S-5）（4.6 mm×250 mm，5 μm）柱，以乙腈 - 水为流动相，流速为 1.0 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，ELSD 漂移管温度为 105 ℃，气体流速为 3.0 L • min^{-1}；UPLC-MS/MS 法：采用电喷雾离子源（ESI^{-}），多反应监测（MRM）模式。**结果**　91 批石斛夜光丸中有 35 批样品检出西洋参。**结论**　所建立方法专属性、重复性、稳定性、耐用性良好，可为石斛夜光丸中人参的质量控制与评价提供可靠方法。

关键词：石斛夜光丸；HPLC-ELSD；UPLC-MS/MS；人参；西洋参；质量控制
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2729-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.028

Evaluation of Ginseng Radix et Rhizoma in Shihu Yeguang pills by HPLC-ELSD and UPLC-MS/MS

ZHU Tao, HE Song-hua, LI Li-li*, LUO Yi* (*Guangxi Institute for Food and Drug Control*, *NMPA Key Laboratory for Quality Monitor and Evaluation of Traditional Chinese Medicine*, *Chinese Material Medica*, *Nanning* 530021)

Abstract: Objective To detect adulterated Ginseng Radix et Rhizoma in Shihu Yeguang pills. **Methods** The samples were determined by HPLC-ELSD and UPLC-MS/MS. The chromatographic separation was performed on a CAPCELL PAK C18 MGIII (S-5) (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile-water at 1.0 mL • min^{-1} in a gradient elution. The columm temperature was 30 ℃, the temperature of ELSD was 105 ℃, and the gas flow rate was 3.0 L • min^{-1}. The electrospray was operated in the negative mode, and the samples were detected by multiple reaction monitoring mode (MRM). **Results** Among the 91 batches of Shihu Yeguang pills, 35 samples batches were adulterated with Panacis Quinquefolii Radix. **Conclusion** The methods shows good specificity, repeatability, stability and durability, which is reliable for the quality control and evaluation of Ginseng Radix et Rhizoma in Shihu Yeguang pills.

Key words: Shihu Yeguang pill; HPLC-ELSD; UPLC-MS/MS; Ginseng Radix et Rhizoma; Panacis Quinquefolii Radix; quality control

石斛夜光丸是治疗眼疾的古老传统名方，处方由石斛、人参、山药、茯苓、地黄、天冬、山羊角等 25 味中药组成，现收载于《中国药典》2020 年版，具有滋阴补肾、清肝明目的功效[1]。现代临床研究表明，石斛夜光丸用于治疗干眼症、玻璃体混浊、中心性浆液性脉络膜视网膜病变、慢性葡萄膜炎、青光眼术后、溢泪症、肝肾阴亏型足跟痛、冠心病及心肌梗死等疾病[2-4]。处方中人参为伞形目五加科人参属植物人参（*Panax ginseng* C.A.Mey）的干燥根和根茎，性温，具有大补元气、固脱生津、安神益智等功效；西洋参为伞形目五加科人参属植物西洋参（*Panax quinquefolium* L.）的干燥根，

作者简介：朱韬，男，主要从事中药质量控制研究，email：zhutao41@sina.com　*通信作者：李丽莉，女，主要从事中药质量控制研究，email：9994701@qq.com；罗轶，女，主要从事中药质量与安全研究，email：luoyi20010211@163.com

性凉，具有补气养阴、清热生津的功效，两者药效区别较大，不能混用。

随着市场需求不断提升，商家追求高额利润，近年来不断有报道使用西洋参混入中药制剂冒充人参进行投料生产[5-6]。2020 年版《中国药典》中对于石斛夜光丸的人参质量控制仅涉及人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 两个成分，但西洋参中也含有这两种成分[7-8]，单纯采用这两个指标成分进行定性鉴别，对于是否存在西洋参掺伪投料情况无法评判。两味药所含化学成分极为相似，均以人参皂苷为重要活性成分，但所含皂苷种类与比例存在一定差异，如西洋参特有的拟人参皂苷 F_{11}，人参中基本没有[5, 9]。因此本试验以拟人参皂苷 F_{11} 为特征标志物，进行掺伪检查的方法研究。由于拟人参皂苷 F_{11} 没有紫外吸收，本试验采用了高效液相色谱 - 蒸发光散射检测器（HPLC-ELSD）法，同时通过 UPLC-MS/MS 技术建立专属性强的检查方法，并对收集到的 91 批样品进行测试，以期对不同生产企业的产品进行评价，为石斛夜光丸中人参掺伪投料检测和质量标准完善提供参考。

1　仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 6460 超高效液相色谱 - 质谱联用仪（Agilent 公司），ELSD 6000 蒸发光检测器（Alltech 公司）；XP205 电子天平（Mettler Toledo 公司，精度 0.01 mg）；Milli-Q 纯水仪（Millipore 公司）。

人参（批号：120917-201712）、西洋参（批号：120997-201810）、拟人参皂苷 F_{11}（批号：110841-201607）（中国食品药品检定研究院），25 批不同产地的西洋参和 13 批西洋参须均购自市场（经广西壮族自治区食品药品检验所黄清泉主管中药师鉴定为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根和干燥根须），91 批不同厂家、不同批次石斛夜光丸均为 2020 年国家药品评价性抽验样品。乙腈为色谱纯，水为纯化水，其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　HPLC-ELSD 法

2.1.1　色谱条件　色谱柱：Capcell PAK C18 MGIII（S-5）（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相：以乙腈为流动相 A，水为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 20 min：10% → 30%A；20 ～ 45 min：30%A）；流速 1.0 mL • min^{-1}；柱温 30 ℃；检测器 ELSD，漂移管温度 105 ℃，载气为氮气，气体流速 3.0 L • min^{-1}，增益 1。

2.1.2　溶液的制备

① 对照品溶液：取拟人参皂苷 F_{11}（经标定，含量为 99.9%）适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 100 μg 的溶液，即得。

② 供试品溶液：取本品，研碎，取 6 g，精密称定；置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇溶液 100 mL，密塞，称定重量，加热回流 1 h，放冷，再称定重量，用 70% 甲醇溶液补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取滤液 50 mL，置蒸发皿中，蒸干，残渣加水 25 mL 使溶解，加水饱和正丁醇振摇提取 4 次，每次 25 mL，合并正丁醇提取液，用氨试液洗涤 2 次，每次 50 mL，再用正丁醇饱和水 50 mL 洗涤，分取正丁醇液，减压浓缩，回收溶剂至干，残渣加甲醇适量使溶解，转移至 2 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

③ 阴性样品溶液的制备：按规定的处方量及工艺自制缺人参的石斛夜光丸阴性样品，按②项下方法制成阴性样品溶液。

④ 阳性样品溶液的制备：取阴性样品 6 g 和西洋参 3.4 mg（相当于 6 g 制剂中 10% 人参的处方量），作为阳性样品，按②项下方法制成阳性样品溶液。

⑤ 人参供试品溶液的制备：取人参 34 mg（相当于 6 g 制剂中人参的处方量），按②项下方法制成西洋参（须）供试品溶液。

⑥ 西洋参（须）供试品溶液的制备：分别取西洋参和西洋参须各 3.4 mg，按②项下方法制成西洋参（须）供试品溶液。

⑦ 掺伪 5% 西洋参（须）样品溶液的制备：取阴性样品 6 g 和西洋参（须）1.7 mg（相当于 6 g 制剂中 5% 人参的处方量），作为阳性样品，按②项下方法制成掺伪样品溶液。

2.1.3　含量测定　分别精密吸取对照品溶液 5 μL、20 μL 及供试品溶液 10 μL，进样测定，用外标两点法对数方程计算拟人参皂苷 F_{11} 的含量。

2.1.4　专属性试验　分别吸取对照品溶液、阴性样品溶液和对照药材溶液各 10 μL，进样测定。结果西洋参和西洋参须在拟人参皂苷 F_{11} 峰相应位置显示有对应色谱峰，阴性样品和人参在拟人参皂苷 F_{11} 相应位置无色谱峰，表明本方法专属性较好，色谱图见图 1。

2.1.5　线性关系考察　称取拟人参皂苷 F_{11} 对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 0.0528、0.1055、0.3165、0.5275、1.0550 mg • mL^{-1} 的对照品溶液，进样测定。以对照品进样量为横坐标（X），峰面积对数值为纵坐标（Y）绘制标准曲线，计算回归方程为：$Y = 1.650X + 2.315$，$r = 0.9999$。结果表明，拟人参皂苷 F_{11} 在进样量为 0.528 ～ 10.550 μg 内与峰面积对数值线性关系良好。

2.1.6　耐用性试验　考察 3 种不同品牌色谱柱 [CAPCELL PAK C18 MGIII（S-5）（5 μm，4.6

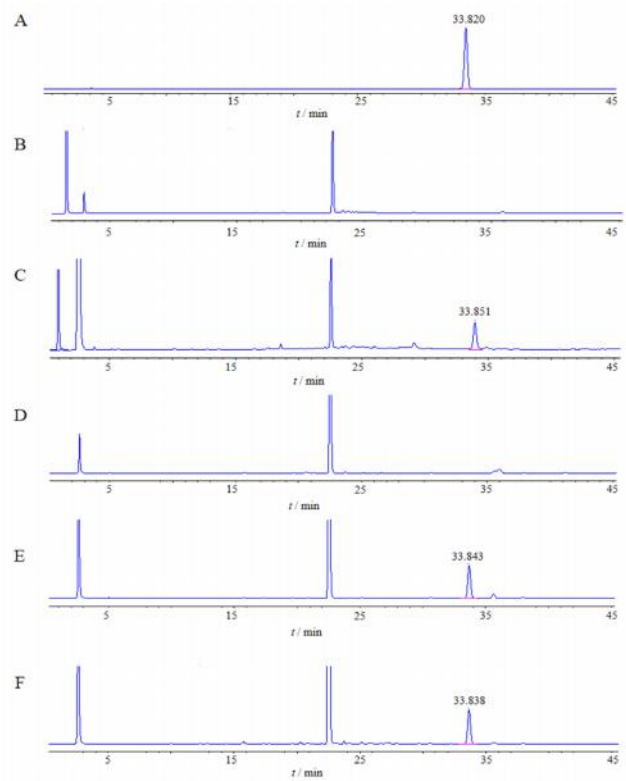


图 1　HPLC-ELSD 法专属性试验色谱图

Fig 1　HPLC-ELSD diagram of specific test

A. 拟人参皂苷 F_{11} 对照品（pseudoginsenoside F_{11} reference）；B. 阴性样品（negative sample）；C. 阳性样品（positive sample）；D. 人参供试品（sample of Ginseng Radix et Rhizoma）；E. 西洋参供试品（sample of Panacis Quinquefolii Radix）；F. 西洋参须供试品（sample of Panacis Quinquefolii Radix fibrous root）

mm×250 mm）、Agilent 5TC-C18（2）（5 μm，4.6 mm×250 mm）、菲罗门 SuperLu C18（5 μm，4.6 mm×250 mm）]，结果 3 种色谱柱测定人参皂苷 F_{11} 的峰面积 *RSD* 为 0.79%，表明方法耐用性良好。

2.1.7　精密度试验　精密吸取拟人参皂苷 F_{11} 对照品溶液，连续测定 6 次，结果峰面积的 *RSD* 为 1.1%，表明本法的仪器精密度较好。

2.1.8　重复性试验　取同一批石斛夜光丸供试品（阳性样品），平行称取 6 份，按“2.1.2”项下方法制成相应溶液并测定，结果拟人参皂苷 F_{11} 平均含量为 149 μg・g^{-1}，*RSD* 为 0.81%，表明本方法重复性较好。

2.1.9　稳定性试验　取同一批石斛夜光丸供试品（阳性样品），按“2.1.2”项下方法的色谱条件，每隔 4 h 测定一次，共测定 6 次，结果拟人参皂苷 F_{11} 峰面积的 *RSD* 为 1.4%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.10　加样回收试验　取阳性供试品 6 g，精密称定，精密加入拟人参皂苷 F_{11} 对照品溶液（2.4 mg・L^{-1}）100 mL，按“2.1.2”项下方法制成相应溶液并测定，结果加样回收率为 98.7%～104.4%，*RSD* 为 2.2%。

2.1.11　定量限和检测限　精密吸取拟拟人参皂苷 F_{11} 对照品溶液（1.1 mg・mL^{-1}），逐级稀释，进样测定，*S/N* 为 3∶1 时确定检测限，*S/N* 为 10∶1 时确定定量限，结果拟人参皂苷 F_{11} 的定量限、检测限分别为 13 μg・g^{-1}、5.8 μg・g^{-1}。

2.1.12　限度拟订　按照 2020 版《中国药典》四部 0212 药材和饮片检定通则规定杂质通常不得过 3%[10]；中药成方制剂中人参与西洋参显微鉴别较困难，故放宽限度，以掺伪 5% 西洋参（须）样品中拟人参皂苷 F_{11} 的含量平均值为限度。

2.1.13　掺伪样品测定　38 份掺伪样品中拟人参皂苷 F_{11} 的含量平均值为 40 μg・g^{-1}，拟订限度为石斛夜光丸每 1 g 含拟人参皂苷 F_{11} 不得过 40 μg。

2.2　UPLC-MS/MS 法

2.2.1　色谱条件　色谱柱：Agilent Eclipse C18 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），流动相：以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱，0～6 min：90%A；6～20 min：90%→50%A；流速：0.25 mL・min^{-1}；柱温：30 ℃，进样量：1 μL。

2.2.2　质谱条件　采用电喷雾电离源，负离子方式扫描，MRM 模式检测；干燥气温度：350 ℃；干燥气流速：5 L・min^{-1}；雾化气压力：40 psi；鞘流气温度：350 ℃；鞘流气流速：10 L・min^{-1}；毛细管电压：3 kV；喷嘴电压：500 V；选择 *m/z* 845.5→653.4 和 *m/z* 845.5→490.9 作为检测离子对。

2.2.3　溶液的制备

① 对照品溶液：取拟人参皂苷 F_{11} 对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 2 μg 的混合溶液，即得。

② 供试品溶液：精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，微孔滤膜（0.22 μm）滤过，即得。

2.2.4　专属性试验　分别取“2.1.2”项下溶液，精密稀释 10 倍，进样测定。结果阴性样品和人参色谱中，均未出现与拟人参皂苷 F_{11} 对照品色谱保留时间相同的色谱峰，表明处方中其他药味对该测定方法无干扰，见图 2。

2.2.5　线性关系考察　精密量取“2.1.2”项下对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.4、1、2 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释并定容，摇匀，进样测定。以对照品质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）绘制标准曲线，得回归方程为：$Y=3.92\times10^4X+3.04\times10^3$，$r=0.9998$，在 0.51～20 μg・$mL^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.2.6　耐用性试验　选取 Waters ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、Agilent Eclipse C18（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、Waters

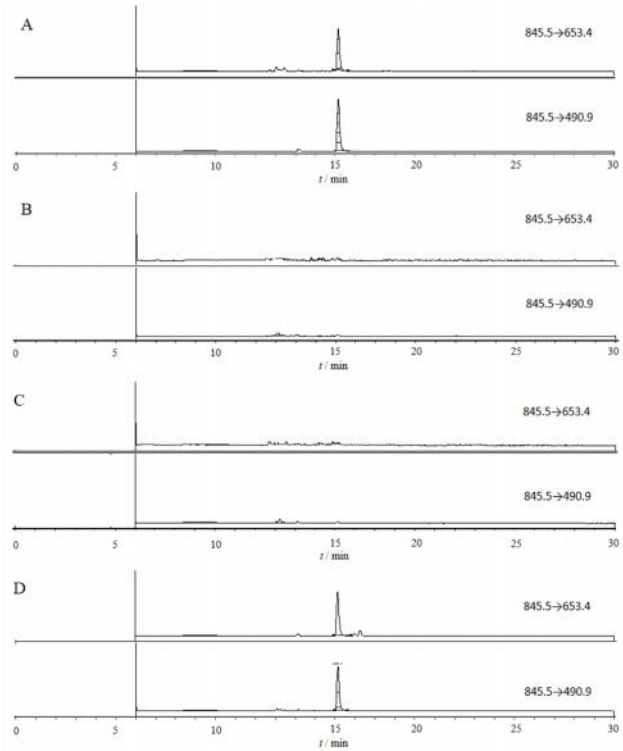


图 2　UPLC-MS/MS 法专属性试验色谱图

Fig 2　UPLC-MS/MS chromatogram of specific test

A. 拟人参皂苷 F_{11} 对照品（pseudoginsenoside F_{11} reference）；B. 阴性样品（negative sample）；C. 人参供试品（sample of Ginseng Radix et Rhizoma）；D. 阳性样品（positive sample）

CORTECS C18（2.1 mm×100 mm，2.7 μm）3 种色谱柱，对检出西洋参掺伪的阳性样品进样分析，结果 3 种色谱柱的分析结果一致，拟人参皂苷 F_{11} 的峰面积 *RSD* 为 2.0%，表明方法耐用性良好。

2.2.7　精密度试验　取拟人参皂苷 F_{11} 对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，测得峰面积的 *RSD* 为 1.9%，表明该仪器精密度良好。

2.2.8　重复性试验　取“2.1.8”项下供试品溶液，稀释 10 倍，进样测定，结果色谱峰面积的 *RSD* 为 1.7%，结果表明本法重复性较好。

2.2.9　稳定性试验　取“2.1.9”项下供试品溶液，稀释 10 倍，每隔 4 h 测定一次，共测定 6 次，结果拟人参皂苷 F_{11} 峰面积 *RSD* 为 1.2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.10　加样回收试验　取阳性供试品 6 g，精密称定，精密加入拟人参皂苷 F_{11} 对照品溶液（2.51 mg • L^{-1}）100 mL，按“2.2.3”项下方法制成相应溶液并测定，结果加样回收率为 98.03% ～ 106.07%，*RSD* 为 3.2%。

2.2.11　检测限和定量限　取未检出的空白样品制备空白基质溶液，精密加入拟人参皂苷 F_{11} 对照品（80 μg • mL^{-1}）0.1 mL，按“2.2.3”项下方法制备，进样分析，按信噪比 $S/N \approx 3$ 折算，拟人参皂苷 F_{11} 的检测限为 0.6 μg • g^{-1}；按 $S/N \approx 10$ 折算，拟人参皂苷 F_{11} 的定量限为 1.9 μg • g^{-1}。

表 1　石斛夜光丸中拟人参皂苷 F_{11} 的含量

Tab 1　Content of pseudoginsenoside F_{11} in Shihu Yeguang pills

批号	HPLC-ELSD 法 /（μg•g^{-1}）	UPLC-MS/MS 法（峰面积）	批号	HPLC-ELSD 法 /（μg•g^{-1}）	UPLC-MS/MS 法（峰面积）
14019013	149	445 232	190502	116	345 172
14019007	165	496 953	190507	120	360 500
14019004	162	486 255	191004	56	168 147
14019002	216	640 918	190402	64	192 083
14019005	183	542 660	191204	54	163 416
14020003	200	600 258	191003	85	255 237
14020002	192	571 646	191001	88	264 894
20190502	130	389 949	191205	81	242 133
20190505	97	295 312	191005	76	227 185
20190904	127	384 622	200101	90	268 975
20191101	121	364 771	191206	74	222 005
20190901	121	365 942	190609	82	246 782
20191103	170	510 506	200102	88	264 087
20190303	116	345 618	200201	82	246 071
20191107	94	282 825	200202	79	236 952
180902	81	246 611	191004	56	167 883
190201	104	310 290	20181201	43	129 080
20190901	81	242 643	181102	136	408 854

2.2.12　限度拟订　不同西洋参和西洋参须制成的掺伪样品，拟人参皂苷 F_{11} 的峰面积差异较大，因此以 5% 西洋参掺伪样品的平均峰面积为拟订限度的参考。

2.2.13　掺伪样品测定　38 份掺伪样品的拟人参皂苷 F_{11} 峰面积平均值为 87 398.79，对应对照品的质量浓度为 2 μg • mL^{-1}。

2.2.14　判定原则　以拟人参皂苷 F_{11} 对照品质量浓度（2 μg • mL^{-1}）为判定限度，规定结果判断标准 为：以 *m/z* 845.5 → 653.4 和 *m/z* 845.5 → 490.9 提取的供试品离子流色谱中，应不得同时出现拟人参皂苷 F_{11} 保留时间一致的色谱峰；若同时出现，则供试品色谱中 *m/z* 845.5 → 653.4 的色谱峰面积值应不得大于对照品溶液中相应的峰面积值。

3　样品含量测定

对 91 批石斛夜光丸进行检测，采用 HPLC-ELSD 法，结果 35 批样品拟人参皂苷 F_{11} 含量超出拟订限度；采用 UPLC-MS/MS 法检测，结果 35 批样品拟人参皂苷 F_{11} 质量浓度大于 2 μg • mL^{-1}。结果见表 1。

4　讨论

4.1　检测方法的选择

本试验对拟人参皂苷 F_{11} 的提取方法进行了优化，考察了溶剂回流法和超声提取法，比较了不同溶剂提取（甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇）、不同溶剂用量（50、100、150 mL）、不同提取时间（45、60、90 min）、洗涤次数对提取的影响，最终选择

了本研究的提取方法。

人参与西洋参的区分方法有薄层色谱和性状鉴别[11]。本研究前期对薄层色谱方法进行了探索，由于薄层色谱灵敏度低，处方中药味较多，干扰斑点影响严重，不适用于石斛夜光丸中西洋参的检查。人参在石斛夜光丸中为原粉入药，因此不能通过性状进行鉴别。ELSD 作为通用型检测器，可快速完成对无紫外吸收化学成分的定性与定量分析，HPLC-ELSD 法减少中药制剂中紫外吸收强的成分的干扰，特别适用于测定皂苷类成分含量[12-14]。本研究使用的两种检测方法，UPLC-MS/MS 法专属性强，分析时间短，而 HPLC-ELSD 法简便，仪器检测成本比较低，均适用于石斛夜光丸中拟人参皂苷 F_{11} 的检测。

4.2　拟人参皂苷 F_{11} 的裂解途径

拟人参皂苷 F_{11} 为皂苷类化合物，质谱裂解中主要丢失母核上连接的糖苷碎片，负离子模式下质谱响应较好，显示较强的 $[M + HCOO]^-$ *m/z* 845.5 的准分子离子峰，母离子峰为 *m/z* 799.6 $[M - H]^-$，先脱去一分子鼠李糖（rha）得到碎片离子（*m/z* 653.4），再脱去一分子葡萄糖（glc），得到 *m/z* 490.9 的碎片离子，裂解途径见图 3。

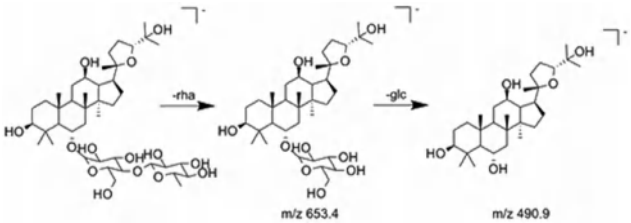


图 3　拟人参皂苷 F_{11} 质谱裂解途径

Fig 3　Fragmentation pathway of pseudoginsenoside F_{11}

4.3　评价石斛夜光丸中人参掺伪投料情况

本研究结果显示，35 批石斛夜光丸检出含有西洋参，不合格率为 38.5%，18 家生产企业中 8 家企业样品检出拟人参皂苷 F_{11} 超出限度，可见人参掺伪问题严重。中成药中人参多以粉末入药，西洋参与人参以粉末入药时极为相似难以通过外观进行有效区分，多数中成药现行标准以人参皂苷 Rb_1、Re 和 Rg_1 作为检验指标，西洋参各部位（茎叶、主根、须根、芦头、根皮、根心等）均含人参皂苷 Rb_1、Re 和 Rg_1，仅含量存在差异，以总量计含量大于人参[15-18]。调研发现，西洋参价格与人参相当甚至更高，而西洋参须和西洋参边角料价格仅为西洋参价格的 20% 左右。因此，不法商家以西洋参须或西洋参边角料代替人参投料。

4.4　总结

近年来发现的中成药人参中西洋参掺伪问题较为严重，亟需得到重视。本研究首次建立了 HPLC-ELSD 法测定石斛夜光丸中拟人参皂苷 F_{11} 的含量，同时建立了 UPLC-MS/MS 法，两种方法都能够准确有效地判断石斛夜光丸中是否有西洋参掺伪投料，为评价石斛夜光丸等含人参中成药中人参投料情况提供了技术支持。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：803-805.

[2] 朱小敏，唐双军，奚超 . 石斛夜光丸联合玻璃酸钠滴眼液及维生素 AD 软胶囊治疗干眼症临床评价 [J]. 中国药业，2020，29（8）：100-102.

[3] 何陈亮，胡振仙，李永波 . 复方血栓通胶囊、石斛夜光丸联合氨碘肽滴眼液治疗玻璃体混浊的效果观察 [J]. 中国基层医药，2015，22（12）：1793.

[4] 徐春娟，王河宝 . 石斛夜光丸研究进展 [J]. 中国中医眼科杂志，2016，26（4）：266-268.

[5] 赵振霞，王晓蕾，雷蓉，等 . UPLC-MS/MS 检测乌鸡白凤丸中非法添加西洋参 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（4）：420-424.

[6] 穆向荣，徐兴燕，焦阳，等 . 基于 HPLC-MS/MS 法的脑灵素制剂中人参掺伪检查研究 [J]. 药学研究，2022，41（8）：521-524，530.

[7] 严华，张慧秀，白宗利，等 . 基于特征图谱的人参属药材西洋参、人参、三七的比较 [J]. 世界中医药，2021，16（6）：887-895.

[8] 刘永利，雷蓉，王晓蕾，等 . 基于中药质量标志物的人参、西洋参、三七及相关中成药质量控制方法研究 [J]. 中国药学杂志，2019，54（17）：1402-1410.

[9] 李向高，张连学，孟祥颖，等 . 西洋参特有成分——拟人参皂苷 F_{11} 的分离、鉴定与含量测定 [J]. 吉林农业大学学报，2005，27（6）：645-648.

[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：30.

[11] 张立新，周晓英，周世玉 . 西洋参、人参与其伪品和劣质品的鉴别研究 [J]. 现代医药卫生，2013，29（11）：1651-1652，1655.

[12] 黄天山，杨洁瑜，顾利红 . HPLC-ELSD 法同时测定康寿丸人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 的含量 [J]. 药品评价，2020，17（15）：27-30.

[13] 李婷，程显隆，王郡瑶，等 . HPLC-ELSD 法同时测定芪蛭通络胶囊中 2 个皂苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2022，42（4）：720-726.

[14] 颜冬兰，叶惠煊，黄胜，等 . HPLC-ELSD 法同时测定补血生乳颗粒中 8 种成分 [J]. 中草药，2019，50（20）：4957-4961.

[15] 张丹，郑开颜，王乾，等 . 国产和进口西洋参不同器官的品质差异研究 [J]. 中国现代中药，2017，19（6）：833-838.

[16] 冯素香，李先贺，李蒙蒙，等 . HPLC-ELSD 法测定人参不同部位 13 种人参皂苷的含量 [J]. 沈阳药科大学学报，2017，34（7）：565-569，612.

[17] 逄世峰，李亚丽，许世泉，等 . 西洋参不同部位人参皂苷类成分研究 [J]. 中国林副特产，2015，135（2）：1-3，9.

[18] 刘俊文，徐美利，徐冰，等 . 西洋参不同部位皂苷成分研究 [J]. 天津中医药，2019，36（7）：715-718.

（收稿日期：2023-03-24；修回日期：2023-06-14）

覆盆子及其易混品桉叶悬钩子的鉴别

邓雯姬，杨洁瑜（广州市药品检验所，广州　510160）

摘要：目的　探究覆盆子及其易混品桉叶悬钩子的生药特征，为有效区分两者提供依据。**方法**　采用体式显微镜对两者聚合果和小核果的构造特征进行观察，并通过显微镜对两者横切面和粉末显微特征展开比较。**结果**　覆盆子宿萼短于聚合果，小核果顶端密被茸毛表面有横纹，非腺毛短而平直；桉叶悬钩子无宿萼基部中心深凹，小核果表面无横纹全身密被茸毛，非腺毛长而弯曲。**结论**　本法可用于鉴别覆盆子与桉叶悬钩子，有效避免市场混用误用。

关键词：覆盆子；桉叶悬钩子；生药学特征；鉴别
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2734-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.029

Identification of *Rubus chingii* Hu and *Rubus eucalyptus* Focke

DENG Wen-ji, YANG Jie-yu (*Guangzhou Institute for Drug Control*, *Guangzhou*　510160)

Abstract: Objective　To determine the pharmacognostic characteristics of *Rubus chingii* Hu and *Rubus eucalyptus* Focke to provide reference for their identification. **Methods**　The structural characteristics of the aggregate fruit and drupes were explored by stereomicroscopy. The characteristics of the tissue and powder were observed by optical microscope. **Results**　The persistent calyx of *Rubus chingii* Hu was shorter than that of the aggregate fruit. The drupe with surface striation was covered with villus on the top, and the non-glandular hair was short and straight. The base of *Rubus eucalyptus* Focke was deeply recessed without persistent calyx. The drupe without surface striation was covered with whole villus, and the non-glandular hair was long and winding. **Conclusion**　This method can identify of *Rubus chingii* Hu and *Rubus eucalyptus* Focke and effectively avoid the mixed and misuse of both.

Key words: *Rubus chingii* Hu; *Rubus eucalyptus* Focke; pharmacognostic characteristics; discrimination

覆盆子（*Rubus chingii* Hu）始载于《神农本草经》，原药材为蔷薇科的华东覆盆子，以其果实入药，主要分布在江西、浙江、安徽等地，是益肾固精常用的中药材[1-2]。覆盆子主要成分为黄酮类、甾类和萜类，这类物质临床药理作用多为抗菌、抗炎、抗癌、抗氧化[3-5]。此外覆盆子还含有酚酸活性成分[6]，中医理论记载性味酸能缩、能涩，固临床上治疗漏尿遗尿、阳痿遗精效果显著[7]。由于用药范围广，市场需求量大，其采收和临床应用常出现易混品混淆误用的情况。目前已有很多研究对覆盆子的易混品进行鉴别，如绵果悬钩子[8]、山莓[9]、树莓[10]、毛栓莓[11]等。但未有对其易混品桉叶悬钩子相关的研究。桉叶悬钩子 *Rubus eucalyptus* Focke，药材名为软覆盆子，来源于蔷薇科植物的干燥果实，主要分布陕西、甘肃、四川等地。现收载于四川省中药材标准（2010 年版），但该标准仅对软覆盆子的整体性状及粉末显微特征进行鉴别，且以文字形式记载。

本文运用体式显微镜比较覆盆子及软覆盆子的外观形态和内在结构的区别，并采用光学显微镜观察两者横切面和粉末的显微特征，从宏观到微观对两者开展比较研究，为两药的鉴别提供参考依据。

1　材料

1.1　仪器

富士 S8100 数码相机（日本富士公司）；奥

作者简介：邓雯姬，女，主管中药师，主要从事药品质量检验及研究，email：234983626@qq.com

林巴斯 BX53 型显微镜和奥林巴斯 SZ61 型体式显微镜（日本奥林巴斯株式会社）。

1.2　药材

收集了不同产地的样品，经鉴定分别为蔷薇科植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥果实和蔷薇科植物桉叶悬钩子 *Rubus eucalyptus* Focke 的干燥果实，具体信息见表 1。

表 1　样品信息

Tab 1　Information of samples

编号	药材	产地	编号	药材	产地
1-1	覆盆子	浙江	2-1	桉叶悬钩子	陕西
1-2	覆盆子	江西	2-2	桉叶悬钩子	甘肃
1-3	覆盆子	安徽	2-3	桉叶悬钩子	四川

2　方法

2.1　性状鉴别

2.1.1　药材表面性状　药材除去杂质后，选取不同规格大小置于附有标尺的拍摄台上，日光下观察其自然形态，并用数码相机记录外观特征。

2.1.2　聚合果表面特征　选取中等大小具有代表性的药材置于在载物台上，应用体式显微镜观察药材不同面（正面、底面、顶面、横切面）的性质特征，并用数码成像系统记录影像数据。

2.1.3　小核果表面特征　摘取中等大小具有代表性的小核果，应用体式显微镜观察药材不同面（正面、外侧面、内侧面、横切面）的性质特征，并用数码成像系统记录影像数据。

2.2　显微鉴别

2.2.1　横切面鉴别　药材泡水软化后，用吸水纸擦掉附在药材表面的水分，将药材固定于切割板上，用刀片进行切制。切制后的薄片放置载玻片上，用滴管滴加少量水合氯醛，稍放置，置于加热板上透化，该步骤重复 1 ～ 2 次，冷却至室温后用稀甘油封片，置于奥林巴斯 BX53 型显微镜下观察并用数码成像系统记录特征。

2.2.2　粉末鉴别　取粉碎后的药材过五号筛，蘸取细粉于载玻片上均匀展开，按“2.2.1”项下透化步骤操作，冷却后盖上盖玻片，置于奥林巴斯 BX53 型显微镜下观察并用数码成像系统记录特征。

3　结果

3.1　性状特征

3.1.1　聚合果特征　覆盆子整体为黄绿或淡棕色，表面密被灰白色茸毛，由众多半月形的小核果聚合而成，聚合果手摸有茸毛感，呈类圆锥形，高 0.6 ～ 1.3 cm，直径 0.6 ～ 1.1 cm。质轻较硬。气味偏酸、涩。体式显微镜下，正面观察覆盆子聚合果，呈类圆形或类三角形；底面观中心凹入，残存萼片，宿萼短于聚合果，下有果梗痕；顶面观呈类圆形。横切面类圆形，中部花托类圆形，其四周围绕众多小核果。详见图 1A。

桉叶悬钩子与覆盆子相似，大小规格相等，为灰绿色或灰褐色类圆锥形的聚合果，表面密被灰白色茸毛，有棕褐色花丝附着表面，高 0.5 ～ 1.3 cm，直径 0.4 ～ 1.5 cm。质轻较硬，手摸茸毛感，气味酸涩。体式显微镜下正面观多呈类圆三角形；底面观中心深凹成孔，无萼片；顶面观呈类圆形。横切面类圆形，密被茸毛，花托中空，四周围绕众多小核果。详见图 1B。

3.1.2　小核果特征　覆盆子小核果为黄棕色，高 2.0 ～ 2.5 mm，直径 0.7 ～ 1.3 mm，表面有明显的横纹。正面观为半月形，整体网格状纹凹陷明显，具丝绢光泽，顶端钝圆密被茸毛，底部略尖较光滑。外侧面中央隆起有一棱线向两端弯曲，棱线上附着茸毛。内侧面光滑，几乎无茸毛。横切类椭圆形两端略尖，种子一枚，位于中心。种子半透明类椭圆形，约占小核果的三分之二。详见图 2A。

桉叶悬钩子为灰绿色，表面密被众多灰白色长茸毛，附着棕色花丝，高 2.0 ～ 2.7 mm，直径 0.9 ～ 1.5 mm，无横纹。正面观为半月形，网格状纹凹陷，全身密被茸毛。外侧面中央隆起有一棱线向两端弯曲，密被茸毛。内侧面茸毛众多。断面类椭圆形两端略尖，种子一枚，位于中心。种子较小，半透明扁椭圆形。详见图 2B。

3.2　显微特征

3.2.1　横切面显微特征　覆盆子外果皮表皮细胞呈类方形，外被角质层，单列切向延长，外缘波状弯曲。表皮细胞向外突起形成非腺毛。中果皮细胞数列，外侧细胞略切向延长，常见草酸钙簇晶。维管束外韧型，位于内果皮脊状突起的外侧，四周有纤维及网纹细胞围绕 [12]。内果皮壁厚木化，为 20 余列纤维脊状突起，内外纤维层交错排列。种皮表皮细胞黄棕色，单列呈类方形。子叶细胞中含糊粉粒、草酸钙簇晶及脂肪油滴。胚乳细胞含大量脂肪油滴及糊粉粒（见图 3）。

桉叶悬钩子外果皮表皮细胞呈类方形，单列切向延长，外被角质层。向外突起的非腺毛长而弯曲。中果皮细胞数列，常见草酸钙簇晶。维管束外韧型，位于内果皮脊状突起的外侧，四周有纤维，网纹细胞偶见。内果皮壁厚木化，为 20 余列纤维脊状突起，内外纤维层交错排列。种皮

图 1　样品性状特征图

Fig 1　Characteristics of samples

A. 覆盆子（*Rubus chingii* Hu）；B. 桉叶悬钩子（*Rubus eucalyptus* Focke）；依次为正面、底面、顶面、横切面（front；basic；top and cross view successively）

图 2　小核果特征图

Fig 2　Characteristics of Fructus

A. 覆盆子（*Rubus chingii* Hu）；B. 桉叶悬钩子（*Rubus eucalyptus* Focke）；依次为表面特征、正面、外侧面、内侧面、横切面）（surface character；front；outer side；inner side and cross view successively）；1. 非腺毛（non-glandular hair）；2. 外果皮（epicarp）；3. 内果皮（endocarp）；4. 种子（seed）

表皮细胞黄棕色，单列呈类方形。子叶细胞中含糊粉粒、草酸钙簇晶及脂肪油滴。胚乳细胞含大量脂肪油滴及糊粉粒（见图 3）。

3.2.2　粉末显微特征　覆盆子粉末呈棕黄色。非腺毛长 60 ～ 450 μm，多为单细胞，壁厚木化，长 60 ～ 450 μm，表面具双螺纹，常见非腺毛脱落，基部表面观似石细胞呈类圆形，残留于表皮层，直径约 25 μm。草酸钙簇晶棱角明显，单个散落或存在中果皮细胞中，直径 18 ～ 50 μm。网纹细胞直径 5 ～ 26 μm，表面观长梭形或椭圆形。果皮纤维无色或黄色，纵横交错或斜向排列成片存在。种皮表皮细胞无色或淡黄色，类多角形壁薄细波状弯曲，多成片存在，有的胞腔可见浅棕色颗粒状物。子叶细胞无色或黄色，富含脂肪油滴和糊粉粒，并可见细小簇晶（见图 4）。

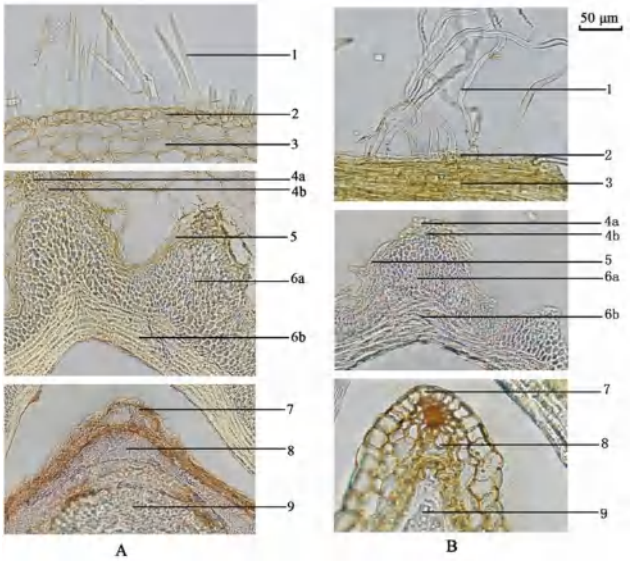


图 3　样品横切图

Fig 3　Cross-cutting characteristics of samples

A. 覆盆子（*Rubus chingii* Hu）；B. 桉叶悬钩子（*Rubus eucalyptus* Focke）；1. 非腺毛（non-glandular hair）；2. 外果皮细胞（epicarp cell）；3. 中果皮细胞（mesocarp cell）；4. 外韧型维管束（4a. 韧皮部；4b. 木质部）[out tough vascular bundle（4a.phloem；4b.xylem）]；5. 网纹细胞（reticulate cell）；6. 内果皮纤维（6a. 外层；6b. 内层）[endocarp fiber（6a.outer；6b.inner）]；7. 种皮细胞（testa cell）；8. 胚乳细胞（endossperm cell）；9. 子叶细胞（cotyledon cell）

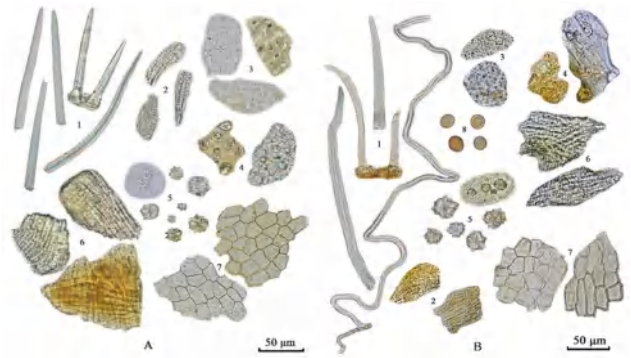


图 4　样品粉末显微图

Fig 4　Powder characteristics of samples

A. 覆盆子（*Rubus chingii* Hu）；B. 桉叶悬钩子（*Rubus eucalyptus* Focke）；1. 非腺毛（non-glandular hair）；2. 网纹细胞（reticulate cell）；3. 子叶细胞（cotyledon cell）；4. 非腺毛基部残基（non-glandular hair foot residues）；5. 草酸钙簇晶（calcium oxalate cluster）；6. 果皮纤维（pericarp fiber）；7. 种皮表皮细胞（seed coat cell）；8. 花粉粒（pollen grain）

桉叶悬钩子粉末灰绿色。非腺毛壁厚木化，胞腔线形或不明显，表面无螺纹。其大多碎断，长 60 ～ 1000 μm，平直或弯曲，常脱落残留形如石细胞状的基部埋于表皮层。草酸钙簇晶棱角明显，单个散落或存在中果皮细胞中，直径 15 ～ 50 μm。网纹细胞直径 5 ～ 20 μm，表面观长梭形或椭圆形。果皮纤维无色或黄色，纵横交错或斜向排列成片存在。种皮表皮细胞无色或淡黄色，类多角形壁薄细

波状弯曲，多成片存在，有的胞腔可见浅棕色颗粒状物。子叶细胞无色或黄色，富含脂肪油滴和糊粉粒，并可见众多细小簇晶散在。花粉粒黄棕色，类圆形，壁微厚内含颗粒状物（见图 4）。

4　讨论

覆盆子为常用的补益中药，标准收载于《中国药典》，其易混品较多。相关文献主要在鉴别绵果悬钩子、山莓、树莓等，目前暂无文献研究其易混品桉叶悬钩子。桉叶悬钩子现收载于四川省中药材标准（2010 年版），但该标准仅为文字描述，且无桉叶悬钩子显微横切面鉴别。本文补充了桉叶悬钩子显微横切面的研究，并提供了丰富的外观形状、内在结构、粉末特征等彩图。

通过研究比较发现，两者性状鉴别要点为：覆盆子聚合果基面观中心微凹入，残存萼片，宿萼短于聚合果，下有果梗痕，断面实心；小核果表面有横纹，顶端密被茸毛，底部较光滑无毛。而桉叶悬钩子基面观中心深凹成孔，无萼片，断面中空；小核果表面无横纹，全身密被茸毛。横切显微特征，覆盆子外韧型维管束四周围绕网纹细胞；而桉叶悬钩子外韧型维管束偶见网纹细胞。粉末显微特征，覆盆子非腺毛较短且平直，表面有螺纹；桉叶悬钩子非腺毛长而弯曲，无螺纹。桉叶悬钩子显微粉末特征虽含花粉粒，但《本草纲目》[13] 记载“覆盆以四五月熟”，现代相关研究 [14] 也指出覆盆子的最佳采收期为 4 ～ 5 月，而 4 ～ 5 月正为桉叶悬钩子的花期，故花粉粒不能作为区别两者的要点。两者差异区别要点见表 2。

表 2　覆盆子和桉叶悬钩子鉴别要点

Tab 2　Characteristics identification of *Rubus chingii* Hu and *Rubus eucalyptus* Focke

药材	性状特征		显微特征	
	聚合果	小核果	横切特征	粉末特征
覆盆子	宿萼短于聚合果，基部中心凹入，断面实心	表面有横纹，茸毛主要密被背部，腹部无毛	外韧型维管束四周围绕网纹细胞	非腺毛长 60 ～ 450 μm，多平直，表面有螺纹
桉叶悬钩子	无宿萼，基部中心深凹成孔，断面中空	表面无横纹，全身密被茸毛	外韧型维管束四周偶见网纹细胞	非腺毛长可达 1000 μm，多弯曲，表面无螺纹

本文通过研究覆盆子及与其易混淆品桉叶悬钩子的生药学特征，比较两者外观性状、内在构造和显微特征的区别点，研究结果为桉叶悬钩子的鉴别提供了依据，有利于提高软覆盆子的质量标准，也为鉴别覆盆子及与其易混淆品桉叶悬钩子提供依据。此外，本文运用体式显微镜和光学显微镜，达到了图像化描述的效果。通过数字图像化能更好地了解药材外观形状及内在结构，对智能识别药材有重要意义。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：399-400.

[2] 程丹，李洁，周斌，等 . 覆盆子化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 中药材，2012，35（11）：1873-1876.

[3] 管咏梅，屈宝华，王慧，等 . 中药覆盆子及其成熟果实研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2023，41（1）：1-5.

[4] 师聪，解春芝，张建萍，等 . 覆盆子不同极性溶剂提取物的抗氧化活性比较 [J]. 食品科技，2021，46（1）：220-224.

[5] 崔璐，郑振秋 . 关于覆盆子化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 全科口腔医学电子杂志，2020，7（1）：192，196.

[6] 孙金旭，朱会霞，肖冬光 . 覆盆子中有机酸含量的测定 [J]. 现代食品科技，2013，29（6）：1374-1376，1320.

[7] 贺冰，尤昭玲 . 浅谈补肾要药 - 覆盆子的应用 [J]. 中医药导报，2004，10（5）：66-67，77.

[8] 文永兰，李亚玲 . 覆盆子及其混伪品绵果悬钩子的比较鉴别 [J]. 中国中医药现代远程教育，2009，7（1）：88.

[9] 蔡文山 . 覆盆子及其混淆品山莓的鉴别 [J]. 海峡药学，2007，19（2）：66-67.

[10] 郭耀武，杨瑞瑞，刘莲英 . 覆盆子与混淆品树莓果的鉴别 [J]. 西北药学杂志，2002，17（6）：251-252.

[11] 姜从良，林雪冰 . 中药覆盆子及其混伪品毛栓莓的理化鉴别 [J]. 亚太传统医药，2006（10）：78.

[12] 石佳，巫明慧，康帅，等 . 覆盆子的性质和显微鉴定研究与数字化表征 [J]. 中国药学杂志，2022，57（6）：420-427.

[13] 李时珍 . 本草纲目校点本 . 第 2 册 [M]. 北京：人民卫生出版社，1979：1243.

[14] 孙乙铭，许寿增，俞春英，等 . 覆盆子成熟过程颜色表征及其与品质指标消长的相关性研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46（6）：1379-1385.

（收稿日期：2023-03-29；修回日期：2023-05-16）

基于高效液相色谱指纹图谱及多模式化学计量学分析评价菝葜饮片的质量

陈彦洁[1, 2]，蒋学青[1, 2]，罗鑫[1, 2]，蒋佳丽[1, 2]，王艺洁[1, 2]，谢谭芳[1, 2]，王志萍[1, 2*]（1. 广西中医药大学药学院，南宁　530200；2. 广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室，南宁　530200）

摘要：目的　建立不同来源的菝葜高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，结合多模式化学计量学分析菝葜饮片的质量。**方法**　建立 18 批菝葜 HPLC 指纹图谱，结合相似度评价、聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘 - 判别分析对不同来源的菝葜进行评价。**结果**　指纹图谱标定了 13 个共有峰，指认出 5 个成分，分别为绿原酸、落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷及白藜芦醇；相似度评价结果，18 批样品除 YP3 以外，其余相似度均大于 0.9；结合多模式化学计量学分析可以将 18 批样品分为三类，并筛选出 6 个可能导致菝葜质量差异的标志物。**结论**　本研究建立的指纹图谱方法简便、重复性好，结合多模式化学计量学分析可用于评价不同来源的菝葜质量。

关键词：菝葜；高效液相色谱；指纹图谱；聚类分析；主成分分析；正交偏最小二乘 - 判别分析
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2738-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.030

Quality evaluation of *Smilax china* L. by combined HPLC fingerprint and chemical pattern recognition

CHEN Yan-jie[1, 2], JIANG Xue-qing[1, 2], LUO Xin[1, 2], JIANG Jia-li[1, 2], WANG Yi-jie[1, 2], XIE Tan-fang[1, 2], WANG Zhi-ping[1, 2*] (1. *School of Pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530200; 2. *Key Laboratory of Generic Technology Research and Development of Traditional Chinese Medicine Preparations in Colleges and Universities in Guangxi*, *Nanning* 530200)

Abstract: Objective　To evaluate the quality of *Smilax china* L. from different sources by combined HPLC fingerprint and chemical pattern recognition. **Methods**　HPLC fingerprints of 18 batches of *Smilax china* L. were established. Similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis were conducted to evaluate *Smilax china* L. from different sources. **Results**　Thirteen common peaks were identified and five components were confirmed, namely chlorogenic acid, astiltin, quercetin, engeletin and resveratrol. The similarity evaluation showed that the similarity of 18 batches of samples was greater than 0.9 except YP3. Combined with multi-mode stoichiometric analysis, the 18 batches of samples were divided into three categories, and 6 quality markers of *Smilax china* L. were selected. **Conclusion**　The fingerprint method is simple and reproducible, and can be used to evaluate the quality of S*milax china* L. from different sources in combination with multi-mode stoichiometric analysis.

Key words: *Smilax china* L.; HPLC; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis

菝葜为百合科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根茎，具有利湿去浊、祛风除痹、解毒散瘀的功效[1]。现在研究表明，菝葜中主要含有甾体皂苷类、黄酮类、氨基酸类、甾醇类和有机酸类等

基金项目：广西科技重大专项（No. 桂科 AA18126003）。
作者简介：陈彦洁，男，硕士研究生，主要从事中药、民族药新制剂与新剂型的研发，email：2635154796@qq.com　*通信作者：王志萍，女，硕士研究生导师，教授，主要从事中药民族药新制剂与新剂型的研究，email：318007460@qq.com

化合物[2]，具有抗癌、抗炎、抗氧化、降血脂[3]等多种药理作用，临床上可用于治疗肿瘤、慢性盆腔炎、乳腺增生、卵巢囊肿等[4-5]疾病。

中药组成复杂，用单一的指标难以分析评价其综合质量，中药指纹图谱技术是评价中药整体性、稳定性的一种有效方法，从整体上体现中药的化学特征，符合中医理论中全面性、整体性的特点，已成为控制天然药物整体质量的有效手段[6]。

多模式化学计量学分析主要包括聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘 - 判别分析（OPLS-DA）等，能从整体上对药材进行评价[7]。指纹图谱技术结合多模式化学计量学分析能反映出中药材质量与化学组成的真实情况[8]，基于此，本研究收集了 18 批不同来源的菝葜饮片，建立了菝葜饮片的 HPLC 指纹图谱，并结合聚类分析、主成分分析及 OPLS-DA，综合评价菝葜饮片的质量，以期为菝葜的质量控制提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

岛津 LC-2030 Plus 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；XSR205DU/A 型电子天平（美国 Mettler Toledo 公司）；KQ-800DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；UPH-IV20TN 型优普超纯水机（四川优普超纯科技有限公司）。

1.2　试药

绿原酸（批号：MUST-22111711，纯度：99.82%）、落新妇苷（批号：MUST-22032404，纯度：98.14%）、白藜芦醇（批号：MUST-21112413，纯度：99.82%）、黄杞苷（批号：MUST-22011202，纯度：98.10%）、槲皮苷（批号：MUST-20121401，纯度：98.87%）（成都麦德生科技有限公司）；色谱纯乙腈、甲醇（美国 Fisher 公司）；色谱纯磷酸 [阿拉丁试剂（上海）有限公司]；其余试剂均为分析纯（成都市科隆化学品有限公司）。本研究收集了包括安徽、江西、贵州、广西、广东及湖南等地的 18 批菝葜饮片，饮片均由广西中医药大学田慧教授鉴定为百合科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根茎，样品信息详见表 1。

2　方法与结果

2.1　溶液的制备

2.1.1　供试品溶液的制备　取菝葜饮片粉末（过 2 号筛）约 0.5 g，精密称定，置 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 70% 甲醇 25 mL，超声（320 W，40 kHz）45 min，放冷，补足质量，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液即得。

表 1　菝葜饮片来源信息

Tab 1　Sample information of *Smilax china* L.

编号	产地	批号	编号	产地	批号
YP1	安徽 1	220724	YP10	广西 1	220719
YP2	安徽 2	230201	YP11	广西 2	221001
YP3	安徽 3	221029	YP12	广西 3	230515
YP4	江西 1	220622	YP13	广东 1	220801
YP5	江西 2	220815	YP14	广东 2	220815
YP6	江西 3	210925	YP15	广东 3	230215
YP7	贵州 1	221001	YP16	湖南 1	220615
YP8	贵州 2	221201	YP17	湖南 2	220824
YP9	贵州 3	230217	YP18	湖南 3	221210

2.1.2　混合对照品溶液的制备　取落新妇苷、黄杞苷、白藜芦醇、绿原酸及槲皮苷对照品适量，精密称定，加 70% 甲醇溶解并定容至刻度，制成质量浓度分别为 0.420、0.190、0.260、0.666、0.206 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2　HPLC 指纹图谱的建立与分析

2.2.1　色谱条件　Shim-pack GIST C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 25 min，9%A；25 ～ 110 min，9% ～ 29%A；110 ～ 115 min，29% ～ 9%A；115 ～ 120 min，9%A）；流速：1 mL • min^{-1}；柱温：35 ℃；检测波长：302 nm；进样量：10 μL。

2.2.2　精密度试验　取菝葜饮片（YP1）0.5 g，按“2.1.1”项下条件制备，再按“2.2.1”项下色谱条件连续进样分析 6 次，以 5 号峰（落新妇苷）为参照峰 S，计算得到各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.39%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.3%，表明仪器的精密度符合指纹图谱要求。

2.2.3　重复性试验　取菝葜饮片（YP1）0.5 g，平行 6 份，按“2.1.1”项下条件制备，再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，以 5 号峰（落新妇苷）为参照峰 S，计算得到各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 1.6%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.7%，表明该方法重复性良好。

2.2.4　稳定性试验　取菝葜饮片（YP1）0.5 g，按“2.1.1”项下条件制备，再按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析，以 5 号峰（落新妇苷）为参照峰 S，计算得到各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.57%，相对峰面积 *RSD* ＜ 1.5%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5　指纹图谱的建立及相似度评价　取 18 批菝葜饮片，按“2.1.1”项方法制备，再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，导入到中

药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版），将编号为 YP1 的样品设为参照图谱，用中位数法将各批次样品计算出的数据进行峰匹配生成指纹图谱共有模式，标定了 13 个共有峰，结果见图 1。相似度计算公式如下[9-10]，式中 x_i 和 y_i 分别代表两组样品的共有峰峰面积。18 批菝葜饮片图谱与对照图谱相比，除 YP3 以外，其余相似度均大于 0.9（见表 2），表明 18 批不同来源的菝葜饮片一致性较好，可以用于评价菝葜饮片的综合质量。

$$相似度=\frac{\sum_{i=1}^{n} X_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(X_i)^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(y_i)^2}}$$

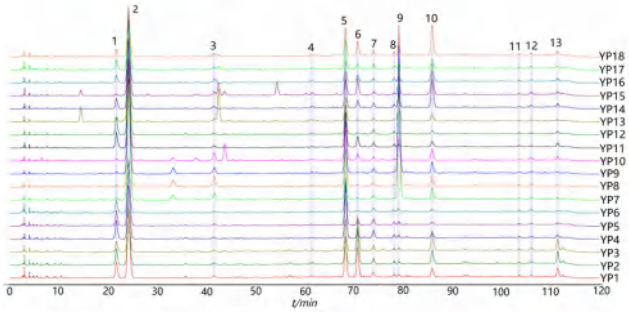


图 1　18 批菝葜饮片 HPLC 叠加图谱

Fig 1　HPLC fingerprint of 18 batches of S*milax china* L.

表 2　18 批菝葜饮片的相似度

Tab 2　Similarity of 18 batches of *Smilax china* L.

编号	相似度	编号	相似度
YP1	0.941	YP10	0.987
YP2	0.905	YP11	0.963
YP3	0.895	YP12	0.952
YP4	0.917	YP13	0.990
YP5	0.951	YP14	0.971
YP6	0.957	YP15	0.970
YP7	0.919	YP16	0.970
YP8	0.937	YP17	0.978
YP9	0.907	YP18	0.924

2.2.6　共有峰指认　通过与已知混合对照品溶液色谱图比较保留时间，结果见图 2 ～ 3，13 个共有峰共指认出 5 个峰，其中峰 2 为绿原酸，峰 5 为落新妇苷，峰 8 为槲皮苷，峰 9 为黄杞苷，峰 10 为白藜芦醇。

2.2.7　聚类分析　以 18 批菝葜饮片共有峰峰面积为变量，经 Z 标准化处理后导入 SPSS 25.0 软件，采用系统聚类中组间连接的聚类方法，以平方欧氏距离为区间，进行聚类，共聚为三类，其中 YP1 ～ YP3 聚类一类，YP7 ～ YP10 聚为一类，YP4 ～ 6、YP11 ～ 18 聚为一类，结果见图 4。

2.2.8　主成分分析　以 18 批菝葜饮片共有峰峰面积为变量，经 Z 标准化处理后导入 SPSS 25.0 软件，通过降维的手段进行主成分分析，结果 Bartlett 球形度检验 $P < 0.01$，表明主成分分析模型成立，以特征值 > 1 提取了 3 个主成分，方差贡献率分别是 43.428%、24.878%、14.548%，累积方差贡献率为 82.854%，见表 3，结合碎石图（见图 5）分析，3 个成分的曲线斜率较大，表明这 3 个主成分能代表该 18 批菝葜饮片指纹图谱的大部分信息，可作为综合指标对菝葜饮片的质量进行评价。

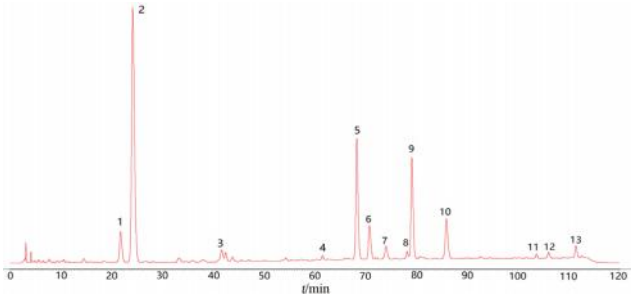


图 2　菝葜饮片对照图谱

Fig 2　HPLC specific chromatogram of S*milax china* L.

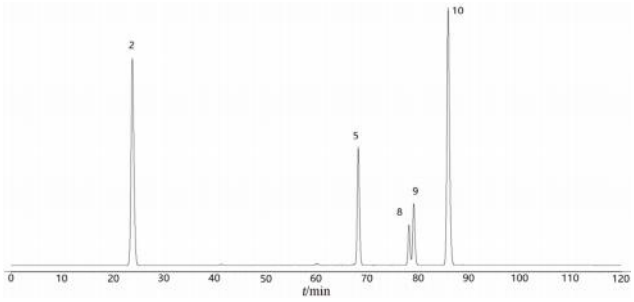


图 3　混合对照品溶液的 HPLC 图谱

Fig 3　HPLC chromatogram of mixed reference solution

2. 绿原酸（chlorogenic acid）；5. 落新妇苷（astilbin）；8. 槲皮苷（quercetin）；9. 黄杞苷（engeletin）；10. 白藜芦醇（resveratrol）

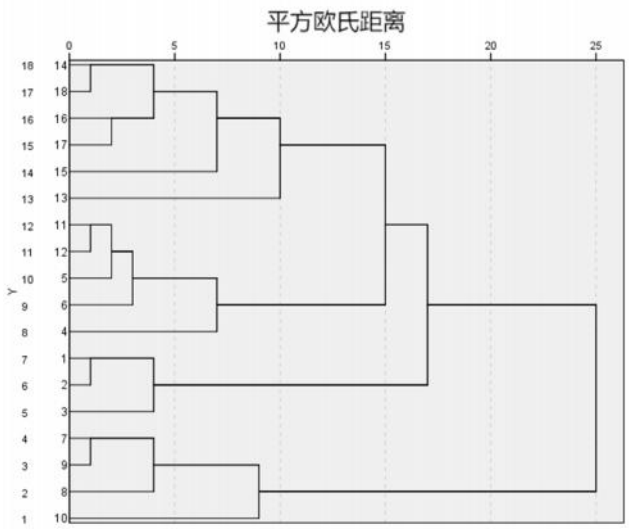


图 4　18 批菝葜饮片聚类分析图

Fig 4　Cluster analysis of 18 batches of S*milax china* L.

表 3　主成分特征值及方差贡献率

Tab 3　Principal component eigen value and variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
1	5.646	43.428	43.428
2	3.234	24.878	68.306
3	1.891	14.548	82.854

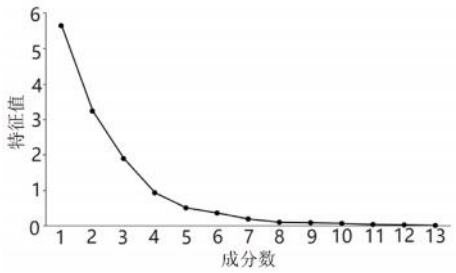


图 5　碎石图

Fig 5　Gravel diagram

从表 4 主成分载荷系数可知，主成分 1 主要反映峰 1、峰 2（绿原酸）、峰 3、峰 5（落新妇苷）、峰 6、峰 7、峰 8（槲皮苷）、峰 9（黄杞苷）、峰 11 和峰 13 的信息，主成分 2 主要反映峰 1、峰 4、峰 10（白藜芦醇）和峰 12 的信息，主成分 3 主要反映峰 13 的信息。

表 4　主成分载荷矩阵

Tab 4　Principal component load matrix

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3
1	0.770	− 0.591	0.049
2	− 0.899	− 0.068	0.291
3	− 0.914	0.194	0.240
4	0.288	0.831	0.003
5	− 0.600	− 0.469	0.525
6	0.689	0.370	0.594
7	0.540	− 0.504	0.285
8	0.705	− 0.107	− 0.438
9	− 0.864	− 0.013	0.310
10	0.189	0.831	− 0.097
11	0.693	− 0.405	0.493
12	0.088	0.771	0.289
13	0.656	0.288	0.643

利用 SPSS 25.0 软件对主成分载荷进行分析，以主成分载荷系数除以对应特征值的算数平方根得到线性组合系数，有关线性模型如下：

成分 1 得分＝ 0.324× 峰 1 － 0.378× 峰 2 － 0.385× 峰 3 ＋ 0.121× 峰 4 － 0.253× 峰 5 ＋ 0.290× 峰 6 ＋ 0.227× 峰 7 ＋ 0.297× 峰 8 － 0.364× 峰 9 ＋ 0.080× 峰 10 ＋ 0.292× 峰 11 ＋ 0.037× 峰 12 ＋ 0.276× 峰 13

成分 2 得分＝ － 0.328× 峰 1 － 0.038× 峰 2 ＋ 0.108× 峰 3 ＋ 0.462× 峰 4 － 0.261× 峰 5 ＋ 0.205× 峰 6 － 0.280× 峰 7 － 0.059× 峰 8 － 0.007× 峰 9 ＋ 0.462× 峰 10 － 0.225× 峰 11 ＋ 0.428× 峰 12 ＋ 0.160× 峰 13

成分 3 得分＝ 0.036× 峰 1 ＋ 0.212× 峰 2 ＋ 0.174× 峰 3 ＋ 0.002× 峰 4 ＋ 0.381× 峰 5 ＋ 0.432× 峰 6 ＋ 0.208× 峰 7 － 0.319× 峰 8 ＋ 0.225× 峰 9 － 0.071× 峰 10 ＋ 0.358× 峰 11 ＋ 0.210× 峰 12 ＋ 0.467× 峰 13

其中峰 1 ～峰 13 表示经 Z 标准化后的 13 个共有峰峰面积，将标准化后的值代入线性模型，得到 18 批菝葜饮片的主成分得分，结果见表 5，将 3 个主成分得分导入 Origin 2018 软件，建立三维散点图（见图 6），结果 18 批菝葜饮片的空间分布分为三组，表明不同来源菝葜的成分组成上存在一些差异，其中 YP1 ～ YP3 分布较为接近，YP7 ～ YP10 分布较为接近，TP4 ～ YP6、YP11 ～ YP18 分布较为接近，与聚类分析结果基本保持一致。

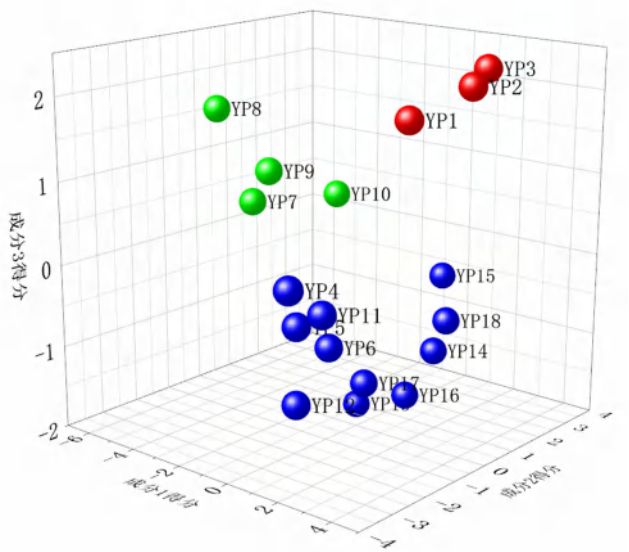


图 6　18 批菝葜饮片主成分得分图

Fig 6　Principal component score of 18 batches of *Smilax china* L.

2.2.8　OPLS-DA　将 18 批菝葜饮片的共有峰经 Z 标准化处理后导入 SIMCA14.1 软件，建立 OPLS-DA 数字模型。结果显示，该模型解释参数（R^2X、R^2Y）分别为 0.592、0.892，表明模型对变量 X（组间差异）、Y（组内差异）的解释率分别为 59.2%、89.2%，Q^2 为 0.791，表明该模型的预测能力可达 79.1%[11]。采用 SIMCA 14.1 绘制得分矩阵图，见图 7。可知，18 批菝葜饮片可分为 3 类，YP1 ～ YP3 为一类，YP7 ～ YP10 为一类，YP4 ～ YP6、YP11 ～ YP18 为一类。

采用 SIMCA 14.1 软件，以 Permutations 检验（n ＝ 200）对建立的 OPLS-DA 模型进行验证，详

表 5　18 批菝葜饮片的主成分得分

Tab 5　Principal component scores of 18 batches of *Smilax china* L.

编号	成分 1 得分	成分 2 得分	成分 3 得分
YP1	2.2794	－0.2839	1.8743
YP2	3.4111	0.7804	2.2172
YP3	2.9089	1.7674	2.3247
YP4	1.5400	－3.3228	0.2586
YP5	0.6670	－2.4332	－0.3482
YP6	0.4103	－1.2376	－0.7948
YP7	－3.9011	－0.3690	0.5683
YP8	－5.3818	－0.4077	1.6377
YP9	－3.1050	－0.4320	0.9982
YP10	－2.7592	1.5290	0.5311
YP11	1.2995	－2.1504	－0.2003
YP12	0.5829	－2.3838	－1.2894
YP13	－0.9617	0.7920	－1.9468
YP14	0.8438	1.9595	－1.2780
YP15	－0.2237	3.2088	－0.5547
YP16	0.6441	1.1313	－1.7381
YP17	0.3095	－0.0042	－1.4340
YP18	1.4358	1.8561	－0.8257

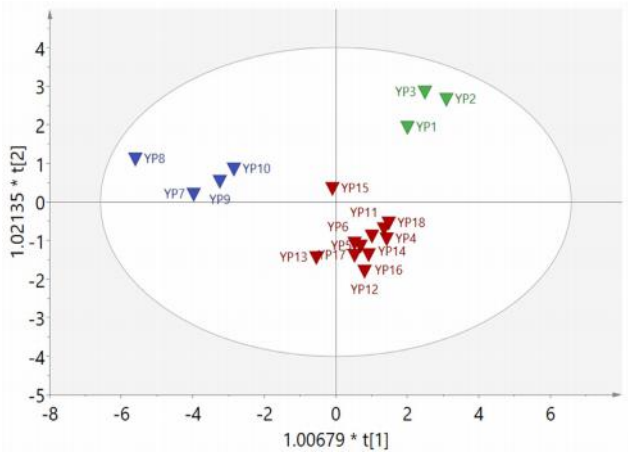


图 7　18 批菝葜饮片 OPLS-DA 矩阵图

Fig 7　OPLS-DA matrix of 18 batches of *Smilax china* L.

见图 8，可知，模型参数（R^2、Q^2）分别为（0，0.083）、（0，－0.586），Q^2 的回归线与纵轴相交于 0.5 以下，表明建立的 OPLS-DA 模型拟合度好 [12]，可用于菝葜饮片质量差异成分的分析验证。

变量投影重要性分析值（VIP）是筛选差异性化合物的重要指标，VIP 值越高，表示其对应化学成分对该模型的贡献度越大。采用 SIMCA 14.1 软件，以 VIP 值＞ 1 为阈值 [13]，筛选影响菝葜饮片质量的标志成分，结果见图 9，共筛选出 6 个成分，峰号依次为 13 号峰、6 号峰、3 号峰、2 号峰（绿原酸）、9 号峰（黄杞苷）、8 号峰（槲皮苷），表明这 6 个共有峰所对应的化学成分可能是菝葜饮片质量差异的标志成分。

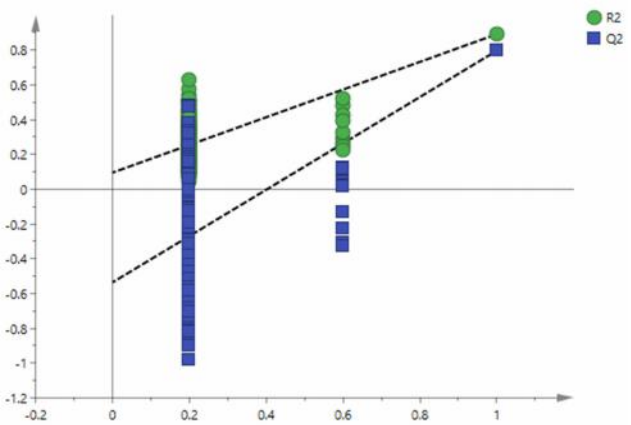


图 8　OPLS-DA 的置换检验结果

Fig 8　OPLS-DA substitution test

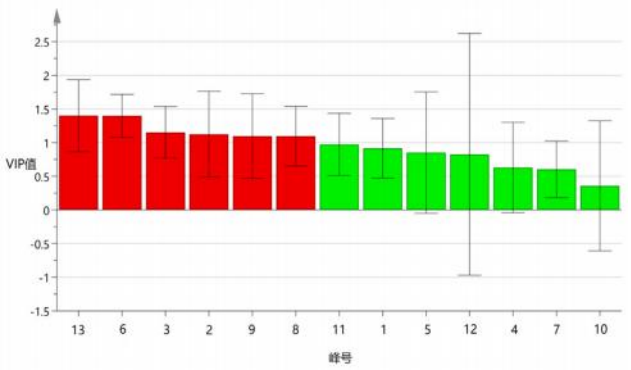


图 9　18 批菝葜饮片共有峰 VIP 值

Fig 9　VIP value of common peak in 18 batches of *Smilax china* L.

3　讨论

3.1　色谱条件优化及供试品制备考察

课题组前期考察了不同流动相体系、色谱柱、柱温、流速，根据色谱图信息丰富程度，峰数量以及峰形为条件，最终确定了本文的色谱条件，并在参考文献 [14-15] 的基础上结合对供试品溶液的制备方法进行考察（不同浓度的溶剂、提取方式、提取时间进行考察），最终发现在 70% 的甲醇下超声 45 min 时的供试品溶液中各成分含量最高。

3.2　共有峰指认及存在的不足

18 批不同来源的菝葜饮片共标定了 13 个共有峰，指认出 5 个成分，分别为绿原酸、落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇。不足之处在于仍然有 7 个成分未被指认，后期将通过液 - 质联用技术，解析未被指认的共有峰的化学成分以及改用 UPLC 建立指纹图谱，缩短分析时间。

3.3　多模式化学计量学分析

聚类分析、主成分分析、OPLS-DA 可以准确地分析不同来源菝葜之间的差异，从结果来看，三类分析结果一致，其中 YP1 ～ YP3 为一类，YP7 ～ YP10 为一类，YP4 ～ YP6、YP12 ～ YP18

为一类，表明不同来源的菝葜饮片的化学组成没有明显的地域性，质量较为稳定。

综上本研究建立了不同来源菝葜饮片的HPLC指纹图谱，通过多模式化学计量学分析对饮片进行综合评价，该结果可为菝葜饮片的质量评价及控制提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：321-322.

[2] 林华，刘永逸 . 金刚藤化学成分及其质量控制分析方法研究概述 [J]. 中国药物评价，2022，39（6）：456-460.

[3] 王江威，苏晓琳，郑秀茜，等 . 中药菝葜的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 化学工程师，2020，34（2）：50-53.

[4] 朱应怀，胡建平，李正翔 . 金刚藤的现代药学研究及临床应用进展 [J]. 海峡药学，2021，33（4）：42-46.

[5] 朱兰寸 . 金刚藤糖浆的临床应用进展 [J]. 中国药业，2013，22（19）：110-112.

[6] 陈淑娜，冯冰薇，成秋香，等 . HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱应用于黄芪的质量评价 [J]. 中南药学，2023，21（1）：105-109.

[7] 杨园珍，王雅琪，胡恋琪，等 . 不同产地葛根与粉葛的HPLC指纹图谱及其多成分化学模式识别分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（4）：162-166.

[8] 孟然，吴哲，冯薇，等 . 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及多成分定量的蒲公英质量评价研究 [J]. 中草药，2022，53（24）：7887-7896.

[9] 关洪月，李林，刘晓，等 . 中药指纹图谱相似度计算方法探析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（18）：282-287.

[10] 詹雪艳，史新元，段天璇，等 . 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（2）：248-251.

[11] 李林杰，谢谭芳，王昱涵，等 . 壮药金母颗粒的指纹图谱建立、化学计量学分析及多组分含量测定 [J]. 中国药房，2022，33（4）：439-445，464.

[12] 王美华，赵邯涛，潘梦雪，等 . 益胃汤物质基准的HPLC指纹图谱分析及多组分含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（17）：9-15.

[13] 何文媛，李妍，王康宇，等 . 正交偏最小二乘判别分析法研究赤芍标准汤剂指纹图谱 [J]. 中药材，2022，45（3）：664-667.

[14] 龙丽，张亚莉，杨琴，等 . HPLC 法测定菝葜药材中黄酮类成分的含量 [J]. 中药材，2019，42（12）：2874-2877.

[15] 杨立勇，李雨生，王祥培，等 . 菝葜药材 HPLC 指纹图谱的鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（8）：104-107.

（收稿日期：2023-03-22；修回日期：2023-04-27）

顶空气相色谱和顶空气相色谱 - 质谱法测定 20 种中药材中磷化铝的残留量

王月玲[1, 2]，戚鹏飞[1, 2]，吴福祥[1, 2]，邵长春[1, 2]，徐雪梅[1, 2*]，杨金草[3]（1. 兰州市食品药品检验检测研究院，兰州　730050；2. 国家市场监管重点实验室（食品中农药兽药残留监控），兰州　730050；3. 甘南藏族自治州药品检验检测中心，甘肃　合作　747000）

摘要：目的　建立 20 种中药材、中药饮片中磷化铝残留量的顶空气相色谱（HSGC）定量检验和顶空气相色谱 - 质谱法（HSGCMS）定性检验方法。**方法**　定量分析采用 Agilent HP-PLOT/Q-PT 毛细管柱，火焰光度检测器（FPD），以峰面积为依据，用外标法进行分析；定性分析采用 Agilent HP-PLOT/Q-PT 毛细管柱，质谱检测器，以保留时间、质谱特征离子碎片峰和相对丰度比作为定性判断依据。**结果**　定量分析中磷化铝（以磷化氢计）在 1 ～ 50 ng 内与测定值呈良好的线性关系（$r = 0.9966$），回收率为 82.3% ～ 88.9%。样品检测发现 20 种中药材中部分批次检出磷化氢。**结论**　本法专属性好、灵敏度高，可用于中药材、中药饮片中磷化铝残留量的检测。

关键词：顶空气相色谱；顶空气相色谱 - 质谱法；中药材；中药饮片；磷化铝残留量

中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2743-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.031

基金项目：甘肃省药品监督管理局药品科研项目（No. 2020GSMPA033）；甘肃省药品监督管理局药品科研项目（No. 2022GSMPA0069）；甘肃省市场监督管理局科技计划项目（No. SSCJG-SP-202104）；甘肃省药品监督管理局药品科研项目（No. 2021GSMPA006）；兰州市科学技术局兰州市科技计划项目（No. 2022-2-45）。

作者简介：王月玲，女，副主任药师，主要从事中药质量评价及安全性方面的研究，email：1357079157@qq.com　*通信作者：徐雪梅，女，主任药师，主要从事化学药品检验和实验室质量控制方面的研究，email：51624889@qq.com

Determination of aluminum phosphide residues in 20 Chinese medicinal materials by headspace gas chromatography and headspace gas chromatography-mass spectrometry

WANG Yue-ling[1, 2], QI Peng-fei[1, 2], WU Fu-xiang[1, 2], SHAO Chang-chun[1, 2], XU Xue-mei[1, 2*], YANG Jin-cao[3] (1. *Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou* 730050; 2. *Key Laboratory of Pesticide and Veterinary Drug Monitoring for State Market Regulation, Lanzhou* 730050; 3. *Gannan Tibetan Autonomous Prefecture Drug Testing Center*, *Hezuo Gansu* 747000)

Abstract: Objective To establish a method to quantitatively and qualitatively determinate aluminum phosphide residues in 20 Chinese medicinal materials and Chinese herbal slices by headspace gas chromatography (HSGC) and headspace gas chromatography-mass spectrometry (HSGCMS). **Methods** Quantitative analysis was performed with an Agilent HP-PLOT/Q-PT capillary column, a flame photometric detector (FPD), and the external standard method based on the peak area. Agilent HP-PLOT/Q-PT capillary column and mass spectrum detector were used for the qualitative analysis. The retention time, mass spectrum characteristic ion fragment peak and relative abundance ratio were used as qualitative evaluation basis. **Results** The linearity was at 1 ～ 50 ng (r = 0.9966), and the recoveries were 82.3% ～ 88.9%. Phosphine was detected in some batches of the 20 Chinese medicinal materials. **Conclusion** This method is specific and sensitive, and can be used for the determination of aluminum phosphide residues in Chinese medicinal materials and Chinese herbal slices.

Key words: headspace gas chromatography; headspace gas chromatography-mass spectrometry; Chinese medicinal material; Chinese herbal slices; residual aluminum phosphide

磷化铝是国内外粮食贮藏中普遍使用的高效杀虫剂，遇水或酸可产生磷化氢气体，该气体是杀虫的有效成分，其穿透性强，易挥散，且对霉菌也有抑制作用[1]。近年来，药材市场上广泛采用磷化铝熏蒸来代替硫磺熏蒸药材应用于中药材贮存[2-4]，经过磷化铝熏蒸处理的中药材可防虫 5 ～ 6 个月[5]。本课题组前期市场调研发现，市场上普遍存在磷化铝熏蒸中药材的情况，尤其是从每年的春季惊蛰至秋季寒露期间，熏蒸尤为普遍，在甘肃省地产大宗中药材中，以党参熏蒸最甚，黄芪、当归次之。

然而熏蒸产生的磷化氢属于剧毒易燃气体，在熏蒸过程中如处理不当会造成较为严重的后果，一般会引起以神经系统、呼吸系统损害为主的全身性疾病[6]，严重的会导致心、肝、肾等重要器官衰竭等[7-8]。熏蒸后磷化氢气体还容易残留在药材中，其安全性尚缺乏系统的研究。目前，中药材中尚无直接检测磷化铝的方法，磷化氢的检测方法也较匮乏和落后，主要有钼蓝比色法、滴定法、离子色谱法等[9-11]，这些方法的前处理操作均较复杂，方法稳定性差，灵敏度较低，专属性不强，易造成假阳性结果[12]，并且需要较大的取样量。近年来，顶空气相色谱法广泛应用于食品[13-14]、药品[15-17]、化妆品[18]等样品中挥发性和半挥发性有机物的分析，也应用于烟草、水果等基质中磷化氢的检测[19-22]，相比传统磷化氢检测方法，该法具有前处理简单、灵敏度高的优势，但目前该方法对中药材中磷化铝残留方面的研究十分有限[23-24]。因此，本试验选择甘肃省市售中药材、中药饮片中易生虫的品种（其中包括部分甘肃省地产中药材品种）党参、大黄、黄芪、桔梗、枸杞子、款冬花、当归、杏仁、泽泻、白芷、土鳖虫、柏子仁、皂角、肉苁蓉、桑白皮、天花粉、防己、瓜蒌、酸枣仁、板蓝根作为研究对象，采用顶空气相色谱（HSGC）和顶空气相色谱 - 质谱（HSGCMS）法建立此 20 种中药材、中药饮片中磷化铝残留量的检测方法，并通过对样品中磷化铝的残留量进行风险评估，为科学评价中药材的安全性提供数据参考，为中药材市场监管提供技术支撑。

1　材料

1.1　仪器

岛津 GC-2010 Plus 气相色谱仪（日本岛津），配置火焰光度检测器（FPD）和顶空进样系统（DANI HSS 86.50 Plus）；安捷伦 7890B-7000D（GS-MS）气相色谱 - 质谱联用仪，配置安捷伦

7697A 顶空进样器，Agilent HP-PLOT/Q-PT 毛细管柱（30 m×0.53 mm，40 μm）（美国安捷伦）；MettlerToledo ME403 型电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；Milli-Q 超纯水仪（美国 Millipore 公司）；Vortexer 涡旋混匀仪（上海嘉鹏科技有限公司）；10、1000、5000 μL 鲁尔头阀门型气体密封针（上海玻利鸽有限公司）；带密封翻盖橡胶塞的 600 mL 玻璃瓶（徐州荣昌玻璃制品有限公司）；20 mL 顶空钳口样品瓶及其 PTFE 硅胶垫瓶盖（安捷伦）；封口均质袋（比克曼生物科技有限公司）。

1.2　试药

56% 磷化铝（济南天邦化工有限公司）；硫酸（纯度：98%，分析纯，重庆川东化工有限公司）；纯化水（Milli-Q 超纯水仪自制）；其余试剂均为分析纯。

中药材、中药饮片在甘肃兰州、定西及安徽亳州药材市场购买，共 20 个品种 252 批次，具体信息见表 1，样品均经兰州市食品药品检验检测研究院戚鹏飞主管药师鉴定为正品。

表 1　样品收集信息表

Tab 1　Sample collection information table

序号	样品	不同采购地点批数				总批次
		兰州市场流通	陇西饮片生产企业	陇西产地加工	陇西中药材农贸市场	
1	党参	22	1	17	0	40
2	黄芪	19	1	1	0	21
3	当归	12	1	7	0	20
4	肉苁蓉	9	1	1	0	11
5	酸枣仁	9	1	0	0	10
6	大黄	5	1	5	0	11
7	枸杞子	6	1	3	0	10
8	款冬花	4	1	5	0	10
9	柏子仁	4	0	0	6	10
10	桔梗	7	1	2	0	10
11	杏仁	5	1	3	0	9
12	泽泻	4	1	0	5	10
13	白芷	6	1	0	3	10
14	土鳖虫	4	1	0	5	10
15	皂角	4	1	0	5	10
16	桑白皮	4	0	0	6	10
17	天花粉	4	1	0	5	10
18	防己	5	1	0	4	10
19	瓜蒌	6	1	0	3	10
20	板蓝根	4	1	4	1	10

2　方法与结果

2.1　定量分析

2.1.1　气相色谱法分离条件　岛津 GC-2010 Plus 气相色谱仪配置火焰光度检测器、磷滤光片、Agilent HP-PLOT/Q-PT 毛细管柱（30 m×0.53 mm，40 μm）；检测器温度 250 ℃；升温程序为初始 50 ℃保持 10 min，升至 200 ℃保持 2 min；进样口温度 220 ℃，分流进样，分流比 10∶1；载气：高纯氮 30 mL·min^{-1}，氢气 62.5 mL·min^{-1}，空气 90 mL·min^{-1}，柱流量 2 mL·min^{-1}。顶空进样器条件：气相循环时间 20 min，顶空瓶平衡温度 50 ℃，平衡时间 10 min，采用振荡模式。

2.1.2　标准曲线　磷化氢标准贮备气体的制备：取磷化铝片 1 片，称重为 3.232 g，置于 600 mL 玻璃瓶中，加水 10 mL，迅速盖紧翻盖橡胶塞密封，室温下静置 2 d[25]，作为磷化氢标准贮备气体。用气体密封针吸取标准贮备气 5.0 mL，注入另一 600 mL 密封玻璃瓶中，轻轻晃动使混合均匀，作为磷化氢标准原气。用气体密封针吸取标准原气 1.0 mL，注入另一 600 mL 密封玻璃瓶中，轻轻晃动使混合均匀，作为磷化氢标准气体。

磷化氢标准贮备气的含量标定：参照 SN/T4395—2015 中的标定方法 [26]，在一个可密封的 50 mL 试剂瓶中，预先加入 10 mL95% 的乙醇和 20 mL1.5% 的氯化汞溶液，吸取 5.0 mL 磷化氢标准贮备气注射到此瓶中，充分振摇后，把瓶口倒置约 30 s 使其反应完全，用甲基红作指示剂，用氢氧化钠滴定液（0.05 mol·L^{-1}）滴定至黄色终点（或电位滴定仪滴定），根据消耗的氢氧化钠滴定液的体积计算出磷化氢标准贮备气体的含量。标定数据见表 2。

标准溶液的制备：分别吸取标准气体 0、100、200、500、1000、2000、3000 和 5000 μL（分别约相当于磷化氢 0、0.9976、1.9952、4.9880、9.9760、19.9520、29.9280 和 49.8800 ng）注入预先加有 5.0 mL5% 硫酸的 20 mL 顶空瓶中，涡旋 10 s，即得系列对照品溶液。

2.1.3　供试品溶液的制备　取供试品粉碎，混匀，精密称取 1 g，置 20 mL 顶空瓶中，加入 5.0 mL 5% 硫酸溶液，迅速压盖封口，涡旋 10 s，即得。

2.1.4　精密度试验　用气密针吸取标准磷化氢气体 3000 μL（约相当于磷化氢 30 ng），注入预先加有 5.0 mL 5% 硫酸的 20 mL 顶空进样瓶中，平行 6 份，涡旋 10 s，进样测定，测得磷化氢峰面积 *RSD* 为 1.3%，表明仪器精密度良好。

2.1.5　线性关系考察　精密吸取“2.1.2”项下系列对照品溶液，注入气相色谱仪测定。以磷化氢质量（ng）为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得方程为 $Y = 2.496\times10^5X - 2.540\times10^5$

表 2　磷化氢标准贮备气及标准气体含量

Tab 2　Content of standard reserve gas and standard gas of phosphine

标准贮备气体积 /mL	消耗滴定液体积 /mL	标准贮备气质量浓度 /（mg • mL^{-1}）	标准气体质量浓度 /（ng • mL^{-1}）	平均质量浓度 /（ng • mL^{-1}）	*RSD*/%
5.00	6.30	0.7183	9.9762	9.976	0.41
5.00	6.33	0.7217	10.0237		
5.00	6.26	0.7137	9.9128		
5.00	6.32	0.7206	10.0078		
5.00	6.31	0.7194	9.9920		
5.00	6.28	0.7160	9.9445		

（r = 0.9966），结果表明磷化氢在 1 ～ 50 ng 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.6　专属性　将未经磷化铝熏制的白芷样品作为阴性样品，经过熏制的白芷样品作为阳性样品，分别取磷化氢标准气体、阴性样品、阳性样品各适量，按“2.1.3”项下方法制备成溶液，注入气相色谱仪，记录色谱图。结果表明：阴性样品溶液色谱图中未出现与对照品保留时间一致的色谱峰，阳性样品溶液色谱图中色谱峰保留时间与对照品一致，且无杂质峰干扰。色谱图见图 1。

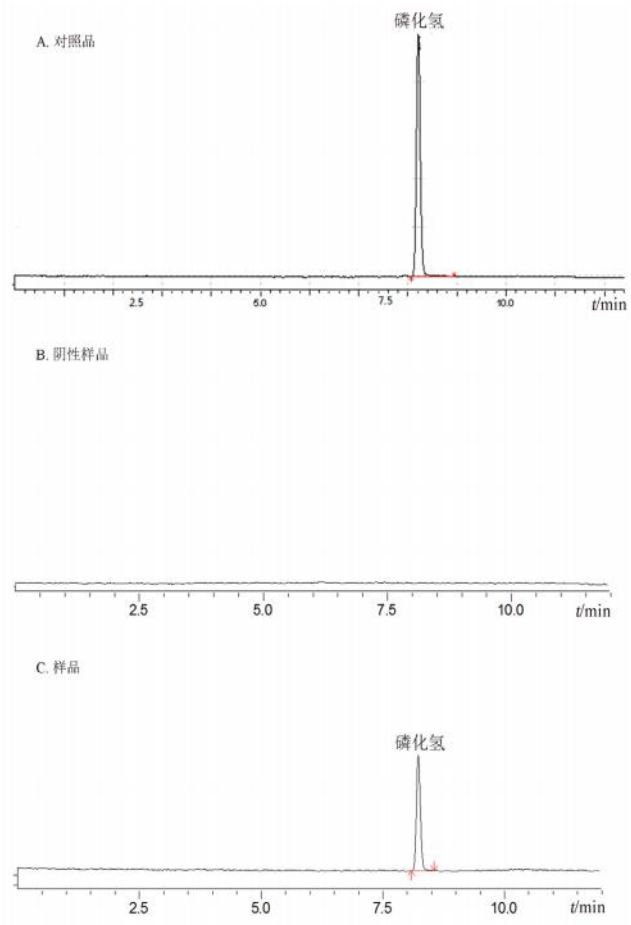


图 1　不同溶液的气相色谱图

Fig 1　Gas chromatograms of different solutions

A. 对照品（reference）；B. 阴性样品（negative sample）；C. 熏蒸白芷样品（fumigated angelica dahurica sample）

2.1.7　检测限与定量限测定　将标准气体逐步稀释，根据磷化氢色谱峰信噪比为 *S/N* ≈ 10，计算该方法的定量限为 0.9976 μg • kg^{-1}；*S/N* ≈ 3 时计算该方法检测限为 0.0665 μg • kg^{-1}。

2.1.8　加样回收试验　取白芷样品粉末，称取约 0.5 g，置 20 mL 顶空瓶中，加入 5.0 mL5% 硫酸溶液，迅速压盖封口，分别加入 200、300、500 μL 的磷化氢标准气体，每个质量浓度平行 3 份，涡旋 10 s，进样测定，计算加样回收率。结果显示，低、中、高浓度平均加样回收率分别为 88.9%（*RSD* = 6.2%）、84.8%（*RSD* = 1.5%）、82.3%（*RSD* = 2.1%）。

2.1.9　稳定性试验　取经磷化铝熏制的白芷样品，按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12、18、24 h 进样测定，测得磷化氢峰面积 *RSD* 为 1.3%，表明溶液在 10 h 内基本稳定。

2.1.10　重复性试验　取经磷化铝熏制的白芷样品，按“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样测定，结果磷化氢平均含量为 0.056 mg • kg^{-1}，*RSD* 为 3.8%。

2.2　定性分析

2.2.1　气相色谱-质谱条件　安捷伦 7890B-7000D（GS-MS）气相色谱-质谱联用仪，配置安捷伦 7697A 顶空进样器、Agilent HP-PLOT/Q-PT 毛细管柱（30 m×0.53 mm，40 μm）；色谱柱升温程序：50 ℃保持 5 min，以 50 ℃ • min^{-1} 速率升温至 200 ℃，保持 2 min；进样口温度：200 ℃；传输线温度：200 ℃；载气：氦气；进样方式：分流进样，分流比：10∶1；电子轰击能量：70 eV；离子源温度：200 ℃；倍增器电压：自动调谐值；柱流量：1.0 mL • min^{-1}；质量扫描范围：19 ～ 80 amu；扫描方式：离子监测扫描 SIM，检测离子：*m/z* 31、33、34。

顶空进样器条件：加热箱温度 50 ℃，定量环温度 95 ℃，传输线温度 105 ℃，气相循环时间

20 min，进样瓶加热平衡时间 10 min，加压时间 0.2 min，定量环充满时间 0.2 min，定量环平衡时间 0.2 min，进样时间 1.0 min。

2.2.2　对照品溶液的制备　用气体密封针吸取标准贮备气 0.2 mL，注入预先加有 5.0 mL5% 硫酸的 20 mL 顶空瓶中，涡旋 10 s，即得系列对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液的制备　同“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法。

2.2.4　检测限的测定　将标准气体逐步稀释，直到磷化氢色谱峰信噪比为 $S/N \approx 3$ 时，计算出该方法的检测限为 0.0023 μg • g^{-1}。

2.3　样品的测定和检测结果判定

将检出磷化铝的阳性样品按“2.2.1”项下方法进样测定。

定量分析采用外标法计算磷化氢含量，为保证检测结果的可靠性，平行测定 2 份，并计算相对偏差。如果平行样相对偏差≤ 20%，则认为定量数据可靠，其含量按 2 份检材的平均值计算。如果平行样相对偏差＞ 20%，则认为定量数据不可靠，应重新检验。样品中磷化铝残留量检测数据见表 3。

表 3　中药材、中药饮片样品中磷化铝残留量检测数据

Tab 3　Aluminum phosphide residues in samples of Chinese medicinal materials and Chinese herbal slices

序号	样品	样品批数	检出批数	检出率/%	质量浓度 /（mg • kg^{-1}）	
					最小值	最大值
1	党参	40	30	75	0.0000	0.0192
2	黄芪	21	17	90.95	0.0000	0.0774
3	当归	20	11	55	0.0000	0.4623
4	肉苁蓉	11	7	63.6	0.0000	0.0043
5	酸枣仁	10	2	20	0.0000	0.0014
6	大黄	11	3	30	0.0000	0.0016
7	枸杞子	10	2	20	0.0000	0.0012
8	款冬花	10	9	90	0.0000	0.0088
9	柏子仁	10	4	40	0.0000	0.0018
10	桔梗	10	5	50	0.0000	0.0291
11	杏仁	9	5	55.6	0.0000	0.0165
12	泽泻	10	5	50	0.0000	0.0014
13	白芷	10	2	20	0.0000	0.0014
14	土鳖虫	10	10	100	0.0014	0.0420
15	皂角	10	2	20	0.0000	0.0012
16	桑白皮	10	6	60	0.0000	0.0021
17	天花粉	10	1	10	0.0000	0.0011
18	防己	10	7	70	0.0000	0.0018
19	瓜蒌	10	7	70	0.0000	0.0056
20	板蓝根	10	1	10	0.0000	0.0011

定性分析中，*m/z* 选择 31、33、34 作为监测离子，34 的响应值相对比较高，因此选择 34 作为特征离子丰度比参考离子。在相同条件下进行样品测定时，样品中磷化氢的色谱峰保留时间与标准溶液一致，且在扣除背景后的样品质谱图中，磷化氢的质谱特征离子与标准溶液一致，特征离子丰度比与浓度接近的标准溶液相比，相对偏差不超过表 4 规定的范围，空白样品无干扰，则可判断检材样品中检出磷化氢。

表 4　特征离子丰度比的最大允许相对偏差范围

Tab 4　Maximum allowable relative deviation of characteristic ion abundance ratio

特征离子丰度比	＞ 50%	＞ 20% ～ 50%	＞ 10% ～ 20%	≤ 10%
最大允许相对偏差	±10%	±15%	±20%	±50%

检测数据显示，20 种中药材、中药饮片均有不同程度的磷化铝残留检出。其中，土鳖虫中的检出率最高，达到 100%；黄芪、款冬花、党参、瓜蒌、防己、肉苁蓉、当归、桑白皮、杏仁次之，检出率达 50% 以上，天花粉、白芷等淀粉含量高的样品检出率较低。

基于残留量数据分析可见，残留量最高的是当归，最大达到 0.4623 mg • kg^{-1}；黄芪次之，最大残留量为 0.0774 mg • kg^{-1}；土鳖虫、桔梗、杏仁较低。由此可见，中药材部分品种中磷化铝残留量高于中国食品安全国家标准 GB 2763—2021 食品中农药最大残留量国家限量标准中规定中谷物、油料和油脂、蔬菜中磷化铝残留量限度 0.05 mg • kg^{-1}，也高于欧洲议会和理事会规定的国际粮食限量标准（0.01 mg • kg^{-1}）及国际食品法典委员会针对干制蔬菜、干制水果、香料等中磷化氢残留量的限量标准（0.01 mg • kg^{-1}）。

3　讨论

3.1　试验方法设计

试验采用气相色谱法 - 火焰光度检测器（GS-FPD-P）定量、气相色谱 - 质谱法（GS-MS）定性的设计，主要是由于 GS-FPD-P 对含磷化合物有高选择性、高灵敏度，而磷化铝残留量是一个痕量检测，因此选择 GS-FPD-P 定量更为适宜。然而中药材种类繁多，成分复杂，GS-FPD-P 在定性方面会受其他一些含磷挥发性成分的干扰，因此，选择 GS-MS 对阳性样品进一步确认。

3.2　磷化铝标准气体的含量标定

参照 SN/T 4395—2015 对磷化铝标准气体含量进行标定，用甲基红作指示剂，溶液颜色由橙色变为黄色。在实际操作中，由于橙色与黄色颜

色比较接近，目测观察颜色突跃有一定困难，影响终点判定，因此建议采用电位滴定法。

3.3　色谱柱的考察

在气相色谱分析中，为达到理想的分离效果，考察了 4 种色谱柱，分别是安捷伦 HP-5 气相色谱柱（30 m×0.32 mm，0.25 μm）、HP-PLOT/Q-PT 色谱柱（30 m×0.53 mm，40 μm）、DB-1701 色谱柱（30 m×030 m×0.32 mm，0.25 μm）和岛津 Rtx-624 色谱柱（30 m×0.25 mm，1.40 μm）。结果发现，除 HP-PLOT/Q-PT 柱外，其他 3 种色谱柱对磷化氢均无保留，出峰时间均在 3 min 以内，且峰形存在不同程度的分叉；HP-PLOT/Q-PT 柱出峰时间约在 8 min 左右，峰形光滑对称，理论板数高，满足分析方法需求。

3.4　影响稳定性因素

在稳定性试验中，溶液在 10 h 内浓度基本稳定，10 h 后逐渐减小，分析原因可能是由于磷化氢化学性质活泼，能与氧气发生反应所致。在检测中建议供试品溶液在 10 h 内进样。

4　结论

本试验建立了 HSGC 和 HSGCMS 法测定 20 种中药材中磷化铝残留量的方法，该方法操作简便，灵敏度高，专属性好，适用于中药材、中药饮片中残留的磷化铝的检测。

参考文献

[1] 周伯军，丁运昭，沈培垠 . 磷化铝正效熏蒸技术的研究 [J]. 口岸卫生控制，2016，21（3）：22-25.

[2] 徐博，吴翠，李卓俊，等 . 茯苓采后的加工生产现状调研和优化建议 [J]. 中南药学，2021，19（9）：1877-1882.

[3] 李调珍 . 磷化铝在中药材养护中作为速效的杀虫剂应用 [J]. 现代应用药学，1989，6（3）：14-15.

[4] 刘建，李春淑 . 防虫剂对中药饮片的防虫效果 [J]. 基层中药杂志，1996，10（2）：52-53.

[5] 陈杰林，刘任，韩群鑫，等 . 中药材养护片剂防虫防霉试验初报 [J]. 中药材，1999，22（11）：566-569.

[6] GBZ11—2002 . 职业急性磷化氢中毒诊断标准 [S]. 2002.

[7] 林朝亮，成向进，李长青，等 . 重度磷化铝中毒死亡 2 例报道并文献复习 [J]. 临床急诊杂志，2017，18（7）：47-549.

[8] 孟军，张永兰 . 急性磷化铝中毒 1 例报告 [J]. 职业与健康，1999，15（9）：21.

[9] GB/T 25222—2010. 粮油检验粮食中磷化物残留量的测定分光光度法 [S]. 2010.

[10] 张蕤，耿金菊，钱卉，等 . 痕量磷化氢检测方法进展 [J]. 化工时刊，2008，22（6）：58-61.

[11] 徐明雅，潘丹杰 . 离子色谱法测定谷物中磷化物残留量 [J]. 粮食与油脂，2016，29（10）：64-66.

[12] 董晓平，尚瑛达 . 钼兰比色法测定粮食中磷化物残留量的几个问题 [J]. 吉林粮食高等专科学校学报，1995，10（1）：32-35.

[13] 曹意晨，黄朝辉，郑瑛倩，等 . 顶空气相色谱法测定常用饮用水中环氧乙烷的残留量 [J]. 中南药学，2018，16（7）：1000-1002.

[14] 张青龄，陈宜，黄建立 . 顶空气相色谱 / 质谱法分析大豆油中正己醛含量 [J]. 福建分析测试，2013，22（6）：14-16.

[15] 石蓉，龙海燕，赵勇，等 . 顶空气相色谱法测定羟苯乙酯中甲醇、乙醇残留量 [J]. 中南药学，2017，15（7）：960-963.

[16] 朱克旭，张海波 . 顶空毛细管气相色谱法测定索非布韦原料药中有机溶剂残留量 [J]. 中南药学，2019，17（7）：1108-1110.

[17] 赵越，董志雨，李梦洁，等 . 顶空气相色谱法同时测定盐酸左西替利嗪原料药中的 3 种残留溶剂 [J]. 中南药学，2018，16（12）：1763-1767.

[18] 周相娟，聂鲲，钟丽君，等 . 顶空 - 气相色谱 - 质谱法测定化妆品中 14 种有机溶剂残留 [J]. 中国卫生检验杂志，2014，24（6）：773-775.

[19] 卢昕博，边腾飞，肖卫强，等 . 顶空气相色谱法测定烟草熏蒸后的磷化氢残留量 [J]. 中国烟草学报，2014，20（4）：7-10.

[20] 张建平，黄惠贞，黄朝章，等 . 顶空气相色谱 - 质谱联用法测定烟草中的磷化氢 [J]. 烟草科技，2013（8）：58-61.

[21] 陈晨 . 论顶空气相色谱法测定烟草熏蒸的磷化氢残留量 [J]. 科技创新与应用，2016（22）：83.

[22] 李丽，王跃进，张凡华，等 . 固态顶空法测定苹果中的磷化氢残留 [J]. 植物检疫，2014，28（6）：50-53.

[23] 张彬，李倩，田晨 . 六种中药材中杀虫剂磷化铝残留量的顶空气相色谱法测定 [J]. 中国药事，2015，29（5）：528-532.

[24] 周恒，苗水，陈明，等 . 顶空气相色谱法测定 15 种中药材、中药饮片中磷化铝残留量 [J]. 中成药，2019，41（4）：943-946.

[25] 林晨，刘利，王玉芹，等 . 气相色谱法检测面粉中磷化氢残留量 [J]. 分析测试技术与仪器，2008，14（2）：92-95.

[26] SN/T 4395—2015. 出入境检验检疫行业标准 [S]. 出口食品中磷化氢残留量的检测方法气相色谱法 .

（收稿日期：2023-02-05；修回日期：2023-05-02）

医院药学

基于数据挖掘痰瘀互结型冠心病组方用药规律的研究

郑敏[1]，朱茜茜[2]，胡蓉[3]，杨熠文[1]，王兆骞[1]，赵青[4]，王又闻[1*]（1. 上海中医药大学中药学院，上海 201203；2. 上海贝达医院，上海　201815；3. 上海中医药大学科技人文研究院，上海　201203；4. 上海市静安区闸北中心医院，上海　200070）

摘要：目的　基于数据挖掘探究中医药治疗痰瘀互结型冠心病的用药规律。**方法**　检索中国知网、万方、维普数据库中关于中医药治疗痰瘀互结型冠心病的临床文献，录入处方的药味组成、性味归经、功效分类、使用剂量等信息并进行频次统计。采用关联规则分析和系统聚类分析法研究用药配伍规律。**结果**　共纳入处方 188 条，涉及中药 176 味，药性以寒、温、平为主，药味以甘、苦、辛为主，主归心、肝、脾、肺、胃、肾经，药物功效以活血化瘀、止咳化痰平喘、补虚、理气、清热为主。高频次使用中药共 37 味，关联规则分析共获得 26 条核心药材组合规则。聚类分析将 11 味核心药材分为三组，第一组为瓜蒌、薤白、丹参、黄芪；第二组为川芎、赤芍、当归、红花；第三组为陈皮、茯苓、半夏。**结论**　本研究通过对中医临床处方的分析，发现中医药治疗痰瘀互结型冠心病符合“痰瘀同治”的治疗法则，活血化瘀与化痰药并用，辅以补虚、理气，起到标本兼治的效果。

关键词：痰瘀互结证；冠心病；用药规律；数据挖掘
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2749-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.032

Prescription and medication rules of phlegm and blood stasis intermingled coronary heart disease based on data mining

ZHENG Min[1], ZHU Qian-qian[2], HU Rong[3], YANG Yi-wen[1], WANG Zhao-qian[1], ZHAO Qing[4], WANG You-wen[1*] (1. *School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai* 201203; 2. *Shanghai Beda Hospital, Shanghai* 201815; 3. *Institute of Science, Technology and Humanities, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai* 201203; 4. *Zhabei Central Hospital of Jing'an District, Shanghai* 200070)

Abstract: Objective To determine the medication rules of traditional Chinese medicine for phlegm and blood stasis intermingled coronary heart disease based on data mining. **Methods** Clinical literatures on phlegm and blood stasis intermingled coronary heart disease with traditional Chinese medicine were collected from China National Knowledge Internet, Wanfang and VIP databases. Information of prescriptions including drug compositions, nature and flavours, channel tropism, efficacy classification, dosage and related frequency were statistically analyzed. Association rule analysis and systematic cluster analysis were conducted to determine the compatibility rule of drugs. **Results** Totally 188 prescriptions were included involving 176 drugs. The nature of the drugs was mainly cold, warm and peaceful, the flavours were mainly sweet, bitter and pungent, and the main channel tropism covered the heart, liver, spleen, lung, stomach and kidney channels. The drug effects mainly included promoting the blood circulation, removing the blood stasis, arresting cough, removing phlegm, relieving asthma, tonifying deficiency, regulating qi-flowing and clearing heat.

作者简介：郑敏，女，硕士，主要从事中药药理学研究，email：zhengminpkyaodong@163.com　*通信作者：王又闻，女，讲师，主要从事中医诊断学研究与中药学教学工作，email：wyw9326@163.com

Totally 37 herbs were used frequently, and 26 core drug combination rules were obtained. Cluster analysis divided 11 core drugs into three groups. Group 1: *Fructus Trichosanthis, Bulbus Allii Macrostemonis, Radix Salviae Miltiorrhizae* and *Radix Astragali seu Hedysari.* Group 2: *Rhizoma Ligustici Chuanxiong, Radix Paeoniae Rubra, Radix Angelicae Sinensis,* and *Flos Carthami*. Group 3: *Pericarpium Citri Reticulatae, Poria,* and *Rhizoma Pinelliae*. **Conclusion** The treatment of phlegm and blood stasis intermingled coronary heart disease with traditional Chinese medicine conforms to the rule of "phlegm-stasis co-treatment". Combination of promoting blood circulation and removing blood stasis and phlegm-expelling drugs, supplemented by tonifying deficiency and regulating qi, helps treat both symptoms and root causes of diseases.

Key words: syndrome of intermingled phlegm and blood stasis; coronary heart disease; medication rule; data mining

冠状动脉粥样硬化性心脏病（coronary heart disease，CHD）简称冠心病，是由于冠状动脉病变引起的血管狭窄或阻塞，导致心肌缺血、缺氧或坏死的一类心血管疾病，临床常并发心绞痛，严重者可致心肌梗死以及心力衰竭[1]。据国家心血管病中心推算，我国冠心病的患病人数达 1100 万，且患病率及死亡率均处于持续上升阶段[2]。目前的药物治疗以及介入治疗只能针对局部病变，缓解症状，无法根治且不良反应多[3]，因此，寻找更安全有效的治疗方法是冠心病临床治疗的迫切需求。

冠心病在中医学中属于"胸痹"的范畴，以胸部闷痛，甚至胸痛彻背，喘息不得卧为主症，伴有心悸汗出、水肿、肢冷、面色苍白等症状[4]，其病机为本虚标实，本虚以气虚、阴虚为主，标实多为瘀血、痰浊、气滞[5]。气虚日久则津血推行无力，血液留滞而为瘀，水液停聚则成痰，痰进一步化浊而成瘀；阴虚者五脏失于濡养，心肾不交，耗伤阴液，使瘀、痰盘踞，心脉痹阻，发为胸痹。由此可见，痰和瘀是冠心病的主要证候要素，且痰可致瘀，痰常夹瘀[6]，一项横断面研究发现痰瘀互结型的冠心病是临床最常见的证型之一[7]。

针对痰瘀互结型冠心病，早在东汉末年，张仲景便提出了"痰瘀同治"的治疗法则，痰浊与瘀血并见，故通阳化痰与活血化瘀应并用，同时辅以对兼症的治疗，实现标本兼治的良好疗效[8]。本研究拟采用数据挖掘技术探究中医临床治疗痰瘀互结型冠心病的用药规律，阐释理法方药一致性的科学内涵，以期为冠心病的临床治疗与基础研究提供理论依据。

1　资料与方法

1.1　处方来源

以"痰瘀互结"和"冠心病"为检索词，在中国知网、万方、维普数据库中检索自收录起始年至 2022 年 12 月 31 日期间的文献。

1.2　筛选标准

1.2.1　纳入标准　① 文献为痰瘀互结型冠心病的临床研究；② 治疗策略以中药复方为主；③ 给药方式为口服；④ 组方完整，标明药味的剂量、使用方法，并且计量单位统一。

1.2.2　排除标准　① 研究对象非痰瘀互结型的冠心病；② 动物实验、细胞实验、Meta 分析等非临床研究或综述；③ 处方不完整、用药剂量未标注；④ 同一作者的期刊论文、会议论文与学位论文中出现的同一组方，保留记录更为完整的学位论文，排除其他；⑤ 组方的计量单位不统一，组方中主要成分为特殊药材，不便于统计药物性味归经、功效主治的。

1.3　数据录入与处理

采用 Excel 2019 软件录入文献题名、方剂组成、药味剂量等相关信息。依据 2020 年版《中国药典》[9] 对药名进行标准化。如仙灵脾、淫羊藿统一作淫羊藿，生山楂、焦山楂统一作山楂，白参、生晒参统一作人参，生黄芪、炙黄芪、黄芪统一作黄芪，熟附子、制附子、炮附片、附片统一作附子，清半夏、法半夏统一作半夏，全瓜蒌、瓜蒌皮、瓜蒌实、瓜蒌仁皮统一作瓜蒌。根据"十四五"规划《中药学》教材[10] 录入药物的性味归经及功效分类；统计各药物的使用频次、四气、五味、归经和功效类别频数以及使用频次排名前五的药物使用剂量。

1.4　数据分析

选取高频次中药，即使用频次大于平均频次的中药，运用 IBM SPSS Modeler 18.0 软件进行关联规则分析，设置最低条件支持度为 20，最小

规则置信度为 90%，最大前项数为 5，运行后获得若干条核心药材组合。构建核心药材组合所涉及中药的网络关系图，并采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行系统聚类分析。

2　结果

2.1　处方及药物纳入情况

以“痰瘀互结”和“冠心病”为检索词，经筛选去重，在中国知网、万方、维普等数据库共得到文献 1453 篇，根据纳入和排除标准，共纳入 188 篇文献，包含 188 个处方和 176 味中药。

2.2　纳入药物性味归经及功效分类分析

根据 2020 年版《中国药典》及《中药学》教材对纳入药物进行性味归经的统计分析，结果显示：药性以温（37%）、寒（31%）、平（24%）为主；药味以甘（50%）、苦（47%）、辛（43%）为主；归经以肝（52%）、脾（41%）、肺（43%）、胃（35%）、心（31%）、肾（31%）为主；见图 1。功效分类以活血化瘀药（24%）、补虚药（17%）、化痰止咳平喘药（15%）、理气药（13%）、清热药（8%）为主，见表 1。进一步对活血化瘀药进行分类统计，结果显示以活血调经药和活血止痛药为主，详见表 2。

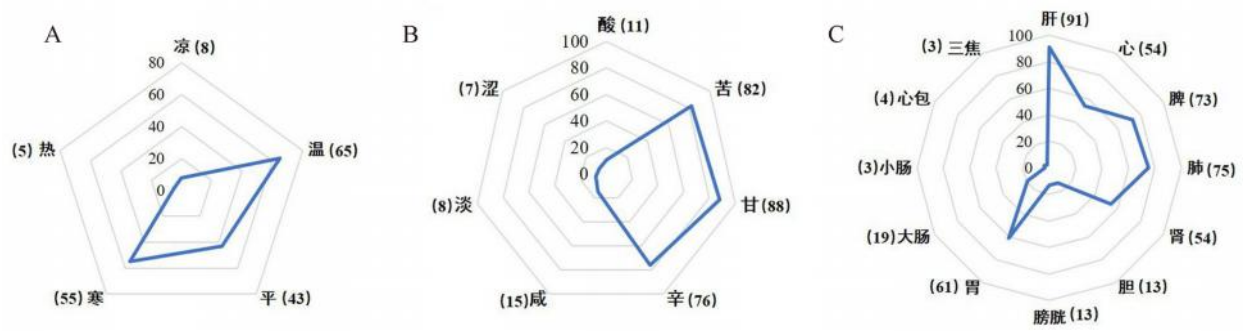


图 1　治疗痰瘀互结型冠心病处方中的中药四气（A）、五味（B）、归经（C）雷达图

Fig 1　Radar map of four natures（A），five flavors（B），and channel tropism（C）of traditional Chinese medicine prescriptions for phlegm and blood stasis intermingled CHD

表 1　治疗痰瘀互结型冠心病处方中的中药功效类别分布

Tab 1　Efficacy of traditional Chinese medicine prescriptions for phlegm and blood stasis intermingled CHD

序号	类别	频次	占比 /%	序号	类别	频次	占比 /%
1	活血化瘀药	606	24.16	10	安神药	60	2.39
2	补虚药	431	17.19	11	化湿药	29	1.16
3	化痰止咳平喘药	378	15.07	12	开窍药	24	0.96
4	理气药	314	12.52	13	温里药	23	0.92
5	清热药	192	7.66	14	消食药	19	0.76
6	解表药	130	5.18	15	祛风湿药	13	0.52
7	利水渗湿药	120	4.78	16	收涩药	11	0.44
8	平肝熄风药	83	3.31	17	泻下药	6	0.24
9	止血药	69	2.75				

表 2　治疗痰瘀互结型冠心病处方中活血化瘀类中药的分类

Tab 2　Classification of traditional Chinese medicine prescriptions in promoting blood circulation and removing blood stasis for phlegm and blood stasis intermingled CHD

药物分类	频次	味数	具体药味
活血调经药	325	7	丹参、红花、桃仁、牛膝、鸡血藤、川牛膝、泽兰
活血止痛药	232	8	川芎、郁金、延胡索、降香、姜黄、乳香、五灵脂、没药
破血消癥药	43	4	水蛭、莪术、三棱、穿山甲
活血疗伤药	6	3	土鳖虫、骨碎补、苏木

2.3　纳入药物使用频次分析

188 条治疗痰瘀互结型冠心病的处方中共涉及药物 176 味，使用总频次为 2508 次。使用频次大于 14 次的中药共计 37 味，被列为高频中药，纳入下一步关联规则分析研究，详见表 3。

2.4　使用频次排名前 5 的药物使用剂量分析

对使用频次排名前 5 的中药在各处方中的剂量进行统计，见图 2，结果显示：半夏的剂量以 10 g 居多，丹参的用量集中在 15 ～ 30 g，瓜蒌、川芎、薤白的用量以 15 g 为主。

2.5　关联规则分析

表 3　治疗痰瘀互结型冠心病处方中的高频次中药

Tab 3　Traditional Chinese medicine prescriptions with high frequency of use for phlegm and blood stasis intermingled CHD

序号	药物	频次	序号	药物	频次
1	半夏	156	20	水蛭	35
2	丹参	135	21	延胡索	35
3	瓜蒌	129	22	黄连	34
4	川芎	119	23	枳实	34
5	薤白	110	24	生地	28
6	甘草	100	25	桔梗	28
7	红花	82	26	牛膝	28
8	陈皮	78	27	白术	26
9	茯苓	76	28	地龙	26
10	黄芪	76	29	葛根	25
11	赤芍	75	30	降香	25
12	当归	75	31	石菖蒲	23
13	桃仁	66	32	麦冬	22
14	三七	60	33	远志	18
15	枳壳	48	34	竹茹	18
16	柴胡	47	35	瓜蒌皮	17
17	党参	42	36	山楂	17
18	桂枝	42	37	酸枣仁	15
19	郁金	42			

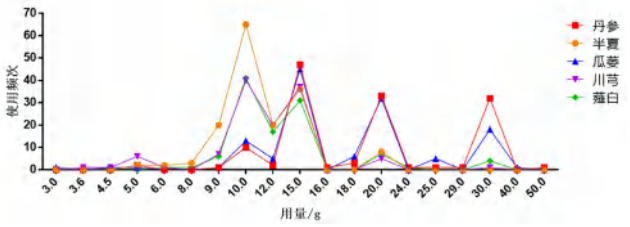


图 2　治疗痰瘀互结型冠心病处方中使用频次排名前 5 的药物剂量分布

Fig 2　Dose of top 5 frequently used traditional Chinese medicine prescriptions for phlegm and blood stasis intermingled CHD

对 37 个高频中药进行 Apriori 建模，共得到核心药材组合规则 26 条，其中包括二阶规则 2 条、三阶规则 14 条、四阶规则 9 条和五阶规则 1 条，详见表 4。核心药材组合共涉及 11 味中药，其关联规则网络如图 3 所示（每个圆圈代表一味中药；线条代表了两个中药间的联系，线条越粗，关联度越高）。

2.6　核心药材组合系统聚类分析

对核心药材组合中所涉及的 11 味中药进行系统聚类分析，绘制树状图，如图 4 所示。以 20 为距离进行分类切割，得到 3 组治疗痰瘀互结型

表 4　治疗痰瘀互结型冠心病处方中核心药材组合的关联规则

Tab 4　Association rules for the core combinations in the prescriptions for phlegm and blood stasis intermingled CHD

序号	后项	前项	支持度 /%	置信度 /%	规则支持度 /%	提升度	部署能力
1	半夏	赤芍＋红花	20.2	97.4	19.7	1.2	0.5
2	半夏	陈皮＋川芎	23.4	95.5	22.3	1.2	1.1
3	半夏	茯苓＋川芎	22.9	95.3	21.8	1.2	1.1
4	瓜蒌	当归＋薤白	22.9	95.3	21.8	1.6	1.1
5	半夏	茯苓＋薤白	21.3	95.0	20.2	1.2	1.1
6	半夏	黄芪＋薤白＋瓜蒌	20.7	94.9	19.7	1.2	1.1
7	瓜蒌	当归＋薤白＋半夏	20.2	94.7	19.1	1.6	1.1
8	半夏	当归＋瓜蒌＋川芎	20.2	94.7	19.1	1.2	1.1
9	半夏	陈皮＋茯苓	26.1	93.9	24.5	1.2	1.6
10	半夏	薤白＋瓜蒌＋川芎	26.1	93.9	24.5	1.2	1.6
11	半夏	薤白＋川芎	33.5	93.7	31.4	1.2	2.1
12	半夏	赤芍＋薤白	24.5	93.5	22.9	1.2	1.6
13	半夏	红花＋薤白	24.5	93.5	22.9	1.2	1.6
14	半夏	茯苓＋瓜蒌	23.4	93.2	21.8	1.2	1.6
15	半夏	陈皮＋茯苓＋丹参	21.3	92.5	19.7	1.2	1.6
16	半夏	陈皮＋瓜蒌	20.7	92.3	19.1	1.2	1.6
17	半夏	赤芍＋瓜蒌＋川芎	20.7	92.3	19.1	1.2	1.6
18	半夏	薤白＋瓜蒌＋川芎＋丹参	20.7	92.3	19.1	1.2	1.6
19	半夏	薤白＋川芎＋丹参	27.1	92.2	25.0	1.2	2.1
20	半夏	赤芍＋薤白＋川芎	20.2	92.1	18.6	1.2	1.6
21	半夏	红花＋薤白＋瓜蒌	20.2	92.1	18.6	1.2	1.6
22	半夏	陈皮	41.0	90.9	37.2	1.1	3.7
23	半夏	薤白＋瓜蒌	44.1	90.4	39.9	1.1	4.3
24	半夏	茯苓	38.3	90.3	34.6	1.1	3.7
25	半夏	黄芪＋瓜蒌	26.6	90.0	23.9	1.1	2.7
26	半夏	红花＋丹参	26.6	90.0	23.9	1.1	2.7

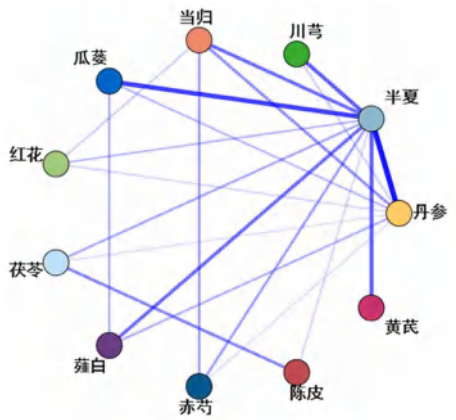


图 3　治疗痰瘀互结型冠心病处方中药关联规则网络图

Fig 3　Network diagram of association rules of traditional Chinese medicine for phlegm and blood stasis intermingled CHD

冠心病的核心基础方，详见表 5。

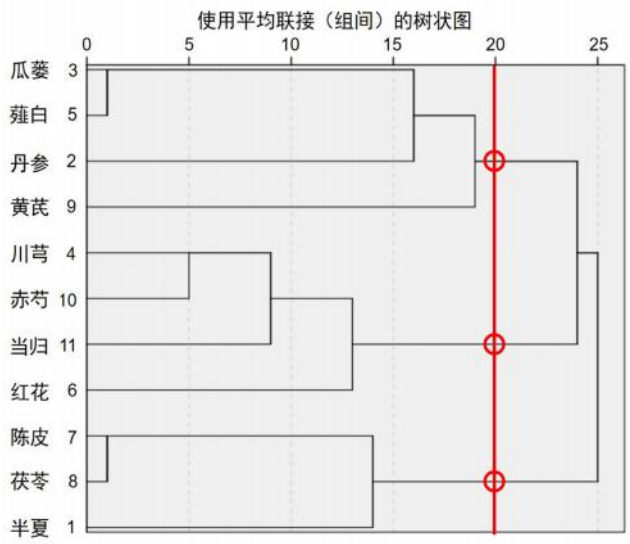


图 4　治疗痰瘀互结型冠心病的核心中药聚类分析树状图

Fig 4　Cluster analysis tree diagram of core traditional Chinese medicine for the treatment of phlegm and blood stasis intermingled CHD

表 5　治疗痰瘀互结型冠心病的中药核心基础方

Tab 5　Core basic prescriptions of traditional Chinese medicines for phlegm and blood stasis intermingled CHD

组别	中药组成
第一组	瓜蒌、薤白、丹参、黄芪
第二组	川芎、赤芍、当归、红花
第三组	陈皮、茯苓、半夏

3　讨论

痰瘀互结型冠心病病位在心，涉及肝、脾、肺、肾等多脏腑，以痰阻和瘀血为主要致病因素，为本虚标实之证，治疗策略应痰瘀同治，兼顾扶正。本研究对纳入的 188 个治疗痰瘀互结型冠心病的处方所涉及的 176 味中药进行了性味归经、功效分类的统计，结果显示药物四气以寒、温、平为主。性温，可温化寒痰，通畅血行，消散瘀滞；性寒，可清热化痰与血分郁热。药味以辛、苦、甘为主。辛味能散能行，可散滞宣通，行气行血；苦味能燥能泄，可燥湿化痰，泄利通降。甘味能补能和能缓，可调和药性，缓和拘急疼痛。联和药性以甘温可补气助阳，辛温可暖肝散结，苦温可养阴燥湿，苦寒可燥湿化痰，甘寒亦可养阴，共为通心养心之用。归经主归 6 经，表明其病位虽在心，但与五脏关联密切。此外，《症因脉治》云："胸痹之症，即胃痹也"。因此，治疗痰瘀互结型冠心病应兼顾多脏腑的偏衰。

功效分类的统计结果显示药物以活血化瘀药、补虚药、化痰止咳平喘药、理气药和清热药为主，其中活血化瘀药以具有活血调经和活血止痛功效的中药为主。由此可见，目前中医临床治疗痰瘀互结型冠心病的策略遵循了痰瘀同治的法则，同时辅以补虚药，通补兼施；与行气药同用，理气行血，增强活血化瘀功效；佐以清热药以清痰瘀所化之热。通过对使用频次排名前 5 的药物进行剂量分析，结果发现同为化痰药，半夏作为毒性中药，其剂量较为单一，常用剂量以 10 g 为主，而瓜蒌的使用剂量稍大于半夏，在 15 ～ 30 g。活血化瘀药中，川芎与丹参用量基本一致，但川芎性偏温燥，用量常较丹参偏少，也更单一。而行气药薤白与活血化瘀药基本保持一致，可见活血化瘀药需与行气药相使为用。

通过关联规则分析与系统聚类分析，将 11 个核心中药分为三组。第一组中，瓜蒌清热化痰、宽胸散结；丹参活血化瘀、通经止痛；辅以薤白行气导滞，黄芪补气生津养血，是治疗气虚痰瘀的基本方。第二组中，川芎作为血中气药，可活血行气止痛；当归、红花均有活血调经止痛之功；赤芍善清血分郁热，四药同用，主治气滞血瘀诸证。第三组中，半夏、陈皮燥湿化痰，陈皮又兼理气健脾，增强气血运化，茯苓利水渗湿，三药合用，针对寒痰阻滞起到治疗作用。三组药物各有侧重，合用可对痰瘀互结型冠心病起到标本兼治的功效。

系统生物学作为一门新兴学科，采用多组学技术，将生物体的基因、蛋白、代谢物等作为一个整体进行研究，与中医学中的整体观念相一致，对于科学阐释中医证候的内涵和中医药治疗疾病的机制起到了重要作用。针对冠心病患者的血浆代谢组学研究发现，冠心病的发病与糖、脂质、氨基酸代谢异常密切相关 [11-12]，而白三烯 E4 可能是痰瘀互结型冠心病有别于其他证型的标志物 [13]。小型猪痰瘀互结型冠心病模型的血清

蛋白质组学研究发现 apo E 和 C4BP 参与了机体免疫反应、脂质代谢以及炎症反应等重要病理过程，与冠心病的发生、发展密切相关[14]，而对冠状动脉组织的蛋白质组学研究鉴定出了 apo A-Ⅰ、GSTM2、Albumin 等差异蛋白参与了抗氧化应激、血栓生成、粥样斑块破裂等过程[15]。由以上多组学研究结果可以推测，冠心病的实质是代谢异常，可将“痰”“瘀”理解为糖、脂质等内源性物质的堆积，蛋白质组学所鉴定出的差异蛋白多为下调，也可认为是“本虚”的实证。此外，肠道菌群作为“人类第二个基因组”，其平衡失调也与冠心病密切相关，其代谢产物如氧化三甲胺、短链脂肪酸、胆汁酸等可作为信号分子干预冠心病的进程[16]。氧化三甲胺会引起血管内皮损伤，促进血栓生成。而短链脂肪酸可以调节血压，降低胆固醇吸收，预防冠心病。肠道菌群的失衡也会导致胆汁酸代谢异常，进而影响胆固醇代谢，诱发冠心病。由此可见，肠道菌群体现的是脾胃运化功能，调节肠道菌群也是治疗冠心病的途径，体现了中医“辨证论治”“治病求本”的理念。本研究中，丹参是临床治疗中使用频次较高的药物之一，现有研究表明，其主要活性成分丹酚酸 A 能够调节炎症，减轻氧化应激，抑制细胞凋亡，丹参酮能够抑制细胞内钙和细胞黏附，起到改善动脉粥样硬化作用[17-18]。瓜蒌 - 薤白是关联规则中出现频率最高的药对，血清代谢组学研究表明，相比于单独给药，两者配伍可影响更多的代谢途径，包括甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢以及嘧啶代谢等[19]，体现了配伍增效的科学性。

综上所述，本研究通过对中医药治疗痰瘀互结型冠心病处方的药味组成、使用频次、性味归经、关联规则进行多角度的分析，深入探究了中医药治疗痰瘀互结型冠心病的用药规律，发现处方中使用较多的药物主要有半夏、瓜蒌、丹参、川芎和薤白等，体现了“痰瘀同治”的治疗思想，结合系统生物学研究进展探讨了中医药治疗冠心病的潜在作用机制，为中医药临床治疗和基础研究提供了理论依据。

参考文献

[1] 李亥辰，陈柏君，熊磊，等 . 芳香温通方药防治冠心病心绞痛的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（1）：202-205.

[2] 胡盛寿，高润霖，刘力生，等 .《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志，2019，34（3）：209-220.

[3] 徐奎，杨思进 . 冠心病药物及介入治疗方法研究进展 [J]. 中国乡村医药，2017，24（1）：79-80.

[4] 张伯礼 . 中医内科学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2017.

[5] 毛静远，牛子长，张伯礼 . 近 40 年冠心病中医证候特征研究文献分析 [J]. 中医杂志，2011，52（11）：958-961.

[6] 常艳宾，张丽丽，李雁 . 从痰浊血瘀理论探讨冠心病的发病机制 [J]. 现代中西医结合杂志，2022，31（3）：368-371.

[7] 王传池，许伟明，江丽杰，等 . 11383 例健康人群及冠心病不同阶段患者痰瘀互结证分布规律的多中心横断面研究 [J]. 中医杂志，2021，62（6）：494-504.

[8] 袁蓉，王阶，郭丽丽 . 冠心病痰瘀互结证的近代研究及中医治疗进展 [J]. 中国中药杂志，2016，41（1）：35-37.

[9] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020.

[10] 钟赣生 . 中药学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2021.

[11] 张宜帆，周曼丽，罗晓欣，等 . 代谢组学在冠心病中医证候中的研究进展 [J]. 中医药通报，2022，21（1）：57-60.

[12] Fu H，Zhu KB，Zhou DL，et al. Identification and validation of plasma metabolomics reveal potential biomarkers for coronary heart disease [J]. Int Heart J，2019，60（6）：1387-1397.

[13] 具星，贾连群，吕美君，等 . 冠心病心绞痛痰瘀互结证与非痰瘀互结证患者血清代谢组学差异 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（2）：599-603.

[14] 刘建勋，苗兰，李欣志，等 . 中国小型猪痰瘀互结证冠心病模型的血清蛋白质组学研究 [A]// 中国中医科学院首席研究员学术论文集萃 [C]. 2012：129-132，128.

[15] 苗兰，刘建勋，曹进，等 . 中国小型猪痰瘀互结证冠心病模型的冠状动脉组织蛋白质组学研究 [J]. 中药药理与临床，2011，27（1）：97-101.

[16] Cheng TY，Li JX，Chen JY，et al. Gut microbiota：a potential target for traditional Chinese medicine intervention in coronary heart disease [J]. Chin Med，2021，16（1）：108.

[17] Wang XY，Wang Y，Jiang M，et al. Differential cardioprotective effects of salvianolic acid and tanshinone on acute myocardial infarction are mediated by unique signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol，2011，135（3）：662-671.

[18] Meng C，Zhuo XQ，Xu GH，et al. Protection of salvianolate against atherosclerosis via regulating the inflammation in rats [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci，2014，34（5）：646-651.

[19] 李加会，徐鹏博，钟华，等 . 代谢组学结合网络药理学技术探究“瓜蒌 - 薤白”药对抗动脉粥样硬化的配伍机制 [J]. 中国中药杂志，2022，47（22）：6207-6216.

（收稿日期：2023-01-02；修回日期：2023-03-04）

非小细胞肺癌靶向治疗固定剂量持续给药模式的利与弊

马进安[1]，吴元强[1*]，马弋然[2]，颜苗[3]（1. 中南大学湘雅二医院肿瘤科，长沙　410011；2. 南华大学衡阳医学院临床学系，湖南　衡阳　421200；3. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙　410011）

摘要：靶向治疗药物问世 20 余年，显著改善了肿瘤患者的生存，其固定剂量持续给药模式也暴露出不少弊端。考虑到东西方人群在遗传学、体重等方面存在差异，我们以非小细胞肺癌的研究数据为基础，剖析了 EGFR-TKIs、ALK-TKIs 存在的疑点问题，主要为固定剂量持续给药带来的疗效受损、远期安全性和药物经济性，提出了突破非小细胞肺癌靶向药物疗效瓶颈的五种策略，包括按体表面积 / 体重给药、合理联合传统治疗、下调靶向药物初始治疗剂量、创新动态给药模式、引入继发性耐药的预防概念，为优化靶向治疗提供参考。

关键词：非小细胞肺癌；靶向治疗；给药模式；表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂；间变性淋巴瘤激酶酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号：R734.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2755-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.033

Advantages and disadvantages of fixed and continuous dose regimen for targeted therapy of non-small cell lung cancer

MA Jin-an[1], WU Yuan-qiang[1*], MA Yi-ran[2], YAN Miao[3] (1. *Department of Oncology*, *The Second Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410011; 2. *Department of Clinical Medicine*, *Hengyang Medical College*, *South China University*, *Hengyang Hunan* 421200; 3. *Department of Pharmacology*, *The Second Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: In recent twenty years, targeted drug therapy has been popular owing to the improvement in the survival of cancer patients. However, the fixed and continuous dosing regimen shows both disadvantages and advantages. There are obvious genetic and body-weight differences between eastern and western population groups, thus, we assume that patients from different population groups should be given different doses. By analyzing the data from non-small cell lung cancer (NSCLC), we found some problems in the fixed and continuous dosing schema of EGFR-TKIs and ALK-TKIs, including discounted effect, long-term safety and economic burden. Therefore, we proposed five strategies for the limitation of targeted therapy for NSCLC: dosing based on patients' body surface or weight, combining with traditional therapies, down-regulating the initial dose of targeted medicine, administrating the drug dose dynamically instead of a fixed dose, and preventing secondary drug resistance. These strategies help optimize the dose regimen of targeted medicine.

Key words: non-small cell lung cancer; targeted therapy; dose regimen; EGFR-TKI; ALK-TKI

恶性肿瘤的治疗模式为综合治疗，其方法包括传统的外科手术、放射治疗（放疗）、化学治疗（化疗）、靶向治疗、免疫治疗、微环境调节剂（多靶点抗血管生成药物）等，需要根据肿瘤分期以及患者的身体状况等因素综合评估，选择合理的组合方式进行治疗，并在病情变化过程中适当调整治疗策略。因此，精准治疗和个体化治疗尤为重要，此决策过程最好由 MDT（multi-disciplinary Treatment）团队完成。精准治疗是指通过新的基因检测技术分析肿瘤基因突变信息，依据

基金项目：湖南省生物质基材料绿色低碳智造工程技术研究中心（No. 2022TP2033）。

作者简介：马进安，男，主任医师，硕士研究生导师，主要从事肿瘤的综合诊疗和研究，email：3420248369@qq.com　*通信作者：吴元强，女，助理研究员，主治医师，主要从事肿瘤的综合诊疗和研究，email：yuanqiang_wu@163.com

个人基因信息为癌症患者制订个体化的治疗方案和其他联合治疗方案[1]。我国专家对精准治疗的定义进行了升华，认为是集合现代科技手段与传统医学方法，科学认识人体机能和疾病本质，以最有效、最安全、最经济的医疗服务获取个体和社会健康效益最大化的新型医学范畴[2]。

精准治疗主要包括靶向治疗，其药物一般指专门针对恶性肿瘤驱动突变设计研发的小分子抑制剂，较传统化疗药物高效低毒，其出现是肿瘤药物治疗史上里程碑式的事件，但其继发性耐药仍然不可避免。伊马替尼由瑞士诺华公司开发，是全球第一个上市的靶向治疗药物，为口服小分子酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitor，TKI），主要阻断 BCR-ABL、c-Kit 蛋白活性，2000 年首先获批用于治疗慢性粒细胞白血病，2002 年获批治疗不能手术切除或发生转移的恶性胃肠道间质瘤。伊马替尼的成功极大地带动了各种 TKI 药物的研发。第二个靶向治疗药物则为针对表皮生长因子受体（EGFR）的 TKI 吉非替尼，由英国阿斯利康公司研发，于 2003 年上市，用于治疗非小细胞肺癌（NSCLC）。EGFR 突变的发现同样给东亚人 NSCLC 的治疗带来了革命性的改变。NSCLC 仍然是世界范围内致死率最高的恶性肿瘤，研发投入较多，针对 EGFR 突变、间变性淋巴瘤激酶（ALK）融合等各种靶点的 TKI 类药物发展迅速，上市了多种靶向药物。

靶向药物的治疗靶点精准，毒副作用明显低于传统化疗药物，但其给药剂量却沿袭了传统化疗“the more the better”的理念，采用接近于最大耐受剂量（maximum tolerated dose，MTD）的固定剂量给药模式，持续至患者不能耐受或疾病进展。靶向治疗固定剂量持续给药模式最大的好处就是临床使用方便，但其不合理性未得到应有的重视。就 NSCLC 来说，目前靶向治疗固定剂量持续给药模式存在的弊端主要集中在药物剂量不精准带来的疗效受损、远期安全性和药物经济性方面。

因此，笔者剖析了 NSCLC 靶向治疗固定剂量给药模式的弊端，以期为优化临床治疗剂量、更好地践行个体化治疗提供思路。

1　靶向治疗现行剂量给药的合理性分析

靶向治疗固定剂量持续给药模式是否合理，一直是临床医师和药师纠结的问题。中南大学周宏灏院士研究发现肝药酶表型不同的患者，其药物代谢与药效也是不同的，临床最好根据不同的遗传学表型选择不同的药物和剂量[3]。其实东西方人群最显著的遗传学差异是乙醛脱氢酶 2（ALDH2）的基因多态性，导致的典型表现就是“亚洲红”（Asian Flush），ALDH2 显著影响人体肝脏的解酒与解毒功能[4]。东亚人群 40% ～ 45% 为 ALDH2 突变型，而西方人群仅约 5% 为突变型，说明不同人种之间的遗传学差异显著，对药物的反应也不同。即使人种相同，患者个体之间的体重、体表面积也存在较大差异，因此，所有患者均采用同一固定剂量给与靶向治疗药物是欠合理的。

传统化疗药毒副作用明显，其剂量按体表面积给药或体重计算，包括口服化疗药，这是普遍接受的给药模式。真实世界中，多数中国医师认为参考国外标准，中国患者化疗、放疗的耐受性要相对低于西方人，这可能与体质、ALDH2 的基因多态性等多种因素有关。西方人体重明显大于东亚人，美国成年人平均体重男性为 89 kg、女性为 80 kg[5]，而中国人平均体重男性为 66.2 kg、女性为 57.3 kg[6]。由此可见，参照体表面积或体重给药的传统标准，靶向治疗固定剂量持续给药导致中国人较西方人靶向药物单位治疗剂量更高，治疗强度更大。综合分析，中国人靶向治疗药物和西方人相比可能“过量”了，日本、韩国等东亚国家数据的参考性要优于西方，当然，最可靠的标准应该是参照中国人自己的药理及疗效数据来制订。

2　EGFR-TKIs 固定剂量给药模式的疑点

2.1　EGFR-TKIs 初始治疗增量不增效，副作用较大者减量反而增效

吉非替尼的常规使用剂量为 250 mg • d^{-1}，小样本回顾性分析显示，吉非替尼 250 mg 初始治疗 EGFR 基因突变阳性 $EGFRm^{+}$ NSCLC 的患者，增加剂量至 500 mg 并不能延长无进展生存期（PFS）以及总生存期（OS），其中位无进展生存期（mPFS）(14.37 个月 *vs* 10.50 个月）、中位总生存期（mOS）(28.47 个月 *vs* 18.33 个月）随着剂量的增加反而缩短[7]。AURA 研究中，80 mg • d^{-1} *vs* 160 mg • d^{-1} 奥希替尼一线治疗 $EGFRm^{+}$ 晚期及转移性 NSCLC 患者，mPFS 为 22.1 个月 *vs* 19.3 个月，大剂量患者的 mPFS 绝对值反而略小[8]。由此可见，吉非替尼、奥希替尼初治时增加剂量可能会因副作用增加而抵消 PFS 获益。EGFR-TKIs 靶向治疗晚期 NSCLC，初始治疗时在安全治疗窗范围内选择可耐受的较大剂量不提高疗效，甚至降低疗效。

NEJ002 研究的回顾性分析发现，不能耐受吉

非替尼 250 mg qd 的晚期 NSCLC 患者调整为 250 mg qod 后，减量组的 mPFS 为 11.8 个月，mOS 为 32.7 个月，优于未减量组的 9.9 个月和 25.3 个月[9]。一项回顾性分析也显示，因吉非替尼毒性而减量的患者其预后明显优于一直口服标准剂量 250 mg 的患者，其 mPFS 为 14.0 个月 *vs* 10.6 个月，mOS 为 54.5 个月 *vs* 29.6 个月[10]。二代 EGFR-TKI 因为其泛 EGFR 靶点及不具备突变选择性，副作用较大，阿法替尼的临床研究显示，49% 的患者因为其毒副作用需要减量[11]，而 ARCHER1050 国际多中心Ⅲ期临床研究显示，超过 60% 的患者因为达可替尼的毒副作用需要减量[12]，这说明其选择的Ⅱ期临床研究推荐剂量（RP2D）过高，最后则导致药品上市说明书的剂量过高，由此可见化疗时代“the more the better”的指导思想存在问题。研究发现，达可替尼减量至 30 mg • d^{-1} 甚至 15 mg • d^{-1} 的患者与一直口服 45 mg • d^{-1} 未减量的患者比较，其客观缓解率（ORR）相似（79.3% *vs* 74.9%），mPFS 为 16.6 个月 *vs* 14.7 个月，mOS 达 37 个月，显著优于未减量患者的 22 个月[12]。以上研究数据说明 EGFRm$^+$ NSCLC 患者因为毒副作用减量反而增加远期疗效，延长 OS。所以，晚期 NSCLC 目前 EGFR-TKIs 的使用剂量欠合理，亟待进一步优化。

2.2　EGFR-TKI *初治时减量未必减效，继发性耐药后再加量治疗仍有效*

小样本研究发现，超低剂量的厄洛替尼 25 mg • d^{-1}（1/6 说明书剂量）初始治疗 EGFRm$^+$ NSCLC 的 ORR 为 71.5%，mPFS 为 17.0 个月，而厄洛替尼 150 mg • d^{-1} 的 OPTIMAL 研究 ORR 为 82.9%，PFS 为 13.7 个月，EURTAC 研究 ORR 为 55.0%，PFS 为 9.7 个月[13]。此结果提示厄洛替尼初始治疗时起始低剂量并不会降低 ORR 与 mPFS，但目前循证医学证据不足。然而，上市后药物的剂量优化，主要依靠临床医师和药师主导的研究者发起的临床研究，但一般很难获得研发厂家的充分支持，难以进行大规模的临床研究，导致研究结果的循证医学证据等级较低，难以进入指南或者规范以指导广大的基层医师与患者。厄洛替尼的低剂量起始治疗方案能否推广到其他 EGFR-TKIs 有待进一步探索。

吉非替尼常规剂量继发性耐药后再加量治疗仍有效。20 例吉非替尼常规剂量 250 mg 初始治疗的 PFS 大于 6 个月的晚期 NSCLC 患者，疾病进展（progressive disease，PD）后再按 375 mg • d^{-1} → PD → 500 mg • d^{-1} → PD → 625 mg • d^{-1} → PD → 750 mg • d^{-1} → PD → 875 mg • d^{-1} → PD → 1000 mg • d^{-1} 渐进模式加量给药，疾病控制率（DCR）可达 65%，耐药后加量治疗可继续再获 9.1 个月的总 PFS，不良反应仅为轻度皮疹与腹泻。可见常规剂量 EGFR-TKI 耐药后通过增加剂量可以获得肿瘤再次控制甚至部分缓解[14]。目前 NCCN 指南和 CSCO 指南对于第三代 EGFR-TKIs 治疗耐药后缓慢进展的患者，也推荐原 EGFR-TKIs 的继续治疗[15]。

2.3　*三代 EGFR-TKIs 剂量与治疗模式的优化潜力*

三代 EGFR-TKIs 选择性抑制 EGFR 突变激酶，对野生型抑制活性较弱，毒性更小，目前已经在国内获批的包括奥希替尼（osimertinib）、阿美替尼（almolertinib）、伏美替尼（furmonertinib）。虽然没有头对头直接比较的研究，但间接比较发现国产阿美替尼、伏美替尼疗效不劣于进口的奥希替尼（二线治疗 PFS 10.1 个月 *vs* 12.3 个月 *vs* 9.6 个月；一线治疗 PFS 18.9 个月 *vs* 19.3 个月 *vs* 20.8 个月），安全性却更好[16-18]。基于靶向治疗药物在晚期 NSCLC 应用和研究中发现的现象及问题，如何选择合适的初始治疗剂量，如何确定合理的给药模式，值得探索。如何优化当今的固定剂量给药模式，延长 EGFR-TKIs 单药一线治疗的有效控制时间是获得更长 OS 的突破点。三代 EGFR-TKIs 是目前治疗 EGFRm$^+$ 晚期 NSCLC 的主流选择，下面笔者以阿美替尼的研究数据考量其Ⅱ期推荐剂量（RP2D），并分析其给药模式是否可以优化。

阿美替尼Ⅰ期临床研究的剂量递增试验和扩展期研究数据见表 1[19]。扩展期研究发现 55 mg、110 mg、220 mg 三个剂量组之间 ORR 差异没有统计学意义，最终选择 110 mg 作为 RP2D 进一步研究。阿美替尼Ⅱ期临床试验（APOLLO）中，110 mg 二线治疗安全性和耐受性良好，89.8% 的受试者发生了至少一次不良事件（adverse event，AE），3 级以上研究药物相关 AE 发生率为 18.0%，7.8% 的受试者发生与研究药物有关的严重不良事件（SAE）[20]。而阿美替尼Ⅲ期临床试验（AENEAS）中[17]，110 mg 剂量一线治疗的受试者中高达 98.6% 的人发生了至少一次 AE，3 级以上 AE 发生率为 36.4%，22.0% 的受试者发生至少一次 SAE，5 例受试者（2.3%）出现死亡。Ⅲ期临床研究发现阿美替尼的毒副作用较Ⅱ期有所增加，可能与二线患者曾使用过一代、二代 EGFR-TKIs 导致其耐受性更好，以及与Ⅲ期研究中阿美替尼的更长程一线使用有关。

表 1　阿美替尼Ⅰ期临床研究数据

Tab 1　Phase Ⅰ clinical trial data of almonertinib

分组	剂量	ORR/%	DCR/%	DLT	mPFS/ 月
Ⅰ期研究剂量分组	55 mg（n = 6）	50.0	100	0/6	—
	110 mg（n = 6）	66.7	100	0/6	—
	220 mg（n = 8）	37.5	75.0	1/8	—
	260 mg（n = 6）	16.7	50.0	1/6	—
扩展期研究剂量分组	55 mg（n = 30）	60.0	83.3	—	9.6
	110 mg（n = 33）	54.5	97.0	—	13.6
	220 mg（n = 31）	54.8	93.5	—	11.1

阿美替尼Ⅰ期研究数据显示 EGFR-TKIs 并不是剂量越高 ORR 越高，选择低剂量的 55 mg 作为 RP2D 也是可行的。尽管阿美替尼毒副作用相对较小，但长程使用时相关毒副作用会有所增加，尚需要临床重视。众所周知，药物低剂量起始逐渐加量可以明显提高患者的耐受性，这种策略在非肿瘤慢性病患者初始治疗用药时经常使用。如果打破当前的固定剂量给药模式，创新性采用动态给药模式，如阿美替尼 55 mg → PD → 110 mg → PD → 220 mg 的剂量渐进递增模式给药，理论上毒副作用更小，患者可更好地耐受，总的单药治疗有效控制时间获得延长。

3　ALK-TKIs 固定剂量给药的疑点

固定剂量给药模式的弊端在 ALK-TKI 靶向治疗 ALK^+晚期 NSCLC 时也同样存在，而且更为明显。ASCEND-8 研究比较了色瑞替尼 450 mg • d^{-1}（与食物同服）和 750 mg • d^{-1}（空腹）治疗 ALK^+晚期 NSCLC 的疗效，450 mg • d^{-1} 组的 mPFS 为 17.6 个月，显著长于 750 mg • d^{-1} 组的 6.7 个月，且副作用明显减少 [21]。目前色瑞替尼的说明书已经调整为 450 mg • d^{-1}，与食物同服。一项回顾性研究色瑞替尼治疗 ALK^+晚期 NSCLC 的Ⅰ期临床数据发现，19 例患者分别口服 300 *vs* 450 *vs* 600 *vs* 750 mg • d^{-1}，其 ORR 分别为 100% *vs* 50% *vs* 50% *vs* 33%，DCR 分别为 100% *vs* 67% *vs* 50% *vs* 67%，剂量越大，ORR 与 DCR 越差 [22]。

基于药品辅料十二烷基硫酸钠（SLS）安全标准在世界不同地区间的差异性，ALK-TKI 阿来替尼治疗 ALK^+晚期 NSCLC，其日本说明书推荐剂量为 300 mg bid [受限于 SLS 而并非阿来替尼的剂量限制性毒性（DLT）]，而包括中国在内的其他国家的说明书均推荐 600 mg bid。全球范围内开展的 ALEX 研究（除日本）阿来替尼 600 mg bid 组的 mPFS 为 34.8 个月（INV）[23]，基于日本人群的 J-ALEX 临床研究阿来替尼 300 mg bid 组的 mPFS 为 34.1 个月（BIRC）[24]，日本真实世界回顾性研究数据显示阿来替尼 300 mg bid 的 mPFS 为 40.1 个月 [25]。由此可见，阿来替尼 300 mg bid 的疗效并不劣于 600 mg bid。医疗费用对患者家庭和整个社会来说是一个巨大的经济负担，这意味着靶向治疗必然要考虑成本效益。在非劣效的基础上，较低剂量由于直接成本下降，肯定更具成本效益。此外，较低剂量带来更小的毒性，减少了后续治疗和住院，从而减少了间接成本，使阿来替尼 300 mg bid 的给药剂量更具成本效益。

4　其他靶向药物给药模式的疑点

K-Ras 突变是 NSCLC 常见的基因突变，2021 年 5 月美国 FDA 加速批准了首个治疗 K-Ras（p.G12C）基因突变型 NSCLC 的靶向药物 Sotorasib（索托拉西布）上市 [26]。虽然 FDA 批准的为高剂量 960 mg，但其临床研究数据显示低剂量组和高剂量组在药物暴露量、目标靶点饱和度和 ORR 方面表现相似，因此 FDA 明确要求在药品上市后继续开展相关试验，研究低剂量是否也具有相似的临床效果。其研发公司安进（AMGEN）在 2022 年启动了临床研究，以探索 Sotorasib 960 mg qd *vs* 240 mg qd 的疗效差异。批准 Sotorasib 上市的同时要求再开展剂量选择的临床试验，说明美国 FDA 专家已开始重视靶向药物的剂量优化。

5　NSCLC 靶向治疗的未来

靶向药物的问世是肿瘤治疗史上的里程碑事件，但同时带来了一系列挑战传统化疗时代思维的问题。“the more the better” 的剂量选择理念可能并不适用于靶向治疗，因为肿瘤细胞的靶点有限，剂量增加至一定水平后并不能再继续增强抗肿瘤活性。而且靶向药物往往需要长期使用，一些剂量限制性毒性经过多个周期使用后才会出现，而 R2PD 只能反映靶向药物短期使用的耐受性，不能充分反映长期使用的安全性，因此将最大耐受剂量作为 R2PD 不一定适合长程使用。

因肿瘤异质性的天然存在以及肿瘤细胞的进化潜能，其原发性和继发性耐药无法避免。继发性耐药是肿瘤细胞对药物刺激、生存环境改变的一种适应性进化，其机制分为生物学耐药和药理学耐药，前者包括靶基因的二次突变、旁路信号代偿及改变、下游通路中的信号异常、组织学变化等，后者包括剂量不足、吸收和新陈代谢异常、中枢神经系统穿透不良和颅内治疗失败等 [27]。从肿瘤细胞适应性进化和哲学的层面来考虑，靶向治疗固定剂量持续给药模式应该与传统慢性病的控制不同，不宜过分追求长时间内的稳态血药浓度，间歇给药模式的适当

“药物假期”也许更有利于肿瘤群体的稳定以及药物压力下的耐药进化[28]。为了突破耐药的关卡，可针对继发性耐药机制研发新药，这是目前的主流策略，但由于耐药机制的复杂性，此路困难重重；其次，也可联合其他传统治疗策略增效。针对目前固定剂量给药模式的弊端，如何在中国人 NSCLC 靶向治疗的疗效上突破瓶颈，挖掘适合中国人的更新的理念，如按体表面积 / 体重给药、联合其他治疗策略、下调药物初始治疗剂量、创新动态给药模式、引入靶向治疗继发性耐药预防概念等。

5.1　按体表面积 / 体重给药策略

精准治疗不仅要求基于基因检测分析的靶点精准，剂量精准同样重要，尤其是中国人群。从传统的化疗到靶向治疗，剂量方面靶向治疗沿袭了化疗的“the more the better”策略，但却为了给药方便采用了不精准的固定剂量模式，放弃了传统的按体表面积 / 体重精准给药的模式。这是一个比较容易解决的问题，可以回顾性分析已经上市的靶向治疗药物的临床研究数据来验证是否合理。真实世界中临床医师则是根据自己的经验和毒副作用进行减量调整或是相应的变通调整。其实最简单的做法是初始治疗时按体重进行分档，如以 45 kg（女性）/50 kg（男性）进行划线，低者采用阿美替尼 55 mg • d^{-1}，高者采用 110 mg • d^{-1}，此用法类似于日本口服化疗药替吉奥以体表面积 1.25/1.5 m^2 为标准分为三个档次给药。

5.2　联合传统治疗策略

传统的化疗、放疗、微环境调节剂与 EGFR-TKIs 的抗癌作用机制完全不同，靶向治疗与它们的联合治疗理论上可以增效，并已经取得一定的临床研究进展[29-31]，但这种联合治疗带来的毒副作用也更为明显。直接的“1 ＋ 1”联合模式可以提高 ORR、PFS 等近期疗效指标，但对于远期疗效 OS 来说尚未完全确立，而且明显增加安全性问题和经济负担。基于毒副作用的考虑，打破常规，“0.75 ＋ 0.75”“0.75 ＋ 0.5”“0.5 ＋ 0.5”等的联合模式值得探索。但 EGFR-TKIs 与 PD-1 单抗免疫治疗的联合在安全性上遭遇了“滑铁卢”，奥希替尼与帕博利珠单抗联合治疗，其间质性肺炎的发生率达到了 34%[32]。理论上 EGFR-TKIs 靶向治疗可提高 ORR，PD-1 单抗免疫治疗可提高 OS，但现实中的强强联合却不尽如人意。脱离药物的使用剂量谈毒性显然不可取，“0.75 ＋ 0.25”的联合模式可否打破桎梏值得思量。

5.3　下调靶向药物初始治疗剂量策略

肺癌 TKI 类药物剂量治疗窗比较大，Ⅰ、Ⅱ期 NSCLC 临床数据显示随着 TKIs 剂量的不断增加，ORR 出现不升反降的异常现象。NSCLC 靶向药物初始治疗时选择合适的剂量非常重要，可使其在保障不降低疗效的前提下，既减少了毒副作用，又节约了医疗成本。与传统化疗的结果相反，靶向药物给药时合理选择低剂量起始治疗 NSCLC 似乎更有利于延长患者的 PFS 与 OS，这是抗肿瘤治疗的最终目的。由此可见，TKIs 有着降低起始治疗剂量的空间，值得进一步探索。

5.4　创新动态给药模式策略

既然靶向药物治疗固定剂量持续给药模式存在不合理性，那么动态给药模式就值得探索。从 ARCHER1050 等研究结果来看，缘于毒副作用等安全性问题，被动下调治疗剂量的患者生存获益显著。NSCLC 的 EGFR-TKIs 治疗一般在 2 ～ 3 个月进入平台期，ALK-TKIs 一般在 6 个月左右达稳态，肿瘤难以持续缩小，临床医师和药师能否化被动为主动，在疗效达稳态后主动下调维持剂量。例如培美曲塞联合铂类双药化疗治疗肺癌 4 个周期后，主动改为单药培美曲塞维持治疗，甚至延长培美曲塞的间隔时间。靶向药物的负荷剂量＋维持剂量给药模式与化疗的足量＋单药维持给药模式异曲同工，理论上可延长患者 PFS 甚至 OS。

EGFR-TKIs 继发性耐药时，几乎均伴随着药理学耐药，通过再加量可在一定程度上突破耐药，初始治疗采用低剂量也为继发性耐药后在安全治疗窗范围内渐进倍增加量治疗提供了可能。鉴于 EGFR-TKIs、ALK-TKIs 前期临床研究中的 ORR 高效性，直接低剂量起始并持续给药，临床复诊疗效评估出现肿瘤体积缓慢增大或者血液 ctDNA 升高而未达到疾病进展标准时，予以剂量渐进倍增给药模式治疗，极大可能会延长 TKIs 的单药控制时间，也就意味着延长 PFS 甚至 OS。

5.5　引入继发性耐药的预防概念

EGFR-TKIs 继发性耐药是必然事件，本团队于 2014 年提出过继发性耐药的预防概念及对策[33]。“上医治未病”是传统中医药的理念精髓，NSCLC 患者气阴两虚、热毒郁结是其主要病机，中医治疗的治则主要是益气养阴。在真实临床实践中，本团队的“益气养阴抗突变”复方与 NSCLC 的 EGFR-TKI 靶向治疗同时使用，具有一定的临床获益[34]。

6　小结与展望

靶向治疗药物是实施精准治疗概念的主要药

物，以循证医学证据为基础，以个体化精准治疗理念为指导，力求最有效、最安全、最经济的目标。医师与药师基于临床观察及经验发现的特殊问题，需要开展临床研究进行验证，任重道远。研发厂家对有效性和自身的经济效益最为重视，药品上市为第一要务，安全性次之，不愿投入过多的经济力量支持临床的剂量与疗效优化研究。作为代表国家审批管理药品的国家药品监督管理局（NMPA），在监管的同时，希望跳出传统思维的框架，创造性地提出符合中国人种与民族特性的标准，比如要求阿来替尼在中国的上市研究设置 300 mg bid 的剂量组。如果 NMPA 能够要求申办方的靶向治疗药物上市研究，提供额外的或自行分析基于体表面积 / 体重的剂量强度与疗效数据的相关性，则更具中国特色。国家医保在中国医疗改革中的作用越来越重要，在 DRG 付费全面铺开的大背景下，参与并支持临床医师和药师开展具有中国特色的药物经济学研究至关重要，也是管理上的创新。中国靶向药物的精准治疗还需要 NMPA、国家医保、临床医师和药师的共同努力。

参考文献

[1] Reardon S. Precision-medicine plan raises hopes [J]. Nature，2015，517（7536）：540.

[2] 郭俊超，袁达 . 我国肿瘤精准治疗的现状和思考 [J]. 浙江医学，2016，38（14）：1137-1138.

[3] 周宏灏 . 基因导向性个体化用药新模式 [J]. 中南药学，2003，1（1）：5-10.

[4] Chen CH，Sun L，Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases [J]. Cardiovasc Res，2010，88（1）：51-57.

[5] Hales CM，Carroll MD，Fryar CD，et al. Prevalence of obesity and severe obesity among adults：United States，2017—2018 [J]. NCHS Data Brief，2020，360：1-8.

[6] 顾景范 .《中国居民营养与慢性病状况报告（2015）》解读 [J]. 营养学报，2016，38（6）：525-529.

[7] Xue C，Hong S，Li N，et al. Randomized，multicenter study of gefitinib dose-escalation in advanced non-small-cell lung cancer patients achieved stable disease after one-month gefitinib treatment [J]. Sci Rep，2015，5：10648.

[8] Ramalingam SS，Yang JC，Lee CK，et al. Osimertinib as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol，2018，36（9）：841-849.

[9] Satoh H，Inoue A，Kobayashi K，et al. Low-dose gefitinib treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer harboring sensitive epidermal growth factor receptor mutations [J]. J Thorac Oncol，2011，6（8）：1413-1417.

[10] Sim SH，Keam B，Kim DW，et al. The gefitinib dose reduction on survival outcomes in epidermal growth factor receptor mutant non-small cell lung cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2014，140（12）：2135-2142.

[11] Park K，Tan EH，O'Byrne K，et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer（LUX-Lung 7）：a phase 2B，open-label，randomised controlled trial [J]. Lancet Oncol，2016，17（5）：577-589.

[12] Wu YL，Cheng Y，Zhou X，et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer（ARCHER 1050）：a randomised，open-label，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2017，18（11）：1454-1466.

[13] Yeo WL，Riely GJ，Yeap BY，et al. Erlotinib at a dose of 25 mg daily for non-small cell lung cancers with EGFR mutations [J]. J Thorac Oncol，2010，5（7）：1048-1053.

[14] 江昊，周涛，高亚杰，等 . 吉非替尼耐药后加量疗法对比更换厄洛替尼治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察 [J]. 肿瘤防治研究，2014，41（11）：1223-1226.

[15] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology（NCCN Guidelines®）Non-Small Cell Lung Cancer. Version 1.2023.

[16] 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.

[17] Lu S，Dong X，Jian H，et al. AENEAS：a randomized phase Ⅲ trial of aumolertinib versus gefitinib as first-line therapy for locally advanced or metastaticnon-small-cell lung cancer with EGFR Exon 19 Deletion or L858R mutations [J]. J Clin Oncol，2022，40（27）：3162-3171.

[18] Shi Y，Chen G，Wang X，et al. Furmonertinib（AST2818）versus gefitinib as first-line therapy for Chinese patients with locally advanced or metastatic EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer（FURLONG）：a multicentre，double-blind，randomised phase 3 study [J]. Lancet Respir Med，2022，10（11）：1019-1028.

[19] Yang JC，Camidge DR，Yang CT，et al. Safety，efficacy，and pharmacokinetics of almonertinib（HS-10296）in pretreated patients with EGFR-Mutated advanced NSCLC：a multicenter，open-label，phase 1 trial [J]. J Thorac Oncol，2020，15（12）：1907-1918.

[20] Lu S，Wang Q，Zhang G，et al. Efficacy of aumolertinib（HS-10296）in patients with advanced EGFR T790M $^{+}$ NSCLC：updated post-national medical products administration approval results from the APOLLO registrational trial [J]. J Thorac Oncol，2022，17（3）：411-422.

[21] Cho BC，Kim DW，Bearz A，et al. ASCEND-8：a randomized phase 1 study of ceritinib，450 mg or 600 mg，taken with a low-fat meal versus 750 mg in fasted state in patients with anaplastic lymphoma kinase（ALK）-rearranged metastatic non-small cell lung cancer（NSCLC）[J]. J Thorac Oncol，2017，12（9）：1357-1367.

[22] Nishio M，Murakami H，Horiike A，et al. Phase I study

of ceritinib（LDK378）in Japanese patients with advanced，anaplastic lymphoma kinase-rearranged non-small-cell lung cancer or other tumors [J]. J Thorac Oncol，2015，10（7）：1058-1066.

[23] Camidge DR，Dziadziuszko R，Peters S，et al. Updated efficacy and safety data and impact of the EML4-ALK fusion variant on the efficacy of alectinib in untreated ALK-positive advanced non-small cell lung cancer in the global phase Ⅲ ALEX study [J]. J Thorac Oncol，2019，14（7）：1233-1243.

[24] Nakagawa K，Hida T，Nokihara H，et al. Final progression-free survival results from the J-ALEX study of alectinib versus crizotinib in ALK-positive non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer，2020，139：195-199.

[25] Ito K，Yamanaka T，Watanabe S，et al. The impact of sequential therapy of crizotinib followed by alectinib：Real-world data analysis of 840 ALK-inhibitor naïve patients with NSCLC harboring ALK-rearrangement（WJOG9516L）[EB/OL]. J Clin Oncol，2019，37（suppl）：abstr 9038.

[26] Skoulidis F，Li BT，Dy GK，et al. Sotorasib for lung cancers with KRAS p.G12C mutation [J]. N Engl J Med，2021，384（25）：2371-2381.

[27] Camidge DR，Pao W，Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours：learning from lung cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol，2014，11（8）：473-481.

[28] Djebbari F，Stoner N，Lavender VT. A systematic review of non-standard dosing of oral anticancer therapies [J]. BMC Cancer，2018，18（1）：1154.

[29] Hosomi Y，Morita S，Sugawara S，et al. Gefitinib alone versus gefitinib plus chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated epidermal growth factor receptor：NEJ009 study [J]. J Clin Oncol，2020，38（2）：115-123.

[30] Li X，Wang F，Jia H，et al. Efficacy and safety of EGFR inhibitors and radiotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer：a meta-analysis [J]. Future Oncol，2022，18（27）：3055-3065.

[31] Kawashima Y，Fukuhara T，Saito H，et al. Bevacizumab plus erlotinib versus erlotinib alone in Japanese patients with advanced，metastatic，EGFR-mutant non-small-cell lung cancer（NEJ026）：overall survival analysis of an open-label，randomised，multicentre，phase 3 trial [J]. Lancet Respir Med，2022，10（1）：72-82.

[32] To KKW，Fong W，Cho WCS. Immunotherapy in treating EGFR-mutant lung cancer：current challenges and new strategies [J]. Front Oncol，2021，11：635007.

[33] 马进安 . 中国非小细胞肺癌 EGFR-TKIs 治疗的现状与思考 [J]. 中国肿瘤时讯，2014，4：18-20.

[34] 马进安，胡春宏，伍参荣，等 . 益气养阴解毒抗突变复方延缓 EGFR 敏感突变型肺癌吉非替尼获得性耐药的研究 [J]. 中医药导报，2015，21（7）：31-35.

（收稿日期：2023-01-15；修回日期：2023-02-21）

某院卡瑞利珠单抗应用的合理性与安全性分析

孙艳艳[1]，孙一鸣[2]，夏一淼[1]，蒋俊杰[1]，王法财[1]（1. 安徽医科大学附属六安医院（六安市人民医院）药学部，安徽　六安　237005；2. 蚌埠医学院第一附属医院药剂科，安徽　蚌埠　233000）

摘要：目的　探讨卡瑞利珠单抗的应用合理性与安全性，为临床合理应用提供参考。**方法**　收集某院 2020 年 2 月至 2023 年 2 月应用卡瑞利珠单抗的患者资料，依据药品说明书及诊疗指南，对卡瑞利珠单抗应用的合理性与安全性进行分析。**结果**　共收集到 102 例患者应用卡瑞利珠单抗 672 次，符合说明书或指南推荐的 75 例（73.53%），存在给药顺序不适宜（41.18%）、用法不适宜（60.78%）、无故中断治疗（42.16%）、预处理不适宜（9.80%）等问题；不良反应发生率为 60.78%，主要表现为血液毒性（34.31%）、皮肤毒性（31.37%）、内分泌毒性（27.45%），观察到罕见的不良反应是毛细血管扩张症与银屑病（各 1 例）。**结论**　我院卡瑞利珠单抗多符合药品说明书或指南推荐，但仍存在超说明书用药问题。此外不良反应发生率较高（60.78%），医院及临床药师应加强免疫检查点抑制剂合理应用管理，特别是毒性监测。

关键词：卡瑞利珠单抗；合理性；安全性

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2761-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.034

基金项目：国家自然科学基金青年项目（No. 82104152）；安徽医科大学校基金资助项目（No. 2021xkj102）。

作者简介：孙艳艳，女，主管药师，主要从事医院药学方面的工作，email：842099009@qq.com　*通信作者：王法财，男，博士研究生，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事医院药学方面的工作，email：18956431869@163.com

Rationality and safety application of camrelizumab in a hospital

SUN Yan-yan[1], SUN Yi-ming[2], XIA Yi-miao[1], JIANG Jun-jie[1], WANG Fa-cai[1] (1. *Department of Pharmacy*, *Lu'an Hospital Affiliated to Anhui Medical University* (*Lu'an People's Hospital*), *Anhui Lu'an* 237005; 2. *Department of Pharmacy*, *The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College*, *Anhui Bengbu* 233000)

Abstract: Objective To determine the rationality and evaluation the safety of camrelizumab, and provide reference for rational use of camrelizumab. **Methods** Data of patients receiving camrelizumab in a hospital from February 2020 to February 2023 were collected. According to drug instructions and guidelines, the rationality and safety of camrelizumab were evaluated. **Results** Totally 102 patients with 672 times of camrelizumab treatment were collected, 75 (73.53%) met the indications in the drug intructions or guideline. Problems included irrational order of administration (41.18%), inappropriate usage (60.78%), interruption of treatment without any reason (42.16%) and pretreatment (9.80%). The incidence of adverse drug reactions was 60.78%, mainly manifested as blood toxicity (34.31%), skin toxicity (31.37%), and endocrine toxicity (27.45%). The rare adverse reactions included capillary dilation and psoriasis, one case each. **Conclusion** Most uses of camrelizumab in the hospital followed the drug instructions or guideline, but there are still cases of off-label indications, with high incidence of adverse reactions (60.78%). Clinical pharmacists should strengthen the management of application of immune checkpoint inhibitors, especially toxicity monitoring.

Key words: camrelizumab; rationality; safety

卡瑞利珠单抗为我国自主研发的人类 IgG4 单克隆抗体，通过与 T 细胞表面的程序性细胞死亡 1 受体（programmed cell death 1 receptor，PD-1）结合，阻断 PD-1 通路介导的免疫抑制反应发挥抗肿瘤作用[1]。2019 年 5 月 26 日卡瑞利珠单抗获国家药品监督管理局（National Medical Products Administration，NMPA）批准上市用于经典型霍奇金淋巴瘤。截至 2023 年 2 月，卡瑞利珠单抗先后获 NMPA 批准用于肝细胞癌、非小细胞肺癌、食管鳞癌等适应证，为目前获批适应证最多的免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitors，ICIs）药物。由于该类药物用药经验少、上市时间短，因此在临床应用过程中可能会存在用药安全性及不合理使用问题。本研究旨在调查分析卡瑞利珠单抗的临床使用情况，对其应用的安全性与合理性进行分析评价，以期为临床安全用药提供参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

利用医院信息系统（HIS）调取安徽医科大学附属六安医院 2020 年 2 月至 2023 年 2 月应用卡瑞利珠单抗的病例，提取相关数据资料。包括患者基本信息、疗程、治疗方案、用药期间不良反应等。

1.2　方法

以 NMPA 批准的适应证及用法用量为主要评价标准判断，对超适应证的情况参考 2022 年中国临床肿瘤学会（CSCO）发布的诊疗指南，结合 PubMed、MicroMedex、CNKI 等相关医学数据库收集循证医学证据评价用药合理性。按照国家药品不良反应监测中心的评判标准对药物不良反应（adverse drug reaction，ADR）进行分类和关联性评价。ADR 严重程度根据 Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）Version5.0[2] 及《免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南》[3] 进行评价与分级。

2　结果

2.1　患者基本情况

2020 年 2 月至 2023 年 2 月期间应用卡瑞利珠单抗患者累计 102 例，总疗程 672 次，人均治疗 6.59 个周期。患者年龄 40 ～ 91 岁，平均年龄为（66.18±11.83）岁。51 例患者合并基础疾病，其中主要为合并高血压（23 例）。详见表 1。

2.2　用药适应证情况

本次收集的 102 例患者中，75 例（73.53%）符合 NMPA 批准适应证，11 例（10.78%）符合 CSCO 指南推荐其他用法，16 例（15.69%）为不符合药品说明书或指南适应证用药（见表 2）。

表 1　102 例患者基本情况

Tab 1　Basic information of 102 patients

临床资料	例数 [*n*（%）]	临床资料	例数 [*n*（%）]
性别		肿瘤类型	
男	70（68.63）	食管癌	40（39.22）
女	32（31.37）	肺癌	31（30.39）
年龄 / 岁		肝癌	14（13.73）
＜ 60	35（34.31）	恶性黑色素瘤	2（1.96）
≥ 60	67（65.69）	直肠癌	3（2.94）
合并基础疾病		胃癌	2（1.96）
是	51（50.00）	淋巴瘤	1（0.98）
否	51（50.00）	宫颈癌	2（1.96）
治疗疗程 / 次		子宫内膜癌	3（2.94）
≤ 3	41（40.20）	鼻咽癌	2（1.96）
4 ～ 10	43（42.16）	结直肠癌	1（0.98）
11 ～ 20	14（13.73）	卵巢癌	1（0.98）
≥ 21	4（3.92）	联合用药	
治疗类型		免疫单药	19（18.63）
一线	68（66.67）	免疫联合化疗	65（63.73）
二线	18（17.65）	免疫联合放疗	1（0.98）
三线及以上	16（15.69）	免疫联合抗血管药物	17（16.67）

表 2　卡瑞利珠单抗临床应用评价

Tab 2　Evaluation of the clinical use of camrelizumab

临床应用	诊断	例数 [*n*（%）]	总计 [*n*（%）]
符合 NMPA 批准适应证	肝细胞癌二线	5（4.90）	75（73.53）
	非鳞状非小细胞肺癌联合化疗一线	19（18.63）	
	食管鳞癌二线	6（5.88）	
	鼻咽癌联合化疗一线	2（1.96）	
	食管鳞癌联合化疗一线	34（33.33）	
	鳞状非小细胞肺癌联合化疗一线	9（8.82）	
符合 CSCO 指南推荐适应证	晚期肝细胞癌一线	9（8.82）	11（10.78）
	肢端黑色素瘤二线	1（0.98）	
	肢端黑色素瘤一线	1（0.98）	
不符合药品说明书 / 指南适应证	皮肤黑色素瘤一线	1（0.98）	16（15.69）
	胃癌二线及以上	2（1.96）	
	小细胞肺癌一线	1（0.98）	
	宫颈癌二线及以上	2（1.96）	
	子宫内膜癌	3（2.94）	
	结直肠癌一线（未检测 MMR）	1（0.98）	
	直肠癌一线 / 二线（未检测 MMR）	2（1.96）	
	B 细胞淋巴瘤二线	1（0.98）	
	EGFR 或 *ALK* 基因突变阳性的转移性肺腺癌一线	2（1.96）	
	卵巢癌一线	1（0.98）	

2.3　用法用量情况

用法用量不适宜的患者中，62 例存在不同程度延长给药间隔情况，43 例因经济等原因放弃治疗，42 例化疗先于卡瑞利珠单抗给药（见表 3）。

表 3　卡瑞利珠单抗用法用量不适宜情况

Tab 3　Inappropriate use of camrelizumab

用法用量不适宜情况	例数 [*n*（%）]	主要问题
用量不适宜	9（8.82）	肝癌免疫单药或联合化疗按照 200 mg 给药
用法不适宜	62（60.78）	延长给药间隔
预处理不适宜	10（9.80）	用药前行异丙嗪处理
给药顺序不适宜	42（41.18）	化疗先于免疫治疗
无故中断治疗	43（42.16）	患者因经济等原因放弃治疗

2.4　用药安全性情况

102 例患者用药过程中 ADR 发生率为 60.78%（62/102）。十分常见的不良反应是白细胞减少（21 例，20.59%）、反应性皮肤毛细血管增生症（reactive cutaneous capillary endothelial proliferation，RCCEP）（20 例，19.60%）、甲状腺功能减退（20 例，19.60%）（见表 4）。≥ 3 级的不良反应 12 例（11.76%）：白细胞减少 4 例（3.92%）、瘙痒 2 例（1.96%）、皮疹 2 例（1.96%）、毛细血管扩张 1 例（0.98%）、ICIs 相关肺炎（checkpoint inhibitor pneumonitis，CIP）1 例（0.98%）、血红蛋白减少 1 例（0.98%）、谷草转氨酶（AST）升高 1 例（0.98%）。其中 2 例患者停止免疫治疗，分别是 3 级瘙痒及发生 CIP 患者，无死亡病例发生。发生的罕见 ADR 是毛细血管扩张症和银屑病（各 1 例），患者均经对症处理后好转并继续治疗。

3　讨论

3.1　超适应证用药分析

真实世界中的免疫治疗多为中晚期肿瘤患者，而新的适应证申报审批存在滞后性，因此往往存在超说明书用药情况。本研究中共有 16 例为不符合药品说明书或指南适应证用药。包括用于皮肤黑色素瘤、胃癌、小细胞肺癌、宫颈癌等。

2021 年美国临床肿瘤学会（ASCO）会议上公布卡瑞利珠单抗联合阿帕替尼用于晚期肢端黑色素瘤Ⅱ期临床数据（NCT03955354）[4]，基于本研究结果，CSCO 指南 [5] Ⅲ级推荐该方案用于一线晚期肢端黑色素瘤（无脑转移），但尚无卡瑞利珠单抗用于皮肤黑色素瘤的临床研究，因此指南未推荐卡瑞利珠单抗用于皮肤黑色素瘤。ICIs 用于胃癌的治疗效果总体欠佳，在晚期三线胃癌或食管胃结合部腺癌中，纳武利尤单抗是 NMPA 批准首个治疗晚期胃癌的 ICIs。卡瑞利珠单抗用于晚期胃癌的治疗目前仅有小样本临床研究 [6]，尚未获得 CSCO 指南推荐。

对于广泛期小细胞肺癌的 ICIs 一线治疗，卡瑞利珠单抗联合阿帕替尼的临床试验为Ⅱ期研

表 4　患者发生不良反应情况及相关性评价

Tab 4　Adverse reactions in patients and evaluation

累及器官 / 系统	临床表现（*n*）	例数 [*n*（%）]	≥ 3 级 [*n*（%）]	ADR 相关性评价（可能 / 很可能 / 肯定，*n*）
血液系统	白细胞减少（21），血红蛋白减少（8），血小板减少（6）	35（34.31）	5（4.90）	28/7/0
免疫系统	输液反应（1）	1（0.98）		0/0/1
呼吸系统	免疫相关性肺炎（1）	1（0.98）	1（0.98）	0/1/0
内分泌系统	甲状腺功能检查异常（8），甲状腺功能减退（20）	28（27.45）		0/28/0
代谢和营养	食欲下降（2），低蛋白血症（1），低钠血症（1），低钾血症（7）	7（6.86）		5/2/0
消化系统	腹泻（2），恶心（5），呕吐（5）	12（11.76）		12/0/0
肝脏	AST 升高（5），谷丙转氨酶（ALT）升高（5），血胆红素升高（1）	11（10.78）	1（0.98）	7/4/0
皮肤组织	RCCEP（20），皮疹（6），瘙痒（5），白癜风（1），毛细血管扩张症（1），银屑病（1），皮炎（1）	32（31.37）	5（4.90）	0/32/0
感染和侵染	感染性肺炎（14），上呼吸道感染（1），尿路感染（1）	16（15.69）		16/0/0
全身性疾病	水肿（1）	1（0.98）		0/1/0
其他实验室检查	凝血酶原时间延长（1），心电图结果异常（5）	6（5.88）		5/1/0

究[7]，虽显示出了抗肿瘤活性，但局限于化疗敏感亚组的样本量小，因此未得到指南推荐。类似的还有宫颈癌、B 细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、卵巢癌，均只有小样本Ⅱ期临床试验或回顾性研究[8-11]，由于此类临床研究循证医学证据级别较低，无预期性治疗结果，一般只做探索性治疗。因此笔者认为不能作为超说明书用药的可靠依据。

ICIs 用于微卫星高度不稳定（microsatellite instability-high，MSI-H）或错配修复缺陷（mismatch repair deficient，dMMR）的结直肠癌患者有明显获益[12]。本研究中应用卡瑞利珠单抗的 3 例结直肠癌患者均未行微卫星状态的检查，而微卫星稳定或错配修复完整的结直肠癌应用 ICIs 治疗的临床研究正在进行中，缺少数据支持，ICIs 不能替代传统治疗。由此可见，本研究中 16 例不符合药品说明书或指南适应证用药的安全性和有效性缺少成熟的临床数据支持。由于不同药物的临床研究之间存在异质性，笔者认为不同 ICIs 之间替换治疗、适应证互换不合理。

3.2　用法用量分析

用法用量不适宜主要表现在给药顺序、延长给药间隔以及无故中断治疗等。关于糖皮质激素（glucocorticoids，GCs）是否影响 ICIs 疗效，目前有临床试验[13]表明免疫治疗前短期常规给予 GCs 用于化疗前预处理未对患者的总生存期（overall survival，OS）和无进展生存期（progression-free survival，PFS）产生影响，相较于单纯化疗疗效仍然显著，由此可见免疫联合化疗时 GCs 用于化疗预处理是合理的。卡瑞利珠单抗用于肝癌治疗时的给药方式有两种，根据相关药物临床试验，卡瑞利珠单抗单药治疗或联合化疗时按照 3 mg • kg^{-1} 给药，联合阿帕替尼则按照 200 mg 固定剂量给药[14-16]，因此本研究中将免疫单药或联合化疗按照 200 mg 给药视为不合理。此外，有患者存在延长给药间隔或中断治疗的问题，经调研患者在出院时医师嘱咐按照相应的时间入院治疗，但有些患者存在经济问题、身体评估未达标、合并症、异地就医等主客观因素不能按时按期完成治疗。

3.3　用药安全性分析

ICIs 通过调控免疫应答发挥杀伤肿瘤细胞作用，因此过度活化的免疫细胞也可能导致机体产生自身免疫损伤引起免疫相关性不良反应（immune-related adverse events，irAEs），常累及皮肤、内分泌、肝脏等器官或组织[17]。本研究中卡瑞利珠单抗注射液 ADR 总发生率为 60.78%，低于说明书中的 94.2%，经调研与病案记录不全及未及时行毒性监测有关。

皮肤毒性是本研究中最常见的 irAEs（62/102），其中 RCCEP 发生率为 19.60%，平均发生在用药后 3 ～ 4 个周期，发生率较低的主要原因考虑与 80.39% 的患者联合化疗或抗血管生成药物相关。在一项关于卡瑞利珠单抗用于鼻咽癌的Ⅰ期临床研究中，研究者认为化疗药物抑制了过度增殖的毛细血管内皮细胞是 RCCEP 发生率降低可能的机制[18]。此外，抗血管生成药物可以通过抑制 VEGF-VEGFR 信号通路降低毛细血管密度，从而降低 RCCEP 发生率[19]。本研究中有 3 例患者发生 3 级瘙痒皮疹，暂停 ICIs 治疗并给予抗组胺药及 GCs 处理后好转。另外有 2 例罕见的皮肤 irAEs，分别是毛细血管扩张症及银屑病。

甲状腺功能减退发生率为 19.60%，与说明书报告相符。对于发生任意级别的甲状腺功能减退无需暂停治疗，1 级可每 4 ～ 6 周监测甲状腺功能，2 ～ 4 级可给予左甲状腺素长期补充治疗[3]。本研究中发现有 2 例患者因持续性甲状腺功能减退暂停治疗，

提示我们应正确处理 irAEs，以免影响 ICIs 的疗效。

本研究还发现 1 例免疫联合化疗的肺癌患者发生 CIP，经激素、吸氧、解痉平喘处理后好转，后未再接受免疫治疗。有研究显示，在 ICIs 治疗相关的总体死亡率中以 CIP 引起的死亡最为常见（23/82，28.0%）[20]，且由于缺乏典型的影像学表现和特异性的临床症状导致 CIP 难以做到早发现和及时处理，因此临床医师需要对 CIP 提高警惕和关注。

4　小结

本研究通过分析本院卡瑞利珠单抗的临床应用，发现存在超说明书用药、用法用量不合理、irAEs 发生率高的问题，在一定程度上反映了真实世界中的用药情况。但同时存在局限性，因免疫治疗临床研究日新月异，而回顾性研究非实时监测，且基于当前的标准评价，因此可能会对结果产生一定偏倚，即造成用药合理性结果偏高，ADR 发生率偏低。此外，医院行政部门及临床应加强超说明书用药和 irAEs 管理。临床药师应更多地参与到患者治疗中，全程监护患者的用药，定期开展抗肿瘤药物超说明书用药点评，以期共同提高用药合理性和安全性。

参考文献

[1] Mo H，Huang J，Xu J，et al. Safety，anti-tumour activity，and pharmacokinetics of fixed-dose SHR-1210，an anti-PD-1 antibody in advanced solid tumours：a dose-escalation，phase 1 study [J]. Bri J Cancer，2018，119（5）：538-545.

[2] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南（2021）[M]. 北京：人民卫生出版社，2021.

[3] US Department of Health and Human Services. Common terminology criteria for adverse events（CTCAE）version 5.0 [EB/OL].（2017-02-25）[2023-2-1]. https：//academy. myeloma. org. uk/wp-content/uploads/2015/04/CTCAE_v5. pdf.

[4] Wang X，Cui C，Lian B，et al. Apatinib in combination with camrelizumab，a humanized immunoglobulin G4 monoclonal antibody against programmed cell death-1，in patients with metastatic acral melanoma [J]. J Clin Oncol，2021，39（15_suppl）：9539-9539.

[5] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 黑色素瘤诊疗指南（2022）[M]. 北京：人民卫生出版社，2022.

[6] Peng Z，Wei J，Wang F，et al. Camrelizumab combined with chemotherapy followed by camrelizumab plus apatinib as first-line therapy for advanced gastric or gastroes ophageal junction adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res，2021，27（11）：3069-3078.

[7] Fan Y，Zhao J，Wang QM，et al. Camrelizumab plus apatinib in extensive-stage SCLC（PASSION）：a multicenter，two-stage，phase 2 trial [J]. J Thorac Oncol，2021，16（2）：299-309.

[8] Lan CY，Shen JX，Wang Y，et al. Camrelizumab plus apatinib in patients with advanced cervical cancer（CLAP）：a multicenter，open-label，single-arm，phase Ⅱ trial [J]. J Clin Oncol，2020，38（34）：4095-4106.

[9] Mei Q，Zhang WY，Liu Y，et al. Camrelizumab Plus gemcitabine，vinorelbine，and pegylated liposomal doxorubicin in relapsed/refractory primary mediastinal B-cell lymphoma：a single-arm，open-label，phase Ⅱ trial [J]. Clin Cancer Res，2020，26（17）：4521-4530.

[10] Liu H，Niu SH，Fang ZH，et al. 185 Camrelizumab monotherapy or combination therapy in patients with recurrent or metastatic cervical and endometrial carcinoma：a retrospective study [J]. J Immunother Cancer，2020，8（Suppl 3）：A199-A199.

[11] Xia LF，Peng J，Lou G，et al. Antitumor activity and safety of camrelizumab plus famitinib in patients with platinum-resistant recurrent ovarian cancer：results from an open-label，multicenter phase 2 basket study [J]. J Immunother Cancer，2022，10（1）：e003831.

[12] Le DT，Uram JN，Wang H，et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency [J]. N Engl J Med，2015，372（26）：2509-2520.

[13] Paz-Ares L，Luft A，Vicente D，et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer [J]. N Eng J Med，2018，379（21）：2040-2051.

[14] Qin SK，Ren ZG，Meng ZQ，et al. Camrelizumab in patients with previously treated advanced hepatocellular carcinoma：a multicentre，open-label，parallel-group，randomised，phase 2 trial [J]. Lancet Oncol，2020，21（4）：571-580.

[15] Qin SK，Chen ZD，Liu Y，et al. A phase Ⅱ study of anti-PD-1 antibody camrelizumab plus FOLFOX4 or GEMOX systemic chemotherapy as first-line therapy for advanced hepatocellular carcinoma or biliary tract cancer [J]. J Clin Oncol，2019，37（s）：abstract 4074.

[16] Xu JM，Zhang Y，Jia R，et al. Anti-PD-1 antibody SHR-1210 combined with apatinib for advanced hepatocellular carcinoma，gastric，or esophagogastric junction cancer：an open-label，dose escalation and expansion study [J]. Clin Cancer Res，2019，25（2）：515-523.

[17] Sanchez K，Page DB，Urba W. Immunotherapy toxicities [J]. Surg Oncol Clin N Am，2019，28（3）：387-401.

[18] Fang WF，Yang YP，Ma YX，et al. Camrelizumab（SHR-1210）alone or in combination with gemcitabine plus cisplatin for nasopharyngeal carcinoma：results from two single-arm，phase 1 trials [J]. Lancet Oncol，2018，19（10）：1338-1350.

[19] Rispoli M，Savastano MC，Lumbroso B. Quantitative vascular density changes in choriocapillaris around CNV after anti-VEGF treatment：dark halo [J]. Ophthalmic Su-rg Lasers Imaging Retina，2018，49（12）：918-924.

[20] De Velasco G，Je Y，Bosse D，et al. Comprehensive meta analysis of key immune-related adverse events from CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitors in cancer patients [J]. Cancer Immunol Res，2017，5（4）：312-318.

（收稿日期：2023-02-24；修回日期：2023-04-19）

治疗革兰氏阳性菌感染重症患者替考拉宁安全浓度范围的探讨

郑灵招[1]，林小青[1]，温悦[1]，黄本润[1, 2]，欧阳华[1, 2*]（1. 厦门大学附属中山医院药学部，福建　厦门　361004；2. 福建医科大学药学院，福州　350000）

摘要：目的　研究革兰氏阳性菌感染的重症患者使用替考拉宁的血药谷浓度（C_{min}）与疗效和安全性的关系，摸索替考拉宁治疗的最佳安全有效血药浓度范围。**方法**　回顾性收集 2019 年 1 月—2020 年 12 月使用替考拉宁治疗革兰氏阳性菌感染的重症患者的相关临床数据，通过 Medcalc 18.2.1 和 SPSS 26.0 软件绘制受试者工作特征（ROC）曲线、Kaplan-Meier 曲线及分组分析比较探讨最佳安全有效浓度范围。**结果**　收集的 247 例样本中，临床有效率及细菌学有效率均为 65.18%，替考拉宁 C_{min} 与临床疗效、细菌学疗效、肝毒性及肾毒性相关性显著；替考拉宁 $C_{min} \geqslant 15$ mg • L^{-1} 患者有效率（临床有效率与细菌学有效率）均显著高于 $C_{min} < 15$ mg • L^{-1} 的患者（$\chi^2 = 14.69$，$P < 0.001$；$\chi^2 = 9.84$，$P = 0.002$），并且 $C_{min} \geqslant 15$ mg • L^{-1} 的临床有效率与 $C_{min} \geqslant 10$ mg • L^{-1} 比较差异有统计学意义（$\chi^2 = 4.71$，$P = 0.030$）；当替考拉宁 $C_{min} \geqslant 27.70$ mg • L^{-1} 时，患者更易发生肝毒性（$AUC = 0.852$，$P < 0.001$），当替考拉宁 $C_{min} \geqslant 30.53$ mg • L^{-1} 时，患者更易发生肾毒性（$AUC = 0.749$，$P = 0.001$）；< 25 mg • L^{-1} 组发生肝、肾毒性的风险显著低于≥ 25 mg • L^{-1} 组（肝：$\chi^2 = 59.95$，$P < 0.001$；肾：$\chi^2 = 47.05$，$P < 0.001$），肝毒性中位发生时间为第 9 日，肾毒性中位发生时间为第 7 日。**结论**　替考拉宁血药浓度维持在 15 ～ 25 mg • L^{-1} 时临床疗效好，肝肾毒性发生风险低，对使用替考拉宁革兰氏阳性菌感染重症患者临床精准用药调整具有重要参考价值。

关键词：替考拉宁；革兰氏阳性菌感染；疗效；不良反应；安全浓度范围
中图分类号：R978.1，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2766-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.035

Safe concentration range of teicoplanin for patients with severe gram-positive bacterial infection

ZHENG Ling-zhao[1], LIN Xiao-qing[1], WEN Yue[1], HUANG Ben-run[1, 2], OU-YANG Hua[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University*, *Xiamen*　*Fujian* 361004; 2. *School of Pharmacy*, *Fujian Medical University*, *Fuzhou*　350000)

Abstract: Objective　To determine the relationship between the serum trough concentration (C_{min}) and efficacy and safety of teicoplanin in critically ill patients with gram-positive bacterial infection, and to explore the safe and effective blood concentration range for teicoplanin treatment. **Methods**　We retrospectively collected the clinical data related to critically ill patients with gram-positive infections treated with teicoplanin from January 2019 to December 2020. The safe and effective concentration range was determined with the subject operating characteristic (ROC) curves, Kaplan-Meier curves and group analysis by Medcalc 18.2.1 and SPSS 26.0 software. **Results**　The clinical efficiency and bacteriological efficiency were 65.18% in the 247 samples collected, and teicoplanin C_{min} was much associated with the clinical efficacy, bacteriological efficacy, hepatotoxicity and nephrotoxicity. Patients with $C_{min} \geqslant 15$ mg • L^{-1} had significantly higher clinical efficiency and bacteriological efficiency than those with $C_{min} < 15$ mg • L^{-1} ($\chi^2 = 14.69$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 9.84$, $P = 0.002$). The clinical effective rate of $C_{min} \geqslant 15$ mg • L^{-1} was statistically different from $C_{min} \geqslant 10$ mg • L^{-1} ($\chi^2 = 4.71$,

作者简介：郑灵招，女，硕士，主要从事临床药学研究，email：1002619386@qq.com　*通信作者：欧阳华，女，硕士，主任药师，主要从事临床药学和医院药学方面的研究，email：oyh820@126.com

$P = 0.030$). Patients were more likely to suffer hepatotoxicity when $C_{min} \geqslant 27.70$ mg • L^{-1} ($AUC = 0.852$, $P < 0.001$) and nephrotoxicity when $C_{min} \geqslant 30.53$ mg • L^{-1} ($AUC = 0.749$, $P = 0.001$). The risk of hepatotoxicity and nephrotoxicity was significantly lower in group < 25 mg • L^{-1} than that in group ⩾ 25 mg • L^{-1} (liver: $\chi^2 = 59.95$, $P < 0.001$; kidney: $\chi^2 = 47.05$, $P < 0.001$), with a median time of showing hepatotoxicity on day 9 and a median time of nephrotoxicity on day 7. **Conclusion** Good clinical efficacy and low risk of hepatic and renal toxicity are expected C_{min} levels are maintained at 15 ～ 25 mg • L^{-1}, which has important reference value for the clinical precision drug adjustment of in patients with severe gram-positive bacterial infections receiving teicoplanine treatment.

Key words: teicoplanin; gram-positive bacterial infection; efficacy; adverse reaction; safety concentration range

替考拉宁是目前临床上治疗多重耐药金黄色葡萄球菌和肠球菌感染性疾病的首选药物之一，研究发现[1-2]个体间药动学差异显著影响替考拉宁血药浓度，重症感染患者在特殊疾病状态下给予常规剂量下很难达到合适的治疗浓度，如果用量过小会导致治疗失败，而用量过大会产生一定的器官毒性。对于非复杂感染患者的替考拉宁谷浓度（C_{min}）需达到 10 mg • L^{-1} 以上才能达疗效[3]，中度革兰氏阳性菌感染 C_{min} 需维持在 10 ～ 20 mg • L^{-1}，严重感染（包括心内膜炎）C_{min} 需维持在 20 ～ 60 mg • L^{-1}[4]。也有研究[5]推荐对于重症患者替考拉宁 C_{min} 推荐 15 ～ 30 mg • L^{-1}。另外替考拉宁不良反应的发生率与血药浓度相关[6]，但替考拉宁安全浓度范围的上限尚未有充分证据确定，研究报道结果也不一致。Nakamura 等[1]认为在替考拉宁 C_{min} > 28 mg • L^{-1} 时与肝功能的发展有关，Wood 等[7]报道在替考拉宁 C_{min} > 60 mg • L^{-1} 时与血小板减少和肾毒性发生风险增加相关，但尚无足够安全性数据证明。目前安全浓度范围探讨以国外文献居多，国内相关报道较少，涉及样本量也较少[8]，确定革兰氏阳性菌感染重症患者使用替考拉宁的最佳安全浓度范围是亟待解决的重点问题。

本研究通过监测患者替考拉宁 C_{min}，分析 C_{min} 与疗效和安全性的相关性，通过浓度分组及绘制受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve，ROC）探讨患者最佳安全有效的浓度范围，为患者个体化用药提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　研究对象

回顾性收集 2019 年 1 月—2020 年 12 月厦门大学附属中山医院静脉使用替考拉宁患者的临床数据。

入选标准：① 年龄⩾ 18 岁；② 静脉使用替考拉宁；③ 用药疗程⩾ 3 d；④ 确诊或拟诊革兰氏阳性菌感染的重症患者；⑤ 同意对替考拉宁进行血药浓度监测的患者；⑥ 患者对本类药物无过敏反应。排除标准：① 无法获取血样或未获得血药浓度结果；② 病例资料不全的患者；③ 治疗期间缺乏疗效学判断的患者；④ 孕妇、精神病患者和残疾人患者。

1.2　血样采集

根据患者给药方案，采集患者替考拉宁第 5 ～ 7 剂给药前 30 min 的血样（抽取 3 ～ 4 mL 静脉血于含 EDTA 抗凝剂的 60 号采血管中），经样品前处理后，使用 HPLC 进行检测，若无法立即检测，则血样离心后取上清液（即血浆）置于－ 20 ℃保存。

1.3　资料的收集

收集的临床资料包括性别、年龄、身高、体重、体质量指数（BMI）、住院时间、用药疗程、用药方案（负荷剂量与维持剂量）、前 3 d 的平均给药剂量（MID）、血常规、相关炎症指标和肝肾功能指标等。

1.4　替考拉宁浓度分组与药敏试验方法

不同感染类型替考拉宁推荐的有效浓度范围不同，常见质量浓度范围为> 10 mg • L^{-1}、> 15 mg • L^{-1} 或> 20 mg • L^{-1} 等，为进一步探究最佳有效浓度水平，本研究以 5 mg • L^{-1} 为一单位，将质量浓度进行分成 6 组（< 10 mg • L^{-1}，10 ～ 15 mg • L^{-1}，15 ～ 20 mg • L^{-1}，20 ～ 25 mg • L^{-1}，25 ～ 30 mg • L^{-1}，　⩾ 30 mg • L^{-1}）（10 ～ 15 mg • L^{-1} 表示 10 ⩽ C_{min} < 15 mg • L^{-1}，余组类同）。

替考拉宁药敏使用 K-B 法药敏纸片（英国 OXOID 公司产品），结果按美国临床实验室标准化委员会（CLSI）2016 年标准判断，替考拉宁对葡萄球菌及肠球菌 K-B 法抑菌圈直径⩽ 10 mm 为耐药（R），

11 ～ 13 mm 为中介（I），≥ 14 mm 为敏感（S）。

1.5　疗效评价

根据临床疗效评价标准[9]，分为：① 痊愈；② 显效；③ 进步；④ 无效。痊愈、显效判定为治疗有效，并据此计算有效率。根据细菌学疗效评价[9-10]，分为：① 清除；② 细菌交替；③ 部分清除；④ 未清除和假定未清除。本研究的细菌学疗效针对革兰氏阳性菌进行评判，以细菌清除＋细菌交替作为细菌学疗效有效的结果判定。

1.6　安全性评价

不良反应根据嘉禾电子病例系统的临床判定和国家药品不良反应（Adverse Drug Reaction，ADR）中心对 ADR 关联性评价进行筛选，将不良事件与药品的关联性评价分为肯定有关、很可能有关、可能有关、可能无关和肯定无关。前三者视作为与药品可能有关，评价为药物的不良反应。

肾毒性：根据 RIFLE 标准进行急性肾损伤分类[11-12]，肾毒性定义为血肌酐增加超过 0.5 mg • d^{-1} 或比原水平增加 50%。肝毒性：根据《药源性肝损害严重程度评价》[13]定义肝毒性，① 谷丙转氨酶（ALT）≥ 5×ULN（参考值上限）；② 碱性磷酸酶（ALP）≥ 2×ULN [伴随谷氨酰转移酶（GGT）升高且排除骨骼疾病引起 ALP 水平升高]；③ ALT ≥ 3×ULN 同时总胆红素（TBil）≥ 2×ULN。当患者药物治疗前肝脏生化异常时，ULN 为药源性肝损伤发病前获得的平均基线值。药源性血液异常：血小板计数（PLT）减少为 PLT ＜ 100×10^9 • L^{-1}，白细胞（WBC）减少为 WBC ＜ 4×10^9 • L^{-1}；中性粒细胞（NEUT）减少为 NEUT ＜ 2.0×10^9 • L^{-1}。

1.7　统计学方法

使用 SPSS 26.0 统计软件，正态分布采用 *t* 检验偏态分布采用非参数检验，计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验，所有检验均为双侧，P ＜ 0.05 被认为差异具有统计学意义。应用 Medcalc 18.2.1 统计软件绘制受试者工作曲线（ROC 曲线），采用 Kaplan-Meier 曲线探索不同浓度范围发生肝肾毒性的风险。

2　结果

2.1　患者一般信息及临床资料

根据纳排标准共纳入 247 例患者，其中男性 156 例，女性 91 例；平均年龄为（68.45±16.29）岁；平均体质量指数（BMI）（22.21±2.54）kg • m^{-2}；平均住院天数为（24.49±15.45）d；替考拉宁平均用药时间为（9.12±4.83）d；其他生化检查见表 1；合并用药（除抗菌药物其他根据合并药物排名前 5 展示）与血药浓度相关性见表 2。

2.2　用药方案

患者用药方案中以负荷剂量 400 mg q12h×3 次，维持剂量 400 mg qd 的方案最常见，有 103 例（41.70%）；负荷剂量 600 mg q12h×3 次，维持剂量 600 mg qd 的方案，有 33 例（13.36%）；未予以负荷剂量的患者有 10 例（4.05%），见表 3。

2.3　微生物检测结果

247 例患者中，检出 53 株金黄色葡萄球菌；51 株凝固酶阴性葡萄球菌；42 株粪肠球菌；27 株屎肠球菌；其中药敏检测数为 164 株（66.40%），替考拉宁耐药菌共 6 株，中介菌 13 株，敏感菌 145 株，见表 4。

2.4　替考拉宁不同浓度组分布情况

247 例患者中 69 例（27.94%）患者替考拉宁 C_{min} ＜ 10 mg • L^{-1}，171 例（69.23%）患者 C_{min} 在 10 ～ 30 mg • L^{-1} 内，C_{min} ≥ 30 mg • L^{-1} 的患者仅 7 例（2.83%），替考拉宁平均 C_{min} 为（14.05±6.85）mg • L^{-1}，其中最低浓度为 3.5 mg • L^{-1}，最高浓度为 40.49 mg • L^{-1}。不同浓度范围组间的临床有效率（χ^2 ＝ 7.27，P ＝ 0.007）和细菌学有效率（χ^2 ＝ 25.95，P ＜ 0.001）差异均有统计学意义，见表 5。

2.5　替考拉宁不同浓度组间有效率对比

在临床有效率中，C_{min} ＜ 10 mg • L^{-1} 组与其他五组差异都有统计学意义（P ＜ 0.05），C_{min} 10 ～ 15 mg • L^{-1} 组的临床有效率与 C_{min} 15 ～ 20 mg • L^{-1} 组差异也有统计学意义（P ＝ 0.009），其余组间差异皆无统计学意义，见图 1A；在细菌学有效率中，除了 C_{min} ≥ 30 mg • L^{-1} 组与 C_{min} ＜ 10 mg • L^{-1} 组有效率差异无统计学意义，其余四组均与 C_{min} ＜ 10 mg • L^{-1} 组差异都有统计学意义（P ＜ 0.05），见图 1B。

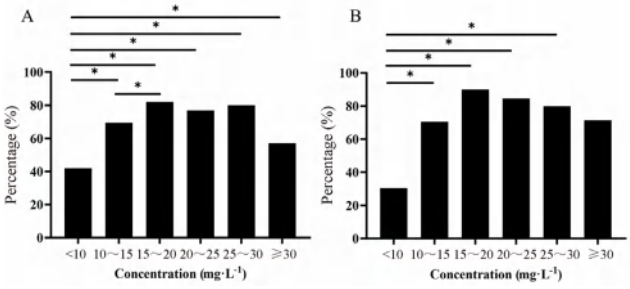


图 1　不同血药浓度组间临床有效率（A）和细菌学有效率（B）的对比（$^*P$ ＜ 0.05）

Fig 1　Clinical effective rate（A）and bacteriological efficiency（B）between groups of different blood concentrations（$^*P$ ＜ 0.05）

2.6　替考拉宁最佳有效浓度

通过卡方分析发现替考拉宁 C_{min} ≥ 15 mg • L^{-1}

表 1　患者一般情况与实验室检查

Tab 1　Basic information and laboratory examination

项目	数值	中位数	范围
性别（男 / 女）	156/91	/	/
年龄 / 岁	68.45±16.29	71.00	24.00 ～ 99.00
身高 /cm	164.00±5.90	164.00	145.00 ～ 190.00
体重 /kg	59.97±7.87	60.00	35.50 ～ 88.00
体质量指数 /（kg • m^{-2}）	22.21±2.54	22.31	13.57 ～ 30.82
住院时长 /d	24.49±15.45	22.00	4.00 ～ 108.00
用药疗程 /d	9.12±4.83	8.00	2.00 ～ 25.00
合并慢病数量	2.85±1.62	3.00	0.00 ～ 7.00
前 3 d 平均给药剂量 /mg	637.47±180.81	600.00	160.00 ～ 1333.33
谷浓度 /（mg • L^{-1}）	14.05±6.85	12.40	3.50 ～ 40.49
白蛋白 /（g • L^{-1}）	30.24±6.79	29.80	8.35 ～ 106.40
总胆红素 /（μmol • L^{-1}）	23.75±32.58	15.10	3.90 ～ 304.20
谷丙转氨酶 /（U • L^{-1}）	46.66±105.53	25.40	3.00 ～ 1234.30
谷草转氨酶 /（U • L^{-1}）	65.14±148.16	32.10	4.80 ～ 1399.20
碱性磷酸酶 /（U • L^{-1}）	145.72±163.42	106.00	31.00 ～ 1817.20
血尿素氮 /（mmol • L^{-1}）	14.93±47.47	9.17	0.87 ～ 744.20
肌酐清除率 /（mg • L^{-1}）	69.37±58.48	55.64	4.46 ～ 391.92
肾小球滤过率 /[mL/（min • 1.73 m^{-2}）]	69.51±40.59	76.66	3.83 ～ 198.59
白细胞计数 /（×10^9 • L^{-1}）	13.96±8.62	12.35	0.13 ～ 53.12
中性粒细胞计数 /（×10^9 • L^{-1}）	11.90±7.76	10.47	0.03 ～ 39.81
血小板计数 /（×10^9 • L^{-1}）	203.13±127.49	194.00	12.00 ～ 959.00
C 反应蛋白 /（mg • L^{-1}）	120.01±87.75	104.31	0.95 ～ 430.23
红细胞沉降率 /（mm • h^{-1}）	56.80±33.10	55.95	0.40 ～ 129.00
降钙素原 /（ng • L^{-1}）	5.80±16.20	0.77	0.02 ～ 100.00

表 2　合并用药与血药浓度相关性分析

Tab 2　Analysis of the correlation between combined drug use and blood concentration

合并药物	有	无	r	P 值
碳青霉烯类抗菌药	134	113	0.15	0.092
头孢类抗菌药	63	184	0.03	0.636
青霉素类抗菌药	48	199	0.064	0.313
喹诺酮类抗菌药	29	218	0.022	0.733
抗真菌药	95	152	－0.08	0.21
非甾体抗炎药	86	161	0.003	0.957
袢利尿剂	158	89	0.044	0.49
糖皮质激素	126	121	0.101	0.112
质子泵抑制剂	168	79	－0.004	0.968

表 3　患者用药方案信息

Tab 3　Medication program information

负荷剂量	维持剂量（mg）	数量	百分比 /%
200 mg q12h×3	200/400	6	2.43
400 mg q12h×3	400	103	41.70
	200/600/800	7	2.83
400 mg q12h×（5 ～ 8）	400	37	14.98
600 mg q12h×3	200/400	11	4.45
	600	33	13.36
800 mg q12h×3	800	12	4.86
无负荷剂量（qd）	/	10	4.05
其他给药方案	/	28	11.34

表 4　部分革兰氏阳性球菌检查结果

Tab 4　Partial gram-positive cocci test results

微生物检测菌种	菌株	药敏检测数 [n（%）]	筛查结果		
			S	I	R
金黄色葡萄球菌	53	40（75.47）	37	2	1
凝固酶阴性葡萄球菌	51	34（66.67）	31	2	1
屎肠球菌	27	18（66.67）	13	3	2
粪肠球菌	42	30（71.43）	28	2	0
肺炎链球菌	18	8（44.44）	7	1	0
其他革兰氏阳性球菌	56	34（60.71）	29	3	2
总计	247	164（66.40）	145	13	6

患者有效率（临床有效率 86.02%；细菌学有效率 77.42%）均显著高于 C_{min} ＜ 15 mg • L^{-1} 的患者（χ^2 ＝ 14.69，P ＜ 0.001；χ^2 ＝ 9.84，P ＝ 0.002），C_{min} ≥ 15 mg • L^{-1} 的临床有效率与 C_{min} ≥ 10 mg • L^{-1} 差异有统计学意义（χ^2 ＝ 4.71，P ＝ 0.030），见表 6。

2.7　血药浓度与安全性的关系

2.7.1　替考拉宁血药浓度与不良反应相关性　发生肝毒性的有 18 例（7.29%）；发生肾毒性的有 20 例（8.10%）；血药浓度与肾毒性及肝毒性显著相关（P ＜ 0.001），而与 WBC 减少、PLT 减少和 NEUT 减少无显著相关性（P ＞ 0.05），见表 7。

表 5　不同浓度分组疗效的关系 [*n*(%)]

Tab 5　Relationship between the efficacy of different concentration groups [*n*(%)]

C_{min}/（mg • L^{-1}）	总计	临床有效率				细菌学有效率			
		有效	无效	χ^2	*P*	有效	无效	χ^2	*P*
＜ 10	69（27.94）	21（30.43）	48（69.57）	7.27	0.007	29（42.03）	40（57.97）	25.95	＜ 0.001
10 ～ 15	85（34.41）	60（70.59）	25（29.31）			59（69.42）	26（30.58）		
15 ～ 20	50（20.24）	45（90.00）	5（10.00）			41（82.00）	9（18.00）		
20 ～ 25	26（10.53）	22（84.61）	4（15.39）			20（76.92）	6（23.08）		
25 ～ 30	10（4.05）	8（80.00）	2（20.00）			8（80.00）	2（20.00）		
≥ 30	7（2.83）	5（71.43）	2（28.57）			4（57.14）	3（42.86）		
总计	247（100.00）	161（65.18）	86（34.82）	/	/	161（65.18）	86（34.82）	/	/

表 6　不同浓度组的有效率对比

Tab 6　Comparison of effective rates of different concentration groups

C_{min}/（mg • L^{-1}）	总计（*n* ＝ 247）	临床有效率				细菌学有效率			
		有效	无效	χ^2	*P*	有效	无效	χ^2	*P*
≥ 15	93	80	13	14.69	＜ 0.001	72	21	9.84	0.002
＜ 15	154	81	73			89	65		
≥ 10	178	140	38	4.71	0.030	128	49	0.83	0.363
≥ 15	93	80	13			72	21		

表 7　不同浓度组的不良反应分布 [*n*(%)]

Tab 7　Distribution of adverse reactions in different concentration groups [*n*(%)]

C_{min}/（mg • L^{-1}）	总计	不良反应					总不良反应
		肝毒性	肾毒性	白细胞减少	血小板减少	中性粒细胞减少	
＜ 10	69	1（1.45）	3（4.35）	4（5.80）	7（10.14）	3（4.35）	16（23.19）
10 ～ 15	85	2（2.35）	3（3.53）	7（8.24）	12（14.12）	3（3.53）	20（24.39）
15 ～ 20	50	2（4.00）	2（4.00）	5（10.00）	8（16.00）	3（6.00）	13（26.00）
20 ～ 25	26	3（11.54）	4（15.38）	1（3.85）	1（3.85）	0（0.00）	8（30.77）
25 ～ 30	10	4（40.00）	5（50.00）	1（10.00）	3（30.00）	1（10.00）	3（30.00）
≥ 30	7	4（57.14）	3（42.86）	0（0.00）	3（42.86）	0（0.00）	5（71.43）
总计	247	18（7.29）	20（8.10）	18（7.29）	34（13.77）	10（4.05）	65（26.32）
r	/	0.342	0.412	－ 0.055	－ 0.002	－ 0.025	0.300
P	/	＜ 0.001	＜ 0.001	0.391	0.970	0.698	＜ 0.001

2.7.2　替考拉宁发生肝、肾毒性的临界值　将肝、肾毒性的发生情况与血药浓度通过 ROC 曲线分析，结果显示，当替考拉宁 C_{min} ≥ 27.70 mg • L^{-1} 时，患者更易发生肝毒性（*AUC* ＝ 0.852，*P* ＜ 0.001），敏感度为 81.25%，特异性为 79.22%；当替考拉宁 C_{min} ≥ 30.53 mg • L^{-1} 时，患者更易发生肾毒性（*AUC* ＝ 0.749，*P* ＝ 0.001），敏感度为 63.20%，特异性为 87.70%，见图 2。

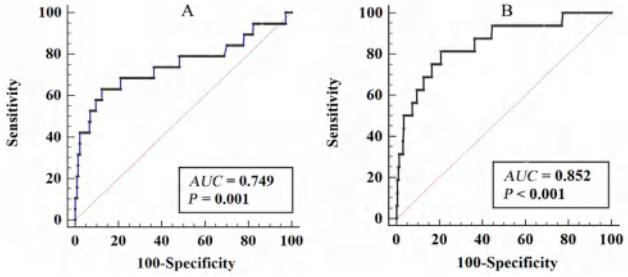


图 2　血药浓度与肾毒性（A）及肝毒性（B）的相关性的 ROC 曲线图

Fig 2　ROC curves of the correlation between blood drug concentration and nephrotoxicity（A）and hepatotoxicity（B）

2.7.3　替考拉宁不同浓度范围的安全性比较　将替考拉宁不同浓度范围组间的肝、肾毒性发生率进行分析，结果发现＜ 10 mg • L^{-1}、10 ～ 15 mg • L^{-1}、15 ～ 20 mg • L^{-1} 及 20 ～ 25 mg • L^{-1} 组的肝、肾毒性发生率与 25 ～ 30 mg•L^{-1} 及≥ 30 mg • L^{-1} 组差异都有统计学意义（*P* ＜ 0.05），25 ～ 30 mg • L^{-1} 与≥ 30 mg • L^{-1} 组间肝、肾毒性的发生率差异无统计学意义（*P* ＞ 0.05），表明当替考拉宁达 25 mg • L^{-1} 及其以上浓度时，患者发生肝、肾毒性发生率显著高于其他低浓度组，见图 3。基于此将患者分为＜ 25 mg • L^{-1} 与≥ 25 mg • L^{-1} 组，采用 Kaplan-Meier 风险函数继以分析验证＜ 25 mg • L^{-1} 组安全性是否更佳，结果发现＜ 25 mg • L^{-1} 组发生肝、肾毒性的风险显著低于≥ 25 mg • L^{-1} 组（肝：χ^2 ＝ 59.95，*P* ＜ 0.001；肾：χ^2 ＝ 47.05，*P* ＜ 0.001），见图 4。另外将肝、肾毒性的发生情况与发生时间进行分析，发现肝

毒性中位发生时间为第 9 日，肾毒性中位发生时间为第 7 日。

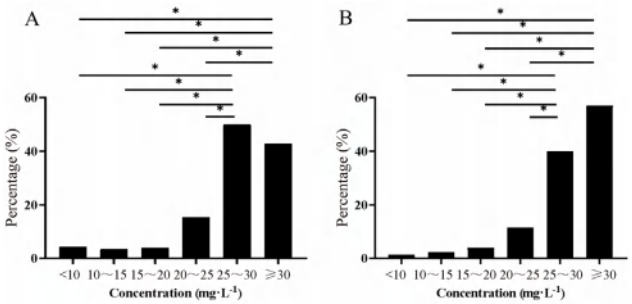


图 3　不同浓度组间肾毒性（A）和肝毒性（B）发生率比较

Fig 3　Incidence of nephrotoxicity（A）and hepatotoxicity（B）among different concentration groups

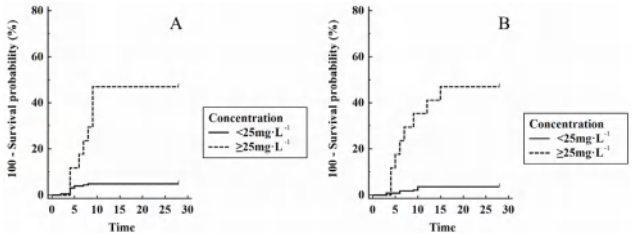


图 4　不同浓度组间的肾毒性（A）与肝毒性（B）的 Kaplan-Meier 风险函数图

Fig 4　Kaplan-Meier risk function of nephrotoxicity（A）and hepatotoxicity（B）between different concentration groups

3　讨论

由于重症患者病理情况复杂，个体差异较大，替考拉宁的临床使用很难到达目标浓度，故监测替考拉宁血药浓度以维持适当的 C_{min} 对保证临床治疗效果至关重要 [14-15]。相关研究显示 [16-17]，金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌和粪肠球菌对替考拉宁的耐药率均较低，与本文结果相近，由此可知明确感染病原菌有助于挑选合适的抗菌药品，对及时控制感染意义重大。

本研究中不同浓度范围组间的临床有效率和细菌学有效率差异均有统计学意义，为保证替考拉宁的临床疗效，《替考拉宁临床应用剂量专家共识》中 [18] 对多数革兰氏阳性菌感染患者推荐为 C_{min} ＞ 10 mg • L^{-1}，本研究通过组内卡方分析发现 C_{min} ≥ 15 mg • L^{-1} 组的临床有效率显著高 于 C_{min} ＜ 15 mg • L^{-1} 和 C_{min} ≥ 10 mg • L^{-1} 组，虽然针对 C_{min} ≥ 15 mg • L^{-1} 组和 C_{min} ≥ 10 mg • L^{-1} 组对替考拉宁重症患者疗效的对比研究非常有限，但国外已有研究认为对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）患者替考拉宁有效浓度应推荐到 15 mg • L^{-1}，且认为替考拉宁初始 C_{min} ≥ 15 mg • L^{-1} 是临床治疗成功的独立因素 [19]，也有研究认为重症患者需要将 C_{min} 维持在 20 ～ 30 mg • L^{-1} [20]，而本研究发现替考拉宁有效率在一定范围内随着浓度的升高而升高，在 15 ～ 20 mg • L^{-1} 时临床有效率和细菌学有效率最高（90.00% 与 82.00%），但随着浓度的继续升高，疗效并不会进一步显著提高，甚至有下降趋势，但并无统计学意义，可能与高浓度组患者数量较少有关，因此临床上可提高给药负荷剂量使替考拉宁尽早达更佳的有效浓度范围，从而提高药物临床治疗有效率，同时也需精准调整维持剂量，避免毒性的发生和经济上的浪费。

本研究中收集的替考拉宁不良反应主要涉及患者肝毒性（7.29%）、肾毒性（8.10%）、PLT 减少（13.77%）、WBC 减少（7.29%）和 NEUT 减少（4.05%），并发现替考拉宁血药浓度与 WBC 减少、PLT 减少和 NEUT 减少无显著相关性而与肝、肾毒性的发生显著相关（P ＜ 0.001）。从图 2A 中可知当替考拉宁 C_{min} ≥ 30.53 mg • L^{-1} 时，患者可能更易发生肾毒性（AUC ＝ 0.749），Wilson[21] 认为如果替考拉宁谷浓度大于 40 mg • L^{-1}，则会增加发生器官毒性的风险，Zhou 等 [15] 则表明替考拉宁血药浓度低于 30 mg • L^{-1} 时对于感染革兰氏阳性细菌的患者才是安全的，但与 Yoon 等 [22] 认为的 C_{min} ＞ 60 mg • L^{-1} 才发生肾毒性的浓度范围相比较低，可能原因是本研究仅有 2.83% 的患者血药浓度≥ 30 mg • L^{-1}，最高浓度为 40.49 mg • L^{-1}，无法评估 C_{min} ＞ 60 mg • L^{-1} 的毒性情况。从图 2B 中可知当替考拉宁 C_{min} ≥ 27.70 mg • L^{-1} 时，患者更易发生肝毒性（AUC ＝ 0.852），与 Nakamura 等 [23] 发现替考拉宁 C_{min} ≥ 28.0 mg • L^{-1} 是肝毒性发生的危险因素的结果一致。

为确定安全的浓度范围，本研究将血药浓度分为 6 组进行分组对比，发现达到 25 mg • L^{-1} 及其以上浓度时，患者发生肝、肾毒性发生率显著高于其他低浓度组。基于此将患者分为＜ 25 mg • L^{-1} 与≥ 25 mg • L^{-1} 组，采用 Kaplan-Meier 风险函数分析发现＜ 25 mg • L^{-1} 组发生肝、肾毒性的风险显著低于≥ 25 mg • L^{-1} 组，与《中国国家处方集分析》[24] 分析中推荐浓度范围（10 ～ 25 mg • L^{-1}）的上限一致。也有研究 [4, 25] 认为替考拉宁 C_{min} ＜ 30 mg • L^{-1} 对感染革兰氏阳性菌的患者是安全的，结果高于本研究探索的安全浓度上限，原因可能是不同研究间不良反应的评判存在一定主观性的观察偏移，不同研究谷浓度范围和分布不同，且肝肾毒性的评定方法可能存在一定差异。同时本研究还发现肝毒性的中位发生时间为第 9 日，肾毒性的中位发生时间为第 7 日，提

示我们临床应用替考拉宁时需谨慎地降低安全浓度范围，并在用药过程的第 9 日关注肝功能变化，第 7 日关注肾功能水平，同时定期监测替考拉宁血药浓度，以便及时调整替考拉宁剂量在一定程度上减少不良事件的发生保证药物使用的安全性。

本研究存在一定的限制：① 主要针对感染革兰氏阳性菌的重症患者使用替考拉宁的疗效和安全性进行分析，但未对患者感染类型和疾病进行分类；② 临床患者复杂的生理病理状态和复杂的用药，安全性的评估可能会出现一定的观察偏移，仍需进一步加大样本量验证。

参考文献

[1] Nakamura A，Takasu O，Sakai Y，et al. Development of a teicoplanin loading regimen that rapidly achieves target serum concentrations in critically ill patients with severe infections [J]. J Infect Chemother，2015，21（6）：449-455.

[2] Gao L，Xu H，Ye Q，et al. Population pharmacokinetics and dosage optimization of teicoplanin in children with different renal functions [J]. Front Pharmacol，2020，11：552.

[3] Loane G，Gwee A. Teicoplanin therapeutic drug monitoring and treatment outcomes in children with gram-positive infections [J]. J Pediatric Infect Dis Soc，2021，10（5）：682-685.

[4] Zhou L，Gao Y，Cao W，et al. Retrospective analysis of relationships among the dose regimen，trough concentration，efficacy，and safety of teicoplanin in Chinese patients with moderate-severe gram-positive infections [J]. Infect Drug Resist，2018，11：29-36.

[5] 田婷婷，方婕，沈钦勇，等 . 替考拉宁的药动学和药效学特点及给药方案研究进展 [J]. 中国抗生素杂志，2022，47（9）：889-893.

[6] Wang T，Li N，Hu S，et al. Factors on trough teicoplanin levels，associations between levels，efficacy and safety in patients with gram-positive infections [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2015，53（5）：356-362.

[7] Wood MJ. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin [J]. J Antimicrob Chemother，1996，37（2）：209-222.

[8] 吕碧君，梁峰华，谢慧，等 . 替考拉宁在重症肺炎患者中的血药浓度监测与应用分析 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（21）：2167-2172.

[9] 抗菌药物临床试验技术指导原则写作组 . 抗菌药物临床试验技术指导原则 [J]. 中国临床药理学杂志，2014，30（9）：844-856.

[10] Matsumoto K，Watanabe E，Kanazawa N，et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of teicoplanin in patients with MRSA infections [J]. Clin Pharmacol，2016，8：15-18.

[11] Ricci Z，Romagnoli S. Acute kidney injury：diagnosis and classification in adults and children [J]. Contrib Nephrol，2018，193：1-12.

[12] Byrne CJ，Egan S，Fennell JP，et al. Teicoplanin use in adult patients with haematological malignancy：exploring relationships between dose，trough concentrations，efficacy and nephrotoxicity [J]. Int J Antimicrob Agents，2015，46（4）：406-412.

[13] 茅益民，陈成伟 . EASL 药物性肝损伤临床实践指南解读 [J]. 肝脏，2019，24（4）：348-349.

[14] Kobayashi R，Otomo S，Shiba Y，et al. Improvement of predictivity of teicoplanin serum trough concentrations at steady state calculated by vancomycin pharmacokinetic parameter [J]. Yakugaku Zasshi，2016，136（11）：1557-1562.

[15] Zhou L，Gao Y，Cao W，et al. Retrospective analysis of relationships among the dose regimen，trough concentration，efficacy，and safety of teicoplanin in Chinese patients with moderate-severe gram-positive infections [J]. Infect Drug Resist，2018，11：29-36.

[16] 吴茱萸，唐思源，李耀军，等 . 老年医院获得性肺炎病原菌感染特点及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志，2017，27（7）：1524-1527.

[17] 邹梅香，梁仁华 . 老年医院获得性肺炎患者病原菌分布及药敏试验分析 [J]. 医学理论与实践，2018，31（7）：1047-1048.

[18] 李光辉，王睿 . 替考拉宁临床应用剂量专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2016，39（7）：500-508.

[19] Ueda T，Takesue Y，Nakajima K，et al. Enhanced loading regimen of teicoplanin is necessary to achieve therapeutic pharmacokinetics levels for the improvement of clinical outcomes in patients with renal dysfunction [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis，2016，35（9）：1501-1509.

[20] 陈肖，陈朴，林媛媛，等 . 老年重症耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染患者替考拉宁的药动学研究和药效学评价 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（11）：1478-1483.

[21] Wilson AP. Comparative safety of teicoplanin and vancomycin [J]. Int J Antimicrob Agents，1998，10（2）：143-152.

[22] Yoon YK，Park DW，Sohn JW，et al. Multicenter prospective observational study of the comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin in patients with health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia [J]. Antimicrob Agents Chemother，2014，58（1）：317-324.

[23] Nakamura A，Takasu O，Sakai Y，et al. Development of a teicoplanin loading regimen that rapidly achieves target serum concentrations in critically ill patients with severe infections [J]. J Infect Chemother，2015，21（6）：449-455.

[24]《中国国家处方集》编委会 . 中国国家处方集 [M]. 2010 年版 . 北京：人民军医出版社 .

[25] Kato H，Hamada Y，Hagihara M，et al. Retrospective study of teicoplanin loading regimen that rapidly achieves target 15-30 μg/mL serum trough concentration [J]. J Infect Chemother，2016，22（5）：308-313.

（收稿日期：2023-02-27；修回日期：2023-05-08）

某院阿帕替尼超适应证用药调查分析

王旭东，黄佩文，邱季*（合肥市滨湖医院药学部，合肥　230000）

摘要：目的　调查分析某院阿帕替尼超适应证用药情况，为规范其临床应用提供循证参考。**方法**　依据《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则（2022 年版）》《超说明书用药循证评价规范》《超说明书用药专家共识》等，建立新型抗肿瘤药物超适应证用药评价标准。采用回顾性分析方法，抽取某院 2021 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日住院患者使用阿帕替尼的病例资料，统计阿帕替尼超适应证用药情况。利用新型抗肿瘤药物超适应证用药评价标准，对阿帕替尼的超适应证用药情况进行循证评价。**结果**　共收集到该院使用阿帕替尼的病例 83 例，其中 34 例（41.0%）为超适应证用药，评价为“推荐使用”“限制使用”“特殊使用”和“不推荐使用”的分别占 52.9%（18/34）、17.6%（6/34）、17.6%（6/34）和 11.8%（4/34）。**结论**　该院阿帕替尼的超适应证用药比较多见，且存在“不推荐使用”情况，需要加强管理，保障肿瘤患者的用药安全及临床获益。

关键词：阿帕替尼；循证医学；超适应证用药；合理用药
中图分类号：R979.1，R734.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2773-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.036

Off-label indications use of apatinib in a hospital

WANG Xu-dong, HUANG Pei-wen, QIU Ji* (*Department of Pharmacy, Binhu Hospital of Hefei, Hefei* 230000)

Abstract: Objective　To analyze the off-label indications use of apatinib in a hospital, and provide evidence-based reference for standardizing clinical medication use. **Methods**　According to the *Guidelines for Clinical Application of New Anti-tumor Drugs* (2022 *Edition*), *Specification of Evidence-base Pharmaceutical Evaluation Method for Off-label Drug Use* and *Expert Consensuses of Off-label Drug Use*, the evaluation criteria for off-label indication use were established. We retrospectively analyzed the data of inpatients receiving apatinib from January 1st, 2021 to December 31st, 2022 in a hospital, and conducted statistical analysis of the off-label indications. The evaluation criteria were used to evaluate the off-label indications use of apatinib based on evidence-based medicine. **Results**　Totally 83 patients were given apatinib in a hospital, 34(41.0%) of whom had off-label indications. 18(52.9%), 6(17.6%), 6(17.6%) and 4(11.8%) patients were evaluated as “recommended use” “restricted use” “special use” and “not recommended use”, respectively. **Conclusion**　The off-label indications use of apatinib in this hospital is relatively common, and “not recommended use” exists. Therefore, management should be strengthened to ensure drug safety and clinical benefit of tumor patients.

Key words: apatinib; evidence-based medicine; off-label indication; rational drug use

阿帕替尼（apatinib）是一种我国自主研发的靶向作用于血管内皮生长因子受体 2（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）的小分子酪氨酸激酶抑制剂，其作为 1.1 类新药于 2014 年 10 月通过我国国家药品监督管理局（National Medical Products Administration，NMPA）审批上

基金项目：安徽省卫生健康科研项目（No.AHWJ2022b104）。
作者简介：王旭东，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：375842488@qq.com　*通信作者：邱季，女，主任药师，教授，主要从事临床药学研究和药事管理，email：anqiuji9258@163.com

市[1-2]。目前，阿帕替尼获 NMPA 批准的适用人群包括既往接受过两种系统化疗后进展或复发的晚期胃腺癌或胃 - 食管结合部腺癌患者和既往接受过至少一线系统性治疗失败或不可耐受的晚期肝细胞癌患者。然而，现今阿帕替尼在医院临床存在不少超适应证用药情况[3-4]。《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则（2022 年版）》明确提示，抗肿瘤药物临床应用须遵循药品说明书，不能随意超适应证使用，但由于肿瘤治疗临床实践的快速发展，药品说明书往往滞后于临床实践，故对于某些特殊情况下的超说明书用药，医疗机构应依据循证医学证据加强管理[5]。国家卫生健康委于 2020 年 12 月颁布的《抗肿瘤药物临床应用管理办法（试行）》也要求，医疗机构应当通过专项处方点评加强抗肿瘤药物临床应用的日常管理，评价抗肿瘤药物处方的适宜性、合理性[6]。本研究依据相关循证医学证据建立新型抗肿瘤药物超适应证用药评价标准，对某三级甲等综合性医院阿帕替尼的临床应用进行评价，为该药的合理应用提供循证参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

通过医院信息系统（HIS）调取某三级甲等综合性医院（下称“该院”）2021 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日所有使用过阿帕替尼的住院患者的病例资料。

1.2　统计方法

查阅调取的病例资料，利用 Excel 软件对使用阿帕替尼患者的性别、年龄及临床诊断等信息进行记录、统计。依据我国 NMPA 最新核准的药品说明书，将超出药品说明书规定适应证的病例用药判定为超适应证用药。

1.3　评价标准

目前评价抗肿瘤药物超适应证用药是否合理尚无统一标准，但学界公认超适应证用药需要相关循证医学证据的支持。《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则（2022 年版）》[5] 和《抗肿瘤药物临床应用管理办法（试行）》[6] 均提示，抗肿瘤药物循证医学证据采纳根据依次是：其他国家或地区药品说明书中已注明的用法，国际权威学协会或组织发布的诊疗规范、临床诊疗指南，国家级学协会发布的经国家卫生健康委员会认可的诊疗规范、临床诊疗指南等。另外，笔者还结合《超说明书用药循证评价规范》[7]、《超说明书用药专家共识》[8]、《单臂试验（single arm trial，SAT）支持上市的抗肿瘤药进入关键试验前临床方面沟通交流技术指导原则》[9] 和《牛津证据分级与推荐意见强度（治疗部分）》[10] 制订新型抗肿瘤药物超适应证用药评价标准。评价标准依据循证医学证据的不同等级，将新型抗肿瘤药物超适应证用药划分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ四个等级，对应的评价结果分别为推荐使用、限制使用、特殊使用和不推荐使用。具体见表 1。

表 1　新型抗肿瘤药物超适应证用药评价标准

Tab 1　Evaluation criteria for off-label indication use of new anti-tumor drugs

等级	证据等级	用药推荐	评价结果
Ⅰ	国外政府机构批准的药品说明书；权威部门发布的诊疗规范或指南	可以超适应证用药	推荐使用
Ⅱ	随机对照试验的系统评价 /meta 分析；随机对照试验（设计良好，低度偏倚）；Micromedex 数据库的 Thomson 分级≥ Class Ⅱ a 级	在多数情况下，可以超适应证用药	限制使用
Ⅲ	单臂试验；队列研究；病例对照研究；Micromedex 数据库的 Thomson 分级为 Class Ⅱ b 级	在特殊情况下，可以超适应证用药	特殊使用
Ⅳ	案例报道，回顾性病例分析，临床经验；Micromedex 数据库的 Thomson 分级为 Class Ⅲ级；无相关循证医学证据资料	不可以超适应证用药	不推荐使用

2　结果

2.1　病例患者及超适应证用药概况

2021—2022 年该院共有 83 例患者使用过阿帕替尼，其中男性 55 例，女性 28 例；患者年龄（67.2±11.9）岁，29 ～ 94 岁。83 例病例中，适应证用药 49 例（59.0%），超适应证用药 34 例（41.0%）。超适应证用药病例的临床诊断包括食管癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、鼻咽癌、胰腺癌等。

2.2　超适应证用药评价

34 例阿帕替尼超适应证用药病例中，评价为推荐使用的有 18 例（52.9%），为采用阿帕替尼治疗食管癌；评价为限制使用的有 6 例（17.6%），包括采用阿帕替尼治疗肺癌（2 例）、结直肠癌（1 例）、宫颈癌（1 例）、前列腺癌骨转移（1 例）、胸腺癌（1 例）；评价为特殊使用的有 6 例（17.6%），包括采用阿帕替尼治疗乳腺癌（1 例）、鼻咽癌（4 例）、卵巢癌（1 例）；评价为不推荐使用的有 4 例（11.8%），包括采用阿帕替尼治疗胆囊癌（1 例）、胰腺癌（1 例）、肾癌（1 例）、脊髓癌（1 例）。具体见表 2。

表 2　该院阿帕替尼超适应证用药评价结果

Tab 2　Evaluation of off-label indication use of apatinib in this hospital

病例诊断	病例数 / 例	循证医学证据	评价结果
食管癌	18	中国医师协会等发布的《中国食管癌放射治疗指南（2021 年版）》[11] 中国临床肿瘤学会发布的《食管癌诊疗指南（2022 年）》[12]	推荐使用
肺癌	2	随机对照试验 [13-14]，meta 分析 [15]	限制使用
结直肠癌	1	随机对照试验 [16]，单臂试验 [17]	限制使用
宫颈癌	1	随机对照试验 [18]，单臂试验 [19-20]	限制使用
前列腺癌骨转移	1	随机对照试验 [21-23]	限制使用
胸腺癌	1	随机对照试验 [24]，回顾性病例分析 [25]	限制使用
乳腺癌	1	单臂试验 [26-28]	特殊使用
鼻咽癌	4	单臂试验 [29]	特殊使用
卵巢癌	1	单臂试验 [30]，案例报道 [31-32]	特殊使用
胆囊癌	1	回顾性病例分析 [33-34]，案例报道 [35]	不推荐使用
胰腺癌	1	回顾性病例分析 [36]，案例报道 [37]	不推荐使用
肾癌	1	案例报道 [38]	不推荐使用
脊髓癌	1	无	不推荐使用

3　讨论

3.1　阿帕替尼超适应证用药分析

3.1.1　推荐使用　本研究表明，该院阿帕替尼的超适应证用药情况比较多见（34/83，41.0%），这可能与其抗肿瘤血管生成的作用机制及广泛开展的临床研究有关。该院阿帕替尼用于治疗食管癌（18 例）评价为“推荐使用”，已有权威部门发布的诊疗规范或指南支持，包括中国医师协会 / 中华医学会发布的《中国食管癌放射治疗指南（2021 年版）》[11] 和中国临床肿瘤学会（CSCO）发布的《食管癌诊疗指南（2022 年）》[12]。1 例患者为食管贲门连接处腺癌，二线治疗进展后选择阿帕替尼；剩余 17 例患者均为晚期多发转移的食管鳞癌，经过一线、二线及以后治疗失败后选择阿帕替尼。与《食管癌诊疗指南（2022 年）》[12] 推荐的治疗方案相符。多项研究结果表明阿帕替尼可作为晚期食管鳞癌一线化疗失败后二线治疗的有效治疗药物 [39]。所以该院 18 例食管癌患者使用阿帕替尼有循证医学证据支持，评价为合理。

3.1.2　限制使用　该院阿帕替尼用于治疗肺癌（2 例）、结直肠癌（1 例）、宫颈癌（1 例）、前列腺癌骨转移（1 例）和胸腺癌（1 例）有相关随机对照试验（RCT）证据支持，评价为“限制使用”。Yu 等 [13] 报道了一项阿帕替尼联合化疗治疗无驱动基因突变的晚期非小细胞肺癌（NSCLC）的 RCT 研究，研究纳入了 33 例在一线化疗后进展的、不能切除的局部晚期或晚期 NSCLC 患者，实验组（$n = 22$）接受阿帕替尼联合 4 个周期的多西紫杉醇或培美曲塞，对照组（$n = 11$）只接受 4 个周期的多西紫杉醇或培美曲塞，试验组和对照组的中位无进展生存期（median progression-free survival，mPFS）分别为 5.47 个月和 2.97 个月，疾病控制率（disease control rate，DCR）分别为 95% 和 73%，客观缓解率（objective response rate，ORR）分别为 27% 和 9%，结果表明阿帕替尼联合单药化疗是二线治疗晚期 NSCLC 的一种新选择。该院 2 例肺癌患者，其中 1 例为 *EGFR19* 外显子突变伴脑转移及纵膈淋巴结转移的晚期 NSCLC 患者，经过二线治疗进展后接受阿帕替尼抗血管靶向治疗；另外 1 例为 *EGFR* 基因无突变的晚期 NSCLC 患者，术后一线化疗后进展，二线化疗后不能耐受，给予阿帕替尼联合两个周期的重组人血管内皮抑制素（恩度）＋紫杉醇（白蛋白结合型）。多项小样本研究数据显示阿帕替尼联合化疗作为二线及后线治疗可提高晚期 NSCLC 的 DCR 和 ORR[40]。而进一步明确阿帕替尼在晚期 NSCLC 综合治疗中的用药价值和用药时机，需要更多、更大型的 RCT 研究，期待更多相关的疗效和安全性研究数据。结合本研究的评价标准和相关 RCT 研究，该院 2 例肺癌选择三线治疗联合阿帕替尼靶向治疗，评价为合理。Liao 等 [16] 报道了一项阿帕替尼姑息治疗晚期结直肠癌的 RCT 研究，研究纳入了 53 例经≥ 2 线化疗后进展的结直肠癌患者，阿帕替尼组（$n = 27$）和对照组（$n = 26$）分别给予阿帕替尼和对症治疗。中位随访时间为 6.0 个月，阿帕替尼组和对照组的 mPFS 分别为 2.0 个月和 1.1 个月 [HR 3.88（95%*CI*：1.91 ～ 7.88，$P < 0.001$）]；DCR 分别为 70.4% 和 26.9%（$P = 0.002$）。该院 1 例晚期结直肠癌继发

腹腔转移患者，经过二线化疗后进展且不能耐受，选择阿帕替尼靶向治疗有循证医学证据，评价为合理。Guo 等[18]报道了一项阿帕替尼联合化疗或化疗同步近距离放疗（concurrent chemo-brachytherapy，CCBT）治疗宫颈癌的 RCT 研究，研究纳入了 52 例初治或复发的宫颈癌患者，阿帕替尼组（n = 28）给予初治患者阿帕替尼联合化疗（卡铂＋紫杉醇），给予复发患者阿帕替尼联合 CCBT，对照组（n = 24）给予初治患者化疗（卡铂＋紫杉醇），给予复发患者 CCBT。中位随访时间为 14.0 个月，阿帕替尼组和对照组的 mPFS 分别为 10.1 个月和 6.4 个月 [HR 0.44（95%CI：0.25 ～ 0.78，P < 0.01）]；ORR 分别为 64.3% 和 33.3%（P < 0.05）。该院 1 例Ⅲ B 期宫颈癌患者，一线治疗给予单纯放疗后腹膜后淋巴结转移，二线治疗行阿帕替尼靶向治疗联合姑息性放疗。多项研究表明，阿帕替尼联合同步放化疗可提高中晚期宫颈癌患者治疗效果，不良反应可耐受，值得临床推广，以后需开展更多、更大规模临床试验以观察其远期疗效和安全性。该患者二线治疗选择阿帕替尼有循证医学证据支持，评价为合理。赵凤等[21]报道了阿帕替尼联合立体定向放疗（SBRT）治疗前列腺癌骨转移的 RCT 研究，研究纳入 29 例前列腺癌骨转移患者，对照组（n = 10）予 SBRT 治疗骨转移部位，试验组（n = 19）除放疗外加用阿帕替尼 250 mg • d^{-1}，试验组平均疼痛评分变化优于对照组，试验组患者血清前列腺特异性抗原（PSA）下降 50% 以上，优于对照组。朱家伦等[22]报道了二氯化锶联合阿帕替尼治疗前列腺癌骨转移的 RCT 研究，研究纳入 80 例前列腺癌骨转移患者，对照组（n = 40）单纯给予二氯化锶（$^{89}SrCl_2$）治疗，联合组（n = 40）采用 $^{89}SrCl_2$ 联合阿帕替尼治疗，治疗后联合组的临床总有效率明显高于对照组（92.5% *vs* 72.5%；P < 0.05），联合治疗后骨转移灶数量 [（4.09±0.42）*vs*（4.88±0.96）] 和疼痛评分 [（3.14±0.76）*vs*（4.31±0.84）] 均低于对照组（P < 0.001），Karnofsky 评分高于对照组 [（74.42±2.72）*vs*（67.46±3.25）]。治疗后联合组患者的血清 PSA 水平低于对照组 [（17.25±6.62）*vs*（21.09±7.65）；P < 0.01]，提示 $^{89}SrCl_2$ 联合阿帕替尼治疗前列腺癌骨转移临床疗效显著，安全性高，且可显著抑制癌细胞增殖和转移，值得临床推广使用。Zhao 等[23]报道了阿帕替尼联合放疗治疗前列腺癌骨转移的多中心研究，治疗组（n = 20）为阿帕替尼联合放射治疗，对照组（n = 10）为单纯放射治疗，治疗组相较于对照组，疼痛控制水平和持续时间均有显著改善，治疗组中 12 例患者 PSA 下降≥ 50%，6 例患者病情稳定。上述 3 项 RCT 提示，阿帕替尼可使前列腺癌骨转移患者在临床治疗中获益。骨骼是前列腺癌最主要的转移部位，超过 70% 的晚期前列腺癌患者会发生骨转移和骨相关事件（SREs）[41]。该院 1 例前列腺癌骨转移患者，双侧睾丸切除术后行氟他胺、比卡鲁胺内分泌治疗，效果不佳，行多西他赛联合泼尼松龙化疗五个周期，PSA 升高，行放疗联合比卡鲁胺内分泌治疗和双膦酸盐抗破骨细胞治疗，PSA 再度升高，给予紫杉醇（白蛋白结合型）化疗三个周期，后因不能耐受而终止，行信迪利单抗＋阿帕替尼＋卡培他滨一个周期联合放射治疗，患者一般情况较前平稳。该患者多线治疗效果不佳后选择联合阿帕替尼靶向治疗，有较充足的循证医学证据，结合本研究的评价标准，评价为合理。裴秀峰等[24]报道了阿帕替尼联合替吉奥治疗复发转移胸腺癌的 RCT 研究，研究纳入 102 名出现转移复发性胸腺癌患者，对照组（n = 51）采用替吉奥治疗，观察组（n = 51）给予阿帕替尼联合替吉奥治疗，观察组患者的整体治疗效果超过 40%，显著高于对照组，同时观察组患者在实际的不良反应发生率方面显著低于对照组（P < 0.05）。该院 1 例胸腺癌伴左肺内、左侧胸膜多发转移患者，一线治疗后病情进展，二线治疗给予阿帕替尼靶向治疗。结合本研究的评价标准和相关 RCT 研究，二线治疗选用阿帕替尼，评价为合理。

3.1.3　特殊使用　该院阿帕替尼用于治疗乳腺癌、鼻咽癌和卵巢癌有相关 SAT 证据支持，评价为“特殊使用”。欧开萍等[26]报道了阿帕替尼联合紫杉醇和卡铂密集方案新辅助治疗三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer，TNBC）的有效性，研究纳入了 16 例Ⅱ～Ⅲ期 TNBC 患者，经阿帕替尼联合化疗后，ORR 为 87.5%，DCR 为 100%，其中包括 2 例完全缓解（complete response，CR）、12 例部分缓解（partial response，PR），2 例疾病稳定（stable disease，SD）。12 例患者完成手术治疗，其中 8 例（66.7%）达病理完全缓解（pathologic complete response，pCR）。Hu 等[27]报道了阿帕替尼治疗转移性 TNBC 的Ⅱ期临床研究，Ⅱa 期和Ⅱb 期分别评价了 22 例和 56 例 TNBC 患者，ORR 分别为 36.4% 和 10.7%，SD ≥ 24 周的分别占 22.7% 和 14.3%，临床获益率（clinical benefit rate，CBR）分别为 59.1% 和 25.0%。Hu 等[28]还报道了另一项阿帕替尼治疗转移性非三阴性乳腺癌（non-triple-

negative breast cancer，nTNBC）的Ⅱ期临床研究，38 例患者的中位随访时间为 10.1 个月，mPFS 为 4.0 个月，ORR 为 16.7%，DCR 为 66.7%，中位总生存期（median overall survival，mOS）为 10.3 个月。上述 3 项 SAT 提示，阿帕替尼可使晚期乳腺癌（包括 TNBC 和 nTNBC）患者在临床治疗中获益。《小分子抗血管生成药物治疗晚期乳腺癌超说明书用药专家共识》[42] 指出：综合现有的临床研究证据显示，对晚期乳腺癌患者，单用小分子抗血管生成药物，如安罗替尼、培唑帕尼和阿帕替尼或联合化疗时，展现出抗肿瘤疗效，具有一定的临床应用价值。该院 1 例三阴性乳腺癌患者环磷酰胺＋表柔比星新辅助化疗后行左乳腺根治术，放化疗后复发，再次接受多线化疗，因不良反应无法耐受以及病情进展，后行奥沙利铂＋长春瑞滨＋阿帕替尼治疗。该患者经三阴性乳腺癌标准化治疗方案及多线治疗后进展及不能耐受，选择联合阿帕替尼靶向治疗，一般情况较前好转，结合本研究的评价标准和相关研究，评价为合理。Li 等 [29] 报道了阿帕替尼治疗复发或难治性鼻咽癌的 SAT 研究，51 例患者的 ORR 为 31.37%，mOS 为 16 个月，mPFS 为 9 个月，提示阿帕替尼针对鼻咽癌有较好的疗效，支持进一步开展大样本研究。阿帕替尼维持治疗可作为转移性鼻咽癌放化疗后的一种治疗选择，能较显著延长无进展生存期，且安全性可控 [43]。该院 4 例鼻咽癌患者经一线治疗后均复发或转移，经过二线、三线治疗后病情进展而选择阿帕替尼，结合本研究的评价标准和相关研究，评价为合理。Zhang 等 [30] 报道了阿帕替尼治疗铂类耐药复发性上皮性卵巢癌，研究纳入 28 例铂类耐药上皮性卵巢癌患者。13 例接受阿帕替尼作为化疗后的维持治疗，mPFS 为 6.0 个月，mOS 为 11.0 个月。4 例患者在化疗后接受阿帕替尼姑息治疗，其中 2 例疾病进展，2 例疾病稳定。11 例单用阿帕替尼作为挽救治疗，DCR 为 81.8%，mPFS 为 3.0 个月，提示阿帕替尼可能对铂类耐药复发性上皮性卵巢癌有效。该院 1 例卵巢癌患者经细胞减灭术联合一线化疗方案治疗后复查示腹主动脉旁并肠系膜淋巴结转移，行放疗联合二线化疗方案，患者出现不良反应和病情进展，改用阿帕替尼靶向治疗，结合本研究的评价标准和相关研究，三线治疗选择阿帕替尼，评价为合理。

3.1.4　不推荐使用　针对本研究提示的“不推荐使用”阿帕替尼的超适应证用药（胆囊癌、胰腺癌、肾癌和脊髓癌）情况，笔者检索了国内外阿帕替尼临床试验登记信息。结果发现，阿帕替尼联合其他药物治疗胰腺癌的两项临床试验正在进行，包括联合卡瑞利珠单抗的 SAT（NCT04415385[44]）、联合伊立替康和替吉奥的 SAT（NCT04101929[45]）。将来上述研究的结果可能会支持阿帕替尼治疗相关类型的肿瘤，但本研究基于目前的循证医学证据，尚不推荐超适应证用药。此外，阿帕替尼联合 SOX 方案（奥沙利铂＋替吉奥）治疗胆囊癌的单中心 RCT（NCT03702491）虽已于 2018 年 10 月启动，原计划于 2020 年 10 月初步完成，但目前仍无研究成果公布 [46]。该院阿帕替尼用于胆囊癌、胰腺癌、肾癌和脊髓癌患者，无循证医学证据，故评价为不合理。

3.2　不良反应分析

调查显示抗肿瘤药物超适应证用药现象非常普遍，同时也引发药品安全性、有效性、医疗责任和伦理学等问题 [47]，特别是超适应证使用时出现不良反应。本研究 83 例患者中，共有 26 例（占 31.33%）患者发生药品不良反应，多为轻至中度可逆不良反应。最常见的不良反应为骨髓抑制（8 例，累计占 9.64%），主要表现为白细胞减少、贫血和血小板减少，用重组人白介素 -11（巨和粒）和人粒细胞刺激因子（瑞白）皮下注射给药对症治疗。20 例（累计占 24.10%）患者出现消化道不良反应，表现为消化道出血、腹泻、恶心、呕吐、食欲下降，通过减量、停药、对症治疗可缓解或消失。7 例（累计占 8.43%）患者出现血压升高。研究 [48] 显示阿帕替尼常见的不良反应包括：高血压、手足综合征、蛋白尿、出血倾向、乏力、腹泻、一过性转氨酶升高、血小板减少、白细胞减少等。与本研究收集的不良反应类型基本一致。朱彩云等 [49] 统计了阿帕替尼单药治疗晚期恶性肿瘤的各种不良反应累计发生率，其中高血压为 39%、手足综合征为 32%、蛋白尿为 28%、肝功能异常为 27%，高于本研究的不良反应发生率，原因可能为本研究中部分患者为轻度不良反应，病程未记录。董栋等 [50] 研究发现阿帕替尼组患者手足综合征、血压升高的发生率高于常规化疗组，因而临床医师在应用阿帕替尼时应格外关注这两类不良反应发生的风险。

4　结论

综上，该院阿帕替尼的超适应证用药比较多见，且存在“不推荐使用”情况，需要加以规范。从医院层面，抗肿瘤药物特别是新型抗肿瘤药物超适应证用药应遵循无替代、有证据、非试验、获批准、有知情、可监控六原则；按照国家卫

生健康委印发的《抗肿瘤药物临床应用管理办法（试行）》的文件要求，结合本研究阿帕替尼超适应证用药的推荐级别，针对临床医师不同级别用药的处方权限进行管理；并结合阿帕替尼上市后临床研究的进展，对阿帕替尼超适应证用药的评价工作进行及时调整；定期对本机构抗肿瘤药物相关的医师、药师、护士进行抗肿瘤药物临床应用知识培训并进行考核；将抗肿瘤药物不良反应，尤其是新型抗肿瘤药物不良反应报告纳入医疗质量考核体系，定期分析和报告新型抗肿瘤药物不良反应的动态和趋势；制订抗肿瘤药物使用应急预案，对出现严重不良反应的，要及时启动应急预案。从操作层面，设立处方前置审核小组，对临床合理用药实行“机审”加“人审”双重审核，判断用药合理性，保证患者的用药安全[51]；对抗肿瘤药物超适应证用药知情同意进行信息化管理，简化流程，提高可操作性；临床医师、护理人员和临床药师应当密切随访患者的用药相关毒性，并及时上报不良反应，尤其是严重的和新发现的不良反应，保障肿瘤患者的用药安全及临床获益。

参考文献

[1] Scott LJ. Apatinib：a review in advanced gastric cancer and other advanced cancers [J]. Drugs，2018，78（7）：747-758.

[2] 李萍，贾乐川，付岩，等 . 甲磺酸阿帕替尼不良反应中文文献分析 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（5）：546-548.

[3] 尹月，邱新野，鞠蕾，等 . 某院甲磺酸阿帕替尼临床应用评价分析 [J]. 中国药学杂志，2016，51（24）：2139-2142.

[4] 詹海燕，杨健，戎佩佩 . 某院甲磺酸阿帕替尼片超说明书用药及其不良反应分析 [J]. 药物流行病学杂志，2018，27（3）：180-184.

[5] 国家卫生健康委办公厅 . 国家卫生健康委办公厅关于印发新型抗肿瘤药物临床应用指导原则（2022 年版）的通知（国卫办医政函 [2022]465 号）[EB/OL].（2022-12-29）[2023-02-01]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/ s7659/202212/8df034c9af-b44a9d95cd986d4e12fbd8. shtml.

[6] 国家卫生健康委 . 国家卫生健康委关于印发抗肿瘤药物临床应用管理办法（试行）的通知（国卫医函 [2020]487 号）[EB/OL].（2020-12-22）[2023-02-01]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/202012/a7600740bed44d1db7015ca5a-1be2cc0. shtml.

[7] 广东省药学会 . 超说明书用药循证评价规范 [EB/OL].（2021-01-19）[2023-02-01]. http：//www. sinopharmacy. com. cn/notification/2157. html.

[8] 张镭，谭玲，陆进 . 超说明书用药专家共识 [J]. 药物不良反应杂志，2015，17（2）：101-103.

[9] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 国家药监局药审中心关于发布《单臂试验支持上市的抗肿瘤药进入关键试验前临床方面沟通交流技术指导原则》的通告（2020 年第 47 号）[EB/OL].（2020-12-02）[2023-02-03]. https：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20201204162615199. html.

[10] SCIENCEOPEN. Levels of evidence and grades of recommendation. oxford centre for evidence-based medicine-levels of evidence（March 2009）[EB/OL].（2009-03-25）[2023-02-03]. https：//www. science-open. com/document?vid ＝ e61a4576-2b56-4605-958b-2f8b3a3618ad.

[11] 中国医师协会放射肿瘤治疗医师分会，中华医学会放射肿瘤治疗学分会，中国抗癌协会肿瘤放射治疗专业委员会 . 中国食管癌放射治疗指南（2021 年版）[J]. 国际肿瘤学杂志，2022，49（1）：12-25.

[12] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 中国临床肿瘤学会（CSCO）食管癌诊疗指南 2022 [M]. 北京：人民卫生出版社，2022.

[13] Yu ZY，Cai XY，Xu ZW，et al. Apatinib plus chemotherapy as a second-line treatment in unresectable non-small cell lung carcinoma：a randomized，controlled，multicenter clinical trial [J]. Oncologist，2020，25（11）：e1640-e1649.

[14] 高世乐，芦东徽，刘美琴，等 . 阿帕替尼联合化疗在晚期非小细胞肺癌患者中的临床疗效和最佳剂量探讨 [J]. 国际肿瘤学杂志，2022，49（3）：140-145.

[15] 余觅，董奇，何杰，等 . 阿帕替尼联合多西他赛治疗晚期非小细胞肺癌疗效及安全性的 meta 分析 [J]. 国际呼吸杂志，2020，40（16）：1238-1247.

[16] Liao XL，Li HL，Liu ZH，et al. Clinical efficacy and safety of apatinib in patients with advanced colorectal cancer as the late-line treatment [J]. Medicine（Baltimore），2018，97（50）：e13635.

[17] Chen XF，Qiu TZ，Zhu YW，et al. A single-arm，phase II study of apatinib in refractory metastatic colorectal cancer [J]. Oncologist，2019，24（7）：883-e407.

[18] Guo QF，Sun YW，Kong EQ，et al. Apatinib combined with chemotherapy or concurrent chemo-brachytherapy in patients with recurrent or advanced cervical cancer：a phase 2，randomized controlled，prospective study [J]. Medicine（Baltimore），2020，99（11）：e19372.

[19] Zhang LL. Phase Ⅱ study of apatinib，a novel tyrosine kinase inhibitor targeting tumor angiogenesis，as second-line treatment for recurrent or advanced cervical cancer patients [J]. Invest New Drugs，2020，38（4）：1186-1191.

[20] Lan CY，Shen JX，Wang Y，et al. Camrelizumab plus apatinib in patients with advanced cervical cancer（CLAP）：a multicenter，open-label，single-arm，phase Ⅱ trial [J]. J Clin Oncol，2020，38（34）：4095-4106.

[21] 赵凤，田伟，曾铭，等 . 阿帕替尼联合立体定向放射治疗用于前列腺癌骨转移治疗的研究 [J]. 实用医院临床杂志，2017，14（4）：15-17.

[22] 朱家伦，王永斌，杨传周，等 . 二氯化锶联合阿帕替尼治疗 80 例前列腺癌骨转移的临床疗效及对癌细胞增殖和转移的影响 [J]. 肿瘤学杂志，2022，28（10）：847-854.

[23] Zhao F，Tian W，Zeng M，et al. Apatinib alone or combined with radiotherapy in metastatic prostate cancer：results from a pilot，multicenter study [J]. Oncotarget，2017，8（67）：110774-110784.

[24] 裴秀峰，赵晓飞 . 阿帕替尼联合替吉奥对复发转移胸腺癌姑息化疗疗效及安全性分析 [J]. 临床医药文献电子杂志，2019，6（45）：58.
[25] 陈秀兰，王薇，李志伟 . 阿帕替尼维持性治疗恶性胸腺癌疗效分析 [J]. 世界最新医学信息文摘（连续型电子期刊），2020，20（104）：12-13，16.
[26] 欧开萍，李俏，罗扬，等 . 阿帕替尼联合紫杉醇和卡铂密集方案新辅助治疗三阴性乳腺癌的近期疗效及安全性 [J]. 中华肿瘤杂志，2020，42（11）：966-971.
[27] Hu XC，Zhang J，Xu BH，et al. Multicenter phase Ⅱ study of apatinib，a novel VEGFR inhibitor in heavily pretreated patients with metastatic triple-negative breast cancer [J]. Int J Cancer，2014，135（8）：1961-1969.
[28] Hu XC，Cao J，Hu WW，et al. Multicenter phase Ⅱ study of apatinib in non-triple-negative metastatic breast cancer [J]. BMC Cancer，2014，14：820.
[29] Li L，Kong F，Zhang L，et al. Apatinib，a novel VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitor，for relapsed and refractory nasopharyngeal carcinoma：data from an open-label，single-arm，exploratory study [J]. Invest New Drugs，2020，38（6）：1847-1853.
[30] Zhang JD，Li AY，Jiang Q，et al. Efficacy and safety of apatinib treatment in platinum-resistant recurrent epithelial ovarian cancer：a real world study [J]. Drug design，development and therapy，2019，13：3913-3918.
[31] Sun HT，Xiao M，Liu SF，et al. Use of apatinib combined with pemetrexed for advanced ovarian cancer：a case report [J]. Medicine，2018，97（27）：e11036.
[32] Zhang MZ，Tian ZK，Sun YH，et al. Successful treatment of ovarian cancer with apatinib combined with chemotherapy：a case report [J]. Medicine，2017，96（45）：e8570.
[33] 杨洋，肖海娟，王鑫，等 . 甲磺酸阿帕替尼二线治疗晚期胆囊癌的疗效与安全性分析 [J]. 现代肿瘤医学，2019，27（11）：1945-1949.
[34] 于虹娥，姜国香，鲍振华，等 . 吉西他滨和奥沙利铂联合阿帕替尼治疗胆囊癌效果观察 [J]. 肿瘤研究与临床，2020，32（10）：693-696.
[35] Zhang MX，Zhang PF，Zhou KX，et al. Remarkable response of metastatic gallbladder carcinoma to apatinib after failed multiline chemotherapies：a case report and literature review [J]. Front Oncol，2019，9：1180.
[36] 梁雪峰，王文辉，张卫华，等 . 甲磺酸阿帕替尼治疗多线治疗失败转移性胰腺癌的临床观察 [J]. 临床肿瘤学杂志，2019，24（12）：1134-1138.
[37] 李录，胡雪晴，赵喆，等 . 阿帕替尼联合吉西他滨治疗晚期胰腺癌 1 例 [J]. 中国肿瘤临床，2017，44（21）：1113-1114.
[38] 陶云霞，李泳澄，张有为，等 . 阿帕替尼一线治疗晚期肾癌 2 例并文献复习 [J]. 癌症进展，2019，17（17）：2105-2107.
[39] 王裕嘉，周倩，肖毓，等 . 阿帕替尼应用于食管癌治疗的研究进展 [J]. 中华转移性肿瘤杂志，2021，4（3）：243-245.
[40] 王迪明，史清明 . 甲磺酸阿帕替尼治疗晚期非小细胞肺癌的研究现状 [J]. 现代肿瘤医学，2022，30（10）：1898-1902.
[41] 中国抗癌协会泌尿男生殖系统肿瘤专业委员会 . 前列腺癌骨转移和骨相关疾病临床诊疗专家共识（2021 版）[J]. 中华肿瘤杂志，2021，43（10）：1016-1026.
[42] 中国抗癌学会国际医疗与交流分会，中国医师协会肿瘤医师分会乳腺学组 . 小分子抗血管生成药物治疗晚期乳腺癌超说明书用药专家共识 [J]. 中华肿瘤杂志，2022，44（6）：523-530.
[43] 李璐，徐鹏，赖昕，等 . 转移性鼻咽癌放化疗后阿帕替尼维持治疗的前瞻性、单臂、多中心Ⅱ期临床研究 [J]. 中国癌症防治杂志，2020，12（4）：397-402.
[44] NIH. The combination of camrelizumab and apatinib as second-line therapy for advanced pancreatic carcinoma [EB/OL].（2020-06-04）[2023-03-23]. https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT04415385?term ＝ Apatinib&cond ＝ pancreatic ＋ cancer&draw ＝ 2&rank ＝ 2.
[45] NIH. Apatinib，irinotecan and S-1（ApaIRIS）in treating patients with metastatic pancreatic cancer after AG regimen [EB/OL].（2019-11-05）[2023-03-23]. https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT04101929?term ＝ Apatinib&cond ＝ pancreatic ＋ cancer&draw ＝ 2&rank ＝ 1.
[46] NIH. Apapitatin combined with SOX for palliative adjuvant chemotherapy in patients with advanced gallbladder carcinoma [EB/OL].（2018-10-11）[2023-03-23]. https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT03702491?term ＝ Apatinib&cond ＝ gallbladder ＋ carcinoma&draw ＝ 2&rank ＝ 1.
[47] 张镭，谭玲，王少华，等 . 国内 24 家医疗机构超说明书用药现状调查与分析 [J]. 中国药学杂志，2016，51（2）：151-154.
[48] 时佳琪，刘超，张艳桥，等 . 甲磺酸阿帕替尼治疗恶性肿瘤的临床不良反应分析 [J]. 中国肿瘤临床，2018，45（4）：191-195.
[49] 朱彩云，陈彦亮，刘敏，等 . 阿帕替尼单药治疗晚期恶性肿瘤的疗效及不良反应分析 [J]. 现代肿瘤医学，2021，29（20）：3649-3653.
[50] 董栋，刘亚洲，李文广，等 . 甲磺酸阿帕替尼治疗晚期乳腺癌的疗效及不良反应分析 [J]. 肿瘤药学，2019，9（5）：754-757，762.
[51] 邢进远，卢晓静，张旭锋，等 . 某院利妥昔单抗超说明书用药现状及合理性分析 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2415-2419.

（收稿日期：2023-02-02；修回日期：2023-05-03）

药事管理

门诊药房自动发药机储位优化的实践与探索

张慧丽，赵亮，曹凯，徐贞贞，陈静静，田京辉*（许昌市中心医院药学部，河南　许昌　461000）

摘要：目的　通过自动发药机储位的优化探索及效果评价，为医疗机构智慧化药房的建设和优化提供参考。**方法**　统计我院 2021 年 8 月 1 日到 2021 年 10 月 31 日自动发药机药品的每日出药数量，根据出药规律确定高峰期出药量，即机内最大储药量，结合单槽储药数量调整机内药品最佳储放轨道。此外，将处方联合使用药物配比高的药品分到临近层的轨道，缩短药品传输行程。**结果**　经过 2021 年 11 月到 2022 年 1 月（3 个月）的储位持续优化，共调整药品品种 180 种，单张处方调配时间由（20.65±6.94）s 缩短至（11.84±4.14）s（$t = 6.067$，$P < 0.001$），自动发药机发药率从 78.69% 提升至 85.21%（$\chi^2 = 464.657$，$P < 0.001$），实时发药窗口发药率从 28.49% 增加到 40.0%（$\chi^2 = 967.177$，$P < 0.001$），平均每日加药次数从（5.16±1.27）次下降到（2.10±0.70）次（$t = 11.783$，$P < 0.001$）；上药时间从（3.78±0.54）h 缩短至（1.75±0.35）h（$t = 17.610$，$P < 0.001$）。**结论**　采用高峰期出药量和处方联用规律的原则优化自动发药机储位，能有效、持续地提升机内药品储位利用空间，使自动化设备得到充分利用，减少加药次数，提高工作效率。

关键词：自动发药机；药品储位；加药次数

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2780-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.037

2018 年，国家卫生健康委员会发布《关于加快药学服务高质量发展的意见》，鼓励推进医院“智慧药房”建设，加快药学服务模式转变，促进新时期药学服务的高质量发展 [1]。智慧化药房建设已经成为医院药房发展的新目标，也是现代药房发展的必然趋势 [2-4]。近几年，自动发药机在我国各地许多医院相继开始应用，其科学合理地使用能使药师工作模式发生极大的转变，提高工作效率和调剂准确率 [5-6]。但设备使用过程中需要长期维护和程序的持续改进，以满足医院的个性化需求。

为加快药学服务模式转型，我院门诊药房于 2020 年 12 月引进江苏艾隆科技有限公司生产的 IRON-1200 型全自动发药机 1 台（包含高发部分和 1 号机器，见图 1），用于盒装药品的储存和调配，另外配备 2 台智能定位调配机用于异型包装药品及拆零药品的储存和调配。设备使用初期主要依据经验发药数量和药盒包装尺寸决定放入机内的药品品种和数量。但随着医院用药目录品种的不断调整、药品包装盒的改变以及疾病随季节变化的规律，需要不断调整机内药品品种、数量及储位，以充分利用机内空间 [7]。本研究根据我院药房实际工作，探索一种相对较简单、易懂的算法用于调整入机药品的储放品种及数量，用于提升自动发药机轨道利用率，减少加药次数，提高配药速率，缩短患者等候时间。旨在提升患者就医体验感，促进医院药学发展 [8]。

图 1　自动发药机（A）和智能调配机（B）的实物图

1　资料

通过我院门诊药房自动发药机管理软件获取 2021 年 8 月 1 日－2021 年 10 月 31 日期间的出

基金项目：许昌市科学技术局市级重点研发与推广专项（No.20220213037）。

作者简介：张慧丽，女，主管药师，主要从事处方审核工作，email：huili15936398374@163.com　*__通信作者：__田京辉，男，副主任药师，主要从事智慧化药房及信息化技术应用方面的研究，email：tianjinghui65@163.com

药记录、上药记录、药品所占轨道数、单轨道储药量数据，统计出机内药品的总出药数量、高峰期出药量以及平均每日加药次数。

2　方法

2.1　高峰期出药量确定最佳储放量及最佳轨道数

将药品的每日出药记录从大到小依次排列（舍弃最大值和最小值），根据较大的几个出药数据确定高峰期出药量，即机内最佳储放量，药品的最佳轨道数等于最佳储放量与满槽数量的比值。本文以艾司奥美拉唑镁肠溶胶囊为例，8 ～ 10 月出药数据由大到小的顺序排列如下（单位为盒）：40、39、39、36、36、36、34、34、33……，由于前几个数据差异不大，由此确定高峰期出药量为 40 盒，结合艾司奥美拉唑镁肠溶胶囊单轨道储药量为 18，得出最佳轨道数为高峰期出药量 / 单轨道储药量＝ 40/18 ＝ 2.22（个），实际中可把轨道数设置为 3 个，每日一次性将 3 个轨道储满药品，即每日加药 1 次即可满足高峰期的出药量。

2.2　药品的储位优化原则

由于自动发药机的空间有限且轨道尺寸固定不变，药师无法将机内所有药品均按照最佳储放量调整轨道数。对于最佳轨道数≥ 5 的药品，不但占用大量的轨道，更会增加加药时间（机械臂单次加药量少）。此时就需要考虑将其移到自动发药机的高发部分。因为高发部分的轨道宽度可以根据药品宽度调整，并且单条轨道储存的药品数量要远大于机内轨道。由于加药是人工直接批量上药，这样就可以大大节省机械臂单盒加药的时间，同时也可将高发部分出药量不大的药品移入自动发药机轨道内。对于每月平均出药量≤ 10 盒的药品，说明其药品用药频率低，如果持续放到自动发药机，就会减少这些药品的周转率，增加药品质控管理的难度，此时需将其移到智能定位调配机，由于智能调配机储药量小，为减少加药频次，可将智能定位调配机出药量大的药品移入自动发药机 1 号机。

2.3　根据处方联用规律适时调整机内药品位置

在优化最佳轨道数的同时，可从大量处方信息中提取出药频率高的药品联用规律，将联用药物配比高的药品分到临近层的轨道，可减少药品传输行程，缩短出药时间。

2.4　统计方法

统计分析各指标数据，进行储位优化前、优化后指标的对照。计量资料采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　药品储位的优化结果

2021 年 11 月 1 日 － 2022 年 1 月 31 日，按照总出药量的大小共持续优化药品品种 180 种，包括出药量较大的前 100 名药品、出药量极小的后 48 种药品、入机新药 14 种、高发移入的 5 种药品以及智能调配机移入的 13 种药品。采用高峰期出药量计算最佳轨道数，由于盐酸克林霉素棕榈酸酯分散片、小儿青翘颗粒、益气和胃胶囊等 8 种药品计算的轨道数≥ 5 条，故将其移到高发；而盐酸司来吉兰片、盐酸米多君片、盐酸乐卡地平片等 48 种药品每月平均出药量≤ 10 盒，为减少轨道占用率，将其移到智能定位调配机（见表 1）。另外，根据出药量的大小，可将高发部分及智能定位调配机的部分药品移入 1 号机器（见表 2），使自动发药机得到充分利用。

表 1　1 号机内部药品品种数及轨道数目的优化

优化类型	2021 年 11 月		2021 年 12 月		2022 年 1 月	
	药品品种数	对应轨道数	药品品种数	对应轨道数	药品品种数	对应轨道数
轨道数配置不足	10	＋ 16	26	＋ 29	16	＋ 16
轨道数配置过量	2	－ 2	5	－ 6	12	－ 12
轨道数配置适中	0	0	9	0	12	0
转移到高发区	8	－ 44	0	0	0	0
移入到智能调配机	33	－ 33	15	－ 15	0	0
优化合计	53	－ 63	55	＋ 8	40	＋ 4

注：轨道数增加用“＋”表示，轨道数减少用“－”表示。

4　自动发药机储位优化的成效分析

自 2021 年 11 月开始，经过 3 个月对其储位不断的优化探索，单张处方调配时间、加药次数及上药时间减少，自动发药机以及实时发药窗口发药率增加。选用 SPSS 22.0 软件对优化前后数据结果进行统计分析，计量资料采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验，差异均具有统计学意义（$P < 0.001$）。

4.1　单张处方调配时间

经过 3 个月的储位优化，单张处方平均调配时间由（20.65±6.94）s 缩短至（11.84±4.14）s（见表 3），差异具有统计学意义（$t = 6.067$，$P < 0.001$），单张处方调配时间越短，说明机器

表 2　移入 1 号机内药品品种数及轨道数目的优化

优化类型	2021 年 11 月		2021 年 12 月		2022 年 1 月	
	药品品种数	对应轨道数	药品品种数	对应轨道数	药品品种数	对应轨道数
入机新药品	4	＋8	5	＋11	5	＋13
高发移入	5	＋12	0	0	0	0
智能调配机移入	11	＋11	2	＋2	0	0
优化合计	20	＋31	7	＋13	5	＋13

注：轨道数增加用“＋”表示，轨道数减少用“－”表示。

调配速率越高，同时患者等候取药的时间越短。

4.2　自动发药机发药率

自动发药机发药率是自动发药机发药量占门诊药房总发药量的比率。储位优化后，自动发药机发药率从 78.69% 提升到 85.21%（见表 3），差异具有统计学意义（$\chi^2 = 464.657$，$P < 0.001$），其值升高，表明更多药品通过机器调配，机器的利用率增加。

4.3　实时发药窗口发药率

实时发药窗口发药率是通过直发窗口发出的药品量与门诊药房总发药量之比。本药房共设置 1 个直发窗口和 4 个混发窗口。直发窗口的药品全部由自动发药机调配，具有调配速率快，无需调配药师的优点；混发窗口的药品由发药机和药师手工共同调配。实时发药窗口发药率 28.49% 提升到 40.00%（见表 3），差异具有统计学意义（$\chi^2 = 967.177$，$P < 0.001$）。结果表明，持续优化机内药品储位，可提高实时发药窗口的发药效率，减少人工调配的时间。

4.4　加药次数

为保证正常的出药速率，每日需要向自动发药机补充药品，补充药品次数越少，表明设置的药品轨道数越合理。由表 3 可见，自动发药机加药次数从平均每日（5.16±1.27）次减少至每日（2.10±0.70）次，差异具有统计学意义（$t = 11.783$，$P < 0.001$）；上药时间从（3.78±0.54）h 缩短至（1.75±0.35）h，差异具有统计学意义（$t = 17.610$，$P < 0.001$）。结果表明，持续优化机内药品储位能大幅度减少上药次数和时间，提高工作效率，降低劳动强度，使药师能更好地投入到药事服务中[9]。

5　讨论

5.1　自动发药机储位优化的重要性

我院为一所国家三级甲等综合医院，患者疾病呈现多样化，处方构成特点呈现药品品种多且比较零散。如果自动化发药机储放药品只依据其经验发药数量和药盒包装尺寸决定放入的品种和

表 3　自动发药机储位优化前后相关指标数据结果对比

时间	单张处方平均调配时间 /s	自动发药机发药率 /%	实时发药窗口发药率 /%	平均每日加药次数 / 次	平均每日上药时间 / h
2021 年 10 月（优化前）	20.65±6.94	78.69	28.49	5.16±1.27	3.78±0.54
2021 年 11 月	16.32±5.98	80.41	31.33	4.38±1.12	2.53±0.48
2021 年 12 月	13.55±4.54	82.57	34.75	3.47±0.98	1.99±0.39
2022 年 1 月	11.84±4.14	85.21	40.00	2.10±0.70	1.75±0.35

数量，并且随意加入药品，就可能导致某些药品的库存量不够当日使用，需要多次补药，增加工作量；某些药品的库存量太大，既增加加药工作时间又浪费轨道。所以随着患者的用药需求、医院用药目录品种的不断调整、药品包装盒的改变以及处方联用药品的规律，需要不断调整机内药品品种、数量及轨道数目，以充分利用机内空间，减少加药次数，提高调剂工作效率，缩短患者取药等候时间，对构建和谐的医患关系具有重要意义，同时符合智慧化药房建设的要求。

5.2　采用高峰期出药量求药品最佳轨道数优势

目前文献报道的储位优化是通过设定轨道利用率最佳值来调整储放轨道数，用公式描述即为：$F = N/S = N/(Q \times V)$（F 为轨道利用率，N 为某药品的平均日发药量，S 为机内某药品的最佳储放量，Q 为某药品占用的轨道数，V 为每条轨道储放药盒数），并且通过设定某药品 S 最佳与 N 的倍率关系，通常文献设定 S 最佳 $= 1.5N$，即根据公式求出 Q[7]。此方法计算相对方便，但不是所有的药品最佳储放量与平均日发量都存在 1.5 倍的比率关系，所以并不适用于所有的医院及所有的药品。

与设定轨道利用率优化储位相比，高峰期出药量求药品最佳轨道数适用于不同地方不同药品的储位持续优化，方法简单易懂、准确可行，能快速判断出机内不同药品的最大库存数是否满足门诊药房当日的用药需求，是一个符合规定且人性化的创新应用，可为其他医疗机构智慧化药房的储位优化提供有价值的参考。药师可结合本院

患者的用药需求和疾病的季节性规律，定期导出出药记录，获得高峰期用药数量，及时调整机内药品的品种和轨道数。

5.3 根据处方联用规律储放药品的优势

如果同张处方中几种药品存储轨道离得较远，自动发药机传输皮带就需要更多的时间才能把所有药品传输到发药出口，所以药品的存储位置很大程度上影响着处方的调配速率。药师可结合本院实际处方用药情况，将具有关联性的药品存放在临近的储位，可缩短传输带的工作距离，提高处方的调配速率[10]。除此之外，还可结合 Apriori 算法挖掘药品之间的关联规律[11]，持续优化机内药品的位置，设计出最优的出药路径，加快自动发药机的调配速度，进一步完善智慧化药房工作流程，促进其发挥最大效能。

5.4 储位优化过程中需要注意的问题

首先，药师在选择轨道时应注意轨道与药盒之间须预留一定的空间，如果预留空间不足，会导致药盒不能顺利滑入轨道，出现药盒拱起甚至空缺现象。反之，当药品批量滑落轨道后，则会导致药盒在轨道倾斜甚至重叠现象，不但造成机内库存不准，而且影响出药和补药的正常操作。其次，由于自动发药机的空间和轨道数是一定的，药师无法将所有药品都按照处方联用规律和最佳轨道数优化来优化，且每月若将所有药品按最佳储药量来调整机内药品轨道数，无疑会增加药师的工作量，因此，药师可根据本院出药频率的大小依次优化。最后，自动化发药机虽然改变了传统的人工调配模式，但同时也对药师提出了更高的要求，因为在自动化发药机运行过程中，出现设备故障是无法避免的。药师除了学习药学专业知识外，还要掌握基本的设备维护知识和处理常见故障的能力，以保证自动化设备的正常运转[12]。

参考文献

[1] 国家卫生健康委员会，国家中医药管理局 . 关于加快药学服务高质量发展的意见 [Z]. 2018-11-28.

[2] 张亚坤，洪亮亮，黄艺玲，等 . 门诊自动化药房工作流程优化实践 [J]. 药学服务与研究，2020，20（1）：70-72.

[3] 张元，李奚晗 . 我国门诊自动化药房建设的发展现状与建议 [J]. 中国药房，2018，29（1）：11-16.

[4] 汪铁山，王穗琼，庄少雄，等 . 我院门诊药房自动化发药系统的建设与实践 [J]. 中国药房，2020，31（19）：2415-2421.

[5] 林艳，蔡志波，黄梦，等 . 国内门诊药房自动化发药系统发展现状及使用效果评价 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（9）：1131-1138.

[6] 卢道兵，梁茂本，韩庆余 . 门诊药房自动化发药系统的构建和应用 [J]. 中国医疗设备，2019，34（1）：91-94.

[7] 沈颖燕，陈秀兰，李桃 . 采用轨道利用率算法持续优化自动发药机内药品储位管理 [J]. 中国药房，2017，28（28）：4029-4032.

[8] 吴晓云，何宇麟 . 自动化药房系统在门诊药房的应用及优化管理 [J]. 中国处方药 ，2022，20（1）：53-54.

[9] 林秀丽，洪亮亮，张小燕，等 . 智慧化门诊药房存在的问题及其改进措施 [J]. 药学服务与研究，2018，18（6）：478-480.

[10] 鲁萍，崔亮，漆新文，等 . 最小时间算法优化自动发药机初始储位的效果分析 [J]. 中国药房，2015，26（22 ）：3112-3114.

[11] 洪卫兰，陈桂强，王持，等 . 基于 Apriori 算法的自动化药房盒装药品储位优化管理 [J]. 中国药业，2020，29（22）：14-17.

[12] 周冬初，颜素华，肖岚，等 . 自动化药房管理系统在门诊药房的应用 [J]. 中南药学，2015，13（5）：550-554.

（收稿日期：2023-03-19；修回日期：2023-05-23）

关于药品检验能力验证 Z 比分数判定方法改进的探讨

寻延滨[1]，敖红光[2]，刘利群[1]，白政忠[1]（1. 黑龙江省药品检验研究院，哈尔滨　150001；2. 哈尔滨理工大学测控技术与通信工程学院，哈尔滨　150080）

摘要：目的　通过对各维度数据的综合分析，对现有 Z 比分数的评价方法进行了补充完善。**方法**　参考 GB/T 28043—2019《利用实验室间比对进行能力验证的统计方法》和 CNAS-GL002：2018《能力验证结果的统计处理和能力评价指南》，结合新建立的图示方法，通过实验室间比对结果的实例，对新建立的评价方法进行探索分析。**结果**　改进后的评价方法和图示能够准确地反映参加者在整体活动中所处的位置，对其综合能力作出客观真实的评价。**结论**　现行的 Z 比分数方法和图示仅从单一维度展示了参加者在特定方面的排序，所反馈的信息量有限。新建立的方法能够有效利用多元数据，客观全面地评价分析实验室的真实能力水平。

关键词：实验室能力验证；Z 比分数；能力比对；稳健统计
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2784-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.038

Improvement of the judgment method of Z-score for drug inspection and proficiency testing

XUN Yan-bin[1], AO Hong-guang[2], LIU Li-qun[1], BAI Zheng-zhong[1] (1. *Heilongjiang Institute for Drug Control*, *Harbin* 150001; 2. *Harbin University of Science and Technology*, *Harbin* 150080)

Abstract: Objective To improve the existing evaluation methods for Z-ratio scores through comprehensive analysis of data from various dimensions. **Methods** Based on the GB/T 28043—2019 *Statistical methods for proficiency testing by interlaboratory comparison* and CNAS-GL002: 2018 *Guidance on Statistic Treatment of Proficiency Testing Results and Performance Evaluation*, and combined with the newly established graphical method, the new method was evaluated against the laboratory comparison results. **Results** The improved evaluation method and diagram accurately reflected the position of participants in the overall activities, and provided an objective and realistic image of their comprehensive abilities. **Conclusion** The current Z-score method and diagram only show the ranking of participants in specific aspects from a single dimension with limited amount of feedback. The new method uses multivariate data to objectively and comprehensively evaluate the real ability of the laboratory.

Key words: laboratory proficiency testing; Z-score; capability comparison; robust statistics

能力验证（proficiency testing，PT）是利用实验室间比对确定实验室检测活动的能力，是实验室认可现场评审的重要补充，同时也是证明、判断和监督实验室能力的重要及有效的手段[1-6]。通过能力验证，实验室可从中查找自身存在的不足，并采取有效的措施弥补质量管理中的疏漏之处，对质量控制和保证起到补充和完善的作用，确保质量管理体系能够持续、有效地运行。国家药品监督管理局每年均组织包括药品、化妆品和医疗器械在内的能力验证活动，通过对全国各级药品检验检测机构业务水平的考核，促进整体行业能力的提升和高质量发展。然而，要做到客观评价实验室的综合能力，除要求参加实验室应提供真实准确的结果外，所采用的统计分析技术对结果的判定也具有显著的影响。目前对于能力验证结果的判定，通常可以采用差值、百分相对

作者简介：寻延滨，男，副主任药师，主要从事药物分析、药品质量标准研究及化妆品检验研究工作，email：xunxyb@aliyun.com

差、Z 比分数、En 值等统计量进行分析，其中 Z 比分数法因为能够同时满足单一样品或分割水平样品对的结果分析，并且能够较为直观地反映出能力验证结果水平的差异和趋势，从而获得广泛的使用[4]。在药品领域能力验证的案例分析中，笔者认为对以考核形式为单一样品的统计，该计算方式没有疑议，但对以考核形式为样品对的统计，其未能综合利用数据对参加者进行客观全面的评估，导致信息没有得到充分的发掘和反馈，有必要在现行评价方法的基础上进一步完善，以便通过量化指标实现对每一个参加实验室的客观评价。下面就以我院组织的省内药品生产企业及检验机构的实验室间比对结果的实际案例进行演示，为突出效果，并未将可能离群的数据剔除。

1　现行 Z 比分数的图示方式

在统计单一样品或分割水平样品对时，柱状图（也称序列图）是最常用的图示之一[4, 7]。该图示的优点是可以直观地获得实验室的比对结果信息，并比较参加者在该项能力比对活动中所处的位置。然而对于数据结果为样品对的比较，其必须使用 2 个图例来分别表示实验室内比对结果（ZW）和实验室间比对结果（ZB）（见图 1 和图 2，其中 a、b 分别代表参加者 a、参加者 b，下同），即需将数据分割后进行不同目的的评价。该方式导致组织者未能有效地综合利用数据来分析各实验室在整体能力比对活动中所处的位置，进而缺失从宏观方向提出改进措施的建议，不利于参加者判断下一步的改进方向。而尧敦图虽然是为两个样品的结果对而设计，但鉴于其绘制较为烦琐，且不能用来准确评定和指示实验的比对结果[4]，在实际统计评价中一般较少使用，在本文中也不予探讨。

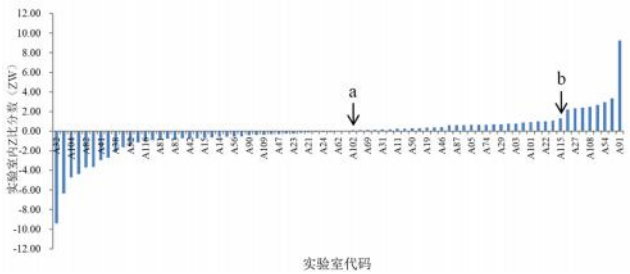


图 1　实验室内 Z 比分数（ZW）的柱状图

Fig 1　Bar chart of ZW-score

2　改进后的 Z 比分数图示方式和方法比较

笔者曾采用将 Z 比分数（ZB 和 ZW）的数据进行综合处理的方法，以 Z 比分数的判定标准为边界，用散点图表示（见图 3）[8]。经与实际数据对比，其图示信息与按 Z 比分数评价的验证结果完全一致，从图中可以清晰地辨别各实验室在整体能力验证活动中所处的位置，以及其结果与其他实验室间存在的差异和需要改进的方向，相关文献也证实了该方法的可行性[9]。然而，该方法虽然具备良好的指示性和可操作性，但因缺少进行量化的具体方法和标准，导致在进行比较时仍然存在不足，无法进一步有效利用数据开展综合评估。

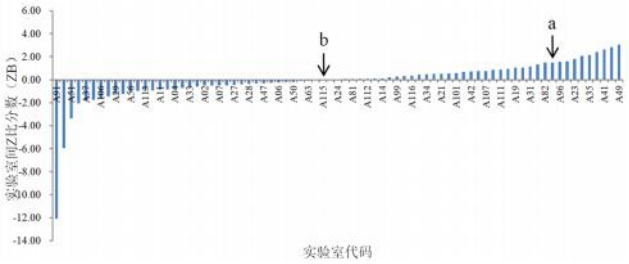


图 2　实验室间 Z 比分数（ZB）的柱状图

Fig 2　Bar chart of ZB-score

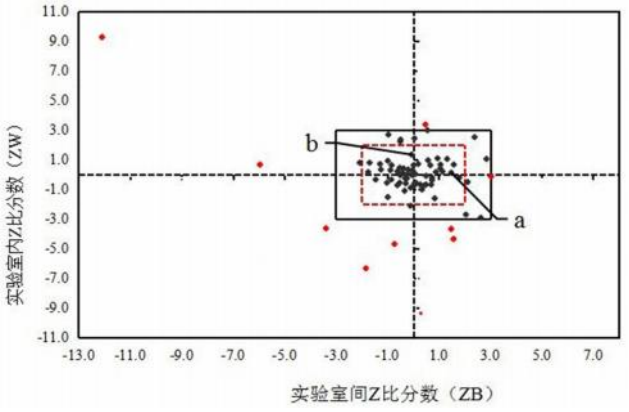


图 3　Z 比分数散点图

Fig 3　Scatter chart of Z-score

通过对散点图的分析可以获知，任意数据点均代表了参加单位的实验室间和实验室内的 Z 比分数结果。将散点图中的各数据点与原点连接，可以发现各线段的长度不尽一致，而该长度所代表的实际意义，是将两种维度的考察结果叠加计算后得出的与 Z 比分数中位值的偏离程度，程度的大小与线段的长短成正相关。即任意点（X）到原点（O）的距离（OX）的平方等于该点 ZB 值和 ZW 值的平方和（$OX^2 = ZB^2 + ZW^2$），开方后得到的数值可暂定义为综合 Z 比分数。据此，我们可以按该方法计算后得到的数值，对所有参加者进行重新排序，进而评估出它们的综合能力水平。

结合实际数据的分析可以发现，在进行实验室内（ZW）数值统计比较时（见图 1），参加者 a 的结果显著小于参加者 b 的结果，但在进行实验室间（ZB）数值统计分析时（见图 2），两者则恰好相反（考虑到对称分布的原因，即使两者分

布在中位值的两侧，亦不影响对其偏离程度的判断）。按现有的评价方法，我们在进行单因素考察时确实可以按照参加者的结果进行排序，但却忽略了其本质上仅为从一维数据的角度考察了单一方面水平的事实。该结果所反馈的信息是割裂的、不完整的，并没有结合多元数据进行深入分析，缺乏从整体层面获知参加者的综合能力，从而无法给出客观科学的比较和评价。

按新方法评价后，虽然显示参加者 b 的排名略好于参加者 a（见图 4），但两者的整体位置相较于单因素比较时呈显著下滑趋势，均处在中等偏后的位置，其他参加者的排序也存在不同程度的变化。这也提示组织方不应只着眼于单一因素的考查，整体能力的考核才是能力比对评价的最终目的，而新的评价方法也与实验室应全面提升质量控制的理念要求相契合。

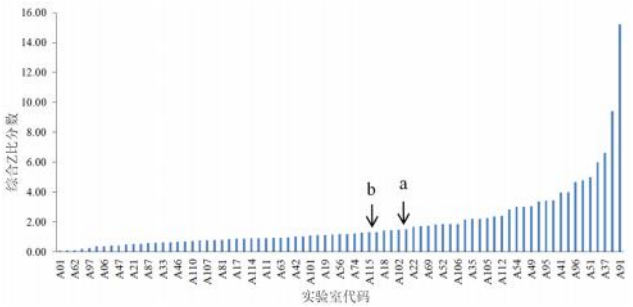


图 4　实验室综合 Z 比分数的柱状图

Fig 4　Bar chart of comprehensive Z-score

3　讨论

3.1　现行 Z 比分数评价方式的不足

在药品领域的能力验证中，除定性实验（如微生物）及个别采用平均值和标准偏差进行结果统计和评价的定量实验（如溶出度）外，包括本文案例在内的大多数可以获得具体数值的定量项目均采用稳健统计方法，通过计算 Z 比分数的方式进行结果评价。对于单一样品或以单一水平进行的能力验证，该方法可以有效地区分结果是否满意，并以柱状图的形式直观地展示参加者的排序情况。但对于较常采用的样品对形式，现行的评价方法则不够完善，尚存在一定局限性，即虽然从不同角度考察了参加者在特定方面所展现的能力，却忽视了不同项目间结果的联系和比较，且各项目独立的评价结果往往让参加者无法判断自身在整体能力验证活动中所处的位置，组织者也不易比较判断各结果的优劣并发现可能潜在的问题，而这显然有悖于能力验证设计的初衷，即达到考察实验室综合能力的目的。

3.2　评价方式改进后的特点和意义

从概念上来说，Z 比分数所采用的限度划分方式与等级分类相似，即认为等级内为同一水平，不再进行细分，但在实际工作中，显然越趋近于中位值的数据，表明参加者的综合技术能力越强、整体质量管理水平越高。改进后的评价方法综合考虑了不同维度下数据对结果的贡献程度，为组织方评估参加者的综合能力提供了新的有效的评价工具。虽然最终的结果评定仍由 Z 比分数来确定，但新设计的评价方法和图示方式可以更直观地展现各参加者数据的离散程度和整体排名情况，从评价方法和展示形式上均可以有效弥补现有评价方式的不足。这也从客观上提醒所有参加者不应只片面地看待能力比对结果，而更应该切实提高自身素质，进而促进实验室的检测能力和管理水平得到全面提升。

参考文献

[1] ISO/IEC 17025：2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S]. 2017.

[2] 李晶，项新华，张河战 . 实验室比对统计分析方法的比较 [J]. 中国药学杂志，2016，51（2）：139-143.

[3] 徐建平，刁凤鸣 . Z 比分数在实验室能力验证检测中的运用 [J]. 环境监测管理与技术，2003，15（1）：42-43.

[4] CNAS-GL002：2018. 能力验证结果的统计处理和能力评价指南 [S]. 2018.

[5] 佟艳春，陈景华，胡洛翡，等 . 实验室测量审核结果的评定方法研讨 [J]. 冶金分析，2009，29（7）：28-32.

[6] 程铁辕，何开蓉，张莹，等 . 能力验证中数据统计处理方法的优选 [J]. 检验检疫学刊，2011，21（4）：71-73.

[7] GB/T 28043—2019. 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法 [S]. 2019.

[8] 寻延滨，敖红光，王林波 . 关于实验室能力比对比分数统计结果的几种图示方式的比较 [J]. 中南药学，2016，14（12）：1404-1407.

[9] 赵新玥，赵文，陈华 . pH 测定检验能力验证及评价新方法的应用 [J]. 药物分析杂志，2018，38（3）：545-550.

（收稿日期：2023-03-16；修回日期：2023-05-18）

药品集中采购政策背景下仿制药与原研药有效性和安全性对比的系统综述

陈思煌[1]，谢菡[2]，魏璟璇[3]，胡美玲[1]，王鑫梅[1]，李俐[2*]（1. 中国药科大学南京鼓楼医院药学部，南京 210008；2. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京　210008；3. 南京中医药大学鼓楼临床医学院药学部，南京　210008）

摘要：目的　梳理药品集中带量采购（集采）政策背景下仿制药与原研药有效性和安全性对比的原始研究，为集采中选仿制药临床评价提供参考。**方法**　系统性检索 2018 年 1 月—2021 年 12 月中国知网、万方、PubMed 和 Cochrane 数据库中关于我国仿制药与原研药疗效与安全性对比文献。提取作者、药品、研究方法及结果信息，使用 ROB2.0 和 ROBINS-I 偏倚风险评估工具进行文献质量评价。**结果**　共纳入 91 篇文献。其中，77 篇文献偏倚风险为高至极高；93.4% 的入选文献表明仿制药与原研药有效性一致；86.2% 的入选文献表明仿制药与原研药安全性一致。抗感染药、抗肿瘤及免疫用药、心血管系统药、血液和造血器官药、消化系统和代谢系统药是多数的研究药物类型，入选文献研究主要集中在慢性病治疗领域。**结论**　大多数仿制药临床研究数据不足，尤其是急性病治疗药物。多数入选的文献存在高偏倚风险，报告质量需提高。医疗机构药师参与的真实世界研究可以为仿制药临床研究提供参考和思路 。

关键词：药品集中带量采购；仿制药；有效性；安全性；系统性综述
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2787-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.039

Clinical efficacy and safety between generic and original drugs under the centralized drug procurement policy: a systematic review

CHEN Si-huang[1], XIE Han[2], WEI Jing-xuan[3], HU Mei-ling[1], WANG Xin-mei[1], LI Li[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210008; 2. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University*, *Nanjing* 210008; 3. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital of Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To sort out original studies on the clinical efficacy and safety between generic drugs and original drugs, and provide reference for the selection of generic drugs for the National Centralized Drug Procurement Policy. **Methods** From January 2018 to December 2021, CNKI, WanFang, PubMed and Cochrane Library were retrieved to collect clinical studies comparing the efficacy and safety of generic drugs with original drugs. The authors, drugs, research methods and results were collected and analyzed. Bias risk was analyzed for included studies with ROB2.0 or ROBINS-I. **Results** Totally 91 publications were included, 77 of which had high to extremely high risk of bias. 93.4% of the enrolled studies indicated no significant differences in efficacy between generic drugs and original drugs; 86.2% of the enrolled studies indicated no significant differences in safety between generic drugs and original drugs. Anti-infection drugs, anti-tumor and immunological drugs, cardiovascular drugs, blood and hematopoietic organs drugs, digestive and metabolic drugs were the main drug types studied. Drugs for chronic diseases were the main types of drugs studied. **Conclusion** Clinical data for most generic drugs are lacking,

基金项目：江苏省药学会 - 奥赛康药学专项科研资助项目（No.A202108）；江苏省卫生健康委员会药品临床综合评价项目；江苏省研究型医院学会 - 精益化用药 - 石药专项科研基金资助项目（No.JY202019）；江苏省医院协会医院管理创新研究课题（No.JSYGY-1-2021-205）；南京市医学科技发展项目（No.GAX21279）；南京大学现代医院管理与发展研究所课题（No.NDYG2021004）。
作者简介：陈思煌，男，在读硕士研究生，主要从事临床药学方面的研究，email：cshkeenic02@163.com　*通信作者：李俐，女，硕士研究生导师，副主任中药师，主要从事临床药学、医院药事管理方面的工作，email：njgllily@163.com

especially drugs for acute diseases. Most included randomized clinical trials have a high risk of bias, and the quality of the reports needs improvement. Real-world studies involving pharmacists in medical institutions can provide new clinical evidence for generic drugs.

Key words: centralized drug procurement policy; generic drug; efficacy; safety; systematic review

为解决药价虚高，减轻用药负担，我国着重推进仿制药质量与疗效一致性评价（以下简称“一致性评价”）和国家组织药品集中带量采购（以下简称“集采”）。2017 年 8 月一致性评价工作移交原国家食品药品监督管理局药品审评中心，标示着一致性评价进入具体实施阶段 [1]。2018 年 11 月起集采开始试点。集采政策以通过一致性评价为优先考虑条件，有效地过滤了低价劣质的仿制药 [2]。

一致性评价以生物等效性试验为基石，但是只能间接预测药物临床效果 [3]。通过一致性评价的仿制药与通过随机临床试验（randomized clinical trial，RCT）批准上市的原研药相比，缺乏详实的临床研究数据。同时，在集采政策实施过程中，学者们通过问卷调查、访谈 [4] 及医院 [5] 或地区 [6] 的实例分析等方式，提出对仿制药疗效的担忧。可见，以健康受试者药动学参数为终点评价指标的生物等效性试验不能完全说服患者及医务工作者，只有详实的临床研究数据和充分的循证医学证据才能够更好地评价仿制药的临床疗效。

本文旨在系统梳理仿制药对比原研药临床研究的原始文献，总结仿制药有效性和安全性的研究方法、研究类型和研究结果，为集采中选仿制药临床评价提供参考。

1　方法

1.1　搜索策略

检索中国知网、万方、PubMed 和 Cochrane 数据库，获取关于我国仿制药与原研药有效性和安全性的文献（语种限中、英文）。研究对象：我国患者；干预措施：使用国产仿制药品；对照组：使用原研药品；结局：与对应研究疾病相关的临床终点；研究类型：RCT 与非随机临床研究。检索的主题词：中文使用“[（国产）OR（仿制）]AND[（进口）OR（原研）]AND[（安全性）OR（有效性）OR（疗效）OR（效果）]”，英文使用“[（domestic）OR（generic）]AND[（import）OR（original）]AND[（safe）OR（effect）AND（China）OR（Chinese）]”，由独立研究员进行文献检索。由于 2017 年 12 月原国家食品药品监督管理局药品审评中心开设了一致性评价专栏，受理量在 2018 年急速增加 [7]，同时，2018 年也是集采政策试点的开始。所以，文献检索的时间范围为 2018 年 1 月至 2021 年 12 月。

1.2　纳入排除标准

纳入标准包括：① 发表时间在 2018 年 1 月至 2021 年 12 月；② 研究类型为 RCT 和非随机临床研究；③ 中国人群；④ 使用我国本土企业生产的仿制药品对比原研药品。排除标准包括：① 系统性评价和 / 或荟萃分析；② Ⅰ期临床试验或生物等效性研究；③ 非对比仿制药品与原研药品临床有效性和 / 或安全性的文献。由独立研究员进行文献筛选。

1.3　文献质量评价

入选 RCT 的文献质量评价使用 Cochrane 推荐的偏倚风险评估工具 ROB（risk-of-bias tool，ROB）2.0[8]。ROB2.0 评估包括随机偏倚、干预措施偏倚、结局数据缺失的偏倚、结局测量偏倚和选择性报告偏倚五个领域，每个领域中多个信号问题供客观判断 [9]。每个领域偏倚风险包括低、中、高三个风险等级。文献整体偏倚风险取决于领域中最高风险等级。关于非随机临床研究的文献质量评价，包括非随机的对照试验、观察性研究等，使用 Cochrane 推荐的偏倚风险评估工具 ROBINS-I（risk of bias in non-randomised studies-of interventions，ROBINS-I）[10]。ROBINS-I 评价包括患者基线或时变混杂偏倚、选择受试者偏倚、干预分类偏倚、干预措施偏倚、结局数据缺失的偏倚、结局测量偏倚和选择性报告偏倚七个领域，每个领域中多个信号问题供客观判断 [11]。每个领域偏倚风险包括低、中、高、极高偏倚风险和无信息五个风险等级。文献整体偏倚风险取决于领域中最高风险等级。由两名独立研究员完成文献质量评价。

1.4　数据提取和分析

提取作者信息、仿制药通用名及商品名（或厂家）、研究类型及设计、样本量、安全性或有效性研究结论。提取后的数据通过 EXCEL 进行统计处理。药品信息以通用名，按照药品的解剖 - 治疗 - 化学分类系统进行药物分类，同时按照对应的疾病分成慢性病治疗药物与急性病治疗药物两类 [12]，为深入分析文献研究领域提供帮助。

2　结果

共纳入 91 篇文献，纳入排除流程如图 1 所示。表 1 总结了入选文献的数量及研究药物的通用名，共涉及 50 种药物。其中，氯吡格雷仿制

药的相关文献数量最多，次之为伊马替尼。抗感染药、抗肿瘤及免疫用药、心血管系统药、血液和造血器官药、消化系统和代谢系统药是研究的主要药物类型。慢性病治疗药物的相关研究文献多于急性病治疗药物。入选文献研究药物分类具体如图 2 所示。

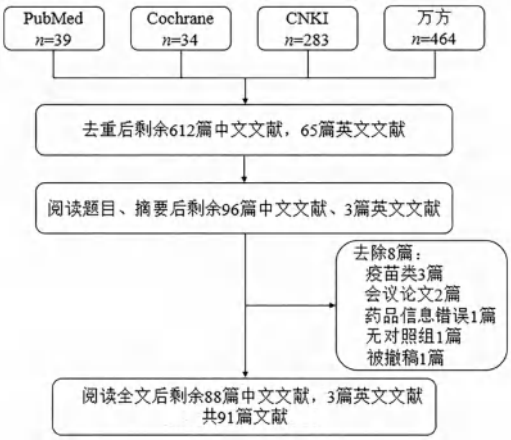


图 1　文献筛选流程

Fig 1　Flow chart of literature

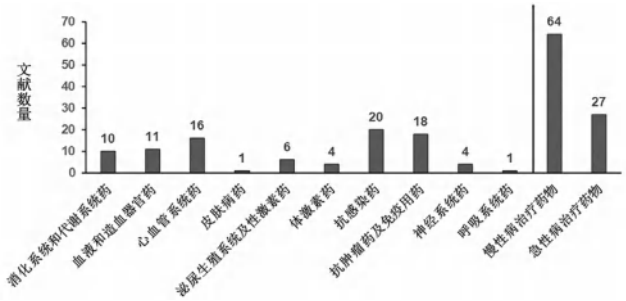


图 2　入选文献研究药物分类

Fig 2　Classifications of drugs from included studies

2.1　研究类型及文献质量评价

入选文献研究类型如图 3 所示。单中心研究是主要研究类型，多中心研究仅 6 篇，仅有 2 篇写明为真实世界研究。此外，有 34 篇文献联合进行药物经济学研究。

在 43 篇 RCT 中，有 22 篇随机分配方法使用随机数字表法、1 篇双色球法、2 篇按入院日期或入院顺序随机分配，其余研究未写明随机方法，并且均未对于分配隐藏详述。同时，有 40 项研究采用开放标签，3 项双盲。另外，仅有 1 篇写明了临床试验批件号。43 篇文献的质量评价仅 1 篇为中偏倚风险，其余均为高偏倚风险（见图 4）。

在 48 篇非随机临床研究的文献质量评价中，有 35 篇是高及极高偏倚风险（见图 5）。

表 1　入选文献及药物通用名

Tab 1　Included literature and China approved drug names

文献数量 / 篇	研究药物
11	氯吡格雷
7	伊马替尼
4	阿托伐他汀、万古霉素
3	艾司奥美拉唑、氨氯地平、恩替卡韦、卡前列素、美罗培南、瑞舒伐他汀
2	奥曲肽、卡培他滨、雷贝拉唑、莫西沙星、头孢呋辛、硝苯地平、重组人促卵泡激素
1	阿德福韦酯、阿卡波糖、阿奇霉素、奥氮平、奥司他韦、比索洛尔、丙泊酚、雌激素（软膏）、达沙替尼、降压药、多西他赛、氟哌噻吨美利曲辛、格列齐特、吉非替尼、吉西他滨、精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液（25R）、咖啡因、亮丙瑞林、门冬胰岛素 30、培美曲塞、硼替佐米、去氨加压素、舍雷肽酶、生长抑素、他汀类、特比萘芬、替莫唑胺、替诺福韦酯、缬沙坦、亚胺培南西司他丁、左氧氟沙星、阿扎胞苷、赖脯胰岛素

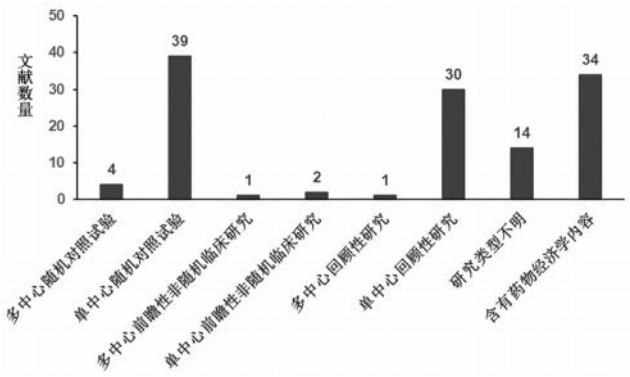


图 3　入选文献研究类型

Fig 3　Study types of included studies

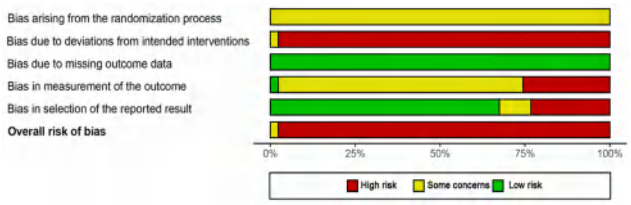


图 4　入选随机对照试验偏倚风险评估结果

Fig 4　Risk of bias assessments in randomized controlled trails

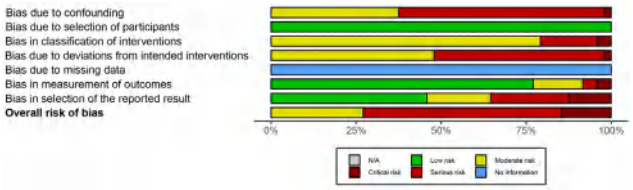


图 5　入选非随机对照研究偏倚风险评估结果

Fig 5　Risk of bias assessments in non-randomized studies

2.2　样本量

入选文献样本量不超过 200 例的研究有 68

项，样本量最小的研究仅 28 例。样本量超过 200 例的研究有 23 项，样本量最大的研究共 6528 例。

2.3　入选文献研究结果

涉及有效性的研究有 91 篇。其中，有效性指标差异有统计学意义的文献仅 6 篇（6.6%）。有效性指标差异有统计学意义的药物有阿卡波糖、奥司他韦、丙泊酚、培美曲塞、重组人促卵泡激素和头孢呋辛，详细结果如表 2 所示。存在有效性显著差异的研究结果表明，仿制药的临床疗效可能更优于原研药。

涉及安全性研究 58 篇。其中，差异有统计学意义的仅有 8 篇（13.8%）。主要安全性指标差异有统计学意义的药物有阿卡波糖、卡前列素氨丁三醇、莫西沙星、培美曲塞、万古霉素、左氧氟沙星，详细结果如表3所示。除阿卡波糖的对比研究以外，其余研究结果均指出原研药安全性优于仿制药，同时均未报道导致残疾或死亡的严重药品不良反应。

将结果或者部分指标差异有统计学意义的 10 种药物以急、慢性病治疗药物分类，仅有阿卡波糖和培美曲塞 2 种慢性病治疗药物。可见，急性病治疗药物相比慢性病治疗药物更易出现有效性或安全性统计学差异。

表 2　有效性指标差异有统计学意义的文献研究结果

Tab 2　Results of included literature with significant differences in efficacy indicators

作者	药物（商品名）	有效性指标	结果（进口组对比国产组）
牛艳丽 [13]	阿卡波糖（未注明）	显效：空腹血糖＜ 7.2 mmol・L^{-1} 或降幅＞ 30%，餐后 2 h 血糖＜ 8.25 mmol・L^{-1} 或降幅＞ 30%，患者症状基本消失或显著缓解；有效：空腹血糖＜ 8.25 mmol・L^{-1} 或降低 10% ～ 29%，患者症状无显著缓解；无效：未达到以上标准；总有效人数：显效加有效人数	显效 [*n*（%）]：20（50.0）*vs* 25（62.5）；有效 [*n*（%）]：11（27.5）*vs* 7（14.0）；无效 [*n*（%）]：9（22.5）*vs* 9（18.0）；总有效率 [*n*（%）]：31（72.5）*vs* 32（82.0）
龙土新 [14]	奥司他韦（可威）	显效：呼吸道症状完全消失，体温恢复正常水平；好转：呼吸道症状缓解，体温接近正常值；无效：呼吸道症状无缓解甚至加重，发热症状未缓解	显效 [*n*（%）]：62（68.89）*vs* 78（86.67），*P* ＝ 0.004；有效 [*n*（%）]：15（16.67）*vs* 10（11.11），*P* ＝ 0.281；无效 [*n*（%）]：13（14.44）*vs* 2（2.22），*P* ＝ 0.003；总有效率 [*n*（%）]：77（85.56）*vs* 88（97.78），*P* ＝ 0.003
郑超等 [15]	丙泊酚（力蒙欣、乐维静、泊得乐）	丙泊酚用量；麻醉诱导时间、苏醒时间、检查时间等	[国产组分为泊得乐（BD）组、力蒙欣组（LM）、乐维静（LW）组]：丙泊酚用量（mg）：(82.00±10.15）*vs*（88.60±12.97)（BD 组），*P* ＜ 0.05；麻醉诱导时长（s）：(31.05±1.88）*vs*（29.80±4.98)（LM 组），*P* ＜ 0.05；苏醒时间（min）：(4.91±0.21）*vs*（4.59±0.67)（LM 组），*P* ＜ 0.05
谢嫣嫣等 [16]	培美曲塞（奥天成）	完全缓解、部分缓解、疾病稳定、疾病进展	完全缓解 [*n*（%）]：6（16.67）*vs* 0（0.00），*P* ＜ 0.001；部分缓解 [*n*（%）]：6（16.67）*vs* 3（6.50），*P* ＝ 0.012；疾病稳定 [*n*（%）]：20（55.56）*vs* 38（82.60），*P* ＝ 0.008；疾病进展 [*n*（%）]：4（11.11）*vs* 5（10.87），*P* ＝ 0.682
于丽等 [17]	头孢呋辛（未注明）	出现术后疑似感染和确诊感染为无效，未出现为有效	有效率（%）：43.41 *vs* 33.17，*P* ＝ 0.040；未详细列出体温、白细胞计数、降钙素原、C 反应蛋白对比
		疑似感染：术后 3 d 无明确感染灶，但出现体温＞ 38 ℃、白细胞计数＞ 10×10^{9}・L^{-1} 等感染指标异常，导致预防用药时间延长或更换抗菌药物的判断为疑似感染；确诊感染：符合《医院感染诊断标准》的术后感染	
袁涛等 [18]	重组人促卵泡激素（金赛恒）	子宫内膜厚度和类型，雌激素、孕激素、黄体生成素水平，应用促性腺激素天数以及用量，流产率、多胎妊娠率等	雌激素（ng・L^{-1}）：(4251.64±2659.76）*vs*（3466.96±2147.80），*P* ＝ 0.025；孕激素（μg・L^{-1}）：(1.28±0.72）*vs*（1.08±0.58），*P* ＝ 0.036；流产率（%）：27.3 *vs* 15.8，*P* ＝ 0.015；多胎妊娠率（%）：9.1 *vs* 47.4，*P* ＝ 0.049

3　讨论

3.1　我国大部分仿制药疗效与安全性同原研药一致

本研究总结了集采政策背景下仿制药对比原研药有效性和安全性研究文献的发表情况、方法和结果。结果表明 93.4% 的文献中原研药和仿制药有效性类似；86.2% 的文献中原研药和仿制药安全性类似。同 Gothe 等 [25] 关于仿制药替代系统性评价的结果，存在安全性差异的入选文献多于存在有效性差异的文献。仿制药的有效性有可能优于原研药，但是，原研药的安全性普遍优于仿制药。

3.2　仿制药临床研究匮乏

本研究结果显示，除氯吡格雷、伊马替尼、阿托伐他汀等以外，其余药品临床研究匮乏。氯吡格雷治疗冠心病 [26]、缬沙坦治疗原发性高血压 [27]、紫杉醇抗肿瘤 [28] 国产仿制药与原研药对比的 meta 分析，结果均表明仿制药与原研药疗效及安全性相

表 3　安全性指标差异有统计学意义的文献研究结果

Tab 3　Included literature with significant differences in safety indicators

作者	药物（商品名）	安全性指标	结果（进口组对比国产组）
牛艳丽 [13]	阿卡波糖（未注明）	不良反应发生率	不良反应发生率：20（50.0%）*vs* 8（20.0%），$P < 0.05$
黄亭等 [19]	卡前列素氨丁三醇（安列克）	恶心、呕吐、头痛等	恶心：14（7.5%）*vs* 29（15.4%），$P = 0.017$；呕吐：17（9.1%）*vs* 36（19.1%），$P = 0.006$；头痛：4（2.2）*vs* 13（6.9），$P = 0.027$
赵冰封等 [20]	卡前列素氨丁三醇（安列克）	恶心、呕吐、腹泻等	腹泻：5（2.5%）*vs* 20（10.0%），$P = 0.002$；恶心、呕吐：4（2.0%）*vs* 15（7.5%），$P = 0.010$
洪明明等 [21]	莫西沙星（佰美诺）	肝酶升高、心脏不良反应、烦躁、睡眠障碍等总不良反应发生率	总不良反应发生率：8（12.5%）*vs* 17（23.9%），$P < 0.05$
张亮等 [22]	莫西沙星（佰美诺）	药物过敏、血糖异常等	药物过敏（*n*）：0 *vs* 9，$P = 0.01$；血糖异常（*n*）：2 *vs* 8，$P = 0.041$
谢嫣嫣等 [16]	培美曲塞（奥天成）	白细胞减少、贫血、粒细胞减少等	总不良反应（*n*）：4 *vs* 16，$\chi^2 = 6.136$，$P = 0.013$；各不良反应发生率无差异
何效平等 [23]	万古霉素（来可信）	红人综合征、白细胞降低、血肌酐升高	总不良反应发生率：17（15.74%）*vs* 32（29.63%），$P = 0.015$；血肌酐升高：13（12.04%）*vs* 28（25.93%），$P = 0.03$
陈嘉宁等 [24]	左氧氟沙星（厂家：宜昌人福）	荨麻疹、血小板减少症、呼吸困难等总不良反应发生率	总不良反应发生率：1（1.61%）*vs* 11（17.74%），$P = 0.002$

似。入选文献研究多集中在慢性病治疗领域，急性病治疗药物研究的文献数量还不足它的一半。亟待开展急性病治疗药物仿制药的临床研究。

3.3　部分研究质量较低

入选文献存在研究质量较低、结局指标统计学叙述不够完善的问题。Meta 分析 [26-28] 和陈朝鑫等 [29] 对我国仿制药与原研药的药物经济学研究进行的系统综述指出的，相关研究质量较低，质量需要改进。此外，入选 RCT 多采用开放标签，使用 ROB2.0 评价偏倚风险定然高于双盲 RCT。双盲 RCT 更适合用于验证体外实验、动物实验和某些偶然因素导致出现差异的试验 [30]，然而试验评价的对象是已经通过一致性评价的仿制药，是否仍需要如此严谨的双盲设计仍需要考虑。前瞻性、随机、开放标签、盲终点的临床试验相比传统的双盲 RCT，具有更贴合日常诊疗活动和成本更低的优点 [31]，也已经应用在利伐沙班和华法林在抗磷脂综合征高危患者的评价中 [32]。通过一致性评价的仿制药可通过该研究类型获取更高质量的循证医学证据。

3.4　局限性

本研究存在局限性：由于回避利益冲突，部分研究入选文献未写明仿制药商品名；为广泛地收集相关文献，没有规定入选研究药物的明确临床终点，可能会导致部分药物有效性、安全性结局评价的偏倚。本研究并非数据严谨的荟萃分析，因此特异性识别某个药品并对它进行定量分析非研究重点。

4　总结与展望

本文发现：① 多数研究表明我国仿制药与原研药有效性和安全性类似；② 大多数仿制药仍旧临床研究数据不足，特别是急性病治疗药物的研究；③ 多数文献存在高及极高偏倚风险，报告质量仍需提高。

集采中选仿制药需要以多维度、多层次的综合评价来回应质量和疗效的忧虑 [1, 33-34]。2015 年我国医院药学专家针对缺乏药品招标采购系统评估的现象制定了药品综合评价指南参考大纲 [35]，并于 2021 年 7 月 28 日《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》发行 [36]。不同于参考大纲中以文献二次评价为主要评价标准，该指南更注重基于真实世界研究的药品评价。真实世界数据产生于日常诊疗活动中，多用于上市后药品的有效性和安全性评价，可与 RCT 形成内、外效度互补 [37-38]。本研究统计 3 年来仿制药对比原研药的临床研究，仅有 2 篇明确提出所采用的临床研究类型是真实世界研究，可见该领域内相关研究匮乏。

药师参与的真实世界研究可弥补相关领域研究的缺失。首都医科大学宣武医院联合北京市其他 15 家医疗机构充分利用药师的力量，基于真实世界数据对集采中选药品的有效性、安全性及使用情况进行研究 [39]，结果表明首批国家集采中选药品的有效性、安全性与原研药品一致，回应了对集采中选药品的质疑。

相信结合集采政策的常态化开展和药品临床综合评价的逐步推进，丰富的临床研究数据会产生并用于集采药品遴选和更替的参考。以药品临床综合评价为基础将给予医务人员和患者在药品使用方面足够的信心，也更有利于我国仿制药高质量发展。

参考文献

[1] 刘冬，哈莉莉，李芳，等 . 我国化学仿制药一致性评价进展与展望 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（16）：2381-2385.

[2] 胡希家，叶向明，冯芳龄，等 . 药品集中带量采购的政策内涵及改革挑战——“药品集中带量采购政策研讨会”综

述 [J]. 卫生经济研究，2020，37（12）：26-27，31.
[3] 杨庆，刘玲玲，周斌 . 我国仿制药一致性评价沿革及评价方法分析 [J]. 中国医药工业杂志，2019，50（3）：338-344.
[4] 何江江，唐密，丛鹂萱，等 . 国家组织药品集中采购和使用试点对临床用药管理与使用的影响 [J]. 中国卫生资源，2021，24（1）：29-31.
[5] 周菁菁，谈在祥 . 我国药品带量采购政策实施效果研究——以 s 医院为例 [J]. 卫生经济研究，2021，38（10）：52-55.
[6] 王煜昊，徐伟，路娜娜，等 . “4 ＋ 7” 集中带量采购实施效果分析——基于 9 试点地区药品销售数据 [J]. 中国卫生政策研究，2021，14（2）：36-43.
[7]《2021 年度药品审评报告》. https：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20220601110541120. html.
[8] Sterne JAC，Savović J，Page MJ，et al. Rob 2：a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials [J]. BMJ，2019，366：l4898.
[9] 刘津池，刘畅，华成舸 . 随机对照试验偏倚风险评价工具 rob2（2019 修订版）解读 [J]. 中国循证医学杂志，2021，21（6）：737-744.
[10] Sterne JA，Hernán MA，Reeves BC，et al. ROBINS-I：a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions [J]. BMJ，2016，355：i4919.
[11] 王浩，唐晓宇，王和平，等 . ROBINS-I：评估非随机干预性研究偏倚风险的新工具 [J]. 中国循证心血管医学杂志，2018，10（7）：789-793.
[12] 王卓群，赵文华 . 我国慢性病防控工作回顾与展望 [J]. 中华疾病控制杂志，2019，23（9）：1025-1028，1036.
[13] 牛艳丽 . 阿卡波糖治疗 2 型糖尿病的药物经济学评价 [J]. 中国医药指南，2018，16（12）：76.
[14] 龙土新 . 国产奥司他韦颗粒治疗儿童流行性感冒 A 型的疗效分析 [J]. 海峡药学，2019，31（1）：206-207.
[15] 郑超，陶峰，汪洁，等 . 国产与进口丙泊酚用于无痛胃镜检查术麻醉效果比较 [J]. 中国药业，2019，28（6）：61-63.
[16] 谢嫣嫣，叶冬梅，张华君，等 . 国产与进口培美曲塞治疗晚期 NSCLC 的药物经济学分析 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（3）：278-281.
[17] 于丽，张寒娟，杨玉玲，等 . 进口与国产头孢呋辛在心脏外科手术预防性应用中的药物经济学评价 [J]. 中国合理用药探索，2018，15（2）：1-4.
[18] 袁涛，张巧利，兰永连，等 . 国产与进口重组人 FSH 在辅助生殖技术超排卵治疗中的疗效比较 [J]. 中国优生与遗传杂志，2019，27（10）：1254-1256，1269.
[19] 黄亭，朱锦明，石祥奎 . 两种卡前列素氨丁三醇对预防剖宫产后出血的疗效与安全性研究 [J]. 中国校医，2019，33（10）：729-731，786.
[20] 赵冰封，黄学桂，赵晗，等 . 国产与进口卡前列素氨丁三醇治疗产后出血的疗效与成本 - 效果分析 [J]. 安徽医药，2019，23（2）：354-356.
[21] 洪明明，龚源 . 莫西沙星仿制药与原研药用于非重症社区获得性肺炎的疗效及安全性回顾性对比研究 [J]. 中国医院用药评价与分析，2019，19（9）：1098-1100.
[22] 张亮，侯文洁，周秋云，等 . 原研与仿制莫西沙星注射液在治疗社区获得性肺炎中的成本 - 效果分析 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（3）：246-250.
[23] 何效平，荣秋玲，何梅，等 . 国产和进口万古霉素治疗神经外科术后肺部感染 MRSA 的回顾性配对研究 [J]. 中国药房，2019，30（18）：2551-2555.
[24] 陈嘉宁，王匀，张慕华，等 . 左氧氟沙星仿制药与原研药用于非重症社区获得性肺炎的疗效及安全性回顾性对比研究 [J]. 中国现代药物应用，2021，15（8）：4-7.
[25] Gothe H，Schall I，Saverno K，et al. The impact of generic substitution on health and economic outcomes：a systematic review [J]. Appl Health Econ Health Policy，2015，13（Suppl 1）：S21-33.
[26] 边妍，潘芸芸，陈吉生 . 硫酸氢氯吡格雷片仿制药对比原研药治疗冠心病的疗效、安全性与经济性的系统评价 [J]. 中国药房，2018，29（21）：2980-2984.
[27] 付文华，侯超 . 国产与进口缬沙坦治疗原发性高血压病的系统评价 [J]. 天津药学，2018，30（3）：45-48.
[28] 周虹，林志强，蔡文杰，等 . 国产与进口紫杉醇抗肿瘤疗效和安全性的系统评价 [J]. 中国医院用药评价与分析，2018，18（2）：211-214，220.
[29] 陈朝鑫，郑斌，郑欢芮，等 . 通过仿制药质量和疗效一致性评价仿制药经济学研究的系统评价 [J]. 中国药物经济学，2020，15（7）：10-19.
[30] Bhide A，Shah PS，Acharya G. A simplified guide to randomized controlled trials [J]. Acta Obstet Gynecol Scand，2018，97（4）：380-387.
[31] Hansson L，Hedner T，Dahlöf B. Prospective randomized open blinded end-point（probe）study. A novel design for intervention trials. Prospective randomized open blinded end-point [J]. Blood Press，1992，1（2）：113-119.
[32] Pengo V，Denas G，Zoppellaro G，et al. Rivaroxaban *vs* warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome [J]. Blood，2018，132（13）：1365-1371.
[33] 徐源，何江江，陈珉惺，等 . 药品集中采购国际经验及对我国国家层面带量采购的启示 [J]. 中国卫生经济，2021，40（4）：93-96.
[34] 安薇，漆立军，王懿睿，等 . 湖北省医疗机构落实药品集中采购工作药学专家建议 [J]. 医药导报，2021，40（12）：1615-1618.
[35] 中国药品综合评价指南项目组 . 中国药品综合评价指南参考大纲（第二版）[J]. 药品评价，2015，12（8）：6.
[36]《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》（国卫办药政发〔2021〕16 号）. 2021；http：//www. nhc. gov. cn/yaozs/s2908/202107/532e20800a47415d84adf3797b0f4869. shtml.
[37] 黄卓山，罗艳婷，刘金来 . 真实世界研究的方法与实践 [J]. 循证医学，2014，14（6）：364-368.
[38] Mahajan R. Real world data：additional source for making clinical decisions [J]. Int J Appl Basic Med Res，2015，5（2）：82.
[39] 岳小林，付娜，赵艳玲，等 . 国家集中带量采购中选药品疗效与安全性的真实世界研究 [J]. 临床药物治疗杂志，2022，20（6）：43-48.

（收稿日期：2023-03-19；修回日期：2023-06-12）

药学教育

《天然药物化学实验指导》中黄酮类化合物显色反应的考证

秦凌月[1]，谢文豪[2]，彭越[2]，韩清娟[3]，黄秀凝[1]，刘艳霞[1*]（1. 陆军军医大学药学与检验医学系 生药学与中药学教研室，重庆　400038；2. 陆军军医大学基础医学院 无军籍地方生大队20队，重庆　400038；3. 陆军军医大学药学与检验医学系 药物分析与分析化学教研室，重庆　400038）

摘要：目的　探究天然药物化学实验教学中黄酮化合物显色反应多样化及与配套理论教材描述不相符的原因，为《天然药物化学实验指导》中“碱 - 酸法提取芦丁”实验教学提供参考。**方法**　采用师生合作的方式，以芦丁、槲皮素、芹菜素为对照品，进行精制芦丁供试品的盐酸 - 镁粉反应、Molish 反应和 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应的鉴定，同时供试品进行聚酰胺薄层色谱分析。**结果**　显色反应表明精制芦丁供试品中含有具 3-OH 的杂质，薄层色谱表明该杂质为槲皮素。**结论**　《天然药物化学实验指导》中，采用 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应鉴定精制芦丁供试品时，芦丁中含有少量槲皮素会造成溶液不褪色或不完全褪色。这种现象在实验课中可探究或给予解释。

关键词：天然药物化学；实验教学；芦丁；显色反应

中图分类号：O657.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2793-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.040

Chromogenic reaction of flavonoids in *Experiment Instruction of Natural Pharmaceutical Chemistry*

QIN Ling-yue[1], XIE Wen-hao[2], PENG Yue[2], HAN Qing-juan[3], HUANG Xiu-ning[1], LIU Yan-xia[1*] (1.*Department of Pharmacognosy and Traditional Chinese Medicine*, *Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine*, *Army Medical University*, *Chongqing* 400038; 2. *The* 20*th Non-military Undergraduate Student Brigade*, *College of Basic Medical Science*, *Army Medical University*, *Chongqing* 400038; 3. *Department of Pharmaceutical Analysis and Analytical Chemistry*, *Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine*, *Army Medical University*, *Chongqing* 400038)

Abstract: Objective　To determine the diversity of flavonoids' chromogenic reaction in the experimental teaching of *Natural Pharmaceutical Chemistry*, and analyze the inconsistency in the chromogenic reaction with the description in the corresponding theoretical textbook. **Methods** With the help of teachers and students, refined rutin was identified by hydrochloric-magnesium powder, Molish and $ZrOCl_2$/citric acid reactions with rutin, quercetin and apigenin as reference. The polyamide thin layer chromatography of the test rutin was conducted. **Results**　The chromogenic reactions showed impurity harboring 3-OH in the test rutin, and the thin layer chromagraphy showed the impurity was quercetin. **Conclusion**　In the *Experimental Instruction of Natural Pharmaceutical Chemistry*, when $ZrOCl_2$/citric acid reaction is used to identify the test refined rutin, a small amount of quercetin in it would cause the solution not to fade or not to fade completely. This phenomenon can be explained in the laboratory.

Key words: natural pharmaceutical chemistry; experimental teaching; rutin; chromogenic reaction

基金项目：陆军军医大学教育改革研究课题（No.2021B08）。

作者简介：秦凌月，女，助教，主要从事药用植物内生菌活性成分作用机制研究，email：lingyueq@126.com　*通信作者：刘艳霞，女，讲师，主要从事药学教育与新药研发，email：liuyibin_04@163.com

天然药物化学是药学、中药学专业的专业必修课，是运用现代科学理论与方法研究天然药物中化学成分的一门学科，主要研究天然药物中各类化学成分的结构特征、物理化学性质、提取分离方法、结构鉴定与生物活性、生物合成规律及途径、体内外动态变化等[1]。笔者所在教研室承担药学四年制本科的天然药物化学授课任务，理论课 56 学时、实验课 54 学时。实验课共设置三个实验，均为 18 学时，其中实验二为“碱 - 酸法提取芦丁”。

芦丁（rutin）是糖苷类黄酮的一种，由槲皮素（quercetin）3 位上的羟基与芸香糖（葡萄糖与鼠李糖 1-6 连接而成的双糖）脱水而成，超过 70 种植物或植物来源的粮食中均含有该黄酮，如杏、葡萄、荞麦种子、樱桃、洋葱、李子和橙子等[2]。芦丁除具有维生素 P 样作用外，还具有多种药理活性，包括抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗细菌与真菌，广泛应用于多种疾病的治疗[3]。

1　事件概述及原因分析

天然药物化学实验课程的选用教材为人民卫生出版社的《天然药物化学实验指导》（第 4 版），配套的理论教材为《天然药物化学》（第 7 版）[4-5]。在 2022—2023 学年秋季学期“碱 - 酸法提取芦丁”实验教学中，学生通过碱溶酸沉法从槐米（豆科植物槐 *Sophora japonica* 的花蕾）中提取芦丁，并依据其在冷水、热水中的溶解度差异进行精制；用 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸显色反应鉴定精制芦丁时，学生加入 2% $ZrOCl_2$/ 甲醇溶液后溶液颜色变黄，但继续加入 2% 枸橼酸 / 甲醇后溶液未发生褪色现象，与配套理论教材中关于锆盐实验原理的描述（黄酮类化合物分子中有游离的 3-OH 或 5-OH 时，3-OH 或 5-OH、4- 酮基与锆盐试剂生成黄色锆络合物，但 3-OH、4- 酮基络合物的稳定性较 5-OH、4- 酮基络合物强，故加入枸橼酸后，5-OH 黄酮的溶液显著褪色，而 3-OH 黄酮仍呈鲜黄色[4]）不相符。超出了学生理解范畴，使学生对该实验产生了质疑。

首先核对试剂，未有异常情况发生。其次分析原因，$ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应的溶液未褪色，猜测可能是芦丁的纯度不高，其中含具有 3-OH 的杂质，杂质的 3-OH、4- 酮基与 Zr^{4+} 形成稳定的络合物，使得加入 2% 枸橼酸 / 甲醇后溶液不褪色。为考证该猜想是否成立，采用师生合作的方式，使用芦丁（黄酮醇苷，含 5-OH）、槲皮素（黄酮醇，含 3-OH、5-OH）、芹菜素（黄酮，含 5-OH）为对照品（见图 1），对实验课获取的精制芦丁进行盐酸 - 镁粉反应、Molish 反应和 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应的鉴定，过程中设置试剂用量的梯度以优化操作步骤，并使用聚酰胺薄层色谱法鉴定所含杂质。

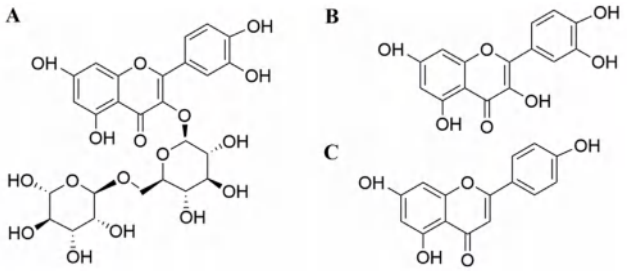


图 1　芦丁（A）、槲皮素（B）、芹菜素（C）的化学结构式

Fig 1　Chemical structure of rutin（A），quercetin（B）and apigenin（C）

2　精制芦丁的显色反应与薄层色谱

2.1　材料

对照品芦丁（批号：153-18-4）、槲皮素（批号：117-39-5）、芹菜素（批号：520-36-5）（纯度均≥ 98%，成都钠钶锂生物科技有限公司），其余试剂均为市售分析纯，水为超纯水。供试品为“碱 - 酸法提取芦丁”实验课中学生提取并精制的芦丁样品。

2.2　供试品及对照品溶液的配制

取供试品 16 mg 置于 25 mL 量瓶中，乙醇定容，得供试品待测溶液。

分别取对照品芦丁 16 mg、槲皮素 8 mg、芹菜素 8 mg 置于 25 mL 量瓶中，乙醇定容，得对应的对照品溶液，分别标记为标液 1、标液 2、标液 3。

2.3　供试品的显色反应

盐酸 - 镁粉反应：取标液 1 ～ 3 及供试品溶液各 2 mL 分别放入比色管中，设置梯度用量的盐酸与镁粉，即分别加入 0.2、0.4、0.2 mL 浓盐酸，再依次分别加入 0.03、0.03、0.06 g 镁粉，观察三组试验的颜色变化情况。

Molish 反应：取标液 1 ～ 3 及供试品溶液各 2 mL 分别放入比色管中，设置梯度用量的 *α*- 萘酚 / 乙醇溶液，即分别加入 0.3、0.2、0.1 mL 10% *α*- 萘酚 / 乙醇溶液，摇匀，沿管壁滴加 3 mL 的浓硫酸，观察三组试验中两液面产生的颜色变化。

$ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应：取标液 1 ～ 3 及供试品溶液各 2 mL 分别放入比色管中，滴加 2% $ZrOCl_2$/ 甲醇溶液，注意观察颜色变化情况，至溶液变为黄色，继续滴加至颜色不再加深为止，记录消耗的 $ZrOCl_2$/ 甲醇溶液体积；再向试管中加

入 2% 枸橼酸 / 甲醇溶液，记录颜色变化情况。

2.4　供试品的聚酰胺薄层色谱

取聚酰胺薄层板，以标液 1 ～ 3 为对照，点上供试品样品，用 75% 乙醇液进行展开。展开一段距离后，吹干，用 1% $AlCl_3$ 溶液对薄层板进行显色，在日光、紫外灯下观察样品斑点的颜色与荧光。

2.5　结果分析

盐酸 - 镁粉反应结果表明，加入 0.4 mL 浓盐酸，再加 0.03 g 镁粉后显色较好且镁粉消化完全，标液 1 ～ 3 及供试品分别呈红色、淡红、黄色、红色。即供试品显色与对照品芦丁相同，符合实验预期，说明实验课中成功从槐米中提取到芦丁（见图 2A）。

Molish 反应结果表明，加入 0.3 mL 10% α-萘酚 / 乙醇溶液，并滴加 3 mL 浓硫酸后，标液 1、供试品呈现的玫瑰环明显，而标液 2、3 无玫瑰环现象。符合实验预期，再次说明实验课中芦丁提取成功（见图 2B）。

$ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应结果表明，消耗 1 mL $ZrOCl_2$/ 甲醇溶液后，标液 1 ～ 3 及供试品溶液均变黄且颜色不再加深；后加入 2% 枸橼酸 / 甲醇溶液，芦丁与芹菜素标液完全褪色，槲皮素标液不褪色，而供试品发生褪色但褪色不完全，最终呈现为浅黄色（见图 2C）。这证实了实验前的推论："碱 - 酸法提取芦丁" 实验课中所用试剂均无异常，供试品不褪色是因为其本身不纯、其中含有具 3-OH 的杂质。

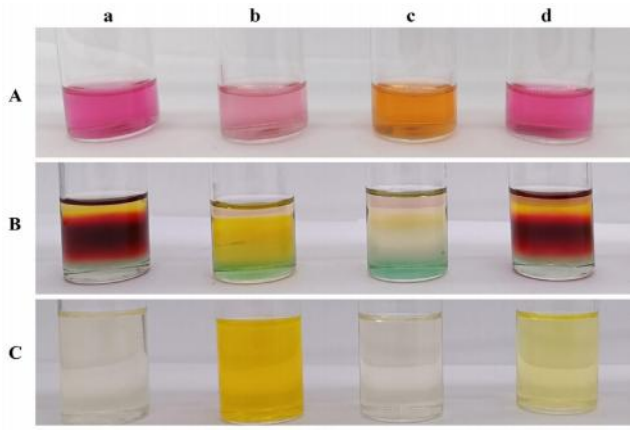


图 2　盐酸 - 镁粉反应（A）、Molish 反应（B）及 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应（C）显色效果

Fig 2　Chromogenic effect of hydrochloric acid-magnesium powder reaction（A），Molish reaction（B）and $ZrOCl_2$/citric acid reaction（C）

a. 芦丁对照品（rutin reference）；b. 槲皮素对照品（quercetin reference）；c. 芹菜素对照品（apigenin reference）；d. 供试品（test product）

聚酰胺薄层色谱的结果表明，供试品的主要成分为芦丁，但其中含有少量槲皮素（见图 3）。即供试品中具 3-OH 的杂质为槲皮素。

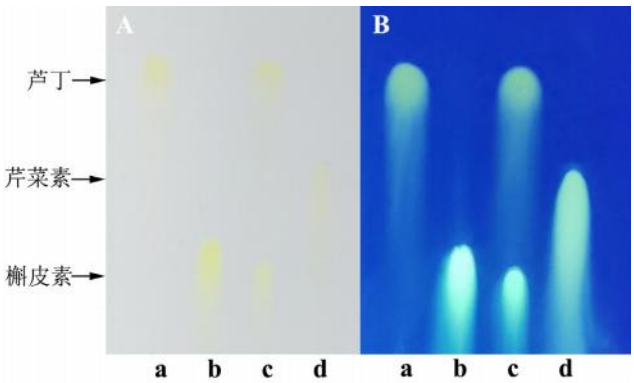


图 3　日光（A）、365 nm 紫外光（B）下的薄层色谱图

Fig 3　Thin layer chromatography under sunlight（A）and 365 nm ultraviolet（B）

a. 芦丁对照品（rutin reference）；b. 槲皮素对照品（quercetin reference）；c. 供试品（test product）；d. 芹菜素对照品（apigenin reference）

3　结论与讨论

提取的芦丁中含有槲皮素杂质的相关研究，为本实验的结果提供了有力支撑：孟祥颖等 [6] 报道通过碱溶酸沉法加热提取芦丁，产物常有 9% ～ 13% 的水解产物存在；赵文斌等 [7] 从槐米粉提取芦丁，薄层层析鉴定表明，样品中含有少量槲皮素；舒晓宏等 [8-9] 从槐花米中提取芦丁时发现，酸碱浓度适宜的石灰水和盐酸可提高芦丁产率，但碱提 pH 值偏高、酸沉 pH 值偏低，芦丁粗提率提高的同时带来含量较高的杂质；另有研究者采用有机溶剂提取法，从槐米、苦荞中提取到的芦丁，也均被不同程度地分解为槲皮素 [10-11]。笔者查阅资料推断，槲皮素杂质是芦丁在提取过程中被碱水解而产生的：芦丁的苷键为烯醇苷键，对碱不稳定，碱溶液会催化苷键水解 [4]；《天然药物化学实验指导》中描述 "称取槐花米 20 g，取 1 ～ 1.5 g 石灰粉加入 10 mL 水后研成乳液，槐米在搅拌条件下加入石灰乳，调节 pH 至 8 ～ 9，加热至微沸，维持 pH 保持 40 min……[5]"；在上述提取过程中，用石灰乳调节溶液 pH 使呈碱性，加热情况符合芦丁碱水解的条件，故而部分芦丁碱水解生成槲皮素，造成提取的供试品芦丁不纯。

综合上述，"碱 - 酸法提取芦丁" 实验课中，通过碱溶酸沉法提取芦丁时，芦丁发生部分碱水解生成槲皮素杂质，槲皮素含有的 3-OH、4- 酮基与锆盐试剂形成稳定性强的络合物，故采用 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应鉴定芦丁供试品时，加入 2% 枸橼酸 / 甲醇溶液后，黄色不褪或褪色不完全；而纯净芦丁的 5-OH 与锆盐试剂形成络合物的稳

定性较差，采用 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应鉴定时，完全褪色。总而言之，实验过程中出现不褪色现象实为芦丁碱水解生成了槲皮素杂质所致，在后续实验授课中可给予解释或进行进一步探讨。

此外，本次实验探究充分体现了基于问题导向（problem-based learning，PBL）[12] 的师生合作教学模式，凸显了“以教师为主导、学生为主体”的教学理念。具体来讲，学生在“碱 - 酸法提取芦丁”实验课中发现了精制芦丁的 $ZrOCl_2$/ 枸橼酸反应的不褪色现象；以两名学生为代表形成学习小组，探讨该问题的可能原因，具有天然药物化学、药物分析学学科背景的教师成立教学组；师生就该问题交流探讨，共同设计用于考证该问题的实验步骤；学生进行实验操作，教师指导实验、答疑解惑；最终师生合作解决了天然药物化学实验教学中的问题。教师在指导学生中获得了成长，学生深刻理解了黄酮化合物显色反应的原理，实验操作得以进一步规范，科研思维也得到引导与培养。基于 PBL 的师生合作教学模式为深化天然药物化学课程改革 [13] 提供了思路与方法。

参考文献

[1] 刘畅，徐巍巍，唐雨，等.《天然药物化学实验指导》中“汉防己”的生源考证 [J]. 中南药学，2019，17（7）：1167-1168.

[2] Ganeshpurkar A，Saluja AK. The pharmacological potential of rutin [J]. Saudi Pharm J，2017，25（2）：149-164.

[3] Rotimi DE，Elebiyo TC，Ojo OA. Therapeutic potential of rutin in male infertility：a mini review [J]. J Integr Med，2023，21（2）：130-135.

[4] 裴月湖，娄红祥 . 天然药物化学 [M]. 7 版 . 北京：人民卫生出版社，2016.

[5] 裴月湖 . 天然药物化学实验指导 [M]. 4 版 . 北京：人民卫生出版社，2016.

[6] 孟祥颖，郭良，李玉新，等 . 芦丁的来源、用途及提取纯化方法 [J]. 长春中医学院学报，2003，19（2）：61-64.

[7] 赵文斌，许玉华，王鲁石，等 . 芦丁的纯化及其含量测定 [J]. 时珍国医国药，2007，18（4）：876-878.

[8] 舒晓宏，冯梅，陈华，等 . 槐花米中芦丁提取最佳 pH 值的实验研究 [J]. 大连医科大学学报，2005，27（2）：91-92.

[9] 张依，周泽纯，全锦秋，等 . 槐米中芦丁的提取工艺优化及检识 [J]. 中国医药科学，2020，10（3）：38-41.

[10] 程秀民，尘学兰，高彦慧，等 . RP-HPLC 测定槐米中芦丁和槲皮素含量 [J]. 中成药，2004，24（8）：680-682.

[11] 王改玲，周乐，梁冉，等 . 不同提取条件对苦荞籽粒中芦丁降解的影响 [J]. 西北植物学报，2005，25（5）：1035-1038.

[12] 程欣，马云淑，陈凌云，等 . PBL 教学法在生物药剂学与药物动力学实验教学能力提升中的探索性研究 [J]. 中南药学，2017，15（5）：700-702.

[13] 刘冬，刘艳霞，明乾良，等 . 天然药物化学课程改革的实践与探讨 [J]. 安徽医药，2022，26（5）：1057-1060.

（收稿日期：2023-04-24；修回日期：2023-05-17）

临床药师在临床

临床药师参与 1 例腺垂体功能减退症患者的药学监护

王莉平[1]，邢瑞敏[1]，郭金明[1]，郝二琢[2]，张树杰[1]，王振贤[1]，张瑞清[1*]（1. 邯郸市中心医院，河北　邯郸　056001；2. 新兴际华集团有限公司医院，河北　邯郸　056300）

摘要：临床药师对 1 例腺垂体功能减退症患者住院使用醋酸泼尼松片后出现精神异常进行分析。对患者疾病及所应用的药物进行因果关系分析，评估精神异常可能的因素，优化激素替代治疗方案。临床药师深入临床，探讨治疗方案，提供合理的给药方案及用药监护，结合循证药学依据，辨别药品不良反应，促进临床合理用药。

关键词：腺垂体功能减退症；糖皮质激素；药品不良反应；精神异常
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2797-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.041

Pharmaceutical care for a patient with hypopituitarism by clinical pharmacists

WANG Li-ping[1], XING Rui-min[1], GUO Jin-ming[1], HAO Er-zhuo[2], ZHANG Shu-jie[1], WANG Zhen-xian[1], ZHANG Rui-qing[1*] (1. *Handan Central Hospital*, *Handan Hebei* 056001; 2. *Hospital of Xinxing Cathay International Group Limited Company*, *Handan Hebei* 056300)

Abstract: Clinical pharmacists analyzed a patient with mental disorder induced by prednisone acetate tablets therapy for adenohypophysis hypofunction. The study evaluated possible factors of mental disorders by examining the causal relationship between diseases and drugs used during hospitalization. Clinical pharmacists optimized the hormone replacement therapy, provided a more reasonable administration plan and pharmaceutical care, combined evidence, identified adverse drug reactions, and promoted rational drug use in the clinic.

Key words: hypopituitarism; glucocorticoid; adverse drug reaction; mental disorder

腺垂体功能减退症是指腺垂体激素分泌减少，可原发于垂体病变，也可继发于下丘脑病变，常见病因包括垂体肿瘤、先天性腺垂体发育不全、垂体缺血性坏死、空泡蝶鞍综合征、自身免疫性疾病等[1]。治疗方案是病因治疗和激素替代治疗[2]。垂体瘤、下丘脑肿瘤患者多数情况下首选方案是手术治疗。对于鞍区占位性病变，必须解除压迫及破坏作用，减轻和缓解颅内高压[3]。其他情况需要补充激素或替代治疗。本文通过对 1 例腺垂体功能减退症患者在应用小剂量醋酸泼尼松片后，出现精神异常的全过程进行给药方案分析及用药干预，为个体化药物选择提供建议，为临床安全用药提供合理化参考。

1　临床资料

患者女，38 岁，身高 162 cm，体重 50 kg，体质量指数（BMI）为 19.05 kg•m^{-2}。主因停经 1 年，间断意识不清 4 d，于 2022 年 7 月 26 日入院。患者 7 月 22 日无明显诱因出现间断意识不清，进行性加重，伴言语错乱，未出现多尿、烦渴症状。7 月 23 日就诊于当地医院，检查电解质，血钠：123 mmol • L^{-1}↓，血钾：3.4 mmol • L^{-1}↓，给予纠正电解质后，症状好转，即于我院就诊。门诊复查

基金项目：河北省医学科学研究课题计划（No.20191847）。
作者信息：王莉平，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：wlp2672@126.com　*通信作者：张瑞清，女，副主任医师，主要从事内分泌工作，email：zhangruiqing116@126.com

电解质，血钠：124.9 mmol • L^{-1}↓，血氯：94.2 mmol • L^{-1}↓，血钾：3.76 mmol • L^{-1}；促肾上腺皮质激素（ACTH）（8：00）：5.92 pg • mL^{-1}↓；皮质醇（8：00）：23.32 nmol • L^{-1}↓；甲状腺功能五项：三碘甲状腺原氨酸（T_3）：0.97 nmol • L^{-1}↓，甲状腺素（T_4）：37.4 nmol • L^{-1}↓，促甲状腺激素（TSH）：11.160 μIU • mL^{-1}↑，游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3）：2.73 pmol • L^{-1}↓，游离甲状腺素（FT_4）：5.30 pmol • L^{-1}↓。性激素六项：雌二醇：40.2 pg • mL^{-1}↓，睾酮＜ 0.025 ng • mL^{-1}，孕酮＜ 0.050 ng•mL^{-1}，垂体泌乳素：6.2 μIU•mL^{-1}，促黄体生成素：3.05 mIU•mL^{-1}↓，卵泡生成素：5.93 mIU•mL^{-1}↓。生长激素：0.10 ng•mL^{-1}↓。入院诊断：① 腺垂体功能减退症；② 电解质紊乱，低钠血症、低氯血症。

2　治疗经过

2022 年 7 月 26 日—7 月 27 日，为纠正患者电解质紊乱，予口服醋酸泼尼松片，早 5 mg，下午 5 mg。7 月 28 日，查房发现患者精神欠佳，给予醋酸泼尼松片早 5 mg，下午 2.5 mg。7 月 29 日凌晨 5 点，患者无明显诱因出现精神亢奋，间断言语错乱。复查电解质，血钠：135.7 mmol • L^{-1}↓，血钾：3.19 mmol • L^{-1}↓。根据患者所应用的药物，查阅药品说明书和文献资料，不排除是醋酸泼尼松片引起的精神异常，故暂停使用醋酸泼尼松片，并完善头颅和垂体磁共振成像（MRI）检查。7 月 30 日—7 月 31 日，患者仍精神亢奋，睡眠差，间断言语错乱，谵语，饮食差。复查电解质，血钠最低达 117.3 mmol • L^{-1}↓，予纠正电解质。患者入院期间监测的电解质情况见表 1。7 月 31 日给予患者氢化可的松注射液 15 mg ＋ 5% 葡萄糖注射液 250 mL 静脉滴注。17：00 时，给予地西泮注射液 10 mg ＋ 0.9% 氯化钠注射液 250 mL，持续泵点镇静治疗。8 月 1 日—8 月 2 日，患者精神亢奋症状明显减轻，电解质较之前好转。头 MRI 扫描未见明显异常。垂体 MRI 提示，空泡蝶鞍。予氢化可的松注射液及地西泮注射液，剂量同前。并予左甲状腺激素片 12.5 μg。8 月 3 日—8 月 6 日，患者精神可，偶有言语错乱，夜间睡眠可，饮食可，治疗同前，8 月 4 日起停用地西泮注射液。8 月 7 日，停用氢化可的松注射液，改为醋酸泼尼松片 1.25 mg，每日一次，患者未再出现精神异常。8 月 9 日，情况可，电解质正常，患者出院。出院医嘱，醋酸泼尼松片 1.25 mg qd，左甲状腺素钠 12.5 μg 早餐前半小时口服。

表 1　患者住院期间监测电解质情况

Tab 1　Monitorid the electrolyte during hospitalization

日期	钠离子浓度 /（mmol • L^{-1}）（137.0 ～ 147.0）	氯离子浓度 /（mmol • L^{-1}）（99.0 ～ 110 .0）	钾离子浓度 /（mmol • L^{-1}）（3.50 ～ 5.30）
7 月 26 日	124.9↓	94.2↓	3.76
7 月 27 日	132.5↓	101.6	4.31
7 月 28 日	137.4	104.0	3.93
7 月 29 日	132.3↓	98.5↓	3.11↓
7 月 30 日	130.9↓	95.4↓	3.42↓
7 月 31 日（7：43）	120.6↓	93.1↓	4.40
7 月 31 日（17：28）	117.3↓	89.4↓	5.48
7 月 31 日（23：01）	120.8↓	93.6↓	4.36
8 月 1 日（8：22）	132.6↓	104.9	3.93
8 月 1 日（18：30）	135.0↓	108.1	4.50
8 月 2 日	134.4↓	103.4	3.62
8 月 4 日	134.6↓	99.9	4.19
8 月 5 日	134.9↓	101.3	3.62
8 月 7 日	137.2	101.8	3.83
8 月 9 日	137.2	101.1	3.84

3　分析与讨论

3.1　*患者治疗方案*

患者垂体 MRI 提示空泡蝶鞍，检查 ACTH、皮质醇、甲状腺功能、生长激素结果均是低下，电解质紊乱，结合患者临床表现，腺垂体功能减退症诊断成立。治疗方案是补充相应的靶腺激素，维持正常的代谢和生理功能。先给予糖皮质激素治疗，稳定后加用甲状腺激素，最后考虑性激素的补充。感染、发热等应急情况下，剂量可增加 2 ～ 3 倍，病情稳定后降至维持剂量 [4]。糖皮质激素中常用的有氢化可的松、泼尼松、可的松和地塞米松 [4]。其中，氢化可的松是推荐用药 [2，5]，氢化可的松是体内天然存在且具有活性的糖皮质激素，不需要在体内转化，可直接被吸收。使用时单次或分次给药，每日剂量一般在 15 ～ 20 mg[5]。泼尼松和可的松需要在肝脏中转化为泼尼松龙和氢化可的松后才有效。特殊情况下如依从性差时可使用长效的糖皮质激素 [5]，但因其对下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的抑制效应较强，不宜长疗程替代治疗 [6]。

3.2　*糖皮质激素药物分析*

3.2.1　糖皮质激素引起精神异常　患者入院前无精神病史，未受到精神刺激，可排除精神疾病因素。应用诺氏（Naranjo’s）评估表 [7] 进行分析，回答及评分情况见表 2。该患者评分为 4 分，即判断患者精神异常与使用醋酸泼尼松片结果为“可能”。

表 2　醋酸泼尼松片引起患者精神异常的诺氏评估结果

Tab 2　Naranjo's assessment results of the patient mental disorder caused by prednisone acetate tablets

相关问题	得分情况			
	是	否	未知	评分理由
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1			说明书及相关文献报道
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	＋2			精神异常是在使用醋酸泼尼松片后发生的
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1			停药后，加用镇静药物治疗，得到缓解
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现		－1		再次给予减量使用，未出现精神异常
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR		－1		低钠血症可引起精神异常的独立因素
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现			0	未知
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度			0	未测定
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1			随着醋酸泼尼松片剂量减少，ADR 缓解
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应			0	未知
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1			每日监测患者精神状况及患者用药情况
总分值				4 分

糖皮质激素半衰期有血浆半衰期和生物半衰期，真正反映激素作用时间的是生物半衰期[3]。泼尼松血浆半衰期为 2.6 ～ 3 h，但其生物半衰期却长达 18 ～ 36 h[2]。所以泼尼松在体内代谢需要较长时间，这可能是该患者停药几天后精神仍有异常的原因。

糖皮质激素在生理剂量治疗时一般无明显不良反应。糖皮质激素在药理剂量时，可能会发生精神症状的不良反应，如欣快感、激动、谵妄、不安等[2]。长期使用糖皮质激素或大量使用者易出现此类不良反应。冉娅娟等[8]曾报道，1 例席汉综合征患者应用氢化可的松治疗 3 d 后出现兴奋、失眠、妄想等症状。尹寿祥等[9]报道 1 例腺垂体功能减退症患者应用大剂量氢化可的松琥珀酸钠注射液后，出现情绪波动大、答题不切题等精神异常症状。本例患者使用较小剂量醋酸泼尼松片在短时间内发生精神异常的不良反应实属少见。引起精神异常症状的原因，可能是糖皮质激素引起神经细胞膜超极化，选择性抑制自发性电活动，增强多巴胺 -*β*- 羟化酶及苯乙胺 -*N*- 甲基转移酶的活性，增加去甲肾上腺素、肾上腺素的合成，去甲肾上腺素通过抑制色氨酸羟化酶活性，降低中枢 5- 羟色胺浓度，扰乱神经递质间的平衡，从而导致情绪及行为异常[8，10]。

3.2.2　患者个体化给药方案分析　患者停用激素后，会进一步加重低钠血症。药师建议尽早启用激素治疗。在激素选择上，可以考虑使用盐皮质激素。患者处于低钠血症状态，盐皮质激素对人体起着保钠、保水和排钾的作用，在维持人体正常水盐代谢、体液容量和渗透平衡方面有着重要的作用[2]，如氟氢可的松片，对维持电解质平衡是有利的。但未找到可供体内使用氟氢可的松制剂。可考虑使用具有较强盐皮质激素作用的糖皮质激素，也可增强保钠作用。糖皮质激素中，盐皮质激素活性由强到弱依次为氢化可的松、可的松、泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼龙[11]。药师推荐氢化可的松，小剂量使用，医师采纳。7 月 31 日，选择氢化可的松注射液每日 15 mg，经过观察，患者未再出现精神异常。应用 7 d 后，改为醋酸泼尼松片 1.25 mg 口服。醋酸泼尼松片是临床上常用的糖皮质激素，在一些自身免疫性疾病如肾病综合征、风湿、系统性红斑狼疮等的治疗中具有较好的效果[12]，在腺垂体功能减退症患者中应用也较为广泛。药师认为，也可选择氢化可的松片，虽为短效制剂，但具有比泼尼松片更为强效的糖皮质激素活性及盐皮质激素，且患者在应用氢化可的松注射液期间，未出现不良反应。重新应用醋酸泼尼松片，需要更加认真地观察患者在精神状态、生活、饮食等方面是否有异常。

对激素补充的疗效评价指标，一是观察患者症状和体征，能否满足日常生活，毛发稀疏是否得到好转，月经是否恢复等。另外，实验室检查如肾上腺功能、甲状腺功能、性腺激素等相关指标是否改善，也是非常有意义的。患者日后的用药评价，还需要临床药师后续的随诊及相关指标的检查，来综合判断激素的选择及剂量是否适宜。

3.3　甲状腺激素药物分析

在补充糖皮质激素的基础上，应给予甲状腺激素，否则可能诱发垂体前叶功能减退症危象[6]。甲状腺激素宜从小剂量起服用，缓慢递增剂量。目前首选左甲状腺素钠治疗已无争议。患者在使用糖皮质激素稳定后加用左甲状腺素钠片 12.5 μg qd。左

甲状腺素钠片一般起始剂量 25 ～ 50 μg • d^{-1}，数周内增至 100 ～ 200 μg • d^{-1}[2]。药师对患者进行用药交代，左甲状腺素钠片在早餐前至少半小时服用，长期用药，不可自行停用。定期监测甲状腺功能，根据结果调整用药，服药期间若出现心悸、震颤、呕吐等不适情况，及时告知医师和药师[13]。

甲状腺功能减退也可能引起精神症状。表现为言行迟钝、神情淡漠、少言，甚至抑郁、幻觉等。另外，甲状腺功能减退患者大脑对药物的反应阈值降低，对治疗的糖皮质激素反应可能异常敏感，表现出较为明显的中枢神经系统兴奋，甚至引起精神异常症状[14-16]。

3.4　纠正低钠血症用药分析

患者伴低钠血症，补钠治疗。补钠过程要严格把控用量和速度，速度不可过快。每日血钠升高的速度为 4 ～ 8 mmol • L^{-1}，24 h 小于 10 mmol • L^{-1}，48 h 小于 18 mmol • L^{-1}，72 h 小于 20 mmol • L^{-1}，直至血钠浓度达到 130 mmol • L^{-1}[17]。

7 月 26 日，给予患者补充 10%NaCl 40 mL，7 月 27 日患者的血钠为 132.5 mmol • L^{-1}，较入院时提升了 8 mmol • L^{-1}，补钠速度适宜。

糖皮质激素缺乏可引起低钠血症，低钠血症也可能使患者对外源性的糖皮质激素更敏感。低钠血症也可能会导致精神异常，如抑郁、易怒、性格改变等情绪的出现[17]。根据 2016 年《老年低钠血症的诊治中国专家共识》，血钠＜ 125 mmol • L^{-1} 为重度低钠血症，7 月 31 日患者血钠最低达 117.3 mmol • L^{-1}，达到重度低钠血症。因此，患者也可能因低钠血症加重精神异常。

根据以上分析，不除外患者应用醋酸泼尼松片引起精神异常，疾病因素也有可能导致或加重精神异常。对腺垂体功能减退症患者，合理使用糖皮质激素是提高疗效，减少不良反应的关键[11]。应根据药物的药动学特征和病情特点，选择适合的药物，调整剂量和用药时间，可减少糖皮质激素不良反应的发生[18]。

4　结论

临床药师参与 1 例腺垂体功能减退症患者治疗的全过程，与医师多次探讨用药问题，在药物选择及剂量上提出建议，取得了较为满意的效果。住院期间，对患者家属进行多次沟通及用药教育，做好用药交代，出院时加强用药宣教，快速有效解决临床中遇到的问题。

参考文献

[1] 葛丹，胡雪剑，任建功，等 . 腺垂体功能减退症 29 例临床分析 [J]. 甘肃医药，2022，41（9）：806-808.

[2] 母义明，郭代红，彭永德，等 . 临床药物治疗学内分泌代谢疾病 [M]. 北京：人民卫生出版社，2017，1：88-95，205-211.

[3] 陈灏珠，钟南山，陆再英 . 内科学（第八版）[M]. 北京：人民卫生出版社，2013：671-673.

[4] 聂梅 . 43 例腺垂体功能减退症患者的临床表现及诊疗措施探讨 [J]. 临床研究，2021，29（5）：112-113.

[5] Fleseriu M，Hashim IA，Karavitaki N，et al. Hormonal replacement in hypopituitarism in adults：an endocrine society clinical practice guideline [J]. J Clin Endocrinol Metab，2016，101（11）：3888-3921.

[6] 洪磊，邓昂 . 临床药师参与 1 例腺垂体功能减退症患者替代治疗用糖皮质激素品种选择的实践与分析 [J]. 上海医药，2017，38（13）：59-62.

[7] 袁立，张顺芝，何鸽飞，等 . 诺氏评估量表评价氯氮平诱导的免疫性溶血性贫血 [J]. 中南药学，2017，15（11）：1658-1661.

[8] 冉娅娟，龙恩武，钱妍 . 临床药师对 1 例席汉综合征患者使用糖尿皮质激素后出现精神异常的药学监护 [J]. 实用药物与临床，2020，23（5）：462-465.

[9] 尹寿祥，姜超 . 临床药师对腺垂体功能减退症患者精神异常的药学监护 [J]. 中国医院用药评价与分析，2017，17（5）：710-715.

[10] 郑金聪，朱俊峰，张妙英 . 糖皮质激素致精神障碍 1 例分析 [J]. 中国医院药学杂志，2010，30（20）：1798-1799.

[11] 中华医学会 . 糖皮质激素类药物临床应用指导原则 [J]. 中华内分泌代谢杂志，2012，28（2）：增录 2a-1-32.

[12] 李鑫 . 强的松与左甲状腺素钠片联合治疗腺垂体功能减退患者的疗效观察 [J]. 中国医药指南，2019，17（18）：148-149.

[13] 张赟，王涛，秦海艳，等 . 腺垂体功能减退症患者的药学监护 [J]. 中国临床研究，2018，31（12）：1702-1704.

[14] 李萍，陈若然，梁琳琅 . 小剂量泼尼松治疗腺垂体功能低下患者引发精神症状 1 例诊治体会 [J]. 内科急危重症杂志，2019，25（5）：435-437.

[15] Neary N，Nieman L. Adrenal insufficiency：etiology，diagnosis and treatment [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes，2010，17（3）：217-223.

[16] Laway BA，Bhat JR，Mir SA，et al. Sheehan’s syndrome with pancytopenia——complete recovery after hormone replacement（case series with review）[J]. Ann Hematol，2010，89（3）：305-308.

[17]《老年患者低钠血症的诊治中国专家建议》写作组 . 老年患者低钠血症的诊治中国专家建议 [J]. 中华老年医学杂志，2016，35（8）：795-804.

[18] 沈悌，厉有名 . 糖皮质激素临床的合理使用（第 2 版）[M]. 北京：人民卫生出版社，2018：33-34.

（收稿日期：2023-03-09；修回日期：2023-05-23）

药品不良反应

四环素类药物致 DRESS 综合征的文献分析

王樟根[1]，周峰[1]，周晓峰[2]，郭妍[1*]，刘琼[2*]（1. 中国人民解放军总医院海南医院药剂科，海南　三亚　572000；2. 中国人民解放军总医院海南医院医疗保障中心，海南　三亚　572000）

摘要：目的　分析四环素类药物致伴嗜酸性粒细胞增多和系统症状的药疹综合征（DRESS 综合征）的发生情况及特点，为临床安全合理用药提供参考。**方法**　通过检索中国知网（CNKI）、万方（WanFang）、维普（VIP）、PubMed、The Cochrane Library、Embase 等数据库，查找自建库至 2022 年 11 月 30 日期间四环素类药物导致 DRESS 综合征的文献，筛选出符合标准的病例进行统计和分析。**结果**　共收集到有效文献 29 篇，涉及患者 32 例，男性 9 例（28.13%），女性 23 例（71.87%）；30 岁以下 20 例；原发疾病主要为痤疮（19 例）；致敏药物 29 例为米诺环素（90.63%），3 例为多西环素（9.37%）；四环素类药物致 DRESS 综合征的潜伏期均值为（27.35±13.76）d，24 例患者在用药 14 d 之后出现不良反应；临床症状主要表现为皮疹、发热、面部水肿、淋巴结肿大、嗜酸性粒细胞增高及内脏受累，最常见受累的器官为肝脏（23 例），其次是心脏（12 例）。32 例患者中 21 例在予以皮质内固醇等药物治疗后好转；1 例好转后复发，1 例好转后皮质内固醇戒断失败；6 例患者死亡，其中 4 例死于 DRESS 综合征导致的心脏受累，2 例死于多器官衰竭；3 例患者治愈后出现自身免疫性后遗症，其中 2 例同时出现甲状腺功能障碍和 1 型糖尿病，1 例出现 1 型糖尿病。**结论**　四环素类药物致 DRESS 综合征的病死率较高，尤其是米诺环素诱发的心脏受累对患者危害极大，临床上应加强用药监测，此外 DRESS 综合征引发的自身免疫性疾病也需要引起关注。

关键词：四环素类药物；DRESS 综合征；文献分析
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2801-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.042

Literature analysis of DRESS syndrome caused by tetracyclines

WANG Zhang-gen[1], ZHOU Feng[1], ZHOU Xiao-feng[2], GUO Yan[1*], LIU Qiong[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Hainan Hospital*, *Chinese PLA General Hospital*, *Sanya Hainan* 572000; 2. *Department of Medical Service Center*, *Hainan Hospital*, *Chinese General Hospital of People's Liberation Army*, *Sanya Hainan* 572000)

Abstract: Objective To analyze the occurrence and characteristics of drug reaction to eosinophilia and systemic symptoms syndrome (DRESS syndrome) caused by tetracyclins, and provide reference for safe clinical drug use. **Methods** By searching CNKI, WanFang, VIP, PubMed, The Cochrane Library, Embase and other databases, we collected the literature on DRESS syndrome caused by tetracyclines from the establishment of the database to November 30, 2022, and screened the cases that met the criteria for statistical analysis. **Results** Totally 29 articles were included, involving 32 patients, 9 males (28.13%), 23 females (71.87%), with 20 patients under 30 years old. The primary disease was acne (19 cases). The main drugs for allergy included minocycline in 29 patients (90.63%) and doxycycline in 3 patients (9.37%). The average incubation period of DRESS syndrome caused by tetracyclines

基金项目：海南省重大科技计划资助（No. ZDKJ2019012）；联勤保障部队军事理论科研项目（No. JJ2021A06-B018）。
作者简介：王樟根，男，药师，主要从事临床药学与药事管理研究，email：M15692537036@126.com　*通信作者：郭妍，女，副主任药师，主要从事临床药学与药事管理研究，email：jiajia200206@126.com；刘琼，男，副主任医师，主要从事医疗管理与药事管理研究，email：liuqiong301hp@163.com

was (27.35±13.76) days, and 24 patients had adverse reactions after 14 days of medication. The main clinical symptoms included rash, fever, facial edema, lymph node enlargement, eosinophil elevation and visceral involvement. The main organs involved included the liver (23 cases), and the heart (12 cases). Among the 32 patients, 21 improved after treatment with corticosteroids and other drugs; 1 case recurred after improvement, and 1 case failed to withdraw corticosteroids after improvement; 6 died, 4 of which died of cardiac dysfunction caused by DRESS syndrome and 2 of multiple organ failure. Autoimmune sequelae occurred in the other 3 patients after recovery (thyroid dysfunction and type 1 diabetes in 2 patients, and type 1 diabetes in 1). **Conclusion** The mortality rate of DRESS syndrome caused by tetracycline drugs is relatively high, especially the cardiac dysfuntion caused by minocycline, which is extremely harmful to patients. In clinical practice, drug use monitoring should be strengthened. In addition, autoimmune diseases caused by DRESS syndrome also needs attention.

Key words: tetracycline; DRESS syndrome; literature analysis

四环素类药物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、立克次体、衣原体、疟原虫、支原体等具有活性，是一种广谱抗菌药物[1]。其作用机制是通过与核糖体30S亚基结合来抑制细菌蛋白质的合成，临床主要用于治疗寻常痤疮和布鲁菌、衣原体、霍乱弧菌等不常见病原体引起的感染[2]。四环素类药物常见的不良反应有阴道念珠菌病和服药后胃肠道不适等[3]，而DRESS综合征相对罕见。DRESS综合征是一种严重的药疹，其特征是发热、皮疹、面部水肿、淋巴结肿大、嗜酸性粒细胞增多、器官受累等，发病率在千分之一至万分之一，病死率高达10%[4-5]。DRESS综合征最常见的致敏药物是别嘌醇、抗癫痫药和抗菌药物[6]，目前国内文献报道引发DRESS综合征的抗菌药物主要有复方磺胺甲噁唑[7]、盐酸万古霉素[8]、头孢菌素[9]等，但是未见关于四环素类药物的相关报道。近年来，随着四环素类药物广泛应用，四环素类药物导致DRESS综合征也陆续有国外文献报道。通过对收集到的四环素类药物致DRESS综合征的29篇文献报道进行回顾性分析，总结其临床特点，旨在引起临床用药关注，为四环素类药物的临床安全合理使用提供参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

通过检索中国知网（CNKI）、万方数据库（WanFang）、维普（VIP）、PubMed、The Cochrane Library、Embase等数据库，检索时限均为各数据库建库至2022年11月30日。中文主题词："四环素""伴嗜酸粒细胞增多和系统症状的药疹综合征""DRESS综合征""药物超敏综合征"；英文主题词："Tetracyclines""Drug Hypersensitivity Syndromes"，采取主题词与自由词相结合的方法检索，以PubMed为例，检索策略见图1。

Search number	Query
27	#13 and #26
26	#14 or #15 or #16 or #17 or #18 or #19 or #20 or #21 or #22 or #23 or #24 or # 25
25	Drug Hypersensitivity Syndrome[Title/Abstract]
24	"Drug Reaction With Eosinophilia and Systemic Symptom"[Title/Abstract]
23	"Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms Syndrome"[Title/Abstract]
22	DRESS Syndromes[Title/Abstract]
21	DRESS Syndrome[Title/Abstract]
20	"Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms"[Title/Abstract]
19	Syndromes, Drug Hypersensitivity[Title/Abstract]
18	Syndrome, Drug Hypersensitivity[Title/Abstract]
17	Hypersensitivity Syndromes, Drug[Title/Abstract]
16	Hypersensitivity Syndrome, Drug[Title/Abstract]
15	Drug Hypersensitivity Syndromes[Title/Abstract]
14	"Drug Hypersensitivity Syndrome"[Mesh]
13	#1 or #2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8 or #9 or #10 or #11 or #12
12	Tetracyclines[Title/Abstract]
11	Tigecycline[Title/Abstract]
10	Tetracycline[Title/Abstract]
9	Rolitetracycline[Title/Abstract]
8	Oxytetracycline[Title/Abstract]
7	Minocycline[Title/Abstract]
6	Methacycline[Title/Abstract]
5	Lymecycline[Title/Abstract]
4	Doxycycline[Title/Abstract]
3	Demeclocycline[Title/Abstract]
2	Chlortetracycline[Title/Abstract]
1	"Tetracyclines"[Mesh]

图1　PubMed检索策略

Fig 1　PubMed retrieval strategy

1.2　纳排标准

纳入标准：① 国内外公开发表的文献报道，不限语种；② 致DRESS综合征不良反应与四环素类药物相关，并符合我国《药品不良反应报告和监测管理办法》中关联性评价标准；③ 文献报道中记载患者信息、出现DRESS综合征后的治疗和转归信息较为完整。排除标准：① 综述、论著和重复文献；② 病历信息不完整的文献，不相关文献，数据不明确、无法获取原文的文献。

1.3　方法

详细阅读32例个案报道，分别对患者性别、年龄、原发疾病、致敏药物、用药时间、联合用药、临床症状、累及器官、外周血嗜酸性粒细胞、治疗措施、转归、关联性评价等信息进行统计分析。

2　结果

2.1　患者的一般情况

检索到符合纳入标准的文献29篇，共32例四环素类药物致DRESS综合征病例报告[4，10-37]。

其中男性 9 例（28.13%），女性 23 例（71.87%）；32 例患者中除去文献[10]男性患者年龄未知，其余 31 例患者的平均年龄为（28.42±15.81）岁，最大年龄 78 岁，最小年龄 13 岁；所有病例中 30 岁以下患者 20 例，大于 60 岁 1 例[11]，本研究 32 例患者的原患疾病：痤疮 19 例[12-30]，肺炎 1 例[11]，膀胱炎 1 例[4]，呼吸道感染 1 例[31]，口腔周皮炎 1 例[32]，慢性结节病 1 例[33]，毛囊炎 3 例[10，34-35]，疟疾 1 例[23]，预防疟疾 1 例[36]，未提供原患疾病 3 例[23，37]。

2.2 导致 DRESS 综合征的四环素类药品种类、数量以及 DRESS 综合征的死亡人数

在调查的所有病例中，导致 DRESS 综合征的四环素类药物共有两种，分别是米诺环素和多西环素。其中米诺环素诱发的有 29 例[4，10-19，21-23，25-35，37]，多西环素诱发的有 3 例[20，24，36]。此外，引起因 DRESS 综合征而死亡的药物均是米诺环素，共计 6 例[13，14，17，23，32，35]。

2.3 四环素类药物使用情况与 DRESS 综合征发生时间

本研究 32 例患者 29 例患者使用米诺环素，3 例使用多西环素。32 例患者中有 5 例联合用药，1 例联用孟鲁司特钠、氢氯噻嗪、喹那普利，1 例联用螺内酯，1 例联用利福平，1 例联用阿德拉、喹硫平，1 例联合局部治疗（维生素 A 酸＋红霉素）。在发生 DRESS 综合征患者中，6 例用药时间未提供，剩余 26 例不良反应发生时间最短为用药后 7 d[12]，最长为用药后 77 d[17]，潜伏期均值（27.35±13.76）d，24 例患者在用药 14 d 之后出现不良反应。详见表 1。

2.4 四环素类药物致 DRESS 综合征的临床表现与实验室检查

四环素类药物致 DRESS 综合征的典型临床表现主要有广泛皮疹、发热、面部水肿、淋巴结肿大、嗜酸性粒细胞增高及多脏器功能受累。32 例患者出现斑丘疹等皮肤症状（27 例）、发热（26 例）、面部或眼眶等皮肤水肿（22 例）、淋巴结肿大（20 例）、呼吸困难（5 例）、恶心（4 例）、胸痛（3 例）、心力衰竭（2 例）、低血压（2 例）、呼吸窘迫（1 例）、呼吸衰竭（2 例）、休克（2 例）、小腿肿胀（1 例）、运动功能减退（1 例）、运动障碍（1 例）、心周积液（1 例）、心悸（1 例）。32 例患者中，最常见的受累器官为肝脏（23 例），其次是心脏（12 例），肾（7 例），肺（7 例），甲状腺（4 例），脑（2 例），脾脏（1 例），未提及（1 例）；累及三个脏器、两个脏器及一个脏器的分别有 7 例、10 例及 13 例，有 1 例患者未提及累及的脏器；实验室检查表现为患者嗜酸性粒细胞增高（25 例），肝功能损伤（23 例），肾功能损伤（7 例），肺部影像学改变（7 例），心肌炎（12 例）。见表 1。

2.5 临床处理、预后及转归

32 例患者入院后均停用可疑致敏药物。22 例予以皮质类固醇治疗；6 例予以皮质类固醇＋免疫调节剂治疗；1 例予以皮质类固醇＋抗过敏治疗；1 例单独予以免疫抑制剂治疗；1 例予以抗过敏治疗，在病情恶化 48 h 后才予以皮质类固醇治疗；1 例未提及治疗措施。治疗后 21 例好转，4 例死于心脏受累，2 例死于多器官衰竭，2 例患者同时出现甲状腺功能障碍和 1 型糖尿病，1 例出现 1 型糖尿病，1 例患者好转后复发，1 例患者皮质类固醇戒断失败。见表 1。

2.6 不良反应关联性评价

依照《药品不良反应报告和监测管理办法》规定，对本文 29 篇（32 例）个案报道中不良反应的严重程度及与致敏药物的相关性进行评价，32 例患者，其关联性评价为“可能”有 6 例，“很可能”有 26 例，见表 1。

3 讨论

3.1 不良反应影响因素分析

目前，国内未见到关于四环素类药物致 DRESS 综合征不良反应的个案报道，本研究共纳入检索到符合标准的文献 29 篇[4，10-37]，均为国外的病例报告。统计结果表明，32 例患者的原患疾病中痤疮 19 例，提示在四环素类药物致 DRESS 综合征患者的原发病中痤疮构成比最高，可能的原因是：四环素类药物有效且成本低，是治疗痤疮最常用的口服抗菌药物之一[38]；米诺环素作为第二代半合成四环素类，主要用于治疗寻常痤疮[1]。32 例患者中男性 9 例（28.13%），女性 23 例（71.87%），提示在四环素类药物致 DRESS 综合征患者中女性构成比远高于男性，可能的原因是：粉刺作为痤疮的一种，在青少年和成人女性中常见[39-41]。病例中 30 岁以下的患者 20 例（64.52%），提示在四环素类药物致 DRESS 综合征患者中 30 岁以下年龄段构成比最高，可能的原因是：四环素类药物主要适应证就是痤疮；在青春期中身体激素环境的变化改变了皮脂腺功能，皮脂腺单位内细菌过度生长导致痤疮的发生[41]。DRESS 综合征发生在应用四环素类药物后的 7 ～ 77 d，其中 24 例患者在用药 14 d 之后出现不良反应，这与文献[42]报道 DRESS 综合征通常在接触致敏药物后 2 ～ 6 周发生的结果基本一致。提示医师在临床治疗使用四环素类药物时需要注意 DRESS 综合征的发生，特别是在用药

表 1　四环素类药物致 DRESS 综合征文献病例资料

Tab 1　Literature and case data of DRESS syndrome caused by tetracyclines

患者信息与原患疾病	用药时间	联合用药	主要临床症状	累及器官	外周血嗜酸性粒细胞	治疗措施	转归	关联性评价
女，60 岁，因膀胱炎使用米诺环素[4]	未提供	未提供	发热、全身红斑、眼眶水肿、淋巴结肿大、心周积液、低血压	心脏、肝脏	21%	停药，类固醇脉冲治疗（连续 3 d 静脉注射甲基强的松龙琥珀酸钠、剂量 1 g·d^{-1}），静脉滴注丙种球蛋白，使用心肺支持，主动脉内球囊泵	好转	很可能
男，约 30 岁，因毛囊炎使用米诺环素[10]	13 d	未提供	发热、四肢、斑丘疹、面部嘴唇水肿、淋巴结肿大	肝脏	未提供	停药，连续 3 d 口服环孢素 5 mg/（kg·d）	好转	很可能
男，78 岁，因肺炎使用米诺环素[11]	26 d	未提供	发热、斑丘疹、面部水肿、小腿肿胀	未提供	未提供	停药，给予泼尼松龙 50 mg·d^{-1}，同时给予肝素治疗深静脉血栓	好转	很可能
女，37 岁，因寻常痤疮使用米诺环素[12]	7 d	未提供	发热、麻疹样皮疹、面部肿胀、休克、全身运动功能减退	肝脏、心脏	增高	停药，给予皮质类固醇、环孢素、托法替尼治疗	好转	很可能
女，20 岁，因痤疮使用米诺环素[13]	28 d	未提供	发热、丘疹、淋巴结肿大、胸痛、呼吸困难	肝脏、心脏	1.1×10^9·L^{-1}	停药，给予甲基强的松龙 32 mg·d^{-1} 治疗 3 周	转氨酶恢复、皮疹好转，停甲基强的松龙后出现胸痛伴呼吸困难，最终死于心脏移植失败	很可能
女，19 岁，因痤疮使用米诺环素[14]	28 d	未提供	发热、头颈部分布斑丘疹、严重面部水肿、胸痛、心悸、呼吸困难	肝脏、心脏	增高	停药，全身皮质类固醇治疗	30 d 后出现呼吸困难，诊断为巨细胞心肌炎，最终死于心脏移植失败	可能
女，15 岁，因痤疮使用米诺环素[15]	28 d	未提供	发热、弥漫性红斑、皮肤肿胀	肝脏、甲状腺	14%	停药，口服皮质类固醇治疗，给予抗组胺药物	肝炎、皮疹等症状好转，但是出现自身免疫性甲状腺功能亢进，1 型糖尿病	很可能
女，38 岁，因痤疮使用米诺环素[16]	21 d	孟鲁司特、氢氯噻嗪、喹那普利	发热、全身红斑鳞状丘疹、眼眶水肿、淋巴结肿大、呼吸困难	肝脏、甲状腺、肾脏、心脏	11%	外用曲安奈德乳膏，给予地塞米松 10 mg/（kg·d）、甲基强的松龙 1 mg/（kg·d）、环孢素、利妥昔单抗、血浆置换治疗	好转	很可能
女，16 岁，因痤疮使用米诺环素[17]	77 d	未提供	发热、斑丘疹，四肢、面部和躯干明显水肿、淋巴结肿大、胸痛、恶心、运动障碍	心脏、肝脏	6%	停药并口服强的松，给药时间 14 d	戒除皮质内固醇后导致症状加重引发急性心肌炎、严重心力衰竭和急性肾衰竭后死亡	可能
女，31 岁，因痤疮使用米诺环素[18]	21 d	未提供	发热、上躯干和四肢近端有红斑皮疹、眼睑水肿，淋巴结肿大、恶心	脑（弥漫性脑水肿脑膜炎）	2.8×10^9·L^{-1}	停药，采用甲基强的松龙 60 mg·d^{-1} 治疗逐渐减量、用药时间 8 个月	好转	很可能
男，15 岁，因痤疮使用米诺环素[19]	42 d	未提供	发热、皮疹、面部肿胀、淋巴结肿大、心力衰竭、休克	肝脏、心脏、肾脏	4.6×10^9·L^{-1}	停药，给予高剂量皮质类固醇并逐渐减量，给药时间大于 7 周，给予免疫球蛋白、环孢素	好转	很可能
女，17 岁，因痤疮使用多西环素[20]	30 d	螺内酯	发热、皮疹、面部水肿、低血压	肝脏	$\geqslant 1.5\times10^9$·L^{-1}	停药，局部皮质内固醇治疗并口服强的松剂量 1 mg/（kg·d），给药疗程 42 d	好转	很可能

续表 1

患者信息与原患疾病	用药时间	联合用药	主要临床症状	累及器官	外周血嗜酸性粒细胞	治疗措施	转归	关联性评价
男，15 岁，因痤疮使用米诺环素 [21]	21 d	未提供	发热、唇口周水肿、躯干和四肢弥漫性麻疹样皮疹、淋巴结肿大、呼吸困难、恶心	肝脏、肺、心脏	11%	停药，给予强的松 1 mg/（kg • d），给药疗程 42 d	好转，但是出现复发	很可能
女，13 岁，因痤疮使用米诺环素 [22]	21 d	未提供	发热、皮疹、肝衰竭	肝脏、甲状腺	1.992×10^{9} • L^{-1}	肝移植，给予他克莫司、吗替麦考酚酯、强的松 [给药剂量 1 mg/（kg • d）疗程 5 个月后减量至 0.5 mg/（kg • d）]	两个月后出现自身免疫性后遗症：甲状腺功能障碍和 1 型糖尿病	可能
女，15 岁，因痤疮使用米诺环素 [23]	未提供	未提供	发热、皮疹、面部水肿、淋巴结肿大	肝脏、肺、肾脏	增高	停药，第 21 日开始静脉予甲泼尼龙后口服泼尼松 1 mg/（kg • d），减量为 0.3 mg/（kg • d）	复发，并出现高血压性脑炎，肾功能不全，肺炎，多器官衰竭后死亡	很可能
男，16 岁，原发疾病未知使用米诺环素 [23]	未提供	未提供	皮疹、面部水肿、淋巴结肿大	肺	增高	未提供	好转	可能
女，33 岁，因疟疾使用米诺环素 [23]	未提供	未提供	皮疹、面部水肿、淋巴结肿大	肝脏、肺、心脏	增高	停药，予皮质类固醇	好转	很可能
女，20 岁，因痤疮使用多西环素 [24]	21 d	未提供	发热、斑丘疹、面部水肿、淋巴结肿大、呼吸衰竭	肺	0.98×10^{9} • L^{-1}	停药，静脉补水，予苯海拉明、盐酸异丙嗪、万古霉素	症状恶化，多器官受累，予脉冲剂量的甲基强的松龙，外用皮质内固醇治疗后好转	可能
女，21 岁，因痤疮使用米诺环素 [25]	未提供	未提供	嗜酸性粒细胞增多症和全身症状、呼吸困难、胸痛	心脏	9.4%	停药，予大剂量甲基强的松龙、免疫球蛋白、抗胸腺细胞球蛋白，体外膜肺氧合移植，口服甲基强的松龙、环孢素、吗替麦考酚	好转	很可能
女，27 岁，因痤疮使用米诺环素 [26]	28 d	利福平	发热、淋巴结肿大、斑丘疹、面部肿胀、恶心	肝脏、脾脏	15%	停药，予静脉注射 100 mg • d^{-1} 的甲基强的松龙后改为口服强的松 100 mg • d^{-1} 并逐渐减量，疗程 2 周	好转	很可能
男，14 岁，因痤疮使用米诺环素 [27]	30 d	阿德拉缓释胶囊，喹硫平	发热、斑丘疹、淋巴结肿大	肝脏、肾脏	23%	停药，予以苯海拉明，口服强的松，疗程 2 周	好转	很可能
女，38 岁，因痤疮使用米诺环素 [28]	未提供	未提供	嗜酸性粒细胞增多症和全身症状、心力衰竭、急性缺氧性呼吸衰竭	心脏	8×10^{9} • L^{-1}	停药，予高剂量强的松、环孢素、米力农，因肾功能损害停用环孢素，予以吗替麦考酚酯未见改善，予利妥昔单抗和为期 4 d 血浆置换	好转	很可能
女，23 岁，因痤疮使用米诺环素 [29]	15 d	联合局部治疗（维 A 酸＋红霉素）	发热、全身弥漫性红斑性微孢皮疹	肝脏	未提供	停药，予皮质类固醇 80 mg • d^{-1} 和免疫球蛋白	好转，但皮质类固醇戒断失败	很可能
男，19 岁，因痤疮使用米诺环素 [30]	28 d	未提供	发热、呼吸窘迫、淋巴结肿大	肝脏、肾、肺	1.64×10^{9} • L^{-1}	停药，静脉注射 2 mg/（kg • d）皮质类固醇，一年后逐步停用	好转	很可能

续表 1

患者信息与原患疾病	用药时间	联合用药	主要临床症状	累及器官	外周血嗜酸性粒细胞	治疗措施	转归	关联性评价
女，47 岁，因呼吸道感染使用米诺环素[31]	14 d	未提供	嗜酸性粒细胞增多症和全身症状	脑	增高	停药，予皮质类固醇治疗	好转	很可能
女，46 岁，因口腔周皮使用炎米诺环素[32]	21 d	未提供	发热、鳞状红斑、淋巴结肿大	心脏、肾	$4.1\times10^{9}\cdot L^{-1}$	停药，口服甲基强的松龙 40 $mg\cdot d^{-1}$	出现间质性肾炎，房颤，出院 3 个月后复发，最终死于嗜酸性粒细胞性心肌炎	可能
女，41 岁，因慢性结节病使用米诺环素[33]	42 d	未提供	发热、皮疹、淋巴结肿大	肝脏	未提供	停药，予 1 mg/（kg·d）泼尼松治疗	好转	很可能
女，18 岁，因毛囊炎使用米诺环素[34]	31 d	未提供	发热、皮疹、面部水肿、淋巴结肿大	肝脏	$1.4\times10^{9}\cdot L^{-1}$	停药，予泼尼松治疗	好转	很可能
男，17 岁，因毛囊炎使用米诺环素[35]	42 d	未提供	剥脱性红皮病、面部水肿	肾脏、肺、甲状腺	未提供	予泼尼松 1 mg/（kg·d）好转后出现反弹、再次提高泼尼松剂量至 2 mg/（kg·d）获得症状改善后，再次减量后加重	死于多器官衰竭	可能
女，59 岁，因预防疟疾使用多西环素[36]	15 d	未提供	发热、斑丘疹、面部水肿	肝脏	15.5%	停药，予强的松 1 mg/（kg·d），疗程 1 个月	好转后 12 个月内出现严重皮肤症状，13 个月后出现自身免疫性糖尿病	很可能
男，25 岁，原发疾病未知使用米诺环素[37]	45 d	未提供	发热、斑丘疹、淋巴结肿大、面部脓疱，面部水肿	肝脏	未提供	停药，连续 3 d 静脉予甲基强的松龙 500 $mg\cdot d^{-1}$，口服泼尼松龙 30 $mg\cdot d^{-1}$、30 d 内逐渐减少剂量	好转	很可能
女，28 岁，原发疾病未知使用米诺环素[37]	16 d	未提供	发热、斑丘疹、淋巴结肿大、面部水肿	肝脏	未提供	停药，连续 3 d 静脉予甲基强的松龙 500 $mg\cdot d^{-1}$，口服泼尼松龙 30 $mg\cdot d^{-1}$、30 d 内逐渐减少剂量	好转	很可能

后 14 ～ 77 d 内需密切关注患者是否出现发热、皮疹、面部水肿、嗜酸性粒细胞增高等 DRESS 综合征的相关临床表现。此外，医师还应详细询问患者的用药史，特别是接诊伴有嗜酸性粒细胞增高的皮疹发热患者，尽早对 DRESS 综合征进行确诊并及时停用致敏药物并予以激素治疗。

3.2　米诺环素和多西环素致 DRESS 综合征分析

米诺环素和多西环素都是第二代半合成四环素类药物，具有相似的化学结构和抗菌谱[43]。本研究中 32 例 DRESS 综合征患者中有 29 例使用米诺环素，其中 6 例为死亡病例；3 例使用多西环素，经治疗后患者全部康复。临床在应用米诺环素或者多西环素时，尤其是年轻患者，必须问询患者的过敏史、用药史，结合患者病情个体化用药，加强用药监护与管理。

3.3　米诺环素和多西环素致 DRESS 综合征的临床治疗与转归

本研究中发现皮质类固醇未及时应用会导致患者预后较差[23]，皮质类固醇过早地停药或者减量会导致患者 DRESS 综合征复发[21，23，32]或者病情恶化[13，17，21，23，35-36]。DRESS 综合征是对药物及其代谢产物的超敏反应，它是药物特异性免疫应答和抗病毒免疫应答之间相互作用的结果[44]。DRESS 临床特征为发热、皮疹、嗜酸性粒细胞增多、淋巴结肿大，可能累及心脏、肺和肾脏等[25]，主要治疗方案包括停用致敏药物、使用皮质类固醇治疗、支持性护理，其他给药方案包括注射用环磷酰胺、免疫球蛋白、口服环孢素等[45]。DRESS 综合征治疗中最重要的是停用可疑的致敏药物，对于轻度 DRESS 综合征患者，

可予局部皮质类固醇和支持性护理；对于重度DRESS综合征患者，全身皮质类固醇是主要的治疗方法[20]。全身皮质类固醇以 1 mg/（kg·d）泼尼松的等效剂量开始，在 3 ～ 6 个月内逐渐减量[45]。本研究中 32 例四环素类药物致 DRESS 综合征患者伴有内脏受累，最常见的受累器官是肝脏，其次是心脏、肾脏、肺等，但其中心肌炎极易引发重症，导致患者死亡。32 例四环素类药物致 DRESS 综合征的患者，入院治疗后均停用致敏药物，大部分患者经及时予以皮质类固醇、免疫调节剂、抗过敏等治疗后恢复。部分患者由于未能及时予以皮质类固醇或者过早停用或减量皮质内固醇，出现 DRESS 综合征复发、自身免疫性疾病或者死亡的情况。对于四环素类药物引起DRESS 综合征的患者，医护人员在治疗过程中要密切关注患者体温、皮疹、面部水肿情况，尤其注意患者是否出现缺氧、胸痛、呼吸衰竭等症状，密切监测肝肾、心脏、肺等内脏功能。对于重症患者，尤其是呼吸系统受累以及心脏受累的患者引发的呼吸困难、射血分数下降，还需予以心肺支持，使用主动脉内球囊反搏泵等治疗。

综上所述，四环素类药物致 DRESS 综合征比较罕见。DRESS 综合征引发的心肌炎是一种潜在的严重威胁生命的并发症。DRESS 综合征最初通常表现为与其他类型的药疹无法区分的麻疹样皮疹，此外，由于潜伏期相对较长，以及始发药物停止后持续时间较长，这些症状通常不被认为与药物有关。DRESS 综合征患者也需要监测自身免疫性疾病等长期后遗症，DRESS 综合征的延迟并发症可能会导致多种自身免疫性疾病，包括自身免疫性甲状腺炎[15，22]、1 型糖尿病[15，22，36]。DRESS 综合征早期诊断、停药和皮质类固醇治疗可以挽救严重疾病患者的生命，因此临床医师和临床药师对四环素类药物导致 DRESS 综合征的总体认识非常重要，同时提高 DRESS 综合征的早期识别和治疗能力对延缓疾病进展、挽救患者生命具有重要意义。本研究建立在个案报道的基础上，由于四环素类药物临床已经较少使用，主要适应证是痤疮，在年轻人群中多见，女性居多，得出的结论有一定局限性。

参考文献

[1] Garrido-Mesa N，Zarzuelo A，Gálvez J. Minocycline：far beyond an antibiotic [J]. Br J Pharmacol，2013，169（2）：337-352.

[2] Klein NC，Cunha BA. Tetracyclines [J]. Med Clin North Am，1995，79（4）：789-801.

[3] 张道军，钱添，郝飞 . 四环素类药物治疗寻常痤疮的再评价 [J]. 临床皮肤科杂志，2020，49（3）：190-192.

[4] Kanno K，Sakai H，Yamada Y，et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome due to minocycline complicated by severe myocarditis [J]. J Dermatol，2014，41（2）：160-162.

[5] Marks CM，Nawn JE，Caplow JA. Antibiotic treatment for chronic lyme disease-say no to the DRESS [J]. JAMA Intern Med，2016，176（12）：1745-1746.

[6] Holbrook MB，Glick J. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS Syndrome）[J]. J Emerg Med，2019，56（5）：562-563.

[7] 谢小云，竺嘉幸，邹淑梅，等 . 复方磺胺甲噁唑片致 DRESS 综合征 1 例及文献复习 [J]. 中南药学，2022，20（12）：2950-2954.

[8] 王哲，孙东 . 万古霉素治疗小儿骨髓炎致 DRESS 综合征 1 例 [J]. 临床小儿外科杂志，2020，19（10）：957-960.

[9] 李小乐，郭伟，宁静，等 . 头孢菌素致儿童 DRESS 综合征 2 例 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（6）：673-674.

[10] Kirchhof MG，Wong A，Dutz JP. Cyclosporine treatment of drug-induced hypersensitivity syndrome [J]. JAMA Dermatol，2016，152（11）：1254-1257.

[11] Hashizume H，Hata M. Deep venous thrombosis associated with cytomegalovirus reactivation in drug-induced hypersensitivity syndrome [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2013，27（5）：658-659.

[12] Azari B，Chowdhury M，Riello R，et al. Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）syndrome associated eosinophilic myocarditis treated with tofacitinib an oral janus（JAK）kinase inhibitor [J]. JACC，2017，69（11）：2351.

[13] Micozzi S，Pinto C，Seoane M，et al. Giant cell myocarditis in hypersensitivity reactions：is an early diagnose possible? [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2015，115（3）：247-248.

[14] San Nicasio CS，Fernández CM，Carreroet EB，et al. Is minocycline a safe treatment for acne? [J]. J Am Acad Dermatol，2011，64（2）：AB111.

[15] Brown RJ，Rother KI，Artmanet H，et al. Minocycline-induced drug hypersensitivity syndrome followed by multiple autoimmune sequelae [J]. Arch Dermatol，2009，145（1）：63-66.

[16] Shaughnessy KK，Bouchard SM，Mohr MR，et al. Minocycline-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）syndrome with persistent myocarditis [J]. J Am Acad Dermatol，2010，62（2）：315-318.

[17] Taylor JL，Kulkarni MS，Behringer EC，et al. Minocycline-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome：myocarditis and multiple organ failure [J]. ICU Director，2012，3（3）：139-143.

[18] Lefebvre N，Forestier E，Farhiet D，et al. Minocycline-induced hypersensitivity syndrome presenting with meningitis and brain edema：a case report [J]. J Med Case Rep，2007，1：22.

[19] Becker BA，Caruthers CN，Jureidini S，et al. Non-invasive management of myocarditis despite a negative gadolinium-enhanced cardiac MRI in a 15-year-old boy with minocycline triggered dress syndrome [J]. J Allergy Clin Immunol，2015，

135（2）：AB123.
[20] Hamel BL，Mason SF，Burek AG，et al. A rare case of acne medication-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms [J]. WMJ，2022，121（3）：e53-e56.
[21] Prejean R，Haas C. Recalcitrant minocycline-induced DRESS mimicking HLH [J]. Dermatol Ther，2020，33（6）：e14104.
[22] Lan J，Lahoti A，Lew DB. A severe case of minocycline-induced DRESS resulting in liver transplantation and autoimmune sequelae [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2016，116（4）：367-368.
[23] Eshki M，Allanore L，Musette P，et al. Twelve-year analysis of severe cases of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms：a cause of unpredictable multiorgan failure [J]. Arch Dermatol，2009，145（1）：67-72.
[24] Robles DT，Leonard JL，Compton N，et al. Severe drug hypersensitivity reaction in a young woman treated with doxycycline [J]. Dermatology，2008，217（1）：23-26.
[25] Howell E，Paivanas N，Stern J，et al. Treatment of acute necrotizing eosinophilic myocarditis with immunosuppression and mechanical circulatory support [J]. Circ Heart Fail，2016，9（12）：e003665.
[26] LaHood N，Sokol K. DRESS syndrome associated with splenic thrombosis [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2017，119（5）：463-464.
[27] Vinson AE，Dufort EM，Willis MD，et al. Drug rash，eosinophilia，and systemic symptoms syndrome：two pediatric cases demonstrating the range of severity in presentation-a case of vancomycin-induced drug hypersensitivity mimicking toxic shock syndrome and a milder case induced by minocycline [J]. Pediatr Crit Care Med，2010，11（4）：e38-e43.
[28] Prabhu G，Tahhan S. Eosinophils were at the heart of the matter：eosinophilic myocarditis responsive to plasma exchange and rituximab [J]. Chest，2021，160（4）：A113.
[29] Trivin C，Brion JP，Bourrain JL，et al. Minocycline-induced drug hypersensitivity syndrome with hepatic disease [J]. Therapie，2005，60（6）：590-593.
[30] Favrolt N，Bonniaud P，Collet E，et al. Severe drug rash with eosinophilia and systemic symptoms after treatment with minocycline [J]. Rev Mal Respir，2007，24（7）：892-895.
[31] Gaha M，Landry D，Bélair M，et al. DRESS syndrome：cerebral vasculitic-like presentation [J]. Neuroradiology，2015，57（10）：1015-1021.
[32] Wu PA，Anadkat MJ. Fever，eosinophilia，and death：a case of minocycline hypersensitivity [J]. Cutis，2014，93（2）：107-110.
[33] Bachelez H，Senet P，Cadranel J，et al. The use of tetracyclines for the treatment of sarcoidosis [J]. Arch Dermatol，2001，137（1）：69-73.
[34] Gowani F，Gehrs B，Scordino T. Drug-induced hypersensitivity syndrome：a clinical，radiologic，and histologic mimic of lymphoma [J]. Case Rep Hematol，2018，2018：7037352.
[35] Plost G，Gurnee E，Rice Z，et al. A fatal case of drug-induced hypersensitivity syndrome complicated by multiple autoimmune disorders including bullous pemphigoid [J]. Pediatr Dermatol，2017，34：S26-S27.
[36] Mailhol C，Tremeau-Martinage C，Paul C，et al. Severe drug hypersensitivity reaction（DRESS syndrome）to doxycycline [J]. Ann Dermatol Venereol，2010，137（1）：40-43.
[37] Natkunarajah J，Goolamali S，Craythorne E，et al. Ten cases of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）treated with pulsed intravenous methylprednisolone [J]. Eur J Dermatol，2011，21（3）：385-391.
[38] Brown SK，Shalita AR. Acne vulgaris [J]. Lancet，1998，351（9119）：1871-1876.
[39] Johnson ML，Johnson KG，Engel A. Prevalence，morbidity，and cost of dermatologic diseases [J]. J Am Acad Dermatol，1984，11（5 Pt 2）：930-936.
[40] Stathakis V，Kilkenny M，Marks R. Descriptive epidemiology of acne vulgaris in the community [J]. Australas J Dermatol，1997，38（3）：115-123.
[41] Knutsen-Larson S，Dawson AL，Dunnick CA，et al. Acne vulgaris：pathogenesis，treatment，and needs assessment [J]. Dermatol Clin，2012，30（1）：99-106.
[42] Isaacs M，Cardones AR，Rahnama-Moghadam S. DRESS syndrome：clinical myths and pearls [J]. Cutis，2018，102（5）：322-326.
[43] Singh S，Khanna D，Kalra S. Minocycline and doxycycline：more than antibiotics [J]. Curr Mol Pharmacol，2021，14（6）：1046-1065.
[44] Miyagawa F，Asada H. Current perspective regarding the immunopathogenesis of drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DIHS/DRESS）[J]. Int J Mol Sci，2021，22（4）：2147.
[45] Gottlieb M，Figlewicz MR，Rabah W，et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms：an emergency medicine focused review [J]. Am J Emerg Med，2022，56：1-6.

（收稿日期：2023-01-05；修回日期：2023-03-20）

13 例 PD-1 抑制剂致免疫性肺炎病例分析

程晟，温爱萍，董怡文，余俊先，李哲，李新刚*（首都医科大学附属北京友谊医院药学部，北京　100050）

摘要：目的　分析 PD-1 抑制剂相关免疫性肺炎的临床特点，为临床安全用药提供参考。**方法**　回顾性分析首都医科大学附属北京友谊医院 2019 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日共 13 例 PD-1 抑制剂致免疫性肺炎病例的诊疗过程及临床特点。**结果**　13 例患者中男 11 例，女 2 例；使用药物包括卡瑞利珠单抗 6 例，纳武利尤单抗 3 例，替雷利珠单抗 2 例，信迪利单抗 2 例。用药开始至确诊平均为（5.15±2.80）个治疗周期。患者症状主诉为喘憋 6 例（46.15%）；咳嗽及咳痰的 3 例（23.08%）；没有明显主观症状的 5 例（38.46%）。胸部 CT 检查结果以双肺多发磨玻璃影为主，共 12 例（92.31%）。13 例患者予糖皮质激素治疗，平均疗程为（27.38±16.46）d。经治疗所有患者临床症状均明显好转。复查胸部 CT 仅 1 名患者痊愈。**结论**　免疫性肺炎是 PD-1 抑制剂发生率较低的严重不良反应，临床药师应积极参与评估和处置，保证患者的用药安全。

关键词：PD-1 抑制剂；免疫检查点抑制剂；免疫性肺炎
中图分类号：R563.1　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2809-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.043

13 cases of immune-related pneumonia induced by PD-1 inhibitor

CHENG Sheng, WEN Ai-ping, DONG Yi-wen, YU Jun-xian, LI Zhe, LI Xin-gang* (*Department of Pharmacy*, *Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University*, *Beijing* 100050)

Abstract: Objective To analyze the clinical characteristics of immune-related pneumonia associated with PD-1 inhibitors, and provide reference for clinical safe drug use. **Methods** The diagnosis and treatment of 13 cases of immune-related pneumonia induced by PD-1 inhibitors in Beijing Friendship Hospital affiliated to Capital Medical University from Jan 1st 2019 to Dec 31st 2022 were analyzed retrospectively. The clinical characteristics and pharmaceutical care were analyzed. **Results** There were 11 males and 2 females. The medications included 6 of camrelizumab, 3 of nivolumab, 2 of tirelizumab, and 2 of sintilimab. The average period from the beginning of medication to the diagnosis was (5.15±2.80). The main complaints of the patients included 6 cases of dyspnea (46.15%), and 3 of cough and expectoration (23.08%). There were 5 (38.46%) without obvious subjective symptoms. Chest CT scan mainly showed multiple ground glass shadows in both lungs in 12 (92.31%). Totally 13 patients given glucocorticoid, and the average course of treatment was (27.38±16.46) d. After the treatment, the clinical symptoms of all patients were improved obviously. Only one patient recovered. **Conclusion** Immune-related pneumonia is a serious adverse reaction with low incidence of PD-1 inhibitor. Clinical pharmacists should pay attention to the evaluation and management of safe of drug use.

Key words: PD-1 inhibitor; immune checkpoint inhibitor; immune-related pneumonia

程序性死亡受体 1（PD-1）是一种由 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞等免疫细胞表达的受体。PD-1 与其配体程序性死亡 - 配体 1（PD-L1）结合可直接抑制肿瘤细胞的凋亡，促进外周效应 T 细胞耗竭，同时促进效应 T 细胞转变成调节性 T 细胞 [1-2]。PD-1 抑制剂作为一种新的肿瘤治疗方式已显示出了巨大的优势和潜力。但 PD-1 抑制剂可以导致免疫相关不良反应，主要包括皮肤、肺、内分泌、血液、肝脏、肾脏、肌毒性等。研究数据表明，PD-1 抑制剂导致所有级别的免疫性肺炎

基金项目：2022 白求恩・求索 - 药学科研能力建设项目（No.23）；国家自然科学基金青年项目（No.82203039）。
作者简介：程晟，男，硕士，副主任药师，主要从事临床药学研究，email：chengsheng_08@sina.com　*通信作者：李新刚，男，主任药师，副教授，硕士研究生导师，主要从事药事管理及定量药理学研究，email：lxg198320022003@163.com

发生率为 3.6%，重症肺炎发生率为 1.1%[3-4]。免疫相关性肺炎可以造成治疗的中断，甚至威胁患者生命，需要临床医务人员予以重视。笔者总结了我院近 4 年确诊免疫性肺炎的出院患者，对病例临床特点和药学监护点进行了分析，以期为医师和药师开展用药安全管理工作提供依据。

1　资料与方法

1.1　病例资料

利用医院信息系统检索首都医科大学附属北京友谊医院 2019 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日期间诊断为免疫性肺炎的出院患者。纳入标准：病程中使用过 PD-1 抑制剂；诊断为免疫相关性肺炎且随访 3 个月以上者；病历资料齐全。排除标准：使用 PD-1 抑制剂前诊断为间质性肺炎者。

查阅患者病历，详细记录患者基本情况、临床诊断、既往病史、PD-1 抑制剂具体品种、用法用量、并用抗肿瘤药物、临床症状、影像学检查（胸部 CT）、实验室检查（确诊时血氧分压）及预后情况等。分析病例特点和药学监护要点。

1.2　药品不良反应关联性评价标准

使用国家药品不良反应监测中心制订的因果判断准则评价因果关系。具体为：① 用药与药品不良反应（ADR）/ 药品不良事件（ADE）的出现有无合理的时间关系？② 反应是否符合该药已知的 ADR 类型？③ 停药或减量后，反应是否消失或减轻？④ 再次使用可疑药品是否再次出现同样 ADR/ADE? ⑤ ADR/ADE 是否可用并用药的作用、患者病情的进展、其他治疗的影响来解释。①②③④是，⑤否，评价为肯定；①②③是，④未再次使用，⑤否，评价为很可能；①②③存疑，④未再次使用，⑤否，评价为可能。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

2　结果

2.1　基本情况

共纳入使用 PD-1 抑制剂后诊断为免疫性肺炎的患者 13 例，其中男性 11 例，女性 2 例。平均年龄为（65.77±8.33）岁。原发病方面，所有患者均为实体器官肿瘤，其中非小细胞肺癌 6 例，小细胞肺癌 1 例，原发性肝癌 3 例，食道癌 1 例，胃癌 1 例，直肠癌 1 例。

既往病史方面，4 例患者合并有两种慢性疾病，8 例患者患有 1 种慢性疾病，1 例患者既往体健。并发症包括：肺气肿（3 例），慢性支气管炎（2 例），糖尿病（3 例），高血压（4 例），慢性乙型肝炎（2 例），慢性阻塞性肺疾病（1 例），肾透明细胞癌（1 例）。

2.2　免疫性肺炎的临床特点

药品不良反应关联性评价结果：3 例为可能，10 例为很可能。最常见的诱发药物为卡瑞利珠单抗，共 6 例。13 例患者从开始使用 PD-1 抑制剂治疗到确诊免疫性肺炎时间，最长为 11 个周期，最短为首次用药后即出现相应症状，平均为（5.15±2.80）周期。患者主诉主要为喘憋，共 6 例，占 46.15%；咳嗽及咳痰的 3 例，占 23.08%；没有明显主观症状的 5 例，38.46%。实验室检查方面，7 例患者血气分析示低氧血症，占 53.85%；5 名患者未行血气分析。影像学检查方面，以双肺多发磨玻璃影为主，共 12 例，占 92.31%。具体见表 1。

2.3　治疗及转归

所有患者均予糖皮质激素治疗。1 例患者给予静脉滴注地塞米松 5 mg，疗程 5 d。7 例患者给予静脉滴注甲泼尼龙治疗后改为口服糖皮质激素。5 例直接使用口服糖皮质激素。口服给药使用甲泼尼龙的 10 例；使用泼尼松的 2 例。13 例患者糖皮质激素的平均疗程为（27.38±16.46）d。

所有患者给予糖皮质激素后，临床症状均明显好转。所有患者治疗 3 个月后复查胸部 CT，1 例患者磨玻璃影消失；12 例遗留有磨玻璃影，其中 10 例较前好转，2 例较前无明显变化。13 例患者中，3 例患者未停用 PD-1 抑制剂，症状好转后继续 PD-1 抑制剂治疗的 1 例，停药后改为其他抗肿瘤方案的 9 例。具体见表 2。

3　讨论

3.1　免疫性肺炎的关联性评价

本研究纳入的 13 例患者，使用 PD-1 抑制剂与影像学改变、临床症状出现的时间关系明确。并用的化疗药物，如铂类、紫杉醇、吉西他滨、培美曲塞等主要不良反应为骨髓抑制、消化道反应、肝肾毒性等；小分子靶向药物，如安罗替尼、瑞戈非尼、阿帕替尼等，主要不良反应为皮肤反应、出血、高血压等。13 例患者在原发肿瘤稳定的情况下，出现呼吸道症状和间质性病变的影像学改变；且所有咳嗽患者均使用抗菌药物进行经验治疗无效。无论停用 PD-1 抑制剂与否，给予糖皮质激素治疗后，患者咳嗽、咳痰、喘憋症状均有明显好转。综合上述依据，根据国家药品不良反应监测中心制订的因果判断准则评价，考虑 3 例未停用 PD-1 抑制剂患者药品不良反应的关联性为“可能”，其余 10 例患者肺炎与 PD-1 抑制剂的关联性为“很可能”。

3.2　免疫相关性肺炎发生风险和机制

免疫相关性肺炎是免疫检查点抑制剂治疗肿瘤

表 1　13 例免疫性肺炎的临床特点

Tab 1　Clinical characteristics of 13 of immune-related pneumonia

No.	原发病	涉及药品	单次使用剂量 /mg	并用抗肿瘤药物	确诊时使用周期	主诉	确诊时血氧分压 /mmHg	确诊时胸部 CT	严重程度分级（CSCO）
1	直肠癌	替雷利珠单抗	200	瑞戈非尼 80 mg qd	1	无	未评估	两肺上叶多发磨玻璃影、亚实性结节	G1
2	原发性肝癌	纳武利尤单抗	240	无	11	咳嗽	75.2	两下肺磨玻璃影	G2
3	非小细胞肺癌	卡瑞利珠单抗	200	无	8	喘憋	79.7	双肺多发磨玻璃影，间质性病变	G2
4	胃癌	卡瑞利珠单抗	200	安罗替尼 12 mg qd ＋替吉奥 40 mg bid	3	无	未评估	双肺多发磨玻璃影	G1
5	非小细胞肺癌	信迪利单抗	200	贝伐珠单抗 240 mg	6	喘憋	134.5（吸氧下）	双肺多发磨玻璃影、片状影	G2
6	原发性肝癌	纳武利尤单抗	240	无	5	无	69.5	双肺多发磨玻璃影	G1
7	非小细胞肺癌	纳武利尤单抗	140	无	5	喘憋	87.4	右肺实变及磨玻璃影	G2
8	食道癌	替雷利珠单抗	200	顺铂 89 mg ＋卡培他滨 1.5 g bid	6	无	未评估	双肺下叶磨玻璃影	G1
9	小细胞肺癌	卡瑞利珠单抗	200	阿帕替尼 250 mg qd	6	喘憋	58.80	双肺多发磨玻璃影	G2
10	非小细胞肺癌	卡瑞利珠单抗	200	吉西他滨 1 g	2	喘憋	未评估	双肺多发磨玻璃影	G2
11	非小细胞肺癌	卡瑞利珠单抗	200	白蛋白紫杉醇 400 mg ＋卡铂 500 mg	1	咳嗽、喘憋	79.2	双肺磨玻璃密度结节	G2
12	非小细胞肺癌	卡瑞利珠单抗	200	培美曲塞 0.8 g	8	无	未评估	双肺散在磨玻璃影	G2
13	原发性肝癌	信迪利单抗	200	无	2	咳嗽、咳痰	74.6	双肺多发磨玻璃影，间质性肺炎	G2

表 2　13 例免疫性肺炎治疗及转归

Tab 2　Management and outcome of 13 of immune-related pneumonia

No.	是否停药	治疗方案	转归
1	否	口服泼尼松 30 mg qd d1 ～ d7，20 mg d8 ～ d14，10 mg d15 ～ d28	未再次给药，3 个月后复查仍有双肺磨玻璃影
2	是	口服甲泼尼龙 80 mg qd d1 ～ d5	咳嗽好转，3 个月后复查仍有双肺磨玻璃影，恢复 PD-1 抑制剂治疗
3	是	口服甲泼尼龙 40 mg qd，每 3 日减 4 mg，疗程 30 d	未再次给药，喘憋好转；3 个月后复查仍有双肺磨玻璃影
4	是	口服泼尼松 30 mg qd d1 ～ d7，20 mg d8 ～ d14，10 mg d15 ～ d28	未再次给药，3 个月、6 个月后复查双肺磨玻璃影有好转
5	是	静脉注射地塞米松 5 mg d1 ～ d5	未再次给药，3 个月、5 个月后复查双肺磨玻璃影有好转
6	是	静脉滴注甲泼尼龙 40 mg qd d1 ～ d7，继续口服 10 mg d8 ～ d30	未再次给药，3 个月复查双肺磨玻璃影无明显变化
7	是	静脉滴注甲泼尼龙 20 mg qd d1 ～ d7，继续口服 20 mg qd d8 ～ d30，12 mg d31 ～ d60	未再次给药，3 个月复查双肺磨玻璃影有好转
8	是	口服甲泼尼龙 16 mg qd d1 ～ d30	未再次给药，3 个月复查双肺磨玻璃影有好转
9	否	静脉滴注甲泼尼龙 40 mg qd d1 ～ d3，继续口服 20 mg d4 ～ d11，12 mg d12 ～ d19	3 个月磨玻璃影稍减少，患者治疗期间未停用免疫治疗
10	否	静脉滴注甲泼尼龙 40 mg d1 ～ d3	未停用 PD-1 抑制剂，复查胸部 CT，未见明显改变
11	是	静脉滴注甲泼尼龙 80 mg d1 ～ d2，继续口服 72 mg qd，每 3 日减 8 mg 疗程共 29 d	症状有所好转，3 个月后磨玻璃影消失未再使用 PD-1 抑制剂
12	是	静脉滴注甲泼尼龙 60 mg qd d1 ～ d3，继续口服 40 mg qd d4 ～ d7，28 mg d8 ～ d14，20 mg d15 ～ d21，12 mg d22 ～ d28，8 mg d29 ～ d35	未再次给药，6 个月后复查 CT，双肺仍多发索条影，考虑慢性炎症
13	是	静脉滴注甲泼尼龙 80 mg qd d1 ～ d3，继续口服 40 mg qd d4 ～ d6，24 mg d7 ～ d9，16 mg d10 ～ d12，8 mg d13 ～ d54	咳嗽咳痰好转，未再次给药，6 个月后复查 CT，双肺较前好转，仍有慢性炎症

患者最危险的不良反应之一。2009 年至 2018 年，世界卫生组织药物预警数据库报告了 613 起致命的免疫检查点抑制剂不良事件，其中抗 PD-1/PD-L1 相关死亡病例原因大多来自肺炎（333 例，占 35%）[5]。一项包含 8642 例患者的荟萃分析中 [6]，治疗组为 PD-1 或 PD-L1 抑制剂，对照组为化疗组，所有级别免疫性肺炎发生率的风险比（odds ratio，OR）为 6.63。免疫相关性肺炎可能的机制如下：① PD-1/PD-L1 抑制剂上调免疫功能，可能导致免疫耐受的破坏 [7]；② 肿瘤组织和正常组织有相似或相同的抗原 [8-10]；③ 活化的 T 细胞攻击正常细胞或浸润正常组织、自身抗体活性增加、炎性细胞因子增加等 [11]。

3.3　给药方法和发生时间

本研究中，所有患者给药方法均遵循药品说明

书中推荐的用法用量，无超量及滥用的情况。目前，免疫性肺炎与用药剂量是否有关尚无明确证据。分析患者平均发病时间，治疗 5 周期及以上患者为 8 例，占 61.54%。既往临床观察中，发生免疫性肺炎患者的治疗周期差别较大，在 1 ～ 33 周期，平均为 8 周期 [12]。说明临床应用 PD-1 抑制剂早期监测胸部 CT 没有改变者，仍需持续观察；出现咳嗽、喘憋症状的患者应予以重视。

3.4　临床表现和影像学特点

本研究结果显示，38.46% 的患者没有任何不适主诉，但胸部 CT 均提示磨玻璃影。提示免疫性肺炎起病时具有一定隐匿性。建议临床使用 PD-1 抑制剂期间不管有无相关症状，应定期监测胸部 CT，以便及时发现免疫相关性肺炎。免疫相关性肺炎最常见的症状包括呼吸困难、咳嗽、胸痛和发热 [13]。本研究结果显示，喘憋、咳嗽为常见症状。免疫相关性肺炎患者胸部 CT 可以表现为非特异性间质性肺炎、过敏性肺炎、急性间质性肺炎 [14]。本研究中所有患者均出现单侧或双侧肺部磨玻璃影；完成血气分析的患者中，7 例患者存在低氧血症，提示临床对于有明显症状的患者，应及时给予吸氧或通气支持，以避免发展为呼吸衰竭。

3.5　干预措施与转归

本研究中大部分患者确诊后，停用了 PD-1 抑制剂。其中病例 1，评估严重程度为 G1，没有暂停 PD-1 抑制剂治疗；病例 9、病例 10 有明显喘憋，评估严重程度为 G2 没有暂停 PD-1 抑制剂治疗。建议临床遵循指南建议，发生免疫性肺炎的患者，均暂停免疫治疗。其中 G1 级患者，在 3 ～ 4 周后复查胸部 CT 及肺功能，如影像学好转，密切随访并恢复治疗；G2 级患者暂停 PD-1 抑制剂治疗，直至降至 G1 后进行评估。G2 及以上级别免疫性肺炎转归后，部分患者可考虑继续行 PD-1 抑制剂治疗 [13]。重启治疗的患者应密切监测症状和影像学变化，避免用药风险。

本研究中所有患者确诊后均采用糖皮质激素治疗。CSCO 指南建议：肺毒性 G1 患者无需使用糖皮质激素；G2 静脉滴注甲泼尼龙 1 ～ 2 mg/（kg • d），治疗 48 ～ 72 h 后，若症状改善，激素在 4 ～ 6 周内按照每周 5 ～ 10 mg 逐步减量；若症状无改善，可加用英夫利昔单抗或吗替麦考酚酯，或静脉注射人免疫球蛋白。本研究未出现严重程度 G3 及以上的病例。但糖皮质激素治疗剂量、疗程差异大，相对不规范。例如所有 G1 患者均使用了糖皮质激素；部分 G2 患者仅使用了口服糖皮质激素，或仅使用静脉注射糖皮质激素。提示临床药师可以参与免疫性肺炎患者的药学监护，为临床提供符合指南的治疗方案，并对患者的用药和转归情况进行随访，增加治疗的有效性。

参考文献

[1] Francisco LM，Salinas VH，Brown KE，et al. PD-L1 regulates the development，maintenance，and function of induced regulatory T cells [J]. J Exp Med，2009，206（13）：3015-3029.

[2] Amarnath S，Mangus CW，Wang JC，et al. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells [J]. Sci Transl Med，2011，3（111）：111-120.

[3] Khunger M，Rakshit S，Pasupuleti V，et al. Incidence of pneumonitis with use of programmed death 1 and programmed death-ligand 1 inhibitors in non-small cell lung cancer：a systematic review and meta-analysis of trials [J]. Chest，2017，152（2）：271-281.

[4] Pillai RN，Behera M，Owonikoko Tk，et al. Comparison of the toxicity profile of PD-1 versus PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer：a systematic of the literature [J]. Cancer，2018，124（2）：271-277.

[5] Wang DY，Salem JE，Cohen JV，et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors：a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2018，4（12）：1721-1728.

[6] 陈康，孙步彤 . PD-1/PD-L1 抑制剂在晚期肿瘤患者中的相关肺炎发生率和发生风险：一项荟萃分析 [J]. 中国肺癌杂志，2020，23（11）：927-940.

[7] Feng S，Coward J，McCaffrey E，et al. Pembrolizumab induced encephalopathy：a review of neurological toxicities with immune checkpoint inhibitors [J]. J Thorac Oncol，2017，12（11）：1626-1635.

[8] Petri CR，Patell R，Batalini F，et al. Severe pulmonary toxicity from immune checkpoint inhibitor treated successfully with intravenous immunoglobulin：case report and review of the literature [J]. Respir Med Case Rep，2019，27：100834.

[9] Mori H，Sakai C，Iwai M，et al. Immune thrombocytopenia induced by nivolumab in a patient with non-small cell lung cancer [J]. Respir Med Case Rep，2019，28：100871.

[10] Raskin J，Masrori P，Cant A，et al. Recurrent dysphasia due to nivolumab-induced encephalopathy with presence of Hu autoantibody [J]. Lung Cancer，2017，109：74-77.

[11] Postow MA，Sidlow R，Hellmann MD. Immunerelated adverse events associated with immune checkpoint blockade [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：158-168.

[12] Larsen BT，Chae JM，Dixit AS，et al. Clinical and histopathologic features of immune checkpoint inhibitor-related pneumonitis [J]. Am J Surg Pathol，2019，43（10）：1331-1340.

[13] Naidoo J，Wang X，Woo KM，et al. Pneumonitis in patients treated with anti-programmed death-1/programmed death ligand 1 therapy [J]. J Clin Oncol，2017，35（7）：709-717.

[14] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 中国临床肿瘤学会（CSCO）免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 [M]. 北京：人民卫生出版社，2021：70.

（收稿日期：2023-03-05；修回日期：2023-05-02）

2 例患者因药物致 QT 间期延长的用药分析

刘丛丛，刘越群（北大医疗鲁中医院，山东　淄博　255400）

关键词：药物；QT 间期延长；不良反应
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2813-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.044

QT 间期是一种广泛使用的心室复极的测量方法[1]。QT 间期延长是由心室肌细胞复极相关的离子通道以及蛋白的结构和功能异常引起的。QT 间期延长可引发室性心动过速，严重者可致尖端扭转型室性心动过速，引发晕厥甚至猝死[2]。某些药物可致心脏 QT 间期延长，甚至尖端扭转型心动过速或室性心动过速[3]，常见的药物有抗心律失常药物（索他洛尔、伊布利特等），以及抗菌药物（喹诺酮类、大环内酯类等）、抗精神病药物（氯丙嗪、硫利达嗪、氟哌啶醇等）和抗肿瘤药物等[4]。本文通过对 2 例因药物引起的 QT 间期延长病例进行分析，旨在探讨引起 QT 间期延长的危险因素和药物作用机制以及临床药师在治疗中应发挥的作用。

1　病例资料

患者 1，女，33 岁，主因“间断晕厥 10 余年，加重 10 日”入院。患者自 10 年前出现心悸晕厥，伴小便失禁，持续 1 min 后恢复，就诊于当地医院给予心电监护示：室速发作，QT 间期延长，诊断为“长 QT 间期综合征，尖端扭转型室性心动过速”，给予药物治疗后好转出院。7 年前患者再次发作，症状同前，就诊于当地医院给予药物治疗后好转。后患者未再发作类似症状，定期查 QT 间期均在正常范围。10 d 前，患者出现咳嗽症状，无发热、咳痰等症状，于当地诊所给予青霉素治疗后无缓解，当日更换为左氧氟沙星治疗，用药后患者出现晕厥，就诊于当地医院。入院后患者先后发作 3 次室速，持续约 5 ～ 15 s 后自行转复。后再发室颤伴晕厥，行胸外心脏按压后转复为窦律。为求进一步治疗，转入我院。既往否认高血压、糖尿病及肝炎病史，有猝死家族史，母亲年轻时去世。入院诊断：尖端扭转型室性心动过速、长 QT 间期综合征。

入院第 1 日，查体 T 36.3 ℃，P 72 次•min^{-1}，R14 次•min^{-1}，BP 111/67 mmHg（1 mmHg＝0.133 kPa）。查体未见阳性体征。血常规检查示：白细胞计数 6.4×10^{9}•L^{-1}、血红蛋白 127 g•L^{-1}、血小板计数 232×10^{9}•L^{-1}。离子检查示：钙 2.55 mmol•L^{-1}，　钠 135.96 mmol•L^{-1}↓，　钾 3.92 mmol•L^{-1}，镁 0.81 mmol•L^{-1}。心肌酶谱、肝肾功能、凝血功能、甲状腺功能等未见明显异常。心电图示：窦性心律，QT 间期延长（516 ms）。给予酒石酸美托洛尔片 25 mg tid ＋门冬氨酸钾镁片 2 片 tid 口服治疗。给予患者利多卡因试验，过程中可见 QTc 缩短：基础 QTc 573 ms → QTC 525 ms，T 波形态未见明显变化，考虑利多卡因阳性。入院第 2 日，离子检查示：钙 2.51 mmol•L^{-1}，钠 135.93 mmol•L^{-1}，钾 3.86 mmol•L^{-1}，镁 0.84 mmol•L^{-1}。加用给予氯化钾缓释片 1 g tid ＋美西律 100 mg tid ＋普萘洛尔 10 mg tid 治疗。入院第 3 日，加用门冬氨酸钾镁片 3 片 tid ＋盐酸氨溴索分散片 60 mg tid 治疗。维持离子水平镁 1 mmol•L^{-1} 左右，钾 4.5 mmol•L^{-1}。入院第 6 日，离子检查示：钠 139.63 mmol•L^{-1}，钾 4.03 mmol•L^{-1}，镁 0.86 mmol•L^{-1}。行运动平板试验示运动中及运动后未见心律失常，直立倾斜试验示阴性。患者病程中反复发作室速等恶性心律失常，有植入型心律转复除颤器（ICD）植入指征，反复与家属沟通，家属均拒绝。美西律加量至 150 mg bid，其余治疗药物不变。入院第 11 日，查体同前，未诉明显不适。离子检查示：钠 134.8 mmol•L^{-1}↓，钾 4 mmol•L^{-1}，镁 0.85 mmol•L^{-1}。患者病情稳定，一般情况可，予以出院，嘱患者出院后继续口服门冬氨酸钾镁片＋氯化钾缓释片＋盐酸美西律片＋盐酸普萘洛尔片药物治疗。

患者 2，女，29 岁，因“发作性心悸、黑朦、头晕 1 年”入院。患者 1 年前服用诺氟沙星数日后出现于平地步行的 10 m 时突发心悸、黑朦，伴头

作者简介：刘丛丛，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：783199674@qq.com

晕、恶心、干呕，无意识丧失、四肢抽动、手脚麻木等不适，2 min 后患者症状好转，无乏力等遗留症状，就诊于外院，自诉心电图及血生化未见明显异常。就诊于当地医院，颅脑 CT 未见明显异常，考虑“焦虑症”，间断服用曲唑酮、氟哌噻吨美利曲辛、佐匹克隆等药物治疗，每周发作 1 ～ 2 次。6 个月前患者加用艾司西酞普兰 1 d 后出现心悸、黑朦、头晕伴头痛、恶心，全身过电感，尿意明显，自感心率快、濒死感，持续约 15 s，心前区不适持续数小时，就诊于当地医院，心电图示：窦性心律，心率（HR）107 次 • min^{-1}，QTc 477 ms，电解质未见异常，考虑“焦虑症”，嘱患者继续口服艾司西酞普兰。1 个月前患者再次服用艾司西酞普兰后又出现上述症状发作，程度较前剧烈，持续约 15 ～ 20 s，就诊于当地医院行心电图示：窦性心律，偶发房性期前收缩，HR 56 ～ 128 次•min^{-1}，QTc 503 ms，血钾 4.05 mmol • L^{-1}。后就诊于当地医院，考虑“焦虑症”，将艾司西酞普兰剂量加量后患者再次出现上述症状，程度同前。10 d 前患者就诊于我院，诊断为长 QT 间期综合征，给予比索洛尔、氯化钾缓释片等药物治疗后症状好转，2 d 前患者为求进一步治疗收入我院。既往史否认其他疾病。有晕厥、猝死家族史。入院诊断为：先天性长 QT 间期综合征可能性大、焦虑状态。

入院第 1 日：查体 T 36 ℃，P 81 次 • min^{-1}，R 16 次 • min^{-1}，BP 107/69 mmHg。其余查体未见阳性体征。血常规检查示：白细胞计数 7.5×10^{9} • L^{-1}、血红蛋白 129 g • L^{-1}、血小板计数 211×10^{9} • L^{-1}。离子检查示：钙 2.47 mmol • L^{-1}，钠 141.24 mmol • L^{-1}，钾 4.24 mmol • L^{-1}，镁 0.84 mmol • L^{-1}。其余检查未见明显异常。心电图示：窦性心律，QT 间期延长（506 ms）。超声心动图：左室射血分数（LVEF）69.8%，右室收缩功能正常，三尖瓣轻度反流。患者家族多人有晕厥及猝死病史，考虑患者长 QT 间期综合征可能性大，给予停用比索洛尔和抗抑郁药物。加用氯化钾缓释片。给予患者利多卡因试验，过程中可见 QTc 缩短：基础 QTc 491 ms → QTC 438 ms，利多卡因试验阳性。入院第 2 日：患者仍焦虑、入睡困难，临床药师建议加用劳拉西泮片 0.5 mg qn。行平板运动试验，示运动中及运动后未见心律失常，直立倾斜试验示阴性。入院第 3 日，考虑患者先天性长 QT 间期综合征可能性大，完善基因检测。加用美西律 100 mg tid。入院第 6 日，查体同前，离子检查示：钙 2.36 mmol • L^{-1}，钠 137.85 mmol • L^{-1}，钾 3.62 mmol • L^{-1}，镁 0.86 mmol • L^{-1}。将美西律加量至 150 mg tid，加用普萘洛尔 10 mg bid。入院第 11 日，患者一般情况可，治疗好转出院。嘱患者院外继续服用美西律＋普萘洛尔＋氯化钾缓释片治疗。

2　讨论

2.1　关联性分析

对本文报道的 2 例患者 QT 间期延长与用药进行相关性分析。患者 1，有心悸晕厥病史 10 余年，发作时心悸，后出现晕厥伴小便失禁，大约持续 1 min 后意识恢复。先后于 3 年前和 7 年前发作过 2 次。后患者未再发作类似症状，定期查 QT 间期均在正常范围。10 d 前因咳嗽使用左氧氟沙星后，出现晕厥、室速等症状频繁发作，共发作 5 次。患者 2，1 年前服用诺氟沙星数日后突发心悸、黑朦，伴头晕、恶心等不适，2 min 后好转。后分别于 8 个月前和 6 个月前 2 次发作头晕、心悸、胸闷伴视物模糊、大汗症状，持续约 10 s，后持续乏力。追溯患者 3 次发病，分别于应用诺氟沙星及艾司西酞普兰后发作。1 个月前患者再次服用艾司西酞普兰后又出现上述症状发作，程度较前剧烈，持续约 15 ～ 20 s。后就诊于当地医院，将艾司西酞普兰剂量加量后患者再次出现上述症状发作。对本文 2 例病例所用药物与长 QT 间期综合征的关联性进行评价，患者均在服用诺氟沙星或艾司西酞普兰后出现心悸、晕厥等症状，心电图示 QT 间期延长，出现不良反应与用药之间有时间先后关系；QT 间期延长为诺氟沙星和艾司西酞普兰已知的不良反应之一，患者 1 此次发病后未再使用上述药物。患者 2 在进行艾司西酞普兰药物剂量加大时，再次发作 QT 间期延长。2 位患者均存在先天性长 QT 间期综合征，家族有猝死早亡史，具有高危因素。2 位患者住院前未服用其他特殊药物，无其他特殊治疗，此事件无法用合并用药的作用、患者病情的进展、其他治疗的影响来合理解释。根据《药品不良反应报告和监测管理办法》中药品与不良反应关联性评价的标准：2 例患者服用诺氟沙星和艾司西酞普兰与出现的 QT 间期延长、心悸、晕厥反复发作的关联性评价为很可能。根据诺氏（Naranjo’s）评估量表 [5] 进行关联性分析，结果见表 1。病例 1 评分为 5 分，考虑患者 QT 间期延长、尖端扭转型室性心动过速由服用左氧氟沙星诱发。病例 2 中诺氟沙星评分为 7 分，考虑该患者心悸、黑朦由药物诱发。艾司西酞普兰评分为 8 分（见表 2），考虑该患者发作 QT 间期延长由艾司西酞普兰诱发。

表 1　患者 1 诺氏药物不良反应评估表

项目	左氧氟沙星分值				
	是	否	未知	回答	得分
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	是	＋1
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后产生	＋2	－1	0	是	＋2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后缓解	＋1	0	0	是	＋1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	未知	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	未知	0
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	未知	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	未知	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	未知	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	未知	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	是	＋1
总分值					＋5

表 2　患者 2 诺氏药物不良反应评估表

项目	诺氟沙星评分					艾司西酞普兰评分				
	是	否	未知	回答	得分	是	否	未知	回答	得分
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	是	＋1	＋1	0	0	是	＋1
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后产生	＋2	－1	0	是	＋2	＋2	－1	0	是	＋2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后缓解	＋1	0	0	是	＋1	＋1	0	0	是	＋1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	是	＋2	＋2	－1	0	是	＋2
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	未知	0	－1	＋2	0	未知	0
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	未知	0	－1	＋1	0	未知	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	未知	0	＋1	0	0	未知	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	未知	0	＋1	0	0	是	＋1
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	未知	0	＋1	0	0	未知	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	是	＋1	＋1	0	0	是	＋1
总分值					＋7					＋8

2.2　国内外文献分析及作用机制

QT 间期反映心室去极化和复极化所需的时间。QT 间期延长的主要原因是心室肌动作电位时间的延长 [6]。我国目前尚无定义 QT 间期延长的统一标准。美国心脏协会 / 美国心脏病学学会 2010 年发表的院内获得性长 QT 间期综合征防治建议中推荐，QTc 正常值男性为 470 ms，女性为 480 ms。不论女性还是男性，QTc ＞ 500 ms 都属于明显的异常 [7]。引起 QT 间期延长危险因素主要有：使用或合用延长 QT 间期的药物、高龄、心脏疾病、电解质紊乱、先天性长 QT 间期综合征家族史等。药物导致的 QT 间期延长的产生主要由于药物对快钾通道的阻断，引起外向钾电流的减少，导致动作电位 3 期快速复极延迟，可增加患者发生尖端扭转型室性心动过速的风险。

在临床上，因药物引起患者出现 QT 间期延长的案例有很多，且具有潜在的致死危害，已经引起医学界的重视和关注。冉拓耀等 [8] 报道 1 例患者服用哌柏西利胶囊后出现 QT 间期延长不良反应。唐文诚等 [9] 报道了 1 例患者服用西酞普兰后出现 QTc 间期延长的不良反应。李陆等 [10] 回顾性分析了国内外关于喹诺酮类药物致 QT 间期延长的病例报道 38 篇，结果显示不良反应出现的时间平均在用药后 32.7 h，QT 间期平均延长 147 ms，64% 的患者出现了尖端扭转型室性心动过速。

喹诺酮类药物导致 QT 间期延长的作用机制说法不一。有些学者认为，喹诺酮类药物通过干扰 *HEGR* 基因来达到阻断心脏电压门控通道 IKr、延长 QT 间期作用 [10]。另有学者认为 [11]，喹诺酮类药物引起 QT 间期延长的发病机制是在 K^+、Na^+、Ca^{2+} 离子通道共同作用下实现的，即：① 药物阻断心肌细胞 K^+ 通道，心肌细胞动作电位延长，QT 间期延长；② 增加心肌细胞 Na^+ 和 Ca^{2+} 的内流，延长动作电位时间，QT 间期延长。喹诺酮类药物致 QT 间期延长的不良反应与患者年龄、性别及合并疾病等因素有关，选用该类药物前，临床药师应充分评估患者的风险与获益，给予医师合理化用药建议并对患者实施用药监护。

西酞普兰是选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂（SSRI），能阻断心脏 *HERG* 基因编码的 K^+ 通道，延长动作电位的时程，引起 QT 间期延长和尖端扭转型室性心动过速风险升高 [12]。美国 FDA 曾 2 次对艾司西酞普兰可能导致 QTc 延长和尖端扭转型室性心动过速发出警告 [13-14]，英国 MHRA 和加拿大卫生部随后也发布了关于西酞普兰诱导 QT 间期延长的警告 [15-16]。西酞普兰导致的 QT 间期延长可能与药物剂量有关 [17]，美国 FDA 警告氢溴酸西酞普兰最高剂量不可高于 40 mg • d^{-1}，我国艾司西酞普兰说明书明确指出 65 岁以上的老年患者，最大剂量不应超过 10 mg • d^{-1}。

2.3　药物致 QT 间期延长治疗建议

药物引起 QT 间期延长时，首要措施是立即停止可能诱发的药物。静脉注射硫酸镁是用于药物获得性长 QT 间期综合征的一线药物，其机制可能与激活 Na^+/K^+-ATP 酶，使细胞内 K^+ 浓度增加有关。无论患者血清镁的水平如何，都应立即静脉给予硫酸镁，首选以硫酸镁 1 ～ 2 g 加入 5% 葡萄糖液稀释至 10 mL，5 ～ 20 min 静脉注射。获得性长 QT 间期综合征致尖端扭转型室性心动过速时往往合并低血钾，药物和低血钾协同可使尖端扭转型室性心动过速的发生率增加，故需补钾。《获得性长 QT 间期综合征的防治建议》[18]（2010 年）中指出，建议将血钾水平保持在 4.5 ～ 5.0 mmol • L^{-1}。

3　小结

有潜在的延长心脏 QT 间期作用的药物，并不意味着临床中就不能使用这些药物，使用前应对患者进行风险 - 效益评估。给患者开具此类药物时，尤其是有心脏病病史、高龄和女性患者，需定期进行心电图或 24 h 动态心电图监测。一旦发生 QT 间期延长等不良反应，应立即停止可疑药物，选择替代药物治疗。进行连续的 QTc 间期监测，注意钾离子、镁离子等水平。针对患有基础心脏疾病的高危患者，临床药师应仔细筛选治疗药物。用药后实施药学监护，对患者及家属进行用药教育，避免不良反应的发生。

参考文献

[1] 张建红，朱立勤，刘学明，等 . 洛哌丁胺与伊曲康唑合用致 QT 间期延长 1 例 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（16）：1791-1792.

[2] Khan F，Ismail M，Khan Q，et al. Moxifloxacin-induced QT interval prolongation and torsades de pointes：a narrative review [J]. Expert Opin Drug Saf，2018，17（10）：1029-1039.

[3] 唐文诚，罗文，王继生，等 . 临床药师参与 1 例西酞普兰致 QT 间期延长的实践与分析 [J]. 中国药物应用与监测，2018，15（5）：280-283.

[4] 杨琳，薛小临 . 药物引起心脏晚钠电流增大及致 QT 间期延长作用 [J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2017，31（1）：73-76.

[5] 刘敏，李忠东 . 实例探讨药物引起 SJS 或 TEN 的评分方法——Naranjo 评分与 ALDEN 评分比较 [J]. 中国药物应用与监测，2014，11（4）：247-249.

[6] 丁发明，张新丽，王琼，等 . 致 QT 间期延长药物使用风险管理的初步探讨及启示 [J]. 中国药物警戒，2018，15（9）：545-549.

[7] 戎佩佩，陈敏，刘虹，等 . 克唑替尼致获得性长 QT 间期综合征的病例报告并文献复习 [J]. 实用药物与临床，2020，23（8）：717-720.

[8] 冉拓耀，李超 . 哌柏西利胶囊致 QT 间期延长 1 例分析 [J]. 中国药物警戒，2023，20（2）：215-218.

[9] 唐文诚，罗文，王继生，等 . 临床药师参与 1 例西酞普兰致 QT 间期延长的实践与分析 [J]. 中国药物应用与监测，2018，15（5）：280-283.

[10] 李陆，文靓，房德敏，等 . 喹诺酮类药物致 QT 间期延长的系统性回顾分析 [J]. 天津药学，2019，31（2）：15-21.

[11] 李妍，徐晶，张文胜 . QT 间期延长与药物安全性评价 [J]. 生物医学工程学杂志，2013，30（4）：905-908.

[12] 马春来，李中东，申慧明，等 . 中国 9 家三级甲等医疗机构治疗帕金森病处方中延长心脏 QT 间期药物的调查 [J]. 中国临床神经科学，2021，29（3）：289-295.

[13] U. S. Food and Drug Administration. FDA drug safety communication：revised recommendations for Celexa（citalopram hydrobromide）related to a potential risk of abnormal heart rhythms with high doses[EB/OL].（2012-03-28）. https：//www. fda. gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-revised-recommendations-celexa-citalopram-hydrobromide-related.

[14] U. S. Food and Drug Administration. FDA drug safety communication：abnormal heart rhythms associated with high doses of Celexa（citalopram hydrobromide）[EB/OL].（2011-08-24）. https：//www. fda. gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-abnormal-heart-rhythms-associated-high-doses-celexa-citalopram.

[15] Khatib R，Sabir FRN，Omari C，et al. Managing drug-induced QT prolongation in clinical practice [J]. Postgrad Med J，2021，97（1149）：452-458.

[16] Friesen K，Bugden S. The effectiveness and limitations of regulatory warnings for the safe prescribing of citalopram [J]. Drug Healthc Patient Saf，2015，7：139-145.

[17] McClelland J，Mathys M. Evaluation of QTc prolongation and dosage effect with citalopram [J]. Ment Health Clin，2016，6（4）：165-170.

[18] 中华医学会心血管病学分会心律失常学组，中华心血管病杂志编辑委员会，中国心脏起搏与心电生理杂志编辑委员会 . 获得性长 QT 间期综合征的防治建议 [J]. 中华心血管病杂志，2010，38（11）：961-967.

（收稿日期：2023-03-23；修回日期：2023-05-13）

注射用氨甲环酸致双眼黑朦 1 例

张涛，刘天龙，李文斌*（中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科，兰州　730050）

关键词：注射用氨甲环酸；双眼黑朦；不良反应
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2817-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.045

1　病例资料

患者，女，49 岁，体重 53 kg。于 2022 年 5 月 17 日因“发现血小板减少 10 年，皮肤出血点一周”入院。患者既往无过敏史、传染病史。入院查体：体温 36.2 ℃，脉搏 82 次 • min^{-1}，呼吸 20 次 • min^{-1}，血压 109/90 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。全身皮肤可见散在出血点及瘀斑，全身浅表淋巴结未触及肿大。入院诊断为：① 原发性免疫性血小板减少症；② 脾切除术后；③ 原发性高血压；④ 慢性乙型病毒性肝炎携带者；⑤ 自身免疫性肝炎。给予止血药注射用氨甲环酸 [广西梧州制药（集团）股份有限公司，批号：22030109] ＋ 0.9% 氯化钠注射液 250 mL 1 g ivgtt qd，50 滴 • min^{-1}。患者诉 5 月 19 日输注氨甲环酸约 30 min，出现双眼黑朦，约 30 min 症状缓解并未告知责任护士及主管医师，5 月 20 日输注氨甲环酸约 20 min 时，再次出现双眼黑朦，持续约 40 min 后自行缓解，报告主管医师，立即停药，未再使用。

2　讨论

根据我国《药品不良反应报告和监测工作手册》中的药品不良反应因果判定方法 [1-2]，本例患者诊断为原发性免疫性血小板减少症，四肢及颈部皮肤出现自发性出血点及瘀斑，医师给予氨甲环酸止血对症治疗，首次给药 30 min 后，患者出现双眼黑朦，存在时间关联性，氨甲环酸药品说明书中提及有致视力模糊的不良反应，属于已知的反应类型。第 2 日再次给予氨甲环酸约 20 min 后出现同样症状，既往无过敏史，排出原患疾病的影响，停药后症状好转，再次使用氨甲环酸，再次出现黑朦，故患者出现黑朦由氨甲环酸引起可以评定为肯定。

氨甲环酸主要用于急性或慢性、局限性或全身性原发纤维蛋白溶解亢进所致的各种出血。适用于前列腺、尿道、肺、脑、子宫、肾上腺、甲状腺等富有纤溶酶原激活物脏器的外伤或手术出血 [3-5]。药品说明书示：氨甲环酸的不良反应主要为恶心，呕吐，腹泻，视力模糊，头晕，头痛，疲乏等。氨甲环酸所致中枢神经系统反应的机制 [6-8]：可能是正常情况下机体的凝血、抗凝系统处于动态平衡，当氨甲环酸从静脉快速输入能通过血脑屏障进入脑脊液，血药浓度迅速增高，凝血机制占优势，血液黏稠度增加，血流阻力增大，血流不畅致脑供血不足，从而出现视力模糊、头晕头痛等症状 [9]。有研究表明，减慢滴速为 15 滴 • min^{-1}，可减轻氨甲环酸不良反应发生率 [10-11]。另外，氨甲环酸说明书中规定静脉滴注溶媒为 5% ～ 10% 葡萄糖注射液稀释配制，本例使用 0.9% 氯化钠注射液 250 mL 稀释配制，不符合说明书配制要求，可能增加患者发生药品不良反应的风险。

本案例提示：使用氨甲环酸时应按照药品说明书中规定溶媒 5% ～ 10% 葡萄糖注射液进行配制，静脉滴注速度控制在 15 滴 • min^{-1}，如发生不适症状，应立即停药，给予对症治疗，以免发生不可逆器质损害。

参考文献

[1] 魏晶，王瑜歆 . 药品不良反应报告因果关系评价方法概述 [J]. 中国药物警戒，2011，8（10）：600-603.
[2] 杨华，魏晶，王嘉仡，等 . 药品不良反应 / 事件报告评价方法研究 [J]. 中国药物警戒，2009，6（10）：581-584.
[3] Shahriar Z. In nonsurgical settings，tranexamic acid reduces mortality and does not increase thrombotic events [J]. Ann Intern Med，2019，171（8）：40-41.
[4] 叶春荣 . 氨甲环酸在产后出血防治中的应用价值研究 [J]. 北方药学，2021，18（8）：182-183.
[5] 邓慧远，钟红，刘跃辉 . 氨甲环酸注射液致癫痫 1 例 [J]. 中南药学，2020，18（2）：329-331.
[6] 王颐婷，李伟炜，谢静文，等 . 氨甲环酸注射液致过敏性休克 1 例 [J]. 中国药物警戒，2018，15（8）：501-502.
[7] 串俊兰，吕晶，韩勇 . 氨甲环酸致不良反应个例报道文献分析 [J]. 中国药师，2013，16（3）：456-458.

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.82003982）。
作者简介：张涛，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学及药品不良反应工作，email：502090599@qq.com　*通信作者：李文斌，男，硕士研究生导师，主任药师，主要从事急性高原反应药物研发与高原药代动力学研究，email：yfcs2002@163.com

[8] 王强，胡伟，徐芳辉，等 . 氨甲环酸：一种治疗黄褐斑的重要辅助药物 [J]. 中南药学，2014，12（9）：889-895.
[9] 刘静，闫峻峰，兰姗，等 . 1632 例老年患者使用氨甲环酸注射剂的不良反应报告分析 [J]. 中国药物应用与监测，2022，19（4）：244-247.
[10] 刘仕娟 . 滴速控制在减轻氨甲环酸氯化钠注射液不良反应中的应用 [J]. 临床合理用药杂志，2011，4（30）：61-62.
[11] 郑海燕 . 控制输液滴速在减轻氨甲环酸氯化钠注射液不良反应中的作用 [J]. 吉林医学，2011，32（11）：2249-2250.

（收稿日期：2023-03-07；修回日期：2023-06-07）

碘克沙醇致严重的大疱性剥脱性皮炎 1 例

胡佳丽[1]，王纯[1]，严俊[1]，马维娜[2*]（1. 上海市嘉定区中心医院肿瘤科，上海　201800；2. 上海市嘉定区中心医院药剂科，上海　201800）

关键词：碘克沙醇；造影剂；大疱性剥脱性皮炎
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)10-2818-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.10.046

随着影像学技术的发展，计算机断层扫描术（CT）用于临床多种疾病诊断中的临床价值在实际应用中被不断发掘，造影剂的使用也越来越普遍。碘对比剂是目前临床介入放射学操作中常用的辅助诊断药物，碘克沙醇属于第 3 代等渗非离子型二聚体，与碘海醇和碘普罗胺等传统造影剂相比，碘克沙醇的渗透压与血浆渗透压相等、聚合度增加、细胞毒性和肾毒性较小等特点，因此在临床上得到了广泛应用 [1]。皮肤及其附件损害是碘克沙醇最常发生的药品不良反应（ADR），其所占比例＞ 60%，主要表现为皮疹或荨麻疹 [2]。本文报道 1 例由静脉滴注碘克沙醇注射液后引起的大疱性剥脱性皮炎，并结合文献总结其临床特点，为识别及处理其不良反应提供临床参考。

1　临床资料

患者，女，82 岁，身高：158 cm，体重：52 kg。因“胃占位性病变可能、子宫颈肿瘤、下肢静脉血栓形成”入院。既往史有高血压、糖尿病病史，否认其他病史，否认药物及食物过敏史。患者于 2022 年 11 月 7 日因“左下肢肿痛 3 d”就诊于心内科，诊断为下肢深静脉血栓收入病房，完善检查。2022 年 11 月 8 日查肿瘤标志物明显升高、宫颈处实性占位。2022 年 11 月 11 日上腹部平扫 CT 示“胃壁明显增厚，小网膜囊区团块影，腹膜后淋巴结增大，建议增强 CT 检查”。后转入肿瘤科，予以低分子肝素钙抗凝治疗，继续完善检查，于 2022 年 11 月 16 日行肺动脉 CT 造影检查（CTA）、11 月 17 日行下腹部增强 CT 检查，为增强显影效果，均静脉内使用造影剂碘克沙醇注射液（规格为 100 mL：32 g），肺动脉 CTA 使用碘克沙醇注射液 40 mL，下腹部增强 CT 使用碘克沙醇注射液 90 mL，嘱予检查前后口服补液 1 L 增加尿量。2022 年 11 月 18 日患者出现左侧下肢红肿，伴疼痛，表面新生水疱形成，当日皮肤科会诊考虑为大疱性丹毒，予以 0.9% 氯化钠注射液 250 mL ＋青霉素钠 800 万 U ivgtt qd，莫匹罗星软膏局部外用。治疗期间患者水疱样病变蔓延至臀部、后背部、双上肢、颜面部，大量渗液，伴破溃、糜烂。2022 年 11 月 25 日，皮肤科再次会诊，考虑为大疱性剥脱性皮炎，推荐糖皮质激素治疗，当日予以注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg ivgtt qd，继续青霉素注射液预防感染，局部予地奈德乳膏、莫匹罗星乳膏外用。2022 年 11 月 28 日上身水疱收敛，下肢仍有新发水疱，继续予注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg ivgtt qd，夫西地酸乳膏、卤米松乳膏外用，每日观察有无新发水疱。2022 年 11 月 30 日水疱较前好转，大部分干瘪，渗液明显减少，无新发出疹，注射用甲泼尼龙琥珀酸钠减量

基金项目：上海市临床药学重点专科建设项目（No.YXZDZK-01）；上海市嘉定区自然科学研究课题（No.JDKW-2021-0043）。
作者简介：胡佳丽，女，住院医师，主要从事肿瘤内科方面的研究，email：493689294@qq.com　*通信作者：马维娜，女，副主任药师，主要从事临床药学方面的研究，email：maweina26 @163.com

至 32 mg ivgtt qd，继续外用乳膏。2022 年 12 月 3 日皮肤状态继续较前好转，注射用甲泼尼龙琥珀酸钠减量至 20 mg ivgtt qd，继续外用乳膏。2022 年 12 月 5 日颜面部、双上肢、背部水疱几乎消退，下肢水疱较前明显收敛，停用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠，予以甲泼尼龙片 12 mg po qd，地奈德乳膏外用，润肤露保持皮肤湿润。后续计划根据皮肤愈合状态继续减量。待皮肤情况好转后，予以抗肿瘤治疗。

2　分析讨论

本例患者为老年女性，入院后完善相关辅助检查，诊断为胃恶性肿瘤（黏液腺癌，伴宫颈、腹膜多发转移），同时诊断为肾功能不全、2 型糖尿病、下肢静脉血栓等。为进一步评估病情行下腹部增强 CT，连续 2 d 使用造影剂碘克沙醇，患者肾功能正常，合并糖尿病、高血压，为减少使用造影剂后肾损伤的发生风险，予适当增加口服补液，检查前后分别饮水 1 L，增加尿量，促进造影剂排泄。而后患者出现皮肤瘙痒，后续发展为大疱性剥脱性皮炎，药物的使用与不良反应的发生有合理的时间关系，患者在治疗期间合并使用的其他药物包括低分子肝素注射液、肾衰宁片、二甲双胍缓释片等未曾有过相关不良反应报道，且停药以及糖皮质激素对症治疗后全身皮疹及水疱明显好转，碘克沙醇药品说明书中不良反应项下有大疱性剥脱性皮炎一项，但对其发生频率的描述为不详。患者自身疾病方面：肿瘤患者需考虑副肿瘤性天疱疮可能，但该病多伴有多发口腔溃疡、足跟疼痛等症状，且死亡率高，预后差，大多数与淋巴瘤相关，治疗方面以抗肿瘤治疗为主，该患者除多发大水疱外无伴随症状，且未行抗肿瘤治疗即好转，暂不考虑该诊断；肿瘤患者，特别是消化道肿瘤患者，多数合并营养不良，可能出现营养不良性大疱病，但该患者白蛋白（ALB）水平接近正常（31 g • L^{-1}），暂排除；此外，患者用药前血液检测示抗表皮细胞间抗体（抗 Dsg3 抗体、抗 Dsg1 抗体），抗表皮基底膜抗体（抗 BP180 抗体、抗 BP230 抗体），抗体结果均为阴性，可排除免疫相关性天疱疮，结合以上分析再依据诺氏不良反应评估量表进行关联性分析，结果见表 1，碘克沙醇与此不良反应评分为 5 分，判定本例患者大疱性剥脱性皮炎与碘克沙醇的使用为“很可能”。此外根据《药品不良反应报告和监测管理办法》对“严重”不良反应报告的定义，本例患者出现大疱性剥脱性皮炎后导致住院或者住院时间延长。因此，判定本次不良反应为严重不良反应。

表 1　碘克沙醇引起大疱性剥脱性皮炎的诺氏评估结果

相关性问题	是	否	未知	回答	得分
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?	＋1	0	0	是	＋1
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的?	＋2	－1	0	是	＋2
3. 该 ADR 是否在停药或者应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	是	＋1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?	＋2	－1	0	未知	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR ?	－1	＋2	0	未知	0
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?	－1	＋1	0	未知	0
7. 药物在血液或者其他体液中是否达到毒性浓度?	＋1	0	0	未知	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解?	＋1	0	0	否	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?	＋1	0	0	否	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应?	＋1	0	0	是	＋1
总分 / 分					5

注：总分≥ 9 分，表明该药物与不良反应的因果关系为肯定；5 ～ 8 分为很可能有关；1 ～ 4 分为可能有关；≤ 0 为可疑。

碘克沙醇是一种非离子型、六碘、水溶性的双聚体 X 射线造影剂，比其他造影剂不良反应发生率低 [3]。据相关文献 [4-5] 所示，其总体的不良反应发生率约为 0.62% ～ 1.52%，其中迟发性的不良反应发生率约为 0.09% ～ 0.97%。迟发不良反应以轻度为主，以皮肤系统反应最常见，发生率约为 0.08% ～ 0.68%，包括皮疹、荨麻疹和瘙痒等。根据文献可知 [6]，碘克沙醇所致不良反应中与皮肤及附件相关的不良反应、迟发性不良反应占比较大。其中患者的年龄、动脉给药途径、注射流速等是迟发不良反应的独立危险因素 [7]。在一项纳入 76 例由碘克沙醇所致不良反应的分析报告中 [8]，出现过大疱性药疹 1 例及剥落性皮疹 2 例。该分析还显示进行了碘过敏试验，结果为阴性，但在使用碘克沙醇时仍有发生了过敏反应的病例。

根据药品说明书（碘克沙醇注射液，Visipaque，厂家 GE Healthcare AS，修订时间 2020-10）可知，患者肾功能不全会导致造影剂清除时间显著延长并导致血栓栓塞风险。同时说明书提示，若患者存在严重心脏病和肺动脉高压可能发生血流动力学变化或心律失常。在本案例中，患者在使用碘克沙醇后出现严重大疱性剥脱性皮炎的可能原因：① 造影剂长时间作用合并患者自身高脂血症产生皮下微血栓所致血管炎，而进一步诱发皮疹；② 造影剂自身特异质反应，引起患者自身进行排异，导致患者出现过敏性皮疹；③ 患者由于糖尿病、胃癌等导致营养风险，加之年龄等因素，基础代谢低下、各项器官功能衰退、应激反应能力相对差而出现过敏反应。

综上，对于使用相关药物的老年患者应谨慎用药，加强对患者用药前评估。《碘对比剂血管造影应用相关不良反应中国专家共识》[9] 指出，不推荐进行碘对比剂过敏试验，碘造影剂过敏试验没有预测过敏样不良反应发生的价值。因此碘克沙醇所致的 ADR 无法预测且难以预防，累及系统 / 器官较为广泛，部分严重程度较高甚至危及生命，临床应引起高度重视。同时，考虑到老年患者肝、肾或心脏功能减退以及伴发疾病或其他药物治疗的频率均更高，需谨慎选择用药剂量，通常应以剂量范围中的最低剂量开始。另外，据药品说明书所示，使用 β- 肾上腺素能阻滞剂可降低对比反应的阈值且增加对比反应的严重性，并降低肾上腺素治疗过敏反应的反应性，这也提示我们应提前配备常规急救设备及药品，做好不良反应的防范工作，避免造成严重后果。

参考文献

[1] 郭志辉，张杰 . 增强 CT 扫描中低渗造影剂碘海醇与碘克沙醇的有效性及安全性研究 [J]. 中国药物滥用防治杂志，2022，28（10）：1470-1472，1481.

[2] An J，Jung H，Kwon OY，et al. Differences in adverse reactions among iodinated contrast media：analysis of the KAERS database [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2019，7（7）：2205-2211.

[3] 张俊斌，王彦芳 . CT 增强扫描中不同对比剂使用安全性对比分析 [J]. 基层医学论坛，2022，26（10）：100-102.

[4] 明强，苏杨，刘伟静，等 . 临床应用碘对比剂碘克沙醇致迟发药物不良反应及危险因素分析 [J]. 中国循环杂志，2014，29（11）：903-906.

[5] 胡泊，刘慧茹，曹靓，等 . 141 例碘克沙醇不良反应报告分析 [J]. 中国药事，2022，36（2）：209-216.

[6] 徐志祥 . 碘克沙醇与碘海醇药品不良反应发生特点的对比分析 [J]. 中国药物警戒，2018，15（2）：125-128.

[7] 明强，苏杨，刘伟静，等 . 临床应用碘对比剂碘克沙醇致迟发药物不良反应及危险因素分析 [J]. 中国循环杂志，2014，29（11）：903-906.

[8] 张强，李晓莉，张晓方 . 76 例碘克沙醇致不良反应报告分析 [J]. 中国合理用药探索，2022，19（7）：102-106.

[9] 陈韵岱，陈纪言，傅国胜，等 . 碘对比剂血管造影应用相关不良反应中国专家共识 [J]. 中国介入心脏病学杂志，2014，22（6）：341-348.

（收稿日期：2023-04-07；修回日期：2023-05-13）