



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第21卷 第12期(总第215期) 2023年12月20日出版

目 次

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民 中路 139 号中南
大学湘雅二医院内

出版: 中南药 学杂志社

发行: 湖南省报 刊发行局

印刷: 长沙建 华印务有限公司

订阅: 全国各地 邮局

定价: 每期 25.00 元, 全年 300.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代 号: 42-290

投稿网 址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: znyxzz2003@vip.163.com

广告经 营许可 证: 4300004000764

中国标 准连续 出版物 号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2023 年 版 权 归 《 中 南 药 学 》

编辑 部 所 有

细胞代谢在重大疾病中的研究进展专题

- (3103) 小胶质细胞线粒体功能障碍在脓毒症脑病中的研究进展
..... 苑心茹, 李欣, 殷一博, 等
- (3109) 线粒体在成骨细胞功能中的相关研究进展..... 于子轩, 于永生
- (3115) 溃疡性结肠炎中线粒体功能障碍的产生及机制研究进展
..... 马玉林, 李铁军

蒙药传统汤散剂剂型改良研究专题

- (3122) 蒙药制剂研究进展..... 李佳, 陶晓倩, 韩子璇, 等
- (3130) 蒙药高灵脂配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱及含量测定研究
..... 杨立茹, 刘梦, 韩子璇, 等

研究论文

- (3135) 抗肠道致病菌化合物筛选及其体外抗肿瘤活性研究
..... 王芳芳, 白学鑫, 黄亚辉, 等
- (3141) 深海来源帚状弯孢聚壳菌 (*Eutypella scoparia* W2) 的化学成分
研究 胡曼宜, 蒋家阳, 徐琳, 等
- (3145) 7-取代去氢骆驼蓬碱衍生物的毒性评价及机制研究
..... 方永晟, 杨洪柳, 刘永建, 等
- (3153) 基于蛋白质组学探讨 RAB7 对肾小球足细胞线粒体自噬的影响
..... 胡文杰, 陈慧宇, 祝晓丽, 等
- (3162) 关苍术醇提物乙酸乙酯部位化学成分及其抗肿瘤活性研究
..... 王思琪, 刘宁雨, 张雪柔, 等
- (3167) 灯盏花素注射液通过调控 p38MAPK 信号通路减轻大鼠子宫内膜
异位症的机制研究 姬白嫣, 魏娟
- (3173) 眩晕宁的血清药物化学研究..... 黎欣, 陈淮钰, 叶洁文, 等
- (3179) 手掌参对 2 型糖尿病认知障碍的作用及机制研究
..... 石勇, 曹珊珊, 张瑞华, 等
- (3186) 基于核受体 PXR、CAR 调控 CYP3A4 研究三七总皂苷提高硝苯
地平疗效的机制 李秋红, 周育生, 胡勇, 等
- (3192) 电子加速器辐照对藏药小檗皮中主要有效成分及灭菌效果的影响
..... 吴剑英, 尼玛次仁, 张国庆, 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 姜月芬 宫 建 祝德秋
秦红岩 袁 成 袁 易 贾素洁
夏道宗 原永芳 徐 珽 徐 萍
徐必学 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
睢大箕 肇丽梅 翟 青 黎 敏
颜 苗 潘卫三 魏高文

- (3198) DOK3 在胶质母细胞瘤替莫唑胺耐药中的作用及机制研究
..... 文海韬, 安喆妮, 吴水华
- (3204) 基于商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉碳源的菌株筛选、分离与功能性评价 唐雷梦媛, 阿呷吕布, 李侯希尔, 等
- (3210) 复方葛根温敏凝胶的制备与体外评价研究
..... 杨丽娜, 万志艳, 陶颖, 等
- (3218) 小檗碱和鱼腥草素钠离子对化合物体外抗菌活性评价
..... 马旭东, 陈四开, 刘湘琼, 等
- (3226) 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的玉蝴蝶祛斑膏化学成分分析
..... 张云, 茅向军, 詹学雄, 等
- (3234) 高效液相色谱法测定人血浆中奥希替尼的浓度
..... 董馨蔚, 倪美鑫, 夏嫻嫻, 等
- (3239) 功能化氧化石墨烯搭载双氯芬酸对大鼠膝关节炎的药效研究
..... 薛泽宇, 庞铭诗, 刘元艳

综述

- (3247) 细胞外囊泡产生机制研究进展
..... 田有溪, 师嘉欣, 李子毅, 等
- (3256) 紫草素抗肺癌的作用机制及其研究进展
..... 惠姣姣, 董永成, 郑涛
- (3262) 靶向嗜酸性肉芽肿性多血管炎的抗体药物研究进展
..... 崔雪萍, 彭红艳, 刘灵敏, 等
- (3267) 神经外科降颅压药物的研究进展
..... 高一铭, 姜美竹, 李草, 等

药物分析与检验

- (3274) 基于 UPLC 指纹图谱和多指标成分定量的野生与栽培贯叶金丝桃的质量评价 周海琴, 何雨晴, 陈盛君
- (3281) 石榴皮菝葜复方搽剂指纹图谱的建立及 3 种成分的含量测定
..... 赛力克阿拉·阿里汗, 赵婷婷, 木合布力·阿布力孜, 等
- (3288) 高效液相色谱法测定孟鲁司特钠中有关物质的含量 张磊
- (3293) UPLC-MS/MS 同时测定止咳平喘类保健食品和中成药中的 25 种非法添加化学成分 张珊珊, 贾昌平, 郑佳新
- (3298) 一测多评法同时测定肺气肿片中 14 种成分的含量
..... 杨婷, 邓芳, 刘涛, 等
- (3305) 气相色谱法测定不同产地艾叶中 9 种挥发性成分含量
..... 张文静, 李海燕, 王晓伟, 等
- (3310) 香卿止痛喷雾剂指纹图谱建立及指标成分含量测定研究
..... 汤湔, 李金慈, 姜俊翔, 等
- (3316) 牛黄益金片 GC 特征图谱研究及 4 种挥发性成分的含量测定
..... 朱伟堃, 王静, 周春峰, 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。

- (3322) 甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液中有关物质定性研究
..... 周成, 吴湖平, 路珊珊, 等
- (3326) HPLC-PDA 波长切换法测定远志 - 石菖蒲药对中 4 种主要成分的含量
..... 孟雪, 张瑜, 王娣, 等
- (3331) 不同产地首乌藤指纹图谱及 4 种成分的含量测定
..... 曹斯琼, 周湘媛, 陈康梅, 等

医院药学

- (3337) 基于 FAERS 数据库的神经激肽 -1 受体拮抗剂不良事件信号挖掘与分析
..... 王凤蝶, 王静, 陈力
- (3345) SWOT 分析儿童专科医院门诊处方前置审核规则库建设的应用与成效
..... 吴国丽, 卢晓林, 王荟
- (3350) 体外膜氧合支持治疗患者治疗药物监测的文献计量分析
..... 董瑜霜, 沈丹天, 钟晗, 等

临床药师在临床

- (3357) 1 例海曲泊帕致药物性肝损伤的药学监护暨文献复习
..... 刘小林, 吴义来, 陈阳, 等
- (3361) 我国药师主导的华法林患者抗凝管理模式发展现状
..... 郭艳, 罗娟, 廖雅琪, 等

药物与临床

- (3364) 使用中文版 EDIN 量表与 Wong-Baker 量表评价对乙酰氨基酚与布洛芬改善 0 ~ 5 岁发热儿童舒适度的效果
..... 王文莉, 史金平, 张先霞

药品不良反应

- (3368) 1 例富马酸替诺福韦二吡呋酯致低磷酸盐血性骨软化症的案例报道及文献汇总分析
..... 杨燕, 刘迎, 李文渊
- (3373) 奥美沙坦相关肠病 1 例及文献复习..... 闻超, 刘锋, 王敏
- (3376) 艾司奥美拉唑致 Stevens-Johnson 综合征 1 例
..... 张梁, 李柯, 吴雄
- (3378) 硫酸依替米星注射液致迟发型过敏性休克 1 例..... 马晓东

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*278*zh*P*25.0*47*2023-12

本期责任编辑: 邬志娟, 彭金飞, 李科, 陆窈窈

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 12 December 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

- (3103) Mitochondrial dysfunction in microglia: a novel perspective for pathogenesis of sepsis YUAN Xin-ru, LI Xin, YIN Yi-bo, et al
- (3109) Advancements in research on the role of mitochondria in osteoblast function YU Zi-xuan, YU Yong-sheng
- (3115) Manifestation and mechanism of mitochondrial dysfunction in ulcerative colitis MA Yu-lin, LI Tie-jun
- (3122) Research progress in Mongolian medicine preparations LI Jia, TAO Xiao-qian, HAN Zi-xuan, et al
- (3130) HPLC fingerprint and content determination of Mongolian medicine *Petauristae Faeces* formula granules YANG Li-ru, LIU Meng, HAN Zi-xuan, et al
- (3135) Screening and antitumor activity of leading compounds against intestinal pathogens in vitro WANG Fang-fang, BAI Xue-xing, HANG Ya-hui, et al
- (3141) Chemical constituents of deep-sea-derived *Eutypella scoparia* W2 HU Man-yi, JIANG Jia-yang, XU Lin, et al
- (3145) Toxicity evaluation and mechanism of 7-substituted harmine derivatives FANG Yong-sheng, YANG Hong-liu, LIU Yong-jian, et al
- (3153) Proteomics-based exploration of the effect of RAB7 on mitochondrial autophagy in renal podocytes HU Wen-jie, CHEN Hui-yu, ZHU Xiao-li, et al
- (3162) Chemical constituents and antitumor activities of ethyl acetate extract of *Atractylodes japonica* WANG Si-qi, LIU Ning-yu, ZHANG Xue-rou, et al
- (3168) Mechanism of Brevescapine injection alleviating endometriosis in rats by regulating p38MAPK signaling pathways JI Bai-yan, WEI Juan
- (3173) Serum pharmacochimistry of Xuanyunning LI Xin, CHEN Wei-yu, YE Jie-wen, et al
- (3179) Effect of *Gymnadenia conopsea* on rats with type 2 diabetes cognitive impairment and related mechanism SHI Yong, CAO Shan-shan, ZHANG Rui-hua, et al
- (3186) Mechanism of Panax notoginseng saponins improving the efficacy of nifedipine based on nuclear receptor PXR and CAR regulation CYP3A4 LI Qiu-hong, ZHOU Yu-sheng, HU Yong, et al
- (3192) Effect of electron accelerator irradiation on the main active components and sterilization of *Berberidis Cortex* WU Jian-ying, Ni-ma-ci-ren, ZHANG Guo-qing, et al

Postal code

42-290

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

¥ 25.00 an issue

¥ 300.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2023 by the
Central South Pharmacy**

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

- (3198) Role and mechanism of DOK3 in temozolomide resistance in glioblastoma
..... *WEN Hai-Tao, AN Zhe-Ni, WU Shui-hua*
- (3204) Screening, isolation and functional of strains based on a commercial type
3 resistant starch from *Canna edulis* carbon source
..... *TANG Lei-meng-yuan, AGA Lyu-bu, LI Hou-xi-er, et al*
- (3210) Preparation and in vitro evaluation of temperature-sensitive in situ gel of
Gegen compound *YANG Li-na, WAN Zhi-yan, TAO Ying, et al*
- (3219) Antimicrobial activity evaluation on ion-pair compounds of berberine and
sodium houttuynonate in vitro
..... *MA Xu-dong, CHEN Si-kai, LIU Xiang-qiong, et al*
- (3226) Chemical constituents in Yuhudie macula-removing cream by UPLC-Q-
TOF-MS *ZHANG Yun, MAO Xiang-jun, ZHAN Xue-xiong, et al*
- (3234) Determination of osimertinib in human plasma by high performance liquid
chromatography
..... *DONG Xin-wei, NI Mei-xin, XIA Xian-xian, et al*
- (3239) Effect of functional graphene oxide with diclofenac on knee osteoarthritis
in rats *XUE Ze-yu, PANG Ming-shi, LIU Yuan-yan*
- (3247) Progress in the underlying mechanism for production of extracellular vesicles
..... *TIAN You-xi, SHI Jia-xin, LI Zi-yi, et al*
- (3256) Research progress in mechanism of action shikonin for lung cancer
..... *HUI Jiao-jiao, DONG Yong-cheng, ZHENG Tao*
- (3262) Research progress in antibody drugs targeting eosinophilic granulomatosis
with polyangiitis
..... *CUI Xue-ping, PENG Hong-yan, LIU Ling-min, et al*
- (3267) Research progress of therapeutic drugs for reducing intracranial pressure
..... *GAO Yi-ming, JIANG Mei-zhu, LI Cao, et al*
- (3274) Quality analysis of wild and home hyperici perforati herba by UPLC finger-
print and multi-component quantitation
..... *ZHOU Hai-qin, HE Yu-qing, CHEN Sheng-jun*
- (3281) Fingerprint construction and 3 components determination of pomegran-
ate peel sarsaparilla compound liniment
..... *Sailikeala Alihan, ZHAO Ting-ting, Mourboul Ablise, et al*
- (3288) Determination of 7 related substances in montelukast sodium by HPLC
..... *ZHANG Lei*
- (3293) Simultaneous determination of 25 illegally added chemical components
in anti-cough and anti-asthmatic health food and traditional Chinese
medicine by UPLC-MS/MS
..... *ZHANG Shan-shan, JIA Chang-ping, ZHENG Jia-xin*
- (3298) Simultaneous determination of 14 constituents in Feiqizhong tablets by
QAMS method *YANG Ting, DENG Fang, LIU Tao, et al*
- (3305) Determination of 9 volatile components in artemisia argyi from different
habitats by gas chromatography
..... *ZHANG Wen-jing, LI Hai-yan, WANG Xiao-wei, et al*
- (3310) Fingerprint establishment and determination of index components in
Xiangqing Zhitong spray
..... *TANG Hao, LI Jin-ci, JIANG Jun-xiang, et al*
- (3316) GC characteristic chromatogram and content determination of 4 volatile
components of Niu Huang Yijin tablets
..... *ZHU Wei-kun, WANG Jing, ZHOU Chun-feng, et al*

- (3322) **Qualitative study on related substances in pazufloxacin mesylate and sodium chloride injection**
..... *ZHOU Cheng, WU Hu-ping, LU Shan-shan, et al*
- (3327) **Content of determination of 4 main components in *Polygala tenuifolia* Willd.-*Acorus tatarinowii* Schott. herb pair by HPLC-PDA wavelength-switching method**..... *MENG Xue, ZHAGN Yu, WANG Di, et al*
- (3331) **Fingerprint and determination of 4 components in *Polygoni Multiflori* Caulis from different origins**
..... *CAO Si-qiong, ZHOU Xiang-yuan, CHEN Kang-mei, et al*
- (3337) **Data-mining and analysis of adverse event signals of neurokinin-1 receptor antagonists based on FAERS database**
..... *WANG Feng-die, WANG Jing, CHEN Li*
- (3345) **Application and effectiveness of outpatient prescriptions pre-audit rules in children's specialist hospitals based on SWOT analysis method**
..... *WU Guo-li, LU Xiao-lin, WANG Hui*
- (3350) **Bibliometric analysis of therapeutic drug monitoring in extracorporeal membrane oxygenation-supported therapy patients**
..... *DONG Yu-shuang, SHEN Dan-tian, ZHONG Han, et al*
- (3364) **Evaluation of the effect of acetaminophen and ibuprofen on comfort improvement in 0 ~ 5-year-olds with fever by Chinese EDIN scale and Wong-Baker scale**
..... *WANG Wen-li, SHI Jin-ping, ZHANG Xian-xia*

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。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项目 1 项。荣获上海药学科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，*Frontiers in Cardiovascular Medicine* 客座编辑。

小胶质细胞线粒体功能障碍在脓毒症脑病中的研究进展

苑心茹¹，李欣²，殷一博²，张小轩¹，吴镜湘²，游兴姬^{1*} (1. 上海大学医学院，上海 200444；2. 上海交通大学附属胸科医院，上海 200000)

摘要：脓症患者表现出长期认知功能障碍和局灶性神经功能缺损，统称为脓毒症相关脑病，其病理机制十分复杂。最近的研究表明，线粒体功能障碍包括线粒体 DNA (mtDNA) 损伤与代谢缺陷，这些均发生在小胶质细胞激活和其引发的神经炎症之前。因此，深入了解脓毒症脑病线粒体功能障碍与小胶质细胞活化之间的关系，对于揭示脓毒症的发病机制以及脓毒症脑病的早期诊断和治疗找到有效的方法具有重要意义。本文综述了 mtDNA、线粒体代谢的变化在脓毒症脑病小胶质细胞活化中的作用及靶向小胶质细胞线粒体作为脓毒症脑病潜在治疗策略的研究进展。

关键词：线粒体；小胶质细胞；脓毒症；脓毒症脑病

中图分类号：R741.02

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2023)12-3103-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.001

Mitochondrial dysfunction in microglia: a novel perspective for pathogenesis of sepsis

YUAN Xin-ru¹, LI Xin², YIN Yi-bo², ZHANG Xiao-xuan¹, WU Jing-xiang², YOU Xing-ji^{1*} (1. Medical College of Shanghai University, Shanghai 200444; 2. Chest Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200000)

基金项目：国家自然科学基金面上项目 (No.82071233)。

作者简介：苑心茹，女，硕士，主要从事脓毒症的机制研究，email: 1274111713@qq.com *通信作者：游兴姬，女，副教授，主要从事慢性痛的机制研究，email: yoyo1976@shu.edu.cn

Abstract: Sepsis patients exhibit long-term cognitive impairment and focal neurological deficits, collectively known as sepsis associated encephalopathy, with complex pathological mechanisms. Mitochondrial dysfunction includes mitochondrial DNA (mtDNA) damage and metabolic defects, which happen usually before the activation of microglia and neuroinflammation. In-depth understanding of the relationship between mitochondrial dysfunction and microglia activation in sepsis encephalopathy is important for revealing the pathogenesis of sepsis and seeking effective methods for early diagnosis and treatment of sepsis encephalopathy. This article aims to expound the role of mitochondrial DNA and mitochondrial metabolism changes in the activation of microglia in sepsis encephalopathy and develop potential therapeutic strategy.

Key words: mitochondria; microglia; sepsis; sepsis associated encephalopathy

脓毒症是重症监护医学中最常见的疾病，其发病率和病死率较高，给社会带来巨大负担^[1]。在脓毒症发作期间，感染病原体会导致促炎和抗炎反应失衡，导致休克、多器官功能障碍综合征，甚至死亡。在中国，每年约有 102 万人死于脓毒症，占全国总死亡人数的 12.6%^[2]。在脓毒症的病理过程中，大脑是最先被感染的器官之一。据调查，高达 70% 的脓毒症患者有不同程度的脑损伤，表现出意识水平的混乱，如睡眠-觉醒周期紊乱、谵妄或幻觉、不安和兴奋的迹象^[3]，这些并发症被称为脓毒症相关脑病（sepsis associated encephalopathy, SAE）^[4]。相关研究表明，即使在脓毒症康复的小鼠中，它们的行为和认知仍然表现出功能障碍^[5]，临床研究中也同样发现，脓毒症幸存患者在出院后仍有死亡风险，并伴有 SAE 及认知功能障碍^[6]。因此，迫切需要对 SAE 的发病机制进行深入研究，为临床 SAE 的治疗提供帮助。

线粒体是生物体内先天免疫的重要场所，参与防御生物体感染以及急性损伤产生的炎症反应，有研究表明，SAE 会引起线粒体的超微结构以及生化层次的改变^[7-9]，而线粒体功能障碍先于小胶质细胞激活^[10]。目前，已有大量研究着眼于 SAE 的发生机制，靶向线粒体功能的药物在 SAE 的治疗中同样也越来越受到重视，具有极大的发展潜力，本文从线粒体 DNA（mitochondrial DNA, mtDNA）以及线粒体代谢失调两个方面综述了小胶质细胞线粒体功能障碍在 SAE 发生发展中发挥的重要作用（见图 1）。

1 mtDNA

1.1 mtDNA 与脓毒症

mtDNA 是细胞内除细胞核 DNA（nuclear DNA, nDNA）外唯一的遗传物质。线粒体膜通透

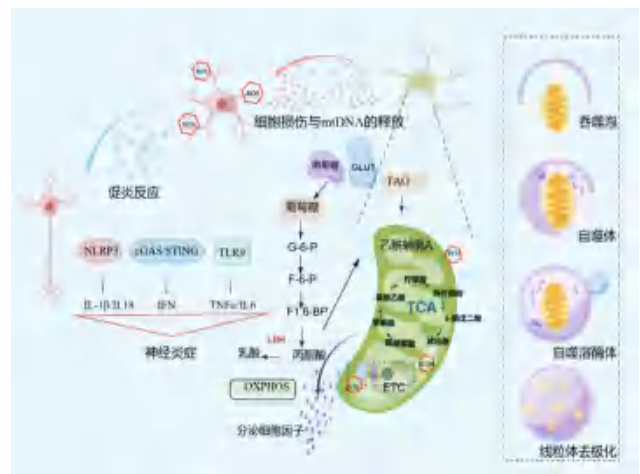


图 1 小胶质细胞中 mtDNA 释放紊乱、氧化应激、自噬受损参与脓毒症相关脑病

Fig 1 Mitochondrial mtDNA release disorder, oxidative stress, and impaired autophagy in microglia involved in sepsis associated encephalopathy

性转变（mitochondrial membrane permeability transition, MMPT）引起 mtDNA 从线粒体向胞质转运。mtDNA 编码线粒体呼吸链复合体的亚基和线粒体蛋白，它的完整性是线粒体正常能量供应所必需的。当细胞暴露于病原体相关的分子模式（pathogen-associated molecular pattern, PAMP）或损伤相关的分子模式（damage-associated molecular patterns, DAMP）时，线粒体活性氧（reactive oxygen species, ROS）被异常释放，随后降低线粒体膜电位，导致膜完整性受损，引起 mtDNA 渗漏到胞质中^[11]。

在 SAE 损伤的初始阶段，细胞线粒体出现肿胀，mtDNA 受损，部分膜去极化^[11-12]。Tsuji 等^[11]在动物实验中发现，给脓毒症小鼠使用化学解偶联剂 BAM15 可以减少中性粒细胞凋亡和 mtDNA 的释放，从而缓解小鼠脓毒症及相关器官衰竭。在另一项临床试验中，Elisabeth 等^[13]使用 qPCR 去评估脓毒症患者的线粒体损伤情况，发现

mtDNA 损伤存在于脓毒症患者肾脏上皮细胞的细胞质中,而在对照受试者的活检中几乎不存在。综上所述,当细胞发生线粒体功能障碍时,其渗漏的 mtDNA 引起并加重 SAE 的发生和发展。

1.2 小胶质细胞 mtDNA 与 SAE

小胶质细胞向 M1 型极化能够促进多种神经系统类疾病,在临床脓毒症患者的皮层中也发现小胶质细胞 M1 型特异性标记物 CD68 显著升高^[14-15],表明小胶质细胞在脓毒症中也存在 M1 型极化的现象。Wu 等^[16]的研究发现极化为 M1 型表型的小胶质细胞会进一步释放促炎细胞因子以及相关酶的表达来诱导脓毒症患者脑病的加剧。同时, Ye 等^[17]研究发现,脑室注射米诺环素可以抑制小胶质细胞极化阻断 IL17A/IL17R 通路,从而起到缓解 SAE 的作用。

有研究表明小胶质细胞 mtDNA 的多态性会直接调节小胶质细胞的激活^[18], Wang 等^[19]在脓毒症的体外模型中使用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激, mtDNA 的释放增加,激活小胶质细胞向 M1 型极化。Dominguini 等^[20]研究发现,甲芬那酸对于 SAE 的保护作用与小胶质细胞的活化以及 mtDNA 增加有着密切的关联,基于此,他们认为在脓毒症期间, mtDNA 的完整性对小胶质细胞的激活与神经元的稳定性至关重要。

在 SAE 中小胶质细胞会通过不同的途径感知受损细胞中 mtDNA 的释放,包括 Toll 样受体 9 (TLR9)、胞质环 GMP-AMP 合成酶 (cGAS) - 干扰素基因刺激因子 (STING) 和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)^[21]。Liao 等^[22]研究发现小胶质细胞胞质中 mtDNA 与 cGAS 结合,激活 STING 通路,从而增强 IFN- β 的表达,加重 SAE 及其炎症反应 (见图 1)。此外,在人体内小胶质细胞发生线粒体损伤释放 mtDNA 的这一过程会产生大量 ROS,激活 NF- κ B 信号通路,合成过多的促炎细胞因子,加重炎症微环境,诱导细胞死亡和组织损伤^[22];因此,损伤相关模式分子 (DAMP) 的释放得到进一步增强,从而激活更多的小胶质细胞,最终构成神经炎症的恶性循环^[23]。以上这些结果提示小胶质细胞 mtDNA 异常是 SAE 发病过程中胶质细胞活化和致病性物质沉积的一个原因,小胶质细胞中 mtDNA 异常触发线粒体功能障碍,加剧炎症反应,最终导致不可逆的神经元死亡、胶质细胞功能丧失以及 SAE 的恶化。

2 线粒体能量代谢障碍

2.1 线粒体能量代谢和脓毒症

线粒体是细胞的能量工厂,在大脑的能量代谢中起着核心作用。脓毒症引起线粒体损伤后,会引起线粒体能量代谢失调,增加 ROS 释放和降低抗氧化防御能力,进一步加重线粒体损伤。Hernandes 等^[24]的研究表明 ROS 在诱发 SAE 中发挥了重要作用。ROS 生成和抗氧化保护机制的失衡引起的氧化应激会导致线粒体脂质心磷脂过氧化,增加 ROS 的释放。除此之外,在线粒体内 ROS 的积累可导致电子传递链 (electron transport chain, ETC) 受损后更多的电子泄漏^[25],进而增加耗氧量并减少三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 生成^[26],降低线粒体膜电位和活性,以及减少呼吸复合物的表达,从而构成恶性循环,导致神经元死亡并加重 SAE。

另外, Mccall 等^[27]给予脓毒症小鼠二氯乙酸酯增加了其线粒体呼吸和 ATP 合成,缓解了氧化应激,使脓毒症小鼠的存活率倍增。2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG) 是一种 2-羟基被氢取代的葡萄糖类似物,作为糖酵解抑制剂,它能够与己糖激酶结合,但不能被己糖激酶磷酸化^[28]。Zheng 等^[29]使用己糖激酶抑制剂处理脓毒症小鼠,使糖酵解代谢减弱,下调了脓毒症小鼠中 BAX 和 BAK 的表达,缓解了脓毒症相关症状。Li 等^[30]的研究在细胞水平上增强了脂肪酸氧化,导致脓毒症的加剧,再次证实了这一观点。

2.2 线粒体能量代谢在小胶质细胞活化与 SAE 中的作用

小胶质细胞维持免疫功能是一个高能量消耗的过程,受线粒体能量代谢的调节。在大脑中,葡萄糖主要用于产生能量,通过糖酵解和氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 满足小胶质细胞的能量需求^[31-33]。除此之外,小胶质细胞可以根据生理和病理条件下的能量需求在糖酵解和氧化磷酸化之间切换^[34]。在静息状态下,小胶质细胞主要依靠 OXPHOS 产生 ATP。在炎症或应激反应的刺激下小胶质细胞会从休眠状态转变为激活状态,并伴有部分线粒体功能障碍和能量产生不足。为了弥补 ATP 的损失,小胶质细胞通过葡萄糖转运蛋白 -1 (GLUT-1) 增强葡萄糖吸收,并利用厌氧糖酵解快速供能,从而增强免疫反应^[34-35]。同样有研究表明,通过抑制 OXPHOS/ETC 活性可激活小胶质细胞^[36]。在原代培养的小胶质/巨噬细胞和 BV-2 细胞系中,通过相应的抑制剂抑制 ETC 复合物可引起一系列细胞反应,包括细胞形态的改变、线粒体 ROS 生

成驱动的氧化应激的诱导、MAPK/NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体的激活、促炎细胞因子的产生升高、受损线粒体积累加速等,从而导致小胶质细胞/巨噬细胞功能障碍和凋亡^[36]。

John 等^[37]总结了线粒体氧化磷酸化和糖酵解的稳态在小胶质细胞代谢稳态调节中的重要性,并强调了小胶质细胞线粒体代谢调节在包括 SAE 在内的神经系统变性疾病中的重要作用。神经元 MT1 是一种神经保护因子,但小胶质细胞 MT1 的功能障碍是否与 SAE 相关尚未得到证明。Gu 等^[38]在细胞水平上用 LPS 处理模拟了脓毒症后的小胶质细胞,发现经 LPS 诱导后细胞的过度有氧糖酵解和 OXPHOS 受损可以通过小胶质细胞 MT1 激活来逆转。MT1 可以正向调控丙酮酸脱氢酶 α 1 (PDHA1) 表达,增强 OXPHOS 并抑制有氧糖酵解。MT1 激活通过调节代谢重编程抑制 LPS 诱导的神经炎症,因此通过缓解小胶质细胞线粒体的能量代谢,可以显著改善 SAE 的发生和发展。上述文献均表明线粒体能量代谢对 SAE 中小胶质细胞驱动的神经炎症有重要贡献,表明保持线粒体代谢稳态是治疗 SAE 的有效治疗策略。

3 小胶质细胞线粒体自噬是 SAE 的潜在保护机制

线粒体自噬在 SAE 中的潜在保护作用受到了广泛关注。线粒体自噬是一种特殊的自噬过程,通过清除受损线粒体来维持线粒体的稳态,这是目前唯一已知的可以选择性去除整个线粒体的途径^[39]。同时,研究表明线粒体自噬可以保护细胞免受脓毒症引起的应激损伤^[40]。

当线粒体暴露于脓毒症时,它会启动自我保护机制,引发线粒体自噬^[41]。已有的一些模型表明,线粒体靶向 ROS 清除剂(例如线粒体 Q),通过增强线粒体的自噬功能,起到缓解脓毒症的作用^[42]。Zhou 等^[43]在 SAE 的大鼠模型中观察到,低剂量地塞米松可以增强自噬,这种地塞米松诱导的自噬减少了 SAE 诱导的神经元凋亡,抑制了 SAE 的发生。在 SAE 中,线粒体自噬可能通过清除过量的 ROS,减轻细胞损伤和炎症反应,从而发挥保护作用。Mai 等^[44]的研究表明 LncRNA Lethe 可以通过调节皮质神经元的自噬保护由脓毒症引起的认知功能障碍,缓解 SAE。Wu 等^[45]的研究发现,使用线粒体靶向肽 SS-31 可以阻止线粒体 ROS 的产生,并保护线粒体的完整性,同时也改善了脓毒症小鼠的 SAE。Manfredini 等^[46]使用线粒体自噬激活剂和线粒体生物发生激活剂来加快线粒体自噬,清除过多的

ROS 可以改善脓毒症后的线粒体功能,从而缓解 SAE。Zhao 等^[47]发现线粒体自噬对维持脓毒症状态下血脑屏障的完整性具有重要作用。线粒体自噬可以保护线粒体内环境的稳态,减轻内皮细胞损伤,从而保护血脑屏障,改善 SAE 的发生。除此之外,Zhong 等^[48]的研究发现,在小胶质细胞中选择性的线粒体自噬可以治疗神经系统变性疾病。Zhou 等^[49]在细胞水平上研究发现铜可以通过 ROS/NF- κ B 通路和线粒体自噬障碍诱导小胶质细胞介导的神经炎症。以此提示线粒体自噬作为生物体内清除线粒体的重要途径,其在 SAE 中可能存在重要的保护作用。

4 总结与展望

小胶质细胞线粒体功能障碍与其驱动的神经炎症相关, $A\beta$ 沉积等病理改变会损伤 mtDNA,扰乱线粒体膜通透性,进而改变线粒体的功能、线粒体代谢等,导致小胶质细胞激活和神经炎症的发生。此外,当严重受损的线粒体没有通过线粒体自噬及时清除时,激活的小胶质细胞会将有害的线粒体内容物,如 ROS 和活性氮,释放到细胞外环境,损害周围的神经元和星形胶质细胞,放大炎症反应,导致 SAE 恶化。

然而,虽然目前在小胶质细胞线粒体和 SAE 研究方面取得了巨大进展,但未来仍有许多问题亟待解答。John 等^[50]证明,线粒体轴突运输的丧失是神经系统变性疾病突触变性和认知能力下降的重要原因。那么 SAE 的小胶质细胞内线粒体是否存在异常运动?目前的线粒体自噬增强剂和其他相关化合物对 SAE 患者是否具有类似的治疗效果?是否有方法可以让候选药物靶向恢复小胶质细胞的线粒体功能?这些问题都有待解决。目前的一种选择是可以将候选药物包装到人工或修饰的天然纳米颗粒中进行靶向递送,但靶向的效率仍需要进一步提高^[51-52]。一项新的研究报道了脑卒中后线粒体从星形胶质细胞转移到神经元,参与神经保护和神经恢复^[53]。那么在 SAE 中,小胶质细胞和其他类型的脑细胞,特别是神经元之间是否存在线粒体交换,小胶质细胞和神经元之间存在的线粒体运输途径,以及该途径在 SAE 中的生物学和病理功能都是值得进一步探讨的。对小胶质细胞线粒体的深入研究将为解密 SAE 的发病机制提供新的视角,填补重要的知识空白,促进治疗干预措施的开发与 SAE 的早期诊断。

参考文献

- [1] WHO guidelines approved by the guidelines review committee [M]. WHO guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents. Geneva; World Health Organization © World Health Organization, 2018.
- [2] Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14 (2): 121-137.
- [3] De Souza Stork S, Hübner M, Biehl E, et al. Diabetes exacerbates sepsis-induced neuroinflammation and brain mitochondrial dysfunction [J]. *Inflammation*, 2022, 45 (6): 2352-2367.
- [4] Olivieri R, Michels M, Pescador B, et al. The additive effect of aging on sepsis-induced cognitive impairment and neuroinflammation [J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 314: 1-7.
- [5] Savi FF, De Oliveira A, De Medeiros GF, et al. What animal models can tell us about long-term cognitive dysfunction following sepsis: a systematic review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 124: 386-404.
- [6] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10141): 75-87.
- [7] Ahmed S, Kwatra M, Ranjan Panda S, et al. Andrographolide suppresses NLRP3 inflammasome activation in microglia through induction of parkin-mediated mitophagy in in-vitro and in-vivo models of Parkinson disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91: 142-158.
- [8] Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock [J]. *Lancet*, 2002, 360 (9328): 219-223.
- [9] Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, et al. Mitochondria: hub of injury responses in the developing brain [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13 (2): 217-232.
- [10] Santos RX, Correia SC, Zhu X, et al. Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (18): 2444-2457.
- [11] Tsuji N, Tsuji T, Yamashita T, et al. BAM15 treats mouse sepsis and kidney injury, linking mortality, mitochondrial DNA, tubule damage, and neutrophils [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133 (7): e152401
- [12] Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35 (22): 7497-7504.
- [13] Elisabeth CS, Bastiaan SS, Matijs M, et al. Sepsis is associated with mitochondrial DNA damage and a reduced mitochondrial mass in the kidney of patients with sepsis-AKI [J]. *Crit Care*, 2021, 25 (1): 36.
- [14] Afina WL, Jacqueline CM, Jeroen JM, et al. Microglia activation in sepsis: a case-control study [J]. *J Neuroinflammation*, 2007, 4: 4.
- [15] Moraes CA, Zaverucha-do-Valle C, Fleurance R, et al. Neuroinflammation in sepsis: molecular pathways of microglia activation [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14 (5): 416.
- [16] Wu QC, Zhao YJ, Chen XY, et al. Propofol attenuates BV2 microglia inflammation via NMDA receptor inhibition [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96 (3): 241-248.
- [17] Ye B, Tao TZ, Zhao AD, et al. Blockade of IL-17A/IL-17R pathway protected mice from sepsis-associated encephalopathy by inhibition of microglia activation [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 8461725.
- [18] Scheffler K, Krohn M, Dunkelmann T, et al. Mitochondrial DNA polymorphisms specifically modify cerebral β -amyloid proteostasis [J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 124 (2): 199-208.
- [19] Wang Y, Chen ZJ, Zhang Y, et al. Mitochondrial biogenesis of astrocytes is increased under experimental septic conditions [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127 (10): 1837-1842.
- [20] Dominguni D, Mivhels I M, Wessler LB, et al. Mitochondrial protective effects caused by the administration of mefenamic acid in sepsis [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19 (1): 268.
- [21] Pinti M, Ferraro D, Nasi M. Microglia activation: a role for mitochondrial DNA? [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16 (12): 2393-2394.
- [22] Liao YJ, Cheng JB, Kong XX, et al. HDAC3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion-induced brain injury by regulating the microglial cGAS-STING pathway [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (21): 9644-9662.
- [23] Gong T, Liu L, Jiang W, et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20 (2): 95-112.
- [24] Hernandez MS, D'Avila JC, Trevelin SC, et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis [J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 36.
- [25] Bai P, Nagy L, Fodor T, et al. Poly (ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26 (2): 75-83.
- [26] Lee I, Hüttemann M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842 (9): 1579-1586.
- [27] McCall CE, Zhu X, Zabalawi M, et al. Sepsis, pyruvate, and mitochondria energy supply chain shortage [J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112 (6): 1509-1514.
- [28] Yao J, Chen SH, Mao ZS, et al. 2-Deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis, sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (7): e21788.
- [29] Zheng ZB, Ma H, Zhang X, et al. Enhanced glycolytic metabolism contributes to cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis [J]. *J Infect Dis*, 2017, 215 (9): 1396-1406.

- [30] Li RQ, Li XQ, Zhao J, et al. Mitochondrial STAT3 exacerbates LPS-induced sepsis by driving CPT1a-mediated fatty acid oxidation [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (2): 976-998.
- [31] Baik SH, Kang S, Lee W, et al. A Breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Cell Metab*, 2019, 30 (3): 493-507.
- [32] Holland R, Mcintosh AL, Finucane OM, et al. Inflammatory microglia are glycolytic and iron retentive and typify the microglia in APP/PS1 mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 68: 183-196.
- [33] Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, et al. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques [J]. *J Exp Med*, 2016, 213 (5): 667-675.
- [34] Preeti K, Sood A, Fernandes V. Metabolic regulation of glia and their neuroinflammatory role in Alzheimer's disease [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, 42 (8): 2527-2551.
- [35] Wang L, Pavlou S, Du X, et al. Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis [J]. *Mol Neurodegener*, 2019, 14 (1): 2.
- [36] Shaikh SB, Nicholson LF. Effects of chronic low dose rotenone treatment on human microglial cells [J]. *Mol Neurodegener*, 2009, 4: 55.
- [37] John PB, Sun DD. Significance of microglial energy metabolism in maintaining brain homeostasis [J]. *Transl Stroke Res*, 2022, 14 (4): 435-437.
- [38] Gu C, Wang F, Zhang YT, et al. Microglial MT1 activation inhibits LPS-induced neuroinflammation via regulation of metabolic reprogramming [J]. *Aging Cell*, 2021, 20 (6): e13375.
- [39] Lou G, Palikaras K, Lautrup S, et al. Mitophagy and neuroprotection [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26 (1): 8-20.
- [40] Georgakopoulos ND, Wells G, Campanella M. The pharmacological regulation of cellular mitophagy [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13 (2): 136-146.
- [41] Buck MD, O'sullivan D, Klein Geltink RI, et al. Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming [J]. *Cell*, 2016, 166 (1): 63-76.
- [42] Xiao L, Xu XX, Zhang F, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorated tubular injury mediated by mitophagy in diabetic kidney disease via Nrf2/PINK1 [J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 297-311.
- [43] Zhou RX, Sun XM, Li YY, et al. Low-dose dexamethasone increases autophagy in cerebral cortical neurons of juvenile rats with sepsis associated encephalopathy [J]. *Neuroscience*, 2019, 419: 83-99.
- [44] Mai C, Qiu L, Zeng Y, et al. LncRNA Lethe protects sepsis-induced brain injury via regulating autophagy of cortical neurons [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (11): 4858-4864.
- [45] Wu J, Zhang MQ, Hao SY, et al. Mitochondria-targeted peptide reverses mitochondrial dysfunction and cognitive deficits in sepsis-associated encephalopathy [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52 (1): 783-791.
- [46] Manfredini A, Constantino L, Pinto MC, et al. Mitochondrial dysfunction is associated with long-term cognitive impairment in an animal sepsis model [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133 (18): 1993-2004.
- [47] Zhao ZH, Hu J, Gao XP, et al. Activation of AMPK attenuates lipopolysaccharide-impaired integrity and function of blood-brain barrier in human brain microvascular endothelial cells [J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97 (3): 386-392.
- [48] Zhong G, Long HP, Zhou T, et al. Blood-brain barrier permeable nanoparticles for Alzheimer's disease treatment by selective mitophagy of microglia [J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121690.
- [49] Zhou Q, Zhang Y, Lu L, et al. Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF- κ B pathway and mitophagy disorder [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 168: 113369.
- [50] John A, Reddy PH. Synaptic basis of Alzheimer's disease: focus on synaptic amyloid beta, P-tau and mitochondria [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 65: 101208.
- [51] Li HW, Zhang L, Qin C. Current state of research on non-human primate models of Alzheimer's disease [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2 (4): 227-238.
- [52] Picone P, Palumbo FS, Federico S, et al. Nano-structured myelin: new nanovesicles for targeted delivery to white matter and microglia, from brain-to-brain [J]. *Mater Today Bio*, 2021, 12: 100146.
- [53] Jia YF, Zhuang X, Zhang Y, et al. The brain targeted delivery of programmed cell death 4 specific siRNA protects mice from CRS-induced depressive behavior [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (11): 1077.

(收稿日期: 2023-06-29; 修回日期: 2023-09-15)

线粒体在成骨细胞功能中的相关研究进展

于子轩, 于永生* (上海大学医学院, 上海 200444)

摘要: 线粒体被称为细胞的“动力源”, 在能量代谢、细胞凋亡、信号转导、炎症、应激反应中发挥重要作用。成骨细胞由骨髓间充质干细胞分化而来, 是骨细胞的重要来源, 成骨细胞的数量与活性下降是骨质疏松症发生的关键之一。诸多研究证据表明, 线粒体的功能与成骨细胞的增殖、分化、凋亡密切相关, 而成骨细胞的数量改变是骨质疏松症发生的关键。所以线粒体是治疗骨质疏松症的潜在重要靶点。本文从能量代谢、氧化应激、信号通路以及线粒体自噬等方面探讨线粒体对成骨细胞功能的影响, 同时介绍针对线粒体功能, 用于骨质疏松症治疗的靶向药物, 以为临床提供更多治疗骨质疏松的思路。

关键词: 线粒体功能; 成骨细胞; 骨质疏松

中图分类号: R68

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3109-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.002

Research advancements in the role of mitochondria in osteoblast function

YU Zi-xuan, YU Yong-sheng* (School of Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444)

Abstract: Mitochondria, known as the cellular “powerhouses”, play a vital role in energy metabolism, cellular apoptosis, signal transduction, inflammation and stress response. Osteoblasts originate from mesenchymal stem cells in the bone marrow and serve as an important source of bone cells. The decline in the quantity and activity of osteoblasts is a critical factor in the development of osteoporosis. Multiple research findings suggested a close correlation between mitochondrial function and the proliferation, differentiation, and apoptosis of osteoblasts. Hence, mitochondria are a potential and essential target for osteoporosis. This article explores the impact of mitochondria on the function of osteoblasts, focusing on energy metabolism, oxidative stress, signaling pathways, and mitochondrial autophagy. Additionally, it introduces target medications that address mitochondrial function in the treatment of osteoporosis, aiming to provide insights for clinical treatment of osteoporosis.

Key words: mitochondrial function; osteoblast; osteoporosis

线粒体是一种细胞器, 由两层膜包被, 具有独特的生理功能, 如提供能量、参与氧化应激、参与各种信号通路等, 在高等真核生物中起至关重要的作用^[1]。骨是一种代谢活跃的组织, 有多种细胞参与骨代谢, 而成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收之间失衡将导致骨稳态失调并引发骨质疏松症^[2]。在骨质疏松症中, 骨微观结构被破坏、骨脆性增加、骨量减少, 与成骨细胞的数量与活性降低有着密切的关系^[3]。

近年来研究表明, 线粒体稳态对成骨细胞的

增殖、分化和凋亡均具有重要的调控作用。本文综述了线粒体对骨质疏松症中成骨细胞功能的作用和相关机制, 同时总结了以线粒体为靶点治疗骨质疏松的相关药物, 为进一步开发抗骨质疏松治疗药物提供潜在方向。

1 线粒体功能对成骨细胞的影响

1.1 线粒体能量代谢

线粒体的主要功能是通过三羧酸循环 (TCA cycle) 和氧化磷酸化 (OxPhos) 产生腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP)^[4]。ATP 为生物体最直接的能源,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81971017)。

作者简介: 于子轩, 女, 硕士研究生, 主要从事骨质疏松等代谢疾病研究, email: yuzixuan823@163.com *通信作者: 于永生, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病、脂肪肝等代谢疾病的机制研究, email: yuyongsheng@shu.edu.cn

由腺嘌呤、核糖和 3 个磷酸基团连接而成, 供能时最后一个磷酸基团水解, 生成腺苷二磷酸 (ADP) 和大量能量。

维持稳定的骨代谢需要不同种类细胞的共同作用, 其中骨的形成依赖于成骨细胞的数量与活性, 需要供应大量的生物能量。生物能源 ATP 是成骨细胞生成即间充质干细胞 (MSC) 成骨分化过程所必需的, ATP 可以提供能量, 通过 P2X7 途径刺激成骨细胞分化^[5], 所以线粒体能量代谢作用对成骨细胞的数量变化至关重要。MSC 主要依靠糖酵解方式获能, 而 MSC 分化为成骨细胞及成骨细胞本身主要通过线粒体氧化磷酸化方式获能, 即 MSC 进行成骨分化时会上调线粒体 OxPhos^[6]。有研究显示, 在开始成骨诱导后, 耗氧量高度增加, 说明细胞成骨分化过程需要强大的耗氧量, 并由线粒体进行能量供应, 而且随着细胞耗氧量与 ATP 的不断升高将会抑制线粒体功能进而阻碍成骨分化^[7]。有研究利用草氨酸盐, 作为乳酸脱氢酶 (LDH) 抑制剂抑制糖酵解供能, 将能量代谢从糖酵解转移到 OxPhos, 促进成骨细胞的生成, 而不影响骨吸收^[8]。所以, 线粒体的 OxPhos 对成骨细胞分化具有重要作用。

1.2 线粒体活性氧 (mtROS) 与氧化应激

在骨质疏松症中成骨细胞不仅数量会下降, 其氧化应激水平也会升高^[9]。氧化应激是由于过量活性氧 (ROS) 的产生或者抗氧化应激防御系统受损^[10]。

而线粒体是细胞中 ROS 的主要来源和靶标^[11]。线粒体进行 OxPhos 产生 ATP 供能时, ROS 就是该过程的副产物。研究表明 mtROS 的增加是由于电子传递链中电子的异常逃逸, 并与氧化应激条件下破骨细胞与成骨细胞之间作用不平衡有关^[12]。ROS 诱导线粒体损伤也是 MSC 成骨分化障碍的主要原因^[13]。在 MSC 成骨分化时随着线粒体 OxPhos 的上调, 产生了大量的 ROS, 但同时线粒体的抗氧化功能也会被激活以防止 ROS 积累^[14]。而且外源性 H₂O₂ 刺激也可以降低碱性磷酸酶 (ALP) 活性、阻碍成骨分化^[15]。

Cai 等^[16]研究发现, 在骨质疏松条件下, 骨髓中的巨噬细胞处于炎症激活状态即 M1 样巨噬细胞比例增加, 并通过隧道纳米管 (TNT)、微囊泡 (MV) 等膜转移方式或以游离线粒体形式增加向 MSC 的氧化损伤线粒体的转移, 诱导 MSC 中线粒体功能的改变, 比如 ROS 增加以及线粒体膜电位降低, 增加 MSC 的细胞凋亡, 进而抑制细胞成骨分化。

同样, 线粒体抗氧化功能异常也会导致成

骨细胞生成障碍。线粒体中的超氧化物歧化酶 (SOD) 就可以通过歧化反应清除不断产生的自由基而保护机体组织^[17]。有研究表明在卵巢切除术后, SOD 等抗氧化酶与 ROS 之间平衡被打破, 过度的氧化应激抑制 SOD, 导致 ROS 积累更多^[18]。使用 SOD2 缺乏的成骨细胞谱系的小鼠模型, 发现成骨细胞培养物中碱性磷酸酶 (ALP) 染色、Von Kossa 和茜素红染色均减少, 而衰老相关分泌表型 (SASP) 因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素 2 (IL-2) 上调, 间充质骨祖细胞培养物中脂肪生成较高, 说明线粒体抗氧化功能的降低促使成骨细胞活性降低和衰老, 从而抑制成骨分化^[19]。

1.3 线粒体自噬

线粒体自噬这个概念最初由 Lemasters^[20] 在 2005 年提出, 即线粒体的选择性自噬。线粒体自噬是正常的生理活动, 在特定条件或病理状态下也可加速进行^[21]。线粒体作为在细胞中至关重要的细胞器, 在 ROS 刺激、营养缺乏、细胞衰老等因素下线粒体也容易受损, 此时细胞会利用自噬机制选择性包裹与降解受损或者功能障碍的线粒体来维持线粒体和细胞稳态。目前发现的线粒体自噬分成两类: 泛素依赖性途径和泛素非依赖性途径^[22]。

泛素依赖性途径中磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN) 诱导的激酶 1 (PINK1) /Parkin 途径的研究最广泛。PINK1 是一种半衰期短的线粒体蛋白, 正常生理状态下, 因其不断转移到线粒体内膜后并被清除导致表达量低而检测不到^[23], 但当线粒体膜电位受损时, PINK1 转移内膜路径被阻断从而在线粒体外膜堆积。Parkin 是一种 E3 泛素连接酶, 在线粒体损伤后空间构象改变形成活化的 E3 泛素连接酶^[24]。

Lee 等^[25]研究发现, 在 PINK1 基因缺失的卵巢切除小鼠中成骨细胞数量显著减少, 一系列成骨标志物如 ALP、骨唾液蛋白 (BSP)、骨钙素 (OCN) 和骨桥蛋白 (OPN) 的表达也明显降低, 说明 PINK1 的存在能促进成骨细胞的增殖分化。还发现由于 PINK1 的低表达导致线粒体稳态受损、功能障碍而产生了过量的 ROS, 从而对成骨细胞分化产生了抑制。这些结果表明 PINK1 缺乏引起线粒体自噬功能障碍致使成骨细胞不能正常分化, 进而促进骨质疏松症疾病的进展。

1.4 线粒体与相关信号通路

1.4.1 PI3K/AKT 信号通路 PI3K/AKT 信号通路是细胞中调节细胞生长、增殖、代谢和存活的核心信号通路之一^[26]。PI3K/AKT 信号通路激活后,

成骨细胞的凋亡减少^[27], 增殖增加^[28]; 成骨细胞分化标志物 ALP、骨形态发生蛋白 (BMP) -2 和 OPN 的表达均增加^[29]。

PI3K/AKT 信号通路参与调控线粒体功能, 包括线粒体的生物合成、线粒体的自噬与线粒体途径凋亡^[17]。AKT 在线粒体中具有多个磷酸化靶点^[30]。并且 AKT 所介导的线粒体靶标的磷酸化被证明能够刺激线粒体 OxPhos 活性^[31]。在成骨细胞分化过程中线粒体的激活是 AKT 依赖性的; 利用骨诱导剂 Wnt3a 和 BMP2 的骨诱导过程中通过激活 AKT 促进线粒体的生物合成, 最终促进成骨细胞分化^[32]。而抑制成骨细胞 PI3K/AKT 信号通路对线粒体功能造成损伤, 线粒体损伤在细胞水平上的表现为呼吸 III 态 (R3)、呼吸控制率 (RCR)、磷氧比值 (P/O) 含量均降低, 呼吸 IV 态 (R4) 升高^[33]。

1.4.2 MAPK 信号通路 MAPK 信号通路与骨代谢密切相关, 参与成骨细胞的增殖、分化和细胞凋亡过程, 研究发现 MAPK 的激活介导了由 H₂O₂ 诱导的成骨细胞凋亡^[34]。

线粒体可通过轻度诱导线粒体 ATP 敏感性钾通道 (mitoKATP) 开放, 导致短暂的 mtROS 爆发, 激活 MAPK。而 MAPK 可以调节线粒体的代谢和功能。MAPK 激活参与线粒体膜通道孔 (mPTP) 的开放, 导致线粒体功能障碍^[35]。MAPK 可以直接与线粒体外膜相互作用, 并且还可以易位到线粒体中, 磷酸化线粒体抗凋亡蛋白 Bcl-xL, 调节细胞的凋亡^[36]。MAPK 通过调控 ROS 和钙信号传导从而影响线粒体所介导的细胞存活和死亡, 对线粒体造成间接影响^[37]。

1.4.3 Wnt/ β -catenin 信号通路 Wnt/ β -catenin 信号通路作为经典 Wnt 转导途径, 是控制骨形成的重要通路, 可以介导骨量的增加和骨重塑的维持^[38]。研究显示, 可利用 Wnt/ β -catenin 信号通路来调节脂肪来源的干细胞, 使其向成骨细胞分化^[39]。成骨细胞中 β -catenin 的稳定性增加已被证明可以增加骨量, 而稳定性降低会导致骨量减少^[40]。

当 MSC 成骨分化时线粒体上调 OxPhos; 同时研究发现上调线粒体 OxPhos 能够通过产生乙酰辅酶 A 转移到胞质后刺激 β -catenin 信号通路, 促进 β -catenin 的乙酰化和活化, 从而有助于成骨细胞分化。OxPhos 抑制剂在降低 MSC 样 C3H10T1/2 细胞的成骨潜力的同时, ATP 水平并没有下降, 说明线粒体通过其他机制继续支持成骨细胞分化^[41]。

2 靶向线粒体的相关抗骨质疏松药物的开发

2.1 LDH 抑制剂类

草氨酸钠 (OXA) 是一种 LDH 小分子抑制剂, 被证明可作为安全有效的骨合成代谢剂, 作

为糖酵解抑制剂在体内促使细胞生物能量从糖酵解转变为 OxPhos, 治疗结果显示小鼠骨矿物质密度 (BMD) 增加并无任何毒性迹象, 刺激成骨细胞的骨形成活性而不影响骨吸收^[8]。即 OXA 通过促进线粒体以 OxPhos 供能从而促进成骨细胞分化。考虑使用其他 LDH 抑制剂 (如 N-羟基吡啶、棉酚) 或者联合治疗, 利用促能量转变作为治疗骨质疏松症的潜在策略。

2.2 蒽醌类

在影响线粒体抗氧化功能方面, 如线粒体靶向的抗氧化剂米托醌 (MitoQ) 和哌啶-氮氧化物 (Mito Tempo)。MitoQ 和 Mito Tempo 通过脂肪族碳链共价附着在亲脂性三苯基磷阳离子上从而靶向线粒体, 发挥抗氧化作用, 能够防止脂质过氧化和让线粒体免受氧化损伤, 避免线粒体损伤导致的成骨细胞功能受损^[42-43]。

2.3 激素类

鸢尾素是一种运动诱导型的肌肉因子, 为蛋白质激素, 可以参与骨代谢的调节。研究发现, 鸢尾素通过激活 SIRT3 途径, 降低线粒体膜电位、细胞内 ROS 水平、线粒体氧化应激、异常线粒体自噬, 调节 ATP 生成、复合物 I 和 IV 活性、线粒体生物发生, 可以改善线粒体功能障碍、增加细胞活力和促进成骨^[44]。

2.4 二甲双胍

二甲双胍是一种治疗 2 型糖尿病的药物, 可以缓解过度氧化、抑制 H₂O₂ 和修复损伤的线粒体, 能通过 PI3K/AKT 信号通路上调 SIRT3 的表达, 进而抑制成骨细胞的凋亡, 是治疗骨质疏松的有效药物^[45]。也有研究结果显示二甲双胍通过作用于细胞膜受体 EGFR 促进 GSK-3 β 磷酸化, 从而抑制 mPTP 开放, 降低胞内钙离子浓度, 减弱由氧化应激诱导的成骨细胞凋亡^[46]。

2.5 醌类

Su 等^[47] 发现维生素 K₂ 能通过激活 AMPK-SIRT1 途径改善线粒体的功能。维生素 K₂ 也被证明能够上调 LC3-II、PINK1 和 Parkin, 恢复线粒体活性, 增强线粒体自噬, 促进成骨细胞的存活^[48]。

2.6 有机硫化化合物类

研究发现大蒜素可以通过激活 PI3K/AKT 和 CREB/ERK 信号, 抑制氧化应激诱导的成骨细胞凋亡, 改善线粒体功能, 有益于骨质疏松的治疗^[49]。

2.7 酯类

雷帕霉素 (RAPA) 为大环内酯类免疫抑制剂, 也是一种自噬诱导剂、mTOR 抑制剂, 被证明能够激活线粒体自噬, 降低 ROS 的水平以及 p53 的表达, 从而促使线粒体更新和质量稳定,

具有增加成骨、减少脂肪生成、减缓衰老和促进增殖的作用^[50-51]。

2.8 中药及天然化合物

Kwan 等^[52]对当归补血汤(含黄芪和当归)进行研究,发现该传统中药汤剂可使线粒体形态学发生变化,线粒体长度、嵴面积、总线粒体面积和线粒体面积均增加,并且增强线粒体的能量,ATP 产生显著增加,从而改善骨疾病的成骨细胞的代谢,即当归补血汤的促成骨作用与其对线粒体功能的有益作用密切相关。

很多天然化合物也被证明可以调节线粒体代谢,如染料木黄酮是一种植物雌激素异黄酮,在各种食物和传统草药中广泛存在,在人骨肉瘤细胞 U-2 OS 细胞中进一步证实了染料木黄酮可选择性触发细胞质中的雌激素受体- α (ER α) 易位至线粒体并表达,使成骨细胞中线粒体细胞色素 c 氧化酶 (COX) I 和 II mRNAs 表达升高,诱导 ATP 合成相关基因的表达,改善能量代谢和促进成骨细胞活化^[53]。

羟基酪醇是一种存在于橄榄油中的天然酚类化合物,可改善自由基稳定性,抑制 ERK 和 JNK 信号通路的激活,具有抗氧化和保护线粒体的作用,能够促进骨形成。Zhang 等^[54]用不同浓度的 H₂O₂ 建立氧化损伤模型,发现羟基酪醇显著降低了 H₂O₂ 诱导的成骨细胞凋亡并能够预防 H₂O₂ 诱导的线粒体功能障碍。

原花青素是指一类多酚类黄酮化合物,是植物来源的抗氧化剂。Chen 等^[55]研究发现原花青素通过激活 Nrf2 途径对成骨细胞进行保护,低剂量的原花青素还可以抑制氧化应激、细胞凋亡和

改善线粒体功能障碍。原花青素促进 Nrf2 核易位并上调成骨细胞中抗氧化酶表达,降低了 ROS 积累和线粒体超氧化物水平,增强成骨细胞功能并具有一定抗凋亡作用。还有研究发现原花青素可以显著提高成骨细胞线粒体膜电位水平和呼吸链复合物 IV 的活性^[56]。

白藜芦醇是一种在红葡萄酒中发现的天然多酚,以植物雌激素和抗氧化特性被熟知^[57]。分子上作为蛋白质脱乙酰化酶 sirtuin1 (SIRT1) 激活剂^[58]。白藜芦醇还可以促进腺苷 5'-单磷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 的活性,同时改善了线粒体功能^[59]。有研究显示,白藜芦醇通过丝裂蛋白介导而改善干细胞衰老线粒体功能^[60]。白藜芦醇还被证明可以增加骨膜来源的 MSC (PO-MSCs) 成骨分化中的 ALP 活性、上调线粒体生物发生^[61]。白藜芦醇可增强线粒体功能和线粒体自噬。

Ferutinin 是一种天然的非甾体植物雌激素,也是一种雌激素受体激动剂,可降低氧化应激水平,还能提高 PINK1 和 Parkin 的表达,促进线粒体自噬和成骨细胞的分化^[62]。

异牡荆素也可以通过脂联素受体 (AdipoR) 选择性地诱导成骨细胞的分化,还通过重新编程线粒体呼吸来介导这种效应,并可以增强线粒体的数量和功能,增加 ATP 的产生,可作为一类新的骨合成代谢药物候选^[63]。

上述研究证实,线粒体功能对促进成骨细胞增殖分化和减少凋亡具有重要作用,从而成为治疗骨质疏松症的关键靶点。以线粒体为靶点的相关抗骨质疏松药物的开发总结见表 1。

表 1 靶向线粒体的药物

Tab 1 Drugs targeting to mitochondria

分类	药物	靶向线粒体的作用	文献
LDH 抑制剂类	草氨酸钠	改变线粒体能量代谢	[8]
萘醌类	MitoQ、Mito Tempo	防止线粒体氧化损伤	[42-43]
激素类	鸢尾素	多重调节和改善线粒体功能	[44]
二甲双胍	二甲双胍	缓解线粒体过度氧化	[45]
醌类	维生素 K ₂	增强线粒体活性和线粒体自噬	[46]
有机硫化物类	大蒜素	抑制线粒体氧化应激	[47]
酯类	雷帕霉素	激活线粒体自噬	[48]
中药及天然化合物	当归补血汤(含黄芪和当归)、染料木黄酮、羟基酪醇、原花青素、白藜芦醇、Ferutinin、异牡荆素	增强线粒体功能、调节线粒体代谢、抗氧化、增强线粒体自噬、促进线粒体生物发生	[49-60]

3 总结

本文综述了线粒体功能对成骨细胞功能的影响,主要是线粒体能量代谢、抗氧化作用、线粒体自噬和相关信号通路,并介绍了目前现有线粒体靶向治疗药物在骨质疏松中的临床前研究。通过对线粒体在成骨细胞增殖、分化、凋亡过程中的影响研究,可以更好地理解线粒体功能在骨质

疏松中的重要作用。线粒体作为潜在的靶标,为治疗骨质疏松症的药物研发提供了一条新策略。目前以线粒体稳态为靶标治疗骨质疏松症的药物的相关成果较多,显示了良好的开发前景。在未来的研究中,利用中药等天然物质靶向线粒体功能治疗骨质疏松具有很大潜力,并将影响成骨细胞增殖、分化、凋亡的线粒体稳态与一系列信号

通路调节、能量代谢、应激反应等包容在一个统一的体系中,从而更好更全面地理解线粒体在骨质疏松发生发展过程中的作用和角色。

参考文献

- [1] Liu YY, Birsoy K. Metabolic sensing and control in mitochondria [J]. *Mol Cell*, 2023, 83 (6): 877-889.
- [2] Zhu Q, Fu YS, Cui CP, et al. OTUB1 promotes osteoblastic bone formation through stabilizing FGFR2 [J]. *Signal Transduct Tar*, 2023, 8 (1): 142.
- [3] Li J, Lu LY, Liu Y, et al. Bone marrow adiposity during pathologic bone loss: molecular mechanisms underlying the cellular events [J]. *J Mol Med*, 2022, 100 (2): 167-183.
- [4] Collier JJ, Olahova M, McWilliams TG, et al. Mitochondrial signalling and homeostasis: from cell biology to neurological disease [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46 (2): 137-152.
- [5] Chen MH, Li MH, Wei YJ, et al. ROS-activatable biomimetic interface mediates in-situ bioenergetic remodeling of osteogenic cells for osteoporotic bone repair [J]. *Biomaterials*, 2022, 291: 121878.
- [6] Jorgensen C, Khoury M. Musculoskeletal progenitor/stromal cell-derived mitochondria modulate cell differentiation and therapeutical function [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 606781.
- [7] Gao J, Feng ZH, Wang XQ, et al. SIRT3/SOD2 maintains osteoblast differentiation and bone formation by regulating mitochondrial stress [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25 (2): 229-240.
- [8] Hollenberg AM, Smith CO, Shum LC, et al. Lactate dehydrogenase inhibition with oxamate exerts bone anabolic effect [J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35 (12): 2432-2443.
- [9] Rached MT, Kode A, Xu LL, et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts [J]. *Cell Metab*, 2010, 11 (2): 147-160.
- [10] Zhao FL, Guo LJ, Wang XF, et al. Correlation of oxidative stress-related biomarkers with postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arch Osteoporos*, 2021, 16 (1): 4.
- [11] Ramirez S, Gomez-valades AG, Schneeberger M, et al. Mitochondrial dynamics mediated by mitofusin 1 is required for POMC neuron glucose-sensing and insulin release control [J]. *Cell Metab*, 2017, 25 (6): 1390-1399. e6.
- [12] Callaway DA, Jiang JX. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases [J]. *J Bone Miner Metab*, 2015, 33 (4): 359-370.
- [13] Cheng DB, Zhang XH, Gao YJ, et al. Endogenous reactive oxygen species-triggered morphology transformation for enhanced cooperative interaction with mitochondria [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141 (18): 7235-7239.
- [14] Morganti C, Cabezas-wallscheid N, Ito K. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells [J]. *Hemisphere*, 2022, 6 (7): e740.
- [15] Lee DH, Lim BS, Lee YK, et al. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2006, 22 (1): 39-46.
- [16] Cai WJ, Zhang JL, Yu YQ, et al. Mitochondrial transfer regulates cell fate through metabolic remodeling in osteoporosis [J]. *Adv Sci*, 2023, 10 (4): e2204871.
- [17] 胡晓青, 于慧美, 沈璐妍, 等. PI3K/AKT/mTOR 信号通路及线粒体稳态在疾病治疗中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37 (11): 2072-2076.
- [18] Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 360 (1-2): 81-86.
- [19] Schoppa AM, Chen XQ, Ramge JM, et al. Osteoblast lineage Sod2 deficiency leads to an osteoporosis-like phenotype in mice [J]. *Dis Model Mech*, 2022, 15 (5): dmm049392.
- [20] Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *Rejuv Res*, 2005, 8 (1): 3-5.
- [21] Wang S, Deng ZT, Ma YC, et al. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16 (14): 2675-2691.
- [22] Lu YY, Li ZJ, Zhang SQ, et al. Cellular mitophagy: mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation [J]. *Theranostics*, 2023, 13 (2): 736-766.
- [23] Deas E, Plun-favreau H, Gandhi S, et al. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20 (5): 867-879.
- [24] Riley BE, Loughheed JC, Callaway K, et al. Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1982.
- [25] Lee SY, An HJ, Kim JM, et al. PINK1 deficiency impairs osteoblast differentiation through aberrant mitochondrial homeostasis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12 (1): 589.
- [26] Yang J, Nie J, Ma XL, et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18 (1): 26.
- [27] Yamazaki M, Fukushima H, Shin M, et al. Tumor necrosis factor alpha represses bone morphogenetic protein (BMP) signaling by interfering with the DNA binding of Smads through the activation of NF-kappaB [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (51): 35987-35995.
- [28] Case N, Ma M, Sen B, et al. Beta-catenin levels influ-

- ence rapid mechanical responses in osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (43): 29196-29205.
- [29] Wu CM, Chen PC, Li TM, et al. Si-Wu-tang extract stimulates bone formation through PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathways in osteoblasts [J]. *Bmc Complem Altern M*, 2013, 13: 277.
- [30] Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of AKT in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation [J]. *J Neurochem*, 2003, 87 (6): 1427-1435.
- [31] Chen YH, Su CC, Deng W, et al. Mitochondrial AKT signaling modulated reprogramming of somatic cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 9919.
- [32] Smith CO, Eliseev RA. Energy metabolism during osteogenic differentiation: the role of AKT [J]. *Stem Cells Dev*, 2021, 30 (3): 149-162.
- [33] 张森, 林伟. 靶向 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对成骨细胞自噬及线粒体功能的影响 [J]. *福建医药杂志*, 2019, 41 (2): 129-131.
- [34] Park BG, Yoo CI, Kim HT, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells [J]. *Toxicology*, 2005, 215 (1): 115-125.
- [35] Javadov S, Jang S, Agostini B. Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2014, 144 (2): 202-225.
- [36] Ballard-croft C, Kristo G, Yoshimura Y, et al. Acute adenosine preconditioning is mediated by p38 MAPK activation in discrete subcellular compartments [J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2005, 288 (3): H1359-1366.
- [37] Wall JA, Wei J, Ly M, et al. Alterations in oxidative phosphorylation complex proteins in the hearts of transgenic mice that overexpress the p38 MAP kinase activator, MAP kinase kinase 6 [J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2006, 291 (5): H2462-2472.
- [38] Oh WT, Yang YS, Xie J, et al. WNT-modulating gene silencers as a gene therapy for osteoporosis, bone fracture, and critical-sized bone defects [J]. *Mol Ther*, 2023, 31 (2): 435-453.
- [39] Bandara N, Gurusinghe S, Lim SY, et al. Molecular control of nitric oxide synthesis through eNOS and caveolin-1 interaction regulates osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells by modulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7 (1): 182.
- [40] Glass DA, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation [J]. *Dev Cell*, 2005, 8 (5): 751-764.
- [41] Shares BH, Busch M, White N, et al. Active mitochondria support osteogenic differentiation by stimulating β -catenin acetylation [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293 (41): 16019-16027.
- [42] Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (7): 4588-4596.
- [43] Dessolin J, Schuler M, Quinart A, et al. Selective targeting of synthetic antioxidants to mitochondria: towards a mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases? [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 447 (2-3): 155-161.
- [44] Li GY, Jian ZX, Wang H, et al. Irisin promotes osteogenesis by modulating oxidative stress and mitophagy through SIRT3 signaling under diabetic conditions [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 2022: 3319056.
- [45] Yang KD, Pei L, Zhou SM, et al. Metformin attenuates H₂O₂-induced osteoblast apoptosis by regulating SIRT3 via the PI3K/AKT pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22 (5): 1316.
- [46] Cao FM, Yang KD, Qiu S, et al. Metformin reverses oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in preosteoblasts via the EGFR/GSK3 β /calcium pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 51 (4): 36.
- [47] Su XN, Wang WC, Fang CW, et al. Vitamin K₂ alleviates insulin resistance in skeletal muscle by improving mitochondrial function via SIRT1 signaling [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2021, 34 (2): 99-117.
- [48] Chen L, Shi X, Weng SJ, et al. Vitamin K₂ can rescue the dexamethasone-induced downregulation of osteoblast autophagy and mitophagy thereby restoring osteoblast function in vitro and in vivo [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1209.
- [49] Ding GL, Zhao JQ, Jiang DM. Allicin inhibits oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by promoting PI3K/AKT and CREB/ERK signaling in osteoblast cells [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11 (6): 2553-2560.
- [50] Ma Y, Qi M, An Y, et al. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging [J]. *Aging Cell*, 2018, 17 (1): e12709.
- [51] Luo D, Ren H, Li T, et al. Rapamycin reduces severity of senile osteoporosis by activating osteocyte autophagy [J]. *Osteoporosis Int*, 2016, 27 (3): 1093-1101.
- [52] Kwan KKL, Dong TTX, Tsim KWK. Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction containing Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix, improves mitochondrial bioenergetics in osteoblast [J]. *Phytomedicine*, 2021, 88: 153605.
- [53] Wu GJ, Chergn YG, Chen JT, et al. Genistein triggers translocation of estrogen receptor-alpha in mitochondria to induce expressions of ATP synthesis-associated genes and improves energy production and osteoblast maturation [J]. *Am J Chinese Med*, 2021, 49 (4): 901-923.
- [54] Zhang XR, Jiang Y, Mao JJ, et al. Hydroxytyrosol prevents periodontitis-induced bone loss by regulating mitochondrial function and mitogen-activated protein kinase signaling of bone cells [J]. *Free Radical Bio Med*, 2021, 176: 298-311.

- [55] Chen L, Hu SL, Xie J, et al. Proanthocyanidins-mediated Nrf2 activation ameliorates glucocorticoid-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in osteoblasts [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9102012.
- [56] Zhang ZF, Zheng LG, Zhao ZQ, et al. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction [J]. *J Toxicol Sci*, 2014, 39 (5): 803-813.
- [57] Zhao L, Wang Y, Wang ZJ, et al. Effects of dietary resveratrol on excess-iron-induced bone loss via antioxidative character [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26 (11): 1174-1182.
- [58] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan [J]. *Nature*, 2003, 425 (6954): 191-196.
- [59] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet [J]. *Nature*, 2006, 444 (7117): 337-342.
- [60] Lv YJ, Yang Y, Sui BD, et al. Resveratrol counteracts bone loss via mitofilin-mediated osteogenic improvement of mesenchymal stem cells in senescence-accelerated mice [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (9): 2387-2406.
- [61] Moon DK, Kim BG, Lee AR, et al. Resveratrol can enhance osteogenic differentiation and mitochondrial biogenesis from human periosteum-derived mesenchymal stem cells [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15 (1): 203.
- [62] Maity J, Barthels D, Sarkar J, et al. Ferutinin induces osteoblast differentiation of DPSCs via induction of KLF2 and autophagy/mitophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (5): 452.
- [63] Pal S, Singh M, Porwal K, et al. Adiponectin receptors by increasing mitochondrial biogenesis and respiration promote osteoblast differentiation: discovery of isovitexin as a new class of small molecule adiponectin receptor modulator with potential osteoanabolic function [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2021, 913: 174634.

(收稿日期: 2023-06-22; 修回日期: 2023-09-20)

溃疡性结肠炎中线粒体功能障碍的产生及机制研究进展

马玉林, 李铁军* (上海大学医学院, 上海 200444)

摘要: 溃疡性结肠炎是一种慢性炎症性肠道疾病, 以结肠黏膜的溃疡和炎症为主要特征。线粒体作为细胞内的主要能量供应器, 不仅产生三磷酸腺苷, 还参与细胞代谢调节、氧化还原平衡维持以及细胞死亡调控等过程。近年研究揭示线粒体在溃疡性结肠炎发展中的关键作用。在溃疡性结肠炎中, 线粒体功能多方面受损, 如线粒体氧化呼吸链异常、活性氧水平增加、线粒体 DNA 异常与线粒体自噬紊乱等, 进一步恶化了肠道黏膜上皮细胞的损伤和炎症反应。本文全面梳理了溃疡性结肠炎中线粒体功能障碍的多个层面, 包括氧化呼吸链异常、活性氧水平升高、线粒体 DNA 损伤和自噬紊乱。通过深入探讨这些机制, 我们期望能更深入地理解线粒体功能障碍与溃疡性结肠炎之间的关系, 为疾病的发病机制提供新的认知, 并为溃疡性结肠炎的治疗开拓新的思路和策略。

关键词: 线粒体; 溃疡性结肠炎; 活性氧; 线粒体 DNA; 线粒体自噬

中图分类号: R574.62

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3115-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.003

Manifestation and mechanism of mitochondrial dysfunction in ulcerative colitis

MA Yu-lin, LI Tie-jun* (School of Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444)

Abstract: Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory bowel disease primarily characterized by ulceration and inflammation of the colon mucosa. Mitochondria, as the main energy suppliers within

基金项目: 2023 年上海大学医学院跨学科新医科研究生创新基金。

作者简介: 马玉林, 女, 硕士研究生, 主要从事药物作用机制研究, email: mayulin0512@163.com *通信作者: 李铁军, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物作用机制及靶点研究, email: ltj204@163.com

cells, are responsible for not only generating adenosine triphosphate (ATP) but also regulating cellular metabolism, maintaining redox balance, and controlling cell death. Recent research has unveiled the pivotal role of mitochondria in the development of UC. In the context of UC, mitochondrial function is impaired from multiple aspects, including abnormalities in the mitochondrial oxidative respiratory chain, increased levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial DNA anomalies and disturbance in mitochondrial autophagy. These factors collectively exacerbate the damage to intestinal mucosal epithelial cells and the ensuing inflammatory response. This article comprehensively delineates various dimensions of mitochondrial dysfunction in UC, including disruptions in the oxidative respiratory chain, elevated ROS levels, mitochondrial DNA damage, and autophagic irregularities. By delving into these mechanisms, we aim to better understand the intricate interplay between mitochondrial dysfunction and UC, thereby shedding new light on the pathogenesis of UC and innovative treatment strategies.

Key words: mitochondria; ulcerative colitis; reactive oxygen species; mitochondrial DNA; mitophagy

溃疡性结肠炎 (UC) 是一种以结肠黏膜连续性炎症为特征的慢性炎症性肠病^[1], 其发病率逐年上升^[2], 严重影响患者健康和生活质量。该病主要累及结肠黏膜和黏膜下组织^[3], 以结肠黏膜溃疡和炎症为主要特征, 发病涉及遗传、免疫、环境和肠道菌群紊乱等多种因素的相互作用^[4]。尽管 UC 的发病机制尚不完全清楚, 但近年来的研究表明, 线粒体可能在 UC 的发生和发展中起到重要作用^[5]。

线粒体作为细胞内的重要细胞器, 在细胞能量代谢和调控细胞生存与凋亡等重要过程中发挥着关键作用^[6]。研究表明胃肠道上皮细胞中的线粒体功能对于维持肠道健康至关重要。而在 UC 中, 线粒体的功能障碍与其病理变化具有显著的相关性^[7]。为进一步研究线粒体功能在 UC 中的作用机制, 从而为阐明其病理过程提供新的视角, 本文综述了线粒体在 UC 中的一系列功能障碍, 包括线粒体氧化呼吸链异常、活性氧 (ROS) 水平增加、线粒体 DNA (mtDNA) 异常及线粒体自噬紊乱, 以揭示其与 UC 发展的关联。

1 UC 中的线粒体功能障碍

线粒体作为细胞的能量中心, 扮演着关键的角色。通过氧化磷酸化过程, 线粒体将细胞内的有机物质转化为三磷酸腺苷 (ATP), 提供细胞所需的能量^[8]。线粒体产能这一过程涉及线粒体内的多个复杂的电子传递链和 ATP 合酶。线粒体产生的 ATP 不仅需满足基本的生理需求, 还参与细胞的各种代谢活动、细胞信号传导以及细胞功能的维持^[9]。除了产生细胞所需的能量外, 线粒体还参与许多生化反应, 其中之一是产生 ROS。在

正常的生理条件下, 细胞内会产生适量的 ROS, 这对于调节细胞信号传导、细胞凋亡和免疫反应等过程至关重要^[10]。另外, 线粒体有自己独特的 DNA, 其负责编码细胞能量产生相关的关键蛋白^[11]。与细胞核 DNA 相比, mtDNA 的复制和修复机制简单, 无保护性的蛋白质包裹, 容易损伤和突变。最后, 线粒体会通过一种细胞质解体过程, 清除受损或老化的线粒体来维持细胞的健康状态, 这个过程称为线粒体自噬^[12]。线粒体自噬可以清除受损的线粒体^[13], 减少线粒体释放的有害物质和损伤的 DNA, 减少线粒体功能障碍所致的细胞毒性并提高细胞存活率。

在 UC 患者中, 线粒体存在功能障碍。首先, 功能受损的线粒体呼吸链复合物导致能量代谢紊乱^[14], 使得肠道组织细胞能量不足, 影响黏膜屏障的修复, 从而加剧 UC 的溃疡和炎症进程。其次, 异常或受损的线粒体引发 ROS 水平上升, 成为影响肠道氧化应激的关键因素, 使 UC 患者肠道黏膜处于氧化应激状态, 加剧炎症反应和破坏肠道屏障功能^[15]。再次, UC 中的炎症反应、免疫异常及大量的 ROS 会引起线粒体 DNA 的损伤。该损伤及其释放作为损伤相关分子模式, 反过来加重线粒体功能障碍、结肠炎症和免疫反应^[16]。最后, 在 UC 中, 线粒体功能异常通常伴随着线粒体自噬紊乱, 即线粒体无法正常清除和修复^[17]。而这些异常的线粒体通过增加炎症因子的产生和炎症反应的持续性, 促使疾病进一步恶化 (见图 1)。

2 UC 中线粒体功能障碍的相关机制

2.1 线粒体氧化呼吸链异常

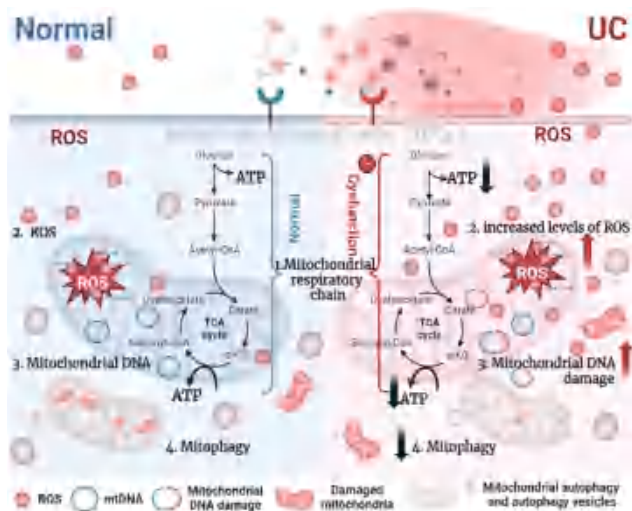


图 1 UC 中线粒体功能障碍的表现

Fig 1 Mitochondrial dysfunction in UC

注 (Note): 肠道内皮细胞 (intestinal endothelial cell, IEC); 线粒体 DNA (mitochondrial RNA, mtRNA)。

线粒体内膜上一系列氢载体和递电子体在内膜上有序地排列成相互关联的链状, 具有传递电子和质子的作用, 称为线粒体氧化呼吸链, 也称为电子传递链^[18], 是细胞内产生能量的主要通路。通过将电子从氧化底物 (如葡萄糖和脂肪酸) 转移到氧气上, 生成 ATP, 维持细胞的能量供应和正常代谢^[19]。氧化呼吸链由多个蛋白质复合物组成, 任何复合物的缺陷或功能异常都可能导致能量产生减少, 影响细胞正常功能。然而, 在 UC 中, 线粒体氧化呼吸链可能出现异常, 导致能量产生的紊乱。这种异常可能由多种因素引发, 包括线粒体内的基因突变、酶缺乏、膜电位降低以及 ROS 过度产生等。线粒体氧化呼吸链的异常导致 ATP 产生减少, 从而影响肠道细胞的功能和存活。此外, 异常的氧化呼吸链还可能增加 ROS 释放, 引发细胞内氧化应激, 加剧结肠肠道黏膜屏障的破坏和炎症反应。

在一项临床研究中, 涵盖 408 名成人及儿童的 UC 患者数据表明, 这些患者的线粒体基因组中参与调控 ATP 产生的基因数量显著减少, 线粒体产能出现明显障碍。此外, 对患者溃疡结肠部位的活检显示, 线粒体呼吸链复合物 I 的活性降低, 氧化磷酸化的限速步骤受到程度不一的限制, 线粒体膜电位也呈下降趋势^[20]。动物实验也验证了这一结果。在肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平增高的 TNF ^{Δ ARE} 小鼠模型中, 研究者发现其 ATP 的水平降低, 且该小鼠结肠炎的发生与结肠隐窝中的线粒体功能受损有关^[21]。

同时, 还有一些药物通过提高膜电位及线粒

体产能, 成功恢复了 UC 中的线粒体功能障碍, 从而发挥了保护及改善作用。Indoximod (IND) 是一种吡啶胺 2, 3- 双加氧酶 (IDO) 抑制剂, 主要用于癌症治疗^[22]。研究人员制备了 IND 纳米颗粒 (IND-NPs), 在细胞和动物模型中证实了其通过增加线粒体膜电位和 ATP 水平恢复葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的线粒体功能障碍^[23]。Yeganeh 等^[24] 评估了远端结肠中线粒体 ATP 浓度的变化, 发现与对照组相比, DSS 诱导的结肠炎小鼠的 ATP 水平下降, 但补充干苹果皮提取物减弱了这种下降的趋势。另外, Mancini 等^[25] 研究了一种名为 P110 的线粒体分裂抑制剂对线粒体生物能量产生的影响, 发现 DSS 会引起肠道内皮细胞 (intestinal epithelial cell, IEC) 的呼吸链受损, 但经 P110 处理后, 复合物 IV 的活性增加, 部分恢复了呼吸链的功能。

2.2 ROS 水平增加

线粒体所产生的 ROS 物质在 UC 的进程中具有关键的作用。ROS 是正常代谢过程中产生的副产物, 但当线粒体功能受损时, ROS 的产生会显著增加。过量的 ROS 可能引发氧化应激, 导致肠道组织氧化性损伤、炎症反应和细胞凋亡。这种氧化状态的失衡可能破坏肠道屏障功能, 进而促进肠道炎症的发展^[26]。

Santhanam 等^[27] 进行的临床研究表明, UC 中上皮细胞线粒体 ROS 的生成增加, 这会造成线粒体相关酶的缺陷。同样地, 动物实验也证明了线粒体产生 ROS 与 UC 的相关性。Ho 等^[28] 研究发现, 在 MDR1 缺乏的小鼠中, 该基因编码的 ATP 依赖性外排转运蛋白功能会丧失, 而这会进一步导致线粒体 ROS 增加, 进而引起结肠炎的恶化。同时结肠给予鱼藤酮 (线粒体电子传递链线粒体复合物 I 抑制剂) 也可增加线粒体 ROS 水平, 进而加速 DSS 诱导的急性结肠炎的发展。相反, 使用 MitoQ (一种线粒体抗氧化剂) 可以减轻模型中 UC 的相关症状。类似地, 在小鼠模型中, 研究证明敲除超氧化物歧化酶 2 (SOD2)^[28]、解偶联蛋白 2 (UCP2)^[29] 和即时早期反应基因 X-1 (IEEX-1)^[30] 等与调控 ROS 相关的基因, 使小鼠对结肠炎的易感性和严重程度增加。

研究发现, 针对线粒体 ROS 的治疗方法对缓解 UC 症状具有积极作用。使用抑制线粒体 ROS 产生的药物或线粒体抗氧化剂 (如五味子苷 B^[31]), 不仅降低了结肠炎在体内外模型中的炎症反应, 还能通过调节细胞焦亡、降低 ROS 的生成减轻其引发的线粒体损伤, 进而减弱结肠炎对上

皮细胞的损伤。Wang 等^[32]发现,在 UC 大鼠和 Caco-2 细胞实验模型中,用从培养的猴头菌菌丝中提取的多糖 EP-1 处理,在体内和体外均能提高 SOD 酶活性,降低 ROS 含量,减缓氧化损伤的程度。

最后,研究还对线粒体产生的 ROS 如何影响 UC 的发生和发展进行了深入探讨。线粒体 ROS 可以与铁结合产生自由基,从而破坏线粒体内的大分子并氧化线粒体 DNA。这些氧化损伤会促进炎症反应,比如激活 NLRP3 炎症小体^[33]。此外,线粒体 ROS 还可以促使受损的 mtDNA 从线粒体释放到细胞质中,而这正是 NLRP3 炎症小体激活所必需的一步^[34]。当线粒体吞噬失败时,产生 ROS 的线粒体可能会积累,进一步放大炎症反应。另外,Mills 等^[35]的研究证明,在脂多糖(LPS)的刺激下,巨噬细胞的代谢从氧化磷酸化产生 ATP 转变为糖酵解,增加了琥珀酸水平,琥珀酸脱氢酶(SDH)的增加会驱动线粒体中琥珀酸的氧化和线粒体膜电位的升高,进而共同促使线粒体 ROS 的产生。巨噬细胞激活后的代谢变化将线粒体从合成 ATP 模式转变为产生 ROS 模式,进一步促进持续的炎症状态发展。

2.3 mtDNA 异常

mtDNA 是线粒体内部负责编码蛋白质的关键分子,然而它容易受到各种内外因素的影响,可能导致其损伤和突变。这些突变可能引发线粒体功能异常,从而影响肠道上皮细胞的能量供应和代谢平衡,进而导致炎症反应加剧和肠道组织损伤。

临床观察显示在 UC 患者中存在 mtDNA 损伤。一项临床研究发现 UC 患者血浆中的 mtDNA 水平升高,且升高水平与疾病严重程度及活动性显著相关^[36]。UC 患者的肠道组织中常见 mtDNA 的结构缺陷和损伤,这些受损的 mtDNA 释放到细胞外,被识别为病原信号,激活炎症反应并引发免疫细胞活化,从而加剧 UC 的炎症反应和组织损伤。在动物实验中,基于线粒体功能障碍是炎症性肠病的触发因素之一,Verma 等^[37]研究了线粒体守门蛋白电压依赖阴离子通道 1 (VDAC1) 在胃肠道炎症中的作用,发现新开发的 VDAC1 相互作用分子 VBIT-12 在 DSS 或三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的小鼠 UC 模型中,抑制了 mtDNA 的释放、caspase-1 和 NLRP3 炎症小体的激活,并改善了 UC 小鼠体重减轻、腹泻、直肠出血等症状。

黄芩汤是一种在湿热性 UC 大鼠具有一定保

护作用的中药方剂。研究发现,黄芩汤能显著降低大鼠结肠上皮组织中的 mtDNA 含量,同时抑制 TLR4、p-PI3K 和 p-Akt 炎症信号通路的表达,从而改善肠上皮黏膜层状态,提升大鼠精神状态,改善毛发光泽度,减轻粪便隐血等 UC 症状^[38]。此外,Alattar 等^[39]的研究表明,从十字花科蔬菜中提取的天然化合物萝卜硫素通过增强抗氧化活性、促进线粒体生物发生和抑制 DNA 聚合等方式发挥了保护作用。

Marchi 等^[40]对受损 mtDNA 如何调控炎症进行了详尽的阐述和总结。研究表明,在 UC 中,mtDNA 可能通过多种途径影响炎症。其中之一是 B 淋巴细胞瘤-2 基因(BCL-2)、细胞凋亡调节剂(BAX)和 BCL-2 拮抗剂/杀伤因子 1 (BAK1) 孔或通过渗透性转换孔复合物(PTPC)离开线粒体,这可以有效激活环 GMP-AMP 合成酶(cGAS),进而诱导细胞因子合成,如干扰素- β 1 (IFN β 1)、白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)^[37]。此外,功能异常线粒体释放的 mtDNA 还可以促使 IL-1 β 和 IL-18 的分泌。

2.4 线粒体自噬紊乱

线粒体自噬在 UC 的发展中发挥着重要作用。UC 患者往往出现线粒体功能异常和线粒体的异常积累,而线粒体自噬作为一种通过清除受损线粒体以维持细胞健康的过程,显得至关重要。线粒体自噬失调可能引发异常的线粒体积累和炎症反应增加,从而进一步促进了 UC 的发展。

张盼^[41]的研究观察了 UC 患者结肠黏膜组织中线粒体的受损情况及线粒体自噬现象。发现与对照组相比,UC 组中的 PINK1、Parkin 的表达上调,但随着疾病严重程度的增加其上调程度逐渐下降。另外,在动物模型中也有相关研究探讨了线粒体自噬与 UC 的关系。Richter 等^[42]发现在肠道炎症中,内脏脂肪细胞的自噬水平上调,而脂肪细胞自噬基因 *Atg7* 的特异性缺失会加剧肠道炎症的发生。其他一些自噬相关基因(如 *Atg16L1*、*Atg7*、*Atg5*、*Irgm1*、*Lrrk2*、*Optn*、*VDR* 或 *Tfeb*) 缺失的小鼠模型也显示了自噬在杯状细胞和潘氏细胞中的重要性。这些自噬相关基因缺失的小鼠会导致炎症细胞因子过度产生、微生物清除能力减弱、抗菌肽分泌减少等功能缺陷,增加对结肠炎的易感性。

IECs 中 NLRP3 炎症小体的过度激活是 UC 严重炎症的主要原因之一。研究发现,在 UC 中,热休克转录因子 2 (HSF2) 调控的 HSP72 可以增强 Parkin 介导的线粒体吞噬,从而减少受损的线

粒体和线粒体来源的 ROS (mtROS) 的产生量, 进而调节 UC 中肠上皮细胞内 NLRP3 炎症小体的激活^[43]。

UC 患者的肠道组织中线粒体自噬的活性显著降低, 导致线粒体的异常积累和功能受损。恢复线粒体自噬可能有助于清除异常线粒体, 减少 ROS 的产生, 从而改善 UC 的病情。一些药物和治疗方法被证实可以通过调节线粒体自噬来改善 UC 的病情。忍冬苷是从金银花中分离得到的黄酮苷类化合物, 具有抗炎和免疫调节作用。

研究表明, 忍冬苷通过调节 EZH2/ATG5-自噬/NLRP3 炎症小体激活来减轻结肠炎^[44]。

3 讨论与展望

UC 是一种复杂的慢性炎症性肠病, 其发病机制尚未完全阐明。然而, 越来越多的研究表明, 线粒体功能障碍在 UC 的发生和发展中发挥着重要作用。本文通过系统性的文献综述, 探讨了线粒体在 UC 中的功能异常、ROS 的过量产生、线粒体 DNA 损伤以及线粒体自噬等因素在其发病机制中的关键作用 (见表 1)。

表 1 线粒体在 UC 中的作用文献证据
Tab 1 Documentary evidence for the effect of mitochondrion on UC

线粒体功能障碍类别	文献证据
线粒体氧化呼吸链异常	UC 患者的线粒体基因组中调控 ATP 产生的基因数量显著减少, 线粒体产能的功能出现明显障碍 UC 患者的线粒体呼吸链复合物 I 的活性降低, 氧化磷酸化受到限制, 线粒体膜电位降低 TNF- α 水平增高的小鼠中 ATP 的水平降低且该小鼠结肠炎的发生与结肠隐窝中的线粒体功能受损有关 IND、干苹果皮提取物、P110 等药物通过调整 ATP 水平、恢复线粒体氧化呼吸链异常等对 UC 发挥了保护作用
ROS 水平增加	UC 患者上皮细胞中的线粒体 ROS 的生成增加, 并进一步造成线粒体相关酶的缺陷 在小鼠中, MDR1 缺乏以及结肠给予鱼藤酮 (线粒体电子传递链线粒体复合物 I 抑制剂) 会引起线粒体活性氧增加, 进而导致结肠炎恶化, 而使用 MitoQ 可以减轻模型中 UC 的相关症状 在小鼠模型中, 通过基因敲除线粒体中调控 ROS 的蛋白, 如超氧化物歧化酶 2、解偶联蛋白 2 和即时早期反应基因 X-1, 使得小鼠对结肠炎的易感性和严重程度增加 五味子苷 B、EP-1 等药物可以通过降低 ROS 水平, 减弱氧化损伤, 对 UC 发挥保护作用
线粒体 DNA 异常	临床研究发现 UC 患者血浆中的线粒体 DNA 水平升高, 且其升高水平与疾病严重程度及活动性显著相关 新开发的 VDAC1 相互作用分子 VBIT-12 在小鼠 UC 模型中可以抑制线粒体 DNA 的释放、caspase-1 和 NLRP3 炎症小体的激活, 并改善了体重减轻、腹泻、直肠出血等症状 研究发现黄芩汤可以显著降低大鼠结肠上皮组织中的线粒体 DNA 含量, 改善 UC 的系列症状; 并且天然化合物萝卜硫素可以通过增强抗氧化活性、促进线粒体生物发生和抑制 DNA 聚合来发挥保护作用
线粒体自噬紊乱	UC 患者结肠黏膜组织中存在线粒体的破坏及线粒体自噬, 研究发现与对照组比, UC 组的 PINK1、Parkin 的表达上调 自噬相关基因缺失的小鼠会表现出炎症细胞因子过度产生、清除微生物能力减弱、抗菌肽分泌减少等功能缺陷, 进一步增加了对结肠炎的易感性 一些药物和治疗方法被证实可以通过调节线粒体自噬来改善 UC 的病情, 忍冬苷即可通过调节 EZH2/ATG5-自噬/NLRP3 炎症小体激活而发挥减轻结肠炎症状的作用

首先, 线粒体功能异常是 UC 患者肠道黏膜细胞能量代谢紊乱的一个主要特征。UC 患者结肠组织中的线粒体 ATP 水平明显降低, 可能与线粒体的氧化磷酸化功能受损有关。这种线粒体功能异常导致细胞能量供应不足, 进而影响肠道黏膜屏障的正常功能和修复, 使得黏膜易受损, 从而引发 UC 的炎症反应。这一现象提示, 通过改善线粒体的功能可能有助于减轻 UC 患者的症状。未来可以进一步探究线粒体功能恢复的方法, 例如开发针对线粒体功能的药物, 以及通过药物来调控与线粒体能量代谢相关的信号通路。

其次, 线粒体是细胞内产生反应性氧化物的主要场所, 线粒体产生的 ROS 在 UC 的发病机制中具有重要地位。ROS 是一类高度反应性的氧化分

子, 线粒体功能异常时, ROS 会显著增加, 过量的 ROS 会引发氧化应激, 导致细胞内的炎症反应和氧化损伤, 进一步加剧 UC 的病理过程。因此, 调控 ROS 的产生可能成为治疗 UC 的新策略。

此外, 线粒体 DNA 的损伤与 UC 的发展密切相关。线粒体 DNA 的损伤会作为一种损伤相关分子模式, 破坏线粒体的功能和稳定性, 进而影响肠道黏膜屏障的正常功能和修复。进一步研究 mtDNA 损伤的机制以及开发针对 mtDNA 损伤的保护策略, 可能为治疗 UC 提供新的方向。

最后, 线粒体自噬在 UC 中的作用尚需深入研究。线粒体自噬在调节线粒体数量和质量方面发挥重要作用, 它能通过清除受损线粒体来维持细胞健康, 可能对 UC 具有保护作用, 因此在

UC 的治疗中有潜在的应用前景。研究表明, 在患者的肠道组织中, 线粒体自噬程度明显降低。导致受损的线粒体未能及时清除和修复, 进一步加剧线粒体功能紊乱和氧化应激, 从而推动 UC 的进展^[45]。未来的研究可以探讨线粒体自噬的调节机制, 开发和筛选调控线粒体自噬的药物, 以及评估线粒体自噬在治疗 UC 中所发挥的作用。

尽管已经有很多提示线粒体氧化呼吸链异常、ROS 产生、线粒体 DNA 损伤和线粒体自噬与 UC 之间关系的研究, 但关于线粒体影响 UC 发生发展的具体机制以及不同线粒体功能异常之间如何相互影响和作用仍需进一步探索。线粒体作为 ATP 的主要来源对多个细胞内过程至关重要, 并在启动程序性细胞死亡中发挥重要作用。然而, 受损的线粒体会显著破坏细胞代谢稳态, 这进一步导致 ROS 过度生成和细胞死亡。ROS 的过度产生会引发氧化应激损伤, ROS 同样是线粒体自噬响应的刺激之一, 它可以引发线粒体自噬, 发挥一定的积极作用。线粒体自噬是一种保护作用, 其中受损的线粒体被溶酶体通过自噬过程选择性降解。在各种刺激包括缺氧、ROS 和呼吸链抑制剂的影响下, 线粒体自噬得以响应, 从而清除受损的线粒体, 维持线粒体功能稳态^[46]。以上矛盾的结果提示我们线粒体功能异常在 UC 中可能是复杂而多样的, 且线粒体氧化呼吸链异常、ROS 产生、线粒体 DNA 损伤和线粒体自噬这几种不同类型的功能异常在 UC 的发展中可能存在重要的相互影响, 未来需要更多的研究来进一步揭示其潜在机制。

总的来说, 深入理解线粒体功能障碍与 UC 之间的关系对于揭示 UC 的发病机制、寻找新的治疗靶点以及开发个体化的治疗策略具有重要意义。进一步研究线粒体功能在 UC 中的作用机制, 有望为阐明其病理过程提供新的视角, 并为未来开发针对线粒体的治疗策略提供基础。

参考文献

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10080): 1756-1770.
- [2] Eisenstein M. Ulcerative colitis: towards remission [J]. *Nature*, 2018, 563 (7730): S33.
- [3] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380 (9853): 1606-1619.
- [4] Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, et al. Ulcerative colitis [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2020, 6 (1): 74.
- [5] Ussakli CH, Ebaee A, Binkley J, et al. Mitochondria and tumor progression in ulcerative colitis [J]. *J Nat Cancer Ins*, 2013, 105 (16): 1239-1248.
- [6] Khan S, Basu S, Raj D, et al. Role of mitochondria in regulating immune response during bacterial infection [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2023, 374: 159-200.
- [7] Amorim JA, Coppotelli G, Rolo AP, et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18 (4): 243-258.
- [8] Alan L, Scorrano L. Shaping fuel utilization by mitochondria [J]. *Curr Biol*, 2022, 32 (12): R618-R623.
- [9] Bensinger R. Mitochondrial ATP synthesis [J]. *New Engl J Med*, 1967, 277 (6): 315.
- [10] Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis [J]. *Cell*, 2015, 163 (3): 560-569.
- [11] Roubicek DA, Souza-Pinto NC. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants [J]. *Toxicology*, 2017, 391: 100-108.
- [12] Terešák P, Lapao A, Subic N, et al. Regulation of PRKN-independent mitophagy [J]. *Autophagy*, 2022, 18 (1): 24-39.
- [13] Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2017, 120 (11): 1812-1824.
- [14] Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23 (2): 141-161.
- [15] Cha H, Lee S, Hwan Kim S, et al. Increased susceptibility of IDH2-deficient mice to dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 32-38.
- [16] Boyapati RK, Dorward DA, Tamborsk AA, et al. Mitochondrial DNA is a pro-inflammatory damage-associated molecular pattern released during active IBD [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24 (10): 2113-2122.
- [17] Foerster EG, Mukherjee T, Cabral-Fernandes L, et al. How autophagy controls the intestinal epithelial barrier [J]. *Autophagy*, 2022, 18 (1): 86-103.
- [18] Rich PR, Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain [J]. *Essays Biochem*, 2010, 47: 1-23.
- [19] Nolfi-Donagan D, Braganza A, SHIVA S. Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101674.
- [20] Haberman Y, Karns R, Dexheimer PJ, et al. Ulcerative colitis mucosal transcriptomes reveal mitochondriopathy and personalized mechanisms underlying disease severity and treatment response [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 38.
- [21] Khaloian S, Rath E, Hammoudi N, et al. Mitochondrial impairment drives intestinal stem cell transition into dysfunctional Paneth cells predicting Crohn's disease recurrence [J]. *Gut*, 2020, 69 (11): 1939-1951.
- [22] Zakharia Y, McWilliams RR, Rixe O, et al. Phase II trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus pembrolizumab for the treatment of patients with advanced melanoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9 (6): e002057.
- [23] Wu PY, Yao SY, Wang X, et al. Oral administration of nanoformulated indoximod ameliorates ulcerative colitis by promoting mitochondrial function and mucosal healing [J]. *Int J*

- Pharm, 2023, 637: 122813.
- [24] Yeganeh PR, Leahy J, Spahis S, et al. Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 57: 56-66.
- [25] Mancini NL, Goudie L, Xu W, et al. Perturbed mitochondrial dynamics is a novel feature of colitis that can be targeted to lessen disease [J]. *Cell Mol Gastroenter*, 2020, 10 (2): 287-307.
- [26] Lan A, Guerbette T, Andriamihaja M, et al. Mitochondrial remodeling and energy metabolism adaptations in colonic crypts during spontaneous epithelial repair after colitis induction in mice [J]. *Free Radical Biol Med*, 2023, 205: 224-233.
- [27] Santhanam S, Venkatraman A, Ramakrishna BS. Impairment of mitochondrial acetoacetyl CoA thiolase activity in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2007, 56 (11): 1543-1549.
- [28] Ho GT, Aird RE, Liu B, et al. MDR1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes intestinal inflammation [J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11 (1): 120-130.
- [29] Zhang H, Kuai XY, Yu P, et al. Protective role of uncoupling protein-2 against dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. *J Gastroen Hepatol*, 2012, 27 (3): 603-608.
- [30] Shen L, Zhi L, Hu W, et al. IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16 (4): 603-612.
- [31] Zhang WW, Wang WS, Shen CZ, et al. Network pharmacology for systematic understanding of Schisandrin B reduces the epithelial cells injury of colitis through regulating pyroptosis by AMPK/Nrf2/NLRP3 inflammasome [J]. *Aging*, 2021, 13 (19): 23193-23209.
- [32] Wang DD, Zhang YQ, Yang S, et al. A polysaccharide from cultured mycelium of *Hericium erinaceus* relieves ulcerative colitis by counteracting oxidative stress and improving mitochondrial function [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 572-579.
- [33] Shimada K, Crother TR, Karlin J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis [J]. *Immunity*, 2012, 36 (3): 401-414.
- [34] Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12 (3): 222-230.
- [35] Mills EL, Kelly B, Logan A, et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages [J]. *Cell*, 2016, 167 (2): 457-70. e13.
- [36] Boyapati RK, Dorward DA, Tamborska A, et al. Mitochondrial DNA is a pro-inflammatory damage-associated molecular pattern released during active IBD [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24 (10): 2113-2122.
- [37] Verma A, Pittala S, Alhozeel B, et al. The role of the mitochondrial protein VDAC1 in inflammatory bowel disease: a potential therapeutic target [J]. *Mol Ther*, 2022, 30 (2): 726-744.
- [38] Zheng YF, Liang CH, Li ZW, et al. Study on the mechanism of Huangqin decoction on rats with ulcerative colitis of damp-heat type base on mtDNA, TLR4, p-PI3K, p-Akt protein expression and microbiota [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 295: 115356.
- [39] Alattar A, Alshaman R, Al-Gayyar M M H. Therapeutic effects of sulforaphane in ulcerative colitis: effect on antioxidant activity, mitochondrial biogenesis and DNA polymerization [J]. *Redox Rep*, 2022, 27 (1): 128-138.
- [40] Marchi S, Guilbaud E, Tait SWG, et al. Mitochondrial control of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23 (3): 159-173.
- [41] 张盼. PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬在溃疡性结肠炎发病中的作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [42] Richter FC, Friedrich M, Kampschulte N, et al. Adipocyte autophagy limits gut inflammation by controlling oxylinpin and IL-10 [J]. *EMBO J*, 2023, 42 (6): e112202.
- [43] Liang H, Zhang FR, Wang W, et al. Heat shock transcription factor 2 promotes mitophagy of intestinal epithelial cells through PARL/PINK1/Parkin pathway in ulcerative colitis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 893426.
- [44] Lv Q, Xing Y, Liu J, et al. Lonicerin targets EZH2 to alleviate ulcerative colitis by autophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11 (9): 2880-2899.
- [45] Xu Y, Shen J, Ran ZH. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases [J]. *Autophagy*, 2020, 16 (1): 3-17.
- [46] Yao RQ, Ren C, Xia ZF, et al. Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles [J]. *Autophagy*, 2021, 17 (2): 385-401.

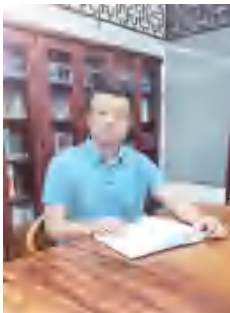
(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-10)

蒙药传统汤散剂剂型改良研究专题

【编者按】

蒙医药是我国四大民族药之一，理论基础独特，在制剂、炮制工艺上也有很强的民族特色。散剂是蒙药最常见的剂型，具有原材料廉价易得、制备简单、疗效好、吸收快的特点。但蒙药散剂主要是通过原药材打粉直接口服入药，因其具有味苦、对咽及食道有刺激、吞咽困难等缺点，导致患者依从性差，尤其不利于儿童患者用药。本项目对传统蒙药剂型进行优化，制备符合蒙医临床理论、便于随方调配的新型蒙药配方颗粒，对蒙药现代化发展具有重要意义。本专栏主要对蒙药有关制剂进行综述，报告蒙药配方颗粒的相关研究，旨在为传统蒙药制剂的优化改良提供参考。

【专题主持人简介】



张纯刚，男，博士，中医学博士后，辽宁中医药大学副教授，硕士研究生导师。主要研究方向为化药仿制药、改良型新药和创新新药、中药、民族药及保健品研发。主持国家自然科学基金、省级重点研发计划及各类基金 6 项。发表论文 60 余篇，其中 SCI 收录 16 篇。以第一发明人申请发明专利 15 项，授权 4 项（其中国际专利 2 项）。作为编委出版全国规划教材 7 部。第三届“中医药社杯”高等学校中药学类专业青年教师教学设计大赛三等奖；指导“创青春”辽宁省大学生创业大赛创业计划竞赛项目获得铜奖。入选辽宁省高层次人才，辽宁省“百千万人才工程”千层次，沈阳市高层次人才拔尖人才，沈阳市中青年科技创新人才，2022 年辽宁省首届优秀研究生导师团队等。

蒙药制剂研究进展

李佳¹，陶晓倩¹，韩子璇¹，杨立茹¹，刘梦¹，程岚¹，张纯刚^{1, 2, 3*} (1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116620; 2. 长治医学院药系，山西 长治 046000; 3. 祈蒙股份有限公司，内蒙古 赤峰 024330)

摘要：蒙药是我国传统医药学的重要组成部分，显著的临床疗效使其被大众所认同。然而，随着蒙药的不断发展，传统蒙药制剂服用不便，质量标准不完善等问题逐渐显露出来，应用药物制剂新技术对传统剂型进行改革极为必要。本文查阅了蒙药制剂的相关文献，对传统蒙药剂型进行总结，并对药物制剂新技术在蒙药中的应用情况以及蒙药制剂现存问题进行整理，以期对蒙药制剂现代化研究提供参考。

关键词：蒙药制剂；传统剂型；制剂新技术；质量问题

中图分类号：R29, R283 文献标识码：A 文章编号：1672-2981(2023)12-3122-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.004

Research progress in Mongolian medicine preparations

LI Jia¹, TAO Xiao-qian¹, HAN Zi-xuan¹, YANG Li-ru¹, LIU Meng¹, CHENG Lan¹, ZHANG Chun-gang^{1, 2, 3*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116620; 2. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000; 3. Qimeng Co., Ltd., Chifeng Inner Mongolia 024330)

基金项目：内蒙古自治区科技重大专项 (No.2021ZD0017)；沈阳市中青年科技创新人才项目 (No.RC200204)。

作者简介：李佳，女，硕士研究生，主要从事中药新剂型、新技术研究，email: 2272581747@qq.com *通信作者：张纯刚，男，硕士研究生导师，副教授，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究和保健食品开发研究，email: gaogaonii123@163.com

Abstract: Mongolian medicine is an important part of Chinese traditional medicine, and its remarkable clinical efficacy makes it highly recognized by the public. However, with the continuous development of Mongolian medicine, problems such as inconvenience in taking traditional Mongolian medicine preparations and quality standards errors have gradually emerged. It is extremely necessary to reform the traditional dosage form with the new technology of pharmaceutical preparation. This paper consulted related literatures of Mongolian medicine preparations, summarized the traditional Mongolian medicine dosage forms, and sorted out the application of new pharmaceutical preparation technology in Mongolian medicine and the existing problems to provide reference for the modernization of Mongolian medicine preparation.

Key words: Mongolian medicine preparation; traditional dosage form; new technology of preparation; quality problem

蒙医药作为我国传统医学的重要组成部分，已有 2000 多年的悠久历史，蒙药发展延续至今，为我国蒙古族人民的身体健康做出了巨大贡献。传统蒙药多为汤剂、散剂，虽疗效较好，制备简单，但其口感不佳、服药量大等问题严重降低了患者的顺应性。此外，随着蒙药质量标准的不断完善，蒙药传统制剂组方不统一、指标含量检测不全面、微生

物含量不达标等问题也逐渐显露出来。近年来蒙医开始对传统制剂进行改革，应用现代药物制剂新技术，将蒙药制备成剂量准确、疗效好、服用方便的新剂型。本文查阅了蒙药制剂相关文献，对传统蒙药剂型进行总结（见表 1），并对药物制剂新技术在蒙药中的应用情况以及蒙药制剂现存问题进行整理，以期对蒙药制剂现代化研究提供参考。

表 1 传统蒙药剂型及其临床应用

Tab 1 Traditional Mongolian medicine dosage form and its clinical application

剂型	优点	缺点	临床应用	文献
汤剂	工艺简单，吸收快，起效迅速	服药量大，口味不佳	常用于临床急性病的治疗	[1-5]
散剂	疗效持久，用药量少，配制方便，药性稳定，便于携带	吸湿性强，气味较大，有效成分不稳定	适用于治疗已成型之病以及聚合性疾病	[6-11]
丸剂	吸收缓慢、药效持久、体积小，方便草原患者服用	起效慢，剂量大，不利于儿童服用	多用于慢性病及根除疾病余邪	[12-14]
膏剂	药物浓度高、稳定性好、便于服用	外用膏剂透皮性较差，黏度小、易黏衣物，使用时较为不便	内服膏剂多用于治疗热性疾病；外用膏剂一般具有抗炎镇痛的功效，用来治疗皮肤溃瘍、感染等	[15-20]
酒剂	制备简便，服用剂量较小，且不易霉变，易于保存	儿童、孕妇、心脏病及高血压患者不宜服用	口服酒剂多用于慢性病辅助治疗以及体虚患者的滋补；外用酒剂多用来治疗风湿疼痛与跌打扭伤	[21-24]
油剂	口味较好，便于服用	制备工艺复杂，制剂工艺流程要求较高	常用于祛寒滋补，壮阳固精	[25-27]
灰剂	蒙药特有剂型，分为急、中、缓三种配剂，可根据病情选择使用	制备工艺复杂，制剂工艺流程要求较高	用于治疗胸腹胀满、胃火衰败、痞瘤、风湿肿毒等病症	[14, 28-29]
搅和剂	制备简单，便于服用	外用搅和剂透皮性较差，黏度小、易黏衣物，使用时较为不便	内服常用于老年重病久卧、身体虚弱者；外用治疗关节、皮肤慢性病	[15, 30-31]
草药剂	制备简单，因地制宜	—	用以治疗热病和外感，多在缺医少药的边远地区	[23]
金石合剂	用药量少，药效持久	毒性较大	仅应用于多次使用其他类制剂无效的顽固性恶性疾患，且患者病症治愈后应立即停药	[32-33]

1 传统蒙药剂型

1.1 汤剂

与中药不同，蒙药汤剂是将药材清洁炮制后，粉碎成 25 ~ 65 目的粗粉，混匀，再加水煎煮或浸泡制成的液体剂型，其有效成分更易被溶出，煎煮或浸渍所需时间更短^[1]。在临床应用过程中，由于患者疾病以及药物功效不同，蒙药汤剂溶媒的选择

也有所不同。一般除水以外，还可用奶、骨汤来煎煮药物，如用纯牛奶煎煮苏格木勒-3 味汤来治疗赫依型失眠^[2]、用绵羊骨汤煎煮阿嘎如-35 味汤治疗心刺痛^[3]，在临床上都有较好的疗效。

汤剂制备工艺简单，吸收快，起效迅速，至今仍被广泛用于临床急性病的治疗^[4]，但其服药量大，口味不佳等问题严重影响患者的依从性，

尤其是对于老人与孩童。因此蒙医在汤剂基础上,对药液进行浓缩,制成合剂,不仅减少了服用量,还保持了汤剂的用药特点。目前大多数汤剂浓缩后,都进行了单剂量包装,即临床常用的口服液,更易于携带、贮存,便于服用。如王欢等^[5]将传统达如奇汤改制为口服液,便于患者服用且保肝效果依旧显著。

1.2 散剂

蒙药散剂是将处方中各味药物按处方配齐,研为细粉,混匀后直接服用的一种剂型,其中寒凉药可以加适量白糖,温热药加适量红糖再混匀服用^[6]。散剂虽消化吸收较汤剂慢,但疗效持久,适用于治疗已成型之病以及聚合性疾病,且散剂用药量少,配制方便,药性稳定,便于携带^[7]。此外,与汤剂相比,散剂直接服用,避免了一些亲脂性成分以及大分子物质难溶于水,有效成分提取不完全的问题,从而增强药物的治疗效果。如文冠木的大分子缩合鞣质不易被溶剂提取,但散剂给药时可在体内胃液作用下转化为表儿茶素后被吸收,加强文冠木祛风除湿的功效^[8]。

散剂虽疗效显著,但在应用中也存在一些较难解决的问题,如吸湿性强,气味较大,有效成分不稳定(挥发性成分)等,目前常将散剂制成颗粒剂、片剂或胶囊剂来帮助其进行防潮掩味,提高药物稳定性。如樊精辉等^[9]将五味沙棘散中原药材进行提取,制成颗粒剂来克服原散剂气味浓烈,不好服用的缺点。古丽巴哈尔·艾力^[10]将阿那日五味散制成片剂,并利用包合工艺将药物中的挥发油成分进行包合,减少挥发油的损失,增强药物的功效。除内服外,散剂亦可以外用,起到干燥皮肤、杀菌消毒的作用,然而散剂黏附性较差,容易脱落,在特殊位置不宜使用,常将其制备成贴剂,如萨库拉将嘎木朱尔散剂制备成贴剂,抗炎抗溃疡,用于术后伤口的修复^[11]。

1.3 丸剂

丸剂因具有吸收缓慢、药效持久、体积小等优点,方便草原患者服用,因此,在蒙医临床中应用频率最高,其按赋形剂可分为水丸、蜜丸、浓缩丸、糊丸等,目前水丸在蒙医临床应用较多^[12]。由于丸剂服用后吸收分解较缓慢,大多数含有毒性药物的方剂都被制成丸剂,从而防止有毒成分过快或过量进入机体,减轻药物的毒副作用^[13],如方中含草乌的扎冲十三味丸、含朱砂的吉祥安坤丸等。一些贵重、芳香和不宜久煎的药材,如麝香、牛黄、黑云香等,也常被制成丸剂服用^[14]。

1.4 膏剂

蒙药膏剂是指药物用水煎煮后,弃渣取汁,药

汁继续用微火熬制,浓缩成稠膏状后供使用的一种剂型^[15],分为内服和外用两种,其中内服膏剂多为单方,用于治疗热性疾病,如蒙医常用沙棘膏治疗气喘咳嗽^[16],文冠木膏用于治疗风湿热证^[17]。外用膏剂一般具有抗炎镇痛的功效,用来治疗皮肤溃疡、感染等,如蒙药生肌长皮膏用于治疗下肢慢性溃疡以及术后切口感染^[18]。然而,传统外用膏剂透皮性较差,黏度小、易黏衣物,使用时给患者带来较大不便^[19]。近来研究人员将其制成贴膏剂,即对药物进行提取后以凝胶为基质制成贴膏,不仅透气性良好、不污染衣物,给药剂量也相对准确,大大提高了药物的生物利用度^[20]。

1.5 酒剂

目前蒙药中常用的酒剂分为两种:一种是药物经过发酵后制得的酒剂,如马奶酒^[21];另一种是以酒为溶媒,浸取药材中有效成分所得的澄清浸出液^[22],其可分为口服和外用两大类,且两类药物制备方法较为不同。口服浸提酒剂一般是将原药材直接浸泡于酒内,用于慢性病辅助治疗以及体虚患者的滋补,如手参酒^[23];外用浸提酒剂常是将散剂浸泡在适量浓度酒精中,密封一段时间后使用,可用来治疗风湿疼痛与跌打扭伤,如慢侵-14味蒙药酒^[24]。酒剂在蒙古族人民生活中应用较为广泛,但儿童、孕妇、心脏病及高血压患者不宜服用。

1.6 油剂

油剂是将药材加工炮制后按照处方进行调配、浸煮、浓缩,达到一定程度后加入鲜牛奶进行混合,再加入相应的药粉以及奶油、蜂蜜、白糖等,浓缩到没有水分,最终呈现出油亮光泽、红黑透明或黄黑透明的一种剂型,一般放在瓷缸内进行贮藏^[25]。油剂在蒙医临床常用于祛寒滋补、壮阳固精,如用塔本温都苏油剂治疗妇女肾寒,腰膝酸痛,肾功能衰退^[26];用三子油剂防治老年病及抗衰老^[27]。

1.7 灰剂

灰剂是蒙医特有的剂型,是将药材净选后按处方调配好,置于耐烧容器内,密闭,用红或黄黏土封固好,晾干,专炉烧三昼夜,煅烧成灰即得,一般以白色为好,黑色为劣^[14]。灰剂常以金属、矿物及动物性药物为主,用于治疗胸腹胀满、胃火衰败、痞瘤、风湿肿毒等病症^[28],服用时可加入白砂糖或制成散剂、丸剂。此外,灰剂分为急、中、缓三种配剂,可根据病情选择使用,如用蒙药壮西小灰剂在临床上治疗食积不消、胃溃疡以及食道癌等疾病^[29]。

1.8 搅合剂

由调配好的处方共研细粉,加入适量炼蜜、奶油、红糖或白糖等反复搅合而成的剂型即为搅

合剂,常贮存在密闭瓷器内,用于老年重病久卧、身体虚弱者^[15],如八味火绒草搅合剂。除口服滋补以外,外用搅合剂对关节、皮肤慢性病的疗效也较为显著,如外用蒙药勒毕巴拉珠尔可治疗瘰疬^[30];三籽散搅合剂外敷于骨伤引起的局部红肿处可消肿并减轻疼痛^[31]。

1.9 草药剂及金石合剂

草药剂是蒙医根据当地地理气候、周围环境及植物的分布情况,因地制宜地采集野生药草,将单味药或数味药煎汤服或将采集的草药置于清洁通风处阴干,制成药末后煎汤服用以治疗热病和外感的一种剂型^[23]。此剂型较为原始,制备简单,多在缺医少药的边远地区使用。金石合剂是以经过加工炮制(包括焖煨、明煨、煨淬)的珍宝类以及金属矿石类药物为主药,适当配合其他动、植物类药物制成的合剂,具有较大毒性,仅应用于多次使用其他制剂无效的顽固性恶性疾患,且患者病症治愈后应立即停药^[32]。目前,随着蒙医药制剂的发展以及蒙药安全意识的提升,草药剂与金石合剂在临床上已应用较少。且有人认为草药剂和金石合剂从概念上讲两者不属于剂型^[33]。

2 蒙药制剂新技术

随着蒙医药现代化发展的不断推进,传统蒙药制备工艺简单、服用不便、生物利用度低等问题逐渐显露出来,蒙医落后的制剂工艺与生产设备也阻碍了蒙药改革创新研究^[34]。因此,利用药物制剂新技术和新方法研究蒙药新剂型是蒙医药发展的重要举措。近年来蒙药制备常用的制剂新技术包括包衣技术、固体分散体技术、微囊与微球制备技术等。

2.1 包衣技术

在传统蒙药制剂中,蒙医常用的包衣材料仅朱砂、银朱两种,且多用于水丸,来改善丸面粗糙、易吸潮、易氧化等问题^[35]。对于一些味道较大的素丸或素片,蒙医还采用包糖衣的方法来掩盖其不良气味。如蒙药伊赫-乌兰-13汤由于味道较苦、难以下咽等特点大大降低了患者用药顺应性,徐青等^[36]对其剂型进行了改进,由汤剂改为片剂,并包上糖衣,以便于患者服用。

目前包衣技术已被广泛应用于蒙药生产中。但临床实践发现,用糖衣作为包裹材料的药物受到温湿度的影响较大,容易受潮变质,并且此技术工艺复杂、制取时间较长,不利于生产效益,新型包衣技术薄膜包衣膜则能够有效规避上述包衣技术的缺陷^[37]。薄膜包衣技术指在制剂的外层包一层薄的高分子聚合物衣,具有耐热防潮、耗时较短、制剂质量稳定等优点,且薄膜包衣用料

少,药片增重较小,有较多的品种选择^[38]。田香等^[39]基于质量源于设计理念研究了地格达-4味汤片薄膜包衣最佳工艺,制得的包衣片剂不仅具有较好的防潮、掩味性能,还使药物的质量稳定性及一致性得到了改善。

2.2 固体分散技术

作为一种常用的增加难溶性药物溶出度的方法,固体分散技术可使药物以无定形、微晶、分子聚集体等形式高度分散于惰性载体中,从而提高药物生物利用度^[40]。对于一些有效成分极性较大的蒙药材,如山柰、多叶棘豆等,口服后其有效成分很难穿过胃肠道类脂膜,几乎不被人体吸收。若将药材进行提取,制备成固体分散体,可显著改善药物的在体肠吸收,增强药物治疗效果,减少服药量。如宋森等^[41]通过固体分散技术将乌兰温都顺-7制备成滴丸,与传统剂型相比不仅提高了药物的生物利用度,还具有速效、稳定性强、作用持久等特点。

2.3 微囊与微球制备技术

微囊与微球是现代应用药物常用的制剂新技术,粒径在1~250 μm,均属于微米级。微囊是利用高分子天然或合成材料将固体或液体药物包裹而成的药库型微型胶囊,因药物经过微囊化,能较好地掩盖不良气味及口味,降低药物在胃肠道中的不良反应,提高其稳定性^[42]。如沙棘果油在治疗胃溃疡、提高免疫、抗突变等方面有较强的药理活性,但沙棘果油中脂肪酸在体内的吸收较慢,患者易发生嗝气、胃灼热、恶心等不良反应,且沙棘果油的高不饱和和有效成分不稳定,极易发生氧化、酸败的现象,因此云花尔等^[43]通过复凝聚法制备了沙棘果油微囊,增强了药物的稳定性并减少了药物对胃的刺激。

与微囊不同,微球是将药物溶解或分散在高分子材料基质中制成的微小球状实体,属于基质型骨架微粒。除了可以掩盖药物不良气味、降低药物在胃肠道中的不良反应,微球还多用于制备长效缓释制剂^[44]。如陈晓北^[45]采用复乳-液中干燥法制备了白益母草总生物碱的乳酸-羟基乙酸共聚物微球,其不仅能克服生物碱口服稳定性差的问题,还具有药物缓释作用,使药效稳定持久,从而减少给药次数,增强患者的依从性。但目前微球制备技术仅停留在药物研发阶段,还未应用于蒙药制剂生产。

2.4 纳米乳与纳米粒制备技术

纳米制剂技术作为现代制药技术的重要发展方向,可极大提高药物的稳定性与利用率,大幅增强药物的靶向性,让药物快速到达病变部位,

从而降低药物毒性,提高疾病的治疗效果^[46]。目前已用于蒙药新型药物制备的纳米技术有纳米乳、固体脂质纳米粒等。

纳米乳作为一种胶体分散体系,内部同时存在亲水和亲油区域,可以形成牢固的油水界面膜,显著改善难溶性药物的溶解性^[47]。此外,纳米乳具有表面张力较低、易于湿润皮肤、可使角质层结构发生变化、增加脂质双分子层流动性等优点^[48],可显著增强药物的透皮吸收能力。在蒙药生产制备过程中,纳米乳常被用于透皮给药制剂的制备,来促进小分子药物的透皮吸收,达到增强药物治疗效果;且纳米乳常为水乳乳液,与传统膏剂相比,更容易涂抹在皮肤上,并且不会留下油腻感和异味。都日娜等^[49]将外用治疗湿疹的蒙药森登-4汤剂制备成纳米乳,不仅能矫色掩味,提高患者的用药遵从性,而且使药物黏附性增大,透皮吸收能力增强,疗效更显著。

固体脂质纳米粒是以固态的天然或合成的类脂如单硬脂酸甘油酯、卵磷脂、三酰甘油等为载体,将药物包裹在类脂核中经不同方法制成的粒径在 50 ~ 1000 nm 的固态胶粒给药体系^[50]。其结合了脂质体与聚合纳米粒的优点,既可以载运亲脂性及亲水性药物,提高药物稳定性及生物利用度,又兼具了缓控释、靶向等优点^[51],是一种极有发展前景的新型给药载体。石文宏等^[52]将沙棘的有效成分醋柳黄酮制成了口服固体脂质纳米粒,其结果与原制剂心达康片相比,不仅提高了醋柳黄酮的体内吸收率,而且有较好的心、肝、血靶向性,更有利于药物对心血管疾病的治疗。

2.5 环糊精包合技术

环糊精作为一种新型分子包裹材料,呈中空的略似锥形的圆筒立体环状结构,筒外部具有亲水性,内部为疏水性空腔^[53]。将疏水性或具有疏水基团的药物包入环糊精中形成易溶于水的包合物,从而增加药物表观溶解度、生物利用度,掩盖药物的不良臭味并提高药物稳定性的技术即为环糊精包合技术^[54],常被用于挥发油等亲脂性药物。李梦蝶^[55]通过饱和水溶液法制备丁香酚环糊精包合物,又与羧甲基纤维素钠水凝胶结合制备了丁香酚环糊精包合物水凝胶,用于糖尿病伤口修复,其不但保留了良好的抗菌性能,而且减弱了单纯丁香酚对创面的刺激作用,使患者更易于用药。对于一些蒙药复方制剂,研究人员常将组方中含有挥发油成分的药物进行提取、环糊精包合后,再与其他提取物合并、浓缩、干燥,制成所需剂型,从而增强药物的治疗效果。如张瑞霞等^[56]将冠心活血汤散剂组方中檀香、降香、紫檀香、肉豆蔻 4 味药碾碎后

采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,用 β -环糊精包合后,与醇提物及水提物合并浓缩至一定浓度,喷雾干燥,制备成胶囊剂,此剂型显著提高了药物稳定性,并且方便服用和携带。

2.6 透皮给药技术

透皮给药技术因具有避免肝脏首过效应、避免胃肠道代谢、方便给药等优点,在药物制剂领域受到极大的重视^[57],部分不稳定以及难服用的药物,尤其是小儿用药,常被制成贴剂、乳膏剂等透皮给药剂型。如立新将蒙药三臣丸改剂型为三臣小儿退热贴,便于儿童用药,且疗效较好^[58]。然而,临床研究表明目前常用的透皮给药制剂透皮吸收率较小,生物利用度较低,可通过化学促渗法和物理促渗法来改善皮肤的渗透性。

在药物中添加渗透促进剂来改善皮肤的渗透性,促进药物分子透皮吸收的方法即为化学促渗法,常用的渗透促进剂包括二甲基亚砜、氮酮类化合物以及醇类化合物等。王佳^[59]将传统乌发涂剂制备为乳膏剂,不仅解决了原剂型制备耗时、量大、用时需剃发、不宜存储等问题,而且因加入促皮渗透剂丙二醇与氮酮,能比原方更快地发挥疗效,药物透皮效率更高。物理促渗法主要是利用仪器产生的电流、瞬时的高电压脉冲电场、超声波、激光等物理手段来促进药物分子透皮吸收,包括离子导入法、电致孔法、超声波法和激光法等^[60]。但物理促渗法在蒙药透皮制剂中应用较少,建议加强此法的相关基础研究,使其更好地应用于蒙药制剂生产中。

3 蒙药制剂现存问题

蒙药作为我国传统医药学的重要组成部分,其具有独特的药物体系与制备方法。近年来,蒙药的快速发展使其显著的临床疗效逐渐被大众所认同,蒙药制剂使用量也在逐年增加。但在大量生产与应用过程中,蒙药制剂存在的问题也逐渐显露出来。

3.1 处方组成不定,入药品种不统一

至今为止,蒙医用于治疗疾病的成方制剂已达 3000 多个,但收载于《内蒙古蒙药制剂规范》的仅有 150 个。对于一些没有收录,尤其是古籍中记载的蒙药制剂,处方组成存在部分差异。如蒙药八味沉香散有两个不同的组方,两者均使用沉香、广枣、肉豆蔻及木香 4 味常用药材,区别在于《诊治明医典》所载组方药材还包括诃子、木棉花蕊、白云香、天竺黄(或石灰华),用于治疗“心赫依热”,而《哲对宁诺尔》所载的组方尚包括动物心脏、丁香、旋覆花及阿魏,其在原功效的基础上,又增加了止痛的作用^[61],两方虽同

名, 但药物组成有区别, 临床疗效也有所差异。此外, 随着蒙药制剂的快速发展, 蒙医院院内制剂研究较多, 常在传统方剂上进行加减, 使药物处方以及药物用量有所区别。

除处方组成外, 蒙药材的质量对蒙药制剂功效也有一定的影响。蒙药材数量较大, 种类较多, 常出现同名异物或同物异名的情况, 如蒙药“地格达”, 中药名为地丁、紫花地丁等, 在内蒙古各地有 10 余种之多, 均可用于配伍, 没有一个统一的标准, 虽药效均为清热解毒, 但品种不统一, 也会造成临床用药疗效不一致^[62]。且随着蒙药材自然资源的匮乏以及生态环境保护意识的加大, 很多药材已难以采集, 药材流通市场也很难买到, 于是蒙药配制中便出现了代替用药或伪品混杂的现象, 使蒙药制剂药效得不到保障^[63]。

3.2 鉴别药味数较少, 含量测定指标不全面

蒙药制剂组方药物数量较多是蒙药疗效好的一大原因, 但目前应用的蒙药制剂质量标准中, 组方中被鉴别的药材数量却较少, 不能完全保障蒙药制剂的质量及药效。与中药相比, 中药制剂质量标准中规定列入正文的鉴别药味应不少于处方药味的 1/2^[64], 而蒙药鉴别药味数则远少于此规定。如在蒙药如达-11 味丸薄层色谱鉴别研究中, 田彩云等^[65]只对红花、木香、甘草 3 味药进行了鉴别。对于蒙药制剂含量测定指标, 蒙药复方制剂为多组分复杂体系, 其治疗作用是所有有效化合物群整体协同的结果, 因此应建立多组分多指标的质量控制体系来评价其质量, 而目前蒙药制剂研究中, 常以一两种化学成分作为含量测定的指标, 不具有整体代表性^[66], 不能对蒙药制剂质量进行全面评价。

3.3 微生物限度不合格

蒙药制剂由多种天然药材组成, 主要包括动植物、矿物类, 大多带有微生物(霉菌、需氧菌和致病菌), 且部分植物药中含大量的糖类成分, 容易受潮发生霉变, 滋生微生物^[67]。目前蒙药中常用剂型以丸剂、散剂、膏剂、丹剂为主, 对原药材的加工炮制较粗糙, 基本起不到灭菌的效果, 在储存过程中还可能继续生长和繁殖^[68], 因此大多数蒙药制剂微生物限度检查不合格, 减少或杀灭微生物成为蒙药制剂制备中的重要任务。制剂企业常用的灭菌技术包括乙醇蒸气灭菌法、臭氧灭菌法、钴 60 辐射灭菌法等。此外对传统剂型进行改革也可以解决蒙药制剂微生物限度不合格的问题。

3.4 安全性问题

药物在发挥防治疾病作用的同时, 可能对机

体产生不同程度的损害, 轻则引起不适, 重则可能威胁患者的生命, 因此在制药过程中, 保证患者的用药安全是药物治疗的前提。蒙医学善用毒性药材, 以毒攻毒往往可以起到神奇的疗效, 而有些毒性药物性质剧烈, 不能直接服用, 需要进行炮制加工来消除或降低药物毒性, 保证用药安全^[69]。但目前蒙医炮制药材的方法较为混乱, 一些通过炮制减毒增效, 炮制方法较多的药材^[70], 如蒙药斑蝥, 有醋煮法、醋炙法、米炒法、麸炒法、豆面炒法、蛤粉炒法等多种炮制方法, 均用来减毒增效^[71], 没有说明哪一种炮制方法较好, 致使研究人员所选方法不定, 炮制品出现不同程度的安全性问题。此外, 蒙医对于药材炮制品的质量控制也缺少一定的标准, 炮制过程多凭经验判断, 缺少客观的经验术语表述和精确量化的判断标准, 缺少对蒙药炮制的过程控制和中间品质量控制^[69]。

毒性药材经炮制后毒性成分可减少, 但不能完全消失, 因此其在制剂中的用量也需要注意。现有蒙成药中毒性药物的用量多由蒙医药专家按临床积累的经验使用^[66], 并且药物在不同复方中使用剂量的差异很大, 最大剂量与最小剂量的比值在 1 ~ 10 000, 大多缺乏现代量效关系研究, 安全隐患大^[72], 应建立严格的使用标准。

药物制剂新技术在蒙药中的应用汇总情况见表 2。

4 结论

蒙药制剂研究是一个复杂的系统工程, 从传统蒙药制剂发展到现代蒙药新剂型, 蒙医药事业实现了巨大突破。如蒙药从原有的全草入药发展到有效成分提取再配伍, 药物服用量显著降低; 从传统的汤剂、散剂、丸剂, 服用后吸收入血作用于全身发展到具有靶向性的纳米粒等新剂型, 既能增强药物临床疗效、又能降低药物毒副作用。但目前为止, 蒙药制剂现代化进程与中药相比还较为缓慢, 一些中药常用的制剂新技术, 如脂质体、微球等制备技术仅处于实验室研究阶段, 还未应用到蒙药制剂生产中, 固体分散体等其他制剂新技术在蒙药制剂生产中应用也较少。应加大蒙药传统剂型改革的发展力度, 加强蒙药制备工艺的创新性研究, 使蒙药制剂与临床有效结合, 并更好地应用于临床。

此外, 蒙药制剂质量状况也有待提高, 对于蒙药材品种不统一, 蒙药方剂处方不定以及蒙药制剂质量及安全性不达标等问题, 应明确蒙药材来源及种类, 规范蒙药制剂组方, 严格监管蒙药制剂生产制备过程, 建立严格的质量检测标准,

表 2 药物制剂新技术在蒙药中的应用

Tab 2 Application of new technology of pharmaceutical preparation in Mongolian medicine

制剂新技术	结构/材料	特点	适用药物	文献
薄膜包衣技术	高分子聚合物衣	耐热、防潮、掩味, 使制剂质量稳定	适用于易吸湿吸潮, 有不良嗅味的蒙药丸剂或片剂	[37-39]
固体分散技术	固体分散体系	增加难溶性药物溶出度, 提高药物生物利用度	适用于有效成分极性大, 口服体内吸收度较低的药物	[40-41]
微囊与微球制备技术	微囊或微球, 粒径在 1 ~ 250 μm	可掩盖药物不良气味及口味; 降低药物在胃肠道中的不良反应; 具有长效缓释作用	适用于气味较大, 以及有效成分在胃肠道内易被破坏或产生刺激作用的药物	[42-45]
纳米乳制备技术	胶体分散体系, 粒径在 10 ~ 100 nm	改善难溶性药物的溶解性; 提高药物透皮吸收能力	适用于经皮给药, 透皮吸收率较小的蒙药方剂	[47-49]
固体脂质纳米粒制备技术	固态胶粒, 粒径在 50 ~ 1000 nm	可载疏水和亲水性药物, 提高药物稳定性; 提高药物生物利用度; 具有缓控释、靶向等优点	适用于有效成分为挥发油或遇光、氧气易引起变质、可靶向给药的药物	[50-52]
环糊精包合技术	圆筒立体环状结构	增加药物表观溶解度; 掩盖药物的不良嗅味; 提高药物稳定性	适用于有效成分为具有不良嗅味或刺激性的挥发油等亲脂性成分的药物	[53-56]
透皮给药技术	—	改善药物的皮肤渗透性, 促进药物分子透皮吸收	适用于透皮给药但透皮吸收率较低的蒙药方剂	[59-60]

运用科学的分析方法对蒙药制剂药效物质及毒性成分进行检测, 保证蒙药质量, 制备出组方合理、剂型适宜、工艺先进、质量可靠、疗效显著的安全稳定的新型蒙药制剂, 实现蒙药科学化、规范化、现代化发展。

参考文献

[1] 文都苏. 浅谈蒙药汤剂[J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23(6): 33-34.

[2] 邓斯琴, 春娜, 山丹, 等. 纯牛奶煎煮蒙药苏格木勒-3味汤治疗赫依型失眠症临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(3): 22-27.

[3] 红艳, 穆立松, 苏乌兰等. 蒙药治疗冠心病概述[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2020, 35(5): 437-443.

[4] 包其其格, 王淑琴, 杨桂莲. 蒙医特色用药方法[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2003, 18(5): 455-456.

[5] 王欢, 巴图德力根, 佟山. 清热祛“粘疫”蒙药制剂达如奇口服液提取工艺研究[J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(6): 587-588.

[6] 晓花, 朱翔慧, 伊乐泰, 等. “地格达”类蒙药在蒙药复方制剂中的应用情况[J]. 中国现代中药, 2018, 20(12): 1583-1592.

[7] 梁斯琴, 呼伊日格其. 论蒙药传统剂型[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(3): 31.

[8] 马超美, 高杰, 许海燕, 等. 文冠木及复方古日古木-7不同给药方式下主要成分的药代动力学性质[J]. 中国现代中药, 2020, 22(2): 305-310.

[9] 樊精辉, 曾月宁, 丛丽华, 等. 五味沙棘颗粒含量测定的方法学研究[J]. 大家健康(学术版), 2013, 7(18): 22-23.

[10] 古丽巴哈尔·艾力·阿那日五味散定性定量控制方法与阿那日五味片前处理工艺研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.

[11] 萨库拉. 蒙药嘎木朱尔的剂型改革研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.

[12] 照日格图. 制蒙药水丸时特别注意的事项[J]. 北方药学, 2013, 10(3): 154-155.

[13] 李哈, 张广平, 陈腾飞, 等. 蒙药诃子配伍草乌的减毒增效机制研究进展[J]. 世界中医药, 2021, 16(24): 3701-3707.

[14] 刘玉琴. 蒙药方剂学的现状与展望[J]. 中国民族民间医药, 2003, 12(4): 189-192.

[15] 刘士民, 董秋梅. 蒙药外用剂的研究概况[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(6): 73-75.

[16] 杨静, 阿古拉. 民族医习用药沙棘膏的质量标准研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(9): 33-34.

[17] 蒙根. 蒙药“霞日——森登”的传统验方简介[J]. 时珍国医国药, 1991, 2(2): 84.

[18] 陈霞. 蒙药生肌长皮膏局部治疗乳腺癌根治术后创面慢性感染临床疗效[J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(3): 10-11.

[19] 金萨如拉. 蒙药文冠木贴膏剂的制备工艺及药效作用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.

[20] 王友凤. 消喘贴敷膏剂的药学研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.

[21] 王猛, 王宇桐. 马奶酒的历史源流与传承现状[J]. 农业考古, 2021, 175(3): 193-197.

[22] 武绍新. 蒙古族医药学概述[J]. 中国医药学报, 1987(2): 29-31.

[23] 塔娜. 蒙医用药特点浅谈[J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16(7): 46-47.

[24] 郝秀颖. 慢侵-14味蒙药酒为主治疗类风湿性关节炎 169例[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(2): 12.

[25] 红芳. 蒙药普通制剂的疗效问题浅述[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(91): 190-191.

[26] 刘散丹, 刘乌云, 赵百岁, 等. 蒙成药塔本温都苏油剂源流[J]. 内蒙古医科大学学报, 2021, 43(6): 574-579.

- [27] 孟玖生. 述蒙医在治疗老年病方面的优势[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(78): 150-159.
- [28] 包勒朝鲁, 乌兰图雅, 那生桑. 论蒙医方剂学基本理论[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 1954-1956.
- [29] 斯琴格日勒, 赵百岁. 蒙成药壮西小灰剂的研究现状[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2013, 28(1): 89-90.
- [30] 孟和巴特尔. 蒙药治疗痤疮 280 例[J]. 中国民族医药杂志, 2002, 8(2): 24.
- [31] 乌图雅, 塔娜, 红霞等. 蒙药三籽汤的研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2023, 29(2): 36-38.
- [32] 何春松, 齐曼丽, 韩来敏, 等. 蒙药中的矿物药[J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(S1): 55-56.
- [33] 那生桑. 蒙药学概况[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(1): 32-34.
- [34] 乌兰图雅, 包勒朝鲁. 浅谈蒙药剂型改革[J]. 医药导报, 2012, 31(8): 1103-1105.
- [35] 李杰, 斯琴高娃, 任晓霞, 等. 蒙药水丸与藏药中药水丸制法的异同[J]. 中国民族医药杂志, 2016, 22(11): 46-48.
- [36] 徐青, 哈日呼. 蒙药“伊赫-乌兰-13 汤”改为片剂的剂型改革研究[J]. 中国民族民间医药, 1994, 3(6): 14-15.
- [37] 黄庄霖, 王惠颖. 中药制剂生产技术现代化的研究进展[J]. 海峡药学, 2021, 33(10): 33-34.
- [38] 袁菊丽. 薄膜包衣技术在中药制剂中的应用[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(5): 456-458.
- [39] 田香, 丁瑞雪, 拉喜那木吉拉, 等. 地格达-4 味汤片薄膜包衣工艺研究[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2630-2636.
- [40] 程亮. 药物制剂新技术在现代中药中的应用[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(85): 192.
- [41] 宋森, 刘全礼, 邱敏, 等. 蒙药乌兰温都顺-7 滴丸成型工艺考察[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(5): 48-50.
- [42] 邱金双, 李陈雪, 牟景龙, 等. 中药微囊制剂研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(8): 129-132.
- [43] 云花尔, 高娃. 蒙药沙棘果油微囊的制备及其质量评价[J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21(6): 63-65.
- [44] 张芳, 杨志强, 王杏林. 长效注射剂释药技术研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(5): 547-555.
- [45] 陈晓北. 白益母草总生物碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的制备[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4418-4421.
- [46] 高扬, 高坤坤. 药物制剂新技术在中药制剂现代化中的应用[J]. 流程工业, 2022(1): 31-33.
- [47] 张旭敏, 谢龙, 赵雨芯, 等. 茶皂素稳定的芹菜素纳米乳制备及其体外释放研究[J]. 中草药, 2022, 53(17): 5348-5355.
- [48] 姚云霞, 李云, 李媛, 等. 纳米乳在药剂学中的研究及应用进展[J]. 军事医学, 2021, 45(6): 473-478.
- [49] 都日娜, 李艳. 蒙药森登-4 纳米乳治疗湿疹的临床观察[J]. 内蒙古医学杂志, 2022, 54(11): 1374-1375.
- [50] 王小宁, 罗国平, 李伟泽, 等. 酮洛芬固体脂质纳米粒的制备与评价[J]. 中国药师, 2017, 20(10): 1705-1709.
- [51] 李楠, 李锡晶, 王倩. 微乳法制备姜黄素固体脂质纳米粒[J]. 中国药房, 2015, 26(19): 2698-2702.
- [52] 石文宏, 巩俊卿, 盛惟. 醋柳黄酮口服固体脂质纳米粒对小鼠靶向性的研究[J]. 中国药师, 2006, 9(9): 783-785.
- [53] 张雯文, 马建武, 任和, 等. 环糊精包合技术及在食品工业中的应用进展[J]. 食品工业, 2014, 35(9): 256-260.
- [54] 李明玥, 倪健, 尹兴斌. 改善中药口服生物利用度的制剂技术研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2): 307-311.
- [55] 李梦蝶. 丁香酚 β -环糊精包合物水凝胶的制备及其对糖尿病伤口修复的研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2020.
- [56] 张瑞霞, 苗培福. 蒙药冠心活血胶囊制粒工艺研究[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(9): 50-52.
- [57] 朱学敏, 马敏, 任略, 等. 透皮吸收促进剂评价的新技术[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(15): 1301-1307.
- [58] 立新. 蒙药三臣小儿退热凝胶贴制备和评价研究[D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2021.
- [59] 王佳. 古方乌发膏的药学研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [60] 刘志敏. 那如-3 巴布剂的透皮吸收特性及改善大鼠佐剂性关节炎病变的机理[D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.
- [61] 徐季轩, 马晓静, 陈泓颖, 等. 我国主要少数民族医药防治缺血性心脏病研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 235-247.
- [62] 苏德那木道尔吉. 蒙药普通制剂的疗效问题浅述[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(18): 1.
- [63] 查娜, 布音, 萨础拉. 蒙药质量标准化研究发展概况[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(11): 6-10.
- [64] 刘敏, 田佳懿, 年宏蕾, 等. 某医疗机构中药制剂质量标准存在的问题及修正对策[J]. 中国药事, 2021, 35(9): 1060-1065.
- [65] 田彩云, 徐彬, 高博闻. 蒙药如达-11 味丸薄层色谱鉴别研究[J]. 人参研究, 2020, 32(2): 43-44.
- [66] 屈晓梅, 宋宏春. 蒙药质量标准研究现状[J]. 疾病监测与控制, 2014, 8(9): 556-557.
- [67] 锡林通嘎拉嘎, 那生桑. 灭菌技术在蒙药及其制剂中的应用现状、存在问题及建议[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(9): 57-59.
- [68] 叶笑. 我国蒙药资源产业现状与发展建议[J]. 中国药物评价, 2017, 34(5): 390-393.
- [69] 吕颖, 张海涛, 郭文芳, 等. 论传统蒙古族药炮制的继承与发展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2742-2747.
- [70] 包勒朝鲁, 红梅, 阿润, 等. 蒙药炮制的现状及其规范化的建议[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3184-3186.
- [71] 任艳, 刘海波, 邓都, 等. 斑蝥炮制沿革及其研究中值得商榷的问题[J]. 中草药, 2020, 51(15): 4082-4091.
- [72] 孙位军, 孙铭, 王张, 等. 基于药品标准的蒙药制剂品种、主治和用药特点研究[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(23): 20-23.

(收稿日期: 2023-06-07; 修回日期: 2023-07-18)

蒙药高灵脂配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱及含量测定研究

杨立茹¹, 刘梦¹, 韩子璇¹, 李佳¹, 张纯刚^{1, 2, 3*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116620; 2. 长治医学院药理学系, 山西 长治 046000; 3. 祈蒙股份有限公司, 内蒙古 赤峰 024330)

摘要: **目的** 建立高灵脂配方颗粒高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并测定穗花杉双黄酮和山柰酚的含量, 为高灵脂配方颗粒的质量控制提供参考。**方法** 采用 COSMOSIL C18 色谱柱, 以甲醇-0.1% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 350 nm, 建立 15 批高灵脂配方颗粒的 HPLC 指纹图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行相似度评价, 并对共有峰进行指认。**结果** 建立了高灵脂配方颗粒指纹图谱, 标定了 10 个共有峰, 指认了 2 个峰, 15 批高灵脂配方颗粒相似度均 > 0.90。含量测定结果显示, 穗花杉双黄酮和山柰酚分别在质量浓度为 1.60 ~ 206.00 μg · mL⁻¹ 和 1.31 ~ 181.00 μg · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好 ($r \geq 0.9999$), 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0%, 平均加样回收率分别为 102.44% 和 100.46%。**结论** 建立的指纹图谱和含量测定方法简便、可行、准确、重复性好, 可为高灵脂配方颗粒的质量评价提供参考。

关键词: 蒙药; 高灵脂; 配方颗粒; 指纹图谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3130-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.005

HPLC fingerprint and content determination of Mongolian medicine Petauristae Faeces formula granules

YANG Li-ru¹, LIU Meng¹, HAN Zi-xuan¹, LI Jia¹, ZHANG Chun-gang^{1, 2, 3*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116620; 2. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000; 3. Qimeng Co., Ltd., Chifeng Inner Mongolia 024330)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint, to determine the content of amentoflavone and kaempferol in Petauristae Faeces formula granules, and to provide reference for the quality control. **Methods** The chromatographic column was COSMOSIL C18. The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid with gradient elution, the column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was 350 nm. The HPLC fingerprint of 15 batches of Petauristae Faeces formula granules was established by the similarity evaluation system of Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint (2012 version). The similarity was evaluated and the common peaks were identified. **Results** The fingerprint of Petauristae Faeces formula granules was established, 10 common peaks were demarcated and 2 peaks were identified. The similarity of 15 batches of Petauristae Faeces formula granules was higher than 0.90. There was a good linearity for the mass concentration of amentoflavone and kaempferol at 1.60 ~ 206.00 μg · mL⁻¹ and 1.31 ~ 181.00 μg · mL⁻¹ ($r \geq 0.9999$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 2.0%. The average recovery was 102.44% and 100.46%. **Conclusion** The fingerprint and content determination method are simple, feasible, accurate and repeatable, which

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项 (No.2021ZD0017); 国家重点研发计划 (No.2018YFC1706903); 中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室一般项目 (No.zyxx1809); 沈阳市中青年科技创新人才项目 (No.RC200204)。

作者简介: 杨立茹, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型、新技术研究, email: 1164785135@qq.com * **通信作者:** 张纯刚, 男, 硕士研究生导师, 副教授, 主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究和保健食品开发研究, email: gaogaonii123@163.com

can provide reference for the quality evaluation of *Petauristae Faeces* formula granules.

Key words: Mongolian medicine; *Petauristae Faeces*; formula granule; fingerprint; content determination

高灵脂, 别名五灵脂, 为鼯鼠科动物复齿鼯鼠 *Petaurista xanthotis* (Milne-Edwards) 的干燥粪便^[1], 其味苦, 气腥臭, 具有清热、止痛、止血化瘀、燥“协日乌素”等功效, 常用于肝胆热、胃热、腹泻、痛风、“协日乌素”病等^[2]。高灵脂含有黄酮类、酚酸类、三萜类等多种化学成分, 临床常用于治疗胸腹痛、损伤及消化系统疾病等, 具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、保护胃黏膜等药理作用^[3]。

蒙医药是蒙古族珍贵的文化遗产, 也是我国中医药学重要的组成部分^[4], 但蒙药制剂的发展相对滞后, 限制了蒙医药的推广。蒙药临床大多以汤散剂入药, 服用困难, 易呛咳且不易携带, 因此开发蒙药新剂型具有重要意义。为了保留蒙药传统特色, 蒙药配方颗粒以蒙药原粉直接加适宜辅料制成颗粒状制剂, 与传统的汤散剂相比蒙药配方颗粒服用简单, 患者依从性增加且质量稳定, 便于携带^[5]。

有报道称鼯鼠喜食侧柏、柏子仁等食物^[6], 而侧柏的有效成分是黄酮类及双黄酮类化合物, 如穗花杉双黄酮, 具有抗炎、抗菌、抗氧化、止血等作用^[7], 研究发现此药理作用与高灵脂相似, 所以认为穗花杉双黄酮为高灵脂的主要药效成分^[8]。由于高灵脂为粪便类药材, 市场上存在掺假的问题, 如使用老鼠或其他属兔科动物粪便冒充鼯鼠粪便, 或将其他粪便与侧柏叶混合制成灵脂状^[9], 因此建立高灵脂客观全面的质量评价体系具有重要意义。本研究建立了 15 批高灵脂配方颗粒的 HPLC 指纹图谱, 对其进行相似度分析, 并在此基础上测定有效成分穗花杉双黄酮的含量, 以期更好地控制高灵脂药材的质量, 保证用药安全, 为高灵脂配方颗粒的总体评价及质量控制提供依据。

1 材料

1.1 试药

高灵脂药材粉(祈蒙股份有限公司), 高灵脂配方颗粒(S1~S15)由本实验自制; 山柰酚对照品(纯度: 97.4%, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110861-202214), 穗花杉双黄酮对照品(纯度: 98%, 成都德思特生物技术有限公司, 批号:

DST211029-046); 甲醇(瑞典欧森巴克化学公司, 色谱纯), 甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯), 磷酸为分析纯, 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器

LC-1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司, 包括四元泵, VWD 可变波长扫描紫外检测器, Chemstations 化学工作站), CP225D 十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], SG3300H 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司), Y-2 摇摆制粒机(上海天和制药机械有限公司)。

2 HPLC 指纹图谱的建立

2.1 色谱条件

以 COSMOSIL C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 40%~55%A; 10~40 min, 55%A; 40~50 min, 55%~65%A; 50~53 min, 65%A; 53~65 min, 65%~80%A; 65~70 min, 80%~85%A; 70~75 min, 85%~40%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 检测波长 350 nm; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称定山柰酚、穗花杉双黄酮对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释, 制成质量浓度分别为 18.1、17.0 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 高灵脂配方颗粒的制备 分别取过 100 目筛 15 批高灵脂粉末 200 g, 加适宜辅料和润湿剂混合均匀, 制成“握之成团, 轻捏即散”的软材, 使用摇摆制粒机制粒, 干燥、整粒、分装, 得到实验室自制的 15 批高灵脂配方颗粒。

2.2.3 供试品溶液的制备 取高灵脂配方颗粒适量, 研细, 取约 0.8 g, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声溶解(功率 180 W, 频率 59 kHz) 1 h, 放至室温, 加甲醇定容至刻度线, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取高灵脂配方颗粒(S1), 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下

色谱条件连续进样测定 6 次, 记录色谱图。结果以穗花杉双黄酮为参照峰, 10 个共有峰的相对保留时间 $RSD \leq 0.17\%$, 相对峰面积 $RSD \leq 1.4\%$, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取高灵脂配方颗粒 (S1), 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 结果以穗花杉双黄酮为参照峰, 10 个共有峰的相对保留时间 $RSD \leq 0.25\%$, 相对峰面积 $RSD \leq 3.4\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取高灵脂配方颗粒 (S1), 共 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样分析, 结果以穗花杉双黄酮为参照峰, 10 个共有峰的相对保留时间 $RSD \leq 0.19\%$, 相对峰面积 $RSD \leq 1.9\%$, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度分析 取 15 批高灵脂配方颗粒样品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样分析, 记录各批次高灵脂配方颗粒样品指纹图谱。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行分析, 以 S6 为参照图谱, 采用中位数法经多点校正后生成指纹图谱 (见图 1) 和混合对照指纹图谱 (见图 2), 共标定 10 个共有峰, 经对照品指认确定: 4 号峰为山柰酚, 6 号峰为穗花杉双黄酮。根据对照图谱 R 和样品指纹图谱计算相似度, 结果见表 1。15 批高灵脂配方

颗粒与对照指纹图谱 R 的相似度均 > 0.90 。

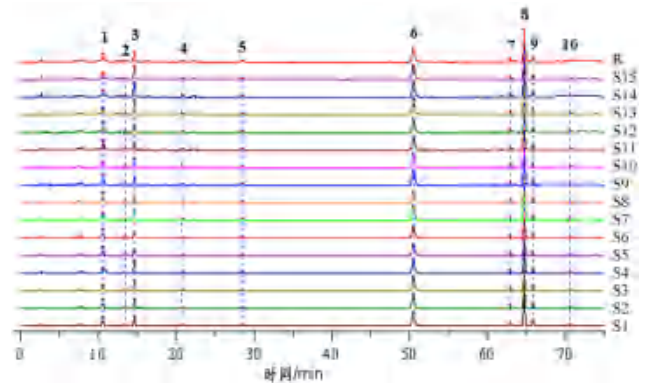


图 1 15 批高灵脂配方颗粒 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprints of 15 batches of Petauristae Faeces formula granules

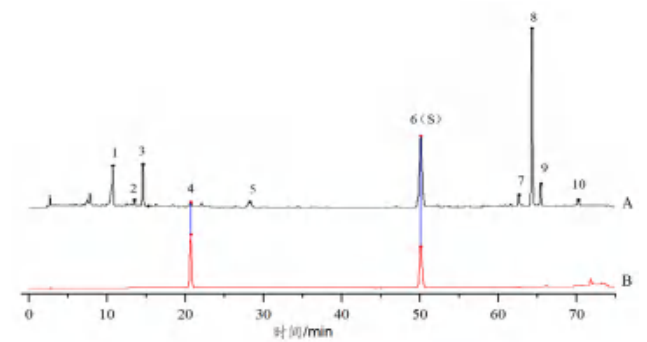


图 2 混合对照品 (A) 和高灵脂配方颗粒 (B) 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of mixed reference (A) and Petauristae Faeces formula granules (B)

4. 山柰酚 (kaempferol); 6. 穗花杉双黄酮 (amentoflavone)

表 1 15 批高灵脂配方颗粒的相似度评价结果

Tab 1 Similarity of 15 batches of Petauristae Faeces formula granules

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	1.000	0.997	0.996	0.997	0.998	0.999	0.993	0.998	0.997	0.997	0.996	0.998	0.995	0.996	0.999
S2	1.000	1.000	0.997	0.996	0.997	0.998	0.999	0.994	0.999	0.998	0.997	0.996	0.997	0.995	0.996	0.999
S3	0.997	0.997	1.000	1.000	0.992	0.994	1.000	0.988	0.994	0.999	0.992	0.991	1.000	0.999	0.999	0.999
S4	0.996	0.996	1.000	1.000	0.989	0.992	0.999	0.984	0.992	0.998	0.989	0.988	0.999	1.000	0.999	0.997
S5	0.997	0.997	0.992	0.989	1.000	1.000	0.995	0.999	0.999	0.995	1.000	1.000	0.991	0.988	0.988	0.997
S6	0.998	0.998	0.994	0.992	1.000	1.000	0.996	0.998	1.000	0.997	1.000	0.999	0.993	0.990	0.990	0.998
S7	0.999	0.999	1.000	0.999	0.995	0.996	1.000	0.991	0.997	0.999	0.995	0.994	0.999	0.998	0.998	1.000
S8	0.993	0.994	0.988	0.984	0.999	0.998	0.991	1.000	0.998	0.992	0.999	1.000	0.986	0.983	0.983	0.994
S9	0.998	0.999	0.994	0.992	0.999	1.000	0.997	0.998	1.000	0.996	1.000	0.999	0.994	0.991	0.991	0.998
S10	0.997	0.998	0.999	0.998	0.995	0.997	0.999	0.992	0.996	1.000	0.995	0.995	0.997	0.997	0.996	0.999
S11	0.997	0.997	0.992	0.989	1.000	1.000	0.995	0.999	1.000	0.995	1.000	1.000	0.991	0.988	0.988	0.997
S12	0.996	0.996	0.991	0.988	1.000	0.999	0.994	1.000	0.999	0.995	1.000	1.000	0.989	0.987	0.987	0.996
S13	0.998	0.997	1.000	0.999	0.991	0.993	0.999	0.986	0.994	0.997	0.991	0.989	1.000	0.999	1.000	0.998
S14	0.995	0.995	0.999	1.000	0.988	0.990	0.998	0.983	0.991	0.997	0.988	0.987	0.999	1.000	1.000	0.997
S15	0.996	0.996	0.999	0.999	0.988	0.990	0.998	0.983	0.991	0.996	0.988	0.987	1.000	1.000	1.000	0.997
R	0.999	0.999	0.999	0.997	0.997	0.998	1.000	0.994	0.998	0.999	0.997	0.996	0.998	0.997	0.997	1.000

3 含量测定

3.1 溶液的制备

精密称取穗花杉双黄酮和山柰酚对照品, 加入甲醇制成含 $20.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 穗花杉双黄酮和

18.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 山柰酚的混合对照品溶液。供试品溶液的制备方法同“2.2.3”项下。

3.2 方法学考察

3.2.1 专属性试验

取甲醇(空白溶剂)、混合对

照品溶液、供试品(S1)溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果见图3,供试品、混合对照品溶液在相应保留时间处有相同色谱峰,且空白溶剂无干扰,表明该方法专属性良好。

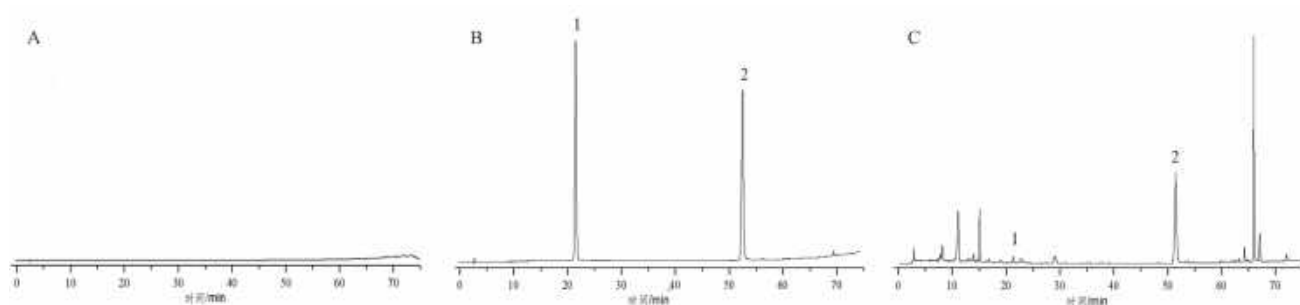


图3 空白溶剂(A)、混合对照品(B)、高灵脂配方颗粒供试品(C)的高效液相色谱

Fig 3 HPLC chromatogram of blank solvent (A), mixed reference substances (B) and Petauristae Faeces formula granules test sample (C)

1. 山柰酚(kaempferol); 2. 穗花杉双黄酮(amentoflavone)

3.2.2 精密度试验 取供试品溶液(S1),按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积^[10]。结果显示穗花杉双黄酮和山柰酚的峰面积RSD值分别为0.29%和0.70%($n=6$),表明仪器精密度良好。

3.2.3 稳定性试验 取供试品溶液(S1),分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果显示穗花杉双黄酮和山柰酚的峰面积RSD值分别为1.7%和1.9%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

3.2.4 重复性试验 取高灵脂配方颗粒(S1),共6份,制备成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并用外标法计算样品的含量。结果显示穗花杉双黄酮和山柰酚的平均含量分别为0.032%和0.0014%,RSD值分别为0.52%和1.6%,表明该方法重复性良好。

3.2.5 线性关系考察 取穗花杉双黄酮和山柰酚对照品,用甲醇溶解并逐级稀释,制成穗花杉双黄酮质量浓度分别为1.61、3.22、6.44、12.88、25.75、51.50、103.00、206.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和山柰酚质量浓度分别为1.31、1.81、2.26、3.62、4.53、9.05、18.10、181.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,进样测定,记录峰面积。以对照品质量浓度(X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线,计算回归方程。结果穗花杉双黄酮和山柰酚回归方程分别为 $Y = 37.12X - 22.72$ ($r = 0.9999$)和 $Y = 39.49X - 17.70$ ($r = 1.000$),表明穗花杉双黄酮在1.61 ~ 206.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、山柰酚在1.31 ~ 181.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关

系良好。

3.2.6 加样回收试验 取已知含量的供试品溶液6份,分别按照对照品加入量与供试品中相应成分含量的比为1:1的量精密加入穗花杉双黄酮和山柰酚对照品^[11],进样测定,测得穗花杉双黄酮和山柰酚的平均加样回收率分别为102.44%和100.46%,RSD分别为1.2%和1.9%,表明该方法回收率良好。

3.2.7 样品含量测定 取15批高灵脂配方颗粒,制备成对应供试品溶液,进样测定,计算穗花杉双黄酮和山柰酚的含量,结果见表2,表明不同批次样品间穗花杉双黄酮和山柰酚的含量存在一定差异。

表2 穗花杉双黄酮和山柰酚含量测定结果(%)

Tab 2 Content of amentoflavone and kaempferol (%)

编号	穗花杉双黄酮	山柰酚	编号	穗花杉双黄酮	山柰酚
S1	0.039	0.0023	S9	0.040	0.0018
S2	0.040	0.0021	S10	0.034	0.0021
S3	0.036	0.0024	S11	0.035	0.0015
S4	0.038	0.0026	S12	0.033	0.0015
S5	0.030	0.0014	S13	0.045	0.0030
S6	0.033	0.0016	S14	0.042	0.0031
S7	0.041	0.0023	S15	0.039	0.0029
S8	0.030	0.0014			

4 讨论

4.1 色谱条件的优化

本试验考察了不同检测波长(265、300、350 nm)、不同流动相体系(甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液)、不同柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)、不同流速(0.8、1.0、1.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)对测定结果的影响。结果表明,检测波长在350 nm、流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶

液、柱温为 30℃、流速为 1.0 mL·min⁻¹ 时, 色谱峰基线平稳、各色谱峰峰形与分离度较好。

4.2 供试品提取条件的优化

本试验考察了不同提取方式(超声、回流)、不同提取溶剂(40%、60%、80%、100% 甲醇)、不同提取时间(30、60、90 min)对有效成分的影响, 结果表明使用 100% 甲醇溶剂超声提取 1 h, 提取效率高, 有效成分含量最大。

4.3 指纹图谱及含量测定结果分析

本试验对 15 批高灵脂配方颗粒样品进行指纹图谱分析, 结果 15 批样品指纹图谱相似度均大于 0.9, 表明不同批次样品化学成分具有较好的一致性, 且所用的 HPLC 指纹图谱方法具有良好的稳定性与特征性。15 批次高灵脂配方颗粒中有效成分穗花杉双黄酮含量在 0.030% ~ 0.045%, 表明不同批次间其成分含量具有一定差异。目前高灵脂药材并没有收录于《中国药典》, 仅在 2020 年版《内蒙古蒙药饮片炮制规范》中收录, 检测项目有性状检查、薄层鉴别、水分检查等, 无含量测定项目^[12], 缺少明确的质量标准、难以实现对高灵脂配方颗粒质量的准确描述和评价。本文建立的穗花杉双黄酮的含量测定方法对制订高灵脂配方颗粒物质基准的质量标准具有一定的指导意义^[13]。

参考文献

[1] 邱清华, 邓绍云. 五灵脂化学成分与药用研究进展[J]. 江苏科技信息, 2015, 452(11): 76-78.
[2] 魏佳华, 于同月, 仝小林. 五灵脂的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(10): 1076-1079.

[3] 李雅娟, 李莎莎, 陈曦, 等. 基于 CiteSpace 的五灵脂研究进展可视化分析[J]. 中医药导报, 2022, 28(11): 159-163.
[4] 王宝丽, 马志强, 林瑞超. 蒙药的研究进展及思考[J]. 中国医药导报, 2017, 14(10): 123-126.
[5] 张闯, 陈世雨, 李葆林, 等. 蛇床子配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究及 6 种香豆素类成分含量测定[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1530-1536.
[6] Shan CX, Guo SC, Yu S, et al. Simultaneous determination of quercitrin, afzelin, amentoflavone, hinokiflavone in rat plasma by UFLC-MS-MS and its application to the pharmacokinetics of platycladus orientalis leaves extract[J]. J Chromatogr Sci, 2018, 56(10): 895-902.
[7] 张瑞峰, 曾阳, 刘力宽, 等. 侧柏叶的化学成分与药理学作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(4): 53-56.
[8] Ho KL, Ng ZX, Wang CW, et al. Comparative analysis of in vitro enzyme inhibitory activities and phytochemicals from *Platycladus orientalis* (L.) franco via solvent partitioning method[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2022, 194(8): 3621-3644.
[9] 陈雪琴, 贾文江, 周仔莉, 等. 五灵脂的质量标准研究[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(4): 469-473.
[10] 胡家震, 赵婷婷, 何席呈, 等. 苦皮藤高效液相色谱指纹图谱及多指标成分含量测定[J]. 中南药学, 2022, 20(12): 2887-2892.
[11] 方朝纛, 甘力帆, 黄醒鹏, 等. 金银花-连翘药对配方颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分含量测定研究[J]. 中南药学, 2023, 21(6): 1612-1620.
[12] 那生桑. 内蒙古蒙药饮片炮制规范[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2020.
[13] 王隆隆, 杨忠杰, 张海风, 等. 芪苓益肾颗粒高效液相色谱指纹图谱物质基准研究及 7 种成分含量测定[J]. 中南药学, 2021, 19(12): 2633-2639.

(收稿日期: 2023-07-20; 修回日期: 2023-08-07)

研究论文

抗肠道致病菌化合物筛选及其体外抗肿瘤活性研究

王芳芳^{1, 2}, 白学鑫¹, 黄亚辉¹, 刘娜^{1*}, 盛春泉^{1*} (1. 海军军医大学药理学系, 上海 200433; 2. 海军军医大学海军特色医学中心, 上海 200433)

摘要: 目的 采用具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌对化合物库(包括上市药物库和天然产物库)进行抑制剂筛选, 以获得具有成药前景的抗肠道致病菌先导化合物。**方法** 本研究通过参考《厌氧菌药物敏感性试验方法-第七版》中的微量肉汤稀释法对 5073 个化合物进行体外抗肠道致病菌抑制活性筛选, 并测定初筛阳性化合物对结肠癌细胞 HCT116 的抗肿瘤活性, 以及致病菌与肿瘤细胞共孵育环境下化合物的抗肿瘤活性, 从而获得具有抗肠道致病菌活性的先导化合物。**结果** 从 5073 个化合物中共获得 240 个具有抗肠道致病菌活性的化合物, 初筛阳性率为 4.73%; 进一步测定它们对结肠癌细胞的体外抗肿瘤活性, 获得 48 个具有明显抑制活性的化合物, 总体阳性率为 0.95%。**结论** 基于生物活性化合物库的表型筛选可以有效识别活性化合物, 发现有潜力的苗头化合物和先导化合物, 为发现新型小分子抗感染和抗肿瘤药物提供有效工具。

关键词: 肠道致病菌; 具核梭杆菌; 产肠毒素脆弱拟杆菌; 表型筛选; 抗肿瘤活性

中图分类号: R735.34

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3135-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.006

Screening and antitumor activity of leading compounds against intestinal pathogens in vitro

WANG Fang-fang^{1, 2}, BAI Xue-xin¹, HANG Ya-hui¹, LIU Na^{1*}, SHENG Chun-quan^{1*} (1. Department of Pharmacy, Navy Medical University, Shanghai 200433; 2. Navy Medical Center, Navy Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: Objective To screen inhibitors in the compound library (including the marketed drug library and the natural product library) with *Fusobacterium nucleatum* and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* to obtain the leading compound against intestinal pathogens with the prospect of being a patent drug. **Methods** Totally 5073 compounds were screened for their in vitro anti-intestinal pathogenic bacteria inhibitory activities by referring to the microbroth dilution method in the "Anaerobic bacteria drug Sensitivity Test Method (7th Edition)". The antitumor activities of the positive compound against colon cancer cell HCT116, as well as the co-incubation environment of pathogenic bacteria and tumor cells were determined to obtain the leading compounds with anti-intestinal pathogenic bacteria activity. **Results** Totally 240 active compounds were obtained, and the positive rate was 4.73%. The antitumor activity of these compounds against the colon cancer cells in vitro was further determined, and 48 compounds with obvious inhibitory activity were obtained, with an overall positive rate of 0.95%. **Conclusion** Phenotypic screening based on bioactive compound library can effectively identify active compounds, find potential seedling compounds and leading compounds, and provide an effective tool for the discovery of novel small molecule anti-infection and anti-tumor drugs.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2020YFA0509200)。

作者简介: 王芳芳, 女, 实验师, 硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: wff546@163.com *通信作者: 盛春泉, 男, 教授, 主要从事抗真菌和抗肿瘤药物研究, email: shengcq@smmu.edu.cn; 刘娜, 女, 副教授, 主要从事抗感染药物研究, email: liuna66@aliyun.com

Key words: intestinal pathogen; *Fusobacterium nucleatum*; enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*; phenotypic screening; antitumor activity

据统计, 全球每年约有 90 万人死于结直肠癌 (colorectal cancer, CRC), 结直肠癌已成为第三大致命癌症^[1]。2022 年统计数据显示, 在中国结直肠癌发病率仅次于肺癌, 位居第二位, 死亡率位居第五位, 进展期癌症患者的五年生存率不足 50%, 严重威胁人类生命健康^[2]。诱发结直肠癌的因素是多方面的, 包括饮食、遗传、不良生活习惯、肠道微生态改变等^[2-3]。

近年来, 肠道微生物群失衡被认为和结直肠癌的发病机制相关, 具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, FN) 和产肠毒素脆弱拟杆菌 (enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF) 等具有致癌可能的特定病原体被发现参与结直肠癌的发生发展^[4-5]。正常情况下, 肠道微生物能够促进肠道健康和保持肠道内环境稳定。然而, 当肠道内的细菌如具核梭杆菌、产肠毒素脆弱拟杆菌等菌群失衡时, 就会给人体健康造成影响。目前, 关于具核梭杆菌、产肠毒素脆弱拟杆菌等肠道致病菌的关键蛋白结构、致病机制尚不清楚, 选择性药物也未见报道, 因而, 针对肠道致病菌开展基于结构的合理药物设计存在困难。

表型筛选在药物研发中起到重要作用。相比于基于靶点的药物筛选, 表型筛选通过直接评估化合物在细胞水平的活性, 可以有效识别活性化合物, 发现有潜力的苗头化合物和先导化合物, 是发现新型小分子抗感染和抗肿瘤药物的有效工具。本实验采用《厌氧菌药物敏感性试验方法 - 第七版》中的微量肉汤稀释法对从上海陶素生物科技有限公司购买的化合物进行体外抗肠道致病菌抑制活性筛选, 以获得具有抗肠道致病菌活性的结构新颖的先导化合物, 为抗结直肠癌新药研发提供新的化合物来源和设计策略。

1 材料

具核梭杆菌 (ATCC 23726) 和产肠毒素脆弱拟杆菌 (ATCC 43860) (美国模式菌种收集中心), 培养人结直肠癌细胞系 HCT116、SW480 (上海中国科学院细胞中心), 测试化合物 (上海陶素生物科技有限公司), 蛋白胨、酵母浸膏、营养肉汤等培养液 (美国 BD 公司), 糖类、抗菌药物、缓冲液、培养基等其他基础试剂 (上海生工生物科技有限公司); CCK-8 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 菌株培养

从 -80 °C 冰箱挑取 10 μL 冻存菌株于 10 mL 肉汤液体培养基中活化, 置于 37 °C 厌氧罐中静置培养 24 h 后, 吸取 10 μL 一次活化的菌株于新的 10 mL 肉汤液体培养基中, 相同条件下继续培养 24 h。取二次活化好的菌液接种于沙氏葡萄糖琼脂 (SDA) 培养基中, 35 °C 静置培养 48 h。实验时挑取单克隆菌落置于肉汤液体培养基中, 静置培养 24 h 至对数生长期用于后续实验。

2.2 抗肠道致病菌活性测定

使用麦氏浊度标准管在比浊仪上定标, 注意使用前应轻轻颠倒均匀, 标准管应显示中间绿色灯亮, 此时菌原液浓度刚好为 1×10^8 cells·mL⁻¹。取 50 mL 离心管, 加入 36 mL 布氏肉汤培养液和 4 mL 马血 (浓度为 50%), 再加入 4 mL 菌原液, 即为实验用菌悬液。将配制好的菌悬液涡旋混匀后加入 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μL, 化合物从 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 开始依次倍半稀释, 使其终质量浓度为 $64 \sim 0.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 96 孔细胞培养板置于厌氧箱中并放入 35 °C 恒温培养箱中静置培养 48 h, 培养完成后使用酶标仪测定每孔细菌在 630 nm 处的光密度值 (OD_{630}), 平行测定 3 次。取抑制率 $\geq 100\%$ 时所对应的最小浓度即为该化合物的最低抑菌浓度 (MIC)。

2.3 抗肿瘤细胞活性测试

提前一日复苏细胞并放入细胞培养箱中培养, 第 2 日观察, 待细胞生长到汇合率为 80% ~ 90% 时, 将细胞消化离心, 弃上层培养基并将细胞稀释后进行计数; 细胞浓度为 6×10^4 cells·mL⁻¹, 依次加入 96 孔板中, 每孔 100 μL, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后将细胞培养板内的培养液全部吸弃, 加入含有不同浓度待测化合物的细胞培养液 100 μL, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 72 h, 移除上层培养液。采用 CCK-8 法测定肿瘤细胞增殖情况, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值, 计算化合物的抑制率, 然后将抑制率导入软件 Graphpad Prism 8 进行曲线拟合并计算 IC₅₀ 值。

2.4 肠道致病菌与结肠癌细胞互作实验

将对数生长期细胞消化离心, 弃上清液, 将细胞稀释后进行计数, 细胞浓度为 6×10^4 cells·mL⁻¹,

依次加入 96 孔板中, 每孔 100 μL 。然后将 96 孔板置于培养箱培养 48 h, 待细胞贴壁且生长汇合率达到 40% 左右时, 转入真菌培养箱继续培养; 考察化合物对致病菌与肿瘤细胞在互作条件下的影响, 首先将活化好的菌株加入离心管离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 弃掉上清, 用空白 DMEM 培养基稀释并吹打均匀, 用比浊仪对菌液浓度进行计数, 使其浓度为 $1 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按照细菌感染细胞的比例 (MOI) 配制菌悬液, 即 500 μL 菌原液加入到 10 mL DMEM 培养基中。接下来将细胞培养板内的旧的培养液全部吸弃, 依次将 100 μL 配制好的菌悬液加入到细胞培养板中。同时化合物用含 10% 血清的 DMEM 培养液按照不同浓度梯度进行稀释, 按照从低浓度至高浓度顺序依次将稀释好的含有化合物的培养液 100 μL 加入到细胞培养板中。最后将培养板放入培养箱中培养 72 h, 采用 CCK-8 法测定肿瘤细胞增殖情况, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测定细胞 OD 值, 计算化合物的抑制率, 将抑制率导入软件 Graphpad Prism 8 进行曲线拟合并计算 IC_{50} 值。

3 结果

3.1 抗具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌体外活性筛选

本研究对市售商业化合物库中 5073 个化合物 (其中 FDA 批准上市药物 2272 个, 天然产物 2801 个) 进行抗菌活性筛选, 测试的两个菌株分别为具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌。以化合物的 MIC 值来评价其体外抗肠道致病菌活性。

从适应证和靶点角度出发, 将抗菌活性筛选中具有抑制活性的药物进行了分类 (上市药物、天然产物和抗菌药物) 和总结。其中上市药物分为抗肿瘤药物、中枢神经系统药物、心血管系统药物、内分泌系统药物、呼吸系统药物、免疫系统药物、抗菌药物以及其他类等 8 类。从 5073 个化合物中共获得 240 个具有抗肠道致病菌活性的化合物, 初筛阳性率为 4.73%; 其中从 2272 个上市药物中获得 147 个活性化合物, 初筛阳性率为 6.47%; 从 2801 个天然产物中获得 93 个活性化合物, 初筛阳性率为 3.32% (见图 1)。



图 1 基于表型筛选发现抗肠道致病菌活性化合物分类

Fig 1 Classification of active compounds against enteric pathogens based on phenotypic screening

3.2 抗肠道致病菌活性化合物分类总结

经体外抗肠道致病菌活性筛选, 结果如图 2 和图 3 所示。

在抗肿瘤药物中, 安罗替尼、索拉非尼和地那西利等抗肿瘤药物对具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌均具有中等抑制活性 ($MIC = 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。查阅文献发现, 具有抑菌活性的抗肿瘤化合物大多数为酪氨酸激酶抑制剂, 主要用于治疗急性髓性白血病和非小细胞肺癌, 靶标包括 Fms 样酪氨酸激酶 3 (FLT-3)^[6], 干细胞生长

因子受体 (c-kit)^[7]、巨噬细胞集落刺激因子受体 (Fms)^[8]等。它们主要分布于造血细胞和神经组织, 也存在于胎盘、性腺和脑组织中, 对造血细胞和淋巴细胞的增殖起关键作用^[6]。其中 c-kit 是酪氨酸激酶受体蛋白家族的重要成员之一, 作为干细胞因子的受体, 可以通过一系列信号通路参与造血干细胞增殖分化和调控^[7]。

五氟利多、芬戈莫德、氟哌噻吨和替加色罗等中枢神经系统药物对具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌具有中等抑制活性 ($MIC = 16 \sim 32$

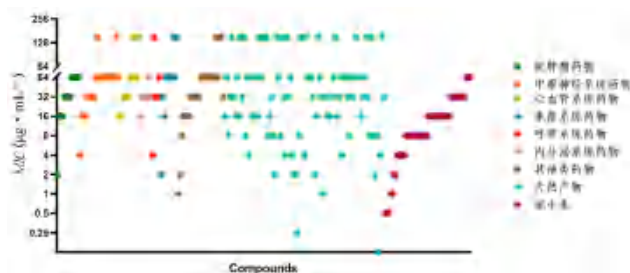


图 2 抗具核梭杆菌活性化合物的 MIC 值
Fig 2 MIC of active compounds against *Fusobacterium nucleatum*

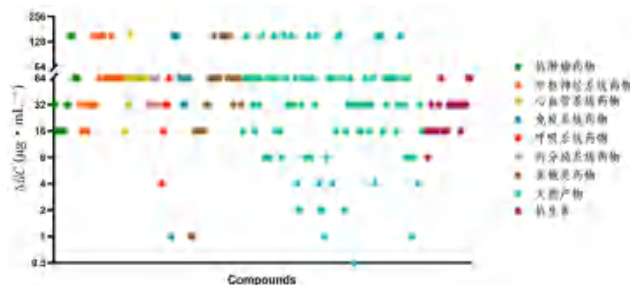


图 3 抗产肠毒素脆弱拟杆菌活性化合物的 MIC 值
Fig 3 MIC of active compounds against enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。该类药物主要作用于多巴胺受体，用于治疗帕金森综合征和精神分裂症。其中普拉克索为一种选择性作用于多巴胺 D_3 受体的多巴胺激动剂，可明显减少帕金森病静息时的震颤^[9]。五氟利多用于治疗各型精神分裂症，更适用于病情缓解患者的维持治疗^[9-10]。

心血管系统药物决奈达隆对具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌具有中等抑制活性 ($MIC = 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。另外，依他尼酸、胺碘酮、洛伐他丁、左西孟旦和替格瑞洛等药物具有一定的抑菌活性 ($MIC = 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

呼吸系统药物左旋葡聚糖对具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌抑制活性较好 ($MIC = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。左旋葡聚糖用于囊性纤维化相关呼吸道感染。另外，葡聚糖很难被胃肠道消化，同时又是肠道微生物喜欢的营养物质，能够促进双歧杆菌和乳酸菌生长，发酵后产生的酸性物质有较强的抑菌杀菌作用，进而抑制病原体的生长繁殖^[11]。

内分泌系统中测试药物为大多为激素类，对具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌抑制活性一般， MIC 在 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。例如：他莫昔芬 ($MIC_{FN} = 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

值得注意的是，免疫系统药物金诺芬对具核梭杆菌 ($MIC = 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和产肠毒素脆弱拟杆菌 ($MIC = 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 具有优秀的体外抑制活性。

金诺芬是一种金属盐，已获得美国食品药品监督管理局批准作为治疗类风湿关节炎药物。同时它也被认为具有抑制肠道细菌生长的作用，并有可能作为一种抗肿瘤药物而重新使用^[12-13]。

由于大多数的抗菌药物是杀菌药，因此普遍都对具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌表现出优秀的抑制活性。例如：益康唑 ($MIC = 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、克拉霉素 ($MIC_{FN} = 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、司帕沙星 ($MIC_{FN} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、拉氧头孢钠 ($MIC_{FN} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

天然产物具有化学结构和生物活性多样性，其活性筛选对发现有潜力的苗头化合物具有重要意义。在天然产物化合物库筛选中，我们发现了多个化合物对具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌都具有抑制活性，例如环庚三烯芬酮 ($MIC_{FN} = 0.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 0.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、4-羟基邻苯二甲酸 ($MIC_{FN} = 0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、香豆酮 ($MIC_{FN} = 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、小茴香酮 ($MIC_{FN} = 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、7-甲氧基黄酮 ($MIC_{FN} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、滨蒿内酯 ($MIC_{FN} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、二氢茉莉酮 ($MIC_{FN} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、三叶苷 ($MIC_{FN} = 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MIC_{ETBF} = 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 等。

3.3 优选化合物体外抗肿瘤细胞活性测试

基于体外抗具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌药物筛选结果，本研究挑选抑菌活性较好的 48 个化合物进行了体外抗肿瘤细胞活性测试 (测试细胞为结肠癌细胞 HCT116)。测试结果如表 1 所示，其中天然产物 2-脱氧鸟苷 IC_{50} 值为 $0.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，溴柳氯苯胺 IC_{50} 值为 $0.81 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，毛蕾异黄酮苷 IC_{50} 值 $1.31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，金诺芬 IC_{50} 值为 $0.29 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，五氟利多 IC_{50} 值为 $2.51 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，以上结果表明化合物金诺芬对肿瘤细胞抑制活性较好，具有进一步研究的潜力。

3.4 致病菌与肿瘤细胞共孵育实验

为了进一步研究优选化合物对致病菌与肿瘤细胞的共同抑制作用，从上述实验结果中优选 6 个化合物 (每个系统选 1 个代表性药物) 进行致病菌与肿瘤细胞共孵育实验。结果见表 2，罗拉吡坦、索拉非尼、金诺芬、五氟利多、益康唑和三氯苯达唑在致病菌与结肠癌细胞 SW480 共孵育条件下 IC_{50} 值均有所降低 (见图 4)。特

表 1 化合物体外抗肿瘤细胞活性 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Tab 1 Antitumor cell activity of the compounds in vitro ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

化合物	IC_{50}	化合物	IC_{50}	化合物	IC_{50}
金诺芬	0.29	色瑞替尼	11.05	7-甲氧基黄酮	26.78
五氟利多	2.51	索拉非尼	2.61	滨蒿内酯	23.18
环吡酮	7.36	恩曲替尼	1.15	鬼臼脂酮	56.64
决奈达隆	4.71	他莫昔芬	4.32	2-脱氧鸟苷	0.34
罗拉吡坦	4.17	舍他康唑	4.17	十九烷酸	13.78
苜蓿素	5.55	咪康唑	5.76	毛薷异黄酮苷	1.31
胺碘酮	3.42	益康唑	3.51	5-氨基戊酸	11.20
地舍平	5.78	异康唑	3.74	去氧孕烯	25.07
替格瑞洛	4.88	布康唑	2.66	3-吡啶乙腈	6.08
溴柳氯苯胺	0.81	唑咕啉	2.05	5-氯-8-羟基喹啉	2.48
奈非那韦	3.92	芥酸	2.14	马尿酸	0.74
双硫氧吡啶	2.42	氨基蝶呤	11.20	雌酚酮	51.22
三氯苯咪唑	27.90	来氟米特	10.15	氧化芍药苷	43.26
山柰酚	43.64	γ -萘内酯	51.23	泰比培南酯	52.37
氟芬那酸	48.23	土贝母苷	50.12	7-羟基黄酮	63.29
木五塘	49.25	多巴胺	42.35	辣椒素	59.61

别是，金诺芬对结肠癌细胞 SW480 的 IC_{50} 值为 $8.31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，而在与具核梭杆菌共孵育条件下 IC_{50} 值下降为 $4.19 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，与产肠毒素脆弱拟杆菌共孵育条件下 IC_{50} 值下降为 $4.94 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，提示该化合物在抑制肠道致病菌的同时可以提升抗肿瘤活性，是一个有潜力的具有抗肠道致病菌和抗肿瘤双重作用的先导化合物，值得进一步研究。

4 讨论

肠道微生物群调控结直肠癌发生发展的途径有以下几种：一是共生细菌或其产物的浸润激活

表 2 致病菌与肿瘤细胞共孵育时化合物的体外抗肿瘤细胞活性 ($IC_{50}, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Tab 2 In vitro antitumor cell activity of compounds incubated with enteric pathogens and tumor cells ($IC_{50}, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

化合物	IC_{50}		
	具核梭杆菌+ SW480	产肠毒素脆弱拟杆 菌+ SW480	SW480
罗拉吡坦	4.20	5.41	6.36
索拉非尼	1.64	1.91	2.20
金诺芬	4.19	4.94	8.31
五氟利多	3.26	4.18	3.70
益康唑	4.85	5.12	6.45
三氯苯达唑	9.45	9.65	9.91

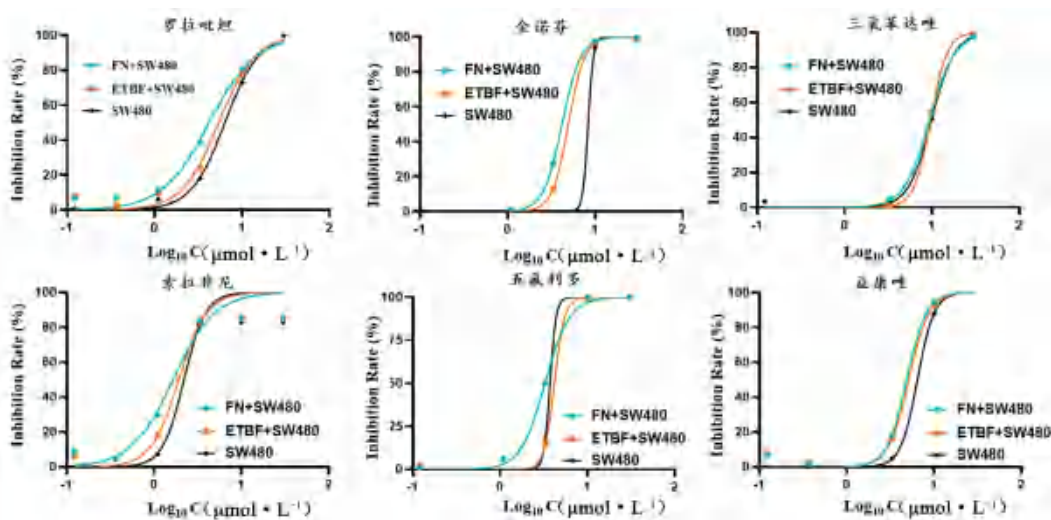


图 4 致病菌与肿瘤细胞共孵育实验 (化合物 IC_{50} 拟合曲线)

Fig 4 Co-incubation experiment of enteric pathogens and tumor cells (partial compound IC_{50} fitting curve)

肿瘤相关的髓系细胞，诱导肿瘤细胞产生炎症反应，二是肠道内的致病菌及其产生的毒力因子黏

附在结肠上皮细胞上，促进肿瘤发生；三是细菌产生的基因毒素导致结肠上皮细胞中 DNA 损伤

并加重结直肠癌的发展；四是在慢性炎症的刺激下，炎症细胞可以产生活性氧和活性氮，而导致 DNA 损伤；此外还包括一些细菌代谢产物，例如次生胆汁酸、硫化氢和亚硝基复合物，也会导致 DNA 损伤，从而增加结直肠癌的发生率^[14-17]。

随着结直肠癌的发病率和死亡率逐年升高，肠道致病菌作为与结直肠发生相关的关键病原体，正成为近年来研究的热点。然而由于靶标不明确，作用机制不了解，使得开发靶向这些关键病原体的药物研发变得困难重重。于是以化合物活性为导向、暂不关注其作用机制的研究策略将更有可能获得结构新颖、作用机制独特且具有成药前景的先导化合物来源。本研究对市售商业化合物库中 5073 个化合物进行体外抗肠道致病菌活性筛选并进行分类总结。同时基于体外抗具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌药物筛选结果，挑选了抑菌活性较好的 48 个化合物进行了体外抗肿瘤细胞活性测试，结果发现金诺芬等化合物对肿瘤细胞（HCT116）均具有较好的抑制活性。金诺芬临床上用于治疗风湿病，既不属于抗菌药物也不属于抗肿瘤药物，然而对肿瘤细胞具有抑制活性，因而具有开发成全新作用机制抗肿瘤药物的潜力。此外，还选取了 6 个抗肿瘤细胞活性较好的化合物进行了致病菌与肿瘤细胞共孵育实验，测试了两者互作条件下化合物的抗肿瘤细胞活性变化，研究发现金诺芬在致病菌与肿瘤细胞共孵育条件下可以显著提升药物的抗肿瘤活性，既能在抑制肠道致病菌活性的同时又发挥抑制肿瘤细胞增殖作用，从而实现协同增效的目的。

通过表型筛选，我们发现了很多不同作用系统、不同作用机制的药物都具有抑制具核梭杆菌和产肠毒素脆弱拟杆菌活性，这也为后续研究提供了很好的化合物来源。对于表型筛选获得的高活性化合物，特别是一些具有较好抗肿瘤活性、高效低毒的非抗肿瘤药物，可以基于药物重定位策略对其进行生物活性评价和初步的作用机制研究，具有很好的开发前景。对于活性一般的化合物，也可以通过结构改造和优化，提升其抑菌活性和抗肿瘤活性，为开发新型靶向结直肠癌药物提供新的来源。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72 (1): 7-33.
[2] Stappenbeck TS, Virgin HW. Accounting for reciprocal

- host-microbiome interactions in experimental science [J]. *Nature*, 2016, 534 (7606): 191-199.
[3] Poore GD, Kopylova E, Zhu Q, et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach [J]. *Nature*, 2020, 579 (7800): 567-574.
[4] Nejman D, Livyatan I, Fuks G, et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria [J]. *Science*, 2020, 368 (6494): 973-980.
[5] Boleij A, Hechenbleikner EM, Goodwin AC, et al. The *Bacteroides fragilis* toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 60 (2): 208-215.
[6] Markovic A, Mackenzie KL, Lock RB. Flt-3: a new focus in the understanding of acute leukemia [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37 (6): 1168-1172.
[7] Stankov K, Popovic S, Mikov M. C-kit signaling in cancer treatment [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20 (17): 2849-2880.
[8] Novatcheva ED, Anouty Y, Saunders I, et al. Fms-like tyrosine kinase 3 inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2022, 22 (3): e161-e184.
[9] Hametner EM, Seppi K, Poewe W. Pramipexole extended release in Parkinson's disease [J]. *Expert Rev Neurother*, 2011, 11 (9): 1229-1234.
[10] Pich J. Review: chlorpromazine versus penfluridol for schizophrenia [J]. *Issues Ment Health Nurs*, 2018, 39 (9): 814-815.
[11] Huang G, Huang H. Application of dextran as nanoscale drug carriers [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2018, 13 (24): 3149-3158.
[12] Momose I, Onodera T, Kawada M. Potential anticancer activity of auranofin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2021, 141 (3): 315-321.
[13] Liu YH, Lu YL, Xu ZR, et al. Repurposing of the gold drug auranofin and a review of its derivatives as antibacterial therapeutics [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27 (7): 1961-1973.
[14] Francescone R, Hou V, Grivnennikov SI. Microbiome, inflammation, and cancer [J]. *Cancer J*, 2014, 20 (3): 181-189.
[15] Sears CL, Geis AL, Housseau F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (10): 4166-4172.
[16] Herrou J, Choi VM, Bubeck Wardenburg J, et al. Activation mechanism of the *Bacteroides fragilis* cysteine peptidase, fragipain [J]. *Biochemistry*, 2016, 55 (29): 4077-4084.
[17] Brennan CA, Garrett WS. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2016, 70: 395-411.

(收稿日期: 2023-03-06; 修回日期: 2023-05-30)

深海来源帚状弯孢聚壳菌 (*Eutypella scoparia* W2) 的化学成分研究

胡曼宜¹, 蒋家阳^{1, 2}, 徐琳¹, 刘柱², 杨献文^{1*} (1. 自然资源部第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 海南大学生命科学学院, 海口 570228)

摘要: **目的** 研究深海来源帚状弯孢聚壳菌的化学成分。**方法** 采用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶色谱、高效液相色谱等现代色谱分离技术, 对帚状弯孢聚壳菌的发酵粗提物进行系统的分离纯化, 对所获得的化合物采用核磁等波谱数据分析, 最终确定其化学结构, 并对其抑菌活性测试。**结果** 从帚状弯孢聚壳菌中分离获得了 6 个天然化合物, 分别鉴定为 penicopeptide A (1)、viridicatin (2)、cyclophenol (3)、ergosterol peroxide (4)、pestalotiopin A (5)、4-methyl-5,6-dihydropyren-2-one (6)。6 个化合物对 4 种致病菌均未显示出很强的抑制活性 (在 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 抑菌率低于 50%)。**结论** 化合物 1、2、3、5、6 均为首次从该属真菌中分离得到。

关键词: 深海; 真菌; 帚状弯孢聚壳菌; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3141-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.007

Chemical constituents of deep-sea-derived *Eutypella scoparia* W2

HU Man-yi¹, JIANG Jia-yang^{1, 2}, XU Lin¹, LIU Zhu², YANG Xian-wen^{1*} (1. Key Laboratory of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen Fujian 361005; 2. College of Life Sciences, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of deep-sea-derived *Eutypella scoparia* W2. **Methods** The crude extract of *Eutypella scoparia* W2 was systematically isolated and purified by column chromatography on repeated silica gel, Sephadex LH-20, and ODS, etc. The chemical structures of the isolated compounds were identified by extensive analysis of the NMR spectroscopic data. The inhibitory activities of all isolates were investigated against 4 pathogenic bacteria. **Results** Totally 6 compounds were obtained from *Eutypella scoparia* W2, including penicopeptide A (1), viridicatin (2), cyclophenol (3), ergosterol peroxide (4), pestalotiopin A (5), and 4-methyl-5,6-dihydropyren-2-one (6). However, none showed significant antibacterial effects, namely growth inhibition rate lower than 50% under the concentration of 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** Compounds 1, 2, 3, 5, and 6 have been isolated from the genus of *Eutypella* for the first time.

Key words: deep-sea; fungus; *Eutypella scoparia* W2; chemical constituent

弯孢聚壳属 (*Eutypella*) 真菌隶属于子囊菌门、炭角菌目、胶孢壳科, 是一种广泛分布于陆地和海洋的真菌^[1-2], 然而, 其化学成分的研究近十几年才有报道^[3], 从中先后发现了萜类、细胞松弛素类、甾体、内酯类等次级代谢产物^[4-7], 这些化合物大多具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒等活

性^[8-11]。到目前为止, 关于深海来源弯孢聚壳菌的研究鲜有报道。前期, 本课题组从南大西洋深海 (-3073 m) 的硫化物中分离获得了一株帚状弯孢聚壳菌株 W2, 经系统的化学成分研究, 一共获得 6 个化合物 (见图 1), 现对其发酵、分离、鉴定及抗菌活性进行报道。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 22177143)。

作者简介: 胡曼宜, 女, 硕士研究生, 主要从事海洋天然药物化学研究, email: humanyi@tio.org.cn * **通信作者:** 杨献文, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事海洋天然药物研究, email: yangxianwen@tio.org.cn

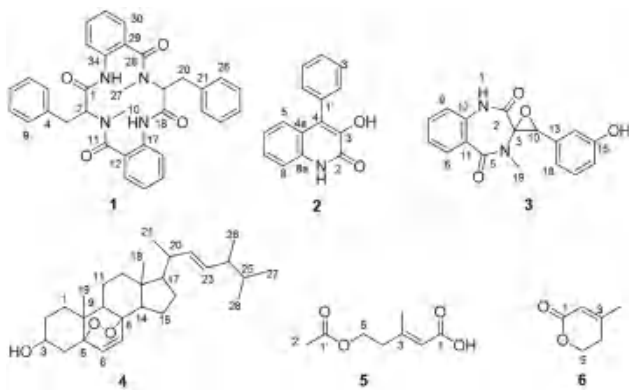


图 1 化合物 1 ~ 6 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 ~ 6

1 材料

1.1 仪器与试剂

高分辨质谱仪 (Waters Xevo G2Q-TOF), 全数字化核磁共振仪 (Bruker Avance II 400 MHz / 600 MHz), 高效液相色谱仪 (Agilent 1260), 氘代试剂 (氘代二甲基亚砜、氘代氯仿、氘代甲醇, 美国 CIL 公司), 葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, GE Healthcare Bio-Sciences AB), ODS 柱 (Daiso, Japan), 柱层析硅胶、薄层层析硅胶板 (山东烟台江友硅胶开发有限公司), 其他化学试剂 (分析纯, 广州化学试剂有限公司)。

1.2 菌株来源

帚状弯孢聚壳菌株 W2 是从南大西洋深海 (-3073 m) 硫化物中分离得到的。经过 ITS 基因序列 (MT258647) 及 16S rRNA 序列分析, 鉴定为帚状弯孢聚壳 (*Eutypella scoparia*)。

2 方法与结果

2.1 菌株发酵培养

将菌种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基中活化培养 4 d, 使用无菌水洗下孢子, 将孢子悬液接种到 3 个盛有 250 mL 的马铃薯葡萄糖水培养基的 1 L 锥形瓶中, 将培养液置于摇床中, 在 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 28°C 的条件下培养 3 d 制成种子液。随后将种子液均匀接种到 50 瓶盛有 200 g 大米和 1.5% 海盐培养基的 1 L 锥形瓶中, 室温下进行大规模发酵培养 30 d。

2.2 提取、分离与纯化

发酵产物经乙酸乙酯浸泡提取, 得到粗提物 14 g, 然后溶于甲醇中, 用石油醚进行脱脂后, 得到 5.4 g 粗提物, 经硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯 ($90\% \rightarrow 60\%$, $t = 6 \text{ h}$, $V = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 梯度洗脱, 通过薄层色谱法显色检测分析, 合并成 4 段 (Fr.1 ~ Fr.4)。

Fr.1 (1.1 g) 经过 ODS 反相硅胶柱色谱, 以甲醇-水 ($5\% \rightarrow 100\%$, 6 h) 梯度洗脱得到 7 个组分 (Fr.1.1 ~ Fr.1.7)。Fr.1.2 经过制备液相 (甲醇-水, $80\% \rightarrow 100\%$) 分离得到化合物 5 (12.5 mg)。Fr.1.7 经过葡聚糖凝胶色谱 (Sephadex LH-20, 二氯甲烷-甲醇, 1:1) 分离得到化合物 4 (450 mg)。Fr.2 (0.6 g) 经凝胶色谱 (Sephadex LH-20, 甲醇) 获得 4 个组分 (Fr.2.1 ~ Fr.2.4), 继而由制备液相分离得到化合物 6 (75.0 mg) 和化合物 2 (9.5 mg)。Fr.3 (0.7 g) 经过多次制备液相 (甲醇-水, $5\% \rightarrow 40\%$) 分离, 得到化合物 1 (12.0 mg)。Fr.4 (0.3 g) 经多次制备液相 (甲醇-水, $5\% \rightarrow 40\%$) 分离, 最终得到化合物 3 (17.9 mg)。

2.3 结构鉴定

化合物 1: 白色固体, 易溶于甲醇。HRESIMS m/z : 583.2320 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$, 583.2321); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.96 (1H, d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, H-13), 7.82 (1H, d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, H-30), 7.60 (1H, t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-15), 7.52 (1H, t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-32), 7.34 (1H, t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-14), 7.28 (1H, m, H-31), 7.16 ~ 7.23 (9H, m, H-6, 7, 8, 16, 22, 23, 24, 25, 26), 7.07 (1H, d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, H-33), 7.02 (2H, d, $J = 7.3 \text{ Hz}$, H-5, 9), 4.43 (1H, t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, H-19), 4.33 (1H, dd, $J = 10.5, 6.8 \text{ Hz}$, H-2), 3.40 (1H, dd, $J = 14.5, 8.0 \text{ Hz}$, H_2 -20), 3.25 (1H, dd, $J = 14.5, 7.3 \text{ Hz}$, H_2 -20), 3.07 (3H, s, H-27), 2.90 (3H, s, H-10), 2.79 (1H, dd, $J = 13.6, 6.7 \text{ Hz}$, H_2 -3), 2.67 (1H, t, $J = 10.9 \text{ Hz}$, H_2 -3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 172.1 (C-1), 171.0 (C-18), 170.6 (C-28), 168.1 (C-11), 138.0 (C-21), 137.8 (C-34), 137.0 (C-4), 136.8 (C-17), 134.0 (C-15), 133.6 (C-32), 132.1 (C-13), 131.6 (C-30), 129.9 (C-26), 129.9 (C-22), 129.8 (C-9), 129.8 (C-5), 129.7 (C-8), 129.7 (C-6), 129.5 (C-25), 129.5 (C-23), 128.1 (C-29), 128.1 (C-7), 127.7 (C-12), 127.6 (C-24), 125.8 (C-31), 125.7 (C-14), 121.9 (C-33), 121.4 (C-16), 69.6 (C-2), 57.7 (C-19), 39.6 (C-10), 35.0 (C-3), 32.7 (C-20), 29.4 (C-27); 综合分析化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HRESIMS, 并结合文献^[12]鉴定化合物 1 为 penicopeptide A。

化合物 2: 无色针晶, 易溶于甲醇。HRESIMS m/z : 260.0704 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Na}$, 260.0687); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ :

7.04 ~ 7.07 (2H, m, H-5, H-6), 7.31 ~ 7.36 (4H, m, H-7, H-8, H-2', H-6'), 7.44 (1H, t, $J=7.4$ Hz, H-4'), 7.51 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H-3', H-5'), 9.21 (1H, s, H-3), 12.23 (1H, s, H-1); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 158.4 (C-2), 142.5 (C-3), 133.8 (C-8a), 133.2 (C-1'), 129.9 (C-2', C-6'), 128.3 (C-3', C-5'), 127.7 (C-4'), 126.5 (C-7), 124.3 (C-4), 124.0 (C-5), 122.2 (C-6), 121.0 (C-4a), 115.3 (C-8); 综合分析化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HRESIMS, 并结合文献^[13] 鉴定化合物 **2** 为 viridicatin。

化合物 **3**: 无色晶体, 易溶于甲醇。HRESIMS m/z : 333.0856 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$, 333.0851); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.55 (1H, m, H-8), 7.17 (1H, m, H-9), 7.16 (1H, m, H-7), 7.15 (1H, m, H-6), 7.00 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-17), 6.70 (1H, dd, $J = 2.2, 8.1$ Hz, H-16), 6.14 (1H, m, H-14), 6.11 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-18), 4.07 (1H, s, H-10), 3.19 (3H, s, H-19); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 168.5 (C-2), 168.2 (C-5), 158.2 (C-15), 136.2 (C-11), 133.8 (C-8), 133.3 (C-13), 132.0 (C-6), 130.1 (C-17), 127.8 (C-12), 125.9 (C-7), 122.1 (C-9), 118.3 (C-18), 116.9 (C-16), 113.7 (C-14), 71.4 (C-3), 65.7 (C-10), 31.5 (C-19); 综合分析化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HRESIMS, 并结合文献^[14] 鉴定化合物 **3** 为 cyclophenol。

化合物 **4**: 无色针晶, 易溶于甲醇。HRESIMS m/z : 451.3179 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3\text{Na}$, 451.3188); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.44 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.23 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.23 (1H, dd, $J = 15.3, 7.5$ Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, $J = 15.6, 8.2$ Hz, H-22), 3.97 (1H, m, H-3), 0.96 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.81 (3H, d, H-19), 0.79 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.78 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.76 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 135.6 (C-6), 135.3 (C-22), 131.6 (C-23), 130.2 (C-7), 81.5 (C-5), 78.5 (C-8), 64.7 (C-3), 55.5 (C-17), 51.3 (C-14), 50.9 (C-9), 44.1 (C-13), 42.0 (C-24), 39.3 (C-20), 38.8 (C-12), 36.9 (C-4), 36.5 (C-10), 34.5 (C-1), 32.5 (C-25), 30.0 (C-2), 28.3

(C-16), 22.9 (C-11), 20.8 (C-21), 20.3 (C-15), 19.8 (C-27), 19.5 (C-26), 17.9 (C-19), 17.3 (C-28), 12.6 (C-18); 综合分析化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HRESIMS, 并结合文献^[15] 鉴定化合物 **4** 为 ergosterol peroxide。

化合物 **5**: 无色油状物, 易溶于甲醇。HRESIMS m/z : 195.0640 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Na}$, 195.0640); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.69 (1H, s, H-2), 4.22 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-5), 2.47 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-4), 2.16 (3H, s, 3- CH_3), 2.01 (3H, s, H-2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 172.7 (C-1), 169.8 (C-1'), 156.9 (C-3), 118.9 (C-2), 62.9 (C-5), 40.6 (C-4), 20.7 (C-2'), 18.6 (3- CH_3); 综合分析化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HRESIMS, 并结合文献^[16] 鉴定化合物 **5** 为 pestalotiopin A。

化合物 **6**: 褐色油状物, 易溶于甲醇。HRESIMS m/z : 135.0421 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calc. for $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2\text{Na}$, 135.0422); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.76 (1H, m, H-2), 4.37 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-5), 2.44 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, H-4), 2.01 (3H, s, 3- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 167.4 (C-1), 162.1 (C-3), 116.4 (C-2), 67.5 (C-5), 29.9 (C-4), 22.9 (3- CH_3); 综合分析化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HRESIMS, 并结合文献^[17] 鉴定化合物 **6** 为 4-methyl-5, 6-dihydropyren-2-one。

2.4 抑菌活性研究

对分离得到的 6 个化合物进行抑菌活性测试。取过夜培养的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血弧菌以及维氏气单胞菌等 4 种病原菌, 按 1×10^6 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的初始接种量接种至新鲜的 LB 液体培养基中, 置于 37°C 培养箱中, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 4 ~ 6 h, 然后使用 MHB 培养基将其稀释至 1×10^6 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 96 孔板各孔中分别加入 100 μL 菌液备用。取化合物母液, 用 MHB 培养基将化合物稀释至 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 各孔加入 100 μL 稀释后的化合物溶液, 随后将 96 孔板置于 37°C 培养箱静置培养; 16 ~ 18 h 后取出, 使用酶标仪测量 600 nm 处的吸光度。然后根据以下公式计算生长抑制率:

$$\text{生长抑制率}(\%) = (\text{试验组} - \text{空白组}) / (\text{对照组} - \text{空白组}) \times 100\%$$

对照组为等量含病原菌的 MHB 培养基, 空白组为等量纯净的 MHB 培养基, 各实验组重复 3 次。结果见图 2, 在 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 化合物 **4** 对

沙门氏菌的抑菌率达到 33.3%，化合物 1 对副溶血弧菌的抑菌率达到 24.7%，其余化合物对几种细菌的抑菌率均低于 20%。但所有化合物在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下的抑菌活性都不强（抑菌率 < 50%）。

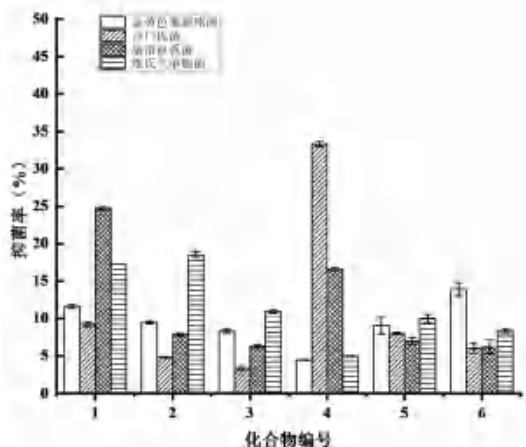


图 2 化合物 1 ~ 6 的抑菌活性实验结果

Fig 2 Antibacterial activity of compounds 1 ~ 6

3 讨论

本研究通过对深海来源帚状弯孢聚壳菌 W2 开展系统的化学成分研究，一共分离得到 6 个化合物，包括 2 个环肽生物碱（1、3）、1 个喹啉生物碱（2）、1 个甾体（4）、1 个脂肪酸衍生物（5）和 1 个环内酯（6）。除化合物 4 外，其余化合物均为首次从该属真菌中分离得到，所有化合物在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下均未表现出强的抑菌活性。之前关于弯孢聚壳属真菌化学成分的报道多集中于萜类、细胞松弛素类和甾体类化合物。环肽类化合物首次报道于 2017 年，从弯孢聚壳菌 *Eutypella* sp. MCCC 3A00281 中分离得到^[18-19]，本文是首次从 *Eutypella scoparia* 中分离得到，丰富了弯孢聚壳属真菌的化学多样性研究。

参考文献

[1] Hong JH, Jang S, Heo YM, et al. Investigation of marine-derived fungal diversity and their exploitable biological activities [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13 (7): 4137-4155.

[2] 许丹, 马吉飞, 苗祯, 等. 北极 Ny-Ålesund 地区真菌多样性分析及龙胆苦苷转化菌株的筛选 [J]. *极地研究*, 2012, 24 (4): 372-383.

[3] 谭俊杰, 张捷, 李医明. 弯孢聚壳属真菌次级代谢产物及其生物活性 [J]. *菌物学报*, 2017, 36 (9): 1181-1191.

[4] Zhang WG, Lu XX, Huo LQ, et al. Sesquiterpenes and steroids from an Endophytic *Eutypella scoparia* [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84 (6): 1715-1724.

[5] Zhang WG, Wang MM, Zhang S, et al. Eutyscoparols A-G, polyketide derivatives from endophytic fungus *Eutypella scoparia* SCBG-8 [J]. *Fitoterapia*, 2020, 146: 104681.

[6] 孙利, 李冬利, 陈玉婵, 等. 海洋真菌帚状弯孢聚壳菌 FS26 代谢产物的分离鉴定与抗肿瘤活性研究 [J]. *菌物学报*, 2011, 30 (2): 268-274.

[7] Zhang WG, Lu XX, Wang H, et al. Antibacterial secondary metabolites from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* SCBG-8 [J]. *Tetrahedron Lett*, 2021, 79: 153314.

[8] Zhang W, Zhu Y, Yu H, et al. Libertellenone H, a natural pimarane diterpenoid, inhibits thioredoxin system and induces ROS-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells [J]. *Molecules*, 2021, 26 (2): 315.

[9] Lu XL, Liu JT, Liu XY, et al. Pimarane diterpenes from the Arctic fungus *Eutypella* sp. D-1 [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2014, 67 (2): 171-174.

[10] Kongprapan T, Rukachaisirikul V, Saithong S, et al. Cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-H267 [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 13: 171-176.

[11] Mao ZL, Zhang WH, Wu CY, et al. Diversity and antibacterial activity of fungal endophytes from *Eucalyptus exserta* [J]. *BMC Microbiol*, 2021, 21 (1): 155.

[12] Sun WG, Chen XT, Tong QY, et al. Novel small molecule 11β -HSD1 inhibitor from the endophytic fungus *Penicillium commune* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26418.

[13] Ciegler A, Hou CT. Isolation of viridicatin from *Penicillium palitans* [J]. *Arch Mikrobiol*, 1970, 73 (3): 261-267.

[14] Li J, Wang J, Jiang CS, et al. (+)-Cyclophenol, a new naturally occurring 7-membered 2, 5-dioxopiperazine alkaloid from the fungus *Penicillium sclerotiorum* endogenous with the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16 (5): 542-548.

[15] Zhang AL, He LY, Gao JM, et al. Metabolites from an endophytic fungus sphaeloma sp. LN-15 isolated from the leaves of *Melia azedarach* [J]. *Lipids*, 2009, 44 (8): 745-751.

[16] Xu J, Aly AH, Wray V, et al. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2011, 52 (1): 21-25.

[17] Reggelin M, Gerlach M, Vogt M. Metallated 2-alkenyl sulfoximines in asymmetric synthesis: regio- and stereoselective synthesis of highly substituted oxabicyclic ethers and studies towards the total syntheses of the euglobals G1 and G2 and arenaran A [J]. *Eur J Org Chem*, 1999, 1999 (5): 1011-1031.

[18] Niu SW, Liu D, Shao ZZ, et al. Eutypellazines A-M, thiodiketopiperazine-type alkaloids from deep sea derived fungus *Eutypella* sp MCCC 3A00281 [J]. *RSC Adv*, 2017, 7 (53): 33580-33590.

[19] Niu SW, Liu D, Shao ZZ, et al. Eutypellazines N-S, new thiodiketopiperazines from a deep sea sediment derived fungus *Eutypella* sp with anti-VRE activities [J]. *Tetrahedron Lett*, 2017, 58 (38): 3695-3699.

(收稿日期: 2023-05-16; 修回日期: 2023-05-29)

7-取代去氢骆驼蓬碱衍生物的毒性评价及机制研究

方永晟, 杨洪柳, 刘永建, 苏知君, 杨宇萍, 黎晓晶, 刘永刚* (北京中医药大学, 北京 102488)

摘要: **目的** 根据构效关系对去氢骆驼蓬碱的 7 位进行结构修饰以得到低毒性化合物, 并基于代谢组学探讨其减毒机制。**方法** 将去氢骆驼蓬碱衍生生成哈尔酚后, 通过酯化反应得到 7-取代去氢骆驼蓬碱衍生物, 并用 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ 、IR 和 MS 对其进行表征。通过 CCK-8 法测定衍生物对 HepG2 细胞增殖的影响, 并以秀丽隐杆线虫为模型进行毒性评价, 然后基于液质研究药物对线虫内源性代谢物的影响。**结果** 去氢骆驼蓬碱给药导致线虫体长变短、身体弯曲频率降低、死亡率上升, 而 7-取代衍生物对线虫的毒性反应均下降, 其中高浓度 ($320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) **1b** 给药组与空白组的线虫相比也未见显著性差异。代谢组学结果表明, 相比于去氢骆驼蓬碱, **1b** 给药对线虫体内嘌呤代谢通路的影响力水平显著降低。此外, 两种药物都会下调线虫体内多种氨基酸 (如 L-丙氨酸、L-谷氨酸、L-精氨酸等) 含量, 还会上调线虫 SOD-3 蛋白水平。**结论** **1b** 对线虫的生长、发育、运动能力的毒性比去氢骆驼蓬碱显著降低, 其减毒效应可能与降低对线虫体内的嘌呤代谢通路的影响有关。此外, 去氢骆驼蓬碱和 **1b** 都会导致线虫氨基酸代谢通路紊乱, 这可能会影响活性氧稳态并激活氧化应激反应。

关键词: 去氢骆驼蓬碱; 结构修饰; 毒性评价; 秀丽隐杆线虫; 代谢组学

中图分类号: R96, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)12-3145-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.008

Toxicity evaluation and mechanism of 7-substituted harmine derivatives

FANG Yong-sheng, YANG Hong-liu, LIU Yong-jian, SU Zhi-jun, YANG Yu-ping, LI Xiao-jing, LIU Yong-gang* (Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To obtain less toxic derivatives by modifying 7-position of harmine according to the structure-activity relationship, and determine the mechanism on the basis of metabolomics. **Methods** After the derivatization of harmine to harmol, 7-substituted harmine derivatives were obtained by esterification and characterized by $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, IR, and MS. The proliferation of HepG2 cells was determined by CCK-8 assay, and the toxicity was evaluated with *Caenorhabditis elegans*. Then the effect of drugs on the endogenous metabolites in worms were determined based on UPLC/MS. **Results** Administration of harmine reduced the worms' body length, and body bending frequency but increased the mortality. Whereas the 7-substituted harmine showed lower toxic responses to the worms, without significant difference between the high concentration group ($320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) **1b** and the blank group. The metabolomics indicated that **1b** had a reduced effect on the purine metabolic pathway as compared with harmine. In addition, both harmine and **1b** downregulated the content of several amino acids (L-alanine, L-glutamic acid, and L-arginine), but upregulated the content of SOD-3 protein in the worms. **Conclusion** **1b** is much less toxic to the growth, development, and motility of worms than harmine, which may be related to the reduced effect on the purine metabolic pathway. Both harmine and **1b** cause the disruption of amino acid metabolic pathways, which might affect ROS homeostasis and activate oxidative stress responses.

Key words: harmine; structure modification; toxicity evaluation; *Caenorhabditis elegans*; metabolomics

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (No.7232283)。

作者简介: 方永晟, 男, 硕士研究生, 主要从事中药物质基础研究, email: a13562616095@163.com *通信作者: 刘永刚, 男, 教授, 主要从事中药药效物质基础研究, email: liuyg0228@163.com

去氢骆驼蓬碱 (harmine, 简称 HAM) 是一种以 β -咪唑为母核结构的化合物, 其在蒺藜科骆驼蓬属植物骆驼蓬 (*Peganum harmala* L.) 的种子中大量存在。去氢骆驼蓬碱具有多种生理活性, 比如能够诱导 β 细胞增殖、提高胰岛质量并改善血糖控制^[1]; 抑制 Tau 磷酸化, 具有治疗阿尔茨海默病的潜力^[2]; 对多种肿瘤细胞 (如肺癌^[3]、胃癌^[4]、肝癌^[5] 等) 的抗增殖或抗迁移能力。然而, 去氢骆驼蓬碱具有显著的神经毒性, 其高剂量时引发小鼠震颤、抽搐、四肢僵直、呼吸困难并死亡^[6-7]。此外, 去氢骆驼蓬碱对秀丽隐杆线虫的生长发育、繁殖能力、运动能力等也有显著的负面影响^[8]。近年来, 在对去氢骆驼蓬碱的多个位点进行衍生化后, 进行毒性、活性评价的研究已有很多^[9], 这都为阐明去氢骆驼蓬碱的构效关系奠定了强有力的基础。去氢骆驼蓬碱的 2 位引入苄基会增强其神经毒性, 而其 7 位甲氧基被大基团取代会消除化合物的神经毒性。Cao 等^[10] 将大的烷氧基团引入去氢骆驼蓬碱的 7 位后发现新衍生物对小鼠的神经毒性显著降低, 急性毒性与死亡率下降。

在之前的研究中, 去氢骆驼蓬碱给药后会造成线虫体内的嘌呤通路紊乱, 导致其体内多种嘌呤产物含量下调及终产物尿酸的含量上调; 其次还会影响氨基酸代谢相关通路, 造成多种氨基酸 (如 L-谷氨酸、L-精氨酸、L-蛋氨酸、L-脯氨酸等) 含量的下调^[11]。药物进入线虫体内后造成的嘌呤代谢与相关氨基酸代谢通路的紊乱可能是其产生神经毒性的机制。因此, 去氢骆驼蓬碱低毒性衍生物对线虫体内代谢通路的影响也需要进一步研究。基于此, 本文在去氢骆驼蓬碱的 7 位定向引入小分子基团后, 以 HepG2 肝癌细胞模型和秀丽隐杆线虫模型进行抗肿瘤活性与毒性评价, 并探讨优势化合物对线虫内源性代谢产物的影响, 为去氢骆驼蓬碱低毒性衍生物的开发和安全性研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞与试药

人肝癌细胞系 HepG2 细胞 (中国科学院细胞典藏库); N2 野生型线虫、CF1553 线虫、缺陷型大肠埃希菌 *E. coli* OP50 (中国科学院遗传与发育生物学研究所惠赠); 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、1% 双抗 (100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 U·mL⁻¹ 链霉素)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA (美国 Gibco 公司); PBS 溶液 (P1020-500, 美国索莱宝); 酵母提取物、胰蛋白酶、琼脂粉、胆固醇 (上海源叶生物科技有限公司);

其余试剂均购自麦克林试剂网。

1.2 仪器

细胞计数仪器 (Countstar); 全波长酶标仪 (Molecular Devices SpectraMax i3x); 十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司); 荧光倒置显微镜 (D-LH/LC, Nikon); CO₂ 培养箱、UPLC-MS、Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机 (Thermo Fisher Scientific); 生化培养箱 (Thermo)。

2 方法与结果

2.1 测定条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Waters UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm), Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC (1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm); 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C; 流动相 A 为水 (含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为乙腈 (含 0.1% 甲酸); 梯度洗脱 (0 ~ 7 min 30%B; 7 ~ 9 min 70%B; 9 ~ 12 min 80%B; 12 ~ 15 min 90%B)。

2.1.2 质谱条件 负离子检出模式, 离子源温度 350 $^{\circ}$ C, 喷雾电压 3.5 kV, S-LensRF 电压 60 V, 毛细管温度 300 $^{\circ}$ C, 鞘气和辅助气均为高纯氮气 (纯度 > 99.99%), 鞘气流速 35 arb, 辅助气流速 10 arb; 数据采集采用一级全扫描 (m/z 100 ~ 1200) 与数据依赖性二级质谱扫描, 碰撞模式采用高能量碰撞解离 (HCD)。

2.2 衍生物的合成

衍生物的合成路线见图 1。首先, 取去氢骆驼蓬碱 (1.06 g, 5.0 mmol) 于 100 mL 茄形瓶中, 加入 15 mL 冰乙酸, 15 mL 40% 氢溴酸水溶液, 130 $^{\circ}$ C 加热回流 10 h, TLC (展开剂为二氯甲烷-甲醇 = 10 : 1) 监测反应, 反应完成后, 用饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH 至 8 左右, 静置产生大量沉淀, 抽滤, 水洗滤饼, 干燥, 得到黄绿色固体哈尔酚 (0.96 g, 4.8 mmol)。哈尔酚取适量用 4 mL 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解, 加入 2 个当量的小分子酸, DMAP/EDCI 作为催化剂加入 1.5 个当量, 40 $^{\circ}$ C 搅拌反应 8 h, TLC (展开剂为二氯甲烷-甲醇 = 15 : 1) 监测反应。反应完全后加入 15 倍量体积的水, 同体积乙酸乙酯萃取 3 次, 饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤并回收溶剂, 并过硅胶柱色谱纯化 (洗脱剂为二氯甲烷-甲醇 = 15 : 1), 衍生物 **1a** ~ **1f** 用 ¹H NMR、¹³C NMR、IR 和 MS 进行表征。

哈尔酚, 黄绿色固体, 产率 96%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.22 (s, 1H, 9-NH), 9.72 (s, 1H, 7-OH), 8.11 (d, J = 5.3 Hz,

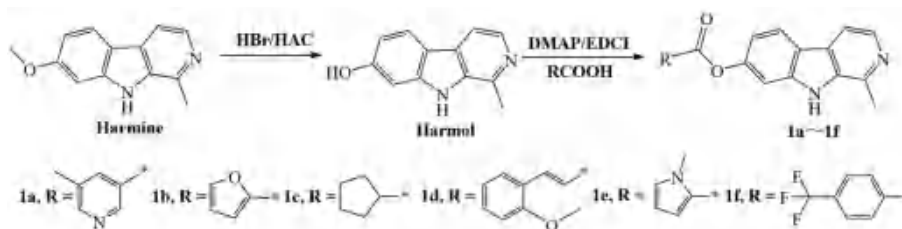


图 1 7-取代去氢骆驼蓬碱衍生物的合成

Fig 1 Synthesis of 7-substituted harmine derivatives

1H, H-3), 7.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-4), 7.73 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-5), 6.90 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8), 6.70 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H, H-6), 2.72 (s, 3H, 1-CH₃)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 158.7 (C-7), 142.7 (C-1), 141.4 (C-9), 138.1 (C-3), 134.9 (C-12), 128.1 (C-11), 123.1 (C-5), 114.3 (C-10), 112.1 (C-6), 110.1 (C-4), 97.1 (C-8), 20.7 (1-CH₃)。波谱数据与文献报道一致^[12], 故鉴定为哈尔酚。

7-(5-methylpyridine-3-formyloxy)-1-methyl-9-H- β -carbolin (**1a**), 白色固体, 产率 78%; ESI-MS: m/z 318.13 [M + H]⁺; 分子式为 C₁₉H₁₅N₃O₂, IR: 3358, 3158, 3090, 2988, 2894, 1727, 1629, 1571, 1485, 1440, 1387, 1293, 1234, 1159, 1031, 959, 854 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.76 (s, 1H, 9-NH), 9.13 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-4'), 8.77 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6'), 8.34 ~ 8.29 (m, 2H), 8.24 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-5), 7.96 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-8'), 7.54 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-8), 7.18 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H, H-6), 2.78 (s, 3H, 1-CH₃), 2.45 (s, 3H, 7'-CH₃)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.5 (2'-CO), 155.1 (C-7), 150.8 (C-4'), 148.3 (C-6'), 142.6 (C-1), 141.1 (C-9), 138.4 (C-3), 138.1 (C-12), 135.6 (C-4'), 134.2 (C-5'), 127.1 (C-11), 125.3 (C-5), 123.1 (C-10), 119.7 (C-3'), 114.3 (C-6), 113.1 (C-4), 105.6 (C-8), 20.9 (1-CH₃), 18.1 (C-7')。

7-(α -furoyloxy)-1-methyl-9-H- β -carbolin (**1b**), 白色固体, 产率 89%; ESI-MS: m/z 293.09 [M + H]⁺; 分子式为 C₁₇H₁₂N₂O₃, IR: 3129, 3043, 2954, 2856, 2765, 2716, 1741, 1627, 1565, 1468, 1390, 1291, 1230, 1173, 1110, 1013, 955, 861 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.74 (s, 1H, 9-NH), 8.30 ~ 8.20 (m, 2H), 8.14 (dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H, H-5'), 7.95 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H,

H-5), 7.64 (dd, $J = 3.5, 0.8$ Hz, 1H, H-7'), 7.48 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-8), 7.12 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H, H-6), 6.84 (dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H, H-6'), 2.77 (s, 3H, 1-CH₃)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 157.1 (2'-CO), 150.2 (C-7), 149.1 (C-5'), 143.6 (C-1), 142.6 (C-3'), 141.1 (C-9), 138.4 (C-3), 135.6 (C-12), 127.1 (C-11), 123.1 (C-5), 120.7 (C-10), 119.7 (C-6), 114.3 (C-7'), 113.3 (C-4), 113.1 (C-6'), 105.5 (C-8), 20.8 (1-CH₃)。

7-cyclovaleryloxy-1-methyl-9-H- β -carbolin (**1c**), 白色固体, 产率 90%; ESI-MS: m/z 295.15 [M + H]⁺; 分子式为 C₁₈H₁₈N₂O₂, IR: 3562, 3138, 3055, 2965, 2870, 2788, 1736, 1625, 1566, 1443, 1324, 1296, 1232, 1145, 975, 878 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.65 (s, 1H, 9-NH), 8.26 ~ 8.16 (m, 2H), 7.92 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-5), 7.30 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-8), 6.97 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H, H-6), 3.10 (tt, $J = 8.7, 7.2$ Hz, 1H, H-3'), 2.76 (s, 3H, 1-CH₃), 2.10 ~ 1.85 (m, 4H), 1.77 ~ 1.55 (m, 4H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 175.3 (2'-CO), 151.0 (C-7), 142.5 (C-1), 141.1 (C-9), 138.3 (C-3), 135.5 (C-12), 127.1 (C-11), 122.9 (C-5), 119.3 (C-10), 114.3 (C-6), 113.1 (C-4), 105.3 (C-8), 43.5 (C-3'), 29.9 (C-4', C-7'), 25.9 (C-5', C-6'), 20.8 (1-CH₃)。

7-(2-methoxycinnamoyloxy)-1-methyl-9-H- β -carbolin (**1d**), 白色固体, 产率 88%; ESI-MS: m/z 359.14 [M + H]⁺; 分子式为 C₂₂H₁₈N₂O₃, IR: 3125, 3037, 2927, 2851, 2760, 2711, 1722, 1623, 1587, 1492, 1443, 1322, 1293, 1234, 1078, 950, 866 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.72 (s, 1H, 9-NH), 8.26 ~ 8.22 (m, 2H), 7.95 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-5), 7.90 (dd, $J = 16.0, 2.0$ Hz, 1H, H-4'), 7.44 ~ 7.38 (m, 4H), 7.09 ~ 7.04 (m, 2H), 6.99 (dd,

$J = 16.1, 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H-3'), 3.83 (s, 3H, 6'-OCH₃), 2.77 (s, 3H, 1-CH₃)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 165.6 (2'-CO), 160.1 (C-6'), 150.9 (C-7), 146.9 (C-4'), 142.5 (C-1), 141.2 (C-9), 138.3 (C-3), 135.8 (C-12), 135.5 (C-8'), 130.5 (C-10'), 127.1 (C-11), 123.0 (C-5), 121.8 (C-9'), 119.4 (C-10), 118.2 (C-5'), 117.5 (C-6), 114.4 (C-3'), 113.7 (C-4), 113.1 (C-7'), 105.4 (C-8), 55.8 (6'-OCH₃), 20.9 (1-CH₃)。

7-(*N*-methylpyrrol-2-formyloxy)-1-methyl-9-*H*- β -carbolin (**1e**), 白色固体, 产率 87%; ESI-MS: m/z 306.13 [M + H]⁺; 分子式为 C₁₈H₁₅N₃O₂; IR: 3133, 3054, 2915, 2869, 2773, 2178, 1708, 1628, 1567, 1440, 1322, 1221, 1147, 1091, 1002, 952, 884 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.69 (s, 1H, 9-NH), 8.27 ~ 8.20 (m, 2H), 7.94 (d, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 7.41 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H-8), 7.27 (t, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H-7'), 7.18 (dd, $J = 4.0, 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H-5'), 7.08 (dd, $J = 8.5, 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 6.23 (dd, $J = 4.0, 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H-6'), 3.93 (s, 3H, 4'-NCH₃), 2.77 (s, 3H, 1-CH₃)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 159.4 (2'-CO), 150.8 (C-7), 142.5 (C-1), 141.2 (C-9), 138.3 (C-3), 135.5 (C-12), 132.1 (C-5'), 127.2 (C-11), 122.9 (C-5), 121.2 (C-3'), 119.6 (C-10), 119.3 (C-7'), 114.7 (C-6), 113.1 (C-4), 108.7 (C-6'), 105.7 (C-8), 36.9 (NCH₃), 20.8 (1-CH₃)。

7-(4-trifluoromethylbenzoyloxy)-1-methyl-9-*H*- β -carbolin (**1f**), 白色固体, 产率 79%; ESI-MS: m/z 371.10 [M + H]⁺; 分子式为 C₂₀H₁₃F₃N₂O₂; IR: 3368, 3157, 2874, 1720, 1630, 1568, 1412, 1322, 1258, 1127, 1063, 1015, 979, 885 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.76 (s, 1H, 9-NH), 8.43 ~ 8.37 (m, 2H), 8.33 ~ 8.20 (m, 2H, H-4', H-8'), 8.02 (m, 2H, H-5', H-7'), 7.96 (d, $J = 5.2 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 7.55 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, H-8), 7.19 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H-6), 2.78 (s, 3H, 1-CH₃)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.3 (2'-CO), 150.8 (C-7), 142.6 (C-1), 141.1 (C-9), 138.2 (C-3), 135.6 (C-12), 133.5 (C-6'), 131.3 (C-4', C-5', C-7', C-8'), 127.2 (C-11), 126.5 (C-3'), 126.4 (CF₃), 123.1 (C-5), 119.7 (C-10), 114.4 (C-6), 113.2 (C-4),

105.6 (C-8), 20.8 (1-CH₃)。

2.3 衍生物对 HepG2 肝癌细胞增殖的影响

HepG2 细胞培养于完全 DMEM 培养基 (含 10% FBS 胎牛血清、双抗), 于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。细胞种板并饥饿 24 h 后加入目标浓度的含药培养基, 继续培养 48 h 后用 CCK-8 法检测去氢骆驼蓬碱及其衍生物对 HepG2 细胞的抗增殖活性。结果如图 2 所示, 浓度 < 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 衍生物对细胞的抗增殖活性均低于去氢骆驼蓬碱, 衍生物对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 均 > 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这表明去氢骆驼蓬碱的 7 位进行基团衍生后会降低抗肿瘤活性, 该结果与文献报道相似^[10], 而在高浓度 (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下, 衍生物 **1a** 与 **1b** 表现出显著的抑制 HepG2 细胞增殖效果。

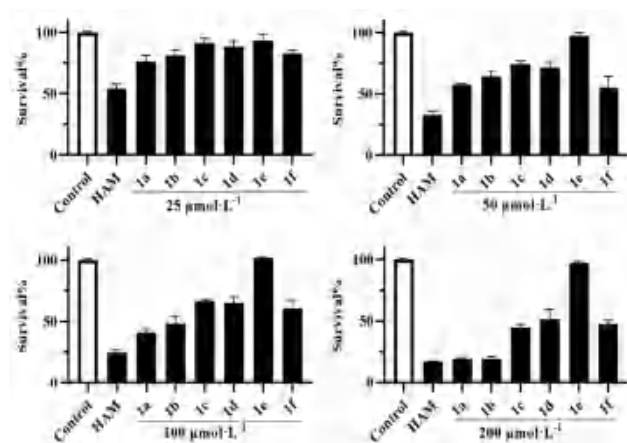


图 2 衍生物 **1a** ~ **1f** 对 HepG2 细胞活力的影响

Fig 2 Effect of derivatives **1a** ~ **1f** on the viability of HepG2 cells

2.4 衍生物的毒性评价

以秀丽隐杆线虫为模型, 对衍生物进行毒性评价。在药物暴露实验后, 线虫的体长可以反映其生长发育情况, 身体弯曲频率可以反映其神经运动能力, 而存活率可以反映药物对线虫整体的毒性。按照文献^[8]中的方法, 线虫 L1 期食物给药且 NGM 培养基中亦添加等浓度的药物, 待线虫生长至成虫时测量线虫的体长及 10 s 内的身体弯曲频率, 并统计给药 7 d 后线虫的生存情况。结果如图 3 所示, 去氢骆驼蓬碱给药后的线虫体长变短, 身体弯曲频率降低, 表现出显著的生长、运动能力受制, 且死亡率上升。7 位取代衍生物给药的线虫的毒性明显下降甚至消失, 其中, 即使是高浓度 (320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) **1b** 的给药, 线虫的生长发育、运动能力、生存情况仍然未见显著性差异。因此可以选中 **1b** 作为代表化合物, 并基于代谢组学探讨其减毒机制。

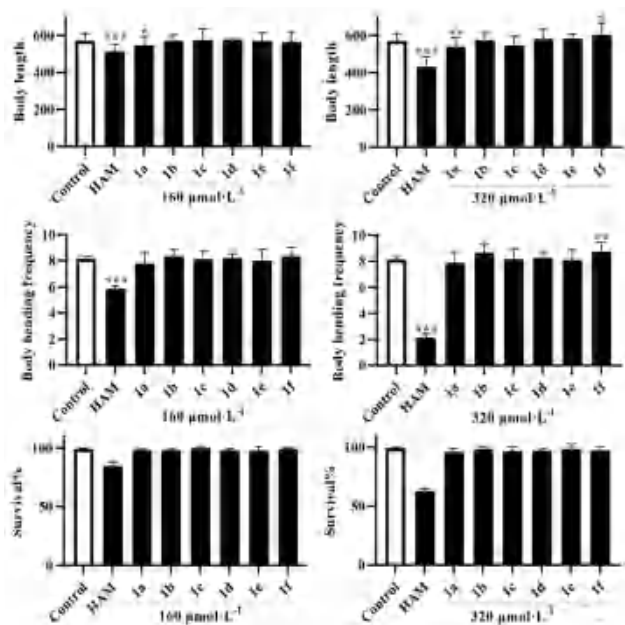


图 3 衍生物的毒性评价

Fig 3 Toxicity evaluation of derivatives

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

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

2.5 代谢组学分析

去氢骆驼蓬碱给药导致线虫内源性嘌呤代谢通路和相关氨基酸代谢通路的紊乱可能是其毒性作用机制。为了探究 **1b** 降低毒性是否与影响线虫体内的嘌呤代谢或相关氨基酸代谢有关，在同条件下将 **1b** 给药后的线虫提取体内代谢物进行代谢组学分析。按照文献^[11]中的方法，收集给药后的线虫并提取代谢物进行液质检测。在代谢物数据库 Metlin 和 HMDB 中进行代谢物的鉴定与识别，并将采集的代谢物信息在 Metaboanalyst 网站中进行代谢通路分析。KEGG 富集代谢通路如图 4 所示，且排名前三的通路情况如图 5 所示。其中，青绿色表示未匹配到或未见显著差异的信息，红色代表给药引起的差异性代谢成分（KEGG ID 的中文名称见表 1）。结果表明，**1b** 主要影响的是线虫体内的氨基酸代谢通路，给药后会引起线虫相关氨基酸（如 L-丙氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-脯氨酸等）的含量下调，这与去氢骆驼蓬碱给药对线虫代谢物的影响结果高度相似。去氢骆驼蓬碱与 **1b** 对嘌呤代谢通路的影响的结果如图 6 所示。紫色为去氢骆驼蓬碱给药引起差异的代谢物，黄色为 **1b** 给药引起差异的代谢物，红色为 **1b** 和去氢骆驼蓬碱给药均引起差异的代谢物。结果表明，相比于去氢骆驼蓬碱，**1b** 给药引起的嘌呤代谢中间产物减少，对嘌呤代谢通路的影响降低，这可能是其降低毒性的机制。

表 1 代谢物名称信息

Tab 1 Name information of metabolites

KEGG ID	代谢物	KEGG ID	代谢物
C00387	鸟苷	C00041	L-丙氨酸
C00008	ADP	C00152	L-天门冬酰胺
C00242	鸟嘌呤	C00036	草酸酯
C00294	肌苷	C00025	L-谷氨酸
C00147	腺嘌呤	C00169	磷酸氨甲酰
C00262	次黄嘌呤	C00042	琥珀酸盐
C00385	黄嘌呤	C00148	L-脯氨酸
C00366	尿酸	C00064	L-谷氨酰胺
C00655	黄原酸	C00062	L-精氨酸
C00942	cGMP	C00097	L-半胱氨酸

2.6 去氢骆驼蓬碱与 **1b** 的 XOD 酶抑制力研究

嘌呤代谢紊乱导致尿酸水平升高，这通常会导导致高尿酸血症，进而导致多种病理反应，如氧化应激、细胞凋亡和炎症等^[12-15]。黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase, XOD）是嘌呤代谢通路中的一种关键酶，其专一性不高，催化嘌呤代谢产物转换为尿酸，也催化多种底物生成氧化物引起连锁反应。为了研究两种药物引起的嘌呤代谢差异是否与抑制 XOD 有关，在体外测定药物酶抑制能力并通过分子对接与分子动力学研究作用关系。参考文献^[16]中的方法，酶标仪的测量模式设置为动力学模式，温度为 37℃，选择实验开始时间反应的 5~15 min，每 30 s 测试一次，计算光度值变化回归方程的斜率 K ，以其代表尿酸的生成速率并计算 XOD 的活性。以别嘌呤醇为阳性药物，去氢骆驼蓬碱对 XOD 抑制能力较弱，**1b** 的酶抑制力有所提高，但两者的差距并不明显（见表 2）。

表 2 XOD 酶活力检测

Tab 2 XOD enzyme activity assay

成分	XOD 酶活力 /%
去氢骆驼蓬碱	87.74 ± 2.09
1b	72.64 ± 3.20
阳性药物别嘌呤醇	23.93 ± 1.21

从 PDB 数据库中获取 XOD 的晶体结构（PDB: 3NVY），以原配体位点为参考，对蛋白和小分子预处理后，在 Autodock Vina 软件中进行分子对接，对接的结果在 Pymol 中可视化。在 AMBER 软件进行分子动力学模拟，共轭梯度法进行体系能量优化，在 302.15 K 的温度下进行 50 ns 的 NPT 模拟。结果如图 7 所示，**1b** 与 XOD 的结合能较低（-49.79 kJ·mol⁻¹），可与多个氨基酸残基形成氢键，具有一定的稳定性。均方根偏差（RMSD）变化用来评测模拟系统的平衡以及复合物是否稳定，氢键数量变化用来评估分子内部的相互作用的改变情况，回旋半径（Rg）变化用来评估蛋白质的紧密程度及结构

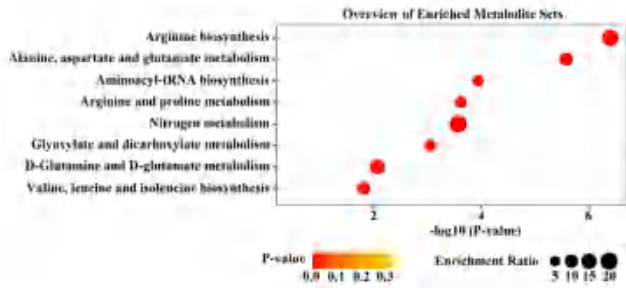


图 4 代谢通路富集分析
Fig 4 Metabolic pathways enrichment analysis

变化程度, SASA 变化用来评估蛋白疏水性及空间构象的稳定性。**1b** 与 XOD 形成的复合物与空蛋白的 RMSD 波动差距并非十分显著, 其均方根偏差波动在 15 ns 后趋于稳定, 表明其具有一定的稳定性; 其氢键的断裂和形成反映出分子内部的相互作用发生了变化, 氢键数量在 1~5 波动, 也显示出作用力的动态支撑; 15 ns 时复合物的 Rg 波动性变大, 观察到其上升趋势, 这表明该复合物的体系开始膨胀松散, 25 ns 时, 溶剂可及表面积 (SASA) 开始升高, 表明

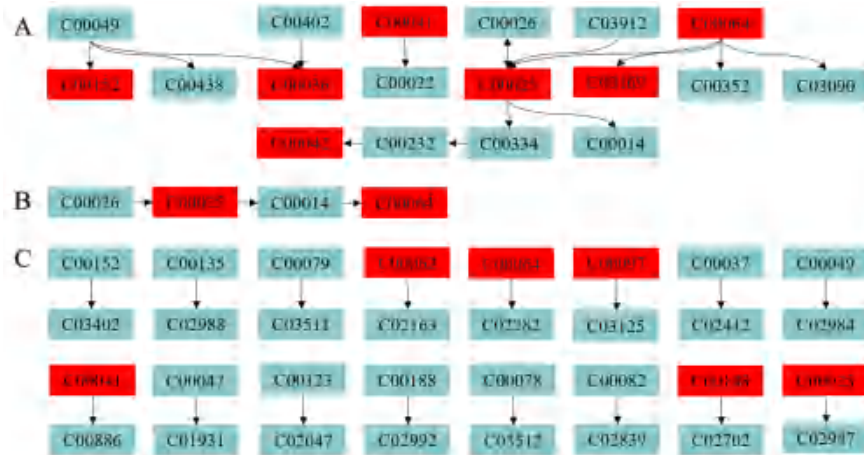


图 5 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (A)、精氨酸生物合成 (B)、氨酰-tRNA 生物合成 (C) 的代谢通路分析
Fig 5 Metabolic pathway analysis of alanine, aspartate, and glutamate metabolism (A), arginine biosynthesis (B), and aminoacyl-tRNA biosynthesis (C)

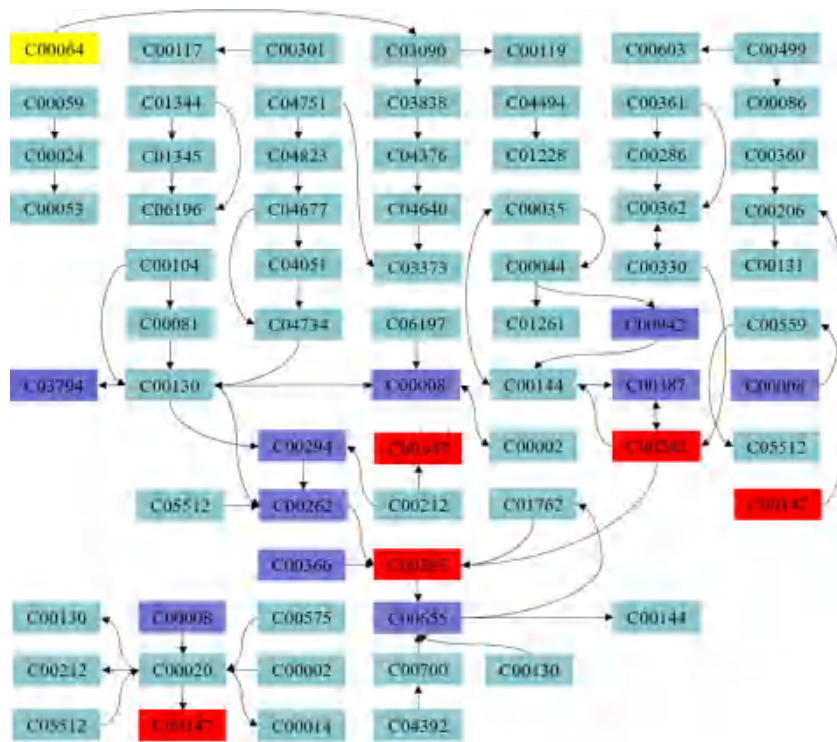


图 6 药物对线虫嘌呤代谢通路的影响
Fig 6 Effect of drugs on the purine metabolic pathway in worms

构象关系的变化导致分子表面积增加, 这会使得分子表面暴露给溶剂的区域更多, 不利于小分子配体

与靶蛋白的结合。药物产生嘌呤代谢的差异是否与抑制 XOD 的活性有关也需要进一步的体内实验研究。

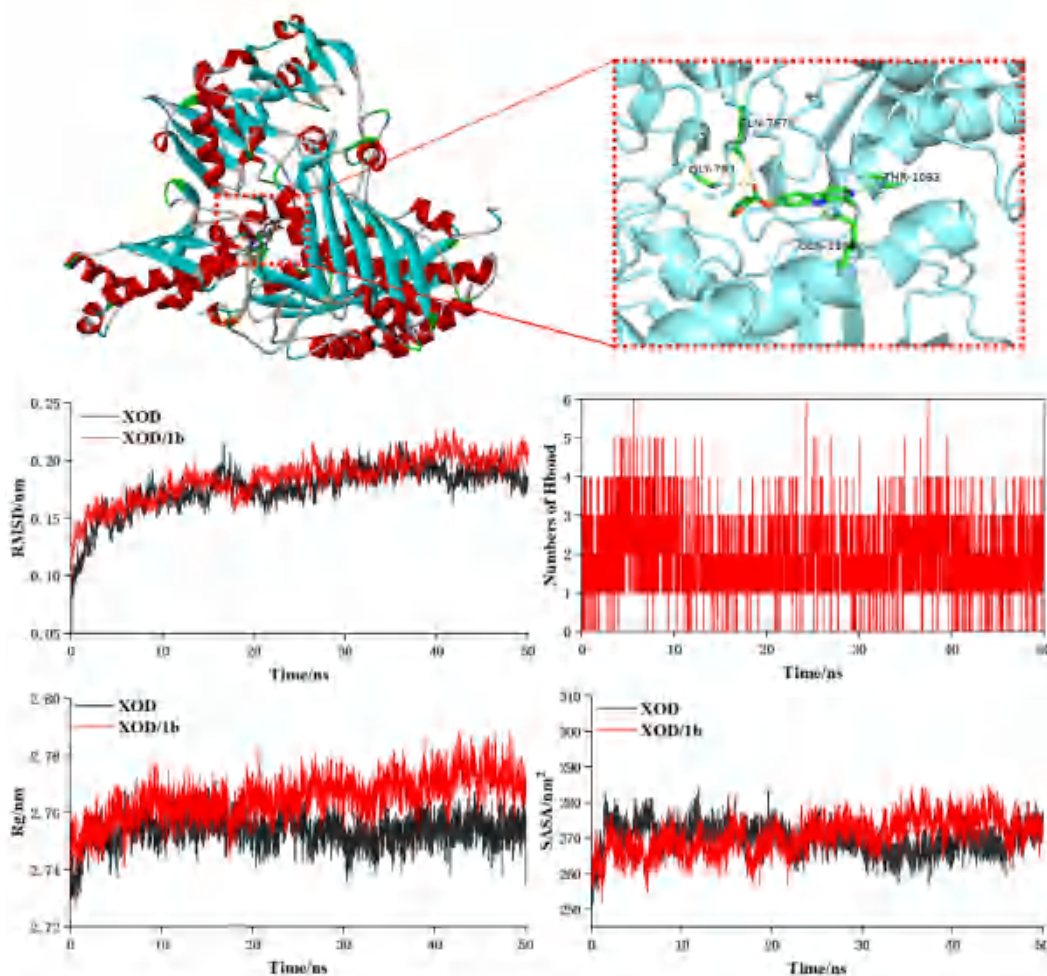


图 7 XOD/1b 的结合作用分析

Fig 7 Analysis of the binding effect of XOD/1b

2.7 HAM 与 1b 对线虫体内 SOD-3 蛋白含量的影响

氨基酸代谢和氧化还原应激之间存在着一定的联系，例如，谷氨酸与 L-精氨酸参与谷胱甘肽的合成，是生物体内的主要抗氧化剂，谷氨酸和 L-精氨酸的缺乏会直接或间接降低生物体的抗氧化能力^[17-19]；一些支链氨基酸也在调节体内能量代谢平衡、氧化应激等方面也发挥着重要作用^[20-21]。去氢骆驼蓬碱与 1b 导致的氨基酸代谢的紊乱可能与氧化应激反应的失衡有关，因此需要进一步探究药物是否同步引起线虫体内的氧化应激。CF1553 线虫是一种 GFP 标记超氧化物歧化酶 3 (SOD-3) 蛋白的线虫，SOD-3 参与清除体内的活性氧 (ROS) 等氧化物，其水平的变化反映了 ROS 水平的变化，因此可用来研究药物引起的氧化应激。按照文献^[22]中的测量方法，CF1553 线虫卵期给药生长至成虫后在荧光显微镜下采集图像，并用 Image J 软件量化荧光强度。结果如图 8 所示，去氢骆驼蓬碱与 1b 都会引起线虫体内

SOD-3 含量的上调，表明药物使线虫的 ROS 水平升高，其作为促氧化剂激活氧化应激，这种应激反应也许与相关氨基酸含量的下调有关。

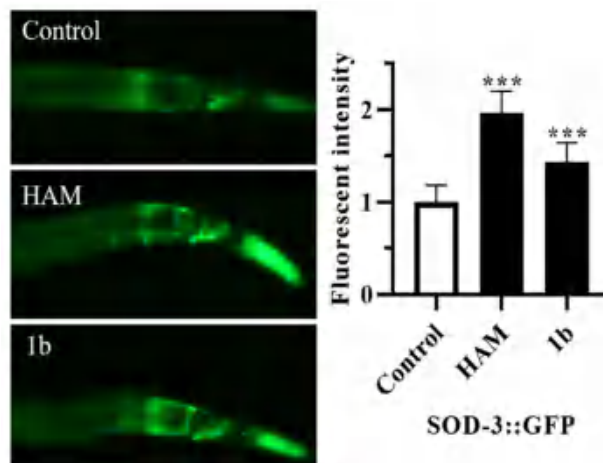


图 8 HAM 与 1b 对线虫 SOD-3 蛋白的影响

Fig 8 Effect of HAM and 1b on the content of SOD-3 in worms

注：与对照组比较，*** $P < 0.001$ 。

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

3 结论

去氢骆驼蓬碱的 7 位引入咪喃酰氧基团后对线虫造成的生长发育、运动能力的毒性显著降低, 药物对线虫嘌呤代谢干扰程度的大幅下降可能是其减毒效应的机制, 而给药后相关氨基酸代谢的紊乱可能与 ROS 稳态失衡及氧化应激反应激活有关, 这些结果有助于进一步理解去氢骆驼蓬碱的神经毒性。此外, 本文首次验证了线虫可作为一种方便简洁的工具用于去氢骆驼蓬碱衍生物的毒性筛选, 且揭示了毒性与内源性代谢的联系, 这可以为结构修饰后的去氢骆驼蓬碱的毒理作用及安全性研究提供参考。

参考文献

- [1] Wang P, Alvarez-Perez JC, Felsenfeld DP, et al. A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (4): 383-388.
- [2] Patil P, Thakur A, Sharma A, et al. Natural products and their derivatives as multifunctional ligands against Alzheimer's disease [J]. *Drug Dev Res*, 2020, 81 (2): 165-183.
- [3] Li YL, Zhou DM, Xu S, et al. DYRK1A suppression restrains Mcl-1 expression and sensitizes NSCLC cells to Bcl-2 inhibitors [J]. *Cancer Biol Med*, 2020, 17 (2): 387-400.
- [4] Li C, Wang YH, Wang CC, et al. Anticancer activities of harmine by inducing a pro-death autophagy and apoptosis in human gastric cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2017, 28: 10-18.
- [5] Zhang L, Zhang F, Zhang WJ, et al. Harmine suppresses homologous recombination repair and inhibits proliferation of hepatoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16 (11): 1585-1592.
- [6] Chen Q, Chao RH, Chen HS, et al. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114 (5): 675-682.
- [7] 张建强. 骆驼蓬有效成分两种给药途径的毒性比较研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30 (6): 75-77, 82.
- [8] Sun QQ, Liu C, Jiang KX, et al. A preliminary study on the neurotoxic mechanism of harmine in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2021, 245: 109038.
- [9] Zhang L, Li DC, Yu SL. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43 (12): 1259-1275.
- [10] Cao RH, Fan WX, Guo L, et al. Synthesis and structure-activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 60: 135-143.
- [11] 孙倩倩, 杜裕, 刘明, 等. 去氢骆驼蓬碱对线虫神经毒性机制的内源性代谢研究 [J]. *质谱学报*, 2021, 42 (5): 975-984.
- [12] Cuny GD, Ulyanova NP, Patnaik D, et al. Structure-activity relationship study of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22 (5): 2015-2019.
- [13] Liu N, Xu H, Sun QQ, et al. The role of oxidative stress in hyperuricemia and xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 1470380.
- [14] Gherghina ME, Peride I, Tiglis M, et al. Uric acid and oxidative stress-relationship with cardiovascular, metabolic, and renal impairment [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (6): 3188.
- [15] Johnson RJ, Bakris GL, Borghi C, et al. Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a scientific workshop organized by the national kidney foundation [J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71 (6): 851-865.
- [16] 廖鑫, 蔡媛, 孙瑜, 等. 分子对接结合体外筛选挖掘来自中药的黄嘌呤氧化酶抑制剂 [J]. *中国新药杂志*, 2022, 31 (16): 1616-1622.
- [17] Iskusnykh IY, Zakharova AA, Pathak D. Glutathione in brain disorders and aging [J]. *Molecules*, 2022, 27 (1): 324.
- [18] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (8): 641-654.
- [19] Liang MC, Wang ZX, Li H, et al. L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 115: 315-328.
- [20] Shimomura Y, Kitaura Y. Physiological and pathological roles of branched-chain amino acids in the regulation of protein and energy metabolism and neurological functions [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 133: 215-217.
- [21] Wu SN, Liu XZ, Cheng L, et al. Protective mechanism of leucine and isoleucine against H₂O₂-induced oxidative damage in bovine mammary epithelial cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4013575.
- [22] 王析瑞, 刘永建, 刘岑, 等. 邻甲氧基肉桂酸抗衰老活性及机制研究 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24 (8): 1481-1486.

(收稿日期: 2023-04-23; 修回日期: 2023-05-14)

基于蛋白质组学探讨 RAB7 对肾小球足细胞线粒体自噬的影响

胡文杰^{1,2}, 陈慧宇^{1,2}, 祝晓丽¹, 魏良兵¹, 秦秀娟^{1*}, 高家荣^{1,3*} (1. 安徽中医药大学第一附属医院 药学部, 合肥 230031; 2. 安徽中医药大学 药学院, 合肥 230012; 3. 安徽中医药大学 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

摘要: **目的** 通过蛋白质组学探究 RAB7 作为线粒体自噬生物标志物对肾小球足细胞线粒体自噬的影响。**方法** 将 6 只 SD 大鼠随机分为对照组和模型组 ($n = 3$), 尾静脉注射阿霉素复制慢性肾小球肾炎 (CGN) 模型。采用蛋白质组学技术联合自噬数据库鉴定 CGN 大鼠的差异自噬相关蛋白。体内采用 Western blot 方法验证相关蛋白的表达, 体外采用嘌呤霉素氨基核苷 (PAN) 诱导肾小球足细胞损伤模型, 使用免疫荧光、透射电镜、Western blot 等方法检测线粒体自噬变化。**结果** 共筛选出 12 个自噬相关蛋白, 其中 RAB7 degree 值最高。体内经 Western blot 验证的 SNRPE、CTNBI、CAT、RAB7A、SOD2 蛋白表达水平与蛋白质组学数据一致。体外实验中, 与正常组比较, 模型组中 RAB7、Parkin 和 PINK1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); RAB7 过表达后, 与正常组比较, 模型组中自噬标志物 LC3 II/LC3 I、Beclin 1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), P62 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。**结论** RAB7 可能是 CGN 中线粒体自噬生物标志物, 影响肾小球足细胞线粒体自噬。

关键词: 慢性肾小球肾炎; 蛋白质组学; RAB7; 肾小球足细胞; 线粒体自噬

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3153-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.009

Proteomics-based exploration of the effect of RAB7 on mitochondrial autophagy in renal podocytes

HU Wen-jie^{1,2}, CHEN Hui-yu^{1,2}, ZHU Xiao-li¹, WEI Liang-bing¹, QIN Xiu-juan^{1*}, GAO Jia-rong^{1,3*} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031; 2. College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 3. Anhui Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Compounding, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the effect of RAB7 as a biomarker on mitochondrial autophagy in glomerular podocytes by proteomics. **Methods** Totally 6 SD rats were randomized into a control group and a model group, with 3 rats in each group. Chronic glomerulonephritis (CGN) rat model was established by tail vein injection of adriamycin. Proteomics technology combined with autophagy database was used to detect differential autophagy-related proteins. Western blot was used to verify the expression of the relevant proteins in vivo. In vitro, puromycin aminonucleoside (PAN) was used to induce glomerular podocytes injury model. Mitochondrial autophagy changes were detected using immunofluorescence, transmission electron microscopy, and Western blot. **Results** Totally 12 autophagy-related proteins was screened, among which RAB7 had the highest degree. In vivo, Western blot verified expression levels of SNRPE, CTNBI, CAT, RAB7A, and SOD2 proteins were consistent with proteomics data. In vitro experiments, the expression of RAB7, Parkin and PINK1 protein in the model group was significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). After RAB7 overexpression, the expression of LC3 II/LC3 I and

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No.82104613); 安徽省高等学校科学研究重点项目 (No.2022AH050455)。

作者简介: 胡文杰, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药物制剂研究, email: 2021205219009@stu.ahtcm.edu.cn ***通信作者:** 高家荣, 男, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事中药物质基础及药理研究, email: zyfygir2006@163.com; 秦秀娟, 女, 主管药师, 主要从事药物制剂研究, email: qxj0716@163.com

Beclin 1 protein in the model group was significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$), and the expression of P62 protein in the model group was significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** RAB7 may be a mitochondrial autophagy biomarker in CGN and affects mitochondrial autophagy on glomerular podocytes.

Key words: chronic glomerulonephritis; proteomics; RAB7; glomerular podocytes; mitochondrial autophagy

慢性肾小球肾炎 (CGN) 是一种免疫介导的肾小球疾病, 简称慢性肾炎, 是导致慢性肾脏病最常见病因之一, 以蛋白尿、血尿、高血压、水肿为主要病理表现特征^[1-3]。CGN 发病机制复杂, 分子学发病机制尚不明确, 因此, 寻找其发病机制、新的靶点和新的治疗策略, 有助于提高 CGN 患者的诊断率和治疗率。

随着后基因组学的发展, 蛋白质组学开始被广泛应用, 其具有可快速、高通量筛选蛋白质的特点, 鉴定和发现疾病的蛋白质生物标志物^[4-5]。基因是遗传信息的来源, 蛋白质是基因功能的执行者。与基因相比, 蛋白质更适合作为动态生化指标, 能更直接地判断疾病的发生和发展^[6-7]。蛋白质组学可以筛选出不同生理和病理条件下的差异表达蛋白, 尤其在筛选各种肾脏疾病的蛋白标志物方面^[8-9]。研究表明自噬标志蛋白 LC3 II/LC3 I、Beclin 1、P62 的表达水平可用于评价自噬水平的高低, 进而用于评估 CGN 的肾损伤水平^[10]。

线粒体自噬是靶向受损的线粒体, 将其递送运输到溶酶体进行降解^[11], 有助于维持线粒体正常形态和线粒体数量^[12]。线粒体自噬作为自噬的一种, 在疾病中具有双刃剑的作用。研究表明, 自噬功能异常或失调会导致各种肾脏疾病的发生与发展, 包括 CGN、糖尿病肾病、急性肾损伤、狼疮肾炎^[13-15]等。

本研究采用蛋白质组学技术联合自噬数据库鉴定了 CGN 大鼠肾脏组织的差异表达自噬相关蛋白, 进而从线粒体自噬的角度探讨 CGN 的分子学发病机制, 为其诊断和治疗提供新的靶点和新的科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (200±20) g, 7 周龄 [郑州华兴实验动物育种公司, SCXK (YU) 2019-0002], 饲养环境: 温度 18~22℃, 湿度 40%~60%, 本研究经安徽中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批准号: AHUCM-rats-2020017)。

1.2 细胞

大鼠肾小球足细胞 (湖南丰汇生物科技有限公司), 于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中培养, 向培养基中加入质量浓度为 50 μg·mL⁻¹ 的嘌呤霉素氨基核苷 (PAN), 共同培养 48 h, 诱导肾小球足细胞损伤模型。

1.3 试剂与仪器

阿霉素 (瀚晖制药有限公司, 货号: 22068611), PAN (美国 MedChemexpress 生物科技公司, 货号: HY-15695), 戊巴比妥钠 (广州莱润实验仪器有限公司, 货号: 57-33-0), CAT (货号: DF7545)、SOD2 (货号: AF5144)、SNPRE (货号: DF7370)、CTNNB1 (货号: AF6266)、PINK 1 (货号: DF7742)、Parkin (货号: AF0235)、LC3 II/LC3 I (货号: AF4650)、Beclin 1 (货号: AF5128)(Affinity), RAB7A (ZENBIO, 货号: 385525), RAB7 (ZENBIO, 货号: 385525), P62 (CST, 货号: 5114T), 山羊抗鼠 IgG (Zs-BIO, 货号: 142637), 山羊抗兔 IgG (Zs-BIO, 货号: 139931), ECL 超敏发光试剂盒检测 (Thermo, 货号: 34094)。

2 方法与结果

2.1 动物分组与造模

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组 (每组 3 只), 模型组大鼠分别于第 1 日 (3.5 mg·kg⁻¹) 和第 14 日 (3.0 mg·kg⁻¹) 尾静脉注射阿霉素复制 CGN 模型^[16], 对照组尾静脉注射等量生理盐水。第 21 日将所有大鼠放入代谢笼中, 收集 24 h 尿液, 以 24 h 尿蛋白质量浓度 ≥ 50 mg·kg⁻¹ 为造模成功标志。造模结束后, 腹腔注射戊巴比妥钠 (30 mg·kg⁻¹) 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 取相同部位肾小球组织于 -80℃ 保存。

2.2 尿蛋白分析

如表 1 所示, 与对照组相比, 造模后 (第 21 日) 的模型组大鼠 24 h 尿蛋白含量明显升高 ($P < 0.01$), 且大于造模成功标准 (≥ 50 mg·kg⁻¹), 表明 CGN 模型建立成功。

表 1 两组大鼠造模前后 24 h 尿蛋白含量的变化 (n = 3)

Tab 1 Changes in 24 h urine protein content before and after the modeling in the 2 groups of rats (n = 3)

组别	24 h 尿蛋白含量 / (mg · kg ⁻¹)	
	造模前	造模后
对照组	24.03 ± 6.02	34.08 ± 9.25
模型组	25.53 ± 3.29	223.23 ± 22.82**

注: 与对照组比较, **P < 0.01。

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

2.3 组织病理学观察

取大鼠肾皮质处肾小球组织, 并固定在 10% 磷酸盐缓冲液多聚甲醛中, 于 4 °C 下保存, 苏木精和伊红 (HE) 染色后, 使用光学显微镜观察肾小球组织形态。HE 染色结果显示, 与对照组大鼠的肾小球结构和肾小球基底膜厚度比较, 模型组大鼠肾小球出现萎缩, 肾小球基底膜增厚, 并伴有大量蛋白管型, 肾小球周围有炎症细胞浸润 (见图 1)。

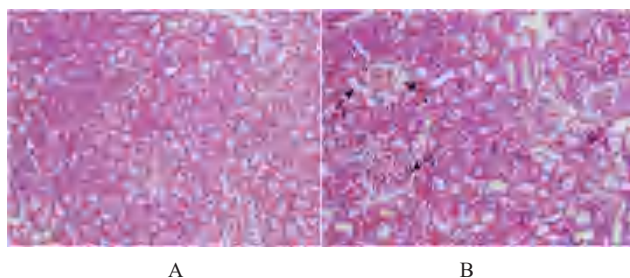


图 1 组织病理学观察 (×200, 比例尺 = 100 μm)

Fig 1 Histopathological observation (×200, scale bar = 100 μm)

A. 对照组 (control group); B. 模型组 (model group)

注 (Note): a. 肾小球基底膜厚度增加 [glomerular basement membrane thickness (GBMT) was increased]; b. 蛋白管 (protein tubules); c. 炎症细胞浸润 (inflammatory cell infiltration)。

2.4 蛋白质的提取与质谱分析

大鼠肾皮质处肾小球组织在 SDT 缓冲液中均质化提取蛋白质, 将提取物煮沸 5 min, 并在 40 000 g 下离心 15 min, 上清液中的蛋白质浓度用双喹啉酸试验 (美国 Pierce) 检测。洗脱液引入 Q-Exactive 质谱仪 (美国 Thermo), 采用 MS/MS 采集模式, 筛选条件: fold-change (FC) > 1.5, P < 0.05, 鉴定差异表达蛋白。使用 R studio 4.2.0 进行热图、GO、KEGG 通路富集分析, 使用 Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) 构建 PPI 网络。

2.5 差异蛋白的鉴定

模型组与对照组间共有 1714 个差异表达蛋白, 以 fold-change (FC) > 1.5, P < 0.05 为筛选条件, 共筛选出 431 个差异表达蛋白, 火山图分析如图 2 所示。

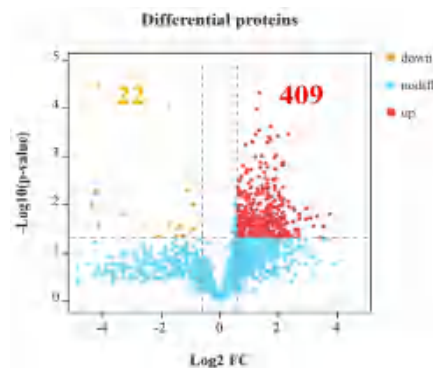


图 2 蛋白质组学差异蛋白的鉴定

Fig 2 Differential expression of proteins identified.

注: 分别用红色和黄色的点表示显著上调和下调的差异蛋白。

Note: Significantly up-regulated and down-regulated proteins are represented as red and yellow dots, respectively.

2.6 GO 和 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析显示差异表达蛋白主要富集在细胞外体、细胞外囊、羧酸代谢过程、氧化代谢过程、催化活性、线粒体基质等。采用 ClusterProfiler R 软件包分析了排名前 20 的 GO 条目 (见图 3)。

KEGG 富集分析结果显示差异表达蛋白主要参与了丙酮酸代谢、柠檬酸循环 (TCA 循环)、糖酵解 / 糖醛酸生成、自噬小体等信号通路。采用 ClusterProfiler R 软件包分析了排名前 30 的 KEGG 途径, 结果如图 4 所示。

2.7 PPI 网络分析

使用 Cytoscape 构建 PPI 网络, 结合 GO 和 KEGG 分析, 且文献表明 RAB7A 参与线粒体自噬的发生与发展^[17], 因此推测在 CGN 的发生发展中, RAB7A 是线粒体自噬的关键蛋白, 并以 RAB7A 为中心绘制了 PPI 网络图 (见图 5)。

2.8 差异表达蛋白与自噬数据库的联合分析

将差异表达的蛋白与自噬数据库 (<https://hamdb.scbdd.com/home/index/>) 进行匹配, 交集共筛选出 12 个自噬相关蛋白, 分别为 RAB7A、RAB11A、RRAGA、SOD2、SNRPE、STAM、ACSL1、CAPNS1、CAT、CTNNB1、FIS1、LAMP1 (见图 6A)。采用 PPI 网络构建 12 个自噬相关蛋白的网络图 (因 12 个蛋白在 PPI 网络分析时, SNRPE 与其他蛋白没有相关性且未形成 PPI 网络, 所以图中并未显示, 见图 6B), Degree 值大小排名见表 2, 其中 RAB7A 的 Degree 值最高。

2.9 Western blot 验证体内蛋白表达

从 12 个蛋白中挑选了与线粒体自噬、慢性肾小球肾炎较相关的 5 个差异蛋白进行验证, Western blot 检测 5 个差异表达蛋白 (SNRPE、CTNNB1、CAT、RAB7A、SOD2) 的表达。以 β-actin 为内对

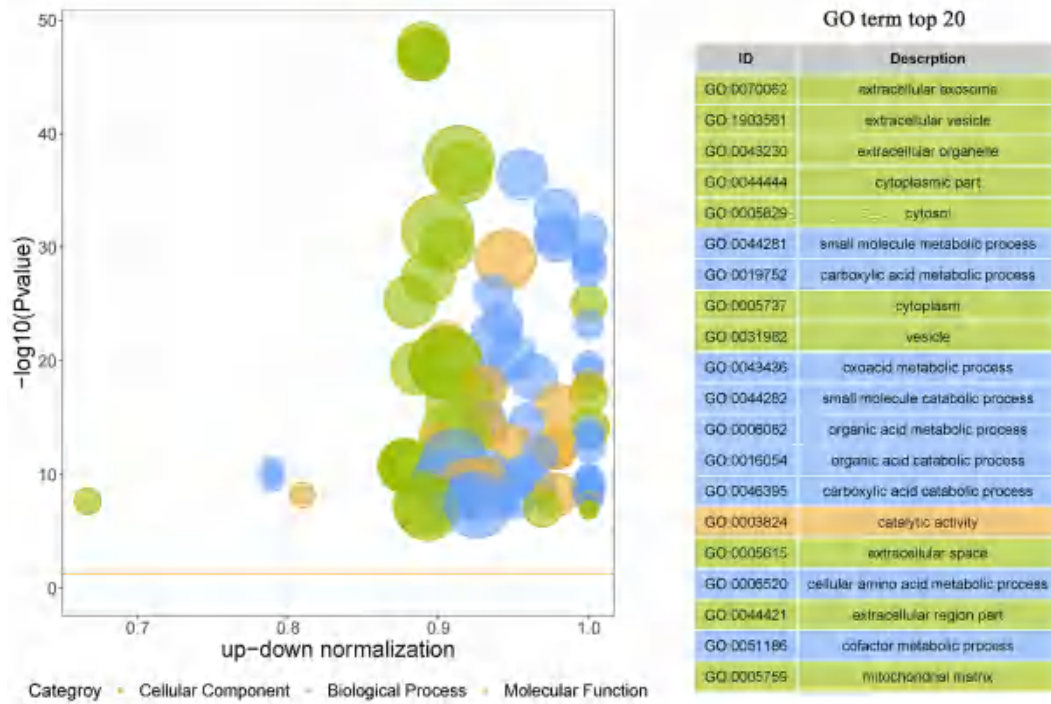


图 3 差异表达蛋白的 GO 富集分析

Fig 3 GO enrichment analysis of differentially expressed proteins

注：生物过程、细胞成分、分子功能分别用蓝色、绿色和黄色表示。

Note: Biological processes, cellular components, and molecular functions, which indicated in blue, green, and yellow, respectively.

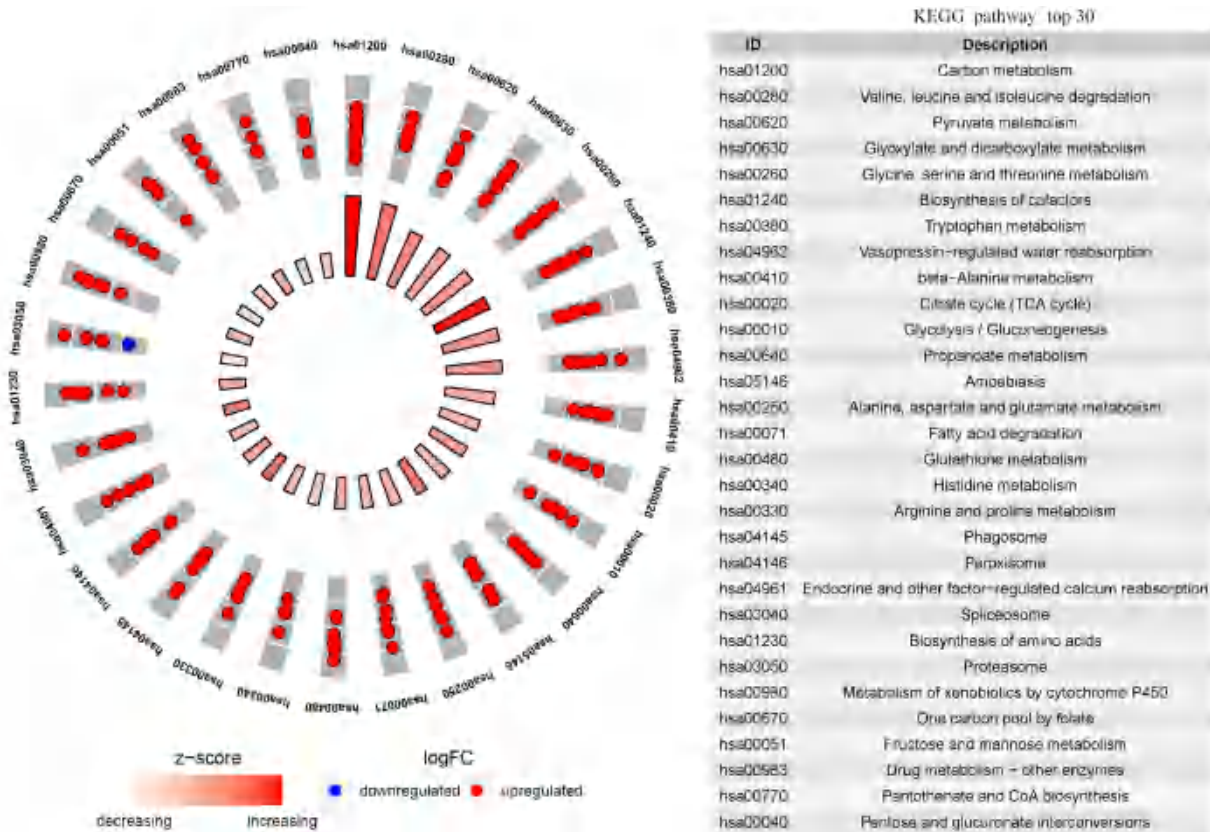


图 4 差异表达蛋白的 KEGG 富集分析

Fig 4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed proteins

注：红色由浅入深代表 z-score 从小到大。

Note: The colour red from shallow to deep represent the z-score from decreasing to increasing.

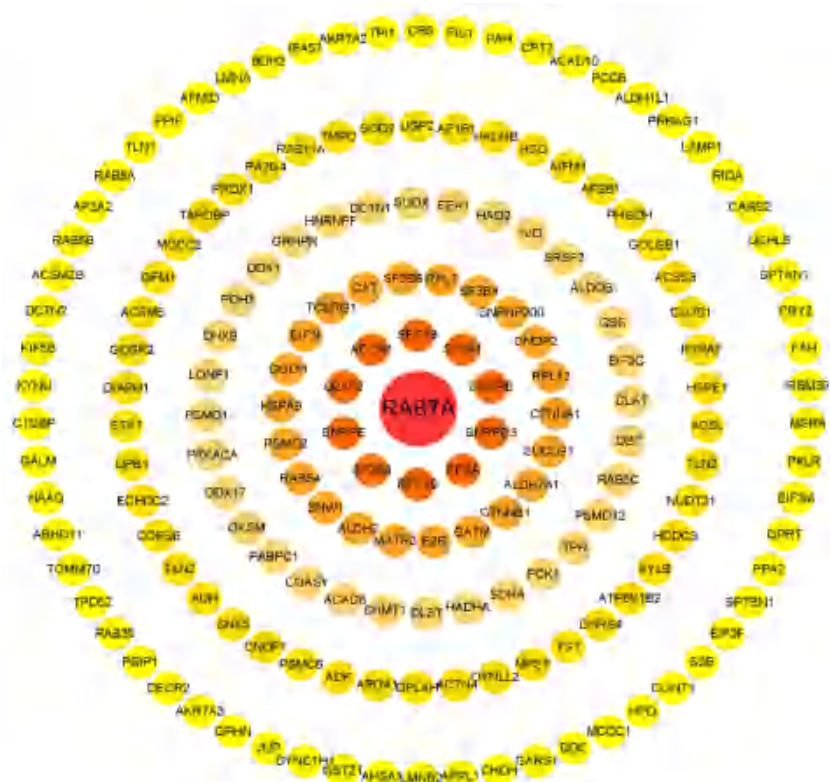


图 5 PPI 网络图的构建
Fig 5 Construction of PPI network

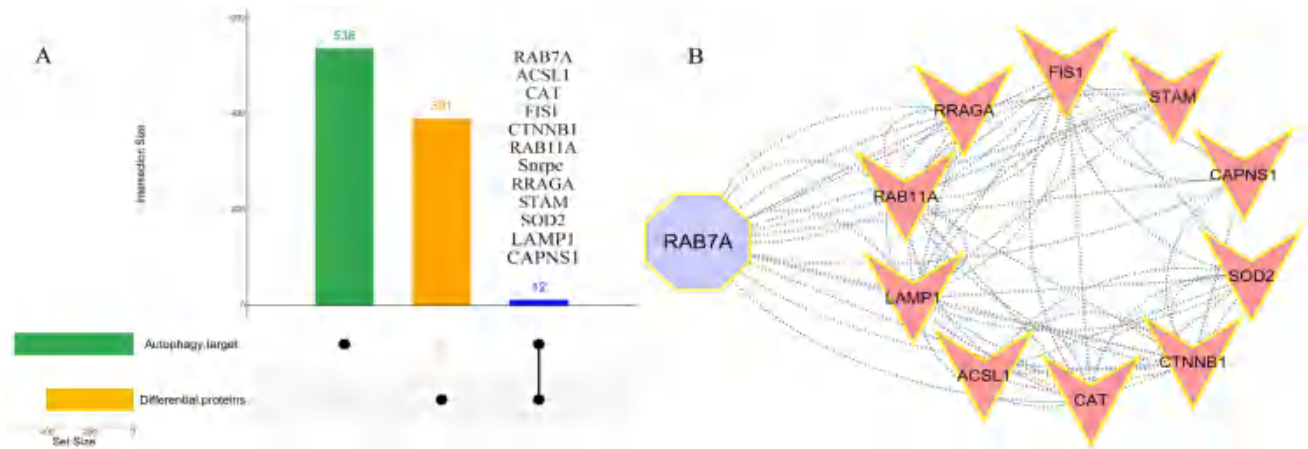


图 6 自噬相关蛋白的分析
Fig 6 Analysis of autophagy-related proteins
A. 差异蛋白和自噬数据库匹配的韦恩图 (Venn diagram of differentially expressed proteins and autophagy database); B. 12 个自噬相关蛋白的 PPI 网络 (PPI network construction of 12 autophagy-related proteins)。

照, 大鼠肾小球组织离心沉淀 ($12\ 000\ r \cdot \min^{-1}$), 收集上清液, 经电泳、转膜、封闭, 稀释一抗 CAT ($1 : 1000$), SOD2 ($1 : 500$), RAB7A ($1 : 500$), SNRPE ($1 : 500$), CTNNB1 ($1 : 500$) 孵育过夜 ($4\ ^\circ\text{C}$)。二抗山羊抗鼠 IgG ($1 : 10\ 000$), 山羊抗兔 IgG ($1 : 10\ 000$) 室温孵育 2 h, 蛋白用 ECL 超敏发光试剂盒检测, 使用 Image J 软件对蛋白条带进行量化, 所有实验均重复 3 次。结果显示, 与正常组相比, 模型组中 CAT、RAB7A、SOD2 蛋白表达

明显减少 ($P < 0.01$), SNRPE、CTNNB1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$)。研究结果表明 SNRPE、CTNNB1、CAT、RAB7A、SOD2 的表达与蛋白质组学结果一致 (见图 7)。

2.10 体外检测线粒体自噬的变化

2.10.1 免疫荧光检测 PINK1、RAB7 的表达水平
为了探索 RAB7 参与调控线粒体自噬的方式, 本研究采用免疫荧光技术检测 PINK1 和 RAB7 的表达水平。在大鼠肾小球足细胞中加入破膜工作

表 2 12 个自噬相关蛋白 Degree 排名

Tab 2 Degree ranking of 12 autophagy-related proteins

蛋白名称	Degree 值
RAB7A	16
LAMP1	16
CAT	14
CTNBN1	14
RAB11A	14
FIS1	12
SOD2	10
ACSL1	6
CAPNS1	6
STAM	6
RRAGA	6
SNRPE	—

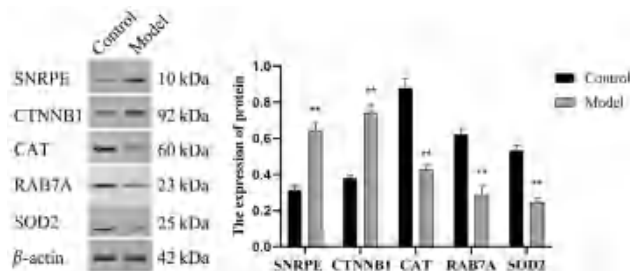


图 7 Western blot 检测 5 个差异表达蛋白

Fig 7 Western blot detection of 5 differentially expressed proteins

注 (Note): 与正常组比较, ** $P < 0.01$ (Compared with the control group, ** $P < 0.01$).

液, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 于 3% BSA 在室温下封闭 30 min。滴加一抗 PINK1 (1 : 100), RAB7 (1 : 100), 清洗 3 次, 每次 5 min。二抗在室温下滴加 50 min。使用 DAPI 对细胞核进行反染色, 收集图像并通过荧光显微镜进行分析。结果如图 8 所示, 与正常肾小球足细胞相比, PAN 诱导的肾小球足细胞中 PINK1 和 RAB7 的表达显著降低 ($P < 0.01$)。

2.10.2 Western blot 分析检测 RAB7、Parkin、PINK1 的表达水平 以 β -actin 为内对照, 收集细胞沉淀, 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液, 经电泳、转膜、封闭, 稀释一抗 PINK1 (1 : 1000), Parkin (1 : 1000), RAB7 (1 : 1000), 孵育过夜 (4 $^{\circ}\text{C}$)。二抗山羊抗鼠 IgG (1 : 10 000), 山羊抗兔 IgG (1 : 10 000) 室温孵育 2 h, 蛋白用 ECL 超敏发光试剂盒检测, 使用 Image J 软件对蛋白条带进行量化, 所有实验均重复 3 次。如图 9 所示, 与对照组相比, 模型组中 RAB7、Parkin、PINK1 的表达水平降低 ($P < 0.01$)。

2.10.3 过表达质粒转染 RAB7 过表达质粒 (635 bp) 由通用生物公司设计 (中国安徽)。转染前在 6 孔板中对肾小球足细胞进行铺板, 使用 250

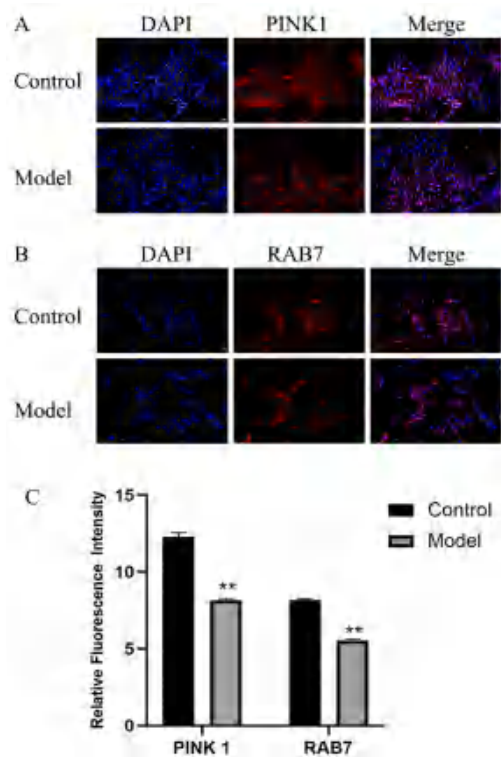


图 8 免疫荧光检测 PINK1、RAB7 的表达水平 (比例尺: 100 μm)

Fig 8 Immunofluorescence detection of the expression levels of PINK1 and RAB7 (Scale bar: 100 μm)

A、B. 免疫荧光图片 (immunofluorescence picture); C. 免疫荧光定量分析 (quantitative immunofluorescence analysis)

注 (Note): 与对照组比较, ** $P < 0.01$ (Compared with the control group, ** $P < 0.01$).

μL 无血清培养基稀释 2.5 μg siRNA, 然后取 5 μL Lipofectamine 2000 在 250 μL 的无血清培养基中稀释, 轻轻混匀并在室温下孵育 5 min。而后将两者轻轻混匀并在室温下孵育 20 min。将混匀后的培养基加入到 6 孔板中, 混匀 1 ~ 2 min 后, 放入培养箱培养 48 h 检测转染效率。

2.10.4 Western blot 检测转染效率 将 RAB7 过表达质粒转染到 PAN 诱导的肾小球足细胞损伤模型中, 通过 Western blot 技术检测转染效率 (见图 10A)。以 β -actin 为内对照, 收集细胞沉淀, 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液, 经电泳、转膜、封闭, 稀释一抗 RAB7 (1 : 1000), 孵育过夜 (4 $^{\circ}\text{C}$)。二抗山羊抗鼠 IgG (1 : 10 000), 山羊抗兔 IgG (1 : 10 000) 室温孵育 2 h, 蛋白用 ECL 超敏发光试剂盒检测, 使用 Image J 软件对蛋白条带进行量化, 所有实验均重复 3 次。结果显示, 与对照组相比, RAB7 表达显著升高, 转染程度高。

2.10.5 透射电镜分析 肾小球足细胞固定后, 使用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。然后用梯度丙酮

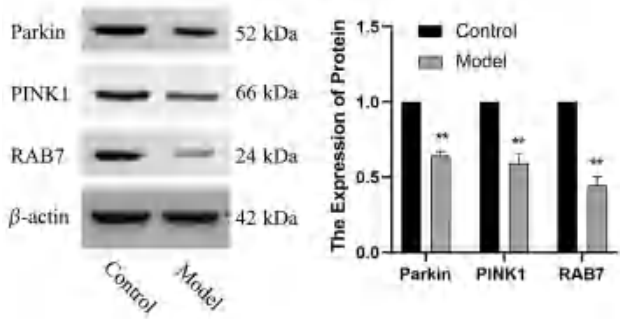


图 9 Western blot 检测自噬相关蛋白的变化
 Fig 9 Changes in autophagy-related proteins were detected by Western blot
 注：与对照组相比，** $P < 0.01$ 。

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

(30%、50%、70%、90% 和 100%) 脱水，用环氧树脂包埋剂包埋，切片，染色，用透射电镜观察肾小球足细胞中的自噬小体和线粒体的形态。如图 10B 所示，正常肾小球足细胞的线粒体呈椭圆形或圆形，膜结构完整，被双层膜包围成封闭的自噬体。与正常肾小球足细胞相比，PAN 诱导的肾小球足细胞的线粒体形态不完整，有明显肿胀，嵴柱结构消失或者断裂，呈空泡状，自噬小体数量减少，表明模型组中自噬体形成减少。过表达 RAB7 后，线粒体结构明显恢复，自噬小体数量增加，自噬水平升高。

2.10.6 过表达 RAB7 对自噬水平的影响 LC3 II / LC3 I、Beclin 1 和 P62 是检测自噬水平的标志物。通过 Western blot 技术检测 LC3 II / LC3 I、Beclin 1 和 P62 的表达水平。以 β -actin 为内对照，收集细胞沉淀， $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min，收集上清液，经电泳、转膜、封闭，稀释一抗 P62 (1 : 1000)，LC3 II / LC3 I (1 : 500)，Beclin 1 (1 : 500)，孵育过夜 (4 °C)。二抗山羊抗小鼠 IgG (1 : 10 000)，山羊抗兔 IgG (1 : 10 000) 室温孵育 2 h，蛋白用 ECL 超敏发光试剂盒检测，使用 Image J 软件对蛋白条带进行量化。所有实验均重复 3 次。结果显示，与正常组相比，模型组中 LC3 II / LC3 I 和 Beclin 1 的表达水平下调 ($P < 0.01$)，P62 的表达水平上调 ($P < 0.01$)，在 RAB7 过表达之后，其结果被逆转 (见图 10C)。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 21.0 版本，实验数据结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

CGN 是慢性肾脏疾病的一个常见诱因，也是导致终末期肾脏疾病的主要原因之一，但目前缺乏明确的诊断指标 [18-19]。将蛋白质组学方法应用

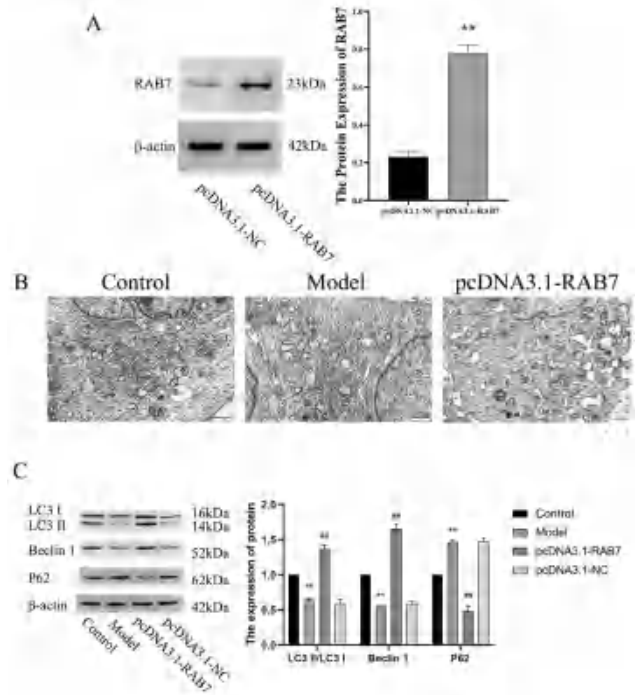


图 10 过表达 RAB7 对自噬水平的影响
 Fig 10 Effect of overexpression of RAB7 on autophagy levels
 A. 过表达 RAB7 转染效率 (transfection efficiency of overexpressed RAB7); B. 肾小球足细胞线粒体结构变化 (structural changes in mitochondria of renal podocytes); C. LC3 II / LC3 I、Beclin 1、P62 的蛋白表达量 (protein expression of LC3 II / LC3 I, Beclin 1, and P62)

注：与对照组相比，** $P < 0.01$ ；与模型组相比，### $P < 0.01$ 。

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

于 CGN 的研究，为深入了解 CGN 的发病机制和筛选蛋白生物标志物提供了新的技术方法，有利于更好地发现诊断和治疗 CGN 的靶点。

本文采用两种模型方法，一种是体内采用阿霉素诱导模型验证蛋白质组学差异蛋白的表达，另一种是体外采用 PAN 诱导模型探讨 RAB7 对肾小球足细胞线粒体自噬的影响。尾静脉注射阿霉素是建立 CGN 大鼠模型的经典方法 [20]，体外主要有两种类型的细胞，即系膜细胞和足细胞。脂多糖诱导常用于系膜细胞，而 PAN 诱导则常用于足细胞 [21-22]。研究表明，PAN 可以诱导小鼠足细胞损伤并降低自噬功能 [23]，因此选择其作为探究足细胞线粒体自噬机制的体外模型。足细胞是分布在肾小球基底膜上皮一侧的固有细胞，其基础自噬率较高 [24]。在病理条件下，足细胞的自噬作用被抑制，导致其从肾小球基底膜上脱落，从而导致肾小球滤过功能的受损 [25-26]。

本研究应用蛋白质组学技术联合自噬数据库，发现 12 个与自噬相关的差异表达蛋白，其中 RAB7 是 Degree 值排名第一的蛋白标志物。目前，

关于 LAMP1 蛋白在线粒体自噬中的相关研究较少, RAB7 则是经典线粒体自噬相关蛋白, 故而未选择 LAMP1。为了进一步探讨 RAB7 调控线粒体自噬并参与 CGN 的发病机制, 本研究分析了 RAB7 影响肾小球足细胞线粒体自噬的作用。

自噬是一个分解代谢过程, 通过降解细胞自身的成分来清除蛋白质聚集物、受损和多余的细胞器, 以维持细胞内的平衡^[27-28]。细胞自噬既可以是非选择性的, 如巨自噬和微自噬; 也可以是选择性的, 包括线粒体自噬、内质网以及核糖体自噬等途径。线粒体自噬是以线粒体为目标细胞器的一种自噬方式, PINK1/Parkin、FUNDC1 和 BNIP3L/Nix 等信号通路在线粒体自噬中都被报道过^[29-30]。线粒体自噬中有损伤的线粒体会优先成为自噬的目标。本研究通过透射电镜发现在 PAN 诱导的肾小球足细胞中存在严重的线粒体损伤, 且自噬小体减少, 表明在 CGN 的发生与发展中, 线粒体出现损伤且自噬水平下降。

在正常细胞的线粒体中, 位于线粒体外膜的 PINK1 被转移到线粒体中, 被相关的降解酶降解并消除。当线粒体去极化, PINK1 导入内膜受到抑制时, PINK1 会在线粒体上积累, 然后启动线粒体外膜对 Parkin 的招募, 以触发自噬, 清除受损线粒体。因此, 受损线粒体的数量和线粒体自噬是否被激活与 PINK1 和 Parkin 紧密相关^[31-33]。自噬的关键是自噬体和溶酶体的融合, 形成酸性的自溶酶体, 从而将其消除。溶酶体和自噬体的融合是由 PLEKHM1、HOPS 和 RAB7 介导的, 其中 RAB7 是自噬体和溶酶体融合所需的一个关键调节因子^[34-36], RAB7 对自噬体转化为自溶体的过程是必需的, 且其活性对这一过程至关重要。因此, 本研究检测了 RAB7、PINK1 和 Parkin 的表达水平, 研究显示, PAN 诱导的肾小球足细胞中 RAB7、PINK1 和 Parkin 的表达水平下降, 表明在 CGN 的发生发展中, 线粒体自噬功能下降, 对受损线粒体的清除能力不足。为了进一步验证 RAB7 对线粒体自噬水平的影响, 本研究在 PAN 诱导的细胞模型中对 RAB7 进行过表达, 检测自噬活性标志物 LC3 II/LC3 I、Beclin 1、P62^[37] 的表达水平。

LC3 II/LC3 I 可以评估自噬的功能状态^[38]; *Beclin 1* 是在哺乳动物中发现的第一个自噬相关基因, 作为自噬体形成中最重要的分子之一, *Beclin 1* 是调节细胞自噬活性的关键靶标^[39]; P62 是一个由众多结构域组成的多功能支架蛋白, 可以结合泛素化的蛋白质, 也可以将其作为目标, 由蛋白酶体降解。此外, P62 可以直接与 LC3 结合, 这

可能会将泛素化的蛋白通过自噬降解^[40]。在转染过表达 RAB7 质粒后, LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 的水平升高, P62 水平下降, 研究表明在 CGN 的发生发展中, 线粒体自噬水平下降。

综上所述, 蛋白质组学分析和验证表明在 CGN 中, RAB7 表达的降低, 导致线粒体自噬水平的降低, 提示 RAB7 作为 CGN 中线粒体自噬的关键蛋白标志物, 参与了 CGN 的线粒体自噬调控过程, 这一假说需要更深入的研究来证实, 以期为临床诊疗 CGN 提供新的思路, 亦为干预 CGN 的药物研发提供新的靶点。

参考文献

- [1] Dai Y, Chen XY, Yang H, et al. Evidence construction of Huangkui capsule against chronic glomerulonephritis: a systematic review and network pharmacology [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154189.
- [2] Chen Q, Guo H, Hu JJ, et al. Rhein Inhibits NF- κ B signaling pathway to alleviate inflammatory response and oxidative stress of rats with chronic glomerulonephritis [J]. *Appl Bionics Biomech*, 2022, 2022: 9671759.
- [3] Gao YC, Jiang NN, Qin XJ, et al. High-throughput data on circular RNA reveal novel insights into chronic glomerulonephritis [J]. *Genes Genomics*, 2023, 45 (4): 475-490.
- [4] Caliskan OS, Massacci G, Krahmer N, et al. Phosphoproteomics and organelle proteomics in pancreatic islets [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2456: 123-140.
- [5] Lamtha T, Krobthong S, Yingchutrakul Y, et al. A novel nanobody as therapeutics target for EGFR-positive colorectal cancer therapy: exploring the effects of the nanobody on SW480 cells using proteomics approach [J]. *Proteome Sci*, 2022, 20 (1): 9.
- [6] Jacob M, Masood A, Shinwari Z, et al. Proteomics profiling to distinguish DOCK8 deficiency from atopic dermatitis [J]. *Front Allergy*, 2021, 2: 774902.
- [7] Yang X, Zhang ZJ, Hang HC. Chemical proteomics for identifying short-chain fatty acid modified proteins in Salmonella [J]. *Methods Enzymol*, 2022, 664: 135-150.
- [8] Zong RR, Zhu FF, Han W, et al. Tear dynamics testing and quantitative proteomics analysis in patients with chronic renal failure [J]. *J Proteomics*, 2021, 248: 104351.
- [9] Aluksanasuwan S, Plumworasawat S, Malaitad T, et al. High glucose induces phosphorylation and oxidation of mitochondrial proteins in renal tubular cells: a proteomics approach [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 5843.
- [10] 李红莲, 周桔, 林华, 等. 丹酚酸 B 通过抗炎、抗氧化和促进自噬减轻慢性肾小球肾炎的肾功能损伤 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35 (5): 34-38.
- [11] Onishi M, Yamano K, Sato M, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. *EMBO J*, 2021, 40 (3): e104705.
- [12] Pickles S, Vigié P, Youle RJ, et al. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance [J]. *Curr Biol*, 2018, 28 (4): R170-R185.

- [13] Liu RH, Huang X, Ye HJ, et al. Lupus recipe inhibits cGVHD-induced lupus nephritis in mice and promote renal LC3-associated autophagy [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11 (3): e815.
- [14] Yang C, Chen XC, Li ZH, et al. SMAD3 promotes autophagy dysregulation by triggering lysosome depletion in tubular epithelial cells in diabetic nephropathy [J]. *Autophagy*, 2021, 17 (9): 2325-2344.
- [15] Lu RR, Chen JQ, Liu BH, et al. Protective role of astragaloside IV in chronic glomerulonephritis by activating autophagy through PI3K/AKT/AS160 pathway [J]. *Phytother Res*, 2020, 34 (12): 3236-3248.
- [16] Wei LB, Gao JR, Gao YC, et al. Effect of the traditional Chinese medicine Qi Teng Xiao Zhuo granules on chronic glomerulonephritis rats studied by using long noncoding RNAs expression profiling [J]. *Gene*, 2020, 728: 144279.
- [17] Rabinovich N, Rasouli M, Reitz CJ, et al. Mitochondrial autophagy and cell survival is regulated by the circadian Clock gene in cardiac myocytes during ischemic stress [J]. *Autophagy*, 2021, 17 (11): 3794-3812.
- [18] Liu T, Gao YC, Qin XJ, et al. Exploring the mechanism of Jianpi Qushi Huayu Formula in the treatment of chronic glomerulonephritis based on network pharmacology [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394 (12): 2451-2470.
- [19] Qin XJ, Gao JR, Xu XJ, et al. LncRNAs expression in adriamycin-induced rats reveals the potential role of LncRNAs contributing to chronic glomerulonephritis pathogenesis [J]. *Gene*, 2019, 687: 90-98.
- [20] 施苗苗, 王云, 姜辉, 等. 芪藤消浊颗粒对阿霉素肾病大鼠补体表达的影响 [J]. *现代免疫学*, 2022, 42 (2): 112-120.
- [21] Liu T, Zhuang XX, Qin XJ, et al. Alteration of N6-methyladenosine epitranscriptome profile in lipopolysaccharide-induced mouse mesangial cells [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2022, 395 (4): 445-458.
- [22] 覃乔静, 常凯利, 孟利霞, 等. Rac1 及 Cdc42 在肾上腺髓质肽 (AM) 缓解嘌呤霉素氨基核苷 (PAN) 所诱导足细胞损伤中作用机制的初步探讨 [J]. *复旦学报*, 2020, 47 (4): 496-505.
- [23] Wang L, Jiang WZ, Wang J, et al. Puerarin inhibits FUNDC1-mediated mitochondrial autophagy and CSE-induced apoptosis of human bronchial epithelial cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Aging*, 2022, 14 (3): 1253-1264.
- [24] Wu GZ, Xu YK, Zhang HY, et al. A new prognostic risk model based on autophagy-related genes in kidney renal clear cell carcinoma [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1): 7805-7819.
- [25] Villarejo-Zori B, Jimenez-Loygorri JI, Zapata-Munoz J, et al. New insights into the role of autophagy in retinal and eye diseases [J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82: 101038.
- [26] Liu XQ, Jiang L, Li YY, et al. Wogonin protects glomerular podocytes by targeting Bcl-2-mediated autophagy and apoptosis in diabetic kidney disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43 (1): 96-110.
- [27] Liang W, Yamahara K, Hernando-Erhard C, et al. A reciprocal regulation of spermidine and autophagy in podocytes maintains the filtration barrier [J]. *Kidney Int*, 2020, 98 (6): 1434-1448.
- [28] Alghamdi TA, Majumder S, Thieme K, et al. Janus kinase 2 regulates transcription factor EB expression and autophagy completion in glomerular podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28 (9): 2641-2653.
- [29] Lampert MA, Orogo AM, Najor RH, et al. BNIP3L/NIX and FUNDC1-mediated mitophagy is required for mitochondrial network remodeling during cardiac progenitor cell differentiation [J]. *Autophagy*, 2019, 15 (7): 1182-1198.
- [30] Wen HX, Li LX, Zhan LX, et al. Hypoxic postconditioning promotes mitophagy against transient global cerebral ischemia via PINK1/Parkin-induced mitochondrial ubiquitination in adult rats [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (7): 630.
- [31] Lan J, Tang LX, Wu SF, et al. Curcumin alleviates arsenic-induced injury in duck skeletal muscle via regulating the PINK1/Parkin pathway and protecting mitochondrial function [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 434: 115820.
- [32] Krzystek TJ, Banerjee R, Thurston L, et al. Differential mitochondrial roles for α -synuclein in DRP1-dependent fission and PINK1/Parkin-mediated oxidation [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (9): 796.
- [33] Du F, Yu Q, Yan SS, et al. PINK1 activation attenuates impaired neuronal-like differentiation and synaptogenesis and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease trans-mitochondrial cybrid cells [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 81 (4): 1749-1761.
- [34] Juhasz G. A mitochondrial-derived vesicle HOPS to endolysosomes using syntaxin-17 [J]. *J Cell Biol*, 2016, 214 (3): 241-243.
- [35] Wong YC, Ysselstein D, Krainc D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis [J]. *Nature*, 2018, 554 (7692): 382-386.
- [36] Jung J, Baek J, Tae K, et al. Structural mechanism for regulation of RAB7 by site-specific monoubiquitination [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 194: 347-357.
- [37] Zeng ZZ, Liang JL, Wu LG, et al. Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 583478.
- [38] He RN, Peng JY, Yuan PF, et al. Divergent roles of BECN1 in LC3 lipidation and autophagosomal function [J]. *Autophagy*, 2015, 11 (5): 740-747.
- [39] He CC, Levine B. The beclin 1 interactome [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22 (2): 140-149.
- [40] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. P62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (33): 24131-24145.

(收稿日期: 2023-05-01; 修回日期: 2023-07-02)

关苍术醇提物乙酸乙酯部位化学成分及其抗肿瘤活性研究

王思琪¹, 刘宁雨¹, 张雪柔¹, 孙朝¹, 王静¹, 王萍², 周媛媛^{1*} (1. 黑龙江中医药大学药学院 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036)

摘要: 目的 研究关苍术的化学成分及部分化合物的抗肿瘤活性。方法 使用 95% 乙醇水对关苍术进行提取, 利用正相硅胶柱色谱、ODS 柱色谱以及半制备 HPLC 分析方法等对其进行分离纯化, 并使用 HR-ESI-MS 和 NMR 鉴定化合物的化学结构。使用人肝癌 HepG-2 细胞对化合物 1、3~4、8~13 进行抗肿瘤活性测试。结果 从中共得到 14 个化合物, 分别鉴定为 7-羟基香豆素 (1)、东茛菪内酯 (2)、没食子酸乙酯 (3)、咖啡酸甲酯 (4)、4-*O*-咖啡酰奎宁酸甲酯 (5)、5, 7, 4'-三羟基-6-甲氧基黄酮 (6)、3, 7-二羟基-4'-甲氧基黄酮 (7)、1-*O*-阿魏酰基-(4*E*, 6*E*, 12*E*)-十四碳三烯-8, 10-二炔-1, 3-二醇 (8)、1-*O*-阿魏酰基-(4*E*, 6*E*, 12*E*)-十四碳三烯-8, 10-二炔-1, 14-二醇 (9)、(8*E*, 15*E*)-十七碳-8, 15-二烯-11, 13-二炔酸 (10)、(4*E*, 6*E*, 12*E*)-4, 6, 12-十四碳三烯-8, 10-二炔-1-醇 (11)、十七烷酸 (12)、二十二烷酸 (13)、蒲公英萜醇乙酸酯 (14)。化合物 3、4 具有一定的抗肿瘤活性, IC_{50} 值分别为 (68.14±26.84)、(59.80±26.40) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论 共得到 14 个化合物, 其中化合物 3~7、13 均为首次从该药用部位中分离获得。MTT 实验结果显示化合物 3、4 具有一定的抗肿瘤活性。

关键词: 关苍术; 化学成分; 分离纯化; 结构鉴定; 抗肿瘤

中图分类号: R284, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)12-3162-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.010

Chemical constituents and antitumor activities of ethyl acetate extract of *Atractylodes japonica*

WANG Si-qi¹, LIU Ning-yu¹, ZHANG Xue-rou¹, SUN Zhao¹, WANG Jing¹, WANG Ping², ZHOU Yuan-yuan^{1*} (1. Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents from *Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam. and their antitumor activities. **Methods** The compounds were extracted with 95% ethanol, separated and purified with silica gel column chromatography, ODS column chromatography and semi-preparative HPLC. Their structures were identified by HR-ESI-MS and NMR. The cytotoxic activity of isolated compounds on human liver cancer (HepG-2) cell lines was determined. **Results** Totally 14 compounds were isolated and identified as 7-hydroxycoumarin (1), scopoletin (2), ethyl gallate (3), caffeic acid methyl ester (4), 4-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (5), 5, 7, 4'-trihydroxy-6-methoxyflavone (6), 3, 7-dihydroxy-4'-methoxyflavone (7), 1-*O*-feruloyl-(4*E*, 6*E*, 12*E*)-tetradecatriene-8, 10-diyne-1, 3-diol (8), 1-*O*-feruloyl-(4*E*, 6*E*, 12*E*)-tetradecatriene-8, 10-diyne-1, 14-diol (9), (8*E*, 15*E*)-heptadeca-8, 15-dien-11, 13-diyneic acid (10), (4*E*, 6*E*, 12*E*)-4, 6, 12-tetradecatriene-8, 10-diyne-1-ol (11), heptadecanoic acid (12), behenic acid (13), and taraxerylacetate (14). The IC_{50} values of compound 3 and 4 were (68.14±26.84) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and (59.40±26.40) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. **Conclusion** Totally 14 compounds have

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81202890); 黑龙江省自然科学基金项目 (No.LH2019H048); 黑龙江省博士后科研启动金资助项目 (No.LBH-Z13195 和 LBH-Q16207); 黑龙江省“头雁”团队支持项目 (黑龙江省头雁行动领导小组文件〔2019〕5号)。

作者简介: 王思琪, 女, 硕士研究生, 主要从事中药及复方药效物质基础研究, email: wangsiqi1225@163.com *通信作者: 周媛媛, 女, 博士, 教授, 主要从事中药及复方药效物质基础研究, email: zhouyuanyuan1998@163.com

been obtained, and compounds **3** ~ **7**, and **13** have been isolated from this medicinal part for the first time. Compounds **3** and **4** have certain antitumor activity.

Key words: *Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam.; chemical constituent; isolation and purification; structure identification; antitumor

关苍术 (*Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam.) 为菊科苍术属多年生草本植物, 其药用部位为其干燥的根茎。关苍术广泛分布在黑龙江、吉林及辽宁三省。据《辽宁中药志》记载, 关苍术具有健脾燥湿、祛风胜湿的作用, 主要用于治疗脘腹胀痛、泄泻、恶心呕吐、倦怠乏力、风寒湿痹、痢疾等症状^[1]。现代研究表明, 关苍术具有抗胃溃疡、保肝、抗炎、降糖、利尿以及保护心血管等作用^[2-3]。关苍术化学成分丰富, 主要为倍半萜、苯酚、烯炔和三萜等成分, 此外还有香豆素、甾醇、黄酮、糖苷等其他类成分^[4-6]。关苍术在癌症治疗上也存在潜在的应用价值^[7]。基于本课题组前期对关苍术 95% 乙醇水提取物的研究, 进一步对其乙酸乙酯部分进行分离纯化, 从中分离得到 14 个化合物, 其中包含 6 个首次从该药用部位中分离得到的化合物 (结构见图 1), 并对含量较高的化合物 **1**、**3** ~ **4**、**8** ~ **13** 进行抗肿瘤活性研究, 以期扩大关苍术的应用。

1 材料

Bruker-600 型超导核磁共振仪 (德国布鲁克公司), HR-ESI-MS 高分辨质谱仪、1525EF 半制备型高效液相色谱、E2695 高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 半制备色谱柱 (9.4 mm × 250 mm, 5 μm, 美国安捷伦公司); 中压层析柱 (瑞士步琦公司); 80 ~ 100 目、200 ~ 300 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 薄层色谱硅胶 (GF₂₅₄, 青岛海洋化工厂); 用于半制备液相的试剂为色谱纯; 其余均为分析纯。

人肝癌细胞 HepG-2 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 噻唑蓝 (MTT)、磷酸盐缓冲液 (PBS) (北京索莱宝科技有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 天津市富宇精细化工有限公司); DMEM 培养基、胰蛋白酶 (美国赛默飞世尔科技公司)。

关苍术药材 (哈尔滨市三棵树药材公司), 经黑龙江中医药大学药学院杨炳友教授鉴定, 确定该药材为菊科苍术属植物关苍术 (*Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam.) 的干燥根茎。

2 提取与分离

将干燥的关苍术药材 (10.0 kg) 进行适当粉碎, 用 95% 乙醇水回流提取 3 次, 每次提取时间

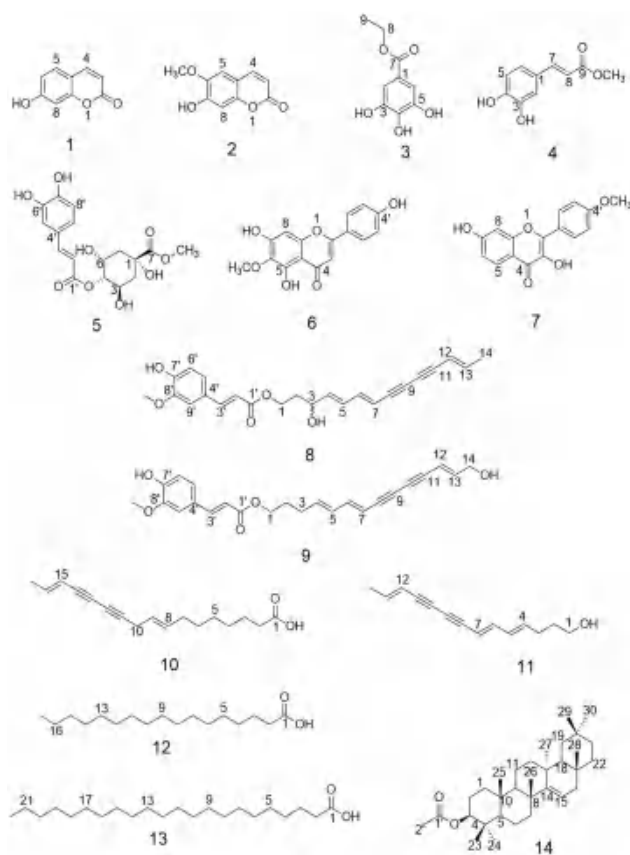


图 1 化合物 **1** ~ **14** 结构

Fig 1 Structure of compounds **1** ~ **14**

为 2 h, 使用旋转蒸发器浓缩得到浸膏 (996.5 g)。将此浸膏加适量蒸馏水分散, 水分散混悬液依次用两倍量的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯及水饱和的正丁醇萃取, 直至萃取液无色, 减压浓缩萃取物, 得各部位浸膏。

取乙酸乙酯部位浸膏 (108.5 g), 经正相硅胶 (200 ~ 300 目) 柱色谱分离, 石油醚 - 乙酸乙酯 (1 : 0 ~ 0 : 1) 和二氯甲烷 - 甲醇系统 (1 : 0 ~ 0 : 1) 梯度洗脱, TLC 检测指导合并, 获得 5 个组分 (Fr.1 ~ Fr.5)。

组分 Fr.1 经正相硅胶柱色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯系统, 100 : 0 ~ 30 : 1) 系统洗脱, 得到 Fr.1.1 ~ Fr.1.5 共 5 个组分; Fr.1.3 经正相硅胶柱洗脱 (石油醚 - 乙酸乙酯系统, 80 : 0 ~ 20 : 1), 纯化得到化合物 **1** (5.6 mg) 和 **2** (2.9 mg)。

组分 Fr.2 经正相硅胶柱色谱 (石油醚 - 乙酸

乙酯系统, 80 : 0 ~ 10 : 1) 系统洗脱, 低温放置有白色固体粉末析出, 得化合物 **14** (3.3 mg)。

组分 Fr.3 经正相硅胶柱色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯系统, 50 : 0 ~ 0 : 1) 系统洗脱, 得到 Fr.3.1 ~ Fr.3.6 共 6 个组分; Fr.3.2 经正相硅胶柱洗脱 (石油醚 - 乙酸乙酯系统, 30 : 0 ~ 0 : 1), 纯化得化合物 **12** (5.1 mg) 和 **13** (6.7 mg)。

组分 Fr.4 经正相硅胶柱色谱 (二氯甲烷 - 甲醇系统, 80 : 0 ~ 0 : 1) 系统洗脱, 得到 Fr.4.1 ~ Fr.4.7 共 7 个组分; Fr.4.2 经正相硅胶柱洗脱 (二氯甲烷 - 甲醇系统, 30 : 0 ~ 0 : 1), 纯化得到化合物 **8** (5.5 mg)、**9** (5.3 mg) 和 **10** (6.5 mg); Fr.4.5 经正相硅胶柱洗脱 (二氯甲烷 - 甲醇系统, 20 : 0 ~ 0 : 1), 纯化得到化合物 **11** (5.7 mg)。

组分 Fr.5 经正相硅胶柱色谱 (二氯甲烷 - 甲醇系统, 50 : 0 ~ 0 : 1) 系统洗脱, 得到 Fr.5.1 ~ Fr.5.5 共 5 个组分; Fr.5.2 经 ODS 柱色谱 (甲醇 - 水系统, 1 : 9 ~ 1 : 0) 系统洗脱, 得到 Fr.5.2.1 ~ Fr.5.2.7 共 7 个组分; Fr.5.2.2 经半制备 HPLC (甲醇 - 水, 15 : 85 ~ 100 : 0) 得化合物 **3** (8.5 mg) 和 **4** (8.0 mg); Fr.5.2.4 经半制备 HPLC (甲醇 - 水, 25 : 75 ~ 100 : 0) 得化合物 **5** (3.5 mg)、**6** (3.1 mg) 和 **7** (3.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色针晶 (乙酸乙酯); HR-ESI-MS m/z : 163.1515 $[M + H]^+$ (计算结果为 163.1516), 分子式为 $C_9H_6O_3$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.67 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.45 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.88 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.79 (1H, dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, H-6), 6.29 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 162.2 (C-7), 161.0 (C-2), 159.6 (C-9), 143.4 (C-4), 129.5 (C-5), 113.6 (C-3), 112.9 (C-10), 112.0 (C-6), 103.3 (C-8)。以上数据与文献^[8]基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 7-羟基香豆素。

化合物 **2**: 黄白色针晶 (甲醇); HR-ESI-MS m/z : 215.1590 $[M + Na]^+$ (计算结果为 215.1593), 分子式为 $C_{10}H_8O_4$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.61 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-4), 6.87 (1H, s, H-8), 6.95 (1H, s, H-5), 6.28 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 3.91 (3H, s, 6-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 161.6 (C-2), 152.1 (C-6), 149.6 (C-7), 143.7 (C-4), 144.0 (C-9), 113.5 (C-3), 111.4 (C-10), 107.2 (C-5), 103.4 (C-8), 56.7 (-OCH₃)。以上数据与文献^[9]

报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为东莨菪内酯。

化合物 **3**: 白色针晶 (三氯甲烷); HR-ESI-MS m/z : 197.1652 $[M - H]^-$ (计算结果为 197.1654), 分子式为 $C_9H_{10}O_5$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.06 (2H, s, H-2, 6), 4.24 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, H-8), 1.39 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 168.2 (C-7), 147.0 (C-3), 147.0 (C-5), 140.0 (C-4), 121.4 (C-1), 110.3 (C-2), 110.3 (C-6), 61.5 (C-8), 14.5 (C-9)。以上数据与文献^[10]报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为没食子酸乙酯。

化合物 **4**: 黄色粉末; HR-ESI-MS m/z : 217.1750 $[M + Na]^+$ (计算结果为 217.1752), 分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.31 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-7), 7.08 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 6.96 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6), 6.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.30 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-8), 3.88 (3H, s, 9-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 176.3 (C-9), 150.6 (C-3), 149.7 (C-4), 141.5 (C-7), 128.4 (C-1), 123.2 (C-5), 121.1 (C-6), 116.9 (C-2), 111.1 (C-8), 56.4 (-OCH₃)。以上数据与文献^[11]报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为咖啡酸甲酯。

化合物 **5**: 淡黄色粉末; HR-ESI-MS m/z : 391.3237 $[M + Na]^+$ (计算结果为 391.3236), 分子式为 $C_{17}H_{20}O_9$; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.51 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3'), 7.02 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-5'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, H-9'), 6.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8'), 6.20 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2'), 4.70 (1H, m, H-4), 4.09 (1H, m, H-3), 3.95 (1H, m, H-5), 3.58 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 174.5 (C-7), 166.5 (C-1'), 148.6 (C-7'), 146.2 (C-6'), 145.2 (C-3'), 126.1 (C-4'), 121.5 (C-9'), 116.2 (C-8'), 115.0 (C-5'), 114.8 (C-2'), 76.0 (C-1), 74.1 (C-3), 65.6 (C-4), 64.7 (C-5), 52.1 (-OCH₃), 39.4 (C-6), 38.5 (C-2)。以上数据与文献^[12]报道基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 4-O-咖啡酰奎宁酸甲酯。

化合物 **6**: 淡黄色粉末; HR-ESI-MS m/z : 301.2710 $[M + H]^+$ (计算结果为 301.2715), 分子式为 $C_{16}H_{12}O_6$; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.90 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.77 (1H, s, H-8), 6.55 (1H, s, H-3), 3.71 (3H, s, 6-OCH₃); ^{13}C -NMR

(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.0 (C-4), 163.8 (C-2), 161.2 (C-4'), 157.2 (C-7), 152.9 (C-5), 152.2 (C-9), 131.1 (C-6), 128.2 (C-2'), 128.2 (C-6'), 121.4 (C-1'), 115.7 (C-3'), 115.7 (C-5'), 104.3 (C-10), 102.2 (C-3), 94.5 (C-8), 59.8 (-OCH₃)。以上数据与文献^[13]报道基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 5, 7, 4'-三羟基-6-甲氧基黄酮。

化合物 **7**: 淡黄色粉末; HR-ESI-MS m/z : 307.2560 [M + Na]⁺ (计算结果为 307.2561), 分子式为 C₁₆H₁₂O₅; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.76 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 7.60 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 7.03 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.99 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.88 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3', 5'), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.9 (C-4), 163.0 (C-4'), 161.9 (C-7), 154.9 (C-9), 145.0 (C-2), 139.5 (C-3), 127.9 (C-2'), 127.9 (C-6'), 127.5 (C-5), 123.9 (C-1'), 118.3 (C-8), 115.5 (C-10), 115.2 (C-6), 114.4 (C-3'), 114.1 (C-5'), 55.5 (-OCH₃)。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 3, 7-二羟基-4'-甲氧基黄酮。

化合物 **8**: 黄色油状; HR-ESI-MS m/z : 391.4411 [M - H]⁻ (计算结果为 391.4416), 分子式为 C₂₄H₂₄O₅; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.60 (1H, dd, J = 15.9, 3.9 Hz, H-3'), 7.07 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz, H-5'), 7.01 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-9'), 6.91 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6'), 6.69 (1H, dd, J = 15.5, 10.9 Hz, H-6), 6.39 (1H, m, H-5), 6.30 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-13), 6.26 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-2'), 5.85 (1H, dd, J = 15.2, 6.0 Hz, H-4), 5.64 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-7), 5.58 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-12), 4.46 (1H, dt, J = 11.5, 8.3 Hz, H-1b), 4.35 (1H, dd, J = 12.2, 6.2 Hz, H-3), 4.28 (1H, dt, J = 11.1, 5.5 Hz, H-1a), 3.92 (3H, s, 8'-OCH₃), 1.82 (3H, m, H-14); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 167.4 (C-1'), 148.0 (C-7'), 146.6 (C-8'), 145.2 (C-3'), 143.6 (C-13), 143.3 (C-6), 139.2 (C-4), 129.1 (C-5), 126.7 (C-4'), 123.6 (C-5'), 114.7 (C-2'), 114.7 (C-6'), 110.4 (C-7), 109.7 (C-12), 109.2 (C-9'), 81.6 (C-11), 79.7 (C-8), 76.7 (C-9), 72.3 (C-10), 68.8 (C-3), 63.8 (C-1), 53.2 (-OCH₃), 36.4 (C-2), 18.8 (C-14)。以上数据与文献^[15]报道基本一

致, 故鉴定化合物 **8** 为 1-*O*-阿魏酰基-(4*E*, 6*E*, 12*E*)-十四碳三烯-8, 10-二炔-1, 3-二醇。

化合物 **9**: 黄色油状; HR-ESI-MS m/z : 391.4411 [M - H]⁻ (计算结果为 391.4416), 分子式为 C₂₄H₂₄O₅; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.62 (1H, m, H-3'), 7.05 (1H, s, H-9'), 7.06 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.92 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-6'), 6.68 (1H, dd, J = 15.4, 11.0 Hz, H-6), 6.42 (1H, dt, J = 16.0, 4.8 Hz, H-13), 6.28 (1H, dd, J = 15.9, 8.4 Hz, H-2'), 6.14 (1H, m, H-5), 5.87 (1H, dd, J = 15.2, 6.8 Hz, H-4), 5.86 (1H, dd, J = 15.2, 6.8 Hz, H-12), 5.57 (1H, d, J = 15.5 Hz, H-7), 4.27 (1H, dd, J = 4.9, 1.9 Hz, H-14), 4.21 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-1), 3.95 (3H, s, 8'-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 167.2 (C-1'), 147.5 (C-7'), 146.7 (C-8'), 144.7 (C-13), 144.6 (C-3'), 144.5 (C-6), 137.7 (C-4), 130.1 (C-5), 126.9 (C-4'), 122.5 (C-5'), 115.0 (C-2'), 114.7 (C-6'), 109.2 (C-9'), 108.7 (C-12), 107.6 (C-7), 81.4 (C-8), 80.3 (C-11), 75.3 (C-9), 74.7 (C-10), 63.5 (C-1), 62.3 (C-14), 55.9 (-OCH₃), 29.0 (C-3), 27.9 (C-2)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 1-*O*-阿魏酰基-(4*E*, 6*E*, 12*E*)-十四碳三烯-8, 10-二炔-1, 14-二醇。

化合物 **10**: 黄色油状; HR-ESI-MS m/z : 257.3519 [M - H]⁻ (计算结果为 257.3517), 分子式为 C₁₇H₂₂O₂; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.27 (1H, dq, J = 15.7, 6.9 Hz, H-16), 5.50 (1H, m, H-15), 5.47 (1H, m, H-8), 5.37 (1H, m, H-9), 3.06 (2H, d, J = 6.7 Hz, H-10), 2.37 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2), 1.82 (3H, m, H-17); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 178.4 (C-1), 143.4 (C-16), 132.6 (C-8), 122.8 (C-9), 110.3 (C-15), 81.3 (C-11), 74.6 (C-14), 72.9 (C-13), 65.0 (C-12), 33.9 (C-2), 29.4 (C-6), 29.3 (C-5), 29.0 (C-4), 27.1 (C-7), 24.9 (C-3), 18.7 (C-17), 18.2 (C-10)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 (8*E*, 15*E*)-十七碳-8, 15-二烯-11, 13-二炔酸。

化合物 **11**: 黄色油状; HR-ESI-MS m/z : 201.2885 [M + H]⁺ (计算结果为 201.2880), 分子式为 C₁₄H₁₆O; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.67 (1H, dd, J = 15.0, 11.2 Hz, H-6), 6.31 (1H, dq, J = 15.0, 7.6 Hz, H-13), 6.13 (1H, dd, J =

15.0, 11.2 Hz, H-5), 5.84 (1H, dt, $J = 15.0, 7.6$ Hz, H-4), 5.57 (1H, m, H-12), 5.53 (1H, hr. d, $J = 15.0$ Hz, H-7), 3.63 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-1), 1.85 (3H, m, H-14), 1.64 (2H, tt, $J = 7.0, 7.0$ Hz, H-2); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 144.8 (C-6), 143.5 (C-13), 138.3 (C-4), 130.1 (C-5), 110.1 (C-12), 108.2 (C-7), 81.3 (C-11), 80.6 (C-8), 75.7 (C-10), 72.4 (C-9), 62.4 (C-1), 31.9 (C-2), 29.3 (C-3), 18.7 (C-14)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 (4*E*, 6*E*, 12*E*)-4, 6, 12-十四碳三烯-8, 10-二炔-1-醇。

化合物 **12**: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z : 271.4627 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (计算结果为 271.4629), 分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.36 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 1.64 (2H, m, H-3), 1.33 ~ 1.28 (26H, br s, H-4 ~ 16), 0.90 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, 17- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 179.9 (C-1), 34.0 (C-2), 31.9 (C-3), 29.7 ~ 18.7 (C-4 ~ 16), 14.1 (C-17)。以上数据与文献^[17]报道基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为十七烷酸。

化合物 **13**: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z : 341.5790 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (计算结果为 341.5793), 分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.08 (2H, t, H-2), 1.50 (2H, m, H-3), 1.18 (36H, m, H-4 ~ 21), 0.81 (3H, t, H-22); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 175.5 (C-1), 38.5 (C-2), 36.2 (C-3), 31.3 ~ 22.3 (C-4 ~ 21), 14.1 (C-22)。以上数据与文献^[18]报道基本一致, 故鉴定化合物 **13** 为二十二烷酸。

化合物 **14**: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z : 491.7528 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算结果为 491.7527), 分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.52 (1H, dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz, H-15), 4.47 (1H, dd, $J = 10.6, 5.4$ Hz, H-3), 2.05 (3H, s, H-2'), 1.07 (3H, s, H-26), 0.97 (6H, s, H-24, 29), 0.91 (3H, s, H-30), 0.88 (3H, s, H-27), 0.86 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-28); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.9 (C-1'), 158.0 (C-14), 116.8 (C-15), 81.2 (C-3), 55.9 (C-5), 49.9 (C-9), 48.9 (C-18), 41.3 (C-19), 39.3 (C-8), 37.9 (C-4), 37.9 (C-1), 37.8 (C-10), 37.6 (C-13), 37.3 (C-22), 36.6 (C-12), 35.9 (C-17), 35.4 (C-21), 33.9 (C-16), 33.6 (C-29), 33.5 (C-7), 30.2 (C-28), 29.7 (C-27), 29.5 (C-

20), 28.8, (C-23), 26.1 (C-26), 23.8 (C-2), 21.7 (C-30), 21.6 (C-2'), 18.9 (C-6), 17.8 (C-11), 16.9 (C-24), 15.4 (C-25)。以上数据与文献^[19]基本一致, 故鉴定化合物 **14** 为蒲公英萜醇乙酸酯。

4 细胞毒活性研究

本实验采用 MTT 法对所提取化合物中含量较高的化合物 **1**、**3** ~ **4**、**8** ~ **13** 进行了体外抗肿瘤活性筛选^[20]。使用人肝癌 HepG-2 细胞, 设置不同浓度的给药组, 对照组加入同体积、同浓度的 DMSO, 每个组分设置 3 个复孔。使用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度值, 并计算 IC_{50} 。结果显示, 化合物 **3**、**4** 具有一定的抗肿瘤活性, IC_{50} 值分别为 (68.14 ± 26.84) 、 (59.80 ± 26.40) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余化合物无明显抗肿瘤活性。

5 讨论

本实验对关苍术乙酸乙酯部位进行分离纯化, 其中化合物 **3** ~ **7**、**13** 均为首次从该药用部位分离得到。同时, 细胞毒活性筛选实验结果表明, 化合物 **3**、**4** 对人肝癌 HepG-2 细胞表现出一定的活性。在我国, 与关苍术同属的苍术属植物有茅苍术、北苍术、白术以及朝鲜苍术^[21], 茅苍术与北苍术挥发油成分主要为萜类, 白术与关苍术均以苍术酮为主, 朝鲜苍术的主要有效成分为苍术酮。因其相似的化学成分, 其药理作用也较为相似, 但由于有效成分的含量存在差异, 故药理活性显著不同, 如茅苍主对于胃肠道调节具有显著影响^[22]。关苍术为东北著名的道地药材, 因其较高的药用价值, 近年来受到广泛的关注, 但其化学成分的研究以及临床上的应用还处于初级阶段。随着社会对关苍术需求量的不断加大, 有关于关苍术化学成分及药理作用的研究还有待于进一步深入。

参考文献

- [1] 高松. 辽宁中药志植物类[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010: 1016.
- [2] 赵千里, 王美娟, 赵敏, 等. 关苍术的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3797-3803.
- [3] 李海兰, 冯卫军, 朴光春, 等. 朝药关苍术的化学成分及药理作用研究[J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1515-1519.
- [4] 马玲, 张海骥, 杨世海, 等. 关苍术的研究现状[J]. 人参研究, 2012, 24(3): 51-54.
- [5] 玄淑华. 关苍术化学成分的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2012.
- [6] 吕鑫. 关苍术根茎化学成分及抑制肿瘤细胞增殖作用研究[D]. 延吉: 延边大学, 2022.
- [7] 王倩. 苍术化学成分药理作用研究进展[J]. 生物化工,

- 2023, 9 (1): 158-162.
- [8] 陆国寿, 卢文杰, 黄周峰, 等. 瑶族药消瘤藤的化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (14): 78-81.
- [9] 周媛媛, 高蕙蕊, 张然然, 等. 关苍术化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42 (10): 2640-2643.
- [10] 乔灏祯, 叶贤胜, 赫军, 等. 山茱萸中一个新的环烯醚萜苷类化合物[J]. 中国药学杂志, 2017, 52 (14): 1212-1216.
- [11] 徐倩倩, 周梅林, 赵苏敏, 等. 川芎中促进视网膜血管内皮细胞增殖的化学成分[J]. 中药材, 2022, 45 (11): 2643-2647.
- [12] 王欣. 桑椹化学成分及生物活性的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [13] 刁克鹏, 李伟, 向康林, 等. 黄果茄中 1 个新的黄酮类化合物[J]. 中草药, 2020, 51 (15): 3845-3849.
- [14] 杨新洲, 吕静南, 徐婵, 等. 鬼箭锦鸡儿细胞毒活性成分研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2015, 37 (1): 134-139.
- [15] Rui MJ, Chou GX. Three new polyacetylenes from *Atractylodes japonica* Koidz. ez Kitam [J]. Nat Prod Res, 2022, 36 (8): 2063-2070.
- [16] Pachaly P, Lansing A, Neugebauer M, et al. Acetylenes from *Atractylis koreana* [J]. Planta Med, 1990, 56 (5): 469-471.
- [17] 李乔, 于洋, 李娟, 等. 翅果油树叶化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2020, 30 (1): 39-44.
- [18] 韦建华, 李常伟, 向杨, 等. 复方依山红化学成分的研究[J]. 广西中医药, 2016, 39 (2): 75-78.
- [19] 蒋锡兰, 魏伟, 孙家英, 等. 内蒙苍术脂溶性部位化学成分研究[J]. 四川文理学院学报, 2020, 30 (2): 30-36.
- [20] 闫玉礼. 刺齿青兰化学成分的分离提取及其抗肿瘤活性研究[D]. 哈尔滨: 东北师范大学, 2020.
- [21] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 23-29.
- [22] 刘思佳, 姚杰, 宋雪, 等. 苍术属药用植物的化学成分、药理作用、临床应用概况[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (1): 151-154.
- (收稿日期: 2023-05-14; 修回日期: 2023-05-30)

灯盏花素注射液通过调控 p38MAPK 信号通路减轻大鼠子宫内膜异位症的机制研究

姬白嫣, 魏娟 (河北省邯郸市第二医院, 河北 邯郸 056001)

摘要: **目的** 探讨灯盏花素注射液 (Bre) 对大鼠子宫内膜异位症 (EMs) 的影响, 并基于 p38MAPK 信号通路探讨其机制。**方法** 将 60 只雌性大鼠按体重随机分为假手术组、模型组、Bre (1 mg·kg⁻¹) 组、SB202190 (p38MAPK 抑制剂, 15 mg·kg⁻¹) 组、Bre (1 mg·kg⁻¹) + SB202190 (15 mg·kg⁻¹) 组, 每组 12 只。除假手术组外, 其他 4 组均采用自体内膜移植法制备 EMs 大鼠模型。造模完成后, 各组分别腹腔注射给药, 1 次·d⁻¹ 连续 4 周。通过超声影像测量异位病灶体积, 根据 Haber 评分标准进行盆腔粘连评分, HE 染色法观察异位病灶组织病理改变, 酶联免疫吸附法检测炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-8) 含量, Western blot 法检测 p38MAPK 信号通路相关蛋白 p38 和 p-p38、胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)、p-ERK1/2、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p-JNK 以及核因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 表达。**结果** 与模型组比较, Bre、SB202190 和 Bre + SB202190 可显著降低 EMs 大鼠异位病灶体积和盆腔粘连评分 ($P < 0.05$); 促进异位病灶结构紊乱、间质疏松、上皮细胞坏死、新生血管减少、腺体萎缩、炎症细胞浸润减少等病理改变; 显著降低 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量, p-p38/p38、(p-ERK1/2)/(ERK1/2)、p-JNK/JNK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值及 p-I κ B α 相对表达量 ($P < 0.05$)。Bre + SB202190 组上述作用均显著优于 Bre 组和 SB202190 组 ($P < 0.05$)。**结论** Bre 可抑制 EMs 大鼠异位病灶生长、减轻盆腔粘连, 其机制可能与抑制 p38MAPK 信号通路过度激活, 进而抑制炎症反应有关。

关键词: 灯盏花素; 子宫内膜异位症; p38MAPK 信号通路; 炎症; 核因子- κ B

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3167-07

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.011

基金项目: 河北省医学科学研究课题 (No.20191491)。

作者简介: 姬白嫣, 女, 副主任医师, 主要从事妇科疾病诊治及研究工作, email: jby811009@163.com

Mechanism of Breviscapine injection alleviating endometriosis in rats by regulating p38MAPK signaling pathways

Ji Bai-yan, WEI Juan (*Handan Second Hospital, Handan Hebei 056001*)

Abstract: Objective To determine the effect of Breviscapine injection (Bre) on endometriosis (EMs) in rats, and its mechanism based on p38MAPK signaling pathways. **Methods** According to body weight, 60 female rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, a Bre ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, a SB202190 (p38MAPK inhibitor, $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group and a Bre ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + SB202190 ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, with 12 rats in each group. Except for the sham operation group, in the other 4 groups EMs rat models were established by autologous endomembrane transplantation. After the modeling, each group was intraperitoneally injected corresponding drugs once daily for 4 consecutive weeks. The volume of the ectopic lesions was measured by ultrasound imaging system. The pelvic adhesion was scored according to the Haber scale. The histopathological changes of the ectopic lesions was observed with HE staining. The content of inflammatory factors (TNF- α , IL-6, and IL-8) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of p38MAPK signaling pathways related proteins p38, p-p38, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), p-ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p-JNK, and nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), p-NF- κ B p65, and p-I κ B α were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, Bre, SB202190 and Bre + SB202190 significantly decreased the ectopic lesion volume and pelvic adhesion score in EM rats ($P < 0.05$), promoted the pathological changes in the ectopic lesions such as structural disorder, interstitial loosening, necrosis and shedding of the epithelial cells, decreased neovascularization and inflammatory cell infiltration, caused gland atrophy, and significantly decreased the content of TNF- α , IL-6, and IL-8, the ratio of p-p38/p38, (p-ERK1/2)/(ERK1/2), p-JNK/JNK, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 and the relative expression of p-I κ B α ($P < 0.05$). The above effects in the Bre + SB202190 group were significantly better than those of the Bre group and the SB202190 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Bre can inhibit the growth of ectopic lesions and reduce pelvic adhesions in EMs rats, whose mechanism may be related to inhibiting the excessive activation of p38MAPK signaling pathways, thereby inhibiting the inflammatory responses.

Key words: breviscapine; endometriosis; p38MAPK signaling pathway; inflammation; NF- κ B

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是一种起病隐匿、迁延难愈的慢性妇科疾病, 发病率为 10%~15%, 以育龄期妇女居多, EMs 可引发痛经、不孕、盆腔痛、性交痛等, 严重影响患者生活质量和生殖健康。EMs 发病机制复杂, 其中炎症反应在其发病过程中发挥着重要作用^[1]。p38 促分裂素原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK) 信号通路是细胞内重要的信号转导通路, 在炎症反应过程中发挥着关键调控作用^[2]。

灯盏花素 (breviscapine, Bre) 是由菊科植物短葶飞蓬干燥全草中提取的一种羟基黄酮类化合物, 具有改善微循环、抗炎、抗氧化等多种药理学作用, 目前主要用于脑供血不足、脑卒中后遗症、冠心病、心绞痛等疾病的治疗。Bre 可

减轻子宫切除术后炎症反应^[3], 能够通过抑制 p38MAPK 信号通路减轻小胶质细胞介导的神经炎症反应^[4], 但 Bre 能否缓解 EMs 病情尚未见文献报道。本研究旨在探讨 Bre 对大鼠 EMs 的影响及其机制, 以期为临床治疗 EMs 提供新的思路。

1 材料

1.1 实验动物

60 只无特定病原体级 8 周龄雌性 SD 大鼠 [玛斯生物技术 (固安) 有限公司, SCXK (冀) 2021-004], 体重 (260 ± 20) g, 饲养于邯郸康业制药有限公司实验动物中心, 室温 (23 ± 2) °C、相对湿度 (60 ± 5)%、光照随室外自然变化, 进食饮水不限。本实验通过邯郸市第二医院伦理委员会批准 [批件号: HDEY (K) 字 2021-013]。

1.2 试药

灯盏花素注射液 (Bre, 规格: 5 mL/20 mg, 神威药业有限公司, 批号: S21D02017); MAPK 抑制剂 SB202190 (美国 Santa Cruz 公司, 批号: 1911013); 戊酸雌二醇片 (拜耳医药公司, 批号: J20200730); HE 染色、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京索莱宝公司, 批号: G1120、PC0020); 肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、IL-8 酶联免疫吸附法试剂盒和 ECL 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为: H052-1、H007-1-2、H008、W028-2-1); p38、p-p38、细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)、p-ERK1/2、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p-JNK 及核因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 、GAPDH 抗体 (北京博奥森公司, 批号分别为 bs-0637R、bs-5476R、bsm-52259R、bs-1522R、bs-2592R、bs-4163R、bs-20160R、bs-3543R、bs-5514R、bs-2188R)。

1.3 仪器

SEQUOIA512 小动物超声影像系统 (德国 SIEMENS 公司); ELX800 全波长酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); RM2245 石蜡切片机、Histostar 包埋机 (德国 Leica 公司); CR22N 高速低温离心机 (日本 Hitachi 公司); 1658001 蛋白电泳转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组、模型构建与给药

将 60 只大鼠按体重随机分为假手术组、模型组、Bre 组、SB202190 组、Bre + SB202190 组, 每组 12 只。除假手术组外, 其他 4 组参照孙瑞英等^[5]报道的方法制备 EMs 大鼠模型: 1 次·d⁻¹灌胃 0.1 mg·kg⁻¹ 戊酸雌二醇, 3 d 后 40 mg·kg⁻¹ 腹腔注射 (ip) 戊巴比妥钠麻醉, 取左侧子宫角部分子宫内膜组织, 修剪成 0.5 cm×0.5 cm 小块后移植到右侧腹壁皮下筋膜层和腹壁肌层之间。假手术组行手术通路, 切除左侧子宫角部分子宫内膜组织, 但不移植。4 周后, 通过动物超声影像系统检测, 右侧腹壁下出现暗灰色低回声区, 即为异位病灶, 异位病灶体积 ≥ 50 mm³ 即造模成功^[6]。经超声影像检测判定造模成功后, Bre 组 ip 给予 1 mg·kg⁻¹ Bre (根据人与大鼠剂量换算公式计算所得), SB202190 组 ip 给予 15 mg·kg⁻¹ SB202190^[7], Bre + SB202190 组 ip 给予 1 mg·kg⁻¹ Bre + 15 mg·kg⁻¹ SB202190, 假手术组和模型组 ip 给予等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次·d⁻¹ 连续 4 周。

2.2 超声影像系统测量异位病灶体积及 Haber 评分标准行盆腔粘连评分

给药完成 12 h 后, 通过超声影像系统测量异

位病灶体积。40 mg·kg⁻¹ ip 戊巴比妥钠实施麻醉后开腹, 暴露异位病灶, 参照 Haber 等^[8]报道的评分标准进行盆腔粘连评分: 无粘连记 0 分; 轻微粘连, 记 1~2 分; 轻度粘连, 异位病灶周围可见少许粘连带, 记 3~4 分; 中度粘连, 异位病灶周围可见一些粘连带, 记 5 分; 中重度粘连, 可见较多的粘连带围绕异位病灶, 肠管周围出现少许粘连带, 记 6~7 分; 重度粘连, 肠管周围出现大量粘连带, 记 8~9 分; 严重粘连, 大量粘连带围绕肠系膜和腹膜间, 肠系膜和腹膜间见严重粘连, 记 10 分。

2.3 HE 染色法观察异位病灶组织病理改变

取部分异位病灶组织 (假手术组取在位子宫内膜组织), 10% 中性甲醛溶液固定、石蜡包埋、4 μ m 切片、烤片、脱蜡处理后行 HE 染色, 显微镜下观察异位病灶组织病理改变。

2.4 酶联免疫吸附法检测异位病灶炎症因子含量

取每只大鼠 100 mg 异位病灶组织 (假手术组取在位子宫内膜组织), 加入 1 mL 0.9% 氯化钠溶液后研磨匀浆, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min 取上清液, 按试剂盒说明检测炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量。

2.5 Western blot 法检测异位病灶蛋白表达

每只大鼠取 50 mg 异位病灶组织 (假手术组取在位子宫内膜组织), 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白含量, 以 40 μ g 蛋白量上样, 通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白、转膜、室温封闭后, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗稀释液 p38 (1:1000)、p-p38 (1:1000)、ERK1/2 (1:800)、p-ERK1/2 (1:800)、JNK (1:800)、p-JNK (1:800)、NF- κ B p65 (1:1000)、p-NF- κ B p65 (1:1000)、p-I κ B α (1:800)、GAPDH (1:2000) 过夜, 室温孵育二抗 (1:4000) 1.5 h, ECL 显影, 通过 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.6 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件进行处理, 运用 K-S 法检测计量资料正态性, Levene 法检验方差齐性。符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐, 两两比较采用 Dunnett' T3 检验; 不符合正态分布的以四分位数间距 [M (P_{25} , P_{75})] 表示, 采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶体积和盆腔粘连评分的影响

假手术组未见异位病灶; 与模型组相比, Bre 组、SB202190 组和 Bre + SB202190 组异位

病灶体积和盆腔粘连评分显著降低 ($P < 0.05$); 与 SB202190 组相比, Bre 组异位病灶体积显著降低 ($P < 0.05$), 盆腔粘连评分差异无统计学意义

($P > 0.05$); 与 Bre 组和 SB202190 组相比, Bre + SB202190 组异位病灶体积和盆腔粘连评分显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 1 及表 1。

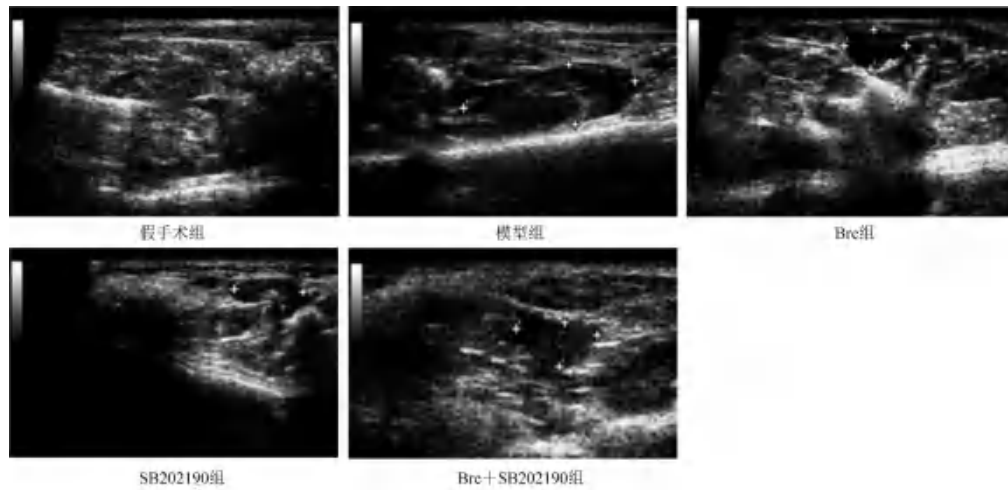


图 1 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶的影响 (超声影像图)

Fig 1 Effect of Bre on the ectopic lesions in EMs rats (Ultrasonic image)

表 1 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶体积和盆腔粘连评分的影响 ($n = 12$)
Tab 1 Effect of Bre on the ectopic lesion volume and pelvic adhesion score of EMs rats ($n = 12$)

组别	病灶体积 /mm ³	盆腔粘连评分 /分
假手术组	—	—
模型组	91.43 ± 14.05	7.00[5.00, 8.00]
Bre 组	27.15 ± 3.64 [#] ▲	3.00[2.00, 3.00] [#]
SB202190 组	38.96 ± 5.08 [#]	3.00[2.00, 4.00] [#]
Bre + SB202190 组	20.41 ± 3.12 [#] ▲▲	2.00[1.00, 2.00] [#] ▲▲

注: 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与 Bre 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 SB202190 组比较, [▲] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group, [#] $P < 0.05$; compared with the Bre group, [△] $P < 0.05$; compared with the SB202190 group, [▲] $P < 0.05$.

3.2 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶组织病理改变的影响

假手术组在位子宫内膜上皮细胞单层整齐排列、间质细胞紧密; 模型组异位病灶呈柱状异常增生、上皮细胞呈假双侧或多层结构、间质细胞增多、新生血管丰富、腺体数量增多; 与模型组相比, Bre 组、SB202190 组和 Bre + SB202190 组异位病灶呈现不同程度的结构紊乱、间质疏松、上皮细胞坏死脱落、新生血管减少、腺体萎缩、炎性细胞浸润减少等病理改变, 其中 Bre + SB202190 组效应优于 Bre 组和 SB202190 组。结果见图 2。

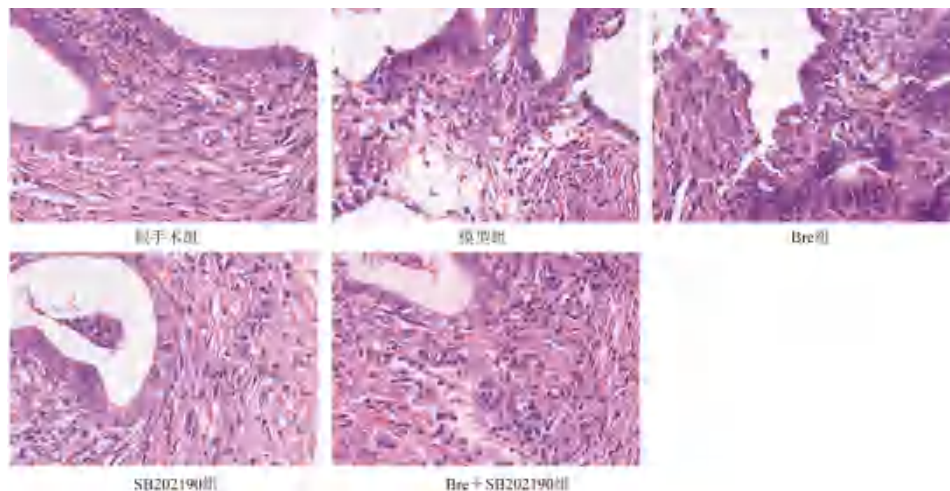


图 2 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶组织病理改变的影响 (HE, ×400)

Fig 2 Effect of Bre on the histopathological changes of the ectopic lesions in EMs rats (HE, ×400)

3.3 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量的影响

与假手术组在位子宫内膜相比, 模型组异位病灶 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量显著升高 ($P < 0.05$);

与模型组相比, Bre 组、SB202190 组和 Bre + SB202190 组 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量显著降低 ($P < 0.05$); 与 SB202190 组相比, Bre 组 TNF- α 、IL-6 含量显著降低 ($P < 0.05$), IL-8 含量差异无统

计学意义 ($P > 0.05$); 与 Bre 组和 SB202190 组相比, Bre + SB202190 组 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量显著降低 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量的影响 ($n = 12$)
Tab 2 Effect of Bre on the content of TNF- α , IL-6, and IL-8 in the ectopic lesions of EMs rats ($n = 12$)

组别	TNF- α / (ng · L ⁻¹)	IL-6/ (ng · L ⁻¹)	IL-8/ (ng · L ⁻¹)
假手术组	118.53 ± 19.47	34.72 ± 4.88	106.41 ± 16.29
模型组	259.06 ± 37.18*	81.53 ± 10.72*	233.82 ± 34.61*
Bre 组	175.49 ± 27.63 [#] △	48.65 ± 6.38 [#] △	151.79 ± 25.04 [#]
SB202190 组	206.80 ± 29.24 [#]	57.09 ± 8.16 [#]	174.25 ± 28.36 [#]
Bre + SB202190 组	143.49 ± 21.65 [#] △▲	40.81 ± 5.73 [#] △▲	125.39 ± 18.40 [#] △▲

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与 Bre 组比较, △ $P < 0.05$; 与 SB202190 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$; compared with the Bre group, △ $P < 0.05$; compared with the SB202190 group, ▲ $P < 0.05$.

3.4 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK 蛋白表达的影响

与假手术组在位子宫内膜相比, 模型组异位病灶 p-p38、p-ERK1/2、p-JNK 相对表达量及 p38、ERK1/2、JNK 磷酸化比率 [p-p38/p38、(p-ERK1/2)/(ERK1/2)、p-JNK/JNK] 显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, Bre 组、SB202190 组和 Bre + SB202190 组 p-p38、p-ERK1/2、p-JNK 相对表达量及 p38、ERK1/2、JNK 磷酸化比率显著降低 ($P < 0.05$); 与 Bre 组相比, SB202190 组 p-p38、p-ERK1/2/p-JNK 相对表达量及 p38、ERK1/2、JNK 磷酸化比率显著降低 ($P < 0.05$), 与 Bre 组和 SB202190 组相比, Bre + SB202190 组 p-p38、p-ERK1/2、p-JNK 相对表达量及 p38、ERK1/2、JNK 磷酸化比率显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 3、4。

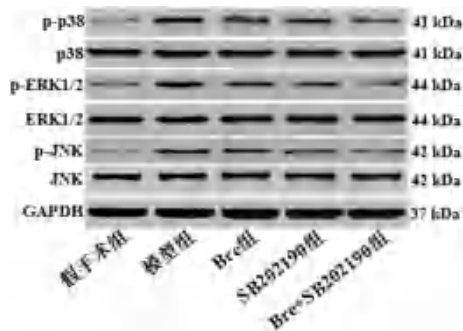


图 3 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK 蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of Bre on the expression of p38, p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, and p-JNK in ectopic lesions of EMs rats

3.5 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、p-I κ B α 蛋白表达的影响

与假手术组在位子宫内膜比较, 模型组异位病灶 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 相对表达量及 NF- κ B p65

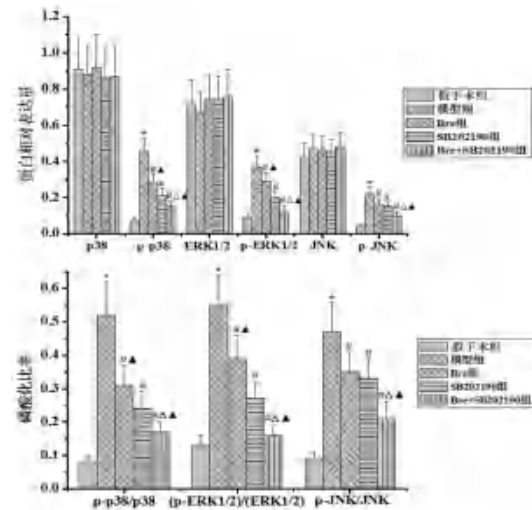


图 4 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK 蛋白相对表达量和 p38、ERK1/2、JNK 磷酸化比率的影响 ($n = 3$)

Fig 4 Effect of Bre on the relative expression of p38, p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, p-JNK and the phosphorylation ratio of p38, ERK1/2, JNK in ectopic lesions of EMs rats ($n = 3$)

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与 Bre 组比较, △ $P < 0.05$; 与 SB202190 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$; compared with the Bre group, △ $P < 0.05$; compared with the SB202190 group, ▲ $P < 0.05$.

磷酸化比率 (p-NF- κ B p65/NF- κ B p65) 显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, Bre 组、SB202190 组和 Bre + SB202190 组 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 相对表达量及 NF- κ B p65 磷酸化比率显著降低 ($P < 0.05$); 与 Bre 组相比, SB202190 组 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 相对表达量及 NF- κ B p65 磷酸化比率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Bre 组和 SB202190 组相比, Bre + SB202190 组 p-NF- κ B p65、p-I κ B α 相对表达量及 NF- κ B p65 磷酸化比率显著降低 ($P < 0.05$) (见图 5、6)。

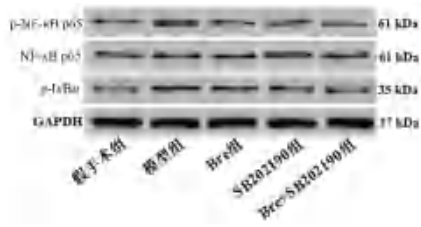


图 5 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 NF-κB p65、p-NF-κB p65、p-IκBα 蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of Bre on the expression of NF-κB p65, p-NF-κB p65, and p-IκBα in the ectopic lesions of EMs rats

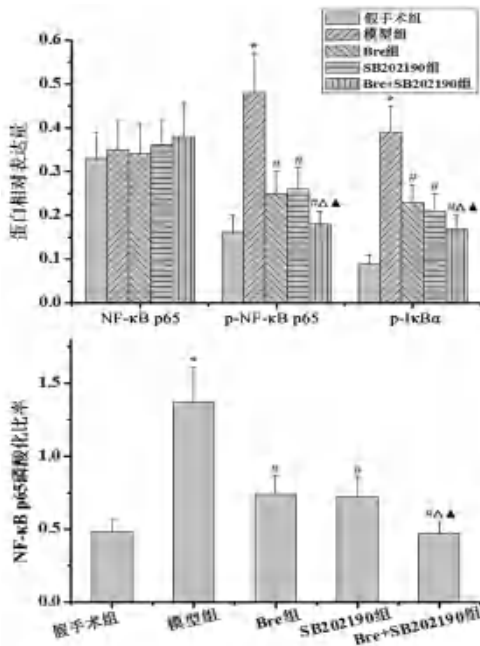


图 6 Bre 对 EMs 大鼠异位病灶 NF-κB p65、p-NF-κB p65、p-IκBα 蛋白相对表达量和 NF-κB p65 磷酸化比率的影响 (n = 3)

Fig 6 Effect of Bre on the relative expression of NF-κB p65, p-NF-κB p65, p-IκBα and the phosphorylation rate of NF-κB p65 in the ectopic lesions of EMs rats (n = 3)

注：与假手术组比较，*P < 0.05；与模型组比较，#P < 0.05；与 Bre 组比较，△P < 0.05；与 SB202190 组比较，▲P < 0.05。

Note: Compared with the sham operation group, *P < 0.05; compared with the model group, #P < 0.05; compared with the Bre group, △P < 0.05; compared with the SB202190 group, ▲P < 0.05.

4 讨论

EMs 动物模型制备方法主要有体外培养法、自体移植法、异体移植法等，其中自体移植法具有成功率高、复制性好、与人临床病理特点接近等优势，是普遍认可的 EMs 造模方法^[9]。本研究发现，经 Bre 或 SB202190 干预能够明显降低 EMs 大鼠异位病灶体积和盆腔粘连评分，诱导异位病灶结构紊乱、间质疏松、上皮细胞坏死脱落、新生血管减少、腺体萎缩、炎性细胞浸润减少等病理学改变，降低 TNF-α、IL-6、IL-8

含量，且 Bre + SB202190 组作用优于 Bre 组和 SB202190 组，提示 Bre 可抑制 EMs 大鼠异位病灶生长、减轻盆腔粘连，其作用机制可能与抑制炎症反应有关。

炎症反应在 EMs 疾病进展过程中发挥着关键作用，而 p38MAPK 信号通路则是调控炎症反应的重要信号转导通路。SB202190 是一种咪唑吡啶类化合物，能够通过阻碍 ATP 与 p38MAPK 结合而抑制 p38MAPK 信号通路，研究表明 SB202190 阻断 p38MAPK 通路能够减轻炎症反应^[10]，因此 p38MAPK 信号通路作为抗感染治疗的有效靶点被广泛关注。有文献报道通过抑制 p38MAPK 信号通路及其介导的炎症反应可有效抑制大鼠 EMs^[11]。p38MAPK 通路主要包括 p38、ERK1/2、JNK 等关键信号分子，3 种信号分子被诱导磷酸化激活后核转位，进而诱导 TNF-α、IL-6、IL-8 等炎症因子表达与浸润，引发并加重炎症反应^[12]。正常生理状态下，NF-κB p65 亚基与特异性抑制分子 IκBα 结合，以 NF-κB p65-IκBα 复合体形式存在于细胞质中，p38MAPK 通路活化信号分子 p-ERK1/2 能够诱导 IκBα 和 NF-κB p65 磷酸化而促进 NF-κB p65-IκBα 复合体解离，游离 p-NF-κB p65 核转位后可诱导 TNF-α、IL-6、IL-8 等炎症因子表达与释放^[13]。本研究发现，经 Bre 或 SB202190 干预能够明显降低 p-p38、p-ERK1/2、p-JNK、p-NF-κB p65 相对表达量和 p38、ERK1/2、JNK、NF-κB p65 磷酸化比率，Bre + SB202190 组作用优于 Bre 组和 SB202190 组，提示 Bre 可能通过抑制 p38MAPK 信号通路过度激活而抑制 EMs 大鼠炎症反应，Bre 和 SB202190 的协同增效机制可能与两者均能抑制 p38MAPK 信号通路活化有关。

综上所述，Bre 可抑制 EMs 大鼠异位病灶生长、减轻盆腔粘连，其机制可能与抑制 p38MAPK 信号通路过度激活，进而抑制炎症反应有关。本课题组后续将采用 p38MAPK 激动剂联合 Bre 给药，以进一步证实该药对 p38MAPK 信号通路的直接靶效作用。

参考文献

[1] Zhu H, Wang Y, He YB, et al. Inflammation-mediated macrophage polarization induces TRPV1/TRPA1 heteromers in endometriosis [J]. Am J Transl Res, 2022, 14 (5): 3066-3078.
 [2] 张瑶, 谢家钊, 胡军, 等. 利拉鲁肽通过 p38 MAPK 通路改善高同型半胱氨酸血症诱导的大鼠海马氧化应激及炎症损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34 (11):

- 2025-2030.
- [3] 张代玲, 王珊珊. 灯盏花素注射液对腹腔镜全子宫切除术患者围术期应激反应及炎症反应的影响[J]. 中成药, 2018, 40 (9): 2114-2116.
- [4] 韩宏. MAPK 信号在激活的小胶质细胞中的表达及灯盏花素联合依达拉奉干预的影响[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
- [5] 孙瑞英, 崔轶凡. 子宫内膜异位症动物模型制备方法研究概况[J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21 (6): 457-460, 464.
- [6] 任艳青, 成秀梅, 方惠敏, 等. 基于调控 HIF-1 α 表达探讨温经汤改善大鼠子宫内膜异位症的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (23): 63-70.
- [7] 刘学文, 张海奇, 田步先, 等. SB202190 对 KA 诱导的难治性癫痫大鼠海马神经元的保护作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2011, 49 (2): 44-48, 53.
- [8] Haber E, Danenberg HD, Koroukhov N, et al. Peritoneal macrophage depletion by liposomal bisphosphonate attenuates endometriosis in the rat model [J]. Hum Reprod, 2009, 24 (2): 398-407.
- [9] 冉青珍, 司徒仪, 杜标炎. 自体移植法复制大鼠子宫内膜异位症模型[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20 (8): 1534-1536.
- [10] Guo K, Ma JX, Liang WY. Effects of SB202190 on expression levels of IL-6 and NF- κ B in flap ischemia-reperfusion injury [J]. Exp Ther Med, 2018, 16 (3): 2522-2526.
- [11] 祝洁, 薛晓鸥, 贺稚平, 等. 基于 p38MAPK 通路探讨乌丹丸对子宫内膜异位症寒凝血瘀证巨噬细胞极化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (24): 105-113.
- [12] 陈宝鑫, 傅晨, 张昕洋, 等. 清热活血药对急性脑缺血再灌注大鼠 MAPK 通路的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18 (22): 3787-3791.
- [13] 张盼, 王钰莹, 王婷, 等. 香烟烟雾颗粒通过 MAPK 和 NF- κ B 信号通路上调内皮素受体诱导大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩[J]. 中南药学, 2022, 20 (6): 1238-1244.
- (收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-04-08)

眩晕宁的血清药物化学研究

黎欣¹, 陈淮钰², 叶洁文¹, 吴刚³, 林青华^{1, 4*} (1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 梧州市中医医院, 广西 梧州 543003; 3. 广西中医药大学教学实验实训中心, 南宁 530200; 4. 广西中医药大学广西壮瑶药工程技术研究中心, 南宁 530200)

摘要: 目的 基于中药血清药物化学的研究方法初步分析眩晕宁的入血成分, 探讨其可能的药效物质基础。方法 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对大鼠的空白血清、含药血清及眩晕宁药液进行数据采集, 结合 MassLynx V4.1 及 UNIFI 软件, 并根据保留时间、准确质量及二级碎片信息鉴定眩晕宁的入血成分。结果 在眩晕宁给药大鼠血清中共鉴定 28 个原形入血成分, 包括香豆素类、萜类、黄酮类、挥发油类、生物碱类等。结论 血清中鉴定出的入血成分, 可能是眩晕宁潜在的活性成分, 为其药效物质基础研究提供了依据。

关键词: 眩晕宁; 含药血清; 血清药物化学; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)12-3173-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.012

Serum pharmacochemistry of Xuanyunning

LI Xin¹, CHEN Wei-yu², YE Jie-wen¹, WU Gang³, LIN Qing-hua^{1, 4*} (1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Wuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuzhou Guangxi 543003; 3. Teaching Experiment and Training Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 4. Guangxi Zhuang Yao Medicine Center of Engineering and Technology, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200)

基金项目: 广西中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (No.202210600009); 广西中医药大学科研面上项目 (No.2022MS032)。

作者简介: 黎欣, 女, 在读本科生, email: lixin233233@163.com *通信作者: 林青华, 男, 副教授, 主要从事中药药效物质基础、作用机制及中药炮制研究, email: linqinghua519@163.com

Abstract: Objective To determine the blood components of Xuanyunning and the possible basis for pharmacodynamic material via serum medicinal chemistry of traditional Chinese medicine. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS technology was used to collect the data of the blank serum, serum containing drug and Xuanyunning liquid in rats. Combined with MassLynx V4.1 and UNIFI software, the blood components of Xuanyunning were identified with retention time, exact mass and secondary fragment information. **Results** Totally 28 prototype blood components were identified in the serum of rats treated with Xuanyunning, including coumarins, terpenoids, flavonoids, volatile oils, and alkaloids, etc. **Conclusion** The blood components identified in the serum may be the potential active components of Xuanyunning, which provides a basis for the research of its pharmacodynamics.

Key words: Xuanyunning; medicated serum; serum pharmacochemistry; UPLC-Q-TOF-MS

眩晕宁是在泽泻汤、二陈汤和二至丸的基础上加减化裁而来^[1], 具有健脾利湿、益肝补肾的功效, 临床常用于痰湿中阻、肝肾不足引起的头昏、头晕^[2]。现代研究发现, 眩晕宁对良性阵发性位置性眩晕复位后残余症状^[3]、后循环缺血性眩晕^[4]效果显著, 且能提高基底动脉平均血流速度、降低血浆黏度、增加脑血流、减少脑血管阻力^[5-6], 值得深入研究。鉴于眩晕宁的血清药物化学研究方面的内容未见报道, 本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析技术与中药血清药物化学相结合的方法, 以 SD 大鼠含药血清为研究对象, 鉴定眩晕宁灌胃给药后的入血成分, 为探讨其药效物质基础提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Xevo G2-XS QTOF/MS 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪、Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (美国 Waters); QL-901 型涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Centrifuge5424 R 型小型台式微量冷冻离心机 (德国 Eppendorf); Direct-Q5UV 型超纯水仪一体机 (广西南宁市博美生物科技有限公司); A502200 型可视氮吹仪 (浙江月旭材料有限公司)。

1.2 试药

眩晕宁药材流浸膏 (桂林三金生物制药有限公司, 由泽泻、白术、茯苓、法半夏、女贞子、墨旱莲、菊花、牛膝、陈皮、甘草按处方剂量, 经水提、浓缩而成, 1 g 浸膏相当于生药 2 g); 乙腈 (批号: 201643, 赛默飞世尔科技有限公司); 水合氯醛 (批号: 2018103001, 成都市科隆化学品有限公司); 氯化钠 (批号: L2002022, 上海阿拉丁生化科技有限公司); 甲醇 (批号: 20210401, 赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体重为 180 ~ 220 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (湘) 2019-0004]。本实验过程中对实验动物的操作符合实验动物福利伦理专业委员会的要求并在《实验动物福利伦理审查指南》的规定下进行。

2 方法

2.1 试药制备

取眩晕宁流浸膏 24 g, 加去离子水稀释并定容至 100 mL, 混匀, 即得眩晕宁药液 (每 1 mL 含生药 0.48 g)。

2.2 血清的获取

取 SD 大鼠适应性饲养 3 d 后, 随机分为空白组 (4 只) 和给药组 (4 只), 按 10 mL · kg⁻¹ 的剂量分别给予生理盐水和眩晕宁药液; 大鼠给药前 12 h 禁食不禁水, 1 d 给药 3 次, 共给药 1 d, 末次给药 1 h 后, 腹主动脉取血, 离心, 取血清, 同组血清等体积混匀, 即得空白血清和含药血清。

2.3 中药血清药物化学研究

2.3.1 眩晕宁供试品的制备 取眩晕宁药液 30 μL, 加 2 mL 甲醇, 离心 (14 000 r · min⁻¹, 4 °C) 10 min, 取上清液即得眩晕宁供试品。

2.3.2 血清供试品的制备 取含药血清 0.5 mL, 加 3 倍量乙腈, 涡旋 1 min, 离心 (14 000 r · min⁻¹, 4 °C) 10 min, 取上清液, 氮吹至干, 残渣加 100 μL 甲醇复溶, 离心, 取上清液即得含药血清供试品。同法制备空白血清供试品。

2.4 数据采集

采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术在正、负离子模式下分别对眩晕宁药液、含药血清和空白血清的供试品进行数据采集。

2.4.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1%

甲酸水溶液 (A) -0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 95%A; 1 ~ 20 min, 95% ~ 5%A; 20 ~ 21 min, 5% ~ 95%A; 21 ~ 22 min, 95%A), 流速 0.50 mL · min⁻¹, 进样量 0.2 μL, 柱温 40 °C。

2.4.2 质谱条件 离子源温度 100 °C, 扫描范围 50 ~ 1500 Da, 毛细管电压 500 V (正离子模式) 或 2500 V (负离子模式), 样品锥孔电压 30.0 V, 脱溶剂气温度 450 °C, 锥孔气体流速 50 L · h⁻¹, 脱溶剂气流速 900 L · h⁻¹, 流速 10 μL · min⁻¹。

2.5 数据处理

采用 MassLynx V4.1 及 UNIFI 软件进行数据处理。首先, 通过查阅文献自建眩晕宁各味药的化合物数据库, 结合 UNIFI 软件的自动筛查功能, 初步得到质谱数据分析结果, 通过质谱数据对软件给出的可能存在的化合物列表进行手动鉴定, 将含药血清、空白血清及眩晕宁药液的一级质谱、保留时间进行对比, 筛选出含药血清和眩晕宁药液的共同成分, 并扣除空白血清及空白背景中的成分, 即眩晕宁药液的原形入血成分; 结合其二级碎片信息、裂解过程及参考文献, 最终确定眩晕宁原形入血成分。

3 结果

通过对眩晕宁供试品和血清供试品的数据处理, 结果共鉴定眩晕宁的原形入血成分 28 个 (见表 1), 其中萜类化合物 9 个、黄酮类化合物 4 个、香豆素类化合物 3 个、挥发油类化合物 3 个、生物碱类化合物 3 个、其他类化合物 6 个。

3.1 萜类

在眩晕宁原形入血的化合物中共鉴定 9 个萜类成分, 包括 alismorientols A (3)、白术内酯 IV (4)、dammarendiol-3-*O*-palmitate (5)、竹节参皂苷 -1 (6)、atractylmacrol B (7)、ligustrin A (8)、alismanoid C (21)、alismanol M (22)、23-乙酰泽泻醇 S (23)。以化合物 3 为例, 对其鉴定过程予以说明。其在负离子模式下产生的一级质谱准分子离子峰为 m/z 317.1988, 与 alismorientols A 加甲酸的离子峰 $[M + HCOO]^-$ 一致, 保留时间为 4.89 min, 通过 UNIFI 软件确定其分子式为 C₁₅H₂₈O₄, 二级质谱给出的碎片离子 m/z 243.9035、 m/z 253.0514 为准分子离子峰, 为 m/z 271.1388 $[M-H]^-$ 分别失去 1 分子 C₂H₄ 和 1 分子 H₂O 形成, 结合文献^[7], 推测该化合物为 alismorientols A, 其二级质谱图及其可能的裂解过程见图 1。

3.2 黄酮类

在眩晕宁原形入血的化合物中共鉴定 4 个黄酮

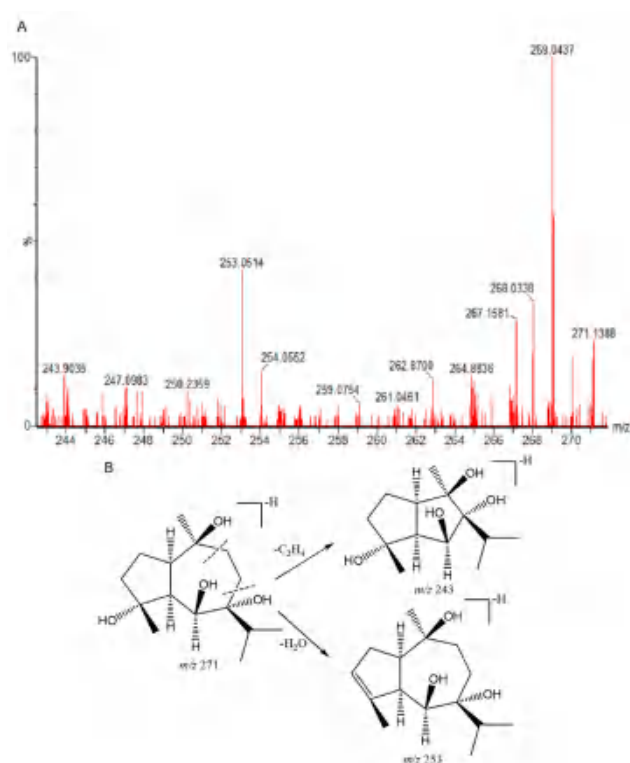


图 1 Alismorientols A 在负离子模式下的二级质谱图 (A) 及其裂解过程 (B)

Fig 1 Secondary mass spectrum of alismorientols A in negative ion mode (A) and its fragmentation pathway (B)

类成分, 包括槲皮素 -3-*O*-葡萄糖苷 (9)、芫花素 (10)、5-羟基-4'-甲氧基二氢黄酮 (11)、5, 7, 8, 4'-四甲基黄酮 (24)。以化合物 9 为例, 对其鉴定过程予以说明。其在负离子模式下产生一级质谱准分子离子峰 m/z 463.0908 $[M-H]^-$, 保留时间为 4.61 min, 通过 UNIFI 软件确定其分子式为 C₂₁H₂₀O₁₂。二级质谱给出了碎片离子 m/z 301.0482, 为其失去 1 个葡萄糖基 (Glc) 得到, 继而失去 1 分子 CO、2 个 H 得到 m/z 271.0634 或失去 1 分子 CO、1 分子 OH、1 个 H 得到 m/z 255.0722, 结合文献^[8], 推测该化合物为槲皮素 -3-*O*-葡萄糖苷, 其二级质谱图及可能的裂解过程见图 2。

3.3 香豆素类

在眩晕宁原形入血的化合物中共鉴定 3 个香豆素类成分, 包括蟛蜞菊内酯 (1) 和 kanzonol W (2)、红花岩黄芪香豆雌酚 E (20)。香豆素类化合物的裂解碎片多为 $[M-H-CO]^-$ 、 $[M-H-COO]^-$ 、 $[M-H-CH_3]^-$ 离子峰。以化合物 20 为例, 对其鉴定过程予以说明。该化合物在正离子模式下产生一级质谱准分子离子峰 m/z 329.0658 $[M + H]^+$, 保留时间为 3.64 min, 借助 UNIFI 软件确定分子式为 C₁₇H₁₂O₇, 其二级碎片离子 m/z 285.0604, 推断是失去 1 分子 COO 而得; 准分子离子峰脱去 1 分子 CO 得到碎

表 1 眩晕宁原形入血成分

Tab 1 Prototype blood components of Xuanyunning

序号	保留时间/min	离子模式	分子式	测定值 (m/z)	加合离子	误差 / $\times 10^{-6}$	主要离子碎片	化合物名称	来源
1	5.10	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	313.0374	- H	6.3	313.0375、299.0657、285.0441、255.0834、243.9035	蟛蜞菊内酯	墨旱莲
2	2.49	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	335.0929	- H	1.2	335.9150、319.6202、308.9882	kanzonol W	甘草
3	4.89	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₈ O ₄	317.1988	+ HCOO	5.7	271.1388、253.0514、243.9035	alisorientols A	泽泻
4	7.94	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	305.1412	- H	5.6	305.0084、261.9914、262.9956、245.8930	白术内酯IV	白术
5	19.51	[M-H] ⁻	C ₄₆ H ₈₂ O ₃	727.6209	+ HCOO	- 5.1	682.6343、443.0063、427.0025	dammarendiol-3-O-palmitate	女贞子
6	11.43	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.4109	+ HCOO	- 0.8	454.9903、410.0013	竹节参皂苷-1	牛膝
7	10.75	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	295.1934	+ HCOO	6.6	185.0623、159.0112、108.1121、93.0014	atractylmacrol B	白术
8	0.50	[M-H] ⁻	C ₈₃ H ₁₄₆ O ₁₀	1302.0918	- H	5.8	1302.1486、694.7872、650.7298	ligustrin A	女贞子
9	4.61	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0908	- H	5.6	463.0936、301.0482、271.0634、255.0722	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	牛膝
10	0.92	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	319.0383	+ Cl	1.5	283.1091、253.0402、121.0363	芫花素	甘草
11	4.43	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	332.0801	+ NO ₃	7.5	269.1130、255.0666、227.7947	5-羟基-4'-甲氧基二氢黄酮	—
12	4.43	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₈ O	216.1254	+ NO ₃	5.7	153.0292、135.0131	α -松油醇	菊花
13	5.24	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O	151.0412	+ HCOO	7.3	105.3363、76.7033	苯甲醛	法半夏
14	0.54	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	266.0905	- H	3.7	266.8014、215.0311、135.0295、119.9462	腺苷	菊花、法半夏
15	0.54	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₃ N ₅ O ₄	280.1061	- H	3.3	146.9654、135.0295、119.9462	2'-O-甲基腺苷	法半夏
16	0.54	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₂ O ₆	215.0334	+ Cl	2.8	179.0564、162.8397、160.0654	果糖	菊花
17	4.72	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₆ O ₃	217.1097	+ HCOO	7.3	171.1028、127.8755	9-氧代壬酸	法半夏
18	0.49	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	173.1049	- H	2.8	112.9845	L(+)-精氨酸	法半夏
19	0.71	[M-H] ⁻	C ₅ H ₁₅ NO ₂	156.0790	+ Cl	- 4.6	120.9008	氢氧化胆碱	法半夏
20	3.64	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	329.0658	+ H	0.8	329.0664、301.0758、285.0604、313.1597	红花岩黄芩香豆雌酚 E	甘草
21	4.42	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₆ O ₃	272.2222	+ NH ₄	0.8	255.0729、211.0727	alisanoid C	泽泻
22	8.14	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	505.3531	+ H	1.5	505.1193、476.3107	alisanol M	泽泻
23	19.94	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	546.3748	+ NH ₄	- 7.6	486.3111、468.3700	23-乙酰泽泻醇 S	泽泻
24	0.62	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₈ O ₂	317.0956	+ K	5.5	250.0774、234.0714	5, 7, 8, 4'-四甲基黄酮	陈皮
25	4.48	[M+H] ⁺	C ₃ H ₅ N ₃	84.0557	+ H	0.7	84.0545	1-甲基-1, 2, 4-三唑	菊花
26	8.68	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₃ NO	152.1075	+ H	3.5	152.0662、137.0970、135.1176	N-甲基酪胺	陈皮
27	2.19	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	367.1499	+ Na	- 4.5	301.1186、258.1121	atractylodemayne F	白术
28	1.12	[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	155.0806	+ Na	9.8	117.0582、87.0333、72.9374	鸟氨酸	法半夏

片离子峰 m/z 301.0758, 结合参考文献^[9]及可能存在的裂解过程, 推测为红花岩黄芩香豆雌酚 E, 其二级质谱图及可能存在的裂解过程见图 3。

3.4 挥发油类

在眩晕宁原形入血的化合物中共鉴定 3 个挥发油类成分, 包括 α -松油醇 (12)、苯甲醛 (13)、1-甲基-1, 2, 4-三唑 (25)。以化合物 12 为例, 对其鉴定过程予以说明。其在负离子模式下产生一级质谱准分子离子峰 m/z 216.1254 [M + NO₃]⁻, 保留时间为 4.43 min, 确定其分子式为 C₁₀H₁₈O, 二级质谱给出了碎片离子 m/z 153.0292 [M-H]⁻, 脱去 1 分子 H₂O 后得到 m/z 135.0131, 结合 UNIFI 数据库, 推测为 α -松油醇, 其二级质谱图及可能的裂解过程见图 4。

3.5 生物碱类

在眩晕宁原形入血的化合物中共鉴定 3 个生物碱类成分, 包括腺苷 (14)、2'-O-甲基腺苷 (15)、N-甲基酪胺 (26)。以化合物 14 为例, 其在负离子模式下产生一级质谱准分子离子峰 m/z 266.0905 [M-H]⁻, 保留时间为 0.54 min, 确定分子式为 C₁₀H₁₃N₅O₄, 结合 UNIFI 数据库及参考文献^[10], 推测其为腺苷。

3.6 其他类

眩晕宁的入血成分除上述类型化合物以外, 尚有 9-氧代壬酸 (17)、L(+)-精氨酸 (18)、鸟氨酸 (28)、果糖 (16)、氢氧化胆碱 (19)、atractylodemayne F (27)。

4 讨论

4.1 动物实验与血清预处理

本研究前期对动物实验过程中的给药剂量 (6

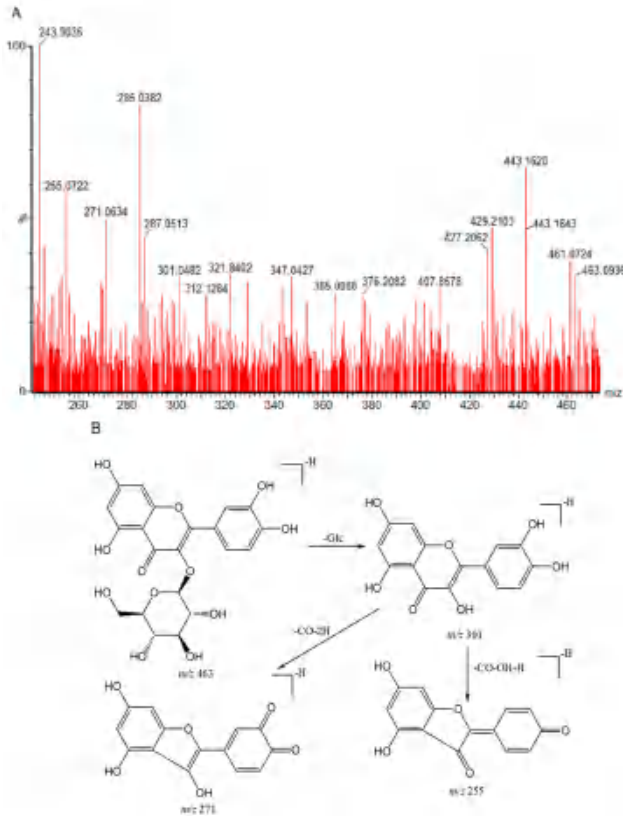


图 2 槲皮素-3-O-葡萄糖苷在负离子模式下的二级质谱图 (A) 及其裂解过程 (B)

Fig 2 Secondary mass spectrum of quercetin-3-O-glucoside in negative ion mode (A) and its fragmentation pathway (B)

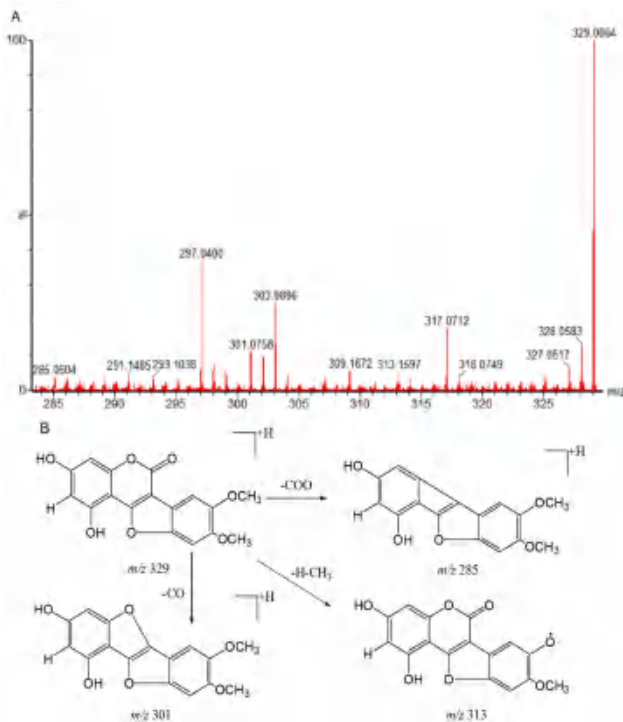


图 3 红花岩黄芪香豆雌酚 E 在正离子模式下的二级质谱图 (A) 及其裂解过程 (B)

Fig 3 Secondary mass spectrum of hedysarimcoumestan E in positive ion mode (A) and its fragmentation pathway (B)

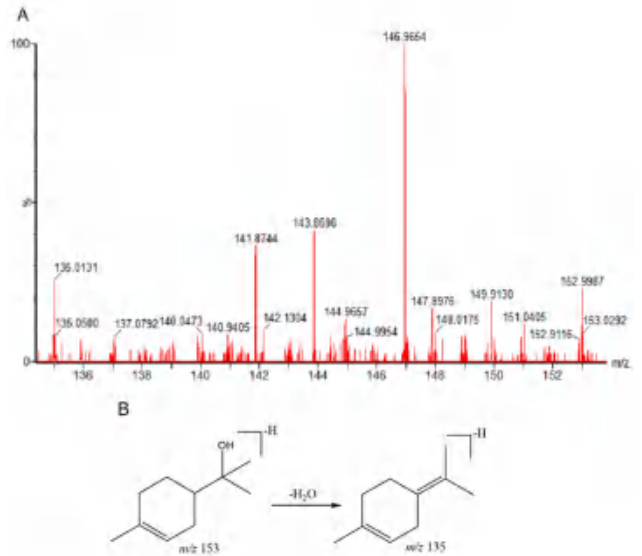


图 4 α -松油醇在负离子模式下的二级质谱图 (A) 及其裂解过程 (B)
Fig 4 Secondary mass spectrum of α -Terpineol in negative ion mode (A) and its fragmentation pathway (B)

倍、9 倍成人等效剂量)、给药次数 (1 d 给药 3 次, 每次间隔 4 h, 共给药 1 d; 1 d 给药 1 次, 共给药 3 d)、取血时间 (末次给药 0.5 h、1 h 后) 进行了考察, 结果发现按 9 倍成人等效剂量给药的入血成分 (UPLC 法, 以色谱峰数量计) 多于 6 倍给药方法, 故予以实验动物 9 倍成人等效剂量。1 d 给药 3 次与 3 d 连续给药 1 次相比, 两者入血成分无显著差异, 且眩晕宁的临床用法是 1 d 服药 3 ~ 4 次, 故动物实验的给药次数确定为 1 d 给药 3 次。末次给药 0.5 h 与 1 h 相比, 末次给药 1 h 后的入血成分多于 0.5 h, 故以末次给药 1 h 后作为取血时间。

溶剂萃取法和固相萃取法是中药血清药物化学研究过程中最常见的血清预处理方式, 本研究采用 UPLC 法色谱峰的数量及峰面积的大小为指标优选血清的预处理方法。结果发现, 溶剂萃取法样品的峰面积比固相萃取法样品的峰面积大, 且色谱峰数量也多于固相萃取法。此外, 与固相萃取法相比, 溶剂萃取法用品成本低, 方法简便, 且处理样品耗时短。故本研究采用溶剂萃取法处理血清。

4.2 入血成分分析

眩晕是空间定位障碍产生的一种运动错觉, 常表现为突发性的自身和 / 或外物按一定方向旋转、浮沉、漂移或翻滚感^[6, 11]。其发病机制尚不完全明确, 但主要与中枢神经系统及前庭疾病有关^[12], 针对眩晕的病因或症状, 抗眩晕药可分为安定镇静药、改善微循环药、糖皮质激素药、利尿脱水药和

钙离子阻滞剂等^[13]。眩晕宁是在充分挖掘祖国医学治疗眩晕经验的基础上加减化裁而来,其临床多用于高血压、颈椎病、眼原性眩晕、梅尼埃病、晕动病等耳性眩晕和脑动脉粥样硬化引起的脑性眩晕等^[1]。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术快速鉴定了眩晕宁中 28 个原形入血成分,其中三萜皂苷成分竹节参皂苷-1 可降低卒中型自发性高血压大鼠血压,具有一定的降压作用^[14];黄酮类成分茺花素是治疗高血压的主要活性成分^[15],两者均可缓解高血压导致的眩晕^[1, 16]。萜类成分 alismanoid C、alismanol M 及 23-乙酰泽泻醇 S 是泽泻利尿作用的活性成分^[17],其通过排出体内多余水分纠正血浆渗透压而有助于治疗眩晕^[18-19]。

5 结论

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 与血清药物化学相结合的研究方法,对眩晕宁的入血成分进行研究,共鉴定出萜类、黄酮类、香豆素类、挥发油类、生物碱类等 28 个原形入血成分,为其药效物质基础的研究提供了参考。

参考文献

- [1] 常华,何胜旭,张陆勇,等.眩晕宁片的降压和抗眩晕作用研究[J].中国中医基础医学杂志,2014,20(3):316-318.
- [2] 燕霞.高效液相色谱质谱及 TASQ 筛查软件对眩晕宁片中多组分质量控制研究[D].南宁:广西中医药大学,2018.
- [3] 张凤.三金眩晕宁片治疗良性阵发性位置性眩晕复位后残余症状 480 例疗效观察[J].中国社区医师,2021,37(36):91-92.
- [4] 邓迪洋.眩晕宁片治疗后循环缺血性眩晕的临床疗效与安全性 Meta 分析[D].武汉:湖北中医药大学,2021.
- [5] 何胜旭,张陆勇,江振洲,等.眩晕宁片对麻醉犬脑循环的影响[J].现代中西医结合杂志,2012,21(32):3552-3554.
- [6] 柴滨,李萍,宋海涛,等.眩晕宁片治疗眩晕的临床效果观察[J].中国医药,2021,16(4):562-566.
- [7] 张朝凤,周爱存,张勉.泽泻的化学成分及其免疫抑制活性筛选[J].中国中药杂志,2009,34(8):994-998.
- [8] 侯小涛,韦棣婷,夏中尚,等.基于血清药物化学的厚藤治疗急性痛风性关节炎质量标志物研究[J].中草药,2021,52(9):2638-2652.
- [9] 刘育辰,陈有根,王丹,等.甘草化学成分研究[J].药物分析杂志,2011,31(7):1251-1255.
- [10] 李琦,李海蛟,章轶哲,等.致幻毒蘑菇卵囊裸盖菇化学成分研究初探[J].菌物学报,2022,41(10):1704-1715.
- [11] 粟秀初,孔繁元,黄如训.眩晕的临床诊断和治疗流程建议[J].中国神经精神疾病杂志,2003,29(4):314.
- [12] 韩德军,王丽,吕仕超,等.中医药治疗前庭周围性与中枢性眩晕用药规律异同研究[J/OL].中药药理与临床,https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20230411.002.
- [13] 丁大连,徐先荣,李鹏,等.对选择和应用抗眩晕药的理性思考[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2021,27(1):105-108.
- [14] 王丽君,朱焰,廖矛川.牛膝总皂苷对卒中型自发性高血压大鼠的影响[J].中国中药杂志,2011,36(9):1239-1241.
- [15] 赵璐,张明泉,徐耿瑞.基于网络药理学和分子对接技术研究寒痉汤治疗高血压病的作用机制[J].中医临床研究,2022,14(27):1-10.
- [16] 蒋庆华,李俊峰,郑敏,等.常规西医治疗联合天麻钩藤饮治疗眩晕症的效果[J].中外医学研究,2022,20(32):142-146.
- [17] 刘珊珊,郭杰,李宗艾,等.泽泻化学成分及药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(7):1578-1595.
- [18] 刘红喜,梁晓,魏竞竞,等.基于历代本草文献探讨眩晕辨治思路[J].中医药学报,2023,51(3):56-61.
- [19] 陈佩宣,朱中贵,金伟勋,等.痰浊中阻型眩晕与血浆渗透压相关性研究[J].深圳中西医结合杂志,2014,24(1):23-24.

(收稿日期:2023-05-10;修回日期:2023-06-14)

手掌参对 2 型糖尿病认知障碍的作用及机制研究

石勇, 曹珊珊, 张瑞华, 张雨涵, 史磊磊, 王欣, 李溪, 张雪航, 韩朝军, 王斌, 刘继平* (陕西中医药大学药学院 陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 观察手掌参对 2 型糖尿病认知障碍大鼠的影响, 评价其神经保护作用并探讨其机制。**方法** 雄性 SD 大鼠, 随机选取 8 只为空白组, 以普通饲料喂养, 其余均以自制高脂高糖饲料喂养 30 d 后腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对照组注射等体积柠檬酸缓冲液。72 h 后尾尖静脉取血检测空腹血糖, 以空腹血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 视为糖尿病造模成功。造模成功后继续喂养 60 d 高脂高糖饲料, 随后将大鼠随机分为模型组, 二甲双胍组 [$0.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 手掌参水提取物低 (PaG_L)、中 (PaG_M)、高 (PaG_H) 剂量组 [0.6 、 1.2 、 $2.4 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 每组 8 只, 给药 30 d 后 Morris 水迷宫法进行测试, 结束后大鼠取血, 检测大鼠血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平, HE 染色观察海马组织病理改变, Western blot 法检测海马组织中 PI3K/Akt 蛋白的表达。**结果** 与空白组相比, 模型组大鼠血糖明显升高, 体重显著下降, 大鼠逃避潜伏期和游泳距离明显延长, 目标象限的游泳时间和穿越站台的次数显著降低, 海马神经元损伤严重, 血清中 SOD 活性降低, MDA 含量升高, PI3K/Akt 蛋白表达水平明显降低; 与模型组大鼠比较, 手掌参可明显增加大鼠体重和降低空腹血糖, 缩短大鼠逃避潜伏期和游泳距离, 增加目标象限的游泳时间和穿越站台的次数, 改善海马神经元损伤, 提高 SOD 活性, 降低 MDA 水平, 升高 PI3K/Akt 蛋白表达水平。**结论** 手掌参可明显改变糖尿病大鼠的认知障碍, 其机制可能与降低 MDA 水平、提高 SOD 的活性及调控 PI3K/Akt 通路有关。

关键词: 手掌参; 2 型糖尿病; 认知障碍; PI3K/Akt 通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3179-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.013

Effect of *Gymnadenia conopsea* on rats with type 2 diabetes cognitive impairment and related mechanism

SHI Yong, CAO Shan-shan, ZHANG Rui-hua, ZHANG Yu-han, SHI Lei-lei, WANG Xin, LI Xi, ZHANG Xue-hang, HAN Chao-jun, WANG Bin, LIU Ji-ping* (College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Pharmacodynamic Mechanism and Material Basis of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shaanxi Administration of TCM, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the effect of *Gymnadenia conopsea* on rats with type 2 diabetes cognitive impairment, evaluate its neuroprotective effect and explore its mechanism. **Methods** Totally 8 male SD rats were randomly selected as a control group with ordinary diet. The rest of the rats were given homemade high-fat and high-sugar diet for 30 days and then intraperitoneally injected with streptozotocin $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The control group was injected with an equal volume of citric acid buffer. After 72 hours, the blood was taken from the caudal vein to detect fasting blood glucose in major rats, and the fasting blood glucose $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ was regarded as successful diabetes modeling. After successful modeling, the rats were fed high-fat diet for 60 days, and then the rats were randomly divided into a model group, a metformin group [$0.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], the *Gymnadenia conopsea* water extracts low,

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (No.2021SF-072); 陕西省教育厅 2022 年度服务地方专项科研计划项目 (No.22JC029)。

作者简介: 石勇, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药神经药理学研究, email: 1360400656@qq.com ***通信作者:** 刘继平, 男, 教授, 主要从事中药神经药理学研究, email: liwenjie780711@163.com

medium and high dose groups [0.6, 1.2, 2.4 g/(kg · d)], 8 rats in each group. Morris water maze method was tested after 30 days of administration, and blood were taken after the test. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level in the rat serum were detected, the hippocampal histopathological changes were observed by HE staining, and PI3K/Akt protein expression in the hippocampal tissues was detected by Western blot. **Results** Compared with the blank group, the blood glucose increased obviously and body weight decreased in the model group, the rat escape latency and swimming distance prolonged, the swimming time and the number of platform crossing in the target quadrant reduced, severe hippocampal neuronal damaged, SOD activity decreased, MDA content increased, and the expression level of PI3K/Akt protein significantly decreased. Compared with the model rats, *Gymnadenia conopsea* significantly increased body weight, reduced fasting blood glucose, shortened the rat escape latency and swimming distance, increased the swimming time and number of platform crossing in the target quadrant, improved the hippocampal neuronal damage, improved SOD activity, reduced MDA level, and increased the expression level of PI3K/Akt protein. **Conclusion** *Gymnadenia conopsea* significantly improve cognitive impairment in diabetic rats, whose mechanism may be related to reducing MDA level, increasing SOD activity and regulating PI3K/Akt pathway.

Key words: *Gymnadenia conopsea*; type 2 diabetes; cognitive impairment; PI3K/Akt pathway

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种以慢性高血糖水平为特征的代谢紊乱综合征^[1], 持续高浓度的血糖会引起全身性血管损伤, 引起心脏、肾脏和神经等多种并发症^[2]。有研究证明, 糖尿病、糖尿病并发症会对大脑代谢、结构和功能产生影响, 临床研究发现, 60% ~ 90% 的糖尿病患者会发生不同程度的神经病变, 进而引发认知功能障碍^[3]。糖尿病脑病 (diabetic encephalopathy, DE) 是糖尿病主要的慢性并发症之一, 以获得性认知障碍和行为缺陷为主要特征, 有学者称之为糖尿病认知障碍 (diabetic cognitive impairment, DCI), 其临床表现为记忆力减退, 语言表达、理解能力下降, 可伴有神情淡漠、行动迟缓等^[4]。已有研究表明糖尿病患者患阿尔茨海默病风险约是正常人的 2 倍^[5]。我国是糖尿病患病率上升最快及患病人数最多的国家^[6]。随着糖尿病患者的增加, 糖尿病认知障碍的发病率显著升高。因此, 开发新的潜在药物来防治糖尿病认知障碍具有非常重大的现实意义。手掌参 *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. 又名佛手参、手参等, 始载于《四部医典》, 具有填精补髓、增强体质、生津止渴、安神增智的功效, 现代药理研究表明, 手掌参具有神经保护和改善记忆障碍等作用^[7-10]。如藏药央宗三宝, 其主要成分为手掌参, 研究发现其能治疗心血管疾病, 对心肌供血和心率具有显著的改善作用, 对血压、心率具有双向调节作用, 尤其对高血压的治疗效果比较显著^[11]。李红等^[12]应用

蒙医经验方金沙丸治疗慢性肾炎、尿毒症等泌尿系统疾病, 在较短时间内可恢复肾脏功能且不易复发。马宏伟等^[13]研究发现, 复方手参滴丸可用于糖尿病肾病的辅助治疗。益寿丸 (手掌参、西红花等 20 味药组成) 具有滋补肝肾, 益精健脑明目功效, 用于肝肾不足, 气血亏虚所致的健忘、头晕、心悸失眠、倦怠乏力等^[14]。本研究旨在探讨手掌参对 2 型糖尿病认知障碍的影响, 为其后续研究开发及临床使用该药提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 SD 大鼠, (200 ± 20) g [成都达硕实验动物有限公司, 合格证号: SCXK (川) 2020-030]; 饲养于陕西中医药大学中药药理实验室, 动物分笼饲养, 保持 12 h 昼夜节律, 室温 (22 ± 1) °C, 湿度 (55 ± 5) %, 自由饮水摄食。

1.2 试药

手掌参药材购自太白县, 经陕西中医药大学中药鉴定教研室颜永刚教授鉴定为正品 (10 倍水浸泡 30 min 后煎煮 1.5 h, 过滤收集滤液, 残渣 8 倍水煎煮 1 h, 收集滤液, 合并两次滤液浓缩并配制成生药浓度分别为 0.6、1.2、2.4 g · mL⁻¹ 药液), 盐酸二甲双胍片 (批号: ABV1015, 中美上海施贵宝制药有限公司)。链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司, 货号: S0130), 丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号: 20211211)、SOD 试剂盒 (批号: 20211213) (南京建成生物工程研究所), PI3K 抗体

(货号: AF8241)、p-PI3K 抗体(货号: AF3242)(Affinity 公司), Akt(货号: 9272S)、p-Akt(货号: 4060S)(CST 公司), GAPDH(货号: 10017731, Proteintech 公司), 羊抗小鼠(BA1050)、羊抗兔(BA1054)、超敏 ECL 化学发光液(AR1197)(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 仪器

Morris 水迷宫(上海吉量软件科技有限公司), 罗氏血糖仪(YZB/GER 5513-2014), Eon 全波长酶标仪(美国 Bio Tek), TGL-16M 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), 正置荧光显微镜与成像系统(日本尼康), 电泳仪(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 动物模型制备

动物适应性饲养 1 周, 随机挑选 8 只为对照(Control)组, 其余小鼠采用自制高脂高糖饲料(基础饲料 59%、蔗糖 20%、猪油 18%、蛋黄 3%)喂养 1 个月后腹腔注射 STZ(临用前溶于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 4.2 的柠檬酸缓冲液中配制成 1% 的浓度) $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 72 h 后尾静脉采血, 用罗氏血糖仪测空腹血糖, 以血糖浓度 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为糖尿病造模成功^[15]。然后继续高脂高糖饲料喂养 60 d, 选择 Morris 水迷宫测试糖尿病认知障碍模型成功者, 随后将大鼠随机分为模型(Model)组, 二甲双胍(Metformin)组 [$0.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 手掌参水提物低(PaG_L)、中(PaG_M)、高(PaG_H)剂量组 [0.6 、 1.2 、 $2.4 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 每组 8 只, 灌胃 30 d, 给药期间动物全部采用普通饲料喂养, 每周测其体重和血糖含量, 自由饮水摄食。

2.2 Morris 水迷宫实验

动物给药 30 d 后进行 6 d 的 Morris 水迷宫实验, 分别从两个不同的标记点将大鼠面向池壁放入水中, 每次 90 s, 第 1 日引导大鼠进入站台, 并使其在站台上停留 20 s, 第 2~5 日使其自己进入站台, 不进行引导, 记录游泳距离和潜伏期, 第 6 日撤去站台, 记录大鼠 90 s 内穿越平台的次数。

2.3 取材与处理

水迷宫实验后 12 h 内禁食, 各组大鼠全身麻醉, 腹腔主动脉取血, 取血后低温冷冻离心机分离出血清, 用于 SOD 活力和 MDA 含量测定。每组选择 4 只大鼠取完整全脑, 置于 4% 多聚甲醛组织固定液中, 其余大鼠取海马, 用于 Western blot 实验。

2.4 HE 染色观察大鼠海马区病理变化

取 4% 多聚甲醛固定大鼠组织, 经乙醇梯度脱水后, 二甲苯梯度透明, 常规石蜡包埋。石蜡包埋的大脑组织切片 ($3 \mu\text{m}$) 使用二甲苯脱蜡, 并使用苏木精染色 3~5 min, 随后将切片暴露于梯度酸性乙醇溶液中, 用无水乙醇和二甲苯脱水澄清, 伊红染色 5 min, 脱水, 透明, 中性树脂封片, 最后在光学显微镜下观察大脑海马 CA1 区组织细胞形态和数目变化。

2.5 Western blot 法检测相关蛋白表达

取出冻存的海马组织用 PBS 洗涤, 并在裂解缓冲液中裂解, 加入磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和 EDTA, 用研磨仪研磨组织, 至完全粉碎, 4°C 离心 2 次, 取上清液, 用 BCA 蛋白测定试剂盒定量海马蛋白浓度, 并在 95°C 下用 2-巯基乙醇加热 5 min。提取的蛋白质通过 SDS-PAGE 电泳, 并转移到 PVDF 膜上。利用 5% 的脱脂奶粉封闭 60 min (阻断非特异性结合位点), 相应一抗 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤印迹, 孵育二抗, 并在室温下与一抗相结合的二抗孵育 1 h。特超敏 ECL 化学发光试剂盒和化学发光成像系统显示特定的条带。以 GAPDH (目标蛋白为磷酸化则以总蛋白) 作为参照, 重复 3 次, 利用 Image J 计算目的蛋白的相对表达量^[16]。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间两两比较方差齐时采用单因素方差分析, 方差不齐时采用非参数性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Graphpad Prism 8.0 进行数据制图。

3 结果

3.1 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠体重及血糖的影响

与 Control 组相比, Model 组大鼠体重均显著降低, 血糖显著升高。前两周手掌参各剂量组与 Model 组相比体重差异均无统计学意义; 第 2 周 PaG_H 组相较 Model 组血糖显著降低; 第 3 周 PaG_M 组、PaG_H 组与 Model 组相比体重均显著增加, 血糖显著降低; 第 4 周手掌参各剂量组与 Model 组相比体重均显著增加, 血糖显著降低(见表 1、2)。

3.2 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠水迷宫检测评分的影响

随着训练天数的增加, 各组大鼠逃避潜伏期和游泳距离均呈下降趋势, 第 2 日开始 Model 组与 Control 组相比大鼠逃避潜伏期和游泳距离显著

表 1 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠体重变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 1 Effect of *Gymnadenia conopsea* on weight changes in rats with diabetic cognitive impairment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	体重 /g			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
Control 组	—	535.75 ± 22.53	551.75 ± 16.42	553.25 ± 22.31	524.38 ± 15.39
Model 组	—	377.13 ± 11.31 ^{###}	378.75 ± 16.69 ^{###}	379.38 ± 14.48 ^{###}	375.13 ± 11.92 ^{###}
Metformin 组	0.2	379.38 ± 33.36	408.50 ± 35.91*	418.50 ± 36.60**	425.75 ± 18.86**
PaG _L 组	0.6	377.63 ± 32.87	383.00 ± 15.47	384.13 ± 20.31	408.75 ± 14.28**
PaG _M 组	1.2	379.13 ± 28.82	386.00 ± 19.86	407.75 ± 21.05*	415.88 ± 17.29**
PaG _H 组	2.4	379.75 ± 22.05	391.25 ± 21.63	412.38 ± 22.39**	419.25 ± 21.11**

注: 与对照组相比, ^{###}*P* < 0.01; 与模型组相比, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。

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

表 2 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠血糖变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 2 Effect of *Gymnadenia conopsea* on blood glucose changes in rats with diabetic cognitive impairment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	血糖 / (mmol · L ⁻¹)			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
Control 组	—	5.74 ± 0.70	6.05 ± 0.62	6.58 ± 0.50	6.24 ± 0.57
Model 组	—	30.98 ± 1.85 ^{###}	30.87 ± 1.61 ^{###}	31.31 ± 2.81 ^{###}	32.53 ± 0.86 ^{###}
Metformin 组	0.2	30.01 ± 2.50	25.56 ± 1.03**	23.98 ± 1.20**	20.00 ± 2.10**
PaG _L 组	0.6	30.13 ± 2.76	28.18 ± 2.74	26.04 ± 3.26	24.14 ± 2.03**
PaG _M 组	1.2	30.95 ± 3.49	27.40 ± 4.64	25.24 ± 2.38**	24.85 ± 3.61**
PaG _H 组	2.4	30.96 ± 2.98	26.83 ± 2.44*	23.83 ± 2.52**	22.23 ± 3.47**

注: 与对照组相比, ^{###}*P* < 0.01; 与模型组相比, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。

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

增加, 第 3 日 PaG_H 组与 Model 组相比逃避潜伏期显著降低, 第 4 日、第 5 日手掌参各剂量组逃避潜伏期和游泳距离均显著减少 (见表 3、4)。第

6 日撤去站台后, Model 组大鼠穿越次数显著低于 Control 组 (*P* < 0.01), 手掌参各剂量组与 Model 组相比穿越次数显著升高 (见表 5)。

表 3 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠水迷宫试验潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 3 Effect of *Gymnadenia conopsea* on the incubation period of water maze test in rats with diabetic cognitive impairment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	逃避潜伏期 /s				
		D1	D2	D3	D4	D5
Control 组	—	89.25 ± 3.19	56.66 ± 19.94	49.88 ± 7.76	39.50 ± 7.24	25.50 ± 4.81
Model 组	—	88.84 ± 5.71	88.57 ± 6.42 ^{###}	83.5 ± 10.02 ^{###}	79.74 ± 15.01 ^{###}	64.46 ± 26.96 ^{###}
Metformin 组	0.2	89.73 ± 2.69	72.61 ± 21.95	53.89 ± 18.01*	33.35 ± 7.17**	21.32 ± 3.63**
PaG _L 组	0.6	90.19 ± 2.12	83.29 ± 11.01	68.75 ± 13.29	45.07 ± 16.32*	36.79 ± 10.45*
PaG _M 组	1.2	90.00 ± 2.65	78.74 ± 12.93	64.85 ± 22.66	41.10 ± 11.09**	30.68 ± 12.63*
PaG _H 组	2.4	89.91 ± 2.89	73.55 ± 17.54	60.01 ± 12.24*	36.54 ± 20.57**	29.23 ± 10.55**

注: 与对照组相比, ^{###}*P* < 0.01; 与模型组相比, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。

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

3.3 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠血清 SOD 活力和 MDA 含量测定

与 Control 组相比, Model 组大鼠血清 SOD 活力明显降低, MDA 含量明显增加。与 Model 组相比, PaG_L 组、PaG_M 组、PaG_H 组血清 SOD 活力明显升高, MDA 含量明显减少 (见表 6)。

3.4 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠海马组织病理学影响

Control 组海马 CA1 区神经细胞排布规则,

细胞结构均一, 细胞圆润完整, 细胞核清晰可见, 未见细胞明显异常。模型组神经细胞排列紊乱, 细胞形态遭到破坏, 细胞形状发生改变。手掌参和二甲双胍给药组可有效减轻神经细胞的损伤程度, 神经细胞排列较为整齐有序, 细胞形态较完整, 改善较为明显 (见图 1)。

3.5 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠海马组织中 PI3K/Akt 通路表达的影响

与 Control 组相比, Model 组 p-PI3K/PI3K 与

表 4 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠水迷宫试验游泳距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 4 Effect of *Gymnadenia conopsea* on the exploration distance of water maze test in rats with diabetic cognitive impairment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	游泳距离 /m				
		D1	D2	D3	D4	D5
Control 组	—	21.62 ± 3.25	14.11 ± 4.35	11.43 ± 2.13	8.83 ± 1.84	5.14 ± 2.00
Model 组	—	20.46 ± 1.88	23.84 ± 2.33 ^{###}	22.57 ± 4.37 ^{###}	23.47 ± 4.01 ^{###}	17.23 ± 7.81 ^{###}
Metformin 组	0.2	22.25 ± 1.93	20.72 ± 7.10	12.75 ± 5.17	8.43 ± 2.26 ^{**}	6.37 ± 1.41 ^{**}
PaG _L 组	0.6	21.57 ± 1.95	22.80 ± 4.22	19.53 ± 3.15	11.93 ± 3.53 ^{**}	10.00 ± 3.16 [*]
PaG _M 组	1.2	20.65 ± 1.73	20.55 ± 3.93	18.49 ± 6.15	10.69 ± 3.91 ^{**}	9.27 ± 5.04 ^{**}
PaG _H 组	2.4	20.78 ± 2.49	17.56 ± 4.43	15.57 ± 3.49	9.90 ± 5.91 ^{**}	8.18 ± 3.12 ^{**}

注：与对照组相比，^{###}*P* < 0.01；与模型组相比，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

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

表 5 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠穿越次数及目标象限距离比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 5 Effect of *Gymnadenia conopsea* on crossing times and target quadrant distance in rats with diabetic cognitive impairment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	穿越次数 / 次	目标象限距离比 / %
Control 组	—	3.63 ± 0.99	26.29 ± 2.62
Model 组	—	0.38 ± 0.48 ^{###}	21.16 ± 2.70
Metformin 组	0.2	3.25 ± 0.97 ^{**}	26.45 ± 7.39
PaG _L 组	0.6	2.50 ± 1.00 ^{**}	23.40 ± 3.69
PaG _M 组	1.2	2.75 ± 1.09 ^{**}	23.55 ± 6.54
PaG _H 组	2.4	3.00 ± 1.58 ^{**}	23.68 ± 3.96

注：与对照组相比，^{###}*P* < 0.01；与模型组相比，^{**}*P* < 0.01。

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

表 6 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠血清中 SOD 活力、MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 6 Effect of *Gymnadenia conopsea* on serum SOD activity and MDA content in rats with diabetic cognitive impairment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	SOD / (U · mL ⁻¹)	MDA / (nmol · mL ⁻¹)
Control 组	—	140.04 ± 6.06	16.21 ± 2.68
Model 组	—	116.78 ± 3.22 ^{###}	24.31 ± 2.93 ^{###}
Metformin 组	0.2	134.05 ± 4.83 ^{**}	17.64 ± 1.97 ^{**}
PaG _L 组	0.6	124.27 ± 2.06 [*]	20.72 ± 3.07 [*]
PaG _M 组	1.2	126.39 ± 3.98 ^{**}	18.15 ± 1.70 ^{**}
PaG _H 组	2.4	130.83 ± 0.46 ^{**}	19.69 ± 2.91 ^{**}

注：与对照组相比，^{###}*P* < 0.01；与模型组相比，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

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

p-Akt/Akt 比值均明显下降。与 Model 组相比，手掌参各剂量组的 p-PI3K/PI3K 与 p-Akt/Akt 比值均显著升高。Metformin 组与手掌参各剂量组均能明显升高 PI3K 及 Akt 的磷酸化水平（见表 7 及图 2）。

4 讨论

中医认为糖尿病属于“消渴症”，但在中医典籍中没有糖尿病脑病的相关病名，根据其临床表现及特征，可归为“消渴”合并“呆证”“健忘”的范畴。《圣济总录》云：“消渴日久，健忘怔

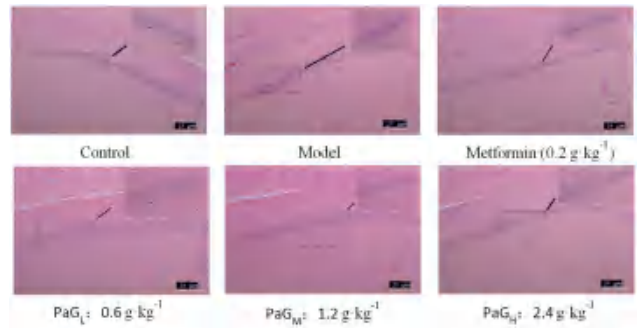


图 1 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠海马 CA1 区病理变化的影响 (×100)

Fig 1 Effect of *Gymnadenia conopsea* on the pathological changes in CA1 region of the hippocampus in rats with diabetic cognitive impairment (×100)

表 7 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠 PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 7 Effect of *Gymnadenia conopsea* on the expression of PI3K/Akt pathway protein in rats with diabetic cognitive impairment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
Control 组	—	1.23 ± 0.12	1.02 ± 0.05
Model 组	—	0.64 ± 0.06 ^{###}	0.85 ± 0.03 ^{###}
PaG _L 组	0.6	0.81 ± 0.03 [*]	0.94 ± 0.02 [*]
PaG _M 组	1.2	0.87 ± 0.06 ^{**}	1.05 ± 0.01 ^{**}
PaG _H 组	2.4	1.07 ± 0.01 ^{**}	1.11 ± 0.02 ^{**}
Metformin 组	0.2	1.15 ± 0.07 ^{**}	1.14 ± 0.05 ^{**}

注：与对照组相比，^{###}*P* < 0.01；与模型组相比，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

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

忡^[17]”。现代医学研究表明，糖尿病脑病的发生涉及多个机制和靶点，其机制主要与神经营养因子的缺乏、胰岛素抵抗、炎症反应和氧化应激等多种因素有关^[18-21]。中药中多糖类成分大多具有降血脂、降血糖的作用^[22-24]，手掌参中多糖有抗氧化、抗炎、增强免疫功能等作用^[25-27]，此外，手掌参还能改善多种原因所致的认知障碍，如李敏等^[28]研究表明手掌参提取物可改善东莨菪碱

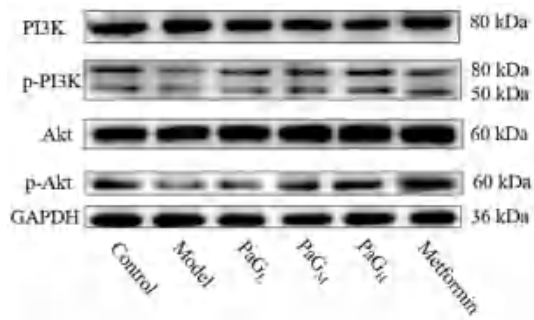


图2 手掌参对糖尿病认知障碍大鼠 PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响
Fig 2 Effect of palm ginseng on the expression of PI3K/Akt pathway protein in rats with diabetic cognitive impairment

所致大鼠的认知障碍, 张丹等^[29-30]研究表明手掌参提取物同样可改善 D-半乳糖 (D-Gal) 和亚硝酸钠 (NaNO₂) 所致衰老小鼠的认知障碍。Pan 等^[31]研究发现手掌参可通过调节 PI3K/Akt 信号通路发挥神经保护的作用, 因此本研究在前人的研究基础上首次探索手掌参对 2 型糖尿病引起认知障碍的作用及机制。

本研究过程中大鼠前期体重普遍增长较快, 毛发旺盛、洁白、光亮, 空腹血糖均正常, 造模后除 Control 组外, Model 组大鼠均出现“三多一少”的糖尿病特征, 体重显著降低, 皮毛稀少干枯, 色泽发黄, 空腹血糖显著升高, 随着饲养时间延长, 大鼠运动迟缓, 应激反应阈值上升, 提示该批次动物模型能较好地模拟人类 2 型糖尿病脑病的发生及发展过程。大鼠灌胃治疗后, 除 Model 组外手掌参各给药组大鼠血糖均有所下降, 表明手掌参有良好的降糖作用。水迷宫实验结果发现, 与 Model 组比较, 手掌参各给药组大鼠的逃避潜伏期和游泳距离均显著减少, 穿越平台的次数增加。研究表明, 氧化应激和炎症因子与糖尿病认知障碍的发生密切相关, 通过试剂盒检测血清中 SOD 活性和 MDA 含量, 与 Model 组相比, 给药组大鼠的 SOD 活性均显著高于模型组, MDA 的含量低于 Model 组, 提示手掌参可以增加大鼠体内 SOD 的活性和减少 MDA 的含量, 表明手掌参具有一定的抗氧化能力。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 是一个细胞内脂质激酶家族, 可转导来自细胞表面受体的信号, Akt 是 PI3K 途径的中心介质, 在正常情况下, 当 PI3K/Akt 被激活时可以调节身体机能, 当能量摄入过多时, PI3K/Akt 通路会被抑制; 而激活 PI3K/Akt 通路可减轻肥胖和胰岛素抵抗。大量研究均表明, PI3K/Akt 通路的激活与糖尿病脑病的发生密切相关, 胰岛素与胰岛素样生长因子与

受体结合后, 均可通过 PI3K/Akt 信号转导通路, 产生许多对神经突起生长、突触可塑性调节及记忆相关基因转录的继发反应, 是神经元存活信息转导途径之一^[32-33]。本研究结果发现手掌参调节 PI3K/Akt 蛋白表达, 促进 PI3K/Akt 的磷酸化水平, 提示手掌参可能通过上调 PI3K/Akt 蛋白的磷酸化水平从而改善糖尿病认知障碍的发生、发展。

综上所述, 手掌参能有效降低血糖, 改善糖尿病引起大鼠的认知障碍, 其作用机制可能与手掌参具有抗氧化活性和调节 PI3K/Akt 通路有关。

参考文献

- [1] Zhou Z, Sun B, Yu DS, et al. Gut microbiota: an important player in type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12 (8): 401-405.
- [2] Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, et al. Complications of diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 11 (5): 218-227.
- [3] Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, et al. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease [J]. *J Periodontol*, 2017, 52 (8): 410-415.
- [4] Zakin E, Abrams R, Simpson DM. Diabetic neuropathy [J]. *Semin Neurol*, 2019, 39 (5): 560-569.
- [5] Exalto LG, Whitmer RA, Kappelle LJ, et al. An update on type 2 diabetes, vascular dementia and Alzheimer's disease [J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47 (11): 858-864.
- [6] Ma RCW. Epidemiology of diabetes and diabetic complications in China [J]. *Diabetologia*, 2018, 61 (6): 1249-1260.
- [7] Ma B, Li M, Hua N, et al. Protective effects of extract of *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairment in rats [J]. *Behav Pharmacol*, 2008, 19 (4): 325-333.
- [8] Guo Z, Pan RY, Qin XY. Potential protection of *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract against oxidative stress in rat cortical neurons [J]. *J Anal Methods Chem*, 2013, 2 (20): 457-464.
- [9] Zhang YC, Liu L, Liang C, et al. Expression profiles of long noncoding RNAs in mice with high-altitude hypoxia-induced brain injury treated with *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 12 (16): 1239-1248.
- [10] Pan RY, Ma J, Wu HT, et al. Neuroprotective effects of a *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract in vitro and in vivo [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 103-112.
- [11] 王俊吉, 张明, 杨敏. 央宗三宝治疗虚劳症和心血管疾病 60 例临床疗效观察 [J]. *青海医药杂志*, 1995, 25 (8): 37-38.
- [12] 李红, 白纲. 金沙丸治疗慢性肾炎尿毒症的临床观察 [J]. *中国民族医药杂志*, 2001, 7 (2): 16-17.

- [13] 马宏伟, 刘荣国, 杨文钰, 等. 复方手参丸治疗糖尿病肾病 40 例临床观察 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24 (3): 71-72.
- [14] 陈岳蓉. 益寿丸质量标准的研究 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2001, 10 (6): 361-362, 369.
- [15] 刘玲, 张静文, 张瑞华, 等. 七福饮调控 JAK2/STAT3 通路改善 2 型糖尿病认知障碍的效应与机制 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38 (7): 1093-1098.
- [16] 张静文, 刘玲, 张瑞华, 等. 基于网络药理学和体内实验探究七福饮治疗 2 型糖尿病认知障碍的分子机制 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38 (3): 9-15.
- [17] 杨帆. 从肾论治糖尿病脑病浅议 [J]. 江苏中医药, 2017, 49 (5): 71-72.
- [18] 王想. 血清脑源性神经营养因子在老年 2 型糖尿病中的表达及对认知功能的影响 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15 (6): 20-22.
- [19] Vadde R, Rarea J. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients [J]. Acta Diabetol, 2008, 45 (10): 41-46.
- [20] Marioni RE, Strachan MW, Reynolds RM, et al. Association between raised inflammatory markers and cognitive decline in elderly people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study [J]. Diabetes, 2010, 59 (3): 710-719.
- [21] 容永忠, 谢毅娟, 陈雷梅, 等. 胰岛素抵抗 ApoE 基因多态性与轻度认知障碍的相关性分析 [J]. 河北医学, 2013, 19 (11): 1604-1607.
- [22] Fu X, Song MX, Lu M, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of polysaccharide isolated from *Sphacelotheca sorghi* in diet-streptozotocin-induced T2D mice [J]. J Food Sci, 2022, 87 (4): 1882-1894.
- [23] 代云云, 谢晓蓉, 王鹏波, 等. 中药多糖降脂作用机理的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (5): 219-223.
- [24] Zhang YW, Li XP, Yang QH, et al. Antioxidation, anti-hyperlipidaemia and hepatoprotection of polysaccharides from *Auricularia auricular* residue [J]. Chem Biol Interact, 2021, 53 (1): 333-345.
- [25] 李凤伟, 彭梦黎, 朱袁平, 等. 提取方法对手掌参多糖理化性质及抗氧化活性的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47 (24): 150-155.
- [26] 卢卫红, 张洪娟, 王文芝. 手参的药效学研究 [J]. 中医药研究, 2002, 18 (2): 43-44.
- [27] 尚军, 李建菊, 张国燕. 藏药旺拉多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 西南农业学报, 2014, 27 (3): 1305-1308.
- [28] 李敏, 王亚芳, 马波, 等. 藏药旺拉提取物对东莨菪碱致动物学习记忆障碍的改善作用及其机制研究 [J]. 药理学学报, 2009, 44 (5): 468-472.
- [29] 张丹, 王亚芳, 张建军. 藏药旺拉提取物 CE 对亚急性衰老小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14 (11): 56-59.
- [30] 张丹, 张建军. 长苞凹舌兰提取物对亚急性衰老小鼠学习记忆和凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19 (4): 259-262.
- [31] Pan RY, Ma J, Wu HT, et al. Neuroprotective effects of a *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract in vitro and in vivo [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 209-217.
- [32] 孔林林, 张军, 乔枫, 等. 基于小鼠 Morris 水迷宫和 Y 迷宫联合试验的多任务行为学测试研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29 (4): 365-368.
- [33] Bрами-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, et al. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation [J]. J Neurosci, 2002, 22 (20): 8911-8921.

(收稿日期: 2023-05-05; 修回日期: 2023-07-07)

基于核受体 PXR、CAR 调控 CYP3A4 研究三七总皂苷提高硝苯地平疗效的机制

李秋红¹, 周育生¹, 胡勇¹, 郝青松¹, 鞠爱霞^{1, 2*} (1.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 研究三七总皂苷 (PNS) 与硝苯地平 (NF) 联用后疗效增强的作用机制, 为指导临床合理用药提供理论遵循。**方法** 将 SD 雄性大鼠随机分为空白组、三七总皂苷组、硝苯地平组和联合给药组。采用 HPLC 测定血浆中硝苯地平及肝微粒体中咪达唑仑的浓度; 应用 qPCR 技术检测核受体 PXR、CAR 和肝药代谢酶 CYP3A4 的基因表达量。**结果** 与 NF 组相比, PNS + NF 组中硝苯地平药时曲线下面积升高、半衰期延长、清除率降低、最大血药浓度 C_{max} 和达峰时间 t_{max} 增加 ($P < 0.01$); 与空白组相比, PNS 组与 PNS + NF 组中肝脏药物代谢酶 CYP3A4 活性降低 ($P < 0.05$), PNS 组与 PNS + NF 组肝脏中核受体 PXR、CAR 和 CYP3A4 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.01$); 与 NF 组相比, PNS 组与 PNS + NF 组肝脏中核受体 PXR、CAR 和 CYP3A4 mRNA 表达量均降低, 但差异无统计学意义。**结论** 三七总皂苷与硝苯地平联用后, PNS 可能通过抑制核受体 PXR、CAR 进而抑制肝药代谢酶 CYP3A4 的活性与基因表达, 提高硝苯地平血药浓度使疗效增强。

关键词: 联合用药; 三七总皂苷; 硝苯地平; 核受体; CYP3A4

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3186-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.014

Mechanism of Panax notoginseng saponins improving the efficacy of nifedipine based on nuclear receptor PXR and CAR regulation CYP3A4

LI Qiu-hong¹, ZHOU Yu-sheng¹, HU Yong¹, QIE Qing-song¹, JU Ai-xia^{1,2*} (1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: Objective To determine the mechanism of synergistic effect of Panax notoginseng saponins (PNS) and nifedipine (NF) to provide a theoretical basis for its rational use. **Methods** SD male rats were randomly divided into a blank group, a PNS group, a NF group and a co-administration group. The concentrations of nifedipine in the plasma and midazolam in the liver microsomes were determined by HPLC. The gene expression levels of nuclear receptor PXR, CAR and liver drug metabolizing enzyme CYP3A4 were determined by qPCR. **Results** Compared with the NF group, the area under the concentration-time curve of nifedipine was increased, the half-life was prolonged, the clearance rate was decreased, the maximum plasma concentration and time to the peak were increased in the co-administration group ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the activity of liver drug metabolizing enzyme CYP3A4 in the PNS group and the co-administration group decreased ($P < 0.05$), and the expression of nuclear receptor PXR, CAR and CYP3A4 mRNA in the liver of the PNS group and the co-administration group also decreased ($P < 0.01$). Compared with the NF group, the expressions of PXR, CAR and CYP3A4 mRNA in the liver of the PNS group and the co-administration group decreased, without much difference. **Conclusion** After combining Panax

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (No.LH2019H107); “新时代龙江优秀硕士、博士学位论文”资助项目 (No.LJYXL2022-083)。

作者简介: 李秋红, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事临床药理学和药物动力学研究, email: liqiu hong642020@126.com

*通信作者: 鞠爱霞, 女, 实验师, 博士, 主要从事中药学相关研究, email: 284812254@qq.com

notoginseng saponins with nifedipine, PNS may inhibit the activity and gene expression of hepatic drug metabolizing enzyme CYP3A4 by inhibiting the nuclear receptors PXR and CAR, and increasing the plasma concentration of nifedipine to enhance the therapeutic effect.

Key words: combination medication; Panax notoginseng saponin; nifedipine; nuclear receptor; CYP3A4

高血压是临床上常见的慢性病,以全身动脉血压升高为主要特征,可诱发中风、冠心病、动脉粥样硬化等心脑血管疾病^[1-2]。目前,我国高血压发病率逐年上升,高血压及其并发症严重威胁着患病人群的生命安全。然而,使用单一药物治疗降压效果并不理想,无法达到正常值和实现持久降压的目的,因此,临床上常将两种或两种以上的药物联合用于治疗高血压。

三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)是从五加科人参属植物三七中提取的有效活性成分,具有降低血压、抗炎、抗氧化、调节血脂等药理作用^[3-5]。硝苯地平(nifedipine, NF)属于二氢吡啶类药物,常用于高血压和心绞痛的治疗,但NF口服生物利用度较低^[6-7]。临床上将PNS与NF联合应用后疗效显著增强,但其增效的机制目前尚不明确。研究表明,PNS可抑制肝药酶CYP3A4的活性,而NF是该酶的底物^[8-9]。因此,PNS与NF之间可能存在由CYP3A4酶介导的药物相互作用。肝药酶CYP3A4同时又受核受体PXR、CAR的调控,当PXR、CAR被某些配体激活时会诱导或抑制肝药酶CYP3A4的活性^[10-11]。故此,我们推测PNS可能通过抑制核受体PXR、CAR的表达从而抑制CYP3A4酶的活性,进而提高NF的血药浓度导致药物的疗效增强。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(山东鲁创分析仪器有限公司);酶标仪(美国BIOTEK公司);红外微量分析仪(北京欣安诚科技有限公司);低温高速离心机(长沙英泰仪器有限公司);实时荧光定量PCR仪(赛默飞世尔科技有限公司);核酸蛋白分析仪(上海艾研生物科技有限公司);干式氮吹仪(上海梓桂仪器有限公司)。

1.2 试药

硝苯地平原料药(Meilunbio试剂公司);硝苯地平对照品(纯度 $\geq 98\%$,批号:Y14S6C3327,上海源叶生物科技有限公司);咪达唑仑注射液(国药集团工业有限公司);注射用血塞通(冻干)(哈尔滨珍宝制药有限公司);地西洋对照品(纯度 $> 99\%$,批号:20120118ACSW,中国食品药品检定研究院)。

甲醇(TEDIA公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime公司);动物总RNA快速抽提试

剂盒(Sangon Biotech公司);Fast King cDNA第一链合成试剂盒(TIANGEN公司);FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)核酸染料(Roche Diagnostics GmbH公司);CYP3A4、PXR、CAR及 β -actin引物由Sangon Biotech公司合成。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,6~8周龄,体重180~200g,由青岛派特福德白鼠养殖公司提供,实验动物生产许可证号:SCKK(鲁)2014-004。饲养环境:温度(23 \pm 3) $^{\circ}\text{C}$,湿度40%~65%。本实验符合实验动物伦理委员会的伦理学标准。

2 方法和结果

2.1 硝苯地平大鼠血浆药物浓度测定

2.1.1 给药方案与分组 SD大鼠20只随机均分为空白组、三七总皂苷组(PNS组)、硝苯地平组(NF组)和联合给药组(PNS+NF组)。NF经灌胃给药,PNS经腹腔注射给药,持续给药7d,给药剂量根据各药的临床给药剂量采用体表面积折算(PNS、NF给药剂量分别为60 mg \cdot kg $^{-1}$ 、30 mg \cdot kg $^{-1}$,联合给药组同时给予两种药物),空白组给予同体积生理盐水。末次给药后禁食不禁水12h。

2.1.2 样品采集与处理

①空白组血浆样品:经眼眶采集血样500 μL 于肝素钠抗凝离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10min(3500 r \cdot min $^{-1}$),从中取出上清液100 μL 于1.5mL离心管中,加入50 μL 地西洋内标溶液,混匀后加入1mL氯仿涡旋5min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10min(12000 r \cdot min $^{-1}$),从中取出800 μL 上清液于玻璃试管中,再次加入1mL氯仿重复上述步骤。合并所得到的上清液,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下氮气缓缓吹干,加流动相100 μL 复溶,涡旋30s,即完成生物样品处理,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

②给药组血浆样品:在给药前和给药后0.167、0.33、0.67、1、2、3、4、6、8、12、24h经眼眶采集血样500 μL ,处理过程同“空白组血浆样品”。

2.1.3 色谱条件 取处理后的血浆样品进样分析,色谱条件:Diamonsil(R)C₁₈柱(150mm \times 4.6mm);流动相为甲醇-0.03%磷酸二氢钠=62:38(V/V);检测波长为240nm;检测流速为1.0mL \cdot min $^{-1}$;检测柱温为20 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 肝微粒体 CYP3A4 酶活性的测定

2.2.1 肝微粒体制备 参考相关文献^[12], 采用氯化钙沉淀法在 4 °C 环境中制备小鼠肝微粒体混悬液, 防止肝药酶失活变性, 采用 BCA 法测定总蛋白含量。

2.2.2 肝微粒体体外孵育体系 肝微粒体蛋白含量为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 探针药物咪达唑仑 $2.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷酸盐缓冲液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 补足总体积为 $500 \text{ } \mu\text{L}$ 。混匀后, 37 °C 水浴摇床孵育 5 min, 加入 $50 \text{ } \mu\text{L}$ NADPH ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液并混匀, 37 °C 水浴摇床孵育 30 min。

2.2.3 肝微粒体中咪达唑仑浓度测定 孵育后的样品室温静置 3 min 后加入 $500 \text{ } \mu\text{L}$ 4 °C 预冷的甲醇终止液 (含地西洋 $8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 混匀后, 4 °C 离心 15 min ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液进样分析。

2.2.4 色谱条件 采用 Topsisil C₁₈ 分析柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$), C₁₈ 预柱 ($10 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$),

以甲醇-磷酸氢二铵缓冲液 (51 : 49, V/V) 为流动相, 检测波长为 230 nm; 柱温为 35 °C; 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 取处理后血浆样品和肝微粒体样品, 分别按“2.1.3”与“2.2.4”项下方法进样分析。结果表明, 各色谱峰峰形尖锐, 且分离度良好 ($R > 1.5$), 并无杂峰干扰。硝苯地平 and 内标物地西洋的保留时间分别为 8.8 min 和 18.6 min 左右, 咪达唑仑 and 内标物地西洋的保留时间分别为 19.3 min 和 29.8 min 左右, 内源性杂质及内标物地西洋在测定条件下不干扰硝苯地平 and 咪达唑仑的测定。咪达唑仑是 CYP3A4 酶的特异性底物, 对该药浓度变化的考察可以间接反映 CYP3A4 酶活性的变化。色谱图见图 1 及 2。

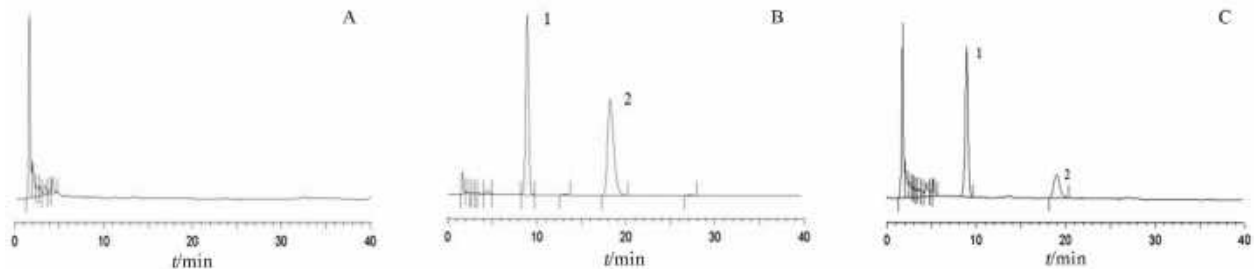


图 1 血浆样品色谱图

Fig 1 Typical chromatograms of plasma samples

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆+硝苯地平+内标 (blank plasma + nifedipine + internal standard); C. 血浆样品+内标 (plasma + internal standard); 1. 硝苯地平 (nifedipine); 2. 地西洋 (diazepam)

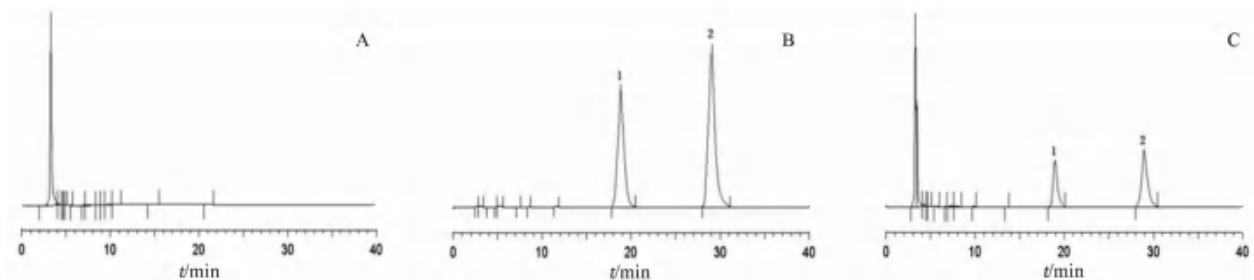


图 2 肝微粒体样品色谱图

Fig 2 Chromatograms of liver microsome samples

A. 空白肝微粒体 (blank liver microsome); B. 咪达唑仑+内标 (midazolam + internal standard); C. 空白肝微粒体+咪达唑仑+内标 (blank liver microsome + midazolam + internal standard); 1. 咪达唑仑 (midazolam); 2. 地西洋 (diazepam)

2.3.2 线性关系考察 取 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 空白血浆样品加入适量的硝苯地平 and 地西洋溶液制备一系列浓度梯度的血浆样品溶液, 按“2.1.2”项下方法操作, 各配制 3 份, 并按“2.1.3”项下条件进样分析。以硝苯地平浓度为横坐标 (X), 硝苯地平与内标物地西洋峰面积的比值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 0.3133X + 0.1057$, $R^2 = 0.9991$, 线性范围为 $1.00 \sim 50.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

制备无活性的肝微粒体, 按“2.2.3”项下方法进行的操作, 咪达唑仑终浓度分别为 7.5 、 6.25 、 5 、 2.5 、 1.25 、 0.625 、 $0.3125 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 同一浓度各制备 3 份, 以药物咪达唑仑的浓度为横坐标 (X), 咪达唑仑与地西洋峰面积比值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 0.1186X - 0.0014$, $R^2 = 0.9967$, 线性范围为 $0.031 \sim 7.50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 精密度与准确度考察 取 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 空白生物

样品溶液加入一定体积的硝苯地平、内标地西洋溶液制备高、中、低浓度的血浆样品，平行制备 5 份，按“2.1.2”项下方法操作，按“2.1.3”项下条件进样分析，计算硝苯地平日内、日间精密度的相对回收率。

制备无活性的肝微粒体，按“2.2.1”项下方法制备成高、中、低 3 个浓度的咪达唑仑肝微粒体样品，终浓度分别为 7.5、2.5、0.625 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，平行制备 5 份，按“2.2.4”项下条件进样分析，计算咪达唑仑日内、日间精密度的相对回收率。硝苯地平与咪达唑仑精密度的结果符合生物分析方法的标准，见表 1、2。

表 1 硝苯地平的精密度的及相对回收率 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Precision and recovery of nifedipine in biological samples ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

硝苯地平 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内		日间	
	回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
1.0	95.33	6.2	95.00	9.2
20.0	96.50	5.1	91.92	9.3
50.0	95.39	4.8	91.73	6.0

表 2 咪达唑仑的精密度的及相对回收率 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Precision and recovery of midazolam in liver microsome samples ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

咪达唑仑 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内		日间	
	回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
0.625	99.21	4.7	97.00	5.5
2.5	99.89	4.4	94.78	5.2
7.5	101.25	4.5	99.67	5.3

2.3.4 稳定性考察 分别制备高、中、低浓度的硝苯地平血浆样品，按“2.1.2”项下方法操作，按“2.1.3”项下条件进样分析，通过长期冷冻储存、室温放置、冷冻解冻循环进行稳定性考察。同时对咪达唑仑进行考察。结果显示， $RSD < 15\%$ ，表明硝苯地平在血浆样品中长期冷冻保存时仍然稳定。咪达唑仑稳定性考察结果显示，肝微粒体中高、中、低浓度的咪达唑仑 RSD 值均小于 10%，说明咪达唑仑在肝微粒体的稳定性较好。

2.4 数据处理与分析

药动学参数采用统计软件 DAS 2.0 计算，数据统计采用 SPSS 24.0 软件进行处理，所有值以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间采用 One-way ANOVA 进行方差齐性检验 (F 检验)，两两比较时进行 t 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.5 硝苯地平在大鼠体内的药动学过程

与硝苯地平组相比，硝苯地平联合三七总皂

昔后药动学参数显示，硝苯地平药时曲线下面积升高，半衰期升高，最大血药浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (t_{max}) 显著增加 ($P < 0.01$)、清除率显著降低 ($P < 0.01$)，见图 3 及表 3。

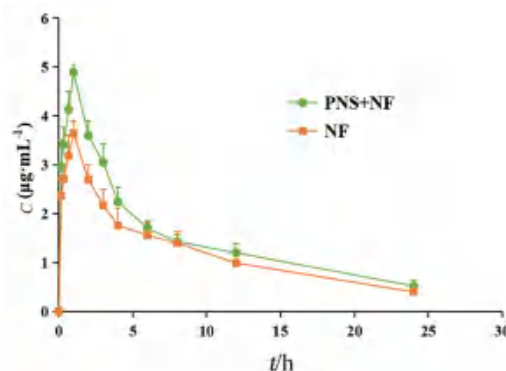


图 3 大鼠体内的血浆药物浓度 - 时间曲线 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Fig 3 Plasma drug-time curve of in rats ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

表 3 大鼠体内的药动学参数 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of rats ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

药动学参数	NF 组	PNS + NF 组
$t_{1/2\alpha}$ /h	0.60 \pm 0.02	0.90 \pm 0.09**
$t_{1/2\beta}$ /h	11.45 \pm 0.76	14.68 \pm 0.74**
t_{max} /h	0.78 \pm 0.19	0.89 \pm 0.18**
C_{max} / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.63 \pm 0.03	4.89 \pm 0.10**
$AUC_{0 \sim 24}$ / ($\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$)	30.74 \pm 1.19	37.60 \pm 1.24**
$MRT_{0 \sim 24}$ /h	7.95 \pm 0.15	8.07 \pm 0.13
CL/F / ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$)	0.82 \pm 0.03	0.63 \pm 0.01**

注：与硝苯地平组比较，** $P < 0.01$ 。

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

2.6 qPCR 技术检测肝脏中核受体 PXR、CAR 和 CYP3A4 mRNA 表达水平

取肝脏组织加液氮研磨，提取大鼠肝脏 RNA (参照动物总 RNA 快速抽提试剂盒说明书) 测定其浓度后进行质量检测，质量符合要求后参照 Fast King cDNA 第一链合成试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 总反应体系为 50 μL ，包含上下引物各 1 μL 、25 μL SYBR Green、18 μL RNase-Free 水以及 5 μL cDNA 模板。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min；45 次循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s)；72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 稳定产物。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达倍数，引物序列见表 4。

2.6.1 三七总皂昔对 CYP3A4 酶活性的影响 与空白组相比，三七总皂昔组和联合给药组中 CYP3A4 酶活性降低 ($P < 0.05$)，而硝苯地平组无影响，表明三七总皂昔对 CYP3A4 酶有抑制作用 (见图 4)。

表 4 qPCR 引物序列

Tab 4 Sequence of qPCR primers

基因	序列
<i>CYP3A4</i>	F: 5'-ACCAGCAGCACACTTTCCTT-3' R: 5'-CATAGGTGGGAGGTGCCTTA-3'
<i>PXR</i>	F: 5'-GACGGCAGCATCTGGAACACTAC-3' R: 5'-TGATGACGCCCTTGAACATG-3'
<i>CAR</i>	F: 5'-TACCTGTTTCAGCCATCACC-3' R: 5'-TACCGCATCTTCCATCTTGT-3'
<i>β-actin</i>	F: 5'-CTGGCCCGACCTGACAGA-3' R: 5'-GCGGCAGTGGCCATCTC-3'

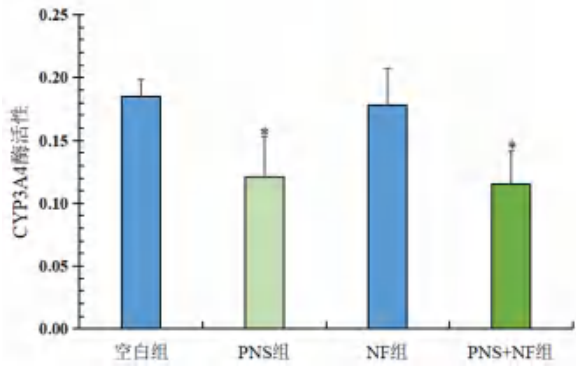


图 4 各组对 CYP3A4 酶活性的影响

Fig 4 Effect of each group on the CYP3A4 enzyme activity

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ 。

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

2.6.2 三七总皂苷对肝脏中核受体 PXR、CAR 和 CYP3A4 mRNA 表达水平的影响 与空白组相比，硝苯地平组肝脏中核受体 PXR、CAR 和 CYP3A4 mRNA 表达量降低，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，三七总皂苷组和联合给药组中各基因表达量均降低 ($P < 0.01$)；与硝苯地平组相比，三七总皂苷组和联合给药组中各基因表达量降低，但差异无统计学意义，见图 5。

3 讨论

高血压及其并发症已成为威胁人类生命健康的主要因素之一^[13]。目前，常用降压药包括钙通道阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂、利尿剂、血管紧张素 II 受体阻滞剂和 β 受体阻滞剂^[14]。然而，使用单一药物治疗高血压及其并发症疗效并不显著，因此，在临床上常联合其他药物使用^[15-16]。硝苯地平属钙通道阻滞剂，其口服生物利用度较低，该药与三七总皂苷联合应用后疗效显著提高，但其作用机制尚未明晰。为进一步证明本课题组的推测，从三七总皂苷对硝苯地平的药动学过程的影响、三七总皂苷对肝药代谢酶 CYP3A4 活性的影响以及三七总皂苷对核受体 PXR、CAR 和肝药酶 CYP3A4 基因表达量

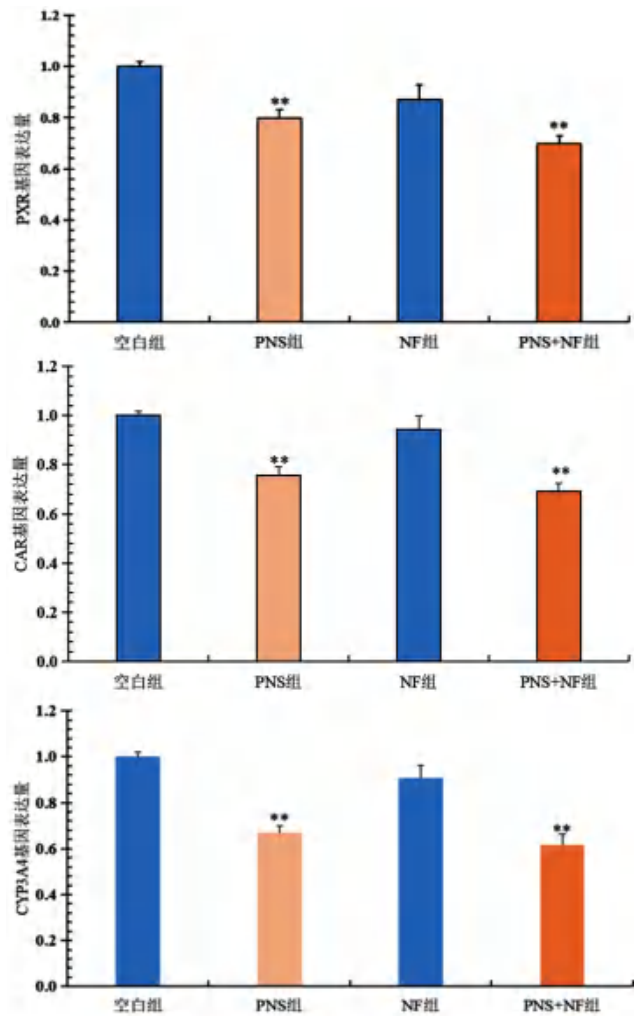


图 5 各组 PXR、CAR 和 CYP3A4 mRNA 表达量

Fig 5 mRNA expression of PXR, CAR and CYP3A4 in each group

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

的影响三个方面探究其增效的机制。药动学结果显示，硝苯地平的血药浓度-时间曲线下面积增加、半衰期延长和清除率显著降低，表明三七总皂苷可通过影响硝苯地平的药动学过程进而提高硝苯地平的血药浓度。三七总皂苷对肝药代谢酶 CYP3A4 活性的影响结果显示，三七总皂苷能通过降低 CYP3A4 酶的活性使硝苯地平的代谢减慢。通过检测核受体 PXR、CAR 和肝药酶 CYP3A4 的基因表达量发现，三七总皂苷能够抑制 PXR、CAR 和肝药酶 CYP3A4 的基因表达，该结果与 CYP3A4 酶活性受到抑制呈现一致性。因此，两药联合疗效增加的机制可能是三七总皂苷抑制核受体 PXR、CAR 的表达进而抑制肝药酶 CYP3A4 活性及基因表达，减缓硝苯地平的代谢提高其血药浓度，进而增强硝苯地平的疗效。然而，在药效增强的同时其不良反应发生率也可能增加。

药物相互作用是引起不良反应的重要因素之一,在药动学方面主要体现在药物代谢和转运过程中的相互作用^[17]。代谢环节对代谢酶的诱导或抑制是影响药物相互作用的主要因素,即两种或两种以上的药物一同或前后使用时,其中一种药物诱导或抑制代谢酶的活性,进而促进或减慢另一种药物的代谢^[18]。CYP3A4 酶作为 CYP3A 家族中主要亚型之一,其作用底物多,除硝苯地平还包括尼群地平、维拉帕米和阿托伐他汀等药物^[19]。因此,在临床上三七总皂苷与这些药物共同应用时都需防止因肝药代代谢酶 CYP3A4 受到抑制而诱发的药物不良反应。

综上,本课题组阐明了三七总皂苷与硝苯地平协同作用的机制,为两药联合应用疗效增强奠定了理论基础。同时因本研究只在健康大鼠中探讨三七总皂苷对硝苯地平药动学过程的影响,还需要建立大鼠高血压模型,更进一步研究三七总皂苷对硝苯地平药效学的影响。其次,还可以采用 Western blot 技术检验蛋白表达量进行相互印证,开展细胞实验以更深一步地研究三七总皂苷联合硝苯地平疗效增强的作用机制。

参考文献

- [1] 刘玥玥,李婷,张博,等. 芫荽的抗氧化活性及对高果糖高盐饮食诱导大鼠血压升高的缓解作用[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(8): 37-44.
- [2] Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension [J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(4): 223-237.
- [3] Xu CC, Wang WW, Wang B, et al. Analytical methods and biological activities of Panax notoginseng saponins: recent trends [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 236: 443-465.
- [4] Loh YC, Tan CS, Ch'ng YS, et al. Overview of signaling mechanism pathways employed by BPAid in vasodilatory activity [J]. J Med Food, 2017, 20(12): 1201-1213.
- [5] Singh D, Chaudhuri PK. Structural characteristics, bio-availability and cardioprotective potential of saponins [J]. Integr Med Res, 2018, 7(1): 33-43.
- [6] 张娜,刘茜英,许俊博,等. 硝苯地平缓释片溶出曲线对比研究[J]. 中国药师, 2021, 24(1): 176-180.
- [7] 杜丽,杜艳,阎爱荣,等. 硝苯地平缓释滴丸的制备含量测定和释放度考察[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(3): 415-416.
- [8] 王凌,程能能,毛玉昌. 三七总皂苷主要成分对人肝微粒体 CYP3A4 酶的抑制作用研究[J]. 中国药师, 2014, 17(3): 353-356.
- [9] 张瑞卿,杨文倩,余裕炳,等. 硝苯地平骨架型缓释微丸在大鼠体内药代动力学及其与 CYP3A4 代谢酶活性的关系[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 427-432.
- [10] Burk O, Piedade R, Fait JT, et al. Differential effects of clinically used derivatives and metabolites of artemisinin in the activation of constitutive androstane receptor isoforms [J]. Br J Pharmacol, 2012, 167(3): 666-681.
- [11] Takano H, Yamaguchi JI, Kato S, et al. Downregulation of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 in human hepatocytes by prolyl hydroxylase domain 2 inhibitors via hypoxia-inducible factor- α stabilization [J]. Drug Metab Dispos, 2021, 49(1): 20-30.
- [12] 李秋红,单万亭,鞠爱霞,等. 基于肝脏药物代谢酶研究附子配伍干地黄的减毒机制[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3961-3966.
- [13] Hua Y, Liu HL, Sun JY, et al. Association between serum calcium and the prevalence of hypertension among US adults [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 719165.
- [14] 宁娜,王庆利,光红梅. 临床常用降压药的致癌性评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(10): 1080-1084.
- [15] 尹宝枝,吴小冬. 拉贝洛尔联合硝苯地平治疗重症妊娠期高血压疾病的有效性与安全性分析[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(2): 298-300.
- [16] 高血压患者药物治疗管理路径编写委员会. 高血压患者药物治疗管理路径专家共识[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(1): 1-24.
- [17] 沙碧君,周素凤,王璐,等. 药物相互作用临床研究方法及进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(9): 1037-1045.
- [18] 刘璐,陈笑艳. 国产小分子化学创新药临床药物相互作用研究现状[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(8): 863-875.
- [19] 陈荣达,谢静,史玉蕊,等. CYP3A4 酶对土茯苓黄酮类成分代谢的影响[J]. 分析实验室, 2020, 39(7): 760-765.

(收稿日期: 2023-05-10; 修回日期: 2023-06-19)

电子加速器辐照对藏药小檗皮中主要有效成分及灭菌效果的影响

吴剑英^{1, 3, 4}, 尼玛次仁², 张国庆⁴, 张继稳^{1, 3}, 陈丽华^{3, 5*}, 谢和兵^{1, 2, 3*} (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 857000; 3.长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226000; 4.江苏云视药物科技有限公司, 江苏 南通 226000; 5.江西中医药大学, 南昌 330004)

摘要: **目的** 探究电子加速器辐照对小檗皮粉末和其水提液的灭菌效果及对主要活性成分的影响。**方法** 采用 2、4、6、8、10 kGy 辐照剂量对小檗皮粉末和水提液进行灭菌, 分别比较辐照前后小檗皮粉末和水提液的性状、显微特征、薄层色谱图、微生物水平、主要活性成分(盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、木兰花碱)的含量变化和指纹图谱相似度。**结果** 经不同辐照剂量灭菌后, 小檗皮粉末和水提液的性状、显微特征、薄层色谱图均未见明显变化, 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、木兰花碱的含量无显著变化 ($P > 0.05$), 细菌菌落数、霉菌和酵母菌菌落总数显著降低 ($P < 0.001$), 当辐照剂量为 4 kGy 及以上时, 样品的微生物符合 2020 年版《中国药典》的限度要求。**结论** 电子束辐照对藏药小檗皮中的主要有效成分无显著影响, 在 4 kGy 时达到良好的灭菌效果, 电子束辐照适用于小檗皮及其提取液的灭菌。

关键词: 小檗皮; 辐照; 有效成分; 含量; 灭菌; 指纹图谱

中图分类号: R29, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)12-3192-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.015

Effect of electron accelerator irradiation on the main active components and sterilization of Berberidis Cortex

WU Jian-ying^{1, 3, 4}, Ni-ma-ci-ren², ZHANG Guo-qing⁴, ZHANG Ji-wen^{1, 3}, CHEN Li-hua^{3, 5*}, XIE He-bing^{1, 2, 3*} (1. College of Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Tibet God Monkey Pharmaceutical Co., Ltd., Shigatse Tibet 857000; 3. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226000; 4. Jiangsu High View Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226000; 5. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: Objective To determine the effect of electron accelerator irradiation on the main active components and sterilization of Berberidis Cortex powder and its aqueous extract. **Methods** Berberidis Cortex powder and aqueous extract were sterilized by the irradiation doses at 2, 4, 6, 8, and 10 kGy. The properties, microscopic characteristics, thin layer chromatography (TLC), microbial levels, content changes of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, and magnoflorine, and fingerprint similarity of Berberidis Cortex powder and its aqueous extract were compared before and after the irradiation. **Results** The properties, microscopic characteristics and TLC of Berberidis Cortex powder and its aqueous extract had no changes after the sterilization with all the irradiation doses, and the contents of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride and magnoflorin did not change ($P > 0.05$). However, the number of bacterial colonies, the total number of mold and yeast colonies were significantly decreased after the sterilization ($P < 0.001$). When the irradiation dose was 4 kGy or above, the microbial limits of the samples met the requirements in Chinese Pharmacopoeia (Version 2020). **Conclusion** Electron

基金项目: 西藏自治区科技厅-日喀则市人民政府区域科技协同创新专项 (No.QYXTZX-RKZ2022-07)。

作者简介: 吴剑英, 女, 硕士, 主要从事中药药剂研究, email: jywu.hm@simm.ac.cn ***通信作者:** 谢和兵, 男, 硕士研究生导师, 主要从事高原医学研究及传统藏药的产业化开发研究, email: 76445044@qq.com; 陈丽华, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术、中药复方配伍与生物药剂学研究, email: chly98@163.com

accelerator irradiation (4 kGy) has no deteriorated effect on the effective components of Berberidis Cortex powder and its aqueous extract, and sterilization remains, indicating that this method is suitable for the sterilization of Berberidis Cortex and its aqueous extract.

Key words: Berberidis Cortex; irradiation; active ingredient; content; sterilization; fingerprint

小檗皮(藏药名, 吉堪)是藏医防治“赤巴”病最常用的藏药之一, 为小檗科植物刺红珠(*Berberis dictyophylla* Franch.)及同属多种植物茎或根的内皮^[1]。小檗皮始载于《四部医典》, 味苦、涩, 性寒, 具有清热、解毒、燥湿、消炎等功效, 常用于治疗痢疾、尿路感染、肾炎、结膜炎等疾病^[2-3], 还可平稳血糖及预防糖尿病并发症^[4-6]。小檗皮主要以生药粉碎制成散剂或制成丸剂, 如“八味小檗皮散”“八味獐牙菜丸”“四味姜黄汤散”。目前藏药常用的灭菌方式是湿热和干热灭菌, 但本团队研究发现小檗皮经热灭菌后, 药材性状发生显著变化, 这与小檗皮中所含小檗碱等生物碱类有效成分受热发生变化有关。因此, 常规的热灭菌不适用于小檗皮生药材或含小檗皮生药材成药的灭菌。

电子加速器辐照灭菌是利用电子加速器产生的高能电子束照射物质达到灭菌目的, 是一种冷加工物理过程, 与传统灭菌方式相比, 具有穿透力强、灭菌效果彻底、经济、安全、适用于大规模生产等优势, 且不会残留有害物质, 能最大限度地保持中药材的性状、活性成分、含量及药理作用, 适用于含生药粉及挥发性成分较多的热敏性成分中药材的灭菌处理。目前已在食品、药品及医疗用品的灭菌工艺中被推广应用^[7-11]。本研究通过不同剂量电子束辐照处理小檗皮粉末及其水提液, 比较辐照前后样品的性状、显微、薄层、微生物及有效成分(盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和木兰花碱)的含量变化, 考察电子束辐照对小檗皮主要有效成分和灭菌效果的影响, 为小檗皮药材以及含小檗皮生药材的成药的灭菌方法提供实验依据。

1 材料

1.1 试药

小檗皮(批号: 20200401)由西藏神猴药业有限责任公司提供, 经西藏神猴药业有限责任公司副主任藏药师尼玛次仁鉴定为小檗科植物刺红珠 *Berberis dictyophylla* Franch. 及同属多种植物茎或根的内皮; 盐酸小檗碱对照品(纯度: 85.9%, 批号: 110713-202015)、盐酸巴马汀对照品(纯度: 85.7%, 批号: 110732-201913)、盐酸药根碱对照品(纯度: 90.3%, 批号: 110733-202110)、木兰

花碱对照品(批号: 112090-202201, 供含量测定用)(中国食品药品检定研究院); 乙酸乙酯、异丙醇、甲苯、磷酸(国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 批号: 221027100215, 上海迈瑞尔化学技术有限公司); 磷酸二氢钠(ACS级, 批号: L8A0T78, 河北百灵威科技有限公司); 盐酸(批号: 2101788, 上海安谱实验科技股份有限公司); 水为怡宝纯净水。

1.2 仪器

DZ-10/20 电子加速器(安徽戈瑞电子科技有限公司, 功率 10 MeV); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); ZYL1000-1 万分之一天平(精度: 0.01 mg, 上海赞维衡器有限公司); WMS-1037 生物显微镜(上海无陌光学仪器有限公司); SB-5200DT 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); DHG-9240A 鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); 1730R 离心机(上海贝晶生物技术有限公司); KWF-20 超微粉碎机(浙江瑞昊机械制造有限公司)。

2 方法

2.1 电子加速器辐照灭菌

将小檗皮样品粉碎后过 60 目筛, 采用聚乙烯袋封装, 每组 6 袋, 每袋 12 g。取小檗皮样品粉末 250 g, 置于圆底烧瓶中, 加 6 倍水回流提取 4 次, 每次 1 h, 其中第一次加水浸泡 4 h 后开始煎煮^[12], 提取结束后合并水提液, 将小檗皮水提液分为 6 组, 装入透明 PET 瓶中, 每组 6 瓶, 每瓶 30 mL。小檗皮粉末及其水提液辐照样品均由中广核戈瑞科技有限公司采用电子加速器辐照灭菌处理, 辐照剂量分别为 2、4、6、8、10 kGy。

2.2 性状比较

通过日光下眼观、手摸、鼻嗅、口尝等方式对辐照样品的的外观、色泽、气味进行直观判断。

2.3 显微鉴别

参照 2020 年版《四川省藏药标准》显微鉴别法, 取不同辐照剂量的样品粉末少许置载玻片上, 滴加甘油醋酸试液, 盖上盖玻片, 置生物显微镜下观察。

2.4 薄层色谱鉴别

分别取不同辐照剂量小檗皮粉末(0、2、4、6、8、10 kGy) 0.5 g, 加甲醇 5 mL, 超声处理 30

min, 过 0.45 μm 滤膜, 取滤液作为供试品溶液 1; 分别取不同辐照剂量小檗皮水提液 (0、2、4、6、8、10 kGy) 1 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 取滤液作为供试品溶液 2。另取盐酸小檗碱对照品, 加甲醇制得质量浓度为 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸小檗碱对照溶液。照薄层色谱法 (通则 0502) 试验, 吸取上述溶液各 1~2 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-水 (6:3:3:2:1) 为展开剂, 置氨蒸气饱和的展开缸内展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。

2.5 含量测定

2.5.1 混合对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱 10.03 mg、盐酸巴马汀 10.12 mg、盐酸药根碱 10.08 mg 和木兰花碱 9.26 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇溶解, 定容, 摇匀, 分别制得质量浓度为 0.862、0.867、0.910、0.926 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品溶液。精密移取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和木兰花碱对照品储备液各 1 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇-0.1% 磷酸溶液 (3:7, V/V) 定容至刻度, 摇匀, 制得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和木兰花碱质量浓度分别为 0.172、0.173、0.182、0.185 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.5.2 小檗皮粉末供试品溶液的制备 精密称取小檗皮粉末约 0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入盐酸-70% 甲醇 (1:100) 20 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 称定重量, 用盐酸-70% 甲醇 (1:100) 补足减失重量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液, 即得。

2.5.3 小檗皮水提液供试品溶液的制备 取小檗皮水提液 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇定容, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取滤液, 即得。

2.5.4 测定方法 采用高效液相色谱法测定盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和木兰花碱的含量。色谱条件如下: 色谱柱为 Agilent 5 TC-C18 (2)(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液 (磷酸调节 pH 至 3.0) (B), 梯度洗脱程序为 0~12 min, 80% \rightarrow 68%B; 12~30 min, 68% \rightarrow 80%B; 30~32 min, 80%B; 流速为 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 270 nm; 进样量为 10 μL , 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6 微生物检查

参照 2020 年版《中国药典》第四部通则中无菌产品微生物限度检查法, 包括通则 1105 (微生物计数法)、通则 1106 (控制菌检查法) 及通则

1107 (非无菌药品微生物限度标准), 检查辐照前后小檗皮粉末和水提液的细菌菌落总数、霉菌和酵母菌菌落总数、大肠菌群的变化。

2.7 数据分析

运用 SPSS 27.0 软件 (IBM SPSS Statistics 27) 进行数据处理, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义; 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版)”软件, 以辐照前小檗皮粉末和水提液色谱图作为参照图谱, 选择平均数法生成对照图谱, 设置时间窗为 0.5 min, 采用多点校正法建立指纹图谱, 对辐照前后小檗皮粉末和水提液的盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、木兰花碱色谱图进行相似度分析, 计算各图谱与对照指纹图谱的相似度。

3 结果

3.1 性状变化

与辐照前样品相比, 辐照后小檗皮粉末和水提液的外观、色泽、气味均未发生明显变化, 表明电子束辐照对小檗皮粉末和水提液的性状无明显影响 (见图 1)。

3.2 小檗皮粉末的显微鉴别

辐照处理前, 小檗皮粉末在显微镜下可见黄绿色至黄棕色的纤维状石细胞, 大小、形态各异, 常成片存在, 孔沟深而清晰, 壁孔明显; 见淡黄色的韧皮纤维, 长棱形, 孔沟细密而清晰, 壁孔明显, 壁略厚; 韧皮薄壁细胞成片存在, 多由 3 个以上纺锤形细胞端壁相连而成, 细胞壁呈扁珠状或均匀加厚; 草酸钙方晶易见, 多呈菱形和不规则形; 见淡黄色的木栓细胞, 长方形或类方形, 排列紧密, 垂周壁微波状增厚。辐照处理后, 小檗皮粉末均能呈现上述显微特征 (见图 2), 表明电子加速器辐照灭菌对小檗皮粉末的显微特征无影响。

3.3 薄层鉴别

未经辐照灭菌的小檗皮粉末和水提液 (即 0 kGy) 和经 2、4、6、8、10 kGy 剂量辐照的小檗皮粉末和水提液在与盐酸小檗碱对照品的相应位置上, 显相同颜色的斑点 (见图 3), 其中粉末 $R_f = 0.53$, 水提液 $R_f = 0.63$ 。结果表明经电子加速器辐照灭菌后小檗皮粉末和水提液薄层色谱无明显改变。

3.4 含量测定结果

3.4.1 专属性 取空白溶液 [盐酸-70% 甲醇 (1:100)]、混合对照品溶液、供试品溶液分别按“2.5.4”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。结果见图 4, 可见色谱图在木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱保留时间处无干扰峰出现, 且该方法可以同时检出 4 种物质。



图 1 辐照前后性状图

Fig 1 Appearance of samples before and after the irradiation

A. 小檗皮粉末 (Berberidis Cortex powder); B. 小檗皮水提液 (Berberidis Cortex aqueous extract)

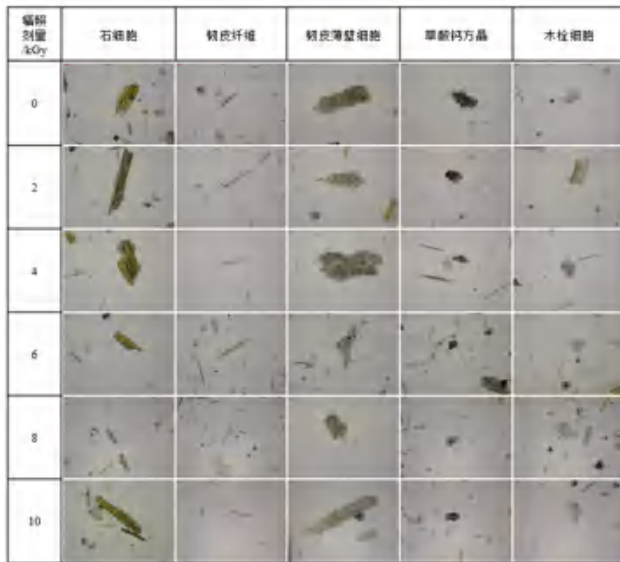


图 2 小檗皮粉末辐照前后的显微特征 (×100)

Fig 2 Microscopic characteristics of Berberidis Cortex powder before and after the irradiation (×100)

3.4.2 各成分的含量变化 分别对辐照前后小檗皮粉末及其水提液中主要活性成分的含量进行测定。结果见表 1, 辐照前后小檗皮粉末和水提液中盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、木兰花碱的含量无显著变化 ($P > 0.05$)。

3.5 指纹图谱相似度

用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版)”对所得色谱图进行处理, 以未辐照样品 (即 0 kGy) 色谱图为参照, 经过多点校正、全谱峰匹配, 生成对照图谱 R (见图 5), 计算相似度。结果显示, 样品相似度均在 0.998 及以上 (见表 2)。

3.6 微生物限度

辐照处理前, 小檗皮粉末和水提液的微生物总数均不符合 2020 年版《中国药典》中非无菌药品微生物限度标准 (需氧菌总数 $\leq 2 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 霉菌和酵母菌总数 $\leq 200 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 控制菌大肠埃希菌不得检出)。辐照处理后, 细菌菌落总数、霉菌和酵母菌菌落总数均显著下降, 采用 4 kGy 及以上

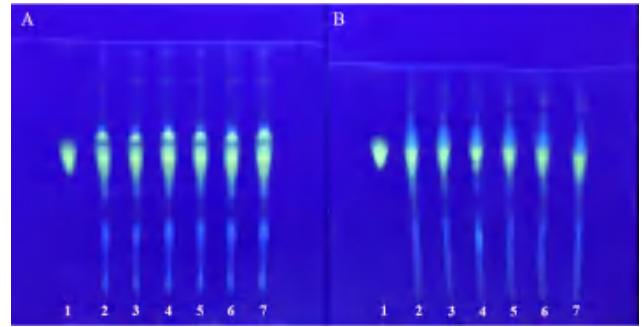


图 3 小檗皮粉末 (A) 及水提液 (B) 辐照前后薄层色谱图

Fig 3 TLC before and after the irradiation of Berberidis Cortex powder and aqueous extract

1. 盐酸小檗碱对照品 (reference materials of berberine hydrochloride); 2~7. 供试品 (辐照剂量依次为 0、2、4、6、8、10 kGy) [test samples (the irradiation dose was 0, 2, 4, 6, 8, and 10 kGy, respectively)].

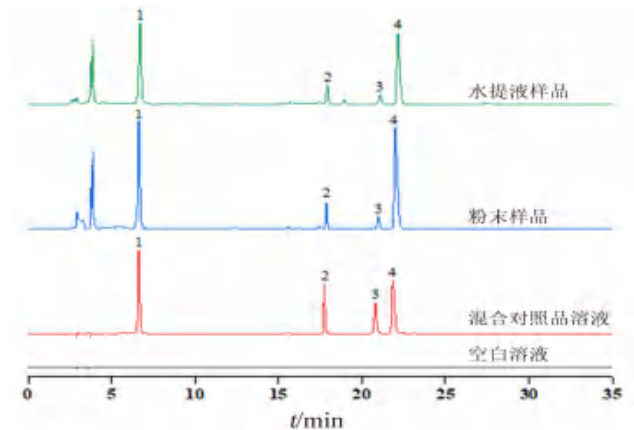


图 4 空白溶液、混合对照品溶液与样品溶液的 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of blank, mixed reference and sample solutions

1. 木兰花碱 (magnoflorine); 2. 盐酸药根碱 (jatrorrhizine hydrochloride); 3. 盐酸巴马汀 (palmatine hydrochloride); 4. 盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride)

剂量时, 小檗皮粉末和水提液的霉菌和酵母菌菌落总数、大肠菌群总数均符合药典标准 (见表 3)。

4 讨论

4.1 主要有效成分的选择

现代药理学研究表明, 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和木兰花碱均具有良好的抗菌、抗炎、镇痛等作用^[13-16]。目前, 已有文献对小檗皮中这 4 种生物碱进行了定性定量分析^[17-20]。为了提高藏药小檗皮的质量评价水平, 本研究以盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和木兰花碱作为重要指标进行同时测定, 以明确辐照灭菌对小檗皮中主要有效成分的影响。

4.2 辐照剂量的选择

根据国家市场监督管理总局 2015 年发布的《中药辐照灭菌技术指导原则》规定, 中药最大辐照灭菌剂量不应超过 10 kGy 的原则, 选定 2、4、

表 1 不同辐照剂量对小檗皮粉末和水提液中各成分含量的影响 (n = 3)

Tab 1 Effect of different radiation doses on the compounds contents of Berberidis Cortex powder and aqueous extract (n = 3)

样品	辐照剂量 /kGy	盐酸小檗碱		盐酸巴马汀		盐酸药根碱		木兰花碱	
		含量 / (mg · g ⁻¹)	P 值	含量 / (mg · g ⁻¹)	P 值	含量 / (mg · g ⁻¹)	P 值	含量 / (mg · g ⁻¹)	P 值
粉末	0	35.69	—	3.42	—	4.99	—	54.25	—
	2	35.62	0.123	3.42	0.835	4.97	0.189	53.92	0.113
	4	35.65	0.361	3.42	0.835	4.99	1.000	54.05	0.344
	6	35.82	0.484	3.42	0.735	4.99	0.922	55.14	0.061
	8	35.46	0.458	3.40	0.490	5.00	0.541	54.45	0.634
	10	36.37	0.093	3.45	0.284	5.08	0.082	54.89	0.119
水提液	0	15.96	—	1.64	—	3.00	—	33.88	—
	2	15.94	0.922	1.64	0.952	3.02	0.727	34.21	0.548
	4	15.89	0.662	1.65	0.706	3.02	0.411	33.51	0.471
	6	16.05	0.888	1.63	0.589	2.94	0.410	34.52	0.453
	8	15.91	0.915	1.63	0.419	3.03	0.755	33.53	0.643
	10	15.62	0.098	1.61	0.126	2.88	0.067	33.89	0.987

表 2 辐照样品指纹图谱相似度

Tab 2 Similarity of fingerprints of irradiated samples

样品	辐照剂量 /kGy	0	2	4	6	8	10	R
粉末	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	R	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
水提液	0	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	0.998	1.000
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.998	1.000
	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999
	6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000
	8	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	10	0.998	0.998	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999
	R	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000

表 3 小檗皮粉末和水提液微生物限度检查结果 (n = 2)

Tab 3 Microbial limit test of Berberidis Cortex powder and aqueous extract (n = 2)

样品	辐照剂量 /kGy	微生物种类及含量		
		细菌菌落 / (cfu · g ⁻¹)	霉菌和酵母菌菌落 / (cfu · g ⁻¹)	大肠菌群 / (mpn · g ⁻¹)
粉末	0	25 018.0 ± 25.5	612.5 ± 17.7	—
	2	2505.0 ± 21.2***	—	—
	4	157.5 ± 10.6***	—	—
	6	—	—	—
	8	—	—	—
	10	—	—	—
水提液	0	50 015.0 ± 21.2	1012.5 ± 17.7	—
	2	15 023.0 ± 4.2***	—	—
	4	992.5 ± 10.6***	—	—
	6	57.5 ± 10.6***	—	—
	8	—	—	—
	10	—	—	—

注：“—”表示未检出；与辐照剂量 0 kGy 比较，***P < 0.001。

Note: “—” indicates no detection; compared with the irradiation dose of 0 kGy, ***P < 0.001.

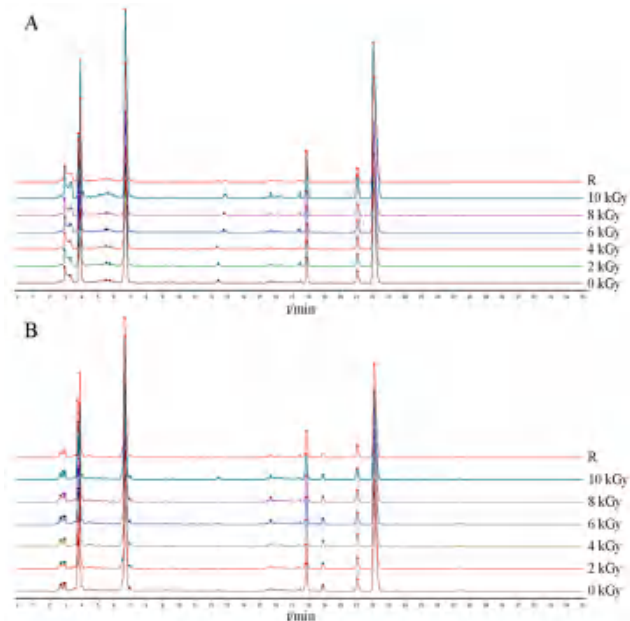


图 5 辐照前后指纹图谱

Fig 5 Fingerprints before and after the irradiation

A. 小檗皮粉末 (Berberidis Cortex powder); B. 小檗皮水提液 (Berberidis Cortex aqueous extract)

6、8、10 kGy 辐照剂量处理小檗皮粉末与提取液，考察辐照灭菌对其指纹图谱及化学成分含量的影

响^[21-24]。经不同辐照剂量处理后的小檗皮粉末和水提液指纹图谱共有峰数量无变化。随着辐照剂量的上升,样品微生物含量显著下降,当剂量为 4 kGy 时,微生物水平满足 2020 年版《中国药典》规定,且对主要成分含量无显著影响。

4.3 辐照灭菌的应用

随着辐照灭菌技术的研发推广和发展完善,目前在中药灭菌领域已有广泛应用,除适用于含热敏性和芳香性成分并以生药粉入药的药材外^[25-26],还适用于含有多种蛋白质和多肽类成分的动物类药粉的灭菌。与辐照灭菌技术相比,传统灭菌方法易造成动物药材蛋白变性从而影响后续有效成分的提取。目前已有多篇文献研究报道^[27-29],辐照灭菌技术既可以达到灭菌效果,且对药物理化性质、成分含量等方面无显著影响,其克服了传统灭菌方法灭菌温度高、时间长、破坏成分的弊端,可将其作为工业生产中含蛋白质和多肽类成分动物药材的主要灭菌方法。

5 结论

不同剂量电子束辐照对小檗皮粉末和水提液的性状、薄层色谱、主要有效成分(盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、木兰花碱)含量及其指纹图谱均无显著影响,当辐照剂量达 4 kGy 时,可达到良好的灭菌效果。因此,电子加速辐照灭菌是一种有效的控制小檗皮生药粉及水提液微生物水平的方法,并对药品质量无显著的影响。本研究可为小檗皮及其藏成药的灭菌工艺提供参考。

参考文献

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药·第 1 册[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1995: 340.
- 西藏、青海、四川、甘肃、云南、新疆卫生局. 藏药标准[S]. 西宁: 青海人民出版社, 1979: 11.
- 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京: 民族出版社, 1997: 84-85.
- 张燕, 孟宪丽, 岳丽珺, 等. 藏药小檗皮对糖尿病模型小鼠血糖水平影响的初步研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(19): 3619-3622, 3607.
- 岳丽珺, 张燕, 向丽, 等. 藏药吉尔巴对糖尿病性视网膜病变的影响及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 149-153.
- 叶凡, 岳丽珺, 范刚, 等. 小檗皮水浸膏对 db/db 糖尿病小鼠视网膜病变的影响(I)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 82-86.
- 王钢, 王丹, 何毅, 等. 麦冬、大黄饮片电子束辐照灭菌工艺研究[J]. 核农学报, 2022, 36(8): 1579-1588.
- 董婷, 高鹏, 汪茵月, 等. 电子束辐照对果蔬品质影响的研究进展[J]. 北方园艺, 2020(16): 133-138.
- 翟建青, 韩燕, 肖欢, 等. 电子束辐照对冷鲜鸡相关品质的影响研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 280-285.
- 严丹, 袁星, 解达帅, 等. 中药饮片灭菌的研究现状与思考[J]. 中草药, 2016, 47(8): 1425-1429.
- 康超超, 王学成, 伍振峰, 等. 基于物理化学及生物评价的中药生药粉灭菌技术研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(2): 507-515.
- 吴秦西, 王友利, 张燕, 等. 均匀设计法优化藏药小檗皮的煎煮法提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1637-1639.
- Okon E, Kukula-Koch W, Jarzab A, et al. Advances in chemistry and bioactivity of magnoflorine and magnoflorine-containing extracts[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1330.
- Zhu L, Gu PQ, Shen H. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 68: 242-251.
- Long JY, Song JW, Zhong L, et al. Palmatine: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics[J]. Biochimie, 2019, 162: 176-184.
- Rolle J, Asante DO, Kok-Fong LL, et al. Jatrorrhizine: a review of its pharmacological effects[J]. J Pharm Pharmacol, 2021, 73(6): 709-719.
- 张静, 吕秀梅, 李艳, 等. 藏族药小檗皮不同药用部位中 4 种生物碱成分的 HPLC 含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 37-42.
- 李琪, 杜欢, 文焕松, 等. 藏族药小檗皮中 6 种成分的含量测定及不同品种比较研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 968-974.
- 徐鑫梅, 武鑫玥, 易欢, 等. 一测多评法测定藏药小檗皮中 6 种成分的含量[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(24): 2852-2858.
- 李艳, 吕秀梅, 林亚丽, 等. 藏药小檗皮的质量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 592-596.
- 迟玉明, 解素花, 姚璐, 等. 中药原粉灭菌新技术研发及产业化应用研究[J]. 创新世界周刊, 2021(1): 86-93.
- 陈伟盛, 潘雯, 朱晓燕. 辐射灭菌不同剂量设定方法的比较[J]. 中国药品标准, 2019, 20(6): 500-504.
- 陈伟盛, 简敏骞, 关倩明, 等. 中药合理辐照灭菌剂量设定的初步研究[J]. 核农学报, 2017, 31(8): 1515-1520.
- 白洁, 迟玉明, 金红宇, 等. 《中药辐照灭菌技术指导原则》解读[J]. 中成药, 2017, 39(7): 1537-1538.
- 范伟. ⁶⁰Co- γ 射线辐射灭菌对连翘药材指纹图谱及有效成分的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(1): 171-175.
- 冯少俊, 伍振峰, 王雅琪, 等. 中药灭菌工艺研究现状及问题分析[J]. 中草药, 2015, 46(18): 2667-2673.
- 马云, 韩振明, 张微, 等. ⁶⁰Co- γ 射线辐照灭菌对全蝎药粉品质的影响研究[J]. 中国药物警戒, 2023, 20(5): 519-523.
- 韩振明, 关永霞, 张微, 等. ⁶⁰Co- γ 射线辐照灭菌对蜈蚣药粉品质的影响研究[J]. 中国药业, 2021, 30(9): 42-45.
- 张微, 韩振明, 杨梅, 等. ⁶⁰Co- γ 射线辐照灭菌对水蛭药粉品质的影响研究[J]. 中国辐射卫生, 2020, 29(3): 207-210, 217.

(收稿日期: 2023-05-12; 修回日期: 2023-07-03)

DOK3 在胶质母细胞瘤替莫唑胺耐药中的作用及机制研究

文海韬¹, 安喆妮², 吴水华^{1*} (1. 湖南省儿童医院神经外科, 长沙 410007; 2. 湖南省儿童医院药学部, 长沙 410007)

摘要: **目的** 研究停靠蛋白 3 (DOK3) 在胶质母细胞瘤替莫唑胺 (TMZ) 耐药中的作用及可能机制。**方法** 使用 CCK8 法测定细胞活力和 TMZ 的半数抑制浓度 (IC_{50}), 采用流式细胞术评价细胞凋亡。Western blot 法检测 DOK3、O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶 (MGMT)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、p-PI3K、AKT 和 p-AKT 蛋白的表达。Transwell 法测定细胞的迁移能力, 免疫荧光测定核转录因子 (NF- κ B) 的核转位。**结果** DOK3 在 TMZ 抗性的 U251 细胞中的表达水平低于其亲本细胞, 而 MGMT、p-PI3K 以及 p-AKT 的表达水平高于其亲本细胞。DOK3 的过表达降低了 TMZ 耐药细胞对 TMZ 的 IC_{50} 值, 也加速了 TMZ 诱导的细胞凋亡和细胞迁移抑制, 降低了 MGMT、p-PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达以及抑制了 NF- κ B 的核转位。**结论**

DOK3 通过 PI3K/AKT/NF- κ B 途径调控 MGMT, 导致神经胶质瘤细胞对 TMZ 产生耐药性。

关键词: 替莫唑胺; U251 细胞; 停靠蛋白 3; 胶质母细胞瘤; O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶
中图分类号: R739.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)12-3198-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.016

Role and mechanism of DOK3 in temozolomide resistance in glioblastoma

WEN Hai-tao¹, AN Zhe-ni², WU Shui-hua^{1*} (1. Department of Neurosurgery, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007; 2. Department of Pharmacy, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007)

Abstract: Objective To determine the effect and possible mechanisms of docking protein 3 (DOK3) in temozolomide resistance in glioblastoma. **Methods** Cell counting kit-8 was used to measure the cell viability and the half-inhibitory concentration (IC_{50}) of temozolomide, and the flow cytometry was used to evaluate the cell apoptosis. Western blot was used to detect the expression level of DOK3, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p-PI3K, AKT, and p-AKT proteins. Transwell was used to measure the migration ability of cells, and immunofluorescence was used to measure the nuclear translocation of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B). **Results** The expression level of DOK3 in temozolomide-resistant U251 cells was lower than its parent cells, while the expression levels of MGMT, p-PI3K, and p-AKT were higher than their parent cells. Overexpression of DOK3 reduced the IC_{50} value of temozolomide-resistant cells and accelerated temozolomide-induced cell apoptosis and cell migration inhibition. Meanwhile, overexpression of DOK3 reduced the expression of MGMT, p-PI3K, and p-AKT and inhibited nuclear translocation of NF- κ B. **Conclusion** DOK3 regulates MGMT through the inactivated PI3K/AKT/NF- κ B pathway, leading to drug resistance of glioma cells to temozolomide.

Key words: temozolomide; U251 cell; docking protein 3; glioblastoma; O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase

基金项目: 湖南省卫生健康委科研课题 (No. 202104040560)。

作者简介: 文海韬, 男, 博士研究生, 主治医师, 主要从事小儿神经外科以及小儿神经疾病病理研究, email: haixiao52013@126.com

*通信作者: 吴水华, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事小儿神经外科以及小儿颅内肿瘤和小儿先天畸形的诊断、治疗和研究, email: 292454021@qq.com

胶质母细胞瘤是恶性程度最高的星形细胞瘤, 占脑胶质瘤的一半以上。其中位生存时间仅约 1 年, 5 年生存率不超过 10%^[1]。手术切除肿瘤合并术后替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 辅助化疗是目前治疗胶质瘤的标准治疗方法。但神经胶质瘤易对 TMZ 产生耐药性, 这是导致治疗失败的重要原因^[2]。DNA 修复酶 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶 (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, MGMT) 在恶性胶质瘤中异常表达是 TMZ 耐药的主要原因^[3], 降低恶性胶质瘤中 MGMT 的表达水平, 对增强 TMZ 的化疗敏感性具有重要意义。核转录因子 NF- κ B (nuclear transcription factor- κ B) 是调控 MGMT 基因表达的重要转录因子^[4], 研究发现磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /AKT 可通过 NF- κ B 调节 MGMT 的表达^[5]。

停靠蛋白 3 (docking protein 3, DOK3) 是负调控蛋白酪氨酸激酶的适配蛋白, 其在 B 细胞发育、浆细胞分化、宿主免疫、炎症反应中起重要的调节作用^[6-7]。DOK1^{-/-}-DOK2^{-/-}-DOK3^{-/-}全敲除的小鼠易发生组织细胞肉瘤^[8]。作为蛋白酪氨酸激酶的调节子, DOK3 在 NF- κ B 转录调节中发挥了重要作用^[9], 因此 DOK3 可能在 TMZ 耐药中发挥重要作用。本文研究了 DOK3 在 TMZ 耐药中的作用及机制, 为 TMZ 耐药的机制提供新的实验依据。

1 材料

TMZ (上海阿拉丁生化科技股份有限公司), CCK8 试验 (北京索莱宝科技有限公司), 胎牛血清 (FBS, 浙江天杭生物科技股份有限公司), p-PI3K p85 抗体和 DOK3 抗体 (Affinity Biosciences 公司), MGMT 以及 β -actin 抗体 (武汉博士德生物公司), FITC-Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司), PI3K p85 抗体、p-NF- κ B、DAPI 染色液、蛋白提取试剂盒和蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), AKT 和 p-AKT^{ser} 抗体 (美国 CST 公司), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H + L) 和辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H + L) (北京中杉金桥生物技术有限公司), 结晶紫水溶液 (长沙艾碧维生物科技股份有限公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 酶标仪 (杭州奥盛仪器有限公司), 凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司), 荧光显微镜 IX51 (日本 Olympus 公司)。LV-DOK3-CMV > EGFP/T2A/Puro 质粒 (LOT: 230209LVH602) 和 LV-CMV > EGFP/T2A/Puro 慢病毒质粒 (LOT:

220806LVH601) (赛业生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

U251 细胞株购于中国科学院典型培养物保委员会细胞库, 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

2.2 耐 TMZ 细胞株的构建

将 U251 细胞暴露于 1 μ mol \cdot L⁻¹ TMZ 初始浓度下, 待存活的细胞恢复生长到融合度为 80% 时, 且对该浓度药物不敏感后, 依次将 TMZ 的浓度增加到 5、25、50、100、200 μ mol \cdot L⁻¹, 最后增加到 400 μ mol \cdot L⁻¹。建立的 TMZ 抗性细胞系命名为 U251/TR。

2.3 CCK8 法检测细胞活力以及半数抑制浓度 (IC₅₀) 值

将 U251 细胞以及 U251/TR 以 1 \times 10⁴ 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中, 重复 3 次。分别用不同浓度的 TMZ (0、10、20、40、80、160、320 μ mol \cdot L⁻¹) 处理 72 h。然后加入 10 μ L CCK8 溶液, 于 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养 2 h, 在 450 nm 波长处测定吸光度。

2.4 质粒构建以及转染

将 U251/TR 细胞以 1 \times 10⁴ 个细胞/孔的密度接种。待细胞融合度达到 50% 时, 加入 LV-DOK3-CMV > EGFP/T2A/Puro 质粒以及 LV-CMV > EGFP/T2A/Puro 慢病毒质粒稀释液 (慢病毒稀释液 + 终质量浓度 5 μ g \cdot mL⁻¹ Polybrene)。12 h 后更换细胞培养液, 在荧光显微镜下观察转染情况。

2.5 流式细胞术分析细胞死亡

将 U251/TR 细胞以 1 \times 10⁴ 个细胞/孔的密度接种在 6 孔板中, 分别转染 LV-DOK3-CMV > EGFP/T2A/Puro 以及 LV-CMV > EGFP/T2A/Puro 慢病毒质粒。分别用 TMZ (220 μ mol \cdot L⁻¹) 处理 72 h。收集细胞, 在 4 °C 下以 1000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 重悬于 1 \times 结合缓冲液中, 加入 5 μ L 的 FITC Annexin V 以及 5 μ L 的 PI 染色液, 并在室温孵育 15 min。使用流式细胞仪进行检测, 用 FlowJo 软件对数据进行分析。

2.6 免疫荧光

细胞处理完毕后, 用 4% 的多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后加入 10% 牛血清白蛋白封闭液封闭 30 min, 加入一抗 p-NF- κ B (1 : 100) 4 °C 封闭过夜, 后加入荧光二抗 (1 : 2500) 室温避光孵育 1 h, PBS 清洗后

使用 DAPI 染核 5 min, 清洗后使用荧光显微镜 IX51 观察并拍照。

2.7 Transwell 发测定细胞迁移

在 24 孔板中接种 U251/TR 细胞 (1×10^5 个细胞/孔), 分别转染 LV-DOK3-CMV > EGFP/T2A/Puro 以及 LV-CMV > EGFP/T2A/Puro 质粒后常规条件培养 24 h。将细胞消化后, 加入至 Transwell 小室。12 h 后加入 $220 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TMZ, 常规培养 72 h。取出 Transwell 小室, 用甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, 用棉签擦去微孔膜上层细胞, PBS 清洗两次。在显微镜拍照, 计数。

2.8 Western blot 分析

收集细胞, 加入 $1 \times \text{RIPA}$ 裂解缓冲液 (含 1% 的蛋白酶抑制剂), 冰浴 30 min。 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 测定蛋白质浓度。上清液热变性后通过 10%SDS-PAGE 进行分离。并转移至 $0.45 \mu\text{m}$ 聚偏二氟乙烯膜 (Millipore, 美国 Sigma aldrich 公司)。用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭聚偏二氟乙烯膜 1 h, 分别与抗 MGMT 抗体 (1:500)、p-PI3K p85 抗体 (1:500)、PI3K p85 抗体 (1:500)、DOK3 抗体 (1:500)、AKT 抗体 (1:1000)、p-AKT^{ser} 抗体 (1:500) 或抗 β -actin (1:1000) 抗体在 4°C 下孵育过夜。随后, 用磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 洗涤膜, 并与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗抗体 (1:5000) 在室温下孵育 1 h。PBST 洗涤后, 使用 Bio-Rad 成像仪对膜进行显影。使用 Image J 软件 (美国国立卫生研究院, Bethesda, MD, USA) 进行光密度定量。

2.9 统计分析

实验独立重复 3 次, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 *t* 检验分析, 多组间比较用 SNK 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 DOK3 蛋白在 U251/TR 细胞中的表达降低

经不同浓度的 TMZ 处理亲本 U251 细胞和 U251/TR 细胞 72 h, U251 细胞的细胞活力相比于 U251/TR 细胞明显下降 (见图 1A)。 TMZ 对 U251/TR 细胞的 IC_{50} 值明显高于 U251 细胞 (219.29 ± 6.48 vs 66.75 ± 1.63) (见图 1B)。 U251 细胞用不同浓度的 TMZ ($20, 40, 60, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 72 h, 随着 TMZ 浓度的增加, DOK3 的表达明显下调 (见图 1C 和 1D)。另外, 直接测定了 DOK3 在 U251 和 U251/TR 中的表达, 结果发现 DOK3 蛋白在 U251/TR 细胞中的表达明显低于 U251 细胞 (见图 1E 和 1F)。

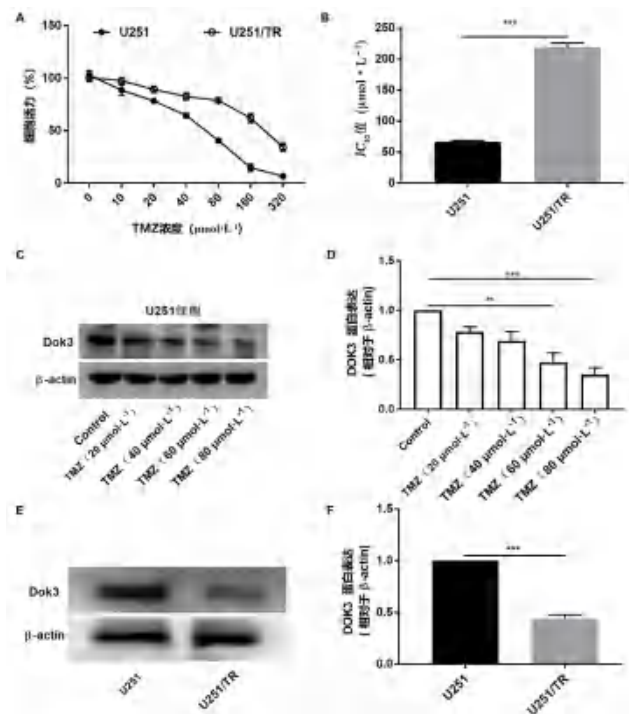


图 1 DOK3 蛋白在 U251/TR 细胞中的表达

Fig 1 Expression of DOK3 protein in U251/TR cells

A. TMZ 对 U251 和 U251/TR 细胞活力的影响 (effect of TMZ on the viability of U251 and U251/TR cells); B. TMZ 对 U251 和 U251/TR 细胞的 IC_{50} 值 (IC_{50} value of TMZ on U251 and U251/TR cells); C. TMZ 对 DOK3 蛋白表达的影响 (effect of TMZ on the expression of DOK3 protein); D. DOK3 蛋白表达统计图 (statistical analysis of DOK3 protein); E. DOK3 蛋白在 U251 和 U251/TR 细胞中的表达 (expression of DOK3 protein in U251 and U251/TR cells); F. DOK3 蛋白表达统计图 (statistical analysis of DOK3 proteins)

注 (Note): ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3.2 DOK3 过表达对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞凋亡的影响

Western blot 结果表明: U251/TR 细胞过表达 DOK3 后, 其蛋白表达量明显高于 LV-Vector 组 (见图 2A)。U251/TR 细胞过表达 DOK3 后用 TMZ 处理细胞, 其 IC_{50} 值明显低于 LV-Vector 组 (见图 2B)。相比于 LV-Vector + TMZ 组, LV-DOK3 + TMZ 组细胞活力明显降低 (见图 2C), 细胞凋亡率明显增加 (见图 2D)。

3.3 DOK3 过表达对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞迁移的影响

U251/TR 细胞过表达 DOK3 后 TMZ ($220 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 72 h, 与 LV-Vector + TMZ 组相比, LV-DOK3 + TMZ 组细胞的迁移数量明显降低 (见图 3)。

3.4 DOK3 过表达对 TMZ 诱导 PI3K/AKT 信号通路的影响

检测 U251 和 U251/TR 细胞中 MGMT、p-PI3K

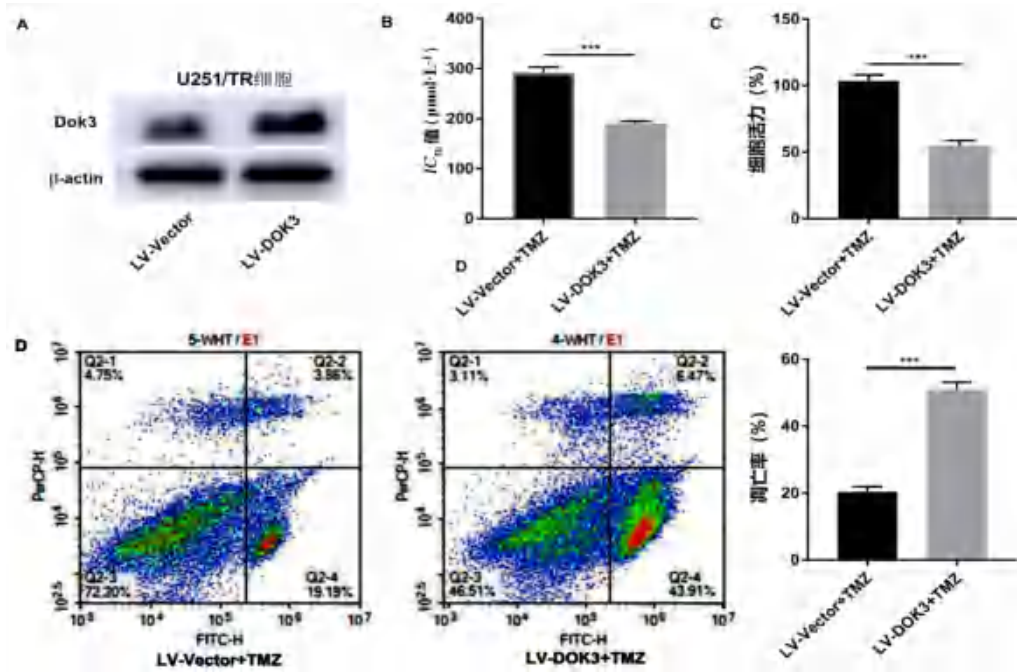


图2 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of overexpression of DOK3 on TMZ-induced apoptosis in U251/TR cells

A. DOK3 的过表达情况 (DOK3 overexpression); B. 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞 IC_{50} 的影响 (effect of overexpression of DOK3 on TMZ-induced IC_{50} in U251/TR cells); C. 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞活力的影响 (effect of overexpression of DOK3 on TMZ-induced U251/TR cell viability); D. 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞凋亡的影响 (effect of overexpression of DOK3 on TMZ-induced apoptosis in U251/TR cells)

注 (Note): 与 LV-Vector + TMZ 组比较, $***P < 0.001$ (Compared with the LV-Vector + TMZ group, $***P < 0.001$).

p85、PI3K p85、AKT、p-AKT^{ser} 蛋白的表达, 结果显示 U251/TR 细胞中 MGMT、p-PI3K p85/PI3K p85、p-AKT^{ser}/AKT 蛋白的表达明显比 U251 细胞增加 (见图 4A)。U251/TR 细胞过表达 DOK3 后 TMZ ($220 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 72 h, 相比于 LV-Vector + TMZ 组, LV-DOK3 + TMZ 组细胞的 MGMT、p-PI3K p85/PI3K p85、p-AKT^{ser}/AKT 蛋白的水平明显降低 (见图 4B)。

3.5 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 NF- κ B 的核转位的影响

免疫荧光染色结果显示, U251/TR 细胞中 p-NF- κ B 的核转位水平明显高于 U251 细胞 (见图 5A)。相比于 LV-Vector + TMZ 组, LV-DOK3 + TMZ 组细胞 p-NF- κ B 的核转位水平明显降低 (见图 5B)。

4 讨论

4.1 TMZ 诱导细胞死亡的机制

脑胶质瘤是最常见的颅内原发性恶性肿瘤, 具有生长迅速和侵袭性强等特点。世界卫生组织在 2007 年将其按恶性程度分为 I ~ IV 级, 包括毛细胞星形细胞瘤 (I 级)、弥漫性星形细胞瘤 (II 级)、间变性星形细胞瘤 (III 级) 以及胶质母细胞瘤 (IV 级)^[10]。TMZ 是临床常用的治疗恶

性胶质瘤的一线化疗药物, 为新型的咪唑类口服二代烷化剂, 其具有口服生物利用度高、易透过血脑屏障、不良反应少等特点^[11-12]。在生理条件下, TMZ 能够自发地转化为有效的抗肿瘤代谢物 3-甲基 (三氮杂烯基) 咪唑 -4-甲酰胺, 继而降解为甲基重氮阳离子, 此阳离子可将 DNA 中鸟嘌呤的 N⁷ 和 O⁶ 以及腺嘌呤的 O³ 位置甲基化, 其中 O⁶ 位的甲基化在 TMZ 抗肿瘤活性中起关键作用^[13]。甲基化的鸟嘌呤不能与胸腺嘧啶结合, 可在细胞 DNA 复制期间诱发错配修复, 导致 DNA 的短链或长链发生断裂, 最终导致细胞死亡^[14]。尽管 TMZ 通常被用作胶质母细胞瘤的标准治疗方法, 但 TMZ 化疗因近 40% 的胶质母细胞瘤患者出现耐药性而受到影响^[15]。目前关于 TMZ 耐药的机制尚未完全明确, 深入研究 TMZ 耐药机制对神经胶质瘤的防治具有重要意义。

4.2 MGMT 介导 TMZ 耐药的机制

DNA 修复酶 MGMT 的表达水平异常是胶质母细胞瘤 TMZ 耐药的重要因素。MGMT 是细胞中维持基因组稳定, 修复 DNA 损伤的一类蛋白质。研究发现 MGMT 可逆转 TMZ 引起的 DNA 甲基化, 修复 DNA, 阻止胶质瘤细胞的凋亡, 从而造成化疗耐药, 直接影响 TMZ 的

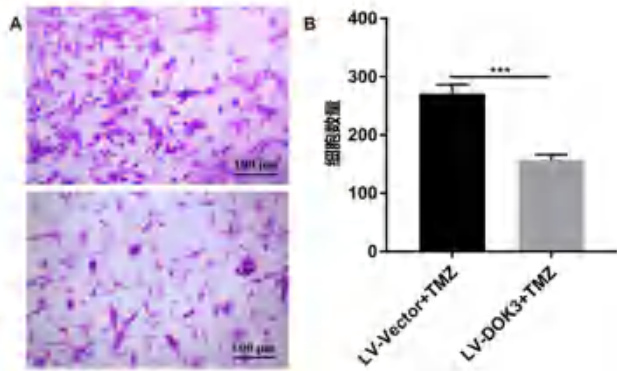


图3 过表达 DOK3 对 U251/TR 细胞的迁移影响
Fig 3 Effect of overexpression of DOK3 on TMZ-induced migration of U251/TR cells

A. 结晶紫染色 (crystal violet staining, $\times 200$); B. 细胞迁移定量分析 (the quantitative analysis for cell migration)

注 (Note): 与 LV-Vector + TMZ 组比较, $***P < 0.001$ (Compared with the LV-Vector + TMZ group, $***P < 0.001$).

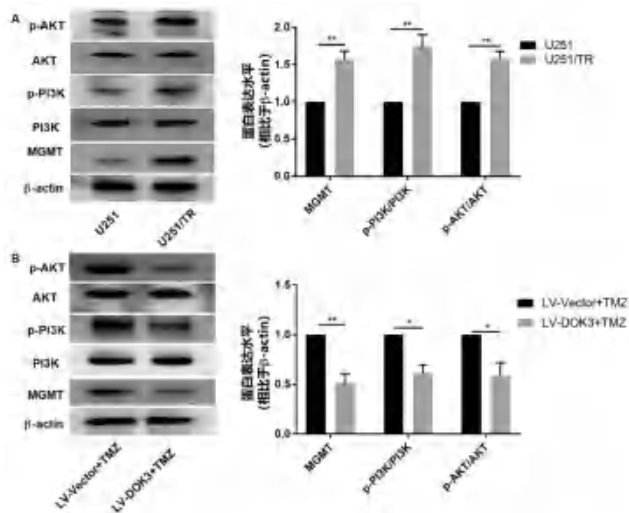


图4 DOK3 过表达对 TMZ 诱导 PI3K/AKT 信号通路的影响
Fig 4 Effect of overexpression of DOK3 on TMZ-induced PI3K/AKT signaling pathway

A. U251 和 U251/TR 细胞中 p-AKT、AKT、p-PI3K、PI3K 以及 MGMT 的表达情况 (expression of p-AKT, AKT, p-PI3K, PI3K, and MGMT in U251 and U251/TR cells); B. 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞中 p-AKT、AKT、p-PI3K、PI3K 以及 MGMT 表达的影响 (effect of overexpression of DOK3 on p-AKT, AKT, p-PI3K, PI3K, and MGMT in TMZ-treated U251/TR cells)

注 (Note): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

抗肿瘤作用^[16]。作为一种细胞 DNA 修复蛋白, MGMT 受到多种因素的调节, 包括转录因子、微小 RNA、组蛋白修饰 (如乙酰化) 以及 MGMT 启动区的甲基化^[17]。在 DNA 修复过程中, 一个 MGMT 分子从鸟嘌呤的 O⁶ 位到其半胱氨酸残基仅不可逆地去除一个烷基。因此, DNA 修复的能力取决于 MGMT 的表达量^[18]。在本研究中, 我们确定 U251/TR 细胞过表达 DOK3 可明显降低

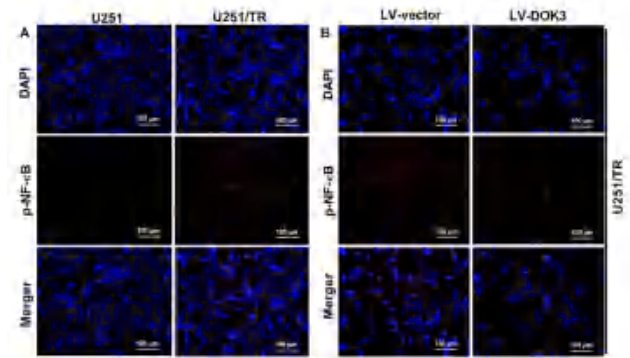


图5 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 p-NF-κB 的核转位的影响 ($\times 200$)
Fig 5 Effect of overexpression of DOK3 on TMZ-induced nuclear translocation of NF-κB ($\times 200$)

A. p-NF-κB 在 U251 和 U251/TR 细胞中的核转位情况 (nuclear translocation of p-NF-κB in U251 and U251/TR cells); B. 过表达 DOK3 对 TMZ 诱导 U251/TR 细胞中 p-NF-κB 核转位的影响 (effect of overexpression of DOK3 on p-NF-κB nuclear translocation induced by TMZ in U251/TR cells)

MGMT 蛋白的表达, 说明 DOK3 蛋白可通过调控 MGMT 的表达量而影响胶质母细胞瘤细胞对 TMZ 的耐药性。事实上细胞实验也证实过表达 DOK3 明显地降低了耐药细胞 U251/TR 对 TMZ 的 IC_{50} 值, 流式细胞术结果也显示过表达 DOK3 明显增加了耐药细胞 U251/TR 的凋亡率。

4.3 DOK3 通过 PI3K/AKT/NF-κB 通路调控 TMZ 耐药

PI3K 蛋白家族参与细胞增殖、分化、凋亡等多种细胞功能的调节^[19]。其中 I 类 PI3K 由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成, 多种生长因子及信号传导复合物可激活受体酪氨酸激酶, 进而活化 PI3K。活化的 PI3K 与细胞内苏氨酸蛋白激酶 AKT 结合导致 AKT 活化^[20]。PI3K/AKT 信号通路在神经胶质瘤发生发展过程中发挥重要作用^[21], 研究表明在 TMZ 耐药细胞株中 PI3K/AKT 信号通路被异常激活^[21], 此信号通路的激活可活化下游的多种信号通路, 促进肿瘤细胞的增殖, 抑制肿瘤细胞的凋亡^[22]。我们的研究也发现, U251/TR 细胞中 p-PI3K 和 p-AKT 的表达明显高于亲本细胞, DOK3 的过表达抑制了 PI3K/AKT 通路的活化, 其他研究也表明 DOK3/Grb2/SHIP1 蛋白模块可被募集到 B 细胞抗原受体并负调节 PI3K 信号的传导^[23]。

核转录因子 NF-κB 是细胞内重要的核转录因子, 它参与机体的炎症反应、免疫应答、增殖与凋亡等过程^[24]。NF-κB 是 PI3K/AKT 通路的下游分子, 活化的 AKT 通过磷酸化作用激活 NF-κB 的转录活性^[25]。NF-κB 被磷酸化后进入细胞核发挥转录功能, 其核转位的水平与其磷酸化水

平有关^[26]。研究发现 NF- κ B 是调控 *MGMT* 基因表达的重要转录因子, 抑制 NF- κ B 的活性下调 *MGMT* 基因的表达, 并且恢复 TMZ 对耐药细胞株的敏感性^[4]。过表达 *DOK3* 消除了 U251/TR 细胞中 p-NF- κ B 的核转位, 说明在 U251/TR 细胞中 *DOK3* 可调控 NF- κ B 信号通路。因此, 我们得出结论, 降低 *DOK3* 的表达, 可通过激活 PI3K/AKT/NF- κ B 途径提高 *MGMT* 蛋白的表达, 增加 TMZ 胶质母细胞瘤细胞对 TMZ 的耐药性。

5 结论

本研究证实, *DOK3* 蛋白在胶质母细胞瘤 TMZ 耐药中发挥重要作用, 其机制可能与调节 PI3K/AKT/NF- κ B/*MGMT* 信号有关。本研究为胶质母细胞瘤 TMZ 耐药机制研究提供了细胞分子水平的数据支持。

参考文献

- [1] Gallego O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma [J]. *Curr Oncol*, 2015, 22 (4): e273-281.
- [2] Krajcser A, Grzywna E, Lewandowska-Łańcucka J. Strategies increasing the effectiveness of temozolomide at various levels of anti-GBL therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115174.
- [3] Liu DL, Yang TR, Ma WB, et al. Clinical strategies to manage adult glioblastoma patients without *MGMT* hypermethylation [J]. *J Cancer*, 2022, 13 (1): 354-363.
- [4] Yu ZY, Chen Y, Wang SQ, et al. Inhibition of NF- κ B results in anti-glioma activity and reduces temozolomide-induced chemoresistance by down-regulating *MGMT* gene expression [J]. *Cancer Lett*, 2018, 428: 77-89.
- [5] Li M, Liang RF, Wang X, et al. BKM120 sensitizes C6 glioma cells to temozolomide via suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B/*MGMT* signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14 (6): 6597-6603.
- [6] Liu N, Tang B, Wei P, et al. TRAF6-mediated degradation of *DOK3* is required for production of IL-6 and TNF α in TLR9 signaling [J]. *Mol Immunol*, 2015, 68 (2 Pt C): 699-705.
- [7] Loh JT, Teo JKH, Lim HH, et al. Emerging roles of downstream of kinase 3 in cell signaling [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 566192.
- [8] Mashima R, Honda K, Yang Y, et al. Mice lacking *Dok-1*, *Dok-2*, and *Dok-3* succumb to aggressive histiocytic sarcoma [J]. *Lab Invest*, 2010, 90 (9): 1357-1364.
- [9] Liu N, Liu XF, Li XO, et al. *DOK3* degradation is required for the development of LPS-induced ARDS in mice [J]. *Curr Gene Ther*, 2016, 16 (4): 256-262.
- [10] Park JE, Kim HS, Park KJ, et al. Pre- and posttreatment glioma: comparison of amide proton transfer imaging with MR spectroscopy for biomarkers of tumor proliferation [J]. *Radiology*, 2016, 278 (2): 514-523.
- [11] Iturrioz-Rodríguez N, Sampron N, Matheu A. Current advances in temozolomide encapsulation for the enhancement of glioblastoma treatment [J]. *Theranostics*, 2023, 13 (9): 2734-2756.
- [12] 孙光强, 薛玉叶, 陆云阳, 等. 重楼皂苷 H 诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡和焦亡的作用研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (5): 973-978.
- [13] Chua J, Nafziger E, Leung D. Evidence-based practice: temozolomide beyond glioblastoma [J]. *Curr Oncol Rep*, 2019, 21 (4): 30.
- [14] Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials [J]. *Cancer Treat Rev*, 1997, 23 (1): 35-61.
- [15] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352 (10): 987-996.
- [16] Yin YC, Zhang LK. Archaeal DNA alkylation repair conducted by DNA glycosylase and methyltransferase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107 (10): 3131-3142.
- [17] Han X, Abdallah MOE, Breuer P, et al. Downregulation of *MGMT* expression by targeted editing of DNA methylation enhances temozolomide sensitivity in glioblastoma [J]. *Neoplasia*, 2023, 44: 100929.
- [18] Hermisson M, Klumpp A, Wick W, et al. O⁶-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells [J]. *J Neurochem*, 2006, 96 (3): 766-776.
- [19] Huang XQ, You L, Nepovimova E, et al. Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and phosphoinositide 3-kinase-related protein kinase family (PIKK) [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2023, 38 (1): 2237209.
- [20] Hanker AB, Kaklamani V, Arteaga CL. Challenges for the clinical development of PI3K inhibitors: strategies to improve their impact in solid tumors [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9 (4): 482-491.
- [21] Sati ISEE, Parhar I. MicroRNAs regulate cell cycle and cell death pathways in glioblastoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (24): 13550.
- [22] Liang JY, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2 (4): 339-345.
- [23] Reth M, Gold MR. What goes up must come down: a tripartite Dok-3/Grb2/SHIP1 inhibitory module limits BCR signaling [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46 (11): 2507-2511.
- [24] Shi PF, Xu J, Cui HJ. The recent research progress of NF- κ B signaling on the proliferation, migration, invasion, immune escape and drug resistance of glioblastoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (12): 10337.
- [25] Ye YL, Yao SQ, Wang RX, et al. PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway regulates behaviors in adolescent female rats following with neonatal maternal deprivation and chronic mild stress [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 362: 199-207.
- [26] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling [J]. *Annu Rev Biophys*, 2013, 42: 443-468.

(收稿日期: 2023-07-04; 修回日期: 2023-10-30)

基于商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉碳源的菌株筛选、分离与功能性评价

唐雷梦媛, 阿呷吕布, 李侯希尔, 吴家慧, 张大川, 杨丽, 王学勇* (北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

摘要: **目的** 筛选、鉴定和功能性评价优势酵解商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉的健康人体肠道菌, 为商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉合生元制剂提供高价值菌种。**方法** 采用商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉改良 BHI 固体培养基, 筛选并鉴定优势酵解肠道菌, 用 DPPH 自由基清除实验和 ABTS 自由基清除实验考察菌株抗氧化能力, 用溶血性实验和药敏实验评价其安全性。**结果** 菌株 1-6 和菌株 S1 能够发酵商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉并显著降低体系 pH 值 ($P < 0.05$), 经鉴定均为蜡样芽孢杆菌。两种菌株无细胞提取上清液对 DPPH 自由基清除率分别 79.63% 和 51.56%, 对 ABTS 自由基清除率分别为 63.79% 和 39.39%。两种菌株均无溶血性且对抗菌药物敏感。**结论** 菌株 1-6 与菌株 S1 具有抗氧化潜力且安全性高, 可作为健康食品市场应用的高价值候选菌株。

关键词: 合生元; 筛选; 抗氧化; 蜡样芽孢杆菌; 商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉

中图分类号: R28

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3204-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.017

Screening, isolation and function of strains based on a commercial type 3 resistant starch from *Canna edulis* carbon source

TANG Lei-meng-yuan, AGA Lyu-bu, LI Hou-xi-er, WU Jia-hui, ZHANG Da-chuan, YANG Li, WANG Xue-yong* (School of Chinese Meteria Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

Abstract: Objective To screen, identify, and evaluate enterobacteria from healthy human dominantly fermented with commercial type 3 resistant starch from *Canna edulis* (CCE) to provide high-value strains for CCE synbiotic preparations. **Methods** CCE was used as a carbon source to modify the brain heart infusion medium to screen strains from human fecal bacteria. The strains were screened and identified. The antioxidant capacity of the strains was examined by DPPH assay and ABTS assay, whose safety was evaluated by hemolytic assay and drug sensitivity assay. **Results** Strain 1-6 and strain S1 were able to ferment CCE and significantly reduced the pH of the fermentation system ($P < 0.05$). Both strains were identified as *Bacillus cereus*. The cell-free culture supernatants of the two strains 1-6 and S1 for DPPH clearance rates were 79.63% and 51.56%, respectively. The ABTS clearance rates were 63.79% and 39.39%, respectively. Both strains were non-hemolytic and all sensitive to antibiotics. **Conclusion** Strains 1-6 and S1 have antioxidant potential with high safety profile and can become probable candidates for health food.

Key words: synbiotics; screening; antioxidant activity; *Bacillus cereus*; type 3 resistant starch from *Canna edulis*

抗性淀粉 (resistant starch, RS) 是一类能够抵抗小肠消化, 到达大肠由肠内微生物发酵, 对健康有益的膳食纤维^[1]。以芭蕉芋块茎作为原料, 制备

得到的芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉, 作为健康食品具有很高的应用价值。据报道, 其能够通过改善宿主-微生物群相互作用改善肥胖和代谢性炎症^[2], 还能

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2020]4Y074 号)。

作者简介: 唐雷梦媛, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药保健功能开发与研究, email: 15276201890@163.com *通信作者: 王学勇, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事民族药新药研发与转化医学研究, email: wxyph.d@163.com

作为功能性膳食纤维发挥抗糖尿病作用^[3], 且已有成熟的食品加工制备工艺。商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉有望作为原料应用于降糖挂面研究^[4], 或作为功能性食品直接应用, 因此, 扩大其应用范围并优化其在人体中的吸收在食品工业中具有重要意义。

抗性淀粉具有益生元作用, 具体表现为能够选择性增加肠内益生菌丰度、降低肠内 pH 值、有助于肠道内短链脂肪酸的产生和调节肠内微生物群平衡^[5]。抗性淀粉能够与益生菌形成共生关系, 通过多种方式使宿主受益^[6]。益生菌被定义为施以足够用量时, 能够为宿主带来健康益处的活微生物^[7]。将益生元和益生菌组合使用, 可作为合生元制剂。合生元能够发挥益生元和益生菌的双重协同作用^[8], 使宿主结肠中微生物群维持更好的平衡, 对宿主健康具有益处^[9]。因此, 筛选能够促进抗性淀粉在肠内酵解, 具有益生活性的菌株, 能够协同增加益生元的作用, 并扩大益生元应用范围。

本研究旨在利用商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉, 从健康人群粪便微生物群中筛选能够优势发酵该底物的菌株, 研究菌株可能存在的健康潜力, 为商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉合生元制剂研究提供候选益生菌并扩大其应用领域。

1 材料

1.1 样品来源

粪便样品: 采集于健康成年男性 [年龄为 20 ~ 23 岁, 体质指数 (BMI) = 23 ~ 25, 3 个月内未服用过抗菌药物、细菌制剂、益生菌等相关产品]; 商用芭蕉芋 RS3 型抗性淀粉 (commercial type 3 resistant starch from *Canna edulis*, CCE) (工业级, 贵州伊利泰生物科技有限公司)。

1.2 培养基

脑心浸液 (BHI) 培养基配方组成 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 胰蛋白胨 10.0 g, 牛心浸粉 17.5 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 磷酸氢二钠 2.5 g。115 °C 高压灭菌 15 min, 调节 pH 至 (7.4 ± 0.2), 固体培养基在此基础上添加琼脂粉 15 g。

参照 Jawan 等^[10]方法改良 BHI 培养基: 使用 CCE 替代 BHI 培养基中葡萄糖, 固体培养基添加琼脂粉后倒平板制备。

1.3 试药与仪器

细菌微量生化鉴定管和血液琼脂基础培养基 (青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 药敏纸片 (湖南比克曼生物科技有限公司); 细菌 DNA 提取试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程股份有限公司); 1, 1-二苯-2-苦基肼 (DPPH) 试剂 (纯度 ≥ 97%,

福州飞净生物科技有限公司); 2, 2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 (ABTS) 试剂 (纯度: ≥ 98%, 北京索莱宝科技有限公司); 厌氧培养箱 HYQX-II (闪谱科技有限公司); T6 系列紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); FE28 台式酸度计 [梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司]。

2 方法与结果

2.1 人源粪菌悬液制备

将新鲜粪便样品置于无菌粪便采集管中, 密封, 迅速转移至厌氧培养箱中。称取 1 g 粪便样品分散于 10 mL 无菌 PBS 缓冲液中, 四层纱布过滤后获得粪菌悬液样品, 3 份样品等体积混合后, 使用 BHI 培养基进行扩增培养, 温度为 37 °C, 厌氧箱气体组成为 5%CO₂、10%H₂、85%N₂。以上过程均严格无菌操作。

2.2 基于 CCE 碳源的菌株筛选

人类肠道内微生物种群种类复杂, 于粪菌悬液中, 添加 1% CCE 作为底物, 厌氧发酵 48 h 以富集酵解 CCE 肠道菌。5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清, 用无菌 PBS 缓冲液重悬后, 梯度稀释 ($1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-5}$), 涂布于改良 BHI 固体培养基上, 改良 BHI 固体培养基与原始培养基在外观上呈现差异, 表面可见白色抗性淀粉成分 (见图 1)。

厌氧培养 48 h 后, 改良 BHI 固体培养基上分离得到单菌 6 株 (分别编号为 1-5、1-6、1-8、1-9、S3、S1), 传代 3 次后接入 BHI 培养基中, 添加 1% CCE 作为底物发酵 24 h。每株菌以相同的条件不添加底物作为空白组, 测定 pH 值。表 1 结果显示, 与空白组相比, 发酵组体系内 pH 值均表现出不同程度下降, 菌株 1-6 与菌株 S1 组的 pH 值差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。发酵体系 pH 值变化能够反映菌株的产酸性能以及对发酵基质的利用程度, 同时能够侧面反映出发酵菌株的耐酸能力^[11-12]。菌株 1-6 与菌株 S1 是酵解 CCE 的优势菌。

表 1 添加 1% CCE 发酵后各菌株发酵组 pH 值变化

Tab 1 pH change of each strain group after adding 1% CCE fermentation

菌株	空白组 pH 值	发酵组 pH 值
1-5	5.22 ± 0.02	5.19 ± 0.02
1-6	5.42 ± 0.02	5.35 ± 0.02**
1-8	5.37 ± 0.04	5.33 ± 0.01
1-9	5.33 ± 0.00	5.32 ± 0.02
S3	5.41 ± 0.01	5.39 ± 0.03
S1	5.48 ± 0.02	5.43 ± 0.02*

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

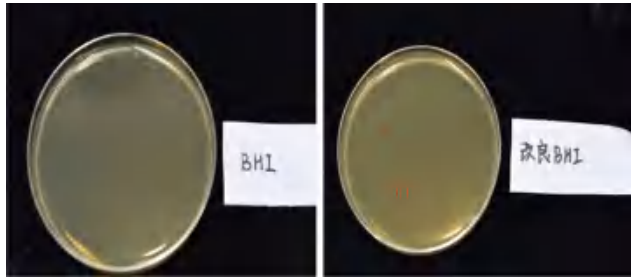


图1 筛选培养基

Fig 1 Medium for screening

2.3 遗传稳定性实验

将菌株 1-6 与菌株 S1 连续传代 8 次后, 添加 1% CCE 作为底物接入 BHI 液体培养基中发酵 24 h。由表 2 可知, 两种菌株仍能稳定酵解 CCE 并产酸。

表 2 菌株 1-6 与菌株 S1 的酵解能力遗传稳定性

Tab 2 Genetic stability of fermentation capacity of strain 1-6 and strain S1

菌株	空白组 pH 值	发酵组 pH 值
1-6	5.48±0.04	5.33±0.02***
S1	5.59±0.05	5.45±0.03**

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

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

2.4 筛选菌株鉴定

2.4.1 形态学鉴定 将菌株 1-6 和菌株 S1 扩增后稀释涂布于 BHI 固体培养基上, 37℃ 厌氧培养 48 h, 并挑取少量菌落参照革兰氏染色试剂盒说明书对细菌进行染色。用显微镜观察结果 (见图 2), 在 BHI 培养基上培养 48 h 后, 菌株 1-6 可观察到大小不一的白色圆形菌落, 表面光滑且有突起。菌株 S1 的菌落为白色, 直径比菌株 1-6 更大 (见图 2A, 2B)。革兰氏染色镜检显示菌株 1-6 和菌株 S1 均为革兰氏阳性。

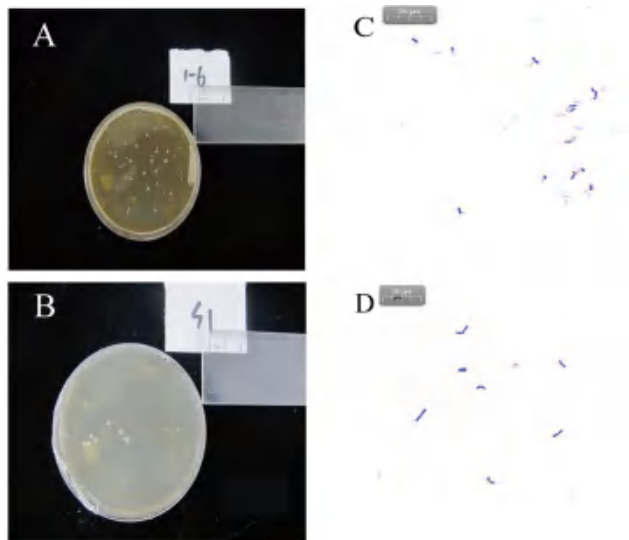


图2 菌株 1-6 与菌株 S1 的形态特征和革兰氏染色镜检

Fig 2 Morphological characteristics and gram staining of strain 1-6 and strain S1

2.4.2 生化鉴定 按照细菌微量生化鉴定试剂管说明书对候选菌株进行七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇、蔗糖、棉子糖、乳糖的微量生化鉴定。结果表明菌株 1-6 与菌株 S1 能分解七叶苷、纤维二糖、麦芽糖和蔗糖, 不分解甘露醇、山梨醇、棉子糖和乳糖 (见表 2)。

表 2 菌株 1-6 与菌株 S1 生化鉴定结果

Tab 2 Biochemical characteristics of strain 1-6 and strain S1

菌株 编号	特征						
	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	山梨醇	蔗糖	棉子糖 乳糖
1-6	+	+	+	-	-	+	- -
S1	+	+	+	-	-	+	- -

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。

Note: “+” means positive; “-” means negative.

2.4.3 分子生物学鉴定 提取菌株基因组 DNA, 用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增 (PCR 扩增体系: 2× pro Taq Master Mix 25 μL, 引物各 1 μL, DNA 模板 20 μL, 双蒸水 3 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 30 s, 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环)。

菌株 1-6 和菌株 S1 的 PCR 扩增产物大小约为 1500 bp。将上海生工测序结果上传至 NCBI 数据库, 序列号分别是 QQ391208 和 QQ391209。在 Genbank 中进行同源性比对, 使用 MEGA 11.0 构建系统发育树 (见图 3)。菌株 1-6 和菌株 S1 与模式菌株 *Bacillus cereus* ATCC 14579T.112 同源性分别是 92% 与 98%, 且处于不同分支上。

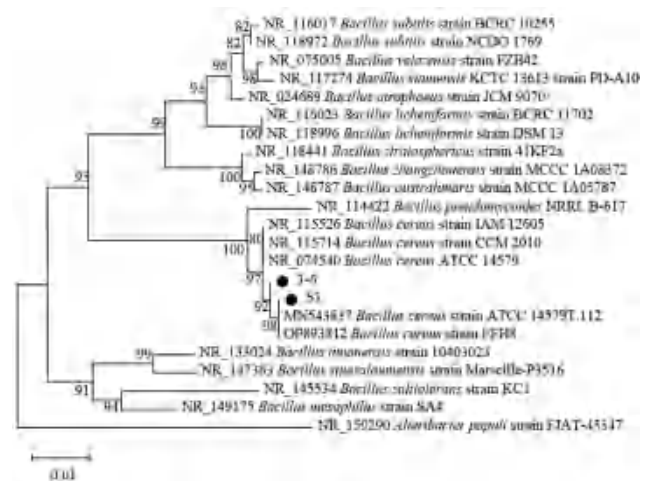


图3 菌株 1-6 与菌株 S1 系统发育进化树

Fig 3 Phylogenetic tree of strain 1-6 and strain S1

结合形态鉴定、生化鉴定和分子生物学鉴定结果, 确定菌株 1-6 与菌株 S1 为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。

2.5 筛选菌株潜在益生活性研究

2.5.1 细菌不同组分制备 在黄玉军等^[13]报道的方法基础上对细菌不同组分进行制备。细菌上清液制备：将菌株 1-6 与菌株 S1 接种于 BHI 培养基中扩增培养，调节细菌计数至 1×10^9 CFU·mL⁻¹，12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min，收集沉淀及上清液。采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤上清液保存于 -80℃ 冰箱中，标记为细菌上清液。沉淀采用等体积无菌水重悬后，一部分冻存于 -80℃ 冰箱中，标记为细菌悬液。一部分用超声冰浴对菌体细胞进行破碎，超声条件为：超声 6 s，间隔 6 s，总工作时长 1 h，标记为细菌破碎液。

2.5.2 DPPH 自由基清除实验 按邹思博等^[14]方法稍作修改。采用无水乙醇溶解 DPPH 粉末，制得 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液。无水乙醇作为参比，在 500 μL 无水乙醇中加入 2.5 mL DPPH 溶液，用紫外分光光度计测定 517 nm 下的吸光

度为 A_d 。2.5 mL 的 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液与 500 μL 细菌的不同组分避光反应 10 min，3000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清液测定吸光度，记为 A_s 。将 500 μL 细菌不同组分样品与 2.5 mL DPPH 溶液混合测定吸光度，记为 A_y 。用以下公式计算细菌清除 DPPH 自由基能力进行评价：

$$\text{DPPH 自由基清除能力} / \% = [A_d - (A_s - A_y) / A_d] \times 100\%$$

如图 4A 所示，菌株 1-6 与菌株 S1 的不同细菌组分对 DPPH 自由基清除能力不同，菌株 1-6 的细菌上清液、细胞悬液和细胞破碎液的 DPPH 自由基清除率分别是 79.63%、31.49% 和 18.09%，菌株 S1 分别是 51.56%、3.81% 和 10.93%。两种菌株的细菌上清液抗氧化能力最强，不同加样体积下 DPPH 自由基清除能力均以浓度依赖性方式增加（见图 4B 和图 4C）。

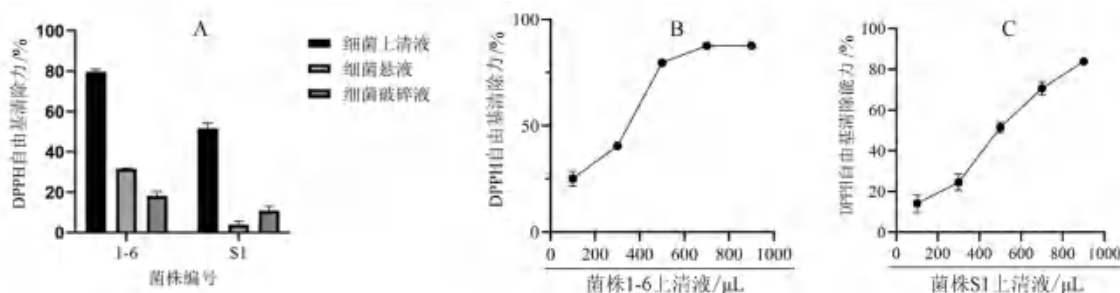


图 4 菌株 1-6 与菌株 S1 对 DPPH 自由基清除率的作用

Fig 4 DPPH free radical scavenging rate of strain 1-6 and strain S1

2.5.3 ABTS 自由基清除实验 按杜妹玲等^[15]方法稍作修改。配制 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 无水乙醇溶液，与等体积 $2.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液混合，避光反应 12 h 后，使用无水乙醇稀释母液至 734 nm 下吸光度为 (0.7 ± 0.02) 。将 30 μL 各细菌组分与 1.97 mL ABTS 稀释液避光反应 30 min 后，在 734 nm 下测吸光度为 A_s 。将 1.97 μL ABTS 稀释液与 50 μL 无水乙醇混合测吸光度为 A_d 。将 1.97 mL 无水乙醇与 50 μL 细菌不同组分混合测吸光度为 A_y 。用以下计算细菌不同组分清除 ABTS 自由基能力：

$$\text{ABTS 阳离子自由基清除能力} / \% = [A_d - (A_s - A_y) / A_d] \times 100\%$$

图 5A 结果表明，菌株 1-6 细菌上清液、细胞悬液和细胞破碎液的 ABTS 自由基清除率分别是 63.79%、1.99% 和 2.57%，菌株 S1 分别是 39.39%、2.42% 和 2.13%。与 DPPH 自由基清除实验一致，两种菌株无细胞培养上清液清除 ABTS 自由基能力最

强，且清除率表现出剂量依赖性（见图 5B 和图 5C）。

2.6 筛选菌株应用安全性研究

2.6.1 溶血性实验 将待测菌株于 BHI 平板上培养过夜后，使用无菌接种环挑取单菌落于血平板中划线。37℃ 厌氧培养 48 h，菌株 1-6 呈灰白色，边缘光滑。菌株 S1 为白色不透明菌落，边界清晰。两种菌株周围没有溶血环出现，不具有溶血性。

2.6.2 药物敏感性实验 采用药敏纸片琼脂扩散法测定细菌对抗菌药物的药物敏感性实验。用无菌 PBS 调节 BHI 液体培养基中菌液至 600 nm 下吸光度为 (0.6 ± 0.02) ，每板取 100 μL 涂布于 BHI 平板上。用无菌一次性医用镊子夹取药敏纸片，放置于平板各个位置，37℃ 倒置培养 24 h。用游标卡尺对药敏纸片的抑菌圈大小进行测量。

菌株 1-6 和菌株 S1 对于不同种类抗菌药物的敏感性表现出差异（见表 4）。菌株 1-6 表现为对四环素敏感，对头孢曲松和环丙沙星中介，对氨苄西林耐药。菌株 S1 表现为对四环素中介，对

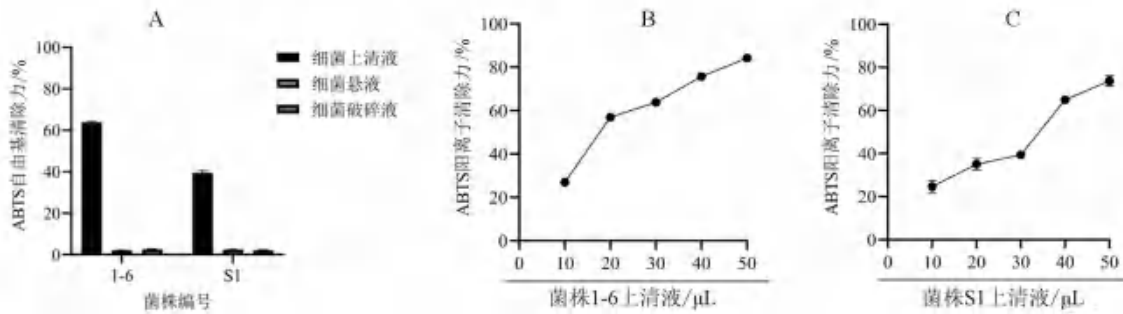


图 5 菌株 1-6 与菌株 S1 对 ABTS 自由基清除率的作用

Fig 5 ABTS free radical scavenging rate of strain 1-6 and strain S1

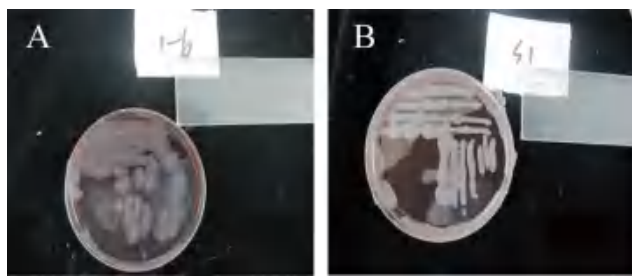


图 6 菌株 1-6 (A) 和菌株 S1 (B) 的溶血性实验

Fig 6 Hemolytic experiments of strain 1-6 (A) and strain S1 (B)

头孢曲松、环丙沙星敏感，对氨苄西林耐药。

表 4 药敏实验结果

Tab 4 Antibiotic susceptibility test results

抗菌药物类型	抗菌药物	菌株 1-6	菌株 S1
四环素类	四环素	S	I
头孢菌素类	头孢曲松	I	S
喹诺酮类	环丙沙星	I	S
β -内酰胺类	氨苄西林	R	R

注 (Note): R 表示菌株耐药 (resistant); I 表示菌株中介 (intermediary); S 表示菌株敏感 (sensitivity)。

2.7 数据处理

如非特殊说明，实验均重复三次，结果描述为 $\bar{x} \pm s$ ，采用 Prism Graphpad 8.0 软件进行数据分析与作图。多组间数据比较使用单因素方差分析 (one way ANOVA)，最终结果采用 Turkey 法再进行多重比较。当 $P < 0.05$ 时，表示差异有统计学意义。

3 讨论

工业生产中，RS 不受加工条件的影响^[16]。RS3 被报道能够在 95 ~ 120 °C 保持其耐酶性^[17]。RS 与益生菌联用具有协同作用。本研究对 BHI 固体培养基进行改良，验证了 CCE 中 RS3 成分可作为培养基中的碳源，筛选具有优势酵解能力的肠道菌。该方法可以进一步开发，以提供更多菌株材料，加速 CCE 合生元制剂的开发。

本研究分离得到菌株 1-6 和菌株 S1，经鉴定均为蜡样芽孢杆菌，是此前未被研究过的菌种，酵解 CCE 产酸能力具有遗传稳定性，两种菌株细菌

上清液中存在的活性成分具有抗氧化作用，能够扩大 CCE 合生元制剂的应用范围。若在体内发挥作用，菌株 1-6 和菌株 S1 需要经过复杂的人体上消化道环境并定植于肠道中。蜡样芽孢杆菌是能够产生芽孢的常见革兰氏阳性菌，具有较强的抗逆性^[18]。人体内进食后胃内 pH 为 4.5 ~ 5.0，十二指肠 pH 为 5.7 ~ 6.4，空肠 pH 为 5.9 ~ 6.8，回肠 pH 为 7.3 ~ 7.7^[19]。菌株 1-6 和菌株 S1 在文中生长发酵 pH 范围分别是 5.33 ~ 7.20、5.43 ~ 7.20，基本涵盖人体上消化道内 pH 值变化范围。胃内有胃蛋白酶，小肠内有 0.2% ~ 0.4% 胆盐，文献报道，蜡样芽孢杆菌的生长期和产生的孢子能够抵抗胃蛋白酶水解与胆盐破坏，在复杂的胃肠道环境中存活^[20]。菌株 1-6 与菌株 S1 对胃蛋白酶和胆盐耐受性需进行深入研究以确定其胃肠内存活率，为食品工业应用提供基础数据。益生性蜡样芽孢杆菌的表面蛋白对其在肠道表面的黏附起着重要作用^[21]。黏附于肠道细胞表面可使肠道内微生物得到补充、抵抗病原菌^[22]。需研究蜡样芽孢杆菌对肠内细胞黏附率，以确定食品添加剂量。

蜡样芽孢杆菌分为有毒型和无毒型两种表型。有毒型菌株可能引发食物中毒^[23]，而无毒型菌株经欧盟委员会批准，可作为动物饲料添加剂，促进动物繁育生长和提高消化系统健康水平^[24]。抗菌药物耐药和敏感性评价是研究益生菌安全性的标准之一，以避免在益生菌使用时出现耐药菌株^[25]。本文对菌株进行安全性评价，结果显示其不具有溶血性和抗菌药物耐药性。初步评价这两种菌株可以安全应用于食品市场，可作为 CCE 合生元制剂候选益生菌株。

参考文献

- [1] Lockyer S, Nugent AP. Health effects of resistant starch [J]. Food Nutr Bull, 2017, 42 (1): 10-41.
- [2] Wu JH, Qiu MY, Zhang C, et al. Type 3 resistant starch

- from *Canna edulis* modulates obesity and obesity-related low-grade systemic inflammation in mice by regulating gut microbiota composition and metabolism [J]. *Food Funct*, 2021, 12 (23): 12098-12114.
- [3] 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.
- [4] 王维. 芭蕉芋抗性淀粉在降糖挂面中的应用 [J]. *现代食品*, 2019 (18): 65-66, 70.
- [5] Tekin T, Dincer E. Effect of resistant starch types as a prebiotic [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107 (2-3): 491-515.
- [6] Palanisamy A, Parimalavalli R. Resistant starch: a functional ingredient in dairy products [J]. *J Food Process Preserv*, 2022, 46 (11): e17126.
- [7] Führen J, Rösch C, Ten Napel M, et al. Synbiotic match-making in *Lactobacillus plantarum*: substrate screening and gene-trait matching to characterize strain-specific carbohydrate utilization [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86 (18): e01081-20.
- [8] 许佳, 张文府, 罗雨. 益生菌、益生元和合生元作为仔猪饲料添加剂的应用研究进展 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2021 (1): 28-31.
- [9] Roberfroid MB. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties [J]. *Br J Nutr*, 1998, 80 (S2): S197-S202.
- [10] Jawan R, Abbasiliasi S, Tan JS, et al. Influence of culture conditions and medium compositions on the production of bacteriocin-like inhibitory substances by *Lactococcus lactis* Gh1 [J]. *Microorganisms*, 2020, 8 (10): 1454.
- [11] Strobel HJ, Russell JB. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria [J]. *J Dairy Sci*, 1986, 69 (11): 2941-2947.
- [12] Bird AR, Brown IL, Topping DL. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health [J]. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2000, 1 (1): 25-37.
- [13] 黄玉军, 刘冬, 赵兰凤, 等. 6 株人源乳酸菌体外抗氧化活性的比较 [J]. *现代食品科技*, 2013, 29 (7): 1673-9078.
- [14] 邹思博, 赵明伟, 纪超凡, 等. 自然发酵东北酸菜中抗氧化乳酸菌的筛选及其益生性研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14 (1): 42-50.
- [15] 杜妹玲, 陈志红, 朱轩池, 等. 响应面和粒子群-人工神经网络模型优化微波辅助提取赤芍总苷工艺 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44 (15): 248-257.
- [16] Aravind N, Sissons M, Fellows CM, et al. Optimisation of resistant starch II and III levels in durum wheat pasta to reduce in vitro digestibility while maintaining processing and sensory characteristics [J]. *Food Chem*, 2013, 136 (2): 1100-1109.
- [17] Liu S, Reimer M, Ai Y. In vitro digestibility of different types of resistant starches under high-temperature cooking conditions [J]. *Food Hydrocoll*, 2020, 107: 105927.
- [18] 胥聆铭, 朱莉, 詹晓北, 等. 蜡样芽孢杆菌高密度发酵条件与过程的优化 [J]. *食品与生物技术学报*, 2023, 42 (8): 46-53.
- [19] Wilson M. Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease [M]. Cambridge CUP, 2005.
- [20] Berthold-Pluta A, Pluta A, Garbowska M. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract [J]. *Microb Pathog*, 2015, 82: 7-14.
- [21] Sánchez B, Arias S, Chaignepain S, et al. Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin [J]. *Microbiology*, 2009, 155 (5): 1708-1716.
- [22] 李焕良, 侯晓彬, 魏雪银, 等. 益生菌添加强化肠内营养支持治疗对 sTBI 患者胃肠耐受性及肠道屏障功能的影响 [J]. *数理医药学杂志*, 2022, 35 (6): 908-910.
- [23] Yang Y, Gu H, Yu XF, et al. Genotypic heterogeneity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* isolates from China [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2017, 364 (1): fnw237.
- [24] Williams LD, Burdock GA, Jiménez G, et al. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. toyoi preparation [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009, 55 (2): 236-246.
- [25] Bujnakova D, Strakova E, Kmet V. In vitro evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves [J]. *Anaerobe*, 2014, 29: 118-127.

(收稿日期: 2023-07-10; 修回日期: 2023-09-05)

复方葛根温敏凝胶的制备与体外评价研究

杨丽娜¹, 万志艳¹, 陶颖¹, 朱卫丰¹, 万鑫浩¹, 郭名鑫¹, 卢燕香^{2*}, 管咏梅^{1*} (1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2. 江西省儿童医院药学部, 南昌 330006)

摘要: **目的** 研究复方葛根温敏凝胶 (TISG of Gegen compound) 的处方与制备工艺, 并进行体外质量评价。**方法** 以泊洛沙姆 (P407、P188) 为凝胶基质处方, 以胶凝温度作为评价指标, 采用 Box-Beheken 法确定复方葛根温敏凝胶的处方和制备工艺, 并对其流变学特性、体外释放等评价。**结果** 复方葛根温敏凝胶的最佳处方为葛根-桂枝提取物 3%、精油微乳 9%、PEG6000 1.54%、P407 20.18%、P188 4.97%, 胶凝温度为 $(32.3 \pm 0.3)^\circ\text{C}$, 24 h 内葛根素和肉桂酸的累计释放量分别为 $(6069.03 \pm 2403.78) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 、 $(229.94 \pm 36.21) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 均符合零级动力学方程。**结论** 精油微乳和提取物复配制备成的温敏凝胶具有控释作用, 能延长药物停留时间, 可为临床治疗项背疼痛的制剂提供参考。

关键词: 复方葛根温敏凝胶; 精油微乳; 流变学性质; 经皮渗透性; 葛根素; 肉桂酸

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3210-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.018

Preparation and in vitro evaluation of temperature-sensitive in situ gel of Gegen compound

YANG Li-na¹, WAN Zhi-yan¹, TAO Ying¹, ZHU Wei-feng¹, WAN Xin-hao¹, GUO Ming-xin¹, LU Yan-xiang^{2*}, GUAN Yong-mei^{1*} (1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Department of Pharmacy, Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006)

Abstract: Objective To determine the formulation and preparation of temperature-sensitive in situ gel (TISG) of Gegen compound and to evaluate its quality. **Methods** Poloxam (P407, P188) was used as the gel matrix prescription, and the gel temperature was used as the evaluation index. The formulation and preparation process of TISG of Gegen compound were determined with Box-Beheken method. The rheological properties and in vitro release of the compound were evaluated. **Results** The optimal TISG of Gegen compound included pueraria-cassia extract 3%, essential oil microemulsion 9%, PEG6000 1.54%, P407 20.18%, and P188 4.97%. The gel temperature was $(32.3 \pm 0.3)^\circ\text{C}$. The cumulative releases of puerarin and cinnamic acid within 24 h were $(6069.03 \pm 2403.78) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ and $(229.94 \pm 36.21) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively, which were consistent with the Zero-order kinetic equation. **Conclusion** The thermosensitive gel prepared with essential oil microemulsion and extract has controlled release effect, which can provide reference for clinical preparations for back pain.

Key words: TISG of Gegen compound; essential oil microemulsion; rheological property; percutaneous permeability; puerarin; cinnamic acid

基金项目: 2021 年度江西省研究生创新专项资金项目 (No.YC2021-S509); 江西中医药大学 2023 年大学生创新创业训练计划项目 (No.X202310412176); 国家重点研发计划重点专项 (No.2017YFC1702905); 江西省高层次高技能领军人才培养工程 (No.12623001)。

作者简介: 杨丽娜, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: 1049482545@qq.com *通信作者: 管咏梅, 女, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: guanym2008@163.com; 卢燕香, 女, 主管药师, 主要从事中药制剂学研究, email: 82453312@qq.com

亚健康状态是新世纪人类医学的重大命题,我国亚健康人群中身体疼痛者发生率高达 56.3%,其中项背部疼痛占较大比重^[1]。临床认为项背疼痛是以颈部肌肉为主的颈椎动力性平衡系统受损期,为颈椎病的前期,是颈性病亚健康状态的最主要表现,在此时期及时纠正可降低颈椎病的发病率^[2]。经皮给药是常用的给药途径之一,近年来,温敏型水凝胶经皮给药在中药学领域的研究越来越多,其以高分子材料(如泊洛沙姆)作为基质,可响应外界温度变化在病变部位发生溶胶-凝胶的相态转变,具有给药方便、可长时间维持血药浓度等优势^[3],可提高患者依从性和药物疗效。因此,开发一款高效、稳定、使用方便,又能缓解项背疼痛的温敏凝胶具有重要意义。

葛根为治疗项背疼痛的要药,常与桂枝联用,中医临床常使用葛根汤、桂枝加葛根汤内服^[4]或打粉外敷^[5]来治疗项背疼痛,方中葛根和桂枝起协同效应发挥主要治疗作用^[6-7]。当疼痛加剧时,常加入川芎、乳香、没药等具有活血化瘀作用的药材^[8]。研究证明葛根中的葛根素具有抗炎镇痛、改善血液流变、松弛肌肉等活性^[9-10]。桂枝中的肉桂酸具有抗氧化、抗炎等活性^[11],川芎、乳香、没药中的精油均具有良好的解痉^[12]、镇痛^[13-14]作用。因此,本研究根据多个葛根、桂枝联用治疗项背疼痛的临床处方,即葛根 12 g、桂枝 6 g、川芎 12 g、乳香 10 g、没药 10 g,其中川芎含油量为 0.6%、乳香含油量为 2.0%、没药含油量为 2.0%,在此基础上拟定了复方葛根的处方为葛根 12 g、桂枝 6 g、川芎精油 0.072 mL、乳香精油 0.2 mL、没药精油 0.2 mL。

目前中药温敏型水凝胶的复配体系多为不同中药的醇提取物间或几种中药精油间的同相复配,不同中药之间的醇提取物与精油复配研究极为少见。因此,本课题组选用精油微乳(川芎精油-乳香精油-没药精油)与葛根-桂枝醇提取物进行复配,研究精油微乳与中药提取物复配制备成温敏凝胶的处方与工艺,并探究温敏凝胶的体外渗透规律,为治疗项背疼痛的中药复方外用制剂的开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

TK-60B 型透皮扩散实验仪(上海锴凯贸易有限公司);Anton Paar Physica MCR101 型流变仪(Anton Paar 厂家);Agilent1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);EM-100CX II 型

透射电镜(JEOL 日本电子);PHS-3C pH 计(雷磁仪电科学仪器);JZNCL-BS140*140 型磁力搅拌器(河南胜博仪器设备有限公司);BS124S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);探针式温度计(YNGDO 公司);EPED 实验室级超纯水器(南京易普易达科技发展有限公司)。

1.2 试药

葛根素、肉桂酸对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为 21061602、PS0094-0100MG,纯度分别为 99.82%、> 98.0%);葛根饮片(批号:210402,产地四川)、桂枝饮片(批号:210402,产地广西)[江中饮片公司,由江西中医药大学葛菲教授鉴定,符合 2020 年版《中国药典》要求]。川芎精油、乳香精油、没药精油(医药级,颇黎芳香医药科技有限公司);聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40,药用级,批号:099599002480,江苏海安石油化工厂),聚乙二醇 6000(PEG6000,药用级,批号:810T032, Solarbio),泊洛沙姆 188、407(P188, P407, 德国 BASF 公司,批号分别为 GNF21021B、GNF21011);乙腈(安徽天地高纯溶剂有限公司,色谱级);磷酸(西陇科学股份有限公司,分析纯)。

1.3 动物

SPF 级 KM 小鼠,雄性,购于江西中医药大学实验动物科技中心,体重(18±2)g,许可证号:SCXK(赣 2018-0003)。所有动物实验遵循江西中医药大学动物实验伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定,符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

前期经正交实验确定葛根-桂枝提取物的制备工艺,即称取葛根 12 g、桂枝 6 g 置于圆底烧瓶中,加入 15 倍量 60% 乙醇溶液,回流提取 3 次,每次 30 min,合并提取液,减压浓缩至 1 g·mL⁻¹后冷冻干燥,得提取物粉末,提取物得率为 21.62%,复方葛根一处方可得提取物 3.89 g。

2.2 精油微乳的制备

前期经伪三元相图法和星点设计效应面(CCD-RSM)法确定了精油微乳处方与制备工艺。油相为复方精油($V_{川芎精油} : V_{乳香精油} : V_{没药精油} = 0.072 \text{ mL} : 0.2 \text{ mL} : 0.2 \text{ mL}$,混匀,总质量为 451 mg);乳化剂为 RH40,助乳化剂为无水乙醇, K_m 值为 2($K_m = \text{乳化剂的质量} / \text{助乳化剂的质量}$),混匀即为乳化剂相。称取 202.2 mg·mL⁻¹ 乳化剂相与 37.3 mg·mL⁻¹ 油相置于烧杯中,磁力搅拌[500 r·min⁻¹、(25±2)℃]10 min 后缓慢滴加蒸馏水,至溶液澄

清不再变化, 即得精油微乳, 粒径和 PDI 平均值分别为 (19.52±0.07) nm、(0.138±0.008)。4℃ 下保存 3 个月测定粒径、PDI 分别为 (20.49±0.26) nm、(0.226±0.004), 无显著性变化, 表明精油微乳稳定性较好。即复方葛根一处方所含的 0.472 mL 精油经滴水法可制备成精油微乳 12.09 mL。

2.3 温敏凝胶的制备

称取 PEG6000、葛根-桂枝提取物溶于处方量的水, 超声溶解后, 缓慢滴入精油微乳中, 磁力搅拌 20 min。在冰浴的条件下加入 P407、P188, 搅拌均匀后置于 4℃ 冰箱溶胀, 静置过夜, 即得。

2.3.1 温敏凝胶胶凝温度的测定 采用“搅拌子法”测定温敏凝胶的胶凝温度, 磁力搅拌转速 200 r·min⁻¹, 升温速率为 1~2℃·min⁻¹, 记录样品完全凝结(不流动)时的温度, 即为胶凝温度, 每个样品平行测定 3 次, 取平均值。本研究设计的复方葛根温敏凝胶为皮肤外用制剂, 因此胶凝温度应高于环境温度 [(25±1)℃], 低于皮肤温度 [(33±0.5)℃], 故将温敏凝胶的最佳胶凝温度设置为 33℃^[15]。

2.3.2 单因素考察^[16-18]

① P407 的用量 (W/W) 对胶凝温度的影响: 固定 P188 为 2%, PEG6000 为 2%, 在冰浴条件下加入 15%~25% 的 P407, 置于 4℃ 冰箱静置过夜, 测定胶凝温度。结果见图 1A, 可知随着 P407 浓度的升高, 胶凝温度降低, 用量为 19%~23% 时, 胶凝温度在 24.0~33.5℃, 需进一步优化。

② P188 的用量 (W/W) 对胶凝温度的影响: 固定 P407 为 20%, PEG6000 为 2%, 在冰浴条件下加入 1%~10% 的 P188, 置于 4℃ 冰箱静置过夜, 测定胶凝温度。结果见图 1B, 可知随着 P188 浓度的增大, 胶凝温度增加, 在用量为 1%~5% 时, 胶凝温度在 24.0~33.5℃, 需进一步优化。

③ PEG6000 的用量 (W/W) 对温敏凝胶的影响: 根据课题组前期研究, 选择 PEG6000 作为葛根-桂枝提取物的凝胶助溶剂^[19], 筛选助溶剂的比例为 1%~5%, 固定 P407 为 20%, P188 为 2%, 冰浴溶解后置于 4℃ 冰箱静置过夜, 测定胶凝温度。结果见图 1C, 可知 PEG6000 用量为 1%~3% 时, 胶凝温度在 24.0~33.5℃, 需进一步优化。

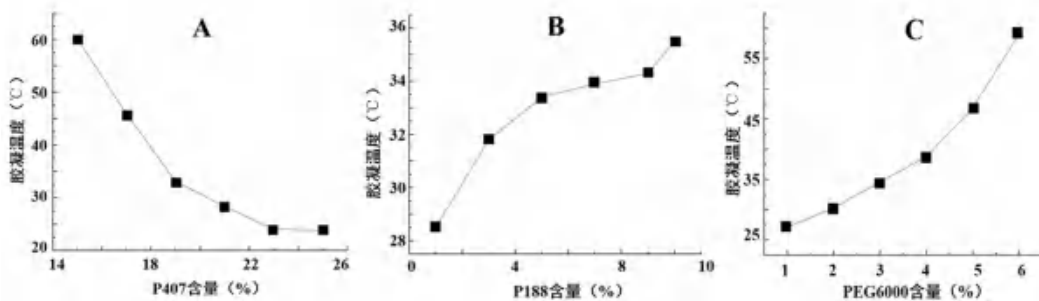


图 1 P407 (A)、P188 (B)、PEG6000 (C) 用量对胶凝温度变化的影响
Fig 1 Influence of dosage of P407 (A), P188 (B) and PEG6000 (C) on gelling temperature

2.3.3 Box-Behnken 法优化处方 采用 Design-expert 8.0 软件, 根据单因素实验结果, 以 P407、P188、PEG6000 用量为影响因素, 胶凝温度 (33℃) 为评价指标, 设计三因素三水平实验, 因素水平表见表 1, 实验结果见表 2, 各项因素回归系数见表 3。

通过二次多项式逐步拟合得到方程: 胶凝温度 = 30.38 - 4.34A + 1.25B + 1.71C + 0.47AB - 1.30AC - 0.67BC + 1.31A² + 0.38B² - 0.34C²。该模型 P < 0.0001, 表明有极显著差异; 方差分析相关系数 R² = 0.9914, 表明该模型预测值与测定值的相关性良好; 失拟项 P = 0.7473 > 0.05, 不具有显著性, 表明方程拟合度和可信度

表 1 因素水平

Tab 1 Level and factor

水平	因素		
	A: P407	B: P188	C: PEG6000
-1	19%	1%	1%
0	21%	3%	2%
1	23%	5%	3%

良好; A、B、C、AC 均具有显著或极显著差异。结果表明各因素之间具有良好的相关性。自变量与响应值的三维图如图 2 所示。胶凝温度是评价温敏凝胶的主要指标, 应接近 33℃, 因此确定最优空白温敏凝胶处方: P407 为 20.18%, P188 为 4.97%、PEG6000 为 1.54%。按最优处方平行制

表 2 Box-Behnken 实验结果 (n = 3)
Tab 2 Box-Behnken experimental (n = 3)

No.	A	B	C	胶凝温度 /℃	No.	A	B	C	胶凝温度 /℃
1	0	-1	1	31.8	10	0	0	0	29.5
2	1	-1	0	25.9	11	1	0	1	27.3
3	-1	-1	0	35.7	12	0	0	0	30.6
4	0	-1	-1	26.6	13	0	0	0	30.3
5	0	1	1	32.9	14	-1	0	1	38.4
6	1	1	0	29.4	15	-1	0	-1	32.8
7	0	1	-1	30.4	16	0	0	0	30.4
8	-1	1	0	37.3	17	0	0	0	31.1
9	1	0	-1	26.9	-	-	-	-	-

表 3 各项因素回归系数

Tab 3 Regression coefficient and variance analysis of each factor

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	204.31	9	22.70	89.50	< 0.0001	A ²	7.23	1	7.23	28.49	0.0011
A	150.51	1	150.51	593.4	< 0.0001	B ²	0.62	1	0.62	2.46	0.1607
B	12.50	1	12.50	49.28	0.0002	C ²	0.49	1	0.49	1.92	0.2085
C	23.46	1	23.46	92.50	< 0.0001	残差	1.76	7	0.25		
AB	0.90	1	0.90	3.56	0.1012	失拟项	0.43	3	0.14	0.42	0.7473
AC	6.76	1	6.76	26.65	0.0013	纯误差	1.35	4	0.34		
BC	1.82	1	1.82	7.19	0.0315	总离差	206.08	16			

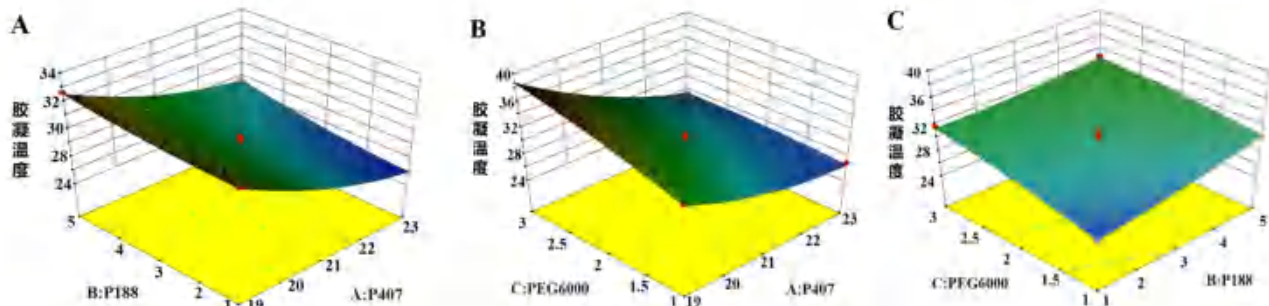


图 2 自变量与响应值的三维图

Fig 2 Three-dimensional plot of the argument and response values

A. P188 与 P407 用量对胶凝温度的影响 (influence of dosage of P188 and P407 on gelling temperature); B. P407 与 PEG6000 用量对胶凝温度的影响 (influence of dosage of P407 and PEG6000 on gelling temperature); C. P188 与 PEG6000 对胶凝温度的影响 (influence of P188 and PEG6000 on gelling temperature)

油微乳量为 9%，葛根桂枝提取物量为 3%。

2.3.5 复方葛根温敏凝胶处方验证 制备 20 g 复方葛根温敏凝胶。称取 PEG6000 0.31 g、葛根-桂枝提取物 0.60 g、蒸馏水 12.26 g 置于烧杯中超声溶解后，缓慢滴入复方精油微乳 1.8 g 中，磁力搅拌 20 min，在冰浴的条件下加入 P407 4.04 g、P188 0.99 g，搅拌均匀后置于 4℃ 冰箱溶胀，静置过夜，即得。平行制备 3 批，测定平均胶凝温度为 (32.3±0.3)℃，胶凝时间为 (60.7±0.8) s，表明处方可行。

2.4 温敏凝胶的质量评价

备 3 批空白温敏凝胶处方，测得平均胶凝温度为 (32.9±0.4)℃，与预测值 33℃ 接近 (相对偏差为 0.19%)，表明制备方法可行，工艺稳定可靠。

2.3.4 温敏凝胶载药量考察 前期研究确定复方葛根一处方可得精油微乳 12.09 mL (约为 12 g)、提取物 3.89 g，因此应按照精油微乳：葛根-桂枝提取物≈3：1 的比例进行载药量考察。根据预实验结果从提取物 1%~10% 开始考察，载入空白温敏凝胶后测定其胶凝温度，结果见表 4。选择对空白温敏凝胶温度影响最小且温度在 (33±0.5)℃ 范围内载药量最大的处方，即载精

2.4.1 外观与离心稳定性评价 如图 3 所示，室温下，复方葛根温敏凝胶为外观均一分散的溶液，流动性较好，加热至 32.5℃ 时呈现胶凝状态，有弹性，黏性较强；测定 pH 值为 (5.9±0.3)，符合经皮制剂 pH 值要求。取本品适量置于离心管中，于 3000 r·min⁻¹ 离心 30 min，未出现分层现象，稳定性较好。

2.4.2 扫描电镜观察微观形态 将复方葛根温敏凝胶制成冻干粉，取适量凝胶粉末，喷金，加速电压 3.01 V，采用场发射扫描电镜 (SEM) 观察，结果见图 4，样品为三维网状结构，符合水凝胶特征。

表 4 复方葛根温敏凝胶处方考察结果 (n = 3)

Tab 4 Prescription of TISG of Gegen compound (n = 3)

编号	微乳 /%	提取物 /%	P188 /%	P407 /%	PEG6000 /%	水 /%	胶凝温度 /℃	现象
1	3	1	4.97	20.18	1.54	69.31	32.5	基质完全溶胀, 浅棕色, 均一, 澄清
2	6	2	4.97	20.18	1.54	65.31	33.0	基质完全溶胀, 浅棕色, 均一, 澄清
3	9	3	4.97	20.18	1.54	61.31	32.5	基质完全溶胀, 浅棕色, 均一, 澄清
4	12	4	4.97	20.18	1.54	57.31	30.1	基质完全溶胀, 棕色, 均一, 澄清
5	15	5	4.97	20.18	1.54	53.31	29.4	基质完全溶胀, 棕色, 均一, 有少量沉淀
6	18	6	4.97	20.18	1.54	49.31	27.1	基质完全溶胀, 棕色, 均一, 有沉淀
7	21	7	4.97	20.18	1.54	45.31	24.3	基质大部分溶胀, 棕色, 有沉淀
8	24	8	4.97	20.18	1.54	41.31	—	基质未完全溶胀, 有沉淀
9	27	9	4.97	20.18	1.54	37.31	—	基质未完全溶胀, 有沉淀
10	30	10	4.97	20.18	1.54	33.31	—	基质未完全溶胀, 有沉淀



图 3 复方葛根温敏凝胶的外观

Fig 3 Exterior of TISG of Gegen compound

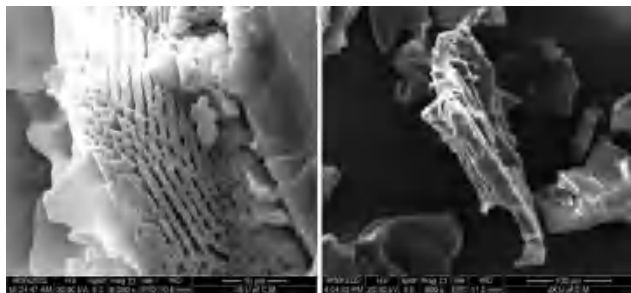


图 4 复方葛根温敏凝胶电镜图

Fig 4 Electron microscopic view of TISG of Gegen compound

2.4.3 流变学特性评价 使用 Anton Paar Physica MCR101 型流变仪, 取适量复方葛根温敏凝胶置于 PP50 不锈钢平行板 (直径 50 mm), 设置测试间隙参数为 1 mm, 温度为 (33 ± 0.5) °C (相变温度测试除外)。

① 黏弹性测定: 设置仪器振幅扫描参数, 应变 (γ) 为 0.01% ~ 100%, 频率为 10 r · s⁻¹, 测定样品的黏弹区 (LVR), 样品在形变过程中因弹性形变而储存的能量为储能模量 (G'), 因黏性形变而以热的形式损耗的能量为损耗模量 (G'')。结果见图 5, 当 $\gamma < 1\%$ 时, $G' > G''$, 表明样品内部结构弹性大于黏性, 表现出凝胶结构; 当 $\gamma > 1\%$ 时, G' 开始下降, 表明凝胶结构开始被破坏; 当 $G' = G''$ 时, 凝胶结构完全被破

坏; $G' < G''$ 时, 黏性占主体, 表现出流体性质。因此所有的动态振荡实验都需控制 γ 在 1% 以内。

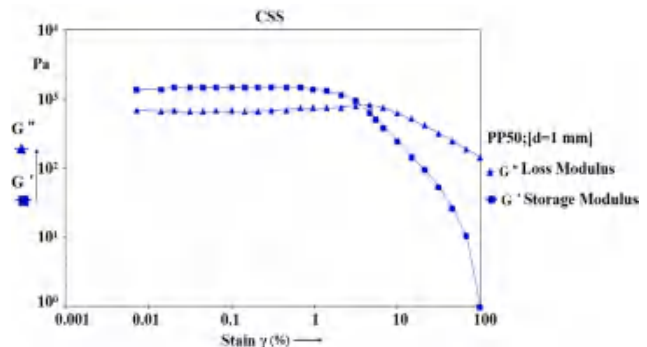


图 5 复方温敏凝胶凝胶的黏弹区测定结果

Fig 5 LVR test of TISG of the Gegen compound

② 相变温度测定: 设置振荡模式参数, 频率为 1 Hz, γ 为 1%, 加热速率为 2 °C · min⁻¹, 温度范围为 4 ~ 50 °C, 测定其溶胶 - 凝胶转变温度。结果见图 6, 在 30 °C 左右 G' 和 G'' 相交进行相变, 交点为相变发生温度, 在此温度前样品表现出明显的流体性质, 相变温度后逐渐 $G' > G''$, 说明凝胶结构正在形成, 在 32 °C 左右时 G' 和 G'' 趋于平缓, 表明凝胶黏弹性趋于稳定, 形成稳定的凝胶状态。

③ 频率扫描: 振荡模式下设置参数, γ 为 1%, 频率扫描范围为 0.1 ~ 10 Hz, 结果见图 7, 在 0.1 ~ 10 Hz 内, G' 曲线始终高于 G'' 曲线, 表现出明显的弹性特性, 未出现显著的频率依赖性, 表明复方葛根温敏凝胶内部结构稳定。

2.5 温敏凝胶离体经皮渗透性研究

2.5.1 葛根素、肉桂酸经皮渗透的 HPLC 方法学建立^[20]

① HPLC 条件: 5C18-MS-IIC18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 12 ~

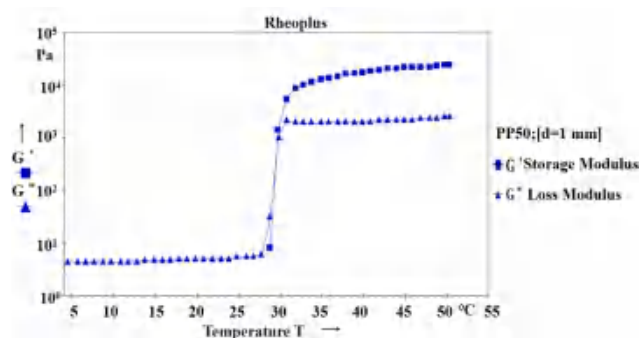


图 6 复方葛根温敏凝胶的相变温度测定结果
Fig 6 Phase transition temperature measurement of TISG of Gegen compound

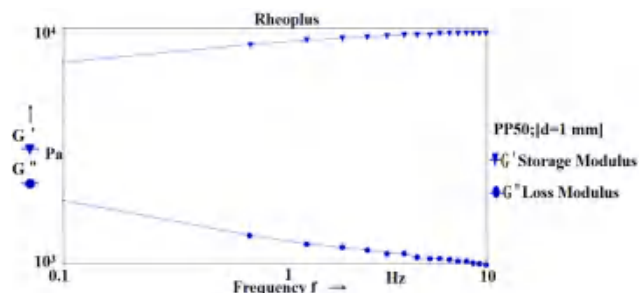


图 7 复方葛根温敏凝胶的频率扫描结果
Fig 7 Requency scan of TISG of Gegen compound

14%A; 10 ~ 15 min, 14% ~ 46%A; 15 ~ 21 min, 46%A; 21 ~ 25 min, 46% ~ 12%A); 检测波长为 254 nm (葛根素), 275 nm (肉桂酸), 柱温为 30 °C, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 进样量为 20 μL。

② 对照品溶液的制备: 精密称取葛根素、肉桂酸对照品置于 25 mL 量瓶中, 用 60% 甲醇溶解定容, 摇匀, 得含葛根素 180.40 μg · mL⁻¹、肉桂酸 3.30 μg · mL⁻¹ 的混合对照品储备液。

③ 专属性考察: 将混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液进样检测, 记录色谱图, 如图 8 (275 nm 下) 所示, 各峰之间无干扰、基线平稳, 表明该方法专属性良好。

④ 标准曲线的建立: 将混合对照品储备液逐级稀释, 进样检测, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 样品质量浓度 (C) 为横坐标, 得葛根素的线性方程为 $A = 68.005C - 7.9129$ ($r = 1.000$), 在 0.088 ~ 18.400 μg · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好; 肉桂酸的线性方程为 $A = 155.57C + 3.3753$ ($r = 0.9998$), 在 0.052 ~ 3.300 μg · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好。

⑤ 方法学考察: 取混合对照品溶液, 平行测定 6 次, 记录峰面积, 计算葛根素和肉桂酸峰面积的 RSD 值分别为 0.30%、0.41%, 表明仪器的精密度良好。取同浓度供试品溶液 6 份, 进样测定, 记录峰

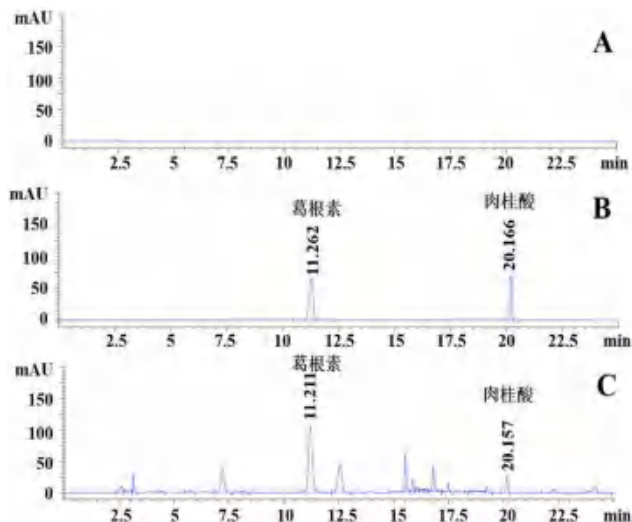


图 8 接收液 HPLC 图
Fig 8 HPLC diagram of receiving solution
A. 空白接收液 (blank receiving solution); B. 混合对照品 (mixed standard); C. 透皮接收液 (transdermal receiving solution)

面积, 计算葛根素和肉桂酸峰面积的 RSD 值分别为 1.1%、0.56%, 表明方法重复性良好。取 24 h 时的透皮接收液于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样检测, 记录峰面积, 计算葛根素和肉桂酸峰面积的 RSD 值分别为 0.23%、0.42%, 表明样品在 24 h 内稳定性好。精密吸取同一样品 6 h 的透皮接收液 0.5 mL, 精密加入含葛根素 19.70 μg · mL⁻¹ 和肉桂酸 0.97 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液 0.5 mL, 置于 1 mL 量瓶中, 涡旋 10 min, 平行 6 份, 进样检测, 记录峰面积, 计算葛根素和肉桂酸的加样回收率分别为 100.11%、103.09%, RSD 值分别为 0.22%、0.30%, 符合加样回收率要求。

2.5.2 离体鼠皮的制备^[21] 小鼠麻醉后, 剃毛机除去腹部毛发, 剪下腹部皮肤, 生理盐水洗去皮下脂肪及组织, 滤纸吸干水分, 用锡箔纸包好, 置于 -20 °C 环境下保存, 备用。

2.5.3 样品的制备

① 复方葛根温敏凝胶: 按“2.3.4”项下方法制备。

② 提取物温敏凝胶: 精密称取 PEG6000 (1.54%)、提取物 (3%) 溶于处方量的水 (70.31%), 在冰浴的条件下缓慢加入 P407 (20.18%)、P188 (4.97%), 搅拌溶解后置于 4 °C 冰箱溶胀, 静置过夜, 即得。

③ 微乳溶液: 精密称取 PEG6000 (1.54%)、提取物 (3%) 溶于处方量的水 (86.46%), 超声溶解后, 缓慢滴加进处方量的微乳 (9%) 中, 磁力搅拌 20 min, 即得。

2.5.4 体外透皮实验^[21-22] 将完整鼠皮平铺于有搅拌子的改良 Franz 扩散池上,表皮层朝供给池,真皮层朝接收池,接收池注入 30% 乙醇生理盐水接收液后密封,置于透皮实验仪中,设置参数温度为 (37±0.5) °C、转速为 400 r·min⁻¹,平衡 30 min。分别精密吸取 1 mL 的复方葛根温敏凝胶、提取物温敏凝胶、微乳溶液加入供给池并密封,于 4、6、8、10、12、24 h 从接收池中取样 1 mL,并及时补充 1 mL 接收液 (37 °C 水浴储存),按“2.5.1”项下 HPLC 条件测葛根素与肉桂酸的峰面积。

2.5.5 累计渗透量 (Q_n) 将各取样点的峰面积代入标准曲线求出葛根素和肉桂酸浓度,按下式计算各点累计渗透量 (Q_n):

$$Q_n = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i V_i)) / A$$

其中, Q_n 代表第 n 个时间点药物单位面积累计透过量, C_n 表示第 n 个时间点测得的药物质量浓度, V 为接收池体积 ($V = 13.97$ mL), C_i 表示第 i 个时间点接收液中葛根素和肉桂酸的质量浓度, V_i 为每次取样体积 ($V_i = 1$ mL), A 表示有

效透皮面积 ($A = 1.13$ cm²)。

按照公式计算 3 种样品中葛根素与肉桂酸 24 h 的累计透过量,可知复方葛根温敏凝胶、提取物温敏凝胶、微乳溶液中葛根素 Q_{24} 分别为 (6069.0338±2403.7781) μg·cm⁻²、(285.5946±159.1431) μg·cm⁻²、(9664.7991±1840.1219) μg·cm⁻²,肉桂酸 Q_{24} 分别为 (229.9358±36.2103) μg·cm⁻²、(71.1290±28.6685) μg·cm⁻²、(593.5455±36.5916) μg·cm⁻²。以时间 t 为横坐标,累计渗透量 (Q_n) 为纵坐标,进行方程模拟,线性回归斜率为稳态透皮速率 (J_s),以方程拟合时相关系数 R^2 最大为最好的拟合结果,结果见表 5、表 6 及图 9。研究表明 3 种样品中葛根素与肉桂酸的释药均符合零级方程。其中,复方葛根温敏凝胶、提取物温敏凝胶、微乳溶液中葛根素 J_s 分别为 315.68 μg/(cm²·h)、14.78 μg/(cm²·h)、502.30 μg/(cm²·h),肉桂酸 J_s 分别为 11.88 μg/(cm²·h)、3.68 μg/(cm²·h)、30.49 μg/(cm²·h)。

表 5 葛根素的累计渗透量 - 时间拟合方程 ($n = 4$)

Tab 5 Cumulative permeation-time fitting equation of puerarin ($n = 4$)

样品	模型	方程	拟合结果	拟合优度 (R^2)
复方葛根温敏凝胶	零级动力学	$Q_n = Q_0 + kt$	$Q_n = 315.68t - 1492.75$	0.9712
	一级动力学	$\lg Q_n = kt$	$Q_n = 0.081t - 2.070$	0.7381
	Higuchi 模型	$Q_n = kt^{1/2}$	$Q_n = 2199.77t^{1/2} - 5019.34$	0.9374
	Ritger-peppas 模型	$\ln Q_n = k \ln t$	$Q_n = 35.45t^{1.62}$	0.9532
提取物温敏凝胶	零级动力学	$Q_n = Q_0 + kt$	$Q_n = 14.78t - 67.15$	0.9683
	一级动力学	$\lg Q_n = kt$	$Q_n = 0.08t + 0.83$	0.7525
	Higuchi 模型	$Q_n = kt^{1/2}$	$Q_n = 103.16t^{1/2} - 232.80$	0.9386
	Ritger-peppas 模型	$\ln Q_n = k \ln t$	$Q_n = 1.95t^{1.58}$	0.9488
微乳溶液	零级动力学	$Q_n = Q_0 + kt$	$Q_n = 502.30t - 2340.18$	0.9691
	一级动力学	$\lg Q_n = kt$	$Q_n = 0.08t + 2.30$	0.7415
	Higuchi 模型	$Q_n = kt^{1/2}$	$Q_n = 3503.84t^{1/2} - 7962.92$	0.9378
	Ritger-peppas 模型	$\ln Q_n = k \ln t$	$Q_n = 60.54t^{1.60}$	0.9496

表 6 肉桂酸的累计渗透量 - 时间拟合方程 ($n = 4$)

Tab 6 Cumulative permeation-time fitting equation of cinnamic acid ($n = 4$)

样品	模型	方程	拟合结果	拟合优度 (R^2)
复方葛根温敏凝胶	零级动力学	$Q_n = Q_0 + kt$	$Q_n = 11.88t - 52.60$	0.9663
	一级动力学	$\lg Q_n = kt$	$Q_n = 0.08t + 0.76$	0.7411
	Higuchi 模型	$Q_n = kt^{1/2}$	$Q_n = 83.09t^{1/2} - 186.27$	0.9411
	Ritger-peppas 模型	$\ln Q_n = k \ln t$	$Q_n = 1.75t^{1.54}$	0.9443
提取物温敏凝胶	零级动力学	$Q_n = Q_0 + kt$	$Q_n = 3.68t - 16.68$	0.9681
	一级动力学	$\lg Q_n = kt$	$Q_n = 0.07t + 0.23$	0.7451
	Higuchi 模型	$Q_n = kt^{1/2}$	$Q_n = 25.71t^{1/2} - 57.98$	0.9393
	Ritger-peppas 模型	$\ln Q_n = k \ln t$	$Q_n = 0.49t^{1.57}$	0.9480
微乳溶液	零级动力学	$Q_n = Q_0 + kt$	$Q_n = 30.49t - 131.05$	0.9650
	一级动力学	$\lg Q_n = kt$	$Q_n = 0.07t + 1.24$	0.7517
	Higuchi 模型	$Q_n = kt^{1/2}$	$Q_n = 213.34t^{1/2} - 474.35$	0.9407
	Ritger-peppas 模型	$\ln Q_n = k \ln t - b$	$Q_n = 4.90t^{1.51}$	0.9441

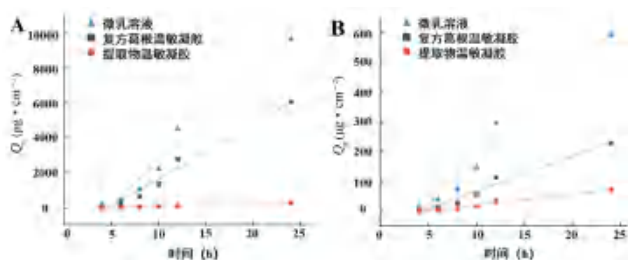


图9 3种样品中葛根素(A)、肉桂酸(B)的累计透过量
Fig 9 Cumulative transmittance of puerarin (A) and cinnamic acid (B) in 3 samples

复方葛根温敏凝胶中葛根素和肉桂酸的 Q_{24} 为提取物温敏凝胶的 21.25 倍和 3.23 倍, 微乳溶液中葛根素和肉桂酸的 Q_{24} 为复方葛根温敏凝胶的 1.59 倍和 2.58 倍, 微乳溶液中葛根素和肉桂酸的 Q_{24} 为提取物温敏凝胶的 33.84 倍和 8.34 倍。复方葛根温敏凝胶中葛根素和肉桂酸的 J_s 为提取物温敏凝胶的 21.36 倍和 3.23 倍, 微乳溶液中葛根素和肉桂酸的 J_s 为复方葛根温敏凝胶的 1.59 倍和 2.57 倍, 微乳溶液中葛根素和肉桂酸的 J_s 为提取物温敏凝胶的 33.99 倍和 8.29 倍。表明复方精油微乳对葛根素和肉桂酸均具有一定的促透效果, 同时将精油微乳载入温敏凝胶基质后可改善其作为经皮给药载体黏附性差、皮肤涂抹相差、滞留时间短等问题^[23], 且制备成复方葛根温敏凝胶后葛根素和肉桂酸仍具有较好的渗透性。

3 讨论

随着中药外用制剂的不断发展,“内病外治”已成为今后研究发展的方向之一, 温敏凝胶剂是目前中药外用制剂研究较为深入的外用剂型之一, 可使药物剂型随温度的变化由液态转化为凝胶状态, 具有作用时间长, 避免首过效应等特点, 尤其适合作各种中药提取物的给药载体^[24]。课题组研究发现乳香精油、没药精油可通过提高人永生角质形成细胞 HaCaT 的细胞膜流动性促进药物透膜入胞, 表现出类似氮酮的作用方式^[25]。葛根为治疗肩颈疼痛的要药, 但是其有效成分葛根素是异黄酮结构, 水溶性和脂溶性都较差, 生物利用度低, 限制了其更广泛的应用。精油比提取物含有更多的小分子, 能够高效透皮吸收, 两者复配后精油也可促进提取物的吸收, 增强两者的功效^[26]。因此本课题考虑以处方中所含精油来加强葛根与桂枝中有效成分的渗入, 经预实验选择将精油制备成微乳剂型来提高其稳定性^[27]。同时, 微乳作为亲脂性药物与亲水性药物载体, 具有能提高载药能力, 促进药物透皮吸收

的作用。

本实验采用泊洛沙姆为基质, 以人体平均皮肤温度 33℃ 为评价指标, 通过 Box-Behnken 法优化出空白处方, 将葛根-桂枝提取物与精油微乳负载于温敏凝胶基质中, 制备方法简单, 可直接涂抹于疼痛部位, 达到延长药物停留时间的目的。同时, 从凝胶黏弹区、相变温度、频率扫描对复方葛根温敏凝胶微观结构的流变学特性进行了研究, 表明其具有较高的稳定性^[28]。采用 Franz 扩散池法对复方葛根温敏凝胶的体外释放规律进行了研究, 样品中葛根素和肉桂酸的释放均符合零级方程, 具有较好的累积渗透量, 且能明显加快药物渗透速率^[29]。且通过对比可知复方精油微乳对葛根-桂枝提取物有促透作用, 提示精油微乳有利于水溶性与油溶性较差葛根素的渗透, 可为中药新剂型与新技术提供参考。

参考文献

- [1] 宋红梅, 陈少清, 王心城, 等. 中医干预项背疼痛亚健康状态临床研究现状 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22 (4): 444-446.
- [2] 王诗忠, 宋红梅, 陈少清, 等. 中医干预项背疼痛亚健康状态的多中心随机对照研究 [J]. 福建中医药大学学报, 2010, 20 (6): 3-6.
- [3] 张冬英. 儿茶酚功能化壳聚糖/牡蛎肽温敏水凝胶的制备及其性能研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
- [4] 莫兴骝, 郑衍庆. 桂枝加葛根汤加减联合针刺治疗神经根型颈椎病患者临床效果研究 [J]. 中外医学研究, 2022, 6 (20): 128-130.
- [5] 蓝蔚娴. 葛根汤加减穴位贴敷治疗风寒阻络型儿童非创伤性寰枢关节半脱位的临床疗效观察 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [6] 李扬, 张志文, 黎邦直, 等. 桂枝加葛根汤对颈椎病模型兔纤维环细胞凋亡和炎症因子的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2021, 23 (5): 13-16.
- [7] 陈会滨, 樊炜骏, 匡尧, 等. 桂枝加葛根汤对神经根型颈椎病大鼠的作用和镇痛机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (9): 1102-1106.
- [8] 李康. 葛根汤及其加减治疗神经根型颈椎病疗效的 meta 分析 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [9] 赖胜敏. 葛根素对神经根型颈椎病 PI3K/AKT 信号通路的影响 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [10] 崔瑞, 王培民. 葛根治疗项痹古今研究概述 [J]. 山东中医杂志, 2021, 40 (5): 538-542.
- [11] 赵柏涵. 桂枝中肉桂醛和肉桂酸的提取优化以及复合银纳米制剂制备及抑菌活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- [12] 顾轶娜, 朱钰, 平其能. 川芎挥发油自微乳化软胶囊的制备及处方工艺筛选 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29 (4): 257-259.

- [13] 赵丽辉, 赵子樟, 李佳响, 等. 乳香、没药活性成分 KTDA、FSA 及其配伍的抗炎镇痛作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33 (11): 1460-1465.
- [14] 朱小芳, 罗晶, 管咏梅, 等. 乳香没药挥发油对川芎体外透皮吸收的影响及其皮肤血流促透机制研究[J]. 中国中医杂志, 2017, 42 (4): 680-685.
- [15] 徐科, 吴赞杰, 李金洋, 等. 复方紫草温敏凝胶的制备与质量评价[J]. 四川农业大学学报, 2021, 39 (6): 791-798.
- [16] 魏玉辉, 张建萍, 段好刚, 等. 苦豆子总碱温敏凝胶的制备及体外评价[J]. 中成药, 2015, 37 (10): 2318-2320.
- [17] 黄德浩, 王涛, 邓红, 等. 苦茶妇科凝胶的工艺研究及流变学参数考察[J]. 中草药, 2019, 50 (1): 76-82.
- [18] 孙晓, 宁洪鑫, 侯文彬, 等. 阴道用中药原位凝胶的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53 (11): 3564-3572.
- [19] 朱卫丰, 刘水婷, 王万春, 等. 黄白温敏型原位凝胶的处方筛选与评价[J]. 中草药, 2021, 52 (7): 1914-1923.
- [20] 万鑫浩, 朱卫丰, 杨丽娜, 等. 经典名方桂枝加葛根汤的基准样品量值传递分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (9): 2430-2439.
- [21] 管咏梅, 杨丽娜, 胡育森, 等. 雷公藤甲素二元醇质体的制备及评价[J]. 中南药学, 2022, 20 (2): 271-277.
- [22] 管咏梅, 胡育森, 刘佳, 等. 混合组挥发油纳米乳的处方筛选与体外透皮性能研究[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51 (11): 1410-1417.
- [23] 葛敏, 彭佳蓓, 乐加薇, 等. 利多卡因微乳凝胶剂的制备及体外透皮特性[J]. 中国临床药学杂志, 2015, 24 (6): 339-342.
- [24] 郭嘉俊. 芍药温敏凝胶的制备及抗骨关节炎初步药效学考察[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [25] 高玲, 黄诗雨, 陈丽华, 等. 乳香、没药挥发油促九分散方中生物碱类成分的 HaCaT 细胞摄取及其机制研究[J]. 中草药, 2021, 52 (8): 2357-2364.
- [26] 吴颖, 刘晴, 唐文, 等. 丹参挥发油与蒲公英提取物复配物在化妆品中的应用[J]. 精细化工, 2022, 39 (3): 562-568.
- [27] 曾照亿, 刘佳, 肖芳, 等. 挥发油 3 种加入方式对止痛凝胶贴膏剂基质及体外释放度的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (15): 20-25.
- [28] 王英舟, 余瑞锋, 肖晶晶, 等. 黄芩苷微乳凝胶的稳定性和流变学考察[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39 (15): 1967-1973.
- [29] 张超, 韩丽, 张定堃, 等. 经皮给药系统促透方法及其联用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (7): 231-235.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-07-26)

小檗碱和鱼腥草素钠离子对化合物体外抗菌活性评价

马旭东^{1, 2}, 陈四开², 刘湘琼³, 肖捷¹, 李玟¹, 余巍^{2*}, 徐广宇^{4*} (1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 解放军联勤保障部队第920医院药剂科, 昆明 650032; 3. 解放军联勤保障部队第920医院老年医学科, 昆明 650032; 4. 湖南师范大学化学化工学院, 长沙 410006)

摘要: 目的 研究鱼腥草素、新鱼腥草素经碳链修饰并与盐酸小檗碱离子配对后的 6 种离子对化合物的体外抗菌活性。**方法** 采用琼脂打孔扩散法测定化合物对标准菌的抑菌圈大小; 二倍稀释法测定化合物和抗菌药物对标准菌及临床分离耐药菌株的最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC、MFC); 微量稀释棋盘法测定化合物与抗菌药物联用的部分抑菌浓度指数 (FICI), 评价其与抗菌药物联用的效果。**结果** 己酰乙醛亚硫酸氢钠、庚酰乙醛亚硫酸氢钠、癸酰乙醛亚硫酸氢钠小檗碱离子对化合物显示出比对照品化合物更显著的抗菌活性, 但抗菌活性弱于临床常用抗菌药物; 合成的离子对化合物对实验所用临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的活性比临床常用抗菌药物更好; 联合抑菌实验表明离子对化合物与抗菌药物之间的协同作用较弱。实验中离子对化合物在抗菌药物中的添加多数情况降低了测试抗菌药物对病原菌的 MIC 值。**结论** 合成的离子对化合物对 MRSA 有很好的抗微生物活性, 其在临床上的应用具有潜在价值。

关键词: 鱼腥草素钠; 盐酸小檗碱; 离子对化合物; 抗菌活性; 协同作用

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3218-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.019

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.21967019); 解放军联勤保障部队第 920 医院院管基金项目 (No.2019YGB22); 云南贵金属实验室开放基金 (No.YPML-2023050271)。

作者简介: 马旭东, 男, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: maxdonge@163.com *通信作者: 余巍, 男, 硕士研究生导师, 主管药师, 主要从事病原微生物及临床药学方面的研究, email: allienyu@163.com; 徐广宇, 男, 教授, 主要从事药物合成及药物工艺方面的研究, email: gyxu@hunnu.edu.cn

Antimicrobial activity evaluation on ion-pair compounds of berberine and sodium houttuynate in vitro

MA Xu-dong^{1, 2}, CHEN Si-kai², LIU Xiang-qiong³, XIAO Jie¹, LI Wen¹, YU Wei^{2*}, XU Guang-yu^{4*}
(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. Department of Pharmacy, 920th Hospital of Joint Logistic Support Force, Kunming 650032; 3. Department of Geriatrics, 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Kunming 650032; 4. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410006)

Abstract: Objective To determine the antimicrobial activity in vitro of six ion-pair compounds synthesized by carbon chain modification of houttuynia and neohouttuynia and pairing with berberine hydrochloride ions. **Methods** The diameter of inhibition zone of compounds against standard microbes was determined by AGAR diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum fungicidal concentration (MFC) of compounds and antibiotics against standard microbes and clinical isolates were determined by double dilution method. The fractional inhibitory concentration index (FICI) of the compounds combined with antibiotics was determined by microdilution checkerboard. **Results** The ion-pair compounds of hexanoyl, heptanoyl and decanoyl acetaldehyde sodium bisulfite showed more significant antimicrobial activity than the control compounds, but the antimicrobial activity was weaker than that of commonly used clinical antibiotics. The activity of synthesized ion-pair compounds against the clinical isolation of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was better than that of commonly used clinical antibiotics. The combined antimicrobial experiments showed weak synergistic effect between ion-pair compounds and antibiotics. Addition of ion-pair compounds to antibiotics in most cases reduced the MIC value of tested antibiotics against pathogens. **Conclusion** Synthesized ion-pair compounds have good antimicrobial activity against MRSA, and potential value in clinical application.

Key words: sodium houttuynate; berberine hydrochloride; ion-pair compound; antimicrobial activity; synergistic effect

随着各种抗菌药物的广泛使用和不合理应用,耐药菌不断出现,细菌耐药机制越来越复杂,研发一些安全有效且对细菌和真菌有抑制作用的新型化合物极其重要。小檗碱,也称黄连素,是从毛茛科黄连属植物黄连(*Coptis chinensis* Franch.)根茎中提取的异喹啉生物碱,属于季铵类化合物,有价格低廉、安全性高、效果显著等特点^[1]。近年来研究发现,小檗碱具有抗病原微生物、抗炎、抗肿瘤、降血糖、调血脂等药理作用^[2]。小檗碱对各种微生物具有不同程度的抑制作用,但一般效果较弱,而对痢疾杆菌有较好的作用,一直被临床用于抗胃肠炎、腹痛和腹泻。但小檗碱水溶性差,口服较难吸收,且具有一定的心肌毒性,因此其在临床上的应用受到了限制^[3-4]。鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb)为三白草科蕺菜属植物蕺菜的干燥地上部

和新鲜全草,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗菌、免疫调节等作用^[5]。鱼腥草素钠是鱼腥草的主要有效成分,是临床常用药物鱼腥草注射液的主要成分,具有消肿、抗化脓感染的功效,主治呼吸道感染及皮肤化脓感染。1952年有人在水蒸气蒸馏法所得鱼腥草精油中发现了一种有抗菌活性的物质,被确定为癸酰乙醛。癸酰乙醛不溶于水,不稳定,常常需要被转化为有一定水溶性,且稳定的加成物才能使用。1971年国内用人工方法合成了癸酰乙醛亚硫酸氢钠,被称为合成鱼腥草素,其对多种细菌引起的感染有效,广泛应用于临床^[6]。本研究通过将鱼腥草素结构进行修饰,然后与小檗碱离子配对形成一系列不同碳链长度的化合物,分别探究了其在单独使用情况下对标准菌、临床分离耐药菌的抗菌效果。现有的抗菌药物有着不同的作

用机制,合理的联合用药可以产生协同作用,减少耐药性的产生,本研究同时将合成的离子对化合物与临床常用抗菌药物进行了联合,旨在发现合成化合物是否能增加常用抗菌药物的临床抗菌治疗效果,减少单一抗菌药物使用的剂量和药物毒性。

1 材料

1.1 实验菌株

金黄色葡萄球菌 (*S. aureus* ATCC25923)、大肠埃希菌 (*E. coli* ATCC25922)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa* ATCC27853)、白假丝酵母菌 (*C. albicans* ATCCY0109)(中国食品药品检定研究院)。临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*MRSA* 181、183、184、187),临床分离白假丝酵母菌 (*C. albicans* 20、819、953),由解放军联勤保障部队第 920 医院药剂科临床微生物实验室依据《全国临床检验操作规程》及常规细菌分离鉴定方法,从本院呼吸科临床重症感染患者痰标本中分离、鉴定、培养而来。

1.2 试药与仪器

Mueller-Hinton 琼脂培养基(批号:20150906,规格:250 g)、Mueller-Hinton 肉汤培养基(批号:20151225,规格:250 g)、沙氏琼脂培养基(批号:20170213,规格:250 g)、液体沙氏培养基(批号:20170435,规格:250 g)(青岛高科园海博生物技术有限公司);注射用硫酸阿米卡星(amikacin, AK, 江苏吴中医药集团有限公司,批号:411211);注射用头孢唑林钠(kefzol, KZ, 哈药集团制药总厂,批号:B111130807);注射用头孢他啶(ceftazidime, CAZ, 广州白云山天心制药股份有限公司,批号:120356);注射用盐酸万古霉素(vancomycin, VA, 批号:113140102)、注射用替考拉宁(teicoplanin, TEC, 批号:131003)(浙江医药股份有限公司新昌制药厂);氟康唑注射液(fluconazole, FLU, 辉瑞,批号:A388403);注射用两性霉素 B(amphotericin B, AmB, 华北制药股份有限公司,批号:1BFLC20301);盐酸特比萘芬[terbinafine, TER, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,产品编号:Sigma-Aldrich-PHR1298];酮康唑[ketoconazole, KET, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,产品编号:Sigma-k1003];伊曲康唑[itraconazole, ICZ, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,产品编号:Sigma-Aldrich-Y0001100];丙二醇(风船化学试剂科技有限公司);氯化钠(上海化学试剂总厂);二甲基亚砜(DMSO, 利安隆博华医药有限责任公司);合成的丁酰乙醛、戊酰乙醛、己酰乙醛、庚酰乙醛、癸酰乙醛、十二酰乙醛亚硫酸氢钠小檗碱离子

对化合物由湖南师范大学化学化工学院徐广宇教授合成并提供,结构均已鉴定,下文依次表示为化合物 1~6;鱼腥草素钠、新鱼腥草素钠、盐酸小檗碱,下文依次表示为化合物 7~9。手提式压力蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备有限责任公司, DGS-280B 型),CHA-213 电子显微镜(日本 OLYMPUS),超净化工作台(苏州净化设备厂, SW-CJ-2FD 型),微量加样器(德国 Eppendor 公司),96 孔微量培养板(德国 Greiner bio-one 股份有限公司),XW-80A 漩涡混合器(上海精科实业有限责任公司),冷藏柜(青岛海尔股份有限公司),FA1004 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

分别称取化合物 1~9 20 mg 用 5% 丙二醇溶解,配制成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,再将化合物母液稀释为 $2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用,用于琼脂打孔扩散法;用无菌生理盐水配制 $1024 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗菌药物母液,用于测定最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC、MFC);将化合物和抗菌药物母液稀释为各倍数的 MIC,用于测定部分抑菌浓度指数(FICI)。

2.2 菌悬液的制备

取少量活化菌落转移至无菌试管,无菌生理盐水进行稀释,校正浓度为 0.5 麦氏比浊标准,相当于 $1.5 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,用于测定抑菌圈;调整菌悬液浓度为 $1.0 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用于测定 MIC 及 MBC;调整菌悬液浓度为 $5.5 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用于测定 FICI。真菌配制成浓度为 $1.0 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液用于测定抑菌圈,进一步稀释为 $1.0 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用于测定 MIC 及 MFC。

2.3 鱼腥草素钠及离子对化合物的合成

原料鱼腥草素(侧链 $\text{R} = \text{C}_9\text{H}_{19}$)和新鱼腥草素(侧链 $\text{R} = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$)分别与亚硫酸氢钠作用制成鱼腥草素钠和新鱼腥草素钠,后将其水溶液或 50%~70% 乙醇溶液加入盐酸小檗碱的水溶液中,冷却放置,过滤,洗涤,干燥得黄色固体,即癸酰乙醛亚硫酸氢钠小檗碱离子对化合物和十二酰乙醛亚硫酸氢钠小檗碱离子对化合物;以戊酮、己酮、庚酮、辛酮为原料先后与甲酸甲酯、亚硫酸氢钠反应合成丁酰乙醛、戊酰乙醛、己酰乙醛、庚酰乙醛的亚硫酸氢钠加成物,后分别与盐酸小檗碱水溶液离子反应制得丁酰乙醛亚硫酸氢钠小檗碱离子对化合物、戊酰乙醛亚硫酸氢钠小檗碱离子对化合物、己酰乙醛亚硫酸氢钠小檗碱离子对化合物、庚酰乙

醛亚硫酸氢钠小檗碱离子对化合物。

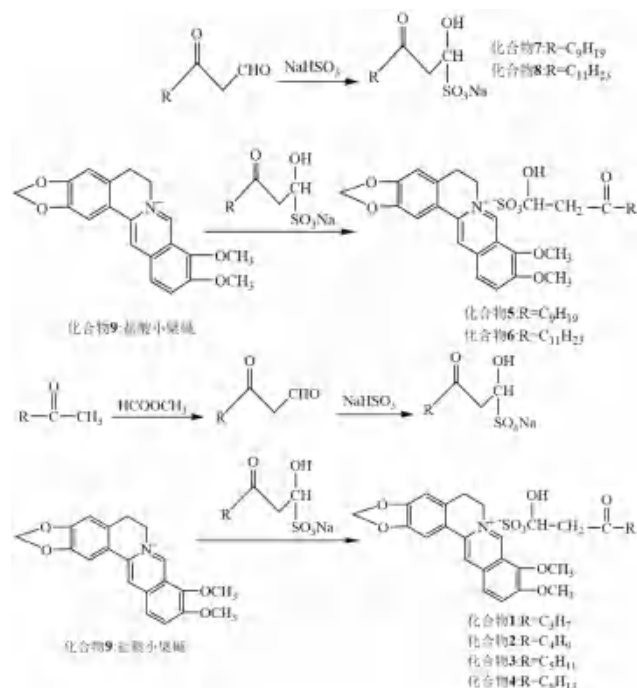


图 1 离子对化合物的合成途径

Fig 1 Synthesis pathways of ion-pair compounds

2.4 抑菌圈的测定

对化合物 1~9 进行药敏实验。制作培养基平板，在超净工作台中用孔径为 6 mm 的无菌玻璃管在培养基上均匀打孔，后将浓度分别为 1.5×10^8 cfu · mL⁻¹ 的细菌悬液、 1.0×10^6 cfu · mL⁻¹ 的真菌悬液涂布于 Mueller-Hinton 琼脂培养基和沙氏琼脂培养基。微量加样器吸取 20 mg · mL⁻¹ 的药液，分别加入不同的孔中，每孔 50 μL。取其中一孔为溶媒对照孔，只加 5% 丙二醇。最后将培养基平板置于 35 °C 恒温箱中培养 18~24 h。以《药理实验方法学》抗菌药物实验法中的平皿打孔法为判定标准^[7]：当抑菌圈直径 < 10 mm 时，表示抑菌作用弱或无抑菌作用；当直径为 10 mm 时，表示轻度敏感；当直径为 11~15 mm 时，表示中度敏感；当直径 > 16 mm 时，表示高度敏感。

从抑菌圈大小可以看出，对于 4 个标准菌，除化合物 8 对 *P. aeruginosa* ATCC27853 无活性，其余化合物均有活性。对白假丝酵母菌 *C. albicans* ATCCY0109 除化合物 8 无抑菌圈出现，其余具有活性（化合物 8 对实验所选菌种均表现为无活性或活性很弱）。离子对化合物 3~5 (R = C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₉H₁₉) 对所有菌种活性明显高于对照品，详细结果见图 2~5。

2.5 MIC 和 MBC 的测定

无菌 96 孔微量培养板，每排的第 1 孔加入



图 2 化合物 1~9 对 *S. aureus* ATCC25923 的抑菌圈测定结果 (10 代表 5% 丙二醇)

Fig 2 Inhibition zone of compounds 1~9 against *S. aureus* ATCC25923 (10 represents 5% propylene glycol)



图 3 化合物 1~9 对 *E. coli* ATCC25922 的抑菌圈测定结果 (10 代表 5% 丙二醇)

Fig 3 Inhibition zone of compounds 1~9 against *E. coli* ATCC25922 (10 represents 5% propylene glycol)

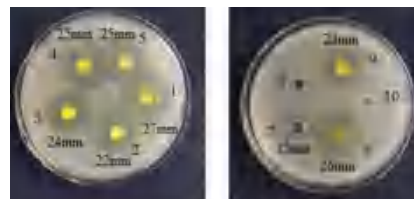


图 4 化合物 1~9 对 *P. aeruginosa* ATCC27853 的抑菌圈测定结果 (10 代表 5% 丙二醇)

Fig 4 Inhibition zone of compounds 1~9 against *P. aeruginosa* ATCC27853 (10 represents 5% propylene glycol)

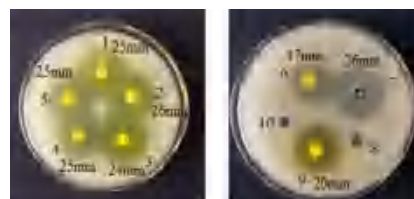


图 5 化合物 1~9 对 *C. albicans* ATCCY0109 的抑菌圈测定结果 (10 代表 5% 丙二醇)

Fig 5 Inhibition zone of compounds 1~9 against *C. albicans* ATCCY0109 (10 represents 5% propylene glycol)

Mueller-Hinton 肉汤培养基或液体沙氏培养基 200 μL 作为阴性对照，第 2~12 孔各加入 100 μL Mueller-Hinton 肉汤培养基或液体沙氏培养基，向每排的第 2 孔加入质量浓度为 2000 μg · mL⁻¹ 的化合物和 1024 μg · mL⁻¹ 的抗菌药物各 100 μL，移液管吹吸混匀后吸取 100 μL 加至第 3 孔中，以此类推进行倍比稀释至第 11 孔，混匀后弃去 100 μL，第 12 孔不做处理，为阳性对照。最后于第 2~12 孔分别加入细菌悬液或真菌悬液 100 μL，培养板置于 35 °C 恒温箱中培养 18~24 h。培养液清晰透亮的最低浓度孔中的药物浓度为 MIC，取 96 孔微量培

养板中的菌液 (MIC 值前 3 ~ 6 孔) 转种于 Mueller-Hinton 琼脂培养基或沙氏琼脂培养基, 置于 35 °C 恒温箱中培养 18 ~ 24 h。活菌计数法检查琼脂平板上的菌落, 平均数小于 5 个的最小浓度即为此药的 MBC^[8]。所有实验测定 3 个复孔, 平行测定 3 次, *S. aureus* ATCC25923 作为每次实验的质控菌株。

从 MIC 测定值来看, 合成化合物及对照品

对标准菌抗菌活性均弱于临床常用抗菌药物, 与文献报道的小檗碱和鱼腥草素钠对各种微生物具有不同程度的抑制作用, 但一般效果较弱相吻合。离子对化合物 3、4、5 (R = C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₉H₁₉) 抗菌活性虽然比对照品有所提高, 但整体活性不如抗菌药物, 结果见表 1、2。

表 1 抗菌药物对标准菌的 MIC、MBC 和 MFC (μg · mL⁻¹)
Tab 1 MIC, MBC and MFC of antibiotics against standard bacteria (μg · mL⁻¹)

抗菌药物	<i>S. aureus</i> ATCC25923		<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853		<i>C. albicans</i> ATCCY0109	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
KZ	0.488	0.977	1.953	3.906	> 62.500	> 62.500	—	—
CAZ	15.625	31.250	0.122	0.244	0.488	0.488	—	—
VA	0.488	0.488	62.500	125.000	> 62.500	> 62.500	—	—
TEC	0.122	0.244	> 62.500	> 62.500	> 62.500	> 62.500	—	—
AK	0.488	0.977	0.977	0.977	0.244	0.244	—	—
FLU	—	—	—	—	—	—	7.813	15.625

注 (Note): “—” 表示未测 (“—” means no detection)。

表 2 化合物对标准菌的 MIC、MBC 和 MFC (μg · mL⁻¹)
Tab 2 MIC, MBC and MFC of compounds against standard bacteria (μg · mL⁻¹)

化合物	<i>S. aureus</i> ATCC25923		<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853		<i>C. albicans</i> ATCCY0109	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
1	15.625	62.500	15.625	62.500	31.250	62.500	31.250	31.250
2	15.625	31.250	62.500	62.500	62.500	62.500	31.250	62.500
3	7.813	31.250	62.500	62.500	62.500	125.000	31.250	31.250
4	15.625	125.000	62.500	62.500	125.000	125.000	15.625	15.625
5	31.250	62.500	15.625	250.000	62.500	62.500	15.625	15.625
6	62.500	250.000	62.500	250.000	62.500	62.500	31.250	31.250
7	62.500	125.000	62.500	125.000	62.500	125.000	7.813	7.813
8	62.500	250.000	62.500	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000
9	31.250	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000	62.500	62.500

选取从我院呼吸科重症病房患者口痰分离的 4 株 MRSA 菌株和 3 株耐药白假丝酵母菌作为受试菌株。从表 3、4 结果来看, 所选用的抗菌药物对于 4 株 MRSA, 除 AK 对 *MRSA183*、*MRSA184*、*MRSA187* 有一定抗菌活性, 其余都呈耐药状态。抑菌圈结果显示, 3 株耐药白假丝酵母菌对 FLU、KET、TER、AmB、ICZ 呈现中

度敏感或高度敏感。*C. albicans20* 对 TER 和 KET 呈现耐药。化合物 1 ~ 9 对 MRSA 的抗菌活性较所用抗菌药物明显。而对耐药白假丝酵母菌的抗菌活性弱于所用抗菌药物 FLU。从表 3、5、6 实验结果来看, 临床常用抗菌药物 TEC、CAZ、VA 对 4 株 MRSA 的活性明显弱于小檗碱、鱼腥草素钠和合成的离子对化合物。

表 3 抗菌药物对 MRSA 的 MIC、MBC (μg · mL⁻¹)
Tab 3 MIC and MBC of antibiotics against MRSA (μg · mL⁻¹)

抗菌药物	<i>MRSA181</i>		<i>MRSA183</i>		<i>MRSA184</i>		<i>MRSA187</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
TEC	256	256	512	> 512	512	512	256	256
AK	256	256	32	32	64	64	32	64
KZ	512	512	256	512	256	512	128	256
CAZ	1024	> 1024	512	1024	1024	1024	256	512
VA	256	256	512	> 512	512	512	256	256

表 4 抗菌药物对白假丝酵母菌耐药菌株的抑菌效果 (mm)

Tab 4 Inhibition zone diameter of antibiotics against clinical isolates of *C. albicans* (mm)

抗菌药物	<i>C. albicans</i> 20	<i>C. albicans</i> 819	<i>C. albicans</i> 953
AmB	25	20	12
FLU	25	32	22
TER	—	34	16
KET	—	> 50	24
ICZ	22	34	—

注 (Note): “—” 表示无明显抑菌圈 (“—” means no obvious inhibition zone)。

2.6 联合用药 FICI 的测定

测定 9 个化合物对 4 种临床常用抗菌药物 TEC、VA、AK、FLU 的体外联合用药效果。联用的化合物和抗菌药物于 96 孔微量培养板上分别以二维棋盘的纵向 (A 至 H)、横向 (2 至 11) 两个方向进行二倍倍比稀释^[8]。根据所测定的化合物和抗菌药物单独对受试菌株的 MIC 值, 化合物沿 y 轴自上向下、抗菌药物沿 x 轴自右向左各自以 1/16MIC、1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC、

表 5 化合物对 MRSA 的 MIC 和 MBC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 5 MIC and MBC of compounds against MRSA ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

化合物	MRSA181		MRSA183		MRSA184		MRSA187	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	> 100.00	> 100.00	500.00	> 100.00	250.00	> 250.00	250.00	> 250.00
2	22.08	> 250.00	250.00	> 100.00	55.20	250.00	250.00	250.00
3	22.08	> 250.00	250.00	> 250.00	55.20	125.00	250.00	250.00
4	11.04	250.00	125.00	250.00	55.20	62.50	250.00	250.00
5	11.04	250.00	62.50	125.00	11.04	125.00	62.50	125.00
6	22.08	250.00	62.50	125.00	22.08	250.00	62.50	125.00
7	11.04	250.00	31.25	62.50	11.04	250.00	31.25	62.50
8	125.00	> 100.00	31.25	62.50	62.50	> 100.00	15.63	31.25
9	> 100.00	> 100.00	250.00	> 100.00	62.50	> 250.00	125.00	> 250.00

表 6 抗菌药物 / 化合物对白假丝酵母菌临床分离株的 MIC 和 MFC ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 6 MIC and MFC of antibiotics/compounds against clinical isolates of *C. albicans* ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

抗菌药物 / 化合物	<i>C. albicans</i> 20		<i>C. albicans</i> 819		<i>C. albicans</i> 953	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
FLU	4.00	4.00	16.00	16.00	> 2.00	> 2.00
1	125.00	> 250.00	62.50	62.50	250.00	> 250.00
2	62.50	> 250.00	31.25	31.25	250.00	250.00
3	62.50	250.00	31.25	31.25	125.00	125.00
4	62.50	250.00	31.25	31.25	125.00	250.00
5	31.25	125.00	31.25	31.25	62.50	125.00
6	62.50	> 250.00	125.00	125.00	250.00	250.00
7	62.50	125.00	31.25	31.25	62.50	125.00
8	> 250.00	> 250.00	125.00	250.00	> 250.00	> 250.00
9	62.50	> 250.00	125.00	250.00	62.50	125.00

MIC、2MIC、4MIC 的浓度梯度分别进行联合。每孔加 100 μL 药液, 最后各孔加入 100 μL 菌液。(H, 1) 孔加 100 μL 肉汤和 100 μL 菌液为阳性对照, (A, 9) 孔加 200 μL 肉汤为阴性对照。将培养板置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 18 h。抗菌药物和化合物之间的相互作用根据 FICI 确定, $FICI = (MIC_{\text{化合物联用}} / MIC_{\text{化合物单用}}) + (MIC_{\text{抗菌药物联用}} / MIC_{\text{抗菌药物单用}})$ 。FICI 值判读标准为: $FICI \leq 0.5$ 为协同作用; $0.5 < FICI \leq 1.0$ 为相加作用; $1.0 < FICI \leq 2.0$ 为无关作用; $FICI > 2.0$ 为拮抗作用^[9]。

联合治疗被认为是抗临床多药耐药菌的有效

方法, 即使多重耐药 (MDR) 菌株对单一抗菌药物不敏感, 它也可能提供协同作用。FICI 测试显示合成的离子对化合物与抗菌药物之间的协同、相加和拮抗作用。对于 *S. aureus* ATCC25923, 化合物 7、8 与 AK 联合, 化合物 4 与 VA 联合, 两药显示为协同作用; 化合物 2 与 TEC 联合, 化合物 5、6 与 AK 联合, 化合物 9 与 VA 联合, 两药显示为相加作用; 对于 *C. albicans* ATCCY0109, 化合物 9 与 FLU 联合, 两药显示为相加作用。其余组合大都显示 $1.0 < FICI \leq 2.0$ 为无关作用, 表明合成的离子对化合物与所用抗菌药物之间的协同作用较弱, 结果见表 7 ~ 10。

表 7 化合物与替考拉宁 (TEC) 联合对 *S. aureus* ATCC25923 的 FICI 测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 7 FICI of compounds combined with TEC against *S. aureus* ATCC25923 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

联合用药	MIC (Alone)		MIC (Comb)		FICI	相互作用
	化合物	TEC	化合物	TEC		
1 + TEC	62.500	0.250	1.953	0.250	1.031	无关
2 + TEC	62.500	0.500	31.250	0.250	1.000	相加
3 + TEC	31.250	0.250	0.977	0.250	1.031	无关
4 + TEC	62.500	0.250	62.500	0.063	1.252	无关
5 + TEC	31.250	0.125	31.250	0.063	1.504	无关
6 + TEC	125.000	0.125	125.000	0.063	1.504	无关
7 + TEC	62.500	0.250	7.813	0.250	1.125	无关
8 + TEC	125.000	0.125	125.000	0.063	1.504	无关
9 + TEC	7.813	0.125	3.906	0.125	1.500	无关

表 8 化合物与阿米卡星 (AK) 联合对 *S. aureus* ATCC25923 的 FICI 测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 8 FICI of compounds combined with AK against *S. aureus* ATCC25923 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

联合用药	MIC (Alone)		MIC (Comb)		FICI	相互作用
	化合物	AK	化合物	AK		
1 + AK	62.500	0.250	1.953	0.250	1.031	无关
2 + AK	62.500	0.500	1.953	0.500	1.031	无关
3 + AK	31.250	0.250	0.977	0.500	2.031	拮抗
4 + AK	62.500	0.250	1.953	0.250	1.031	无关
5 + AK	62.500	1.000	3.906	0.500	0.562	相加
6 + AK	125.000	0.500	62.500	0.063	0.626	相加
7 + AK	62.500	0.500	15.625	0.125	0.500	协同
8 + AK	125.000	0.500	31.250	0.125	0.500	协同
9 + AK	31.250	0.500	62.500	0.063	2.126	拮抗

表 9 化合物与万古霉素 (VA) 联合对 *S. aureus* ATCC25923 的 FICI 测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 9 FICI of compounds combined with VA against *S. aureus* ATCC25923 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

联合用药	MIC (Alone)		MIC (Comb)		FICI	相互作用
	化合物	VA	化合物	VA		
1 + VA	62.500	0.500	1.953	0.500	1.031	无关
2 + VA	31.250	0.500	1.953	0.500	1.062	无关
3 + VA	31.250	0.500	0.977	0.500	1.031	无关
4 + VA	62.500	1.000	1.953	0.250	0.281	协同
5 + VA	31.250	0.500	3.906	0.500	1.125	无关
6 + VA	125.000	0.500	125.000	0.125	1.250	无关
7 + VA	62.500	0.500	31.250	0.500	1.500	无关
8 + VA	125.000	0.500	125.000	0.125	1.250	无关
9 + VA	31.250	0.500	15.625	0.125	0.750	相加

3 讨论

一直以来有关植物活性成分在抗菌方面的研究是国内外学者研究的热点之一,一些天然产物有望成为新的抗菌剂。小檗碱是从中药黄连中分离的一种生物碱,其分子由两个异喹啉环稠合而成,结构中含有氮杂环和季铵盐结构,在临床上

表 10 化合物与氟康唑 (FLU) 联合对 *C. albicans* ATCCY0109 的 FICI 测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 10 FICI of compounds combined with FLU against *C. albicans* ATCCY0109 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

联合用药	MIC (Alone)		MIC (Comb)		FICI	相互作用
	化合物	FLU	化合物	FLU		
1 + FLU	15.625	7.813	15.625	0.977	1.125	无关
2 + FLU	15.625	7.813	15.625	0.977	1.125	无关
3 + FLU	3.906	7.813	3.906	0.977	1.125	无关
4 + FLU	31.250	7.813	31.250	0.977	1.125	无关
5 + FLU	31.250	7.813	31.250	0.977	1.125	无关
6 + FLU	62.500	7.813	62.500	0.977	1.125	无关
7 + FLU	62.500	7.813	62.500	0.977	1.125	无关
8 + FLU	62.500	7.813	62.500	7.813	2.000	无关
9 + FLU	125.000	7.813	3.906	3.906	0.531	相加

主要应用于细菌性痢疾和其他胃肠道细菌性感染及功能紊乱的治疗^[10]。中药有效成分鱼腥草素钠在临床上被用于治疗慢性支气管炎及其他上呼吸道感染性疾病,具有多种药理活性,包括抗菌、抗炎、抗真菌和心血管保护作用^[11]。文献报道在小檗碱 C-8 位引入不同长度的碳基链(甲基、乙基、丙基和丁基),其衍生物的抗菌活性极大增强,且衍生物的抗菌活性也随着取代烷基链的增长依次增强,C-8 位用乙酰氧基取代后对 MRSA 有较好的抗菌活性^[12]。后来又有研究者通过修饰小檗碱 C-7 位合成了一系列衍生物,发现小檗碱 C-7 位取代衍生物对 MRSA 和耐万古霉素肠球菌(VRE)有较好的活性^[13]。本研究是在小檗碱 N-7 位引入具有活性的鱼腥草素钠离子对成分,对其碳基链进行增减(R = 丙基、丁基、戊基、己基、壬基、十一烷基),琼脂打孔和 MIC 测定实验结果显示合成的离子对化合物 3、4、5 (R = C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₉H₁₉) 广谱抗菌活性强于小檗碱、鱼腥草素钠和新鱼腥草素钠。后期的研究可以在鱼腥草素离子对碳基链上进行更复杂的基团如卤素(-F、-Cl、-Br、-I)、-SH 等的取代,或取代基上引入酯键、醚键增加化合物的脂溶性,观察对抗菌活性有无进一步的影响。MRSA 的出现是一个全球性问题,随之带来的是金黄色葡萄球菌成为医院获得性感染的最常见诱因之一。金黄色葡萄球菌大面积抗多种药物能力的提升对感染控制造成了极为严峻的考验,本研究中合成的离子对化合物对临床分离菌株 MRSA 的活性强于所用抗菌药物。从最近的研究文献来看,小檗碱可能破坏 MRSA 细胞壁结构和细胞膜的完整性,其具体机制还不明确^[14]。此外,一些研究表明小檗碱

对 MRSA 的抗菌机制可能包括抑制生物膜的形成、蛋白质合成和细菌分裂^[15]。本实验中,合成的离子对化合物对 MRSA 具有较好的活性,是否具有特殊的作用机制值得进一步研究。联合治疗被认为是临床抗多药耐药菌的有效方法,本文研究了合成的 6 种离子对化合物与抗菌药物联用对 *S. aureus* ATCC25923 及 *C. albicans* ATCCY0109 的作用,结果显示离子对化合物与抗菌药物之间的协同作用较弱。但从实验结果来看,合成的离子对化合物在抗菌药物中的添加多数情况下降低了所测试抗菌药物对病原菌的 MIC,表明合成的离子对化合物能增加抗菌药物对病原菌的敏感性,其可能是一类有效的抗菌药物辅助剂。

4 结论

小檗碱 N-7 位引入具有活性的鱼腥草素钠离子对成分,对其碳基链进行增减,当取代基为 $R = C_5H_{11}$ 、 C_6H_{13} 、 C_9H_{19} 时,离子对化合物抗菌活性强于对照品,但仍弱于常用抗菌药物。如需进一步增加化合物的抗菌活性,推测可以在碳基链上引入脂溶性取代基,以增加化合物膜渗透性,促进化合物更多地进入病原菌细胞;合成的离子对化合物对 MRSA 具有比临床常用抗菌药物更好的活性,具体机制有待进一步研究;本文测试的 6 种离子对化合物与临床常用抗菌药物联用对 *S. aureus* ATCC25923 及 *C. albicans* ATCCY0109 协同作用较弱,但能降低所测试抗菌药物对病原菌的 MIC。合成的离子对化合物具有的抗 MRSA 作用及降低联用抗菌药物对金黄色葡萄球菌 MIC 的特性,将有利于治疗 MRSA 感染时两者的联合应用。

参考文献

[1] 胡茜,张颖,李堃,等.黄连主要成分小檗碱的临床药理作用探析[J].中国中医药现代远程教育,2021,19(24):203-205.
 [2] 邢宇,刘鑫,林园.小檗碱药理作用及其临床应用研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2017,31(6):491-502.
 [3] 林媛,司书毅,蒋建东.小檗碱的抗菌作用[J].药理学

报,2018,53(2):163-168.
 [4] 陈跃杰,周雪,朱丹.小檗碱及其盐类药物的制剂学研究进展[J].中国药物评价,2022,39(2):140-147.
 [5] 武营雪,丁倩云,刘静,等.鱼腥草化学成分、药理及质量控制研究进展[J].药物分析杂志,2022,42(1):108-120.
 [6] 肖娟,向安萍,张年凤.鱼腥草的化学成分及药理作用研究进展[J].现代中西医结合杂志,2022,31(11):1563-1567.
 [7] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,1982:1067-1071.
 [8] 梁蓓蓓,李悦,牛卉,等.利奈唑胺与磷霉素对甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌体外联合药敏的研究[J].中国临床药理学杂志,2015,31(18):1840-1842.
 [9] Huang YQ, Zhou Q, Wang WQ, et al. Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: clinical efficacy of combined antimicrobial therapy and in vitro drug sensitivity test results[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 92.
 [10] Li XB, Song YQ, Wang L, et al. A potential combination therapy of berberine hydrochloride with antibiotics against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 660431.
 [11] Verma RS, Joshi N, Padalia RC, et al. Chemical composition and allelopathic, antibacterial, antifungal, and antiacetylcholinesterase activity of fish-mint (*Houttuynia cordata* Thunb.) from India [J]. Chem Biodivers, 2017, 14(10): e1700189.
 [12] Fan TY, Hu XX, Tang S, et al. Discovery and development of 8-substituted cycloberberine derivatives as novel antibacterial agents against MRSA [J]. ACS Med Chem Lett, 2018, 9(5): 484-489.
 [13] Yang YS, Lu X, Zeng QX, et al. Synthesis and biological evaluation of 7-substituted cycloberberine derivatives as potent antibacterial agents against MRSA [J]. Eur J Med Chem, 2019, 168: 283-292.
 [14] Xia S, Ma LY, Wang GX, et al. In vitro antimicrobial activity and the mechanism of berberine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infection patients [J]. Infect Drug Resist, 2022, 15: 1933-1944.
 [15] Liu J, Obando D, Liao V, et al. The many faces of the adamantyl group in drug design [J]. Eur J Med Chem, 2011, 46(6): 1949-1963.

(收稿日期:2023-05-06;修回日期:2023-07-09)

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的玉蝴蝶祛斑膏 化学成分分析

张云^{1,2}, 茅向军¹, 詹学雄³, 张丽艳¹, 陈碧强³, 于婷², 范志梁¹, 唐海姣^{2*}, 王宗权^{2*} (1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 盈科瑞(横琴)药物研究院有限公司, 广东 珠海 519031; 3. 福建汇天生物药业有限公司, 福建 三明 365001)

摘要: **目的** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对玉蝴蝶祛斑膏的中间体及单药味进行化学成分鉴定及综合分析, 并对其化学成分进行药味归属, 为建立玉蝴蝶祛斑膏特征图谱奠定基础。**方法** 以 phenomenex Luna Omega Polar C18 (2.1 mm×100 mm, 1.6 μm) 为色谱柱, 以 0.2% 乙酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0~1 min, 12%~17%B; 1~5 min, 17%~28%B; 5~10 min, 28%~90%B; 10~11 min, 90%~100%B; 11~14 min, 100%B); 检测波长为 300 nm; 柱温为 25℃, 流速为 0.25 mL·min⁻¹。并采用 G6530C 型 Q-TOF-MS, 质谱检测分别在正、负离子模式下进行, 干燥气温度: 350℃, 干燥气流速: 10 L·min⁻¹, 雾化气压力: 35 psi, 鞘气温度: 350℃, 鞘气流速: 12 L·min⁻¹, 毛细管电压: 4000 V (正模式) 和 3500 V (负模式), 一级质谱选用 MS 模式, 质量扫描范围: 100~1500 m/z。二级质谱选用 Auto-MS/MS 模式, 质量扫描范围: 100~1000 m/z, 碰撞电压: 10、15、20、30 eV。所得数据由 Agilent MassHunter 软件采集。数据处理采用 Agilent 软件 Qualitative Navigator (B.08.00) 和 Qualitative Workflows (B.08.00)。对玉蝴蝶祛斑膏及单药味进行 UPLC-UV 和 UPLC-TOF-MS 分析, 在正负离子模式下采集数据。**结果** 在正负离子模式条件下共鉴定和推测出 19 个化合物, 结合质谱碎片信息对各色谱峰进行指认和归属。其中 5 个化合物归属到柿叶, 14 个化合物归属到木蝴蝶, 5 个化合物归属到菟丝子; 结合文献报道和对照品对比, 鉴定出 15 个化合物, 主要为黄酮类化合物, 其中包括黄芩苷、木蝴蝶苷 B、金丝桃苷、芹菜素等。**结论** 本研究比较全面地阐明了玉蝴蝶祛斑膏的化学组成, 对玉蝴蝶祛斑膏的鉴别和质量评价研究有重要的参考价值。

关键词: 玉蝴蝶祛斑膏; 高效液相-质谱联用; 化学成分; 木蝴蝶苷 B

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3226-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.020

Chemical constituents in Yuhudie macula-removing cream by UPLC-Q-TOF-MS

ZHANG Yun^{1,2}, MAO Xiang-jun¹, ZHAN Xue-xiong³, ZHANG Li-yan¹, CHEN Bi-qiang³, YU Ting², FAN Zhi-liang¹, TANG Hai-jiao^{2*}, WANG Zong-quan^{2*} (1. *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025*; 2. *Increase (Hengqin) Pharmaceutical Institute Company Limited, Zhuhai Guangdong 519031*; 3. *Fujian Huitian Biological Pharmacy Company Limited, Sanming Fujian 365001*)

Abstract: Objective To identify and comprehensively analyze the chemical components in Yuhudie macula-removing cream and single pharmaceutical flavor, and to classify the chemical components based on the pharmaceutical flavor, to lay the foundation for the establishment of characteristic

基金项目: 广东省科技计划项目 (No.2021A0505080007)。

作者简介: 张云, 男, 硕士研究生, 主要从事中药及民族药质量控制及新药研究, email: 2331775351@qq.com *通信作者: 唐海姣, 女, 工程师, 主要从事中药新药研发工作, email: tanghaijiao@ykrskj.com; 王宗权, 男, 高级工程师, 主要从事中药新药研发工作, email: wangzongquan@ykrskj.com

map of Yuhudie macula-removing cream by UPLC-Q-TOF-MS/MS. **Methods** The separation was conducted with phenomenex Luna Omega Polar C18 (2.1 mm×100 mm, 1.6 μm) column, with 0.2% acetic acid aqueous solution as the mobile phase A, acetonitrile as the mobile phase B, and gradient elution (0 ~ 1 min, 12% ~ 17%B; 1 ~ 5 min, 17% ~ 28%B; 5 ~ 10 min, 28% ~ 90%B; 10 ~ 11 min, 90% ~ 100%B; 11 ~ 14 min, 100%B). The detection wavelength was 300 nm. The column temperature was 25 °C and the flow rate was 0.25 mL · min⁻¹. G6530C Q-TOF-MS was used to detect the mass spectrum in the positive and negative ion modes. The drying temperature was 350 °C, the drying gas flow rate was 10 L · min⁻¹, the atomizing gas pressure was 35 psi. The sheath temperature was 350 °C, the sheath gas flow rate was 12 L · min⁻¹, the capillary voltage were 4000 V (positive mode) and 3500 V (negative mode). MS mode was selected for primary mass spectrometry, with the mass scanning ranged 100 to 1500 *m/z*. Auto-MS/MS mode was used for secondary mass spectrometry, with a mass scanning range of 100 ~ 1000 *m/z* and collision voltage of 10, 15, 20 and 30 eV. The data were collected with Agilent MassHunter software. Agilent software Qualitative Navigator (B.08.00) and Qualitative Workflows (B.08.00) were used for the data processing. UPLC-UV and UPLC-TOF-MS analysis were conducted on Yuhudie macula-removing cream and single medicine flavor. The data were collected under the positive and negative ion mode. **Results** Totally 19 compounds were identified under the condition of positive and negative ion mode, and the chromatographic peaks were identified and attributed according to the mass spectrum fragment information: 5 compounds were attributed to Shiye, 14 to Muhudie, and 5 to Tusizi. According to literature reports and comparison of control products, 15 compounds were identified, mainly flavonoids, including baicalin, baicalin-7-diglucoside, hyperoside, and apigenin, etc. **Conclusion** This experiment comprehensively elucidates the chemical compositions of Yuhudie macula-removing cream, which has important reference value for its identification and quality evaluation.

Key words: Yuhudie macula-removing cream; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; chemical constituent; baicalin-7-diglucoside

黄褐斑, 最早出现在《黄帝内经》称为“面尘”者, 后世医家称本病为“肝黯”“面黑肝”“黥黯”等。现代医学研究表明, 其病因主要包括家族遗传和种族差异^[1], 紫外线照射^[2], 内分泌失调^[3], 皮肤屏障破坏^[4], 炎症反应^[5], 皮肤光老化^[6], 血管增生扩张^[7], 自由基增多^[8]等。调查显示, 黄褐斑多发病于妊娠期妇女, 月经不调以及其他一些妇科疾病, 本病虽无明显自觉症状, 但对患者容颜损害及精神上带来了巨大伤害, 截至目前, 对此病的治疗中西医及美容界均无尚无理想的药物治疗, 特别是外涂药物更是缺如。

以中医药理论为指导原则, 我们研发了一种具有益气填精、养肌消斑功效的医用外用制剂——玉蝴蝶祛斑膏。以柿叶 20 g, 木蝴蝶 15 g, 菟丝子 2 g 入药, 该玉蝴蝶祛斑膏组方中柿叶味苦、性寒、无毒、专入肺经, 主治咳喘, 肺气胀, 各种内出血, 具有消退色斑及消除瘀血的作用, 为君药。木蝴蝶为臣药, 其性味苦寒, 有清肺理气等功能。菟丝子, 其性味辛、甘、平, 入

肝肾经, 能调补肝脾肾, 益经血, 达到调节脏腑功能、润肤的目的, 为佐药。故玉蝴蝶祛斑膏适用于气血瘀滞精血不足所致的面部黄褐斑, 对皮肤无刺激。现代研究表明其具有养颜、护肤、祛斑的功效, 其主要机制是其中的黄酮类化合物具有清除体内自由基的功能^[9-10], 如黄芩苷^[11], 金丝桃苷^[12], 槲皮素^[13], 芹菜素^[14]等。现有研究表明, 黄酮清除自由基的能力主要集中在分子结构的酚羟基上, 黄酮类化合物结构中酚羟基数目越多, 其活性越强^[15]。

目前, 对玉蝴蝶祛斑膏组方整体的化学成分的研究未见报道。因此, 本实验采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS/MS), 对玉蝴蝶祛斑膏及单味药的化学成分进行分析, 建立了单味药材的化学成分数据库, 采用数据库匹配, 对照品验证的方式, 对检测到的成分进行了鉴定和药味归属, 可为工艺生产过程的质量控制、稳定性研究以及质量标准起草等提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 (Agilent 1290 II, UPLC), 四极杆-飞行时间串联质谱仪 [G6530C, Q-TOF-MS, 配有 Agilent MassHunter 软件、Agilent Qualitative Navigator (B.08.00) 软件、Qualitative Workflows (B.08.00) 软件], 数控超声波清洗器 (KQ-500DE, 昆山市超声仪器有限公司), 电子加热套 (98-1-B, 天津市泰斯特仪器有限公司), 实验室纯水与超纯水系统 (Master-S15, 上海和泰仪器有限公司), 高速台式离心机 (TD5B, 长沙湘智离心机仪器有限公司), 电子天平 (JJ1000, 常熟市双杰测试仪器厂), 电子天平 (SOP, 赛多利斯科学北京仪器有限公司)。

1.2 试药

柿叶 (批号: SY-220507-J-YP01, 产地: 河北)、木蝴蝶 (批号: MHD-220507-D-YP01, 产地: 云南)、菟丝子 (批号: TSZ-220507-M-YP01, 产地: 内蒙古), 柿叶、木蝴蝶、菟丝子经盈科瑞 (横琴) 药物研究院有限公司中药副主任王宗权鉴定柿叶为柿树科植物柿 *Diospyros kaki* L.f. 的干燥叶, 木蝴蝶为紫葳科植物木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent. 的干燥成熟种子, 菟丝子为旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子; 对照品木蝴蝶苷 B (批号: 111915-201804, 纯度为 90.4%)、黄芩苷 (批号: 110715-202122, 纯度为 94.2%)、金丝桃苷 (批号: 111521-201809, 纯度为 94.9%) (中国食品药品检定研究院)。乙腈 (色谱纯, 批号: 22100312G402, OCEANPAK), 乙醇 (分析纯, 批号: 2022070110)、乙酸 (分析纯, 批号: 2022080102) (广州化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件 采用 Agilent 1290 II 型超高效液相色谱 (UPLC), phenomenex Luna Omega Polar C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.6 μm), 配有在线过滤器; 以 0.2% 乙酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0~1 min, 12%~17%B; 1~5 min, 17%~28%B; 5~10 min, 28%~90%B; 10~11 min, 90%~100%B; 11~14 min, 100%B); 检测波长为 300 nm; 柱温为 25 °C, 流速为 0.25 mL·min⁻¹; 进样量为 2 μL。

2.1.2 质谱条件 采用 G6530C 型四极杆-飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF-MS), 配有独立四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器 (DAD)

和电喷雾离子源 (ESI), 质谱检测分别在正、负离子模式下进行, 干燥气温度: 350 °C, 干燥气流速: 10 L·min⁻¹, 雾化气压力: 35 psi, 鞘气温度: 350 °C, 鞘气流速: 12 L·min⁻¹, 毛细管电压: 4000 V (正模式) 和 3500 V (负模式), 一级质谱选用 MS 模式, 质量扫描范围: 100~1500 *m/z*。二级质谱选用 Auto-MS/MS 模式, 质量扫描范围: 100~1000 *m/z*, 碰撞电压 10、15、20、30 eV。所得数据由 Agilent MassHunter 软件采集。数据处理采用 Agilent 软件 Qualitative Navigator (B.08.00) 和 Qualitative Workflows (B.08.00)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 玉蝴蝶祛斑膏全方供试品溶液 称取木蝴蝶 15 g 加水煎煮 2 次, 每次 2 h, 第一次加水 300 mL, 200 目过滤, 第二次加水 225 mL, 200 目过滤, 合并滤液备用; 另称取柿叶 20 g、菟丝子 2 g 加水煎煮 2 次, 每次 30 min, 第一次加水 440 mL, 200 目过滤, 第二次加水 330 mL, 200 目过滤, 合并滤液与上述滤液合并, 浓缩至约 500 g, 离心, 取上清液, 即得玉蝴蝶祛斑膏浓缩液。取浓缩液约 1.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入乙醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定重量, 用乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.2 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 柿叶供试品溶液 称取柿叶 20 g 加水煎煮 2 次, 每次 30 min, 第一次加水 400 mL, 200 目过滤, 第二次加水 300 mL, 200 目过滤, 合并滤液, 浓缩, 离心, 取上清液, 即得柿叶供试品溶液。取浓缩液约 1.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入乙醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定重量, 用乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.2 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 木蝴蝶供试品溶液 称取木蝴蝶 15 g 加水煎煮 2 次, 每次 2 h, 第一次加水 300 mL, 200 目过滤, 第二次加水 225 mL, 200 目过滤, 合并滤液, 浓缩, 离心, 取上清液, 即得木蝴蝶供试品溶液。取浓缩液约 0.6 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入乙醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定重量, 用乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.2 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 菟丝子供试品溶液 称取菟丝子 2 g 加水煎煮 2 次, 每次 30 min, 第一次加水 40 mL, 200

目过滤，第二次加水 30 mL，200 目过滤，合并滤液，浓缩，离心，取上清液，即得菟丝子供试品溶液。取浓缩液约 0.2 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入乙醇 50 mL，称定重量，超声处理 30 min（功率 250 W，频率 40 kHz），放冷，再称定重量，用乙醇补足减失的重量，摇匀，用微孔滤膜（0.2 μm）滤过，取续滤液，即得。

2.2.5 对照品溶液 分别取黄芩苷、木蝴蝶苷 B、金丝桃苷对照品适量，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加甲醇使溶解，定容至刻度，摇匀，制成 10 mg · L⁻¹ 对照品溶液。

2.3 化学成分分析

将“2.2.1”项下的供试品溶液，按“2.1”项下条件进样分析，获得正负离子模式下玉蝴蝶祛斑膏供试品溶液的总离子流色谱图（TIC），见图 1。所得数据由 Agilent MassHunter 软件采集，数据采用 Agilent 软件 Qualitative Navigator（B.08.00）和 Qualitative Workflows（B.08.00）进行处理。

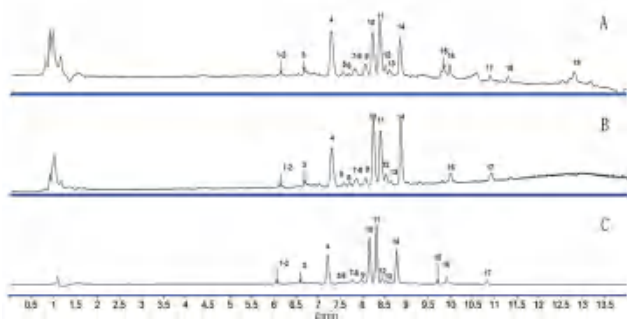


图 1 玉蝴蝶祛斑膏 UPLC-MS 总离子流图和 UPLC-UV 色谱图
Fig 1 UPLC-MS ion modes diagram and UPLC-UV chromatographic diagram of Yuhudie macula-removing
A. 正离子模式（positive ion modes）；B. 负离子模式（negative ion modes）；C. 紫外色谱图（UV chromatographic）

查阅相关文献报道，收集木蝴蝶、柿叶，菟丝子的化学成分信息，包括分子式及相对分子量等。通过玉蝴蝶祛斑膏样品进行一级质谱分析，并进行二级质谱扫描，得到化合物的离子碎片信息，并结合对照品裂解规律以及文献资料对所得化合物进行鉴定和推测，共鉴定和推测出 19 个化合物，其中 3 个化合物经对照品比对得到鉴定，并归属到相应的单味药中，见表 1。

组方中化学成分以黄酮类化合物为主，其中包括木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩苷、金丝桃苷、芹菜素等。该类化合物具有相同的母核，由 A、B、C 三个闭环构成，结构见图 2。

黄酮类化合物常在 A 环的 C-5 至 C-8，C 环的 C-3 及 B 环的 C-4' 至 C-5' 与甲基、羟基等取代

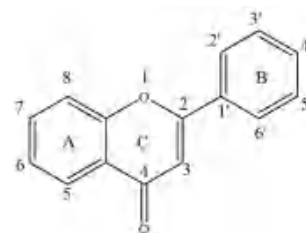


图 2 黄酮类化合物母核
Fig 2 Parent nucleus of flavonoids

基形成不同的化合物，该类化合物常与糖类化合物缩合形成黄酮苷类化合物，多见丢失糖基的苷元碎片离子以及环的断裂裂解产生的碎片，母核中 A 环较稳定，B 环和 C 环连接易断裂，C 环的 1, 3 键和 1, 4 键易发生 RDA 裂解。黄酮类化合物离子多会产生特征性的中性丢失，易发生 H₂O、CH₃、CO、CO₂ 等的中性丢失。可根据其特征碎片离子推断母核上特殊的取代基。

以金丝桃苷（化合物 3）为例，通常是 C 环的 C-3 断裂失去一分子葡萄糖。本实验在正离子模式下可见 m/z 465.1022 [M + H]⁺， m/z 487.0838 [M + Na]⁺， m/z 503.0568 [M + K]⁺，负离子模式下可见 m/z 463.0883 [M - H]⁻，二级裂解碎片可见 m/z 303.0501 [M + H-Glc]⁺， m/z 301.0354 [M - H-Glc]⁻，与文献报道信息一致^[18, 21-25]，并结合对照品比对，将化合物 3 鉴定为金丝桃苷，并归属到菟丝子药味，二级质谱及裂解规律见图 3、4。

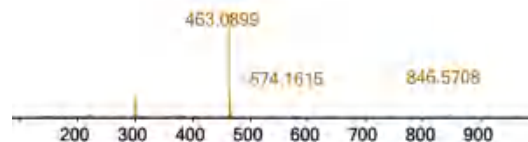


图 3 金丝桃苷二级质谱
Fig 3 Secondary mass spectrogram of hyperoside

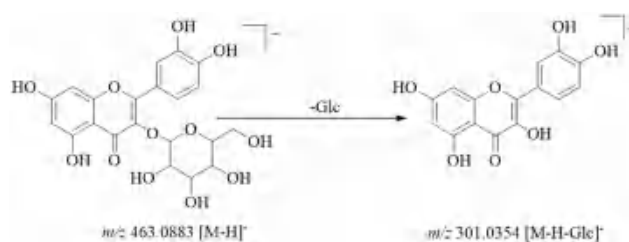


图 4 金丝桃苷的裂解途径
Fig 4 Fragment pathways of hyperoside

以木蝴蝶苷 B（化合物 4）为例，本实验在正离子模式下可见 m/z 595.1654 [M + H]⁺，负离子模式下可见 m/z 593.1521 [M - H]⁻， m/z 1187.3075 [2M - H]⁻。二级裂解碎片可见 m/z 595.1671 [M + H]⁺， m/z 433.1132 [M + H-Glc]⁺， m/z 271.0602 [M + H-2Glc]⁺， m/z 269.0460 [M - H-2Glc]⁻。与文献报

表 1 玉蝴蝶祛斑膏化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果

Tab 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of chemical components of Yuhudie macula-removing

No	t_R /min	母离子 m/z	分子式	误差 $/\times 10^{-6}$	化合物	碎片离子 m/z	来源
1	6.162	549.1612 [M + H] ⁺ , 547.1459 [M - H] ⁻ ,	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	- 1.59 - 0.83	未鉴定 ^[16]	549.1577, 531.1476, 513.1384, 495.1262, 411.1046, 393.0962, 547.1460, 457.1160, 374.9988	木蝴蝶
2	6.162	595.1312 [M - H] ⁻ ,	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	- 1.44	槲皮素 -3- <i>O</i> - β -D- 半乳糖 - (2→1) - β -D- 芹糖苷 ^[17]	NA	菟丝子
3	6.688	465.1022 [M + H] ⁺ , 487.0838 [M + Na] ⁺ , 503.0568 [M + K] ⁺ , 463.0883 [M - H] ⁻ ,	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	1.50 2.79 0 - 0.39	金丝桃苷 ^[18]	303.0501 [M + H-Glc] ⁺ , 463.0889 [M - H] ⁻ , 301.0354 [M - H-Glc] ⁻	菟丝子
4	7.300	595.1654 [M + H] ⁺ , 593.1521 [M - H] ⁻ , 1187.3075 [2M - H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0.59 - 1.14	木蝴蝶苷 B ^[18]	595.1671 [M + H] ⁺ , 433.1132 [M + H-Glc] ⁺ , 271.0602 [M + H-2Glc] ⁺ , 593.1527 [M - H] ⁻ , 269.0460 [M - H-2Glc] ⁻	木蝴蝶
5	7.566	449.1088 [M + H] ⁺ , 471.0902 [M + Na] ⁺ , 487.0634 [M + K] ⁺ , 447.0938 [M - H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	- 1.79 - 0.50 - 0.40 - 1.10	山柰酚 -3- <i>O</i> - β -D- 葡萄糖苷 ^[19]	287.0546 [M + H-Glc] ⁺ , 447.0919 [M - H] ⁻ , 284.0327 [M - H-Glc] ⁻	柿叶
6	7.702	601.1182 [M + H] ⁺ , 623.0996 [M + Na] ⁺ , 559.1053 [M - H] ⁻ , 639.0730 [M + K] ⁺ ,	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	0.31 1.47 - 1.59 0	未鉴定	601.1191, 315.0711, 599.1041, 285.0405,	柿叶
7	7.842	625.1772 [M + H] ⁺ , 623.1628 [M - H] ⁻ ,	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	- 1.13 - 1.26	山柰素 -3- <i>O</i> - 葡萄糖 - 葡萄糖苷 ^[20]	625.1745 [M + H] ⁺ , 463.1224 [M + H-Glc] ⁺ ,	木蝴蝶
8	7.849	601.1193 [M + H] ⁺ , 559.1046 [M - H] ⁻ ,	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	- 0.71 - 0.20	未鉴定	301.0698 [M + H-2Glc] ⁺ 601.1191, 315.0711, 599.1041, 285.0405	柿叶
9	8.068	579.1725 [M + H] ⁺ , 577.1573 [M - H] ⁻ ,	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	- 2.63 - 1.74	白杨黄素 -7- <i>O</i> - 双葡萄糖 ^[20]	579.1711 [M + H] ⁺ , 417.1182 [M + H-Glc] ⁺ , 255.0648 [M + H-2Glc] ⁺	木蝴蝶
10	8.231	447.0931 [M + H] ⁺ , 445.0783 [M - H] ⁻ , 915.1583 [2M + Na] ⁺ , 891.1625 [2M - H] ⁻ ,	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	- 2.18 - 0.96 1.66 0.08	黄芩苷 ^[18, 20]	447.0928 [M + H] ⁺ , 271.0602 [M + H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ , 445.0772 [M - H] ⁻ , 269.0454 [M - H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻	木蝴蝶
11	8.391	433.1134 [M + H] ⁺ , 431.0995 [M - H] ⁻ ,	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	- 0.61 - 2.40	木蝴蝶苷 A ^[18, 20]	433.1133 [M + H] ⁺ , 271.0600 [M + H-Glc] ⁺ , 431.0979 [M - H] ⁻ , 269.0454 [M - H-Glc] ⁻	木蝴蝶
12	8.521	477.1034 [M + H] ⁺ , 951.1825 [2M - H] ⁻ , 475.0892 [M - H] ⁻ ,	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	- 1.31 0.25 - 1.55	未鉴定	477.1045 [M + H] ⁺ , 301.0712 [M + H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	木蝴蝶
13	8.620	463.1250 [M + H] ⁺ , 461.1093 [M - H] ⁻ ,	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	- 3.01 - 0.37	山柰素 -7- <i>O</i> - 葡萄糖苷 ^[20]	463.1228 [M + H] ⁺ , 301.0699 [M + H-Glc], 461.1112 [M - H] ⁻ , 299.0553 [M - H-Glc] ⁻	木蝴蝶

续表 1

No	t_R /min	母离子 m/z	分子式	误差 $/\times 10^{-6}$	化合物	碎片离子 m/z	来源
14	8.850	431.0977 $[M + H]^+$,	$C_{21}H_{18}O_{10}$	-1.14	白杨素-7-葡萄糖苷 ^[16]	431.0969 $[M + H]^+$,	木蝴蝶
		429.0836 $[M - H]^-$,		255.0647 $[M + H - C_6H_8O_6]^+$,			
		859.1738 $[2M - H]^-$,		429.0824 $[M - H]^-$,			
				0.25		253.0502 $[M - H - C_6H_8O_6]^-$	
15	9.851	274.2736 $[M + NH_4]^+$,	$C_{16}H_{32}O_2$	1.95	棕榈酸 ^[18]	274.2737 $[M + NH_4]^+$,	柿叶、 菟丝子
		475.1238 $[M + HCOO]^-$,		256.2624 $[M]^+$			
16	9.981	271.0611 $[M + H]^+$,	$C_{15}H_{10}O_5$	-3.32	芹菜素 ^[18]	271.0605 $[M + H]^+$,	木蝴蝶
		269.0455 $[M - H]^-$,		253.0490 $[M + H - H_2O]^+$			
17	10.893	255.0657 $[M + H]^+$,	$C_{15}H_{10}O_4$	-1.65	白杨黄素 ^[18]	255.0646 $[M + H]^+$,	木蝴蝶
		253.0507 $[M - H]^-$,		153.0171 $[M + H - C_8H_6]^+$,			
				209.0597 $[M - H - CO_2]^-$			
18	11.305	415.2120 $[M + H]^+$	$C_{29}H_{50}O$	NA	β -谷甾醇 ^[18]	415.2111 $[M + H]^+$,	木蝴蝶、 柿叶、 菟丝子
						357.0731 $[M + H - CH_3 - CH(CH_3)_2]^+$,	
						240.9889, 119.0852,	
19	12.805	279.1597 $[M + H]^+$,	$C_{16}H_{22}O_4$	-2.19	邻苯二甲酸丁酯	205.0865 $[M + H - CO_2]^+$,	木蝴蝶、 柿叶、 菟丝子
				149.0239 $[C_8H_5O_3]^+$			

道结果一致^[20, 24, 26], 并结合对照品比对, 将化合物 4 鉴定为木蝴蝶苷 B, 并归属到木蝴蝶药味, 二级质谱及裂解规律见图 5、6。

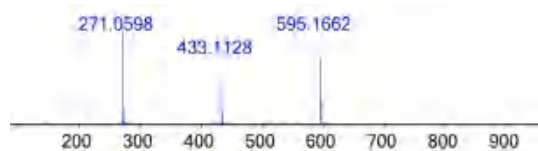


图 5 木蝴蝶苷 B 二级质谱

Fig 5 Secondary mass spectrum of baicalin-7-diglucoside

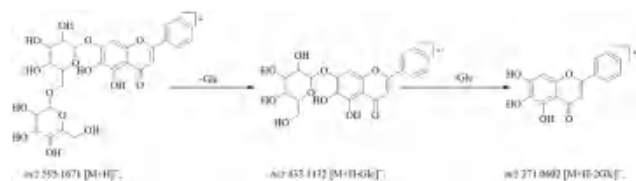


图 6 木蝴蝶苷 B 的裂解途径

Fig 6 Fragment pathways of baicalin-7-diglucoside

化合物 5 在正离子模式下可见 m/z 449.1088 $[M + H]^+$, m/z 471.0902 $[M + Na]^+$, m/z 487.0634 $[M + K]^+$ 等离子峰, 负离子模式下可见 m/z 447.0938 $[M - H]^-$, 二级离子碎片可见 m/z 287.0546 $[M + H - Glc]^+$, m/z 284.0327 $[M - H - Glc]^-$ 。结合文献报道^[19, 27-28], 推测化合物 5 为山柰酚-3- O - β -D-葡萄糖苷, 并归属到柿叶药味, 二级质谱及裂解规律见图 7、8。

化合物 7 在正离子模式下可见 m/z 625.1772 $[M + H]^+$, 负离子模式下可见 m/z 623.1628 $[M - H]^-$, 二级裂解碎片可见 m/z 463.1224 $[M + H - Glc]^+$, m/z 301.0698 $[M + H - 2Glc]^+$ 。与文献报道一致^[20], 鉴定

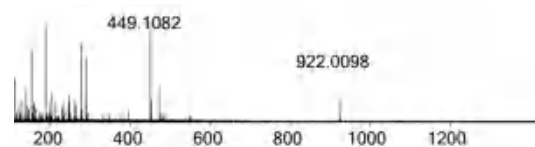


图 7 山柰酚-3- O - β -D-葡萄糖苷二级质谱

Fig 7 Secondary mass spectrogram of kaempferol-3- O - β -D-glucoside

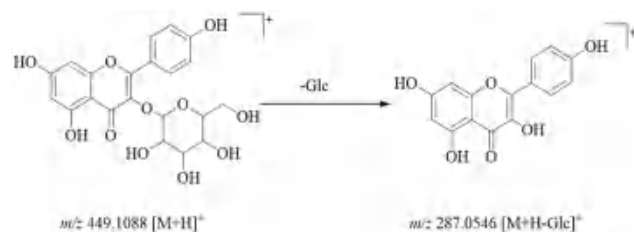


图 8 山柰酚-3- O - β -D-葡萄糖苷的裂解途径

Fig 8 Fragment pathways of kaempferol-3- O - β -D-glucoside

化合物 7 为山柰素-3- O -葡萄糖-葡萄糖苷。并归属到木蝴蝶药味, 二级质谱及裂解规律见图 9、10。

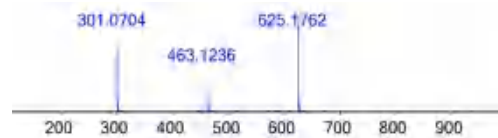


图 9 山柰素-3- O -葡萄糖-葡萄糖苷二级质谱

Fig 9 Secondary mass spectrogram of kaempferol-3- O -glucose-glucoside

化合物 10 在正离子模式下可见 m/z 447.0931 $[M + H]^+$, 负离子模式下可见 m/z 445.0783 $[M - H]^-$, 二级裂解碎片可见 m/z 271.0602 $[M + H - C_6H_8O_6]^+$, m/z 269.0454 $[M - H - C_6H_8O_6]^-$, 结果与文献报道一致^[20, 24-25], 并经过对照品比对, 将化合物 10 鉴定为

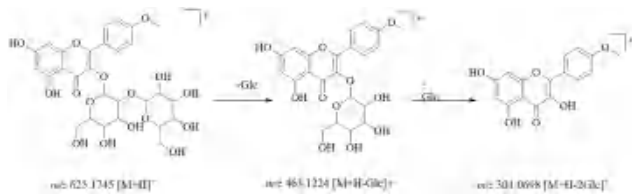


图 10 山柰素-3-O-葡萄糖-葡萄糖苷的裂解途径

Fig 10 Fragment pathways of kaempferol-3-O-glucose-glucoside

黄芩苷。并归属到木蝴蝶药味，二级质谱及裂解规律见图 11、12。

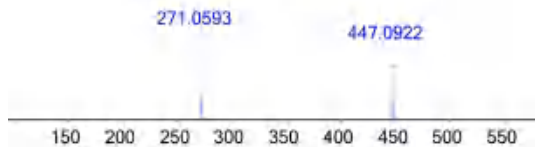


图 11 黄芩苷二级质谱

Fig 11 Secondary mass spectrum of baicalin

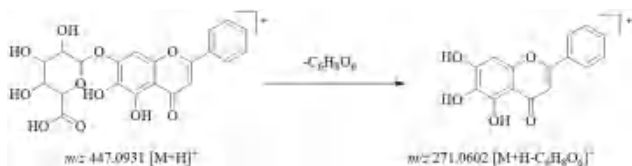


图 12 黄芩苷的裂解途径

Fig 12 Fragment pathways of baicalin

化合物 16 在正离子模式下可见 m/z 271.0611 [M + H]⁺，负离子模式下可见 m/z 269.0455 [M - H]⁻，二级裂解碎片可见 m/z 253.0490 [M + H - H₂O]⁺，结果与文献报道一致^[29]，并经过对照品比对，将化合物 16 鉴定为芹菜素。并归属到木蝴蝶药味，二级质谱及裂解规律见图 13、14。

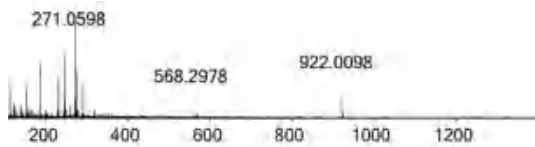


图 13 芹菜素二级质谱

Fig 13 Secondary mass spectrum of apigenin

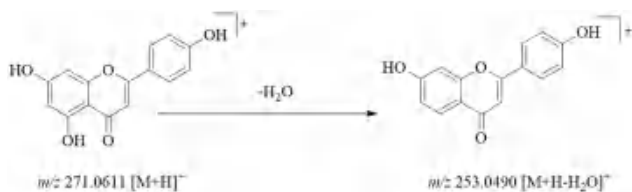


图 14 芹菜素的裂解途径

Fig 14 Fragment pathways of apigenin

化合物 17 在正离子模式下可见 m/z 255.0657 [M + H]⁺，负离子模式下可见 m/z 253.0507 [M - H]⁻，二级裂解碎片可见 m/z 153.0171 [M + H - C₈H₆]⁺， m/z 209.0597 [M - H - CO₂]⁻，上述结果与文献报道数据一致^[24, 29-30]，故将化合物 17 鉴定为白杨黄素。并归属

到木蝴蝶药味，二级质谱及裂解规律见图 15、16。

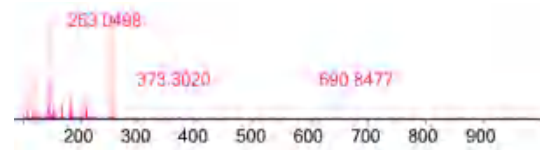


图 15 白杨黄素二级质谱

Fig 15 Secondary mass spectrum of chrysin

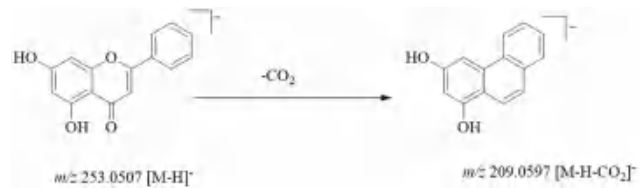


图 16 白杨黄素的裂解途径

Fig 16 Fragment pathways of chrysin

白杨黄素也可发生 RDA 裂解，二级质谱及裂解规律见图 17、18。

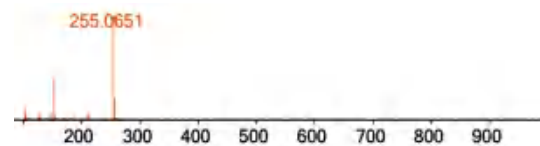


图 17 白杨黄素的 RDA 二级质谱

Fig 17 Secondary mass spectrum of chrysin

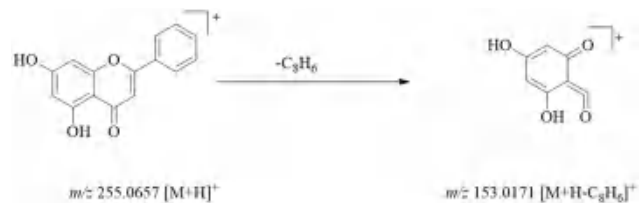


图 18 白杨黄素的 RDA 裂解途径

Fig 18 RAD Fragment pathways of chrysin

玉蝴蝶祛斑膏中检出的归属于木蝴蝶、柿叶、菟丝子的成分主要是黄酮类成分，而木蝴蝶、柿叶、菟丝子中的主要活性成分也均为黄酮类成分。

3 讨论

本研究对色谱条件进行了优化，考察了不同色谱柱，柱温及洗脱梯度等，最后选择了 phenomenex Luna Omega Polar C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm) 色谱柱，流动相为 0.2% 乙酸水 - 乙腈系统，柱温为 25 °C，此色谱条件的分离效果较好。

玉蝴蝶祛斑膏中的成分不尽相同，正离子模式适用于检测杂原子化合物，负离子模式更适用于多羟基的化合物。因此，本研究采用了两种离子扫描模式 (ESI⁺ 和 ESI⁻) 对玉蝴蝶祛斑膏中间体及各药味的成分进行鉴定，共鉴定了 15 个化合物，大多数为黄酮类化合物，其中包括黄芩苷、木蝴蝶苷 B、木蝴蝶苷 A 等化合物，以及四

环三萜类化合物 β -谷甾醇。并通过对照品比对指出黄芩苷、木蝴蝶苷 B 及金丝桃苷 3 个化合物, 由于目前对玉蝴蝶祛斑膏相关研究报道较少, 且部分成分存在多种同分异构体, 导致一些响应较好的色谱峰为未鉴定出的成分, 这一部分内容需要在后续研究中继续挖掘和探索。

本研究建立了基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的分析方法, 对中药复方制剂玉蝴蝶祛斑膏的中间体及其药味的化学成分进行了较为全面的分析, 所鉴别的化合物可全面反映其化学物质基础, 本研究对玉蝴蝶祛斑膏的工艺开发、质量控制和临床应用具有重要的参考意义。

参考文献

- [1] 姜群群, 刘玲玲, 刘卫兵. 黄褐斑的中西医研究进展 [J]. 中医临床研究, 2017, 9 (16): 145-148.
- [2] Misun K, Takako S, Soohyun K, et al. Ultraviolet-irradiated endothelial cells secrete stem cell factor and induce epidermal pigmentation [J]. Scientific reports, 2018, 8 (1): 4235.
- [3] Muriel C. How hormones may modulate human skin pigmentation in melasma: an in vitro perspective [J]. Exp Dermatol, 2019, 28 (6): 709-718.
- [4] Chloé M, Cécile L, Arlette BG, et al. Effect of UVA or UVB irradiation on cutaneous lipids in films or in solution [J]. Photochem Photobiol, 86 (3): 553-562.
- [5] Kang HY. Melasma and aspects of pigmentary disorders in Asians [J]. Ann Dermatol Venereol, 2012, 139 (4): S144-S147.
- [6] 刘媛, 李福民, 廖金凤, 等. 皮肤光老化机制研究进展 [J]. 临床皮肤科杂志, 2016, 45 (6): 479-481.
- [7] 朱丽萍, 庞勤, 吕乐春, 等. 黄褐斑患者组织病理特征分析 [J]. 中华皮肤科杂志, 2016, 49 (10): 706-711.
- [8] 韩秀萍. 茶多酚与光子技术结合治疗黄褐斑的应用探索 [J]. 医学信息, 2010, 23 (3): 649-650.
- [9] 李蜀眉, 宋刚, 田维平, 等. 桔皮中黄酮化合物清除自由基的研究 [J]. 内蒙古农业大学学报 (自然科学版), 2004, 25 (3): 89-91.
- [10] 吴碧华, 龙存国, 王晓明, 等. 甘草总黄酮清除羟自由基作用的体外实验探讨 [J]. 川北医学院学报, 2001, 16 (1): 3-5.
- [11] 刘小宁. 黄芩中黄酮类化合物清除自由基机理的密度泛函理论计算 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.
- [12] 刘帅涛, 陶慧林, 李锦艳. 4 种黄酮小分子对 DPPH 自由基的清除作用及构效关系研究 [J]. 分析测试学报, 2012, 31 (1): 71-75.
- [13] 刘敏, 肖颖, 左爱仁, 等. 槲皮素、根皮素、水飞蓟宾清除自由基和抑制脂质过氧化活性研究 [J]. 中成药, 2012, 34 (4): 753-756.
- [14] 徐魏, 雷艳琴, 魏湘芝, 等. 紫花地丁芹菜素清除 DPPH 自由基稳定性研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9 (11): 2775-2779.
- [15] 孟庆华, 于晓霞, 张海凤, 等. 天然黄酮类化合物清除自由基机理及其应用进展 [J]. 云南民族大学学报 (自然科学版), 2012, 21 (2): 79-83.
- [16] 陈丽娜, 杨明, 时东方, 等. 基于液相色谱-质谱技术分析木蝴蝶中化学成分 [J]. 生物化工, 2019, 5 (4): 14-17.
- [17] 高佃华. 菟丝子化学成分的研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2009.
- [18] 王舒芳, 钱忠直主编. 中药质量现代分析技术中国药典一部参考手册 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2010.
- [19] 梅为云, 李娜, 周志宏, 等. 云南甜柿叶化学成分研究 [J]. 云南民族大学学报 (自然科学版), 2017, 26 (4): 274-277.
- [20] 吴茵, 白万军, 魏欣. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析木蝴蝶中化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (2): 196-200.
- [21] 冯阳, 陈玉梅, 辛华. 金樱子黄酮类成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (12): 71-76.
- [22] 林志燕, 杨荣富, 唐跃年. 8 种黄酮类成分的 LC-MS/MS 分析 [J]. 中国药师, 2014, 17 (8): 1292-1297.
- [23] 潘宏春, 秦伟瀚, 李晓明, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 法野马追化学成分分析鉴定 [J]. 中草药, 2020, 51 (12): 3147-3156.
- [24] 张宁, 高霞, 周宇, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析杏贝止咳颗粒化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (22): 4439-4449.
- [25] 林秀莲, 宋粉云, 潘玄玄, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析补肾强身片中化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (19): 61-67.
- [26] 何民友, 魏梅, 程学仁, 等. 基于 UPLC-MS/MS 对木蝴蝶配方颗粒 6 种成分含量测定及特征图谱研究 [J]. 中国现代中药, 2020, 22 (2): 271-277.
- [27] 郭伟华, 张放. 柿树中 3 种主要活性成分研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36 (1): 395-399.
- [28] 王梦杰, 李镐, 华会明, 等. 柿叶中黄酮类化合物及提取工艺研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (13): 4214-4222.
- [29] 丁健桦, 王兴祥, 张慧, 等. 芹菜素的电喷雾萃取电离串联质谱 [J]. 高等学校化学学报, 2011, 32 (8): 1714-1719.
- [30] 第五文博, 谈娜娜, 王晓玲, 等. 元宝枫叶中的黄酮类成分分析与电喷雾质谱裂解规律研究 [J]. 宝鸡文理学院学报 (自然科学版), 2020, 40 (3): 25-33.

(收稿日期: 2023-06-15; 修回日期: 2023-07-22)

高效液相色谱法测定人血浆中奥希替尼的浓度

董馨蔚, 倪美鑫, 夏娴娴, 王慧芳, 朱罗晨, 顾海娟* (南通大学附属肿瘤医院/南通市肿瘤医院药剂科, 江苏南通 226300)

摘要: **目的** 建立一种快速、简便检测人血浆中奥希替尼浓度的高效液相色谱法 (HPLC), 并应用于临床。**方法** 色谱柱: Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 柱 (4.6 mm×150 mm, 4 μm); 流动相: 磷酸二氢钾 (pH 3.6) - 乙腈 = 68.5 : 31.5 (V/V), 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C, 进样量: 20 μL。**结果** 色谱图显示奥希替尼与杂质分离良好, 奥希替尼线性范围是 62.50 ~ 2500.00 ng·mL⁻¹ ($R^2 = 0.9991$); 定量下限变异系数为 4.4%; 日内、日间精密度相对标准偏差小于 8.0%, 方法回收率在 85% ~ 115%, 稳定性试验相对标准偏差小于 10%, 方法学考察符合要求。应用该方法对 10 位口服甲磺酸奥希替尼的非小细胞肺癌患者进行血药浓度检测, 奥希替尼血药浓度在 112.694 ~ 539.877 ng·mL⁻¹。**结论** 该方法简便准确, 成本低廉, 可操作性强, 可应用于临床奥希替尼血药浓度的检测。

关键词: 高效液相色谱; 奥希替尼; 血药浓度; 临床应用

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3234-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.021

Determination of osimertinib in human plasma by high performance liquid chromatography

DONG Xin-wei, NI Mei-xin, XIA Xian-xian, WANG Hui-fang, ZHU Luo-chen, GU Hai-juan* (Department of Pharmacy, Affiliated Tumor Hospital of Nantong University/Nantong Tumor Hospital, Nantong Jiangsu 226300)

Abstract: Objective To establish a rapid and simple method to determine osimertinib in human plasma by high performance liquid chromatography, and use it in clinical practice. **Methods** The column was Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm×150 mm, 4 μm), the mobile phase was potassium dihydrogen phosphate (pH 3.6)-acetonitrile (68.5 : 31.5, V/V) with a flow rate of 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The chromatogram showed that osimertinib was well separated from the impurities. The linear ranges of plasma osimertinib concentrations was 62.50 ~ 2500.00 ng·mL⁻¹ ($R^2 = 0.9991$); the variation coefficients of the lower limit of quantification was 4.4%; the relative standard deviation of intra-day and inter-day precision was less than 8.0%; the recovery rate was 85% ~ 115%, and the relative standard deviation of stability test was less than 10%. The methodology met the requirements. The established method was used for 10 patients with non-small cell lung cancer who received osimertinib orally. The concentration of osimertinib in the plasma ranged 112.694 ~ 539.877 ng·mL⁻¹. **Conclusion** This method is simple, accurate with low cost and highly manipulable, which is suitable for clinical detection of plasma osimertinib concentration.

Key words: high performance liquid chromatography; osimertinib; plasma concentration; clinical application

基金项目: 南通市卫生健康委科研课题 (No.QNZ2022030, No.MSZ2023039); 江苏省研究型医院学会精益化用药石药专项科研项目 (No.JY202233); 南通大学临床医学专项项目 (No. 2022LY022)。

作者简介: 董馨蔚, 女, 硕士, 主要从事临床药学工作, email: dxwldm@163.com * **通信作者:** 顾海娟, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: guhaijuan0714@126.com

肺癌是世界高发的恶性肿瘤之一,亦是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,且呈年轻化,严重威胁人们的生命安全;其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌中最常见的组织类型^[1-3]。甲磺酸奥希替尼(osimertinib mesylate)是第三代表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI),可用于EGFR T790M突变阳性的局部晚期或转移性NSCLC患者的治疗。国外研究发现,服用相同剂量甲磺酸奥希替尼的患者,其血药浓度存在较大的个体化差异^[4];且皮疹、腹泻等不良反应在高血药浓度患者中更容易出现^[5]。FDA颁布的《口服靶向抗肿瘤药物的治疗药物监测》(2021年版)中指出,奥希替尼血药浓度与患者疗效及安全性密切相关^[6],故临床上很可能出现不良反应或疗效低的风险。因此,奥希替尼血药浓度监测在临床患者科学制订合理用药方案及精准个体化治疗中具有重要意义。本文拟通过建立一种快速,简便,可操作性强的高效液相色谱法,测定人血浆中奥希替尼的浓度,并应用于临床为后续血药浓度相关深入研究提供技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);KQ-500DY.A型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);GZX-9246 MBE数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);DN-12W水浴加热氮吹仪(上海楚定分析仪器有限公司);分析型1010A摩尔超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司);AP-01P真空泵(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);BS100S电子天平[赛多利斯(北京)科学仪器有限公司];XW-80A漩涡混合器(上海精科实业有限公司);Minnisin离心机、5702离心机(德国Eppendorf)。

1.2 试剂

甲磺酸奥希替尼对照品(Zzstandard生物科技有限公司,批号:ZC-49637,纯度:99.78%);乙酸乙酯(汕头市西陇化工厂有限公司,批号:090701,含量 $\geq 99.5\%$);磷酸二氢钾(批号:09070460325,含量 $\geq 99.5\%$);氢氧化钠(批号:180408138E,含量 $\geq 96\%$);磷酸(批号:10051810 542,含量 $\geq 85\%$)(南京化学试剂有限公司);甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司)。

空白血浆为江苏省南通市肿瘤医院体检人群

血浆,未服用过甲磺酸奥希替尼药品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18柱(4.6 mm \times 150 mm, 4 μ m);流动相:磷酸二氢钾(pH 3.6)-乙腈=68.5:31.5(V/V),流速:1 mL \cdot min⁻¹;柱温:30 $^{\circ}$ C,检测波长:251 nm,进样量:20 μ L。

2.2 溶液配制

2.2.1 标准曲线工作溶液的配制 精密称取甲磺酸奥希替尼对照品10.0 mg,用甲醇溶解并定容于10 mL量瓶中,得到1 mg \cdot mL⁻¹的甲磺酸奥希替尼储备液。精密吸取甲磺酸奥希替尼储备液,用甲醇进行稀释,得到系列浓度对照品溶液,分别为25 000.0、12 500.0、5000.0、2500.0、1250.0和625.0 ng \cdot mL⁻¹,在-20 $^{\circ}$ C条件下保存,作为标准曲线工作液。

2.2.2 质控品溶液的配制 精密吸取“2.2.1”项下甲磺酸奥希替尼储备液,用甲醇进行稀释,得到甲磺酸奥希替尼低、中、高浓度质控品溶液,分别为1250.0、5000.0、18 750.0 ng \cdot mL⁻¹。

2.3 血浆样品制备

2.3.1 标准曲线血浆样品的制备 分别移取“2.2.1”项下的甲磺酸奥希替尼标准曲线工作液22 μ L,加入198 μ L空白血浆,涡旋40 s,混合制成不同浓度的甲磺酸奥希替尼标准曲线血浆样品(质量浓度分别为2500.0、1250.0、500.0、250.0、125.0和62.5 ng \cdot mL⁻¹)。

2.3.2 质控品制备 使用移液枪分别移取“2.2.2”项下配制的低、中、高浓度的甲磺酸奥希替尼质控品溶液22 μ L,加入198 μ L空白血浆,涡旋40 s,混合制成低、中、高浓度的甲磺酸奥希替尼质控品(质量浓度分别为125.0、500.0、1875.0 ng \cdot mL⁻¹)。

2.4 样品处理

取血浆样品220 μ L于1.5 mL无菌Ep管中,加入0.1 mol \cdot L⁻¹ NaOH 100 μ L,涡旋40 s;加入1000 μ L乙酸乙酯,涡旋5 min后,离心(13 400 r \cdot min⁻¹, 8 min);用移液枪取上清液850 μ L置1.5 mL Ep管中,氮气吹干;取200 μ L流动相复溶,涡旋5 min后,离心(13 400 r \cdot min⁻¹, 8 min),取上清液至进样瓶中,待进样分析。若为患者血液样品,先进行离心(4400 r \cdot min⁻¹, 10 min),取上清液再进行上述步骤,将上清液置于-20 $^{\circ}$ C条件下保存。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 分别取空白血浆、空白血浆加入甲磺酸奥希替尼对照品以及患者口服甲磺酸奥希替尼后血浆样品,在“2.1”项色谱条件下进样检测。结

果见图 1,奥希替尼保留时间在 6.8 min 左右;血浆样品分离测定不受内源性物质等杂质峰干扰。

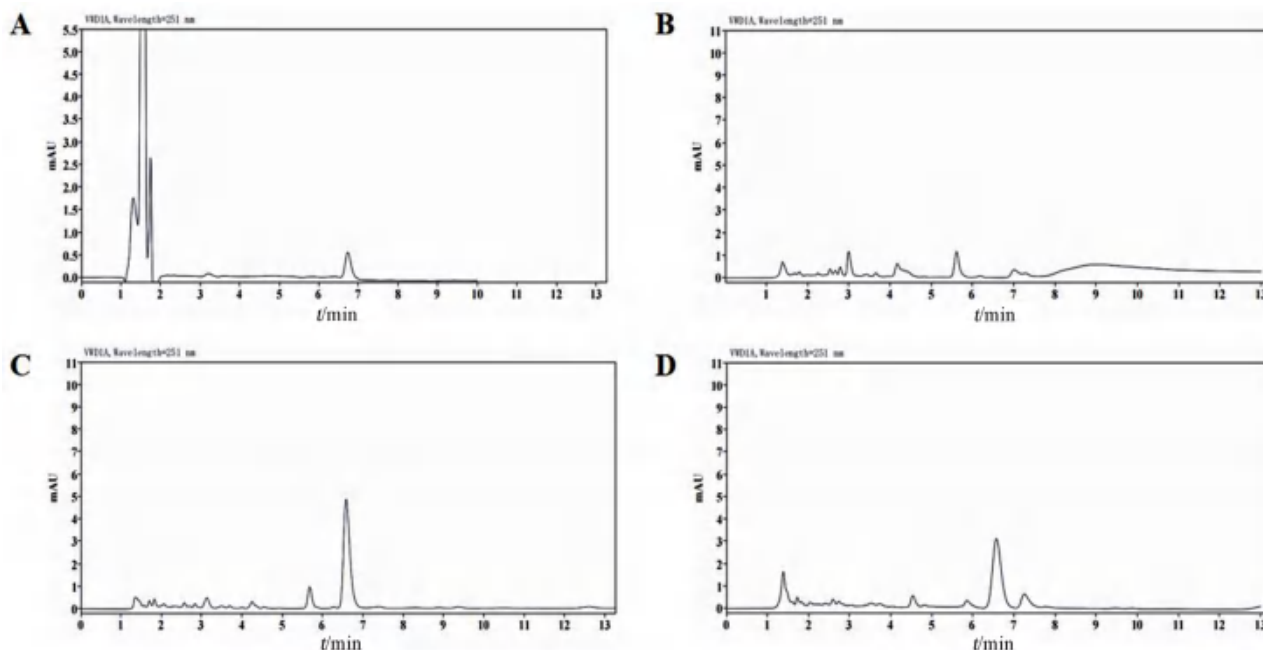


图 1 奥希替尼 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of osimertinib

A. 奥希替尼对照品溶液 (standard solution); B. 空白血浆 (blank human plasma); C. 空白血浆+奥希替尼对照品 (blank plasma spiked with osimertinib); D. 服药后血浆样品 (plasma sample after the administration)

2.5.2 标准曲线与定量下限 取“2.3”项下的甲磺酸奥希替尼标准曲线血浆样品,在“2.1”项色谱条件下检测分析,每个浓度平行 5 组,以质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归,拟合得到奥希替尼标准曲线方程为: $Y = 0.029\ 09X + 0.001\ 58$ ($R^2 = 0.9991$)。取“2.3”项下甲磺酸奥希替尼标准曲线最低点浓度的血浆样品 ($62.50\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 平行 6 组,作为定量下限浓度血浆样品,在“2.1”项色谱条件下进样,计算其定量下限的变异系数为 4.4%。

2.5.3 回收率与精密度 取“2.3”项下所制备的甲磺酸奥希替尼定量下限,低、中、高质控品样品,每个浓度设置 5 个平行组,在“2.1”项色谱条件下同日进样,并计算回收率及日内精密度;连续进样 3 d,计算方法日间精密度。结果显示,奥希替尼定量下限,低、中、高浓度质控样品的回收率均在 85% ~ 115%;日内精密度 RSD 分别为 4.4%、1.8%、7.0% 和 1.9%;日间精密度 RSD 分别为 4.3%、2.8%、5.2% 和 1.7%。结果表明回收率与精密度结果符合要求。

2.5.4 稳定性 取“2.3”项下制备的甲磺酸奥希替尼低、中、高质控样品,每个浓度设置 3 个平行

组,分别考察样品在 4 °C 条件下放置 12 h、反复冻融 3 次以及 -80 °C 环境放置 30 d 的稳定性。结果显示奥希替尼质控样品在 4 °C 放置 12 h、反复冻融 3 次和 -80 °C 放置 30 d 条件下 RSD 分别在 0.98% ~ 6.3%、2.7% ~ 9.9%、2.3% ~ 8.2%,表明该方法稳定性符合要求,短期、长期、反复冻融的储存条件并不影响本方法对样品的准确测定。

2.6 统计学方法

所有样本均为独立样本,且重复 3 次。数据处理采用 Data Analysis 工作站,数据分析采用 Excel 软件计算均值、标准差,结果采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,日内、日间精密度用 RSD 进行评价。

2.7 血药浓度监测的临床应用

根据建立的检测方法,选择口服甲磺酸奥希替尼的 NSCLC 患者血样进行验证与应用。纳入标准:①明确诊断为 NSCLC 的患者;②规律且连续口服甲磺酸奥希替尼大于 1 个月,依从性良好,未出现漏服和少服药物的现象;③男女不限,年龄 ≥ 18 岁;④患者参与研究前被告知目的,且愿意接受并签署知情同意书;⑤临床资料齐全,随访信息完整者。排除标准:①口服甲磺酸奥希

替尼小于 1 个月；② 双靶治疗，即同时服用甲磺酸奥希替尼及其他靶向药物；③ 依从性较差；④ 沟通、认知障碍等；⑤ 预计生存期 < 3 个月。于患者第二日服药前 2 ~ 3 h 进行采血。本课题已获得南通市肿瘤医院伦理委员会的批准 [审批号：通肿伦审（科研）2022-064]，涉及血样的患者或

家属已签署《知情同意书》。本研究选择了 10 名口服甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙，As traZeneca AB，批号：MMNF/2208514、MMPD/2210522）的 NSCLC 患者进行验证与应用。其中男性 4 例，女性 6 例，所有患者用法用量均为 80 mg po qd，具体结果见表 1。

表 1 HPLC 法检测临床 NSCLC 患者奥希替尼血药浓度结果

Tab 1 Plasma drug concentration of osimertinib in NSCLC patients detected by HPLC

性别	年龄 / 岁	身高 / cm	体重 / kg	谷丙转氨酶 / (U · L ⁻¹)	谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	肌酐 / (μmol · L ⁻¹)	血药浓度 / (ng · mL ⁻¹)	临床诊断
女	75	155	47	6	16	65	539.877	右肺恶性肿瘤；慢性乙型肝炎
女	62	147	58	9	18	64	112.694	右肺下叶浸润性腺癌术后，EGFR-21 突变
女	47	158	50	9	19	43	134.283	左肺腺癌，EGFR-21、L858R 突变，T790M 突变
男	69	163	66	20	26	71	214.514	左肺恶性肿瘤，EGFR-19Del 突变，T790M 突变
女	72	156	52	9	19	65	182.317	右肺上叶腺癌术后（pT3N1M0）
男	52	170	60	25	26	92	128.549	右肺上叶癌术后脑转移，EGFR-L858R 突变
男	65	163	58	16	23	96	174.043	左肺腺癌，EGFR-19Del 突变
男	79	173	65	13	24	101	285.325	右肺腺癌，EGFR-L858R 突变
女	75	160	45	8	17	106	146.455	右肺腺癌，EGFR-L858R 突变
女	58	150	51	53	36	61	197.145	右肺腺癌，EGFR-L858R 突变

3 讨论

3.1 奥希替尼血药浓度监测方法

目前，关于奥希替尼血药浓度的检测方法有 HPLC 法^[7]、液相色谱-质谱法 (LC-MS/MS)^[8]、超高效液相色谱-质谱法 (UPLC-MS/MS)^[9]、基质辅助激光解吸/电离法 (MALDI)/MS^[5] 等；UPLC-MS/MS 方法专属性好且准确度高，是目前定量药物在血浆中的药代动力学分析和患者监测的黄金标准^[5]；但其基质效应对定量检测影响较大，且仪器昂贵，检测成本及对人员、环境的要求较高，不适用于医院治疗药物监测的广泛使用。相比液质联用的方法，HPLC 法灵敏度较低，但其成本低廉，可操作性强，对流动相离子浓度变化影响不显著，对实验室环境（如温度、湿度）等实验要求不高，可推广应用于各级别医疗机构，为临床制订个体化用药方案提供参考。

3.2 奥希替尼血浆样品的处理

奥希替尼具有与亲核细胞及人血浆蛋白形成 Michael 加合物的能力^[9-11]。国外有研究表明，奥希替尼在人血浆中高度不稳定^[12]，Michael 加合物的形成可能是奥希替尼在人血浆中可测浓度不稳定的原因之一^[9]。Veerman 等^[9]对此进行了更为深入的稳定性实验，研究结果表明：环境温度下，人血浆中奥希替尼浓度在 3 h 内保持稳定；在 T = 0 °C 条件下，奥希替尼在人血浆中稳定至

少 24 h。且在相同的暴露条件下，环境温度在 T = 37 °C 时，奥希替尼在全血中的稳定性几乎是在血浆中的 5 倍；室温条件下，人血浆中奥希替尼浓度至少在 5 h 内保持稳定。因此，在实际临床检测患者奥希替尼血药浓度时，应注意血浆样品的存放时间和条件，于抽血后 3 h 内完成血浆样品的制备并进行检测为佳；若无法立即进行血药浓度检测，可于 0 °C 环境下全血存放 24 h，以避免长时间放置不稳定引起的血药浓度检测差异。

奥希替尼分子量为 426，水溶性较差，亲脂性强^[13]，本研究考虑奥希替尼这一特点，采用乙酸乙酯液液萃取的方法进行样品预处理，该方法相对于固相萃取法操作简便、蛋白沉淀法灵敏度好，提取方便效率高^[7]。

3.3 奥希替尼血药浓度监测的临床应用及影响因素

甲磺酸奥希替尼作为目前治疗 NSCLC 的一线靶向药物，临床使用广泛；其所致的不良反应累及全身多个系统/器官，例如呼吸系统、消化系统、心血管系统等，且不乏严重和新的不良反应^[14]。研究显示，对于服用相同剂量奥希替尼的患者，奥希替尼血药浓度存在个体间差异，药物不良反应发生情况与奥希替尼血药浓度存在相关性^[4, 15]；因此，奥希替尼血药浓度监测在临床精准治疗中具有重要意义。甲磺酸奥希替尼主要通过 CYP3A4 和 CYP3A5 代谢，平均半衰期为 38 h^[16]。

有研究表明,患者同时服用氨氯地平可导致奥希替尼血药浓度升高,这可能与氨氯地平为 CYP3A 弱抑制剂有关^[7];当奥希替尼与 CYP3A 诱导剂(如利福平)联用时,会导致患者奥希替尼的血药浓度下降,显著降低其药物活性^[17]。但食物不会影响奥希替尼生物利用度,且同时服用奥美拉唑,改变胃内环境 pH,对奥希替尼血药浓度亦未产生显著影响^[18]。目前,有关奥希替尼血药浓度影响因素的研究报道甚少,国内外也未见基于患者年龄、性别、体重、种族、吸烟状况等与其血药浓度相关性的研究^[19]。奥希替尼血药浓度监测尚未在国内临床实践中广泛开展,这可能与监测方法要求高、中国人群奥希替尼治疗窗尚未明确以及监测意识缺乏有关^[20]。本研究对所建立的高效液相色谱法进行了临床应用,结果显示服用相同剂量甲磺酸奥希替尼的 NSCLC 患者,其血药浓度结果在 112.694~539.877 ng·mL⁻¹,存在较大个体间差异。

本研究主要通过高效液相色谱仪建立一种检测人血浆中奥希替尼浓度的方法,并于临床进行验证与应用。方法学研究结果显示专属性,灵敏度,日内、日间精密性及稳定性良好。本方法较 LC-MS/MS 法操作要求低、无基质效应且成本较为低廉,可用于临床奥希替尼血药浓度的检测,亦可为后续血药浓度相关深入研究提供技术支持。

参考文献

- [1] 靳贺,杨黎,李春刚.非小细胞肺癌靶向治疗研究进展[J].解放军医药杂志,2020,32(7):105-111.
- [2] 林丽珠,王思愚,黄学武.肺癌中西医结合诊疗专家共识[J].中医肿瘤学杂志,2021,3(6):1-17.
- [3] 王燕,鲁钰莹,杨丽丽,等.健康体检人群肺癌危险因素的调查与分析[J].肿瘤基础与临床,2021,34(6):505-508.
- [4] Aghai F, Zimmermann S, Kurlbaum M, et al. Development and validation of a sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of ten kinase inhibitors in human serum and plasma[J]. Anal Bioanal Chem, 2021, 413(2): 599-612.
- [5] Fresnais M, Roth A, Foerster KI, et al. Rapid and sensitive quantification of osimertinib in human plasma using a fully validated MALDI-IM-MS/MS assay[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(7): 1897.
- [6] Mueller-Schoell A, Groenland SL, Scherf-Clavel O, et al. Therapeutic drug monitoring of oral targeted antineoplastic drugs[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2021, 77(4): 441-464.
- [7] 唐原君,汪硕闻,孙涛,等.HPLC法同时检测肺癌患者血浆中奥希替尼与吉非替尼的药物浓度[J].中国药师,2020,23(9):1755-1760.
- [8] Janssen JM, de Vries N, Venekamp N, et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for nine oral anticancer drugs in human plasma[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 174: 561-566.
- [9] Veerman GDM, Lam MH, Mathijssen RHJ, et al. Quantification of afatinib, alectinib, crizotinib and osimertinib in human plasma by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry; focusing on the stability of osimertinib[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1113: 37-44.
- [10] 刘晓云,陈笑艳,钟大放.共价酪氨酸激酶抑制剂的代谢和药理学[J].药学学报,2019,54(3):432-439.
- [11] Zhang DF, Jiao Y, Liu Y, et al. Progress of small molecule anti-tumor covalent drugs[J]. J Chin Pharm Univ, 2017, 48: 1-7.
- [12] Dickinson PA, Cantarini MV, Collier J, et al. Metabolic disposition of osimertinib in rats, dogs, and humans: insights into a drug designed to bind covalently to a cysteine residue of epidermal growth factor receptor[J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(8): 1201-1212.
- [13] 王思哲.奥希替尼的合成研究及其制剂的制备[D].武汉:武汉工程大学,2020.
- [14] 姜坤,付远春,徐虹,等.奥希替尼致43例不良反应的文献分析[J].中国药物应用与监测,2021,18(5):314-318.
- [15] Garcia-Ferrer M, Wojnicz A, Mejia G, et al. Utility of therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib in chronic myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Ther, 2019, 41(12): 2558-2570, 2557.
- [16] 鲁美琦,窦鹏挥,王振,等.奥希替尼药物临床研究进展[J].广东化工,2023,50(6):82-84.
- [17] Vishwanathan K, Dickinson PA, So K, et al. The effect of itraconazole and rifampicin on the pharmacokinetics of osimertinib[J]. Clin Pharmacol, 2018, 84: 1156-1169.
- [18] Vishwanathan K, Dickinson PA, Bui K, et al. The effect of food or omeprazole on the pharmacokinetics of osimertinib in patients with non-small-cell lung cancer and in healthy volunteers[J]. Clin Pharmacol, 2018, 58: 474-484.
- [19] Solassol I, Pinguet F, Quantin X. FDA-and EMA-approved tyrosine kinase inhibitors in advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer: safety, tolerability, plasma concentration monitoring, and management[J]. Biomolecules, 2019, 9(11): 668.
- [20] 李力,肖昌钱,李贺,等.LC-MS/MS法测定非小细胞肺癌患者血浆中奥希替尼浓度[J].中国临床药理学杂志,2019,35(19):2381-2384.

(收稿日期:2023-05-10;修回日期:2023-06-26)

功能化氧化石墨烯搭载双氯芬酸对大鼠膝骨关节炎的药效研究

薛泽宇, 庞铭诗, 刘元艳* (北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要: 目的 合成 PEP-PEG-GO/DIC 纳米片并研究其对膝骨关节炎 (KOA) 大鼠的药效。方法 通过红外、电镜、粒径及电位表征 PEP-PEG-GO/DIC, 并检测其载药量、释药曲线, 然后通过膝关节给药治疗 KOA 模型大鼠, 观察病理、免疫组化染色以及测定 TNF- α 、IL-6、MMP-13 在大鼠膝关节组织匀浆中的含量, 对比 PEP-PEG-GO/DIC 与双氯芬酸 (DIC) 单药的治疗效果。结果 合成的 PEP-PEG-GO/DIC 为不规则片状, 电位为 (18.3 \pm 0.9) mV, 平均直径为 (402.7 \pm 5.4) nm。PEP-PEG-GO/DIC 相较于单独 DIC 药物组对 KOA 模型大鼠病理损伤更轻, 炎症和疾病标志物含量更低。结论 PEP-PEG-GO/DIC 能够提高 DIC 对于 KOA 的治疗作用, 能够在关节腔内注射后持续缓慢释放药物, 延长药物在关节内的停留时间, 提高治疗效率, 并且有效缓解 KOA 的软骨损伤, 减少炎症因子, 具有生物安全性。

关键词: 膝骨关节炎; 氧化石墨烯; 双氯芬酸; 功能化纳米片

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3239-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.022

Effect of functional graphene oxide with diclofenac on knee osteoarthritis in rats

XUE Ze-yu, PANG Ming-shi, LIU Yuan-yan* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102)

Abstract: Objective To synthesize PEP-PEG-GO/DIC nanosheets and determine the effect on knee osteoarthritis (KOA) in rats. **Methods** PEP-PEG-GO/DIC was characterized by NIR, electron microscope, particle size and zeta potential, and its drug loading and release curve were measured. Then, KOA model rats were treated via knee joint administration. The pathological and immunohistochemical stainings were observed, and the content of TNF- α , IL-6 and MMP-13 in the knee joint tissue homogenate of rats was determined. The therapeutic effect of PEP-PEG-GO/DIC was compared with that of diclofenac monotherapy. **Results** The synthesized PEP-PEG-GO/DIC was irregular, fragments with a potential of (18.3 \pm 0.9) mV and an average diameter of (402.7 \pm 5.4) nm. Compared with the DIC alone, KOA model rats had less pathological damage and lower levels of inflammation and disease markers. **Conclusion** PEP-PEG-GO/DIC can improve the therapeutic effect of DIC on KOA, and can release drugs slowly and continuously after intraarticular injection. It can prolong the residence time of drugs in joints, effectively alleviate the cartilage injury of KOA, reduce the inflammatory factor and side effects of DIC, and it is biosafe.

Key words: knee osteoarthritis; graphene oxide; diclofenac; functionalized nanosheet

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种由年龄、肥胖、炎症、创伤及遗传因素等多种因素引起的慢性退行性疾病, 易发生于中老年人群, 发病率高且预后差。其中以膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 最为常见, 在 65 岁以上膝痛的

中老年人群中患病率超过 50%^[1], 75 岁以上超过 80%^[2-3]。临床表现为关节疼痛、关节活动受限及关节畸形, 病理表现包括软骨破坏、增生及骨赘形成。目前的治疗策略主要包括关节镜、关节置换术等可能损伤关节的手术治疗以及抗炎、软骨

作者简介: 薛泽宇, 男, 硕士研究生, 主要从事新型纳米药物研究, email: 913059627@qq.com *通信作者: 刘元艳, 女, 研究员, 主要从事中药药效物质基础研究, email: yyliu_1980@163.com

修复等为目的的药物治疗。双氯芬酸 (diclofenac, DIC) 为一线非甾体抗炎药 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 能够抑制炎症发生且促进软骨形成, 相较于塞来昔布治疗起效速度更快^[4]。周志洁等^[5]通过膝关节注射复方双氯芬酸钠研究其对 KOA 大鼠的影响, 发现其可以起到修复软骨、抑制炎症因子的作用。尽管 DIC 对 KOA 的抗炎镇痛效果较好, 但长期使用会导致胃肠道损伤、肾损伤、肝损伤等器官的损伤, 限制了其临床使用。针对 KOA 的发病特点, 局部关节腔注射法给药的疗效优于口服给药, 且可降低药物对患者全身的不良反^[6-7], 但在关节药物注射治疗中, 滑膜关节的屏障和清除作用是很大的挑战。由于滑液交换, 关节注射的小分子药物将迅速被清除, 治疗时, 需要增加注射频率, 但会造成额外的损伤, 并使患者依从性降低。纳米药物递送系统如金属纳米颗粒、脂质体及水凝胶等用于 KOA 治疗药物时, 可延长小分子在关节腔中的停留时间^[8-12]。

氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 是由石墨烯经过氧化作用得到的二维纳米材料, 具有高比表面积、高透光率、高强度、高柔韧性、光致发光能力、良好的导电性和导热性等特性, 还具有边缘亲水中间疏水、高度可调节性等化学性质, 以及抗菌、抗炎、润滑、清除活性氧等生物学性质^[13]。GO 的边缘富有活跃的羧基、羟基、环氧基等基团, 在生物环境内 GO 会与蛋白、细胞等作用而对其造成损伤, 因此需要对其进行功能化修饰来增加其稳定性。对 GO 表面进行功能化修饰分为共价和非共价修饰两种。共价修饰是依靠 GO 表面具有能够进行酯化、酰化等共价修饰的含氧基团。非共价修饰主要是依靠 π - π 共轭、氢键、范德华力、离子反应等分子间作用力。在使用生物相容性好的材料如聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG), 对 GO 修饰后增强了其稳定性, 改善了其亲水性, 减小了不良反应, 更能够发挥其优势^[14]。并且, GO 结构中有 π 电子基团, 能够通过 π - π 堆叠作用力吸附含有苯环的分子, 提高药物的装载能力。DIC 结构中含有苯环, 因此适合用功能化 GO 装载实现缓释, 提高局部药物浓度, 降低其不良反应。关节软骨基质中的胶原蛋白有许多种, 其中 II 型胶原蛋白占 90% ~ 95%^[15]。KOA 病理状态下, 关节软骨的蛋白聚糖丢失, 软骨基质降解导致了 II 型胶原蛋白暴露在关节腔中, 因此, 可以利用具有与胶原蛋白结合能力的物质实现关节软骨的靶向递送。Rothenfluh 等^[16]利用噬菌体展示技术筛选

出了胶原靶向肽 (collagen peptide, PEP, 序列为 WYRGRL), 相较于干扰肽修饰, 经过靶向肽修饰的纳米粒子在关节软骨中的含量高出 70 多倍。研究表明, PEP 修饰的纳米粒子在关节腔内的半衰期相较于未修饰的纳米粒子延长了 12 倍^[17]。此外, KOA 关节腔内大量的炎性细胞浸润, pH 值从生理状态下的中性变为弱酸性。同时在细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中还存在着天然带有弱酸性的黏多糖, 使 ECM 表面呈现弱负电, 这一静电作用使得带正电的粒子便于进入软骨下骨深处^[18]。而 PEP 为带正电的粒子, 用其修饰 GO 后能够使纳米药物更容易靶向软骨下骨。

本研究设计了一种靶向软骨下骨的功能化 GO 纳米片装载 DIC, 通过 PEG 修饰改善 GO 的溶解性和生物相容性, 利用 PEP 与 II 型胶原蛋白特异性结合的能力实现靶向递送, 同时 PEP 带正电, 能够使电位上升, 便于使载体通过负电黏多糖网络达到软骨下骨进行治疗, 缓慢释放药物。因此, 合成得到的 PEP-PEG-GO/DIC 纳米片具有生物相容性良好、靶向性强、载药量高等优势, 为 KOA 的局部给药治疗提供了一种可选择的有效方案。

1 材料

1.1 仪器

电子分析天平 (德国 Sartorius, 万分之一), TCQ-250 超声清洗器 (北京医疗设备二厂), 傅里叶变换红外光谱仪、高速冷冻离心机、酶标仪 (赛默飞世尔科技公司), 透射电子显微镜 (日本 JEM-1400Flash), 扫描电子显微镜 (日本 JSM-IT200), 紫外分光光度计 (上海佑科), 磁力搅拌器 (科瑞仪器有限公司), 粒径电位仪 (英国马尔文公司 Zetasizer Nano-ZS90), 冷冻干燥机 (日本 JEM-1400), 恒温水浴锅 (日本 EYELA 公司), 注射器 (欧健医用器材公司), 盖玻片、防脱载玻片 (美国 Corning), 脱钙机 (湖南康利来医疗器械公司), 移液枪、离心机 (Eppendorf), 恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司), 超纯水机 (Millipore)。

1.2 试药

氧化石墨烯分散液 (先丰纳米, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 50 ~ 200 nm), 氨基聚乙二醇巯基 (NH_2 -PEG-SH, MW: 2000, 上海芃硕生物), II 型胶原靶向肽 (PEP, 序列为 WYRGRL, 西安瑞禧生物), 双氯芬酸钠 (CAS 号: 15307-79-6, 上海源叶生物, HPLC $\geq 99\%$), 氢氧化钠、盐酸 (国药化学试剂有限公司), 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺 (EDC, 含量: 98.5%, 麦克林), N-羟基丁二酰亚胺 (NHS, 99%, 上海源叶生物),

氯乙酸钠 (迈瑞尔), 30% 过氧化氢 (AR, 北京化工厂), 碘乙酸钠 (麦克林), 戊巴比妥钠 (青岛捷世康生物科技有限公司), 碘伏 (上海展云化工公司), EDTA 脱钙液、4% 多聚甲醛、苏木素-伊红染色试剂盒、改良番红 O-固绿软骨染色液 (北京索莱宝科技有限公司), 生理盐水 (金山化学有限公司), 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥科技有限公司), 基质金属蛋白酶-13 (MMP-13) 一抗 (美国博士德), 大鼠肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6、MMP-13 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 15 只来自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 体重均为 200 g 左右, 许可证编号 SCXK (京) 2019-0010。

2 方法

2.1 合成路线

制备过程如图 1 所示。GO 经过羧基化后, 和 $\text{NH}_2\text{-PEG-SH}$ 分子中的氨基发生酰胺化反应, 使 PEG 连接到 GO 表面, 随后利用 PEG 一段的巯基与 PEP 中的巯基形成二硫键, 制备获得 PEP-PEG-GO, 最后通过 GO 结构中间的 $\pi\text{-}\pi$ 堆叠吸附带有苯环结构的 DIC, 获得 PEP-PEG-GO/DIC。

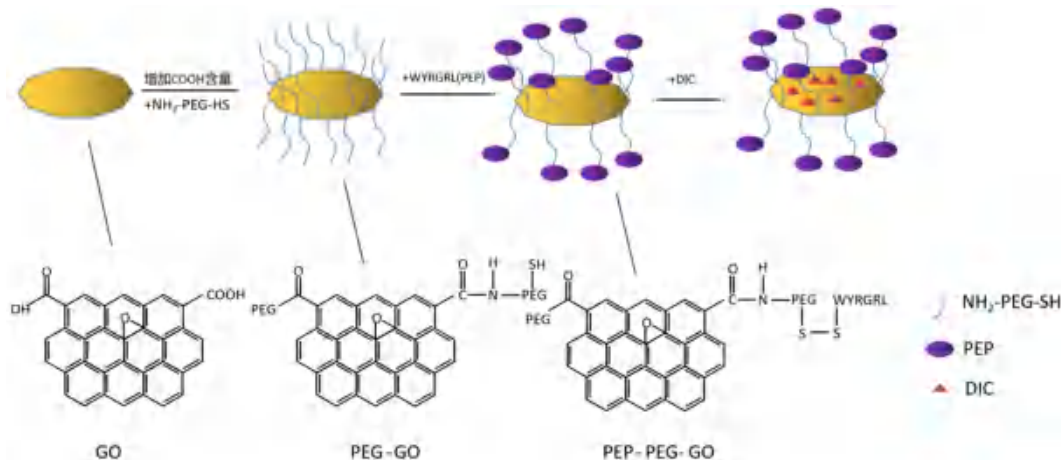


图 1 PEP-PEG-GO/DIC 的合成过程

Fig 1 Synthesis of PEP-PEG-GO/DIC

2.1.1 GO 的羧基化 首先量取 50 mL GO 分散液置于烧杯中, 称取 5.0 g 氯乙酸钠和 5.0 g 氢氧化钠, 溶于装有 GO 分散液的烧杯中, 室温下用磁力搅拌器搅拌 2 h。用盐酸调节 pH 至 7, 得到的溶液在室温下透析 48 h, 经过干燥得到羧基化 GO。

2.1.2 PEG 修饰 GO 称取 40 mg 的 $\text{NH}_2\text{-PEG-SH}$ 加入烧杯中, 加适量蒸馏水溶解。称取 100 mg EDC 和 50 mg NHS 加入 PEG 溶液中, 室温搅拌 3 h。称取 25 mg 干燥的羧基化 GO 于适量蒸馏水中, 称取 25 mg EDC 和 50 mg NHS 加入 GO 悬液中, 室温搅拌 3 h。随后将搅拌好的 $\text{NH}_2\text{-PEG-SH}$ 溶液逐滴加至搅拌好的 GO 混悬液中, 室温下搅拌 24 h, 得到的溶液在室温下透析 48 h, 采用水作为透析液, 经过干燥得到黑色的 PEG-GO。

2.1.3 PEP-PEG-GO 的合成 称取适量 PEG-GO 于烧杯中, 加入蒸馏水, 超声 10 min。称取适量 PEP 加入混悬液, 加入适量 30% 过氧化氢, 室温下搅拌 24 h。以水为透析液透析 48 h, 干燥得到 PEP-PEG-GO。

2.1.4 PEP-PEG-GO/DIC 的合成 称取干燥的 PEP-PEG-GO 10 mg, 加入 10 mL PBS 中, 超声

10 min 制成混悬液, 加入 10 mL 的 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的双氯芬酸钠溶液, 以 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 在室温下搅拌 3、6、12、20、24 h, 反应完成后, 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 保留上清液以备后续实验, 沉淀干燥后得到 PEP-PEG-GO/DIC。

2.2 PEP-PEG-GO 的表征

2.2.1 GO、GO-COOH、PEG-GO、PEP-PEG-GO 的红外光谱 用傅里叶变换红外光谱仪对产物的红外光谱进行表征。将干燥的纳米颗粒样品按照质量分数 1 : 100 与溴化钾粉末混合, 为防止吸收水分, 将其置于烘灯下充分研磨。将研磨好的样品放在压片模具上, 将其压成均匀的样品薄片, 迅速将样品薄片置于红外光谱仪进行检测。检测时红外光谱分析仪的分辨率为 0.5 cm^{-1} , 信噪比为 40 000 : 1, 波数范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。

2.2.2 GO、PEG-GO、PEP-PEG-GO 的 Zeta 电位与粒径 分别取适量 GO、PEG-GO、PEP-PEG-GO 分散于水中, 使得质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 超声 30 min 后, 转移到测量皿中, 使用粒径电位仪测定其粒径以及电位, 参数设置为 25°C , 平衡时间为 10 s, 测量均重复 3 次, 最终结果取平均值。

2.2.3 PEP-PEG-GO/DIC 的形貌分析 使用扫描电子显微镜对 PEP-PEG-GO/DIC 的形貌进行分析。将干燥后的样品研磨处理后,置于加速电压为 200 kV 的电子显微镜下观察。根据照片中各处灰度不同,可看出其形态。

使用透射电子显微镜对 PEP-PEG-GO/DIC 的形貌进行分析。取适量样品分散于水中,并滴于铜片上,由于 GO 具有导电性,所以不需要在样品上镀电导层。待样品干燥后,将铜片粘在样品座上的导电胶带上,在电压为 20.0 kV 的条件下进行扫描,记录扫描电镜图,并进行分析。

2.3 载药以及释药实验

2.3.1 载药量测定 首先绘制双氯芬酸钠标准曲线。精密称取 1 mg 双氯芬酸钠溶解于 10 mL PBS (pH 6.2) 中,转移到 25 mL 量瓶中定容,分别用移液枪移取 1000、2000、3000、5000 μL 的双氯芬酸钠溶液至 25 mL 量瓶中,用 PBS 定容到 25 mL,分别得到 0.0016、0.0032、0.0048、0.0080 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的双氯芬酸钠溶液。使用紫外分光光度计在 280 nm 波长处测定吸光度,根据吸光度和对应的溶液浓度绘制标准曲线。

收集“2.1.4”项下离心后的上清液,用紫外分光光度计测定吸光度,并根据标准曲线计算未装载的药物质量,根据公式计算载药量:

$$\text{载药量}(\%) = (M_1 - M_2) / M_{\text{PEP-PEG-GO}} \times 100\%$$

M_1 代表双氯芬酸初始质量, M_2 代表未装载的双氯酚酸质量。

2.3.2 释药曲线 精密称取 5 mg PEP-PEG-GO/DIC 分散到 10 mL PBS 释放介质中,再转移至透析袋中,密封,置于装有 500 mL 的 PBS (pH = 6.2) 的烧杯中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温搅拌。间隔一定时间 (0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、48、72 h) 取样,每次取样 5 mL,并补入空白释放介质 5 mL。样品过滤后,使用紫外检测在 280 nm 测定吸光度并利用“2.3.1”项下测定的标准曲线确定浓度,并计算释药量,以释放时间作为横坐标,释药量作为纵坐标,绘制体外释放曲线。同法绘制 pH 7.4 下的释放曲线。

2.4 动物实验

2.4.1 造模 Wistar 大鼠适应性喂养一周后,随机分为 KOA 组, DIC 组, PEP-PEG-GO/DIC 组, 每组 5 只。分组造模给药,在麻醉的状态下使用脱毛剂将左膝关节附近毛脱去,并用 75% 乙醇擦去多余脱毛剂,在其左膝关节单次注射 50 μL (20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的碘乙酸钠溶液^[19]。通过观察膝关节损伤以及组织切片判断造模情况。

2.4.2 给药 大鼠造模成功后进行分组给药,根

据“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算给药剂量^[5],每组注射时间保持一致。KOA 组:注射生理盐水; DIC 组:注射双氯芬酸钠药物 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; PEP-PEG-GO/DIC 组:注射相当于搭载 DIC 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 PEP-PEG-GO/DIC。每周膝关节注射给药一次,持续 4 周。每日观察动物的日常活动,在实验开始前及结束实验前各称重一次,实验期间每周称量体重一次。通过检测大鼠膝关节组织匀浆中 MMP-13、IL-6、TNF- α 的含量判断治疗效果。

2.4.3 组织病理学改变观察 给药结束后将各组大鼠处死,取患肢,去除非必要组织,保留完整膝关节,进行观察拍照并按照 Pelletier 大体标准对其评分,评估各组软骨变化^[20]。由两名实验人员统一评分标准后遵循双盲原则进行评分并计算均值。评分依据如下,0 分:大鼠膝关节面光整,色泽如常;1 分:大鼠膝关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;2 分:大鼠膝关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表层或中层;3 分:大鼠膝关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;4 分:大鼠膝软骨剥脱,软骨下骨质暴露。

2.4.4 组织学染色 使用 4% 多聚甲醛固定大鼠膝关节 48 h,然后将固定好的大鼠膝关节标本放到 10% EDTA 脱钙液中,使用脱钙机脱钙,脱钙时间持续一个月,间隔两日进行一次 10% EDTA 的脱钙液的更换,最终大鼠膝关节组织变软说明脱钙完成,结束脱钙。随后使用自来水将残留在大鼠膝关节表面的脱钙液冲洗干净,之后将组织转移到脱水机内使用预先设好的浓度梯度的乙醇进行脱水,再使用透明剂处理,使膝关节透明。然后熔化石蜡加到包埋框中,立即按照包埋面要求将大鼠膝关节组织转移到包埋框,贴好标签,冷却后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。需要时取出蜡块,使用切片机连续切片,片厚 5 μm 。切片贴附到防脱载玻片上,65 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 4 h,最后室温保存在切片盒中备用。切片用于苏木素-伊红染色,番红 O-固绿染色以及 MMP-13 和 Col2A 免疫组织化学染色^[21]。番红 O-固绿染色切片按照 OARSI 标准进行评分,由两名实验人员统一评分标准后遵循双盲原则进行评分并计算均值。

使用显微镜对切片进行观察,用 PANNORAM-IC 全景切片扫描仪将组织切片进行扫描。使用 SlideViewer2.5 扫描软件选取组织的目的区域进行 200 倍或 400 倍成像。成像完成后使用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件,统一以像素面积 pixel 作为标准单位,分别测量每张切片中 3 个视野阳性的累计光密度值 (IOD) 以及对应的阳性像素面积 (Area),并计算出平均光密度值 (AOD 值) = IOD/Area。

2.4.5 大鼠膝关节组织匀浆中 MMP-13、IL-6 及 TNF- α 含量检测 采用预冷的 PBS (0.01 mol·L⁻¹, pH 7.4) 冲洗组织, 去除残留血液, 称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与 PBS 按 1:9 的重量体积比, 在 PBS 中加入蛋白酶抑制剂加入玻璃匀浆器中, 在冰上充分研磨。为了进一步裂解组织细胞, 对匀浆液进行反复冻融。最后将匀浆液于 2~8℃, 5000×g 离心 5~10 min, 取上清液进行检测。

3 结果

3.1 PEP-PEG-GO/DIC 的表征

3.1.1 红外表征 如图 2 所示, GO 的红外光谱, 在 3400、1630 和 1050 cm⁻¹ 处有特征峰, 3400 cm⁻¹ 处是 O-H 伸缩振动峰, 1630 cm⁻¹ 处是 C=C 伸缩振动峰, 1050 cm⁻¹ 处是 C-O 伸缩振动峰。羧基化后 1630 cm⁻¹ 处的 C=C 峰吸收增加, 说明 GO 表面羧基含量增加。与 GO 相比, GO-PEG 的红外光谱中增加了 1100 cm⁻¹ 的 C-O, 2900 cm⁻¹ 的 C-H, 1640 cm⁻¹ 的 NH-CO 这 3 个特征峰, 说明 GO 与 NH₂-PEG-SH 之间的酰胺键生成, 证明了 PEG 的成功修饰。相较来说, PEP-PEG-GO 的红外光谱无法判断出 PEP 是否修饰成功, 需要根据其他结果进行判断。

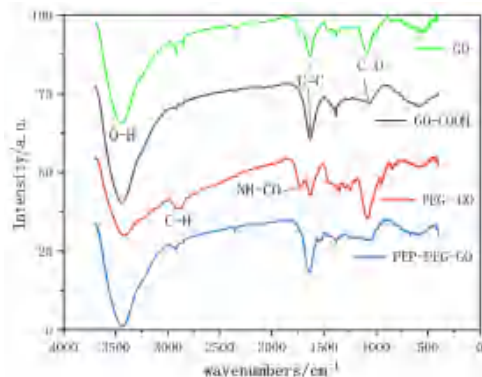


图 2 GO、GO-COOH、PEG-GO 及 PEP-PEG-GO 的红外光谱图
Fig 2 NIR spectral of GO, GO-COOH, PEG-GO, and PEP-PEG-GO

3.1.2 Zeta 电位与粒径 PEP-PEG-GO/DIC 合成中电位和粒径的变化结果见表 1, 初始 GO 电位为 (-26.5±0.9) mV, 粒径为 (206.3±3.4) nm; 在经过 PEG 修饰后, 电位变为 (-8.2±0.8) mV, 粒径变为 (321.3±2.8) nm; 使用 PEP 修饰后, 电位变为 (18.3±0.9) mV, 粒径变为 (402.7±5.4) nm。初始 GO 为负电位, PEG 修饰后将 GO 包裹起来屏蔽了一部分的负电, 因此电位上升。PEP 为带正电的阳离子, 因此在连接之后使电位上升为正电位, 证明 PEP 成功修饰。电位的上升能够使纳米片更容易穿过软骨表面负电屏障, 粒径增大能够降低纳米片对细胞的毒性, 降低其在关节内的清除速率, 但可能会降低穿过软骨的效率^[18, 22]。

表 1 合成过程中粒径与电位的变化

名称	Zeta 电位 /mV	粒径 /nm	PDI
GO	-26.5±0.9	206.3±3.4	0.279
PEG-GO	-8.2±0.8	321.3±2.8	0.438
PEP-PEG-GO	18.3±0.9	402.7±5.4	0.265

3.1.3 PEP-PEG-GO/DIC 的形貌分析 扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察 PEP-PEG-GO/DIC 的形貌, 结果见图 3, 能够看到其形貌为不规则片状, 直径大多为 200~500 nm, 链状 PEG 枝接在 GO 片上, 表明 PEG 成功修饰。

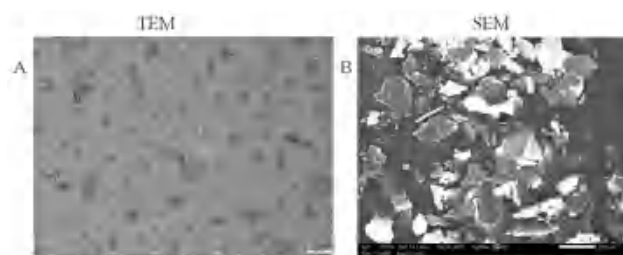


图 3 PEP-PEG-GO/DIC 纳米片的透射电子显微镜图 (A) 及扫描电子显微镜图 (B)

Fig 3 TEM (A) and SEM (B) of PEP-PEG-GO/DIC nano sheets

3.2 PEP-PEG-GO/DIC 搭载药物与释药测定

绘制双氯芬酸钠的浓度-吸光度标准曲线, 线性方程为 $Y = 30.846X - 0.0499$ ($R^2 = 0.997$)。经过计算得到最终载药量为 (98±0.91)%。

生理状态下关节内 pH 为中性, KOA 病变时关节内由于炎症导致 pH 降低。实验中采用 pH 6.2 的缓冲液模拟关节内的环境。

从图 4 中可看出, 在 pH 为 6.2 的环境中 PEP-PEG-GO/DIC 释药速度较快, 最终释药率也更高 (61.2%)。前期由于药物浓度差导致释药速率较快, 2 h 释药量约为 0.99 mg, 无突释现象。随着浓度差降低, 释药速率逐渐变缓, 72 h 后视为药物全部释放, 累计释药量为 3.06 mg。

3.3 PEP-PEG-GO/DIC 对 KOA 大鼠的治疗效果

3.3.1 组织观察与评分 大鼠膝关节照片结果如图 5 所示。通过肉眼观察可以看出, KOA 组可见明显炎症表现, 软骨表面出现损伤, 软骨表面溃疡, 呈现出较大面积缺损糜烂, 损伤达到软骨深层, 部分软骨剥脱, 露出软骨下骨面。DIC 组软骨表面轻度损伤, 软骨缺损面积不大, 部分软骨缺损达到软骨表层或中层, 软骨表面轻度糜烂。PEP-PEG-GO/DIC 组可以看出软骨表面轻度损伤, 软骨面粗糙, 软骨表面未见糜烂, 未见明显软骨缺损。图 6 为对大鼠关节软骨的评分, KOA 组评分最高, DIC 组和 PEP-PEG-GO/DIC 组评分低于 KOA 组。评分高低为 KOA 组 > DIC 组 > PEP-PEG-GO/DIC 组。各

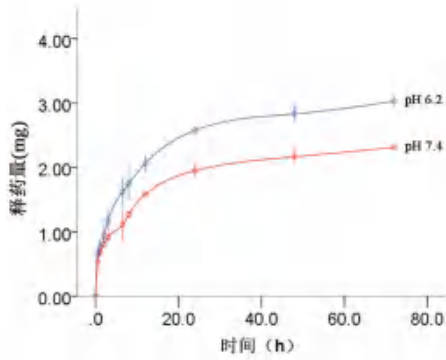


图 4 PEP-PEG-GO/DIC 在 pH 6.2 和 pH 7.4 环境下的药物释放曲线
Fig 4 Drug release curve of PEP-PEG-GO/DIC in pH 6.2 and pH 7.4

组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



图 5 大鼠膝关节照片

Fig 5 Rat knee joint

A. KOA 组 (KOA group); B. DIC 组 (DIC group); C. PEP-PEG-GO/DIC 组 (PEP-PEG-GO/DIC group)

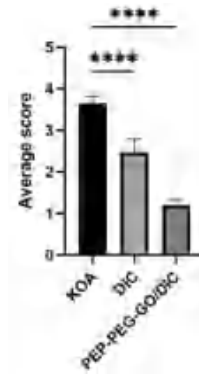


图 6 各组大鼠膝关节软骨评分 (**** $P < 0.05$)

Fig 6 Knee cartilage score of rats in each group (**** $P < 0.05$)

3.3.2 组织学染色 HE 染色结果见图 7。可看出 KOA 组表现出关节炎炎症, 软骨表面出现裂隙, 裂隙直达软骨下骨。DIC 组仍能观察到软骨炎症, 软骨表面较薄, 有少量裂隙。PEP-PEG-GO/DIC 组的软骨表面较为完整, 软骨层较厚, 表现好于 KOA 组和 DIC 组, 表明 PEP-PEG-GO/DIC 能够有效修复软骨损伤。

番红 O-固绿染色能够看出软骨基质中蛋白聚糖含量的变化。染色结果如图 8, KOA 组呈



图 7 大鼠组织学 HE 染色 ($\times 20$)

Fig 7 HE staining of rat histology ($\times 20$)

现出炎症表现, 软骨层较为薄, 红色少, 呈现软骨缺损, 同时还有蛋白聚糖含量减少, 损失严重, 软骨表面侵蚀, 软骨细胞少, 有深达软骨下骨的裂隙, 基质损失严重。DIC 组也呈现出炎症

表现, 软骨基质中蛋白聚糖相较 KOA 组增多。PEP-PEG-GO/DIC 组软骨结构较为完整, 炎症表现不明显蛋白聚糖含量最为丰富。结果 KOA 组 >

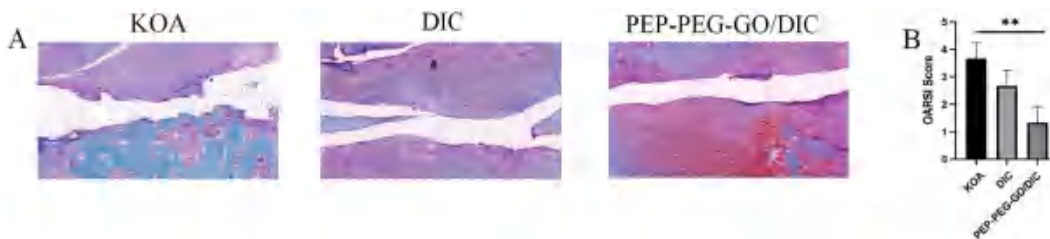


图 8 各组大鼠膝关节番红 O-固绿染色 ($\times 20$, A) 及切片的 OARSI 评分 (B)

Fig 8 O-solid green staining of rat knee joint ($\times 20$, A) and its OARSI score (B)

注 (Note): 与模型组比较, ** $P < 0.01$ (Compared with the model group, ** $P < 0.01$)。

DIC 组 > PEP-PEG-GO/DIC 组。

3.3.3 大鼠膝关节中标志物表达分析 通过免疫组化染色分析 DIC 和 PEP-PEG-GO/DIC 对 KOA 分解代谢标志物 MMP-13 的表达的影响, 从而反映软

骨损伤程度。MMP-13 作为炎性分解代谢的指标, 是 KOA 相关病理环境的标志物。结果如图 9 所示, KOA 组呈现出软骨表层和中间层的 MMP-13 强阳性表达, 而 DIC 组和 PEP-PEG-GO/DIC 组阳性表达

减弱, 尤其 PEP-PEG-GO/DIC 组的 MMP-13 阳性表达最弱, 表明 PEP-PEG-GO/DIC 能够修复关节软骨缺损。使用 ELISA 检测大鼠膝关节组织匀浆中的促炎因子 TNF- α 、IL-6 以及 MMP-13, 结果如图 9 所示。与 KOA 组相比, DIC 组和 PEP-PEG-GO/DIC

组大鼠膝关节组织匀浆中的 TNF- α 、IL-6、MMP-13 含量均有降低, PEP-PEG-GO/DIC 组的 3 项指标含量最低。说明 DIC 和 PEP-PEG-GO/DIC 对大鼠 KOA 均有治疗作用, 且 PEP-PEG-GO/DIC 较单独 DIC 药物治疗效果更好。

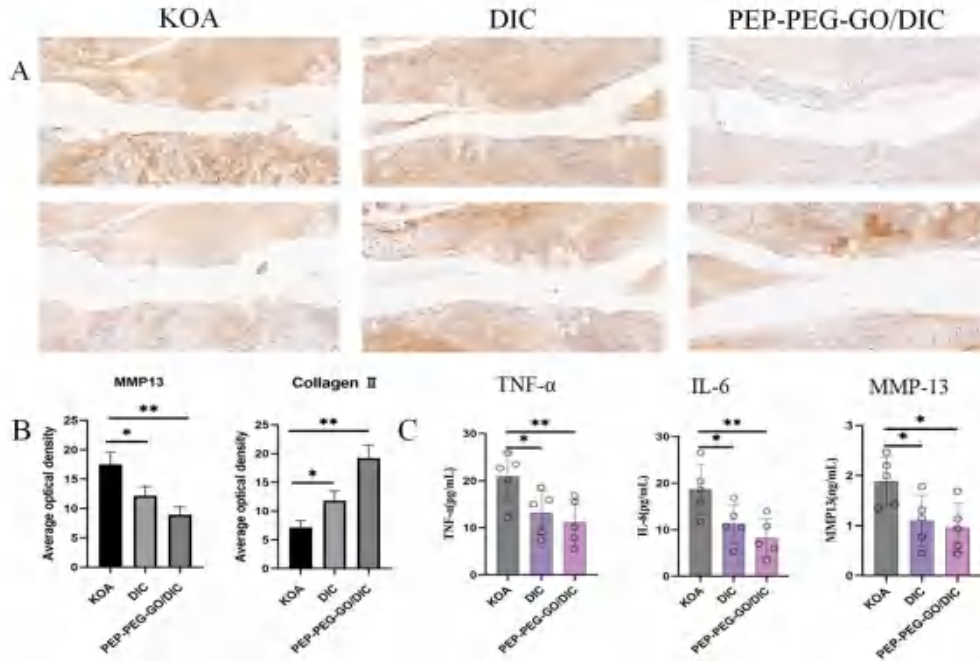


图 9 大鼠膝关节组织中 MMP-13、Col2A 的免疫组化染色 (×20) 和表达 (A) 及不同因子含量 (B)

Fig 9 Immunohistochemical staining of MMP-13 (A) and Col2A (B) and average optical density of rat knee tissue (×20) and different factors in knee tissue homogenate

注 (Note): 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

3.3.4 毒性分析 对大鼠的主要器官(肺、肝、心、肾、脾)进行组织学分析, 通过 HE 染色观察 DIC 和 PEP-PEG-GO/DIC 对大鼠主要器官的毒性影响。如图 10 所示, PEP-PEG-GO/DIC 组器官

无明显损伤, DIC 组与 KOA 组相比无明显器官组织损伤, 说明 PEP-PEG-GO/DIC 没有引起明显的体内毒性。

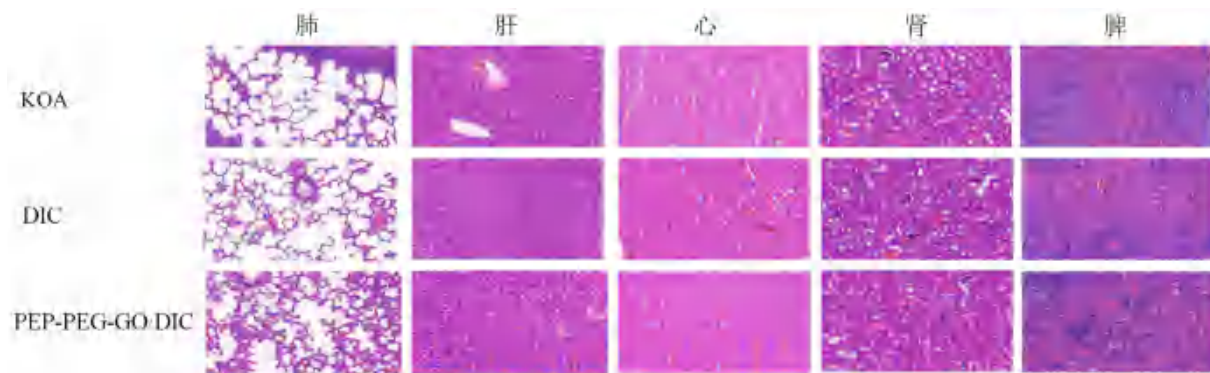


图 10 各组大鼠主要器官组织切片 HE 染色 (×20)

Fig 10 HE staining performed on major organ sections of rats in each group (×20)

4 结论与讨论

本文构建了一种经 PEG 和 PEP 修饰的 GO 纳米片搭载 DIC, 该纳米片具有良好的载药性能、pH 酸性敏感性能, 同时也具有一定的安全性和稳定性, 有利于 DIC 在 KOA 治疗中的应用。

KOA 是由多种因素引起的以关节软骨磨损、破裂、溃疡、脱失, 关节软骨下骨及周围骨反应、滑膜炎性反应、关节周围肌肉萎缩, 关节疼痛、关节功能下降的退行性关节病。关节腔内药物注射法所需时间短, 操作安全、简单, 可重复性好,

稳定性强,可模拟软骨破坏的终末环节并使关节囊保持完整,不仅降低了关节的感染率,还避免了造模过程中出现的物理损伤,适用于软骨病理、药物防治的研究,关节腔内药物注射造模时发生的病理过程与人类 KOA 接近,就目前研究 KOA 的造模方法现状来看,是比较理想的一种方法。因此本研究使用膝关节注射碘乙酸钠来进行造模。

近年研究表明,MMPs 在软骨基质降解中具有重要作用。MMPs 参与蛋白聚糖和胶原蛋白的降解,其中 MMP-13 的作用最为突出。MMP-13 是活性最强的 II 型胶原裂解酶,可直接降解 II 型胶原,还能降解聚集蛋白聚糖,造成软骨退变^[21]。免疫组化结果显示,在 KOA 组中,软骨组织的 MMP-13 免疫组化染色阳性率明显升高,呈显著强阳性,且以炎性细胞为主,纤维组织较少,说明炎症反应严重。在 DIC 组和 PEP-PEG-GO/DIC 组中,MMP-13 的阳性率明显降低,结果与组织匀浆检测中的 ELISA 实验结果一致。同时,实验结果表明还发现在 PEP-PEG-GO/DIC 组中 MMP-13 免疫组化染色阳性比 DIC 组更弱,由此说明了 PEP-PEG-GO/DIC 能够更好地抑制 KOA 模型大鼠膝关节组织中 MMP-13 的表达,进而减轻关节炎的进展。为了考察 PEP-PEG-GO/DIC 的生物安全性,该实验通过观察 PEP-PEG-GO/DIC 组大鼠心、肝、脾、肺、肾的切片,以 KOA 组为对照,判断 PEP-PEG-GO/DIC 大鼠对全身主要器官的毒性,结果显示 PEP-PEG-GO/DIC 对大鼠心、肝、脾、肺、肾无明显不良反应。

综上,本研究使用 PEG 和 PEP 修饰 GO 并搭载 DIC 通过关节腔注射治疗 KOA 模型大鼠,结果表明 PEP-PEG-GO/DIC 对 KOA 疗效较好,为 KOA 治疗提供了一种新方案。

参考文献

[1] 李娟. 骨关节炎的病理与发病因素 [J]. 医药前沿, 2017, 7 (4): 216-217.

[2] Tang X, Wang S, Zhang S, et al. The prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in China: results from the China health and retirement longitudinal study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68 (3): 648-653.

[3] Lespasio MJ, Piuizzi NS, Husni ME, et al. Knee osteoarthritis: a primer [J]. *Perm J*, 2017, 21: 16-183.

[4] 高天慈, 刘晓星, 刘路, 等. 鹤膝膏联合双氯芬酸钠缓释片治疗膝关节炎临床研究 [J]. *中国药业*, 2021, 30 (21): 89-92.

[5] 周志洁, 张兰云, 李凤国, 等. 复方双氯芬酸钠对骨关节炎大鼠软骨形态及氧化应激的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27 (26): 4154-4160.

[6] 江志勇, 许楚宏, 陈海燕, 等. 非甾体抗炎药在中医骨伤科中运用的合理性研究 [J]. *中国当代医药*, 2019, 26

(28): 114-116.

[7] Liang YJ, Xu X, Xu LM, et al. Non-surgical osteoarthritis therapy, intra-articular drug delivery towards clinical applications [J]. *J Drug Target*, 2021, 29: 609-616.

[8] Dwivedi P, Nayak V, Kowshik M. Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis [J]. *Biotechnol Progr*, 2015, 31 (5): 1416-1622.

[9] Goudarzi R, Amini S, Dehpour AR, et al. Estimation of anti-inflammatory and analgesic effects of topical NANO-CEN (nanoliposomal arthroceon) on mice [J]. *AAPS Pharm-SciTech*, 2019, 20 (6): 233.

[10] Jeoneg HK, Lee YP, Lahaye R, et al. Evidence of graphitic AB stacking order of graphite oxides [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130 (4): 1362-1366.

[11] Barinov A, Malcioglu OB, Fabris S, et al. Initial stages of oxidation on graphitic surfaces: photoemission study and density functional theory calculations [J]. *J Phys Chem C*, 2009, 113 (21): 9009-9013.

[12] Li CX, Liu R, Song YR, et al. Hyaluronic acid hydrogels hybridized with Au-triitolide nanoparticles for intraarticular targeted multi-therapy of rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 849101.

[13] Liu Z, Robinson JT, Sun X, et al. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130 (33): 10876-10877.

[14] Sun X, Liu Z, Welsher K, et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery [J]. *Nano Res*, 2008, 1: 203-212.

[15] Buckwalter JA, Mankin H, Grodzinsky A. Articular cartilage and osteoarthritis [J]. *Instr Course Lect*, 2005, 54: 465-480.

[16] Rothenfluh DA, Bermudez H, O'Neil CP, et al. Biofunctional polymer nanoparticles for intra-articular targeting and retention in cartilage [J]. *Nat Mater*, 2008, 7 (3): 248-254.

[17] Singh A, Corvelli M, Unterman SA, et al. Enhanced lubrication on tissue and biomaterial surfaces through peptide-mediated binding of hyaluronic acid [J]. *Nat Mater*, 2014, 13 (10): 988-995.

[18] 陈俊炎, 孟庆奇, 李斯明. 关节腔注射治疗骨关节炎药物载体系统中的软骨靶向功能 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28 (3): 458-463.

[19] 王明建, 巨少华, 刘攀旺, 等. 木瓜蛋白酶、碘乙酸钠和 II 型胶原蛋白酶致膝关节炎大鼠模型的对比研究 [J]. *四川医学*, 2020, 41 (2): 126-131.

[20] 吴丹, 李洁芳, 刘君. 乌头汤联合甲氨蝶呤治疗大鼠类风湿性关节炎的疗效及其与 p38MAPK 通路的相关性 [J]. *中医药导报*, 2024, 30. doi: 10.13862/j.cn43-1446.

[21] 熊锋. pH 响应型金属有机骨架纳米载药系统治疗骨关节炎的作用研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2020.

[22] Ma J, Liu R, Wang X, et al. Crucial role of lateral size for graphene oxide in activating macrophages and stimulating pro-inflammatory responses in cells and animals [J]. *ACS Nano*, 2015, 9 (10): 10498-10515.

(收稿日期: 2023-09-10; 修回日期: 2023-11-01)

综述

细胞外囊泡产生机制研究进展

田有溪^{1, 2, 3}, 师嘉欣^{2, 3}, 李子毅^{2, 3}, 彭新生^{1*}, 邱宏^{1, 2, 3*} (1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808; 2. 中国科学院上海药物研究所糖类药物研究中心, 上海 201203; 3. 中国科学院大学药学院, 北京 100049)

摘要: 细胞外囊泡 (EVs) 是包载有蛋白质、核酸、脂质和小分子物质的脂质双分子层纳米囊泡。EVs 在不同生理病理条件下均具有重要作用, 但 EVs 的高度异质性严重阻碍了 EVs 的功能研究。EVs 产生机制的多样性是 EVs 高度异质性产生的主要原因, 阐释 EVs 的产生机制有助于其功能的确定和应用。本文简要介绍了 EVs 的命名和分类, 重点综述了 EVs 的产生机制。

关键词: 细胞外囊泡; 外泌体; 微囊泡; 产生机制

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3247-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.023

Progress in the underlying mechanism for production of extracellular vesicles

TIAN You-xi^{1, 2, 3}, SHI Jia-xin^{2, 3}, LI Zi-yi^{2, 3}, PENG Xin-sheng^{1*}, QIU Hong^{1, 2, 3*} (1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan Guangdong 523808; 2. Carbohydrate-based Drug Research Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203; 3. School of Pharmacy, the University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are lipid bilayer vesicles encapsulating many proteins, nucleic acids, lipids, and small molecule metabolites. Studies have shown that EVs play important roles under physiological and pathological conditions. The EVs are highly heterogenous, which is due to the diverse mechanisms underlying the EV production, and the heterogeneity severely impeded the functional elucidation of EVs. Therefore, the elucidation of the underlying mechanism for EV production is critical for the advance of the functional investigation and the application of EVs in health and disease. This paper briefly introduces the nomenclature and classification of EVs and mainly focuses on the underlying mechanism for EV production.

Key words: extracellular vesicle; exosome; microvesicle; production mechanism

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由脂质双分子层包被的纳米囊泡, 内含蛋白质、脂质、核酸和小分子代谢物等不同物质^[1-3]。由于内容物来自其亲本细胞^[3-4], EVs 能够保持亲本细胞的功能, 如间充质干细胞产生的 EVs 和间充质干细胞一样对急性肾衰竭^[5]、心肌梗死^[6]、肝损伤^[7]和大脑神经损伤^[8]具有修复作用。EVs 能以不同方式进入靶细胞并将不同分子转运至靶细胞, 从

而参与炎症、癌症、细胞稳态维持和再生修复等不同生理病理过程^[9-10]。因此, EVs 在基因和药物递送、疾病诊断和治疗等不同领域被广泛研究。然而, 由于 EVs 的产生机制多样, 产生的 EVs 具有高度异质性, 这使得 EVs 的检测、分类和功能确定均极具挑战。阐明 EVs 的产生机制将为 EVs 的制备和应用提供重要的理论依据。为此, 本研究系统地总结了 EVs 的分类及其可能的产生机制。

基金项目: 上海市浦江人才计划资助项目 (No.19PJ1411300); 广东省教育厅普通高校重点科研项目 (No.2021ZDZX2039)。

作者简介: 田有溪, 女, 硕士, 主要从事细胞外囊泡生物学及应用研究, email: youxitian2@qq.com *通信作者: 邱宏, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事基础与转化糖科学和细胞外囊泡生物学及其应用的研究, email: hongqiu@simm.ac.cn; 彭新生, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物载体新剂型及胶原蛋白基础研究及转化研究, email: xspeng@gdmu.edu.cn

1 EVs

EVs 是由细胞产生的, 是几乎可以从所有生物体液中获得的天然纳米囊泡^[4]。1946 年, Chargaff 等^[11]首次发现通过超高速离心获得的微粒样沉淀物可以缩短血浆凝血时间; 1967 年, Wolf^[12]首次通过电镜观察这些微粒样沉淀物的形态及大小, 并将其命名为“血小板尘埃”; 1987 年, Johnstone 等^[13]首次从绵羊网织红细胞的体外培养液中通过 100 000 g 离心 90 min 获得囊泡, 这些囊泡具有网织红细胞质膜的特征, 被命名为“外泌体”。2011 年 György 等^[14]提出将所有不同类型的脂质双分子层包裹的细胞外结构称为“细胞外囊泡”。EVs 内容物包含亲本细胞来源的蛋白质、mRNA、miRNA、脂质和小分子代谢物等物质, 这些物质可通过 EVs 转运至受体细胞发挥作用, 从而介导细胞间通信^[15]。EVs 参与各种重要的生理病理过程的调控, 比如免疫调节^[16]和肿瘤细胞的生长、转移和侵袭^[17-18], 因此 EVs 可以作为疾病诊断标记物、治疗药物、药物靶标和药物载体等。

2 EVs 的命名与分类

不同细胞类型和组织均可产生 EVs, 而且因产生机制不同, EVs 的大小、形态和内容物存在异质性。EVs 命名没有统一标准, 目前存在多种命名方式。根据来源细胞或组织名称命名: 树突状细胞来源的囊泡称为 Dexosomes^[19]; 前列腺来源的囊泡称为前列腺体^[20]; 骨、软骨和动脉粥样硬化斑块中的囊泡称为基质囊泡^[21]; 来自神经元的囊泡称为突触小泡^[22]。根据囊泡的产生机制、生物物理或生化特性和受体组成将囊泡分为外泌体 (exosome)、微囊泡 (microvesicle)、凋亡小体 (apoptotic body)、外泌体样囊泡 (exosome like vesicle)、迁移体 (migrasome) 和脱落体 (ectosomes) 等, 其中最常见的是外泌体、微囊泡和凋亡小体三类^[23-26]。目前的囊泡提取分离技术还不能将不同生物途径来源的囊泡进行区分, 2018 年国际细胞外囊泡协会建议根据粒径的大小将 EVs 进行分类, 200 nm 及以下的囊泡称为小细胞外囊泡, 是目前研究最为深入的一类囊泡, 也是生物学功能相对清楚的一类囊泡; 200 ~ 500 nm 的称为中细胞外囊泡; 大于 500 nm 的称为大细胞外囊泡^[27], 见图 1。

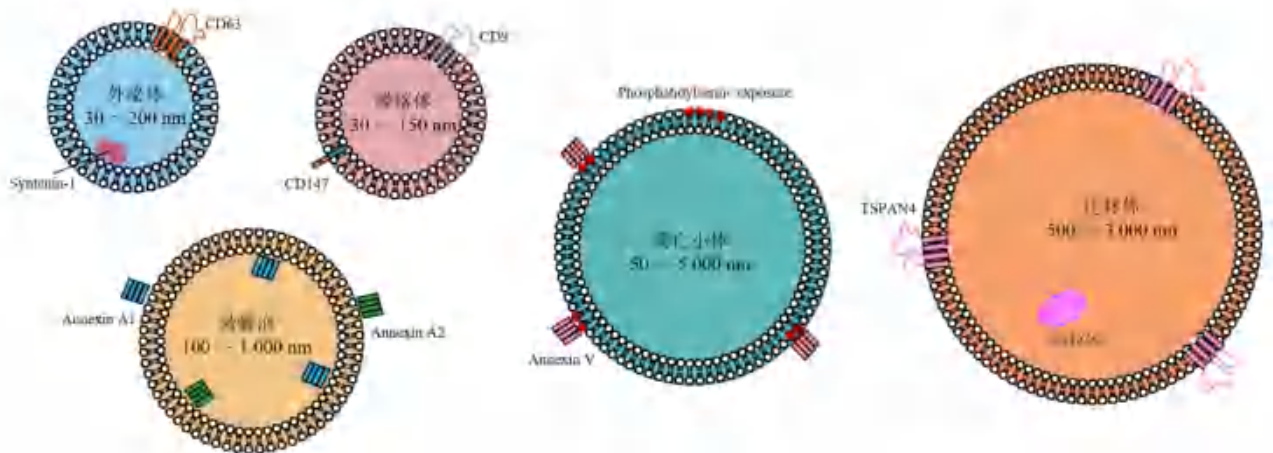


图 1 不同类型的细胞外囊泡

Fig 1 Different types of extracellular vesicles

3 EVs 的产生及产生机制

EVs 的产生同时受细胞外环境及细胞自身的调控, 不同细胞环境下相同细胞产生的囊泡也不一样。不同种类 EVs 的产生机制也不一样, 比如微囊泡是质膜外向出芽产生的膜性小泡 (membrane vesicle)^[28], 外泌体则是多囊泡体 (multivesicular body, MVB) 与质膜融合释放到细胞外环境的腔内小泡 (intraluminal vesicles, ILVs)^[29]。

3.1 外泌体的产生机制 (见图 2)

外泌体主要通过内体途径产生, 始于质膜内

陷形成的早期内体^[30-31]。早期内体膜内向芽殖, 在腔内生成 ILVs, 形成具有特征性多泡外观的多囊泡体 (MVB)。MVB 既可与质膜融合将 ILVs 释放到细胞外环境, 被释放的 ILVs 称为外泌体, 其粒径在 30 ~ 200 nm; 也可与溶酶体/自噬体进行融合将 MVB 降解^[32]。简而言之, 外泌体的生成包括三个步骤: ILVs 的生成、MVB 的转运和外泌体的释放。

3.1.1 ILV 的生成 目前已知的 ILV 生成机制根据是否有内体分选转运复合体 (the endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)

的参与,可分为两大类:ESCRT 依赖途径和非 ESCRT 依赖途径 (Syndecan-Syntenin-ALIX, 脂质, 四次跨膜蛋白质, Rab 家族蛋白质)。

① ESCRT 依赖途径: ESCRT 包含 4 种不同的蛋白质复合物 (ESCRT-0、-I、-II、-III) 及其他辅助蛋白^[33-34]。其中 ESCRT-0 是由 2 分子 HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) 和 2 分子 STAM1 (signal transducing adaptor molecule 1) 形成的异源四聚体^[35]。ESCRT-I 是一成茎型的异源四聚体,由 TSG101 (tumor susceptibility gene 101)、Vps28 (vacuolar protein sorting 28)、Vps37 和 MVB12 (multivesicular body sorting factor 12 kDa) 或 UBAP1 (ubiquitin binding associated protein 1) 组成^[36]。ESCRT-II 是由 EAP45 (Vps36)、EAP30 (Vps22) 和 2 分子的 EAP20 (Vps25) 组成的 Y 型异源四聚体^[37]。ESCRT-I 和 ESCRT-II 可以通过 Vps28 和 EAP45 (Vps36) 相互作用^[38]。ESCRT-III 的组成还不清楚,但主要包括含 α 螺旋的带电荷的多囊泡体蛋白质家族 (charged multivesicular proteins, CHMPs) 蛋白寡聚物或多聚物,以 CHMP4 (Vps32) 同源蛋白为主^[39]。ESCRT-II 和 ESCRT-III 通过 EAP20 和 CHMP6 结合^[38]。

ESCRT 是膜变形 (deformation) 和剪切的主要驱动力,也是 MVB 中 ILV 形成的主要机制^[40]。ESCRT 在早期内体膜和质膜上以连续复合物 (ESCRT-0、-I、-II、-III) 的形式结合,以调节货物分选和 ILV 形成。ILV 的形成始于早期内体膜上的货物装载,由 STAM 和 HRS 组成的 ESCRT-0 介导^[38, 41]。ESCRT-0 含有 10 个泛素结合位点,其中每个 HRS 分子上有 3 个,每个 STAM 分子上有 2 个。当泛素化货物与 ESCRT-0 复合物结合后, HRS-STAM 复合物通过 HRS 上 FYVE 结构域与早期内体膜上磷酸肌醇 3 磷酸结合而导向内体膜,然后其中泛素与 ESCRT-I 的 TSG101 上 UEV 结构域 (或者 UBAP1 上的 SOUBA 结构域和 MVB12 上的 UBA 结构域) 结合将 ESCRT-I 募集到内体膜^[38]。网格蛋白 (clathrin) 可与 HRS 结合,促进 ESCRT-0 募集。ESCRT-I 通过 Vps28 上 GLUE 结构域与膜上的磷酸肌醇 3 磷酸和泛素结合。随后, ESCRT-I 通过 Vps28 和 EAP45 (Vps36) 亚基的连接招募 ESCRT-II。之后, ESCRT-III 被 ESCRT-II 招募并使带电荷的多囊泡体蛋白 2-4 (charged multivesicular body protein, CHMP2-4) 聚合物成核,介

导 ILV 的雕刻 (sculpting) 和剪切 (scission)^[42]。ESCRT-III 也可被 ALIX (apoptosis linked gene 2 interacting protein X) 招募。最后,辅助蛋白 AAA-ATPase Vps4 解离 ESCRT III 复合体并使其循环回收^[43]。

基因敲低筛选发现,在表达 MHC-II 的 HeLa 细胞中敲低 ESCRT 相关基因 HRS、TSG101 和 STAM1 时,通过 CD63 捕获抗体结合和流式分析发现 CD63 阳性的囊泡分泌减少,而 CHMP4C、VPS4B、VTA1 (vesicle trafficking 1) 和 ALIX 敲低后 CD63 阳性的囊泡分泌增加。HRS、TSG101 和 STAM1 敲低时,囊泡相关的 CD63 和 MHC-II 分泌减少,但不同基因对细胞分泌的囊泡大小和囊泡蛋白质组成的影响不同;而 Vps4B (vacuolar protein sorting 4B) 敲低则导致囊泡相关的 CD63 和 MHC-II 分泌增加,但不改变囊泡的特征^[44]。

② 非 ESCRT 依赖途径: 研究发现同时抑制四种 ESCRT 复合物的关键亚基不能阻止 MVB 形成^[45]。随后的研究发现 Syndecan-Syntenin-ALIX 通路、脂质、四次跨膜蛋白和 Rab 家族蛋白质均可通过非 ESCRT 依赖途径调控多囊泡内腔内小泡的生成。

Syndecan-Syntenin-ALIX: 在缺乏泛素化货物和 ESCRT-0 复合物的情况下可以招募 ESCRT 相关蛋白参与 ILV 的生成和货物分选,除涉及 Syndecan、Syntenin 和 ALIX 外,这一系统发挥作用时也必须要有 ESCRT-III 存在^[46]。Syndecan 1 是一种跨膜硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,它作为共受体介导生长因子和趋化因子信号传导^[47-48]。Syntenin (SDCBP) 是一种细胞溶质因子,含有 2 个 PDZ 结构域,能与 Syndecan 羧基末端以高亲和力结合,从而将 Syntenin 募集至细胞质膜,随后 Syntenin 通过其 N 末端与 ALIX 结合,这一结合可促进 ESCRT-I 蛋白 TSG101 和 ESCRT-III 蛋白 Vps32 (CHMP4) 相互作用,促进 Syndecan 在多囊泡体内向出芽至 ILV 中,从而促进 ILV 的生成以及货物分选^[46]。此外,该过程还依赖 Src 介导的 Syndecan 1 内吞并且与 PLD2 (phospholipase D2) 和 ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) GTPase 活性调节有关^[49-50]。

脂质 (lipids): Trajkovic 等^[51] 发现少胶质细胞 Oli-neu 产生的囊泡中富含胆固醇、鞘脂和神经酰胺。神经酰胺由中性鞘磷脂酶 2 (neutral sphingomyelinase 2, nSMase 2) 水解去除鞘磷脂中磷酸胆碱部分后形成,它可以通过两种不同方式促

进 ILV 生成: ① 诱导微区结构聚集, 促进微区结构诱导出芽 (domain induced budding); ② 神经酰胺的锥形结构通过产生膜叶之间的面积差异引起自发性负性膜弯曲 (negative membrane curvature)^[52]。这种 ILV 生成途径在多种肿瘤细胞的研究中得到了证实, 其中 EVs 在抑制神经酰胺的合成时减少并在采用神经酰胺刺激时增加^[53-55]。胆固醇是 MVB 的重要组成部分, 是另一种 EVs 膜上富集的脂质^[56-57]。研究表明, 少突胶质细胞晚期内体的胆固醇累积能以筏蛋白 (flotillin) 依赖的方式增加 EVs 分泌^[58]。

四次跨膜蛋白质 (tetraspanins): tetraspanin 家族蛋白质^[59-60]含有 4 个跨膜结构域, 在哺乳动物中具有 33 个成员, 包括 CD9、CD37、CD51、CD53、CD63、CD81、CD82 等^[61-62]。Van 等^[60]发现人黑色素细胞中前黑素小体蛋白 PMEL 的 ILV 分选与泛素化和 ESCRT 无关, 而 CD63 的敲低导致 PMEL 的 ILV 分选和 ILV 生成减少。黑色素瘤细胞中具有靶向作用的 EVs 生成和唐氏综合征患者成纤维细胞中 EVs 的生成也依赖于 CD63^[59, 63]。进一步的研究发现载脂蛋白 E 参与了 CD63 介导的非 ESCRT 依赖的 ILV 生成和释放^[59, 64]。Perez 等^[65]通过蛋白质组学分析发现细胞 CD81 富集的膜微区结合和粘附的蛋白质与囊泡中鉴定的蛋白质大量重叠, 这说明 CD81 参与 ILV 货物分选。CD9 和 CD82 的过表达/敲低可以增加/减少以 EVs 释放的 β -连环蛋白 (β -catenin)^[66]。

Rab 家族蛋白质: Wei 等^[67]通过构建表达组成型活化形式的 Rab-GTP 酶的稳转细胞株, 发现依赖于 Rab31 的 ILV 生成不会因 ESCRT 相关基因 (Hrs、Tsg101 和 Alix) 或四次跨膜蛋白 (CD9 和 CD81) 的敲低而发生改变, 而抑制神经酰胺和胆固醇的生成会使 ILV 生成减少。进一步研究发现, 在被表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 等受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTKs) 磷酸化后, Rab31 被激活, 通过与脂筏微区 Flotillin 蛋白的 SPFH 区域结合, 驱动 EGFR 等进入 CD63 阳性的 MVB, 促进 ILV 生成。

3.1.2 MVB 的命运抉择——降解还是释放 ILV 生成后, MVB 有 3 种去向: ① 被转运到质膜与质膜融合, 随后将 ILV 释放到细胞外环境中; ② 通过与溶酶体融合而降解; ③ 与自噬体融合形成自噬内涵体 (amphisome) 后进一步转运到质膜并与质膜融合, 将 EV 释放到细胞外环境中, 或

者进一步与溶酶体融合而降解^[15]。MVB 的转运机制目前尚不清楚, 仍需深入研究^[68-69]。

MVB 向质膜的转运涉及它们与细胞骨架、相关驱动蛋白和小 GTP 酶的相互作用, 微囊泡生成也涉及类似的相互作用^[70-71]。虽然参与这一过程的驱动蛋白尚未确定, 但肌动蛋白被证明为肿瘤细胞中的 MVB 细胞内转运提供了停靠位点 (docking site)^[55, 72], MVB 停靠位点的稳定性受皮质肌动蛋白 (Cortactin)、Rab27A 和 Coronin 1b 调控, Cortactin 的敲低或过表达分别使得 EVs 分泌减少或增加, 但不影响囊泡内容物的组成^[73]。

Rab 蛋白是小 GTPase Ras 超家族的一个亚家族, 研究发现不同的 Rab 蛋白参与了细胞内囊泡运输的不同步骤, 是调节细胞内囊泡转运的分子开关^[72, 74]。Rab11 是第一个被报道参与 EVs 分泌的 Rab GTP 酶。Savina 等^[75]报道 Rab11 突变体的过表达可以抑制 K562 细胞中含有转铁蛋白受体 (transferrin receptor, Tfr) 和热激蛋白 70 (heat shock protein 70, HSC70) 的 EVs 的释放。后续研究发现 Rab7、Rab27A、Rab27B、Rab35 和 Rab31 等 Rab 蛋白也参与外泌体产生的调节^[76-78]。Chieh 等^[76]发现 Rab35 是 PLP 外泌体释放和少突胶质细胞中 MVB 与质膜对接所必需的。Fei 等^[77]发现拟泛素化 (neddylation) 修饰的 Coro1a 可与 MVB 表面的 Rab7 结合并激活 Rab7, 促进 MVB 与溶酶体的融合, 导致 MVB 降解, 从而引起 HEK293、RAW264.7 和 HeLa 细胞外泌体分泌减少。Ostrowski 等^[78]发现 Rab27 的两种异构体 Rab27A 和 Rab27B 是 MVB 在质膜的停靠分子, 可以促进 HeLa 细胞中携带 CD63、CD81 和 MHC II (major histocompatibility complex II) 等分子以外泌体形式分泌。如前所述, Rab31 能够不依赖 ESCRT 驱动 ILV 形成, 促进外泌体生成; 同时 Rab31 通过招募 GTP 酶激活蛋白 TBC1D2B 使 Rab7 失活, 从而避免 MVB 与溶酶体融合而被降解^[67]。

3.1.3 外泌体的释放 外泌体是 MVB 与质膜融合后释放到细胞外环境中的纳米颗粒。该过程需要可溶性 N-马来酰亚胺敏感因子黏附受体 (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor, SNARE) 蛋白复合物的参与, 当 MVB 向质膜靠近时, MVB 表面的 v-SNARE 和质膜上的 t-SNARE 可相互结合形成功能性的 SNARE 复合物, 从而诱导 MVB 与质膜的融合, 将 ILV 释放到细胞外环境生成外泌体^[79]。v-SNARE 相关蛋白 VAMP7 (vesicle associated membrane protein 7) 参

与了膜转运、细胞迁移、自噬体产生等过程，已证明 VAMP7 可以调节 K562 白血病细胞中 EVs 的释放^[80]，但抑制 MDCK 细胞中的 VAMP7 对 EVs 的分泌没有影响^[81]。t-SNARE 相关蛋白 SNAP23 (synaptosomal associated protein 23) 在细胞膜上的定位参与了肿瘤细胞衍生的 EVs 的分泌。已有研究证明 SNAP23 在 PKM2 (pyruvate kinase isoform M2) 介导的磷酸化控制下促进肿瘤细胞中外泌体的释放^[82]。另一种 SNARE 家族蛋白 YKT6 参与内质网到高尔基体复合物的转运，研究发现 YKT6 是 HEK293 细胞和 A549 细胞外泌体释放必需的分子媒介^[83]。类似地，不同的 SNARE 复合物可介导特定细胞器与不同细胞类型中的质膜的融合或单个细胞类型中不同 MVB 亚群的融合^[84]。



图 2 外泌体的产生
Fig 2 Production of exosomes

3.2 微囊泡的产生机制 (见图 3)

微囊泡的生成不同于外泌体，它是直接从质膜上出芽形成，其粒径在 100 ~ 1000 nm^[23]。微囊泡的生成机制与 ILV 生成类似。微囊泡的生成涉及与 ILV 生成类似的机制。已证明其中一种机制涉及 ESCRT，当 ALIX、TSG101、Vps22、CHMP1/3 (charged multivesicular body protein 1/3) 和 Vps4 等 ESCRT 蛋白敲低时微囊泡分泌减少^[85]。Nabhan 等^[86]发现 ARRDC1 (arrestin domain containing protein 1) 通过将 ESCRT-I 亚基 TSG101 和 Vps4 招募到质膜，直接驱动质膜出芽。脂质依赖机制也被报道，Bianco 等^[87]发现酸性鞘磷脂酶诱导星形胶质细胞产生神经酰胺依赖性的微囊泡，而中性鞘磷脂酶是外泌体生成所必需的^[51]。Del 等^[88]发现另一种脂质依赖机制，当胆固醇在激活的中性粒细胞中耗尽时，微囊泡的形成就会受损。微囊泡出芽涉及 Ca²⁺ 依赖的细胞

骨架重组，在这个过程中 Ca²⁺ 水平会显著升高，从而导致钙蛋白酶激活，以及内翻酶、外翻酶和乱序酶的改变，进而驱动膜不对称的细胞骨架重塑，导致质膜出芽形成微囊泡^[89-91]。Rho 家族小 G 蛋白和 Rho 相关蛋白激酶 (Rho-associated kinase, ROCK) 是微囊泡释放所必需的^[92-93]。Wang 等^[94]发现 Rho 家族小 G 蛋白 CDC42 (cell division cycle 42) 是微囊泡生成过程中多种调控信号的汇聚节点。GTP 激活的 CDC42 与下游效应蛋白 - 含 IQ 结构域的 GTP 酶激活样蛋白 1 (IQ-domain GTPase-activating protein 1, IQGAP1) 结合后可以促进微囊泡脱落，激活的 CDC42 通过抑制细胞表面受体 (包括 EGFR 和 VEGF 寡聚体 VEGF90K) 的内吞来维持持续的 EGF 信号转导，促进微囊泡的释放。研究还发现小 GTP 结合蛋白 ARF1 或 ARF6 可激活 RhoA 和促进肌动蛋白的收缩，从而促进微囊泡的释放^[95-96]。

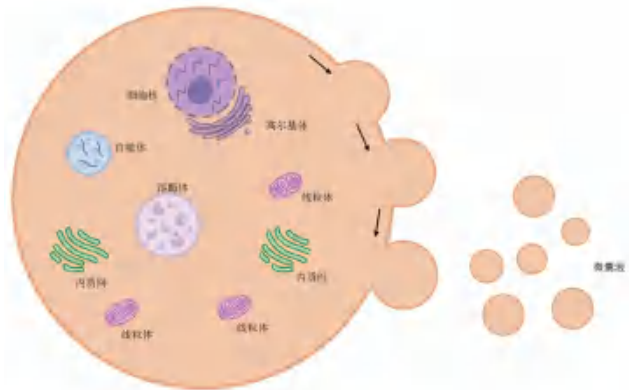


图 3 微囊泡的生成
Fig 3 Production of microvesicles

3.3 凋亡小体的产生机制 (见图 4)

凋亡小体是细胞程序性死亡时产生的，是细胞凋亡的标志，其粒径在 50 ~ 5000 nm^[97]。这可以将它们与正常活细胞不断产生的其他类型的细胞外囊泡 (例如外泌体和微囊泡) 区分开来^[98]。凋亡小体是在凋亡细胞分解过程中产生的，细胞核和细胞质被迅速包裹成多个大小不一的致密膜结合囊泡^[99-100]。单个凋亡小体的货物由恰好在产生它的细胞质突起中的细胞成分组成^[99, 101]。因此，可以根据其货物不同分为两组：① 如果它们携带凋亡细胞核的片段，则称为核凋亡小体 (nuclear apoptotic bodies, NAB)，这类凋亡小体的粒径往往大于外泌体和微囊泡，粒径在 0.5 ~ 5 μm^[97, 102]；② 如果它们携带的是细胞质，则称为细胞质凋亡小体 (cytoplasmic apoptotic bodies, CAB)，这类凋亡小体的粒径较小，在 50 ~ 500 nm^[103-104]。已

有报道证明凋亡小体的生成涉及蛋白激酶, 包括肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK)^[105]、Rho 相关激酶 (Rho-associated kinase,

ROCK1)^[106]、膜联蛋白通道 1 (plasma membrane channel pannexin 1, PANX1)^[107]。

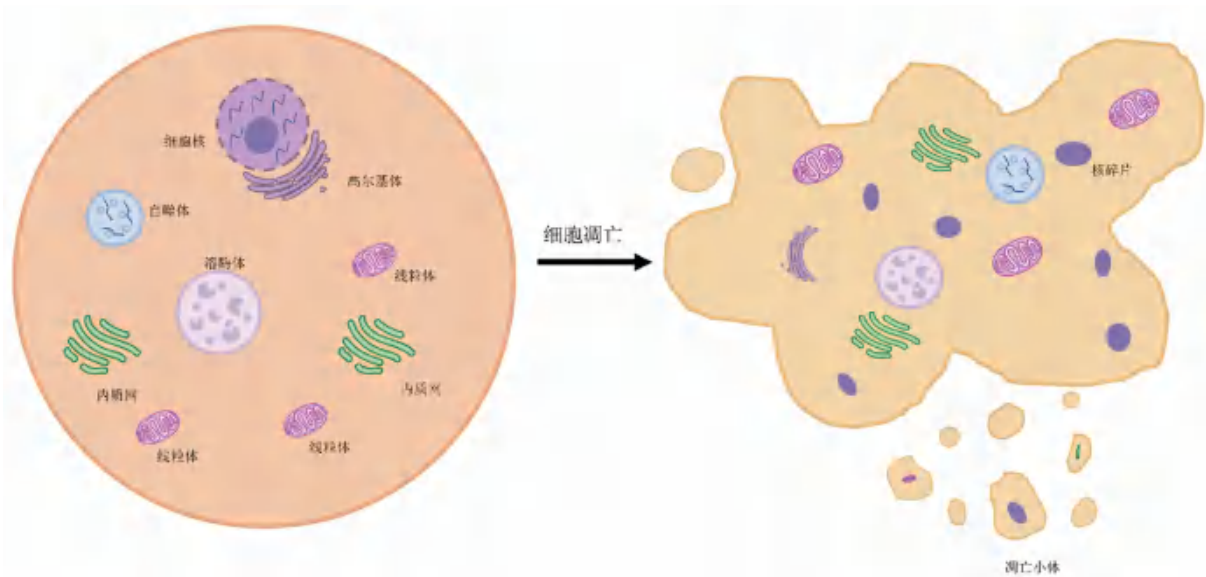


图 4 凋亡小体的生成

Fig 4 Production of apoptotic bodies

4 小结

随着技术的进步, 人们对 EVs 产生机制的理解取得了重大进展。由于 MVB 和 EVs 在不同的细胞及不同的细胞环境中, 其特性会发生动态变化, 因此, 仍然存在许多挑战和问题。在未来的研究中, 应该更加注意使用互补的分析方法和更准确的生物标志物来区分异质性的 EVs, 这将有利于确定不同 EVs 的亚群及其对应的生成分泌机制, 也可以指导基于 EVs 的药物开发和 EVs 制备新策略的发现。

参考文献

[1] Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies [J]. *Blood*, 1999, 93 (11): 3956-3963.

[2] Gauthier BR, Cobo-Vuilleumier N, López-Noriega L. Roles of extracellular vesicles associated non-coding RNAs in diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1057407.

[3] Jia S, Zocco D, Samuels ML, et al. Emerging technologies in extracellular vesicle-based molecular diagnostics [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014, 14 (3): 307-321.

[4] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200 (4): 373-383.

[5] Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20 (5): 1053-1067.

[6] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10 (3): 301-312.

[7] Li TF, Yan YM, Wang BY, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22 (6): 845-854.

[8] Xin HQ, Li Y, Buller B, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth [J]. *Stem Cells*, 2012, 30 (7): 1556-1564.

[9] Jayabalan N, Nair S, Nuzhat Z, et al. Cross talk between adipose tissue and placenta in obese and gestational diabetes mellitus pregnancies via exosomes [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8: 239.

[10] Cheng L, Hill AF. Therapeutically harnessing extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21 (5): 379-399.

[11] Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood [J]. *J Biol Chem*, 1946, 166 (1): 189-197.

[12] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma [J]. *Br J Haematol*, 1967, 13 (3): 269-288.

[13] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262 (19): 9412-9420.

[14] György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesi-

- cles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68 (16): 2667-2688.
- [15] Van Niel G, Carter DRF, Clayton A, et al. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23 (5): 369-382.
- [16] Zhu X, Badawi M, Pomeroy S, et al. Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6 (1): 1324730.
- [17] Xu R, Rai A, Chen MS, et al. Extracellular vesicles in cancer-implications for future improvements in cancer care [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15 (10): 617-638.
- [18] 张宁, 谢姝钰, 常国欣, 等. 细胞外囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用及应用 [J]. *药学进展*, 2022, 46 (2): 93-115.
- [19] Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *J Transl Med*, 2005, 3 (1): 9.
- [20] Stegmayr B, Berggren PO, Ronquist G, et al. Calcium, magnesium, and zinc contents in organelles of prostatic origin in human seminal plasma [J]. *Scand J Urol Nephrol*, 1982, 16 (3): 199-203.
- [21] Tanimura A, Mcgregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1983, 172 (2): 173-177.
- [22] Fischer Von Mollard G, Mignery GA, Baumert M, et al. Rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (5): 1988-1992.
- [23] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19 (2): 43-51.
- [24] Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6 (1): 21-29.
- [25] Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9 (2): 197-208.
- [26] Gavard J. Migrasome-derived nanoparticles: the chamber of secrets was opened again [J]. *FEBS J*, 2023, 290 (13): 3355-3358.
- [27] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7 (1): 1535750.
- [28] Trams EG, Lauter CJ, Salem N, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645 (1): 63-70.
- [29] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21 (1): 9-17.
- [30] Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977.
- [31] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75 (2): 193-208.
- [32] Van Niel G, D'angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19 (4): 213-228.
- [33] Henne WM, Stenmark H, Emr SD. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5 (9): a016766.
- [34] Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes [J]. *Nature*, 2010, 464 (7290): 864-869.
- [35] Mayers JR, Fyfe I, Schuh AL, et al. ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple ubiquitylated cargoes simultaneously [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (11): 9636-9645.
- [36] Kostelansky MS, Sun J, Lee S, et al. Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex [J]. *Cell*, 2006, 125 (1): 113-126.
- [37] Hierro A, Sun J, Rusnak AS, et al. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex [J]. *Nature*, 2004, 431 (7005): 221-225.
- [38] Vietri M, Radulovic M, Stenmark H. The many functions of ESCRTs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21 (1): 25-42.
- [39] Teis D, Saksena S, Emr SD. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation [J]. *Dev Cell*, 2008, 15 (4): 578-589.
- [40] Frankel EB, Audhya A. ESCRT-dependent cargo sorting at multivesicular endosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 74: 4-10.
- [41] Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, et al. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (14): 12513-12521.
- [42] Schoneberg J, Lee IH, Iwasa JH, et al. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18 (1): 5-17.
- [43] Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT pathway [J]. *Dev Cell*, 2011, 21 (1): 77-91.
- [44] Colombo M, Moita C, Van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (Pt 24): 5553-5565.
- [45] Stuffers S, Sem WC, Stenmark H, et al. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs [J]. *Traffic*, 2009, 10 (7): 925-937.
- [46] Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-synten-

- in-ALIX regulates the biogenesis of exosomes [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14 (7): 677-685.
- [47] Roucourt B, Meeussen S, Bao J, et al. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway [J]. *Cell Res*, 2015, 25 (4): 412-428.
- [48] Dixson AC, Dawson TR, Di Vizio D, et al. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24 (7): 454-476.
- [49] Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2 [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3477.
- [50] Imjeti NS, Menck K, Egea-Jimenez AL, et al. Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114 (47): 12495-12500.
- [51] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J]. *Science*, 2008, 319 (5867): 1244-1247.
- [52] Gulbins E, Kolesnick R. Raft ceramide in molecular medicine [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (45): 7070-7077.
- [53] Madeo M, Colbert PL, Vermeer DW, et al. Cancer exosomes induce tumor innervation [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 4284.
- [54] Cheng Q, Li X, Wang Y, et al. The ceramide pathway is involved in the survival, apoptosis and exosome functions of human multiple myeloma cells in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39 (4): 561-568.
- [55] Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, et al. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior [J]. *Cell Rep*, 2013, 5 (5): 1159-1168.
- [56] Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, et al. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization [J]. *Biochem J*, 2004, 380 (1): 161-171.
- [57] Llorente A, Skotland T, Sylvanne T, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831 (7): 1302-1309.
- [58] Strauss K, Goebel C, Runz H, et al. Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (34): 26279-26288.
- [59] Van Niel G, Bergam P, Di Cicco A, et al. Apolipoprotein E regulates amyloid formation within endosomes of pigment cells [J]. *Cell Rep*, 2015, 13 (1): 43-51.
- [60] Van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and-dependent endosomal sorting during melanogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 21 (4): 708-721.
- [61] Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 397-422.
- [62] Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14 (1): 49-60.
- [63] Hurwitz SN, Conlon MM, Rider MA, et al. Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 31295.
- [64] Gauthier SA, Perez-Gonzalez R, Sharma A, et al. Enhanced exosome secretion in Down syndrome brain—a protective mechanism to alleviate neuronal endosomal abnormalities [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2017, 5 (1): 65.
- [65] Perez-Hernandez D, Gutierrez-Vazquez C, Jorge I, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (17): 11649-11661.
- [66] Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, et al. Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling [J]. *J Cell Biol*, 2010, 190 (6): 1079-1091.
- [67] Wei DH, Zhan WX, Gao Y, et al. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway [J]. *Cell Res*, 2021, 31 (2): 157-177.
- [68] Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13588.
- [69] Riches A, Campbell E, Borger E, et al. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells—a new regulatory pathway [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50 (5): 1025-1034.
- [70] Bonifacino JS, Glicic BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion [J]. *Cell*, 2004, 116 (2): 153-166.
- [71] Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle [J]. *Dev Cell*, 2007, 12 (5): 671-682.
- [72] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10 (8): 513-525.
- [73] Sinha S, Hoshino D, Hong NH, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics [J]. *J Cell Biol*, 2016, 214 (2): 197-213.
- [74] Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91 (1): 119-149.
- [75] Savina A, Fader CM, Damiani MT, et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner [J]. *Traffic*, 2005, 6 (2): 131-143.
- [76] Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189 (2): 223-232.
- [77] Fei X, Li Z, Yang D, et al. Neddylation of Coro1a determines the fate of multivesicular bodies and biogenesis of extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10 (12): e12153.

- [78] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12 (1): 19-30.
- [79] Zylbersztejn K, Galli T. Vesicular traffic in cell navigation [J]. *FEBS J*, 2011, 278 (23): 4497-4505.
- [80] Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, et al. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793 (12): 1901-1916.
- [81] Proux-Gillardeaux V, Raposo G, Irinopoulou T, et al. Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration [J]. *Biol Cell*, 2007, 99 (5): 261-271.
- [82] Wei Y, Wang D, Jin F, et al. Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23 [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14041.
- [83] Ruiz-Martinez M, Navarro A, Marrades RM, et al. YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (32): 51515-51524.
- [84] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289.
- [85] Matusek T, Wendler F, Poles S, et al. The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog [J]. *Nature*, 2014, 516 (7529): 99-103.
- [86] Nabhan JF, Hu R, Oh RS, et al. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (11): 4146-4151.
- [87] Bianco F, Perrotta C, Novellino L, et al. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells [J]. *EMBO J*, 2009, 28 (8): 1043-1054.
- [88] Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation [J]. *Blood*, 2005, 106 (5): 1604-1611.
- [89] Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, et al. Membrane microparticles: two sides of the coin [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2005, 20: 22-27.
- [90] Pasquet JM, Dachary-Prigent J, Nurden AT. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 239 (3): 647-654.
- [91] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10 (5): 619-624.
- [92] Li B, Antonyak MA, Zhang J, et al. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2012, 31 (45): 4740-4749.
- [93] Li SR, Man QW, Gao X, et al. Tissue-derived extracellular vesicles in cancers and non-cancer diseases: Present and future [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10 (14): e12175.
- [94] Wang J, Zhuang X, Greene KS, et al. Cdc42 functions as a regulatory node for tumour-derived microvesicle biogenesis [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10 (3): e12051.
- [95] Schlienger S, Campbell S, Claing A. ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25 (1): 17-29.
- [96] Sedgwick AE, Clancy JW, Olivia Balmert M, et al. Extracellular microvesicles and invadopodia mediate non-overlapping modes of tumor cell invasion [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14748.
- [97] Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M, et al. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body [J]. *Virchows Arch*, 1998, 433 (5): 443-447.
- [98] Akers JC, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies [J]. *J Neurooncol*, 2013, 113 (1): 1-11.
- [99] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26 (4): 239-257.
- [100] Povea-Cabello S, Oropesa-Ávila M, De La Cruz-Ojeda P, et al. Dynamic reorganization of the cytoskeleton during apoptosis: the two coffins hypothesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (11): 2393.
- [101] Hauser P, Wang S, Didenko VV. Apoptotic bodies: selective detection in extracellular vesicles [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1554: 193-200.
- [102] Hristov M, Erl W, Linder S, et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro [J]. *Blood*, 2004, 104 (9): 2761-2766.
- [103] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication [J]. *J Proteomics*, 2010, 73 (10): 1907-1920.
- [104] Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes [J]. *Methods*, 2012, 56 (2): 293-304.
- [105] Mills JC, Stone NL, Erhardt J, et al. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation [J]. *J Cell Biol*, 1998, 140 (3): 627-636.
- [106] Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3 (4): 346-352.
- [107] Poon IK, Chiu YH, Armstrong AJ, et al. Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis [J]. *Nature*, 2014, 507 (7492): 329-334.

(收稿日期: 2023-05-09; 修回日期: 2023-06-25)

紫草素抗肺癌的作用机制及其研究进展

惠姣姣, 董永成, 郑涛 (十堰市太和医院 (湖北医药学院附属医院) 药学部, 湖北 十堰 442000)

摘要: 紫草素是传统中药紫草的活性成分, 具有广泛的抗肿瘤作用。肺癌是一种发病率和死亡率都较高的恶性肿瘤。大量研究结果证实紫草素具有抗肺癌活性。本文通过检索文献, 对紫草素抗肺癌作用及其作用机制研究进展进行归纳总结。研究表明紫草素可通过抑制肺癌细胞增殖、诱导肺癌细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制肺癌细胞侵袭和迁移、诱导肺癌细胞坏死和自噬以及逆转肿瘤耐药多个方面发挥抗肺癌作用。

关键词: 紫草素; 肺癌; 作用机制; 研究进展

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3256-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.024

Research progress in mechanism of action shikonin for lung cancer

HUI Jiao-jiao, DONG Yong-cheng, ZHENG Tao (Department of Pharmacy, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000)

Abstract: Shikonin is the active ingredient of the *Arnebiae Radix*, a traditional herbal medicine with therapeutic effect on cancers. Lung cancer is a malignant tumor with high morbidity and mortality. Accumulating evidence has demonstrated that shikonin exhibits therapeutic effect on lung cancer. This review summarized the research progress in shikonin for lung cancer. Evidence has demonstrated that shikonin can inhibit lung cancer cells, which include inhibiting proliferation, inducing the apoptosis, blocking the cell cycle, inhibiting invasion and migration, inducing necrosis and autophagy, and reversing drug resistance.

Key words: shikonin; lung cancer; mechanism of action; research progress

癌症已成为威胁人类健康的重大疾病, 其致死率高, 是导致人类预期寿命降低的重要因素。国际癌症研究机构 (international agency for research on cancer, IARC) 2020 年的统计数据显, 癌症是目前 112 个国家中 < 70 岁人口的第一或第二大死因^[1]。肺癌是全球癌症致死的重要原因, 约占癌症致死总数的 18%^[2-3]。

肺癌主要分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中 NSCLC 较为常见, 占肺癌总数的 80% ~ 85%。目前临床治疗肺癌的主要方式是手术治疗、放疗和化疗综合治疗^[4], 但其效果不佳, 存在并发症多、复发率高等问题。中药具有多靶点协同作用、对机体正常细胞损伤较小的高效低毒的特点, 从中探寻有效的抗肿瘤作用成分成为近年来的研究热点。

紫草最早见于《神农本草经》, 是我国传统

中药。据 2020 年版《中国药典》记载, 紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. 或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根, 具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑的功效, 可用于血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤等症的治疗^[5]。近年来, 较多研究者对紫草中的活性成分紫草素 (shikonin) 及其衍生物的药理活性尤其是抗肿瘤作用进行了深入研究。研究表明, 紫草素对肺癌^[6]、肝癌^[7]、乳腺癌^[8]、宫颈癌^[9]、结直肠癌^[10]等多种癌症的发生发展具有治疗作用。本文通过检索相关文献, 对紫草素抗肺癌作用与机制进行综述, 以期为进一步的研究提供参考。

1 紫草素是紫草中的主要抗肿瘤活性成分

紫草中含有的化学成分复杂, 紫草素等萘醌类化合物是紫草中的主要抗肿瘤活性成分^[11] (见图 1)。紫草素属于萘茜类萘醌, 其母核为 5, 8-

作者简介: 惠姣姣, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: 1757781325@qq.com

二羟基-1,4-萘醌(5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone),并具有异己烯基侧链。根据其旋光性不同,可将紫草素类化合物分为左旋紫草素(阿卡宁,S型,alkannin)与右旋紫草素(紫草宁,R型,shikonin)两种异构体^[12]。钱薇等^[13]运用网络药理学方法,发现紫草中1-甲氧基乙酰紫草素、吡氟甲禾灵、甘露醇、谷甾醇和乙酰紫草素5种活性成分与癌症疾病关联度最高,且ESR1基因、雄激素受体(androgen receptor,AR)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)等可能为紫草抗癌的关键靶点。

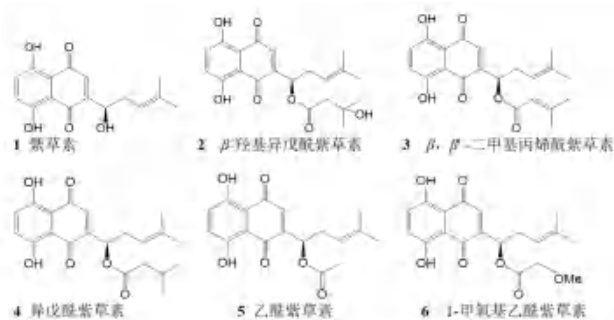


图1 紫草中常见抗肿瘤活性成分结构式
Fig 1 Common structural formula of anti-tumor active components in Arnebiae Radix

2 紫草素抗肺癌的作用机制

大量研究证实紫草素及其衍生物可通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制肿瘤细胞侵袭和迁移、诱导肿瘤细胞自噬、逆转肿瘤细胞耐药等途径发挥抗肿瘤作用。

2.1 抑制肺癌细胞增殖

2.1.1 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路 磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路影响 NSCLC 细胞的生长、增殖、凋亡、迁移、侵袭、转移和耐药,是 NSCLC 治疗中的关键通路。李世玲等^[6]研究发现,经不同浓度紫草素(5~20 μmol·L⁻¹)处理后的 NSCLC 细胞株 NCI-H358 的 p-Akt、p-PI3K 和 p-mTOR 蛋白水平均受到抑制,细胞活力及迁移能力明显下降。Li 等^[14]研究发现,紫草素以时间和剂量依赖性方式抑制耐阿法替尼的 NSCLC 细胞(H1650/R, H1975/R)的增殖,其作用机制主要与下调 PI3K 和 Akt 的表达,负调控 PI3K/Akt 信号通路有关,进一步的体内研究发现紫草素可抑制 H1650/R 荷瘤小鼠的肿瘤生长,对增殖相关信号蛋白的检测方法与体外实验结果一致。Akt 是 PI3K 信号的重要下游效应器,被 PI3K 激活后能磷酸化部分关键

的癌前分子,以促进细胞活力和抑制凋亡^[15]。多个研究表明紫草素可下调 Akt 的表达及其磷酸化水平^[16-18],与紫草素抑制肺癌细胞增殖作用相关。

以上研究证明,紫草素可通过负调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,下调肺癌细胞中 p-Akt、p-PI3K 和 p-mTOR 蛋白水平,产生显著的抑制肺癌细胞增殖作用。

2.1.2 抑制有氧糖酵解 Warburg 效应是指肿瘤细胞的代谢转化主要是有氧糖酵解,可为肿瘤细胞无限增殖提供足够的能量,是肿瘤细胞产生三磷酸腺苷(ATP)的中心代谢途径。6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 2(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2, PFKFB2)在 NSCLC 组织中的表达显著上调,其过表达可促进肺癌细胞的增殖、迁移和 Warburg 效应。Sha 等^[19]研究发现紫草素可显著下调 NSCLC 细胞株 A549 和 H446 中 PFKFB2 转录水平,继而抑制 Warburg 效应,减少肺癌细胞的增殖和迁移。丙酮酸激酶 M2(pyruvate kinase M2, PKM2)是糖酵解途径的关键限速酶,在肺、乳腺、肝脏等肿瘤组织中高表达。Dai 等^[20]研究发现,紫草素通过下调 PKM2 抑制肺癌细胞 A549 和 PC9 的增殖、迁移、侵袭和有氧糖酵解水平,而 PKM2 敲低后紫草素的抗糖酵解及抑制增殖作用丧失,说明紫草素可靶向 PKM2 介导的糖酵解,进而抑制肿瘤细胞的增殖。

2.2 诱导肺癌细胞凋亡

2.2.1 上调促凋亡蛋白 p53 及 Bax 的表达、下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 及 XIAP 的表达 Bcl-2 蛋白家族包括抑凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X, Bax),其相互间的复杂作用促成了线粒体介导的凋亡。p53 基因是促凋亡基因,其可通过调节胱天蛋白酶(caspase)-3 调控其下游基因 Bcl-2 的蛋白表达。

miR-628-3p 属于微小 RNA(miRNA),在多种肿瘤细胞中低表达,过表达的 miR-628-3p 可以抑制肿瘤细胞的生长和迁移并诱导肿瘤细胞凋亡。Pan 等^[21]研究发现紫草素可通过上调 p53 的表达来促进 miR-628-3p 的表达,呈剂量依赖性诱导 NSCLC 细胞株 A549 和 PC-9 的凋亡并抑制其增殖。Yeh 等^[22]研究表明,紫草素可上调 A549 细胞中 p53、p16 和裂解型胱天蛋白酶(cleaved caspase)-3 的表达,并促进细胞色素 C 的释放,呈剂量依赖性地诱导细胞凋亡、坏死和衰老,而 p53 特异性抑制剂可减弱以上作用。以上研究证明紫草素诱导肺癌细胞凋亡的作用与 p53 的表达

上调有关。

也有多个研究证明,紫草素可抑制 Bcl-2 的表达、上调 Bax 的表达,通过调节肺癌细胞 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达比例调控线粒体膜的通透性,激活线粒体凋亡途径,从而发挥促凋亡作用,进而抑制细胞增殖,并具有剂量依赖性^[14, 17, 23-25]。紫草素还能通过促进线粒体凋亡途径标志物细胞色素 C 的释放^[24]、下调凋亡抑制蛋白家族的关键成员 X-连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)的表达^[23]发挥促凋亡作用。

2.2.2 调控 caspase 家族蛋白 刘晓莉等^[24]研究发现紫草素可上调 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 的表达,在一定剂量范围内呈剂量依赖性地诱导 A549 细胞的凋亡。黄静山等^[26]研究发现细胞凋亡和程序性坏死途径都是紫草素诱导 A549 细胞死亡的作用机制之一,紫草素可通过 caspase 途径诱导细胞凋亡,表现为 caspase-3 和 caspase-8 表达活性升高,而经不可逆 caspase 抑制剂干预后细胞凋亡率有所降低。XIAP 是细胞凋亡和自噬的主要调节因子,主要通过和 caspase 直接结合并阻断 caspase-3/7/9 的激活和成熟来阻止细胞凋亡。Wang 等^[27]研究发现,紫草素可抑制 NSCLC 细胞 H1299 的 Survivin 信号通路,通过调控 Survivin 下游分子 XIAP 及其介导的 caspase-3 和 caspase-9 的表达,导致线粒体膜电位的下降,诱导 H1299 细胞凋亡。

2.2.3 上调活性氧(reactive oxygen species, ROS),引起细胞衰老 ROS 可导致细胞能量代谢紊乱,ROS 的蓄积也可损伤细胞,多个研究表明,紫草素可诱导肺癌细胞内 ROS 的大量产生和蓄积,通过 ROS 介导的内质网应激进而诱导肺癌细胞凋亡^[26, 28-30]。紫草素可在诱导 NSCLC 细胞株 A549、H1650 和 H1975 生成大量 ROS 的同时使细胞凋亡指标 caspase-3/9 和多腺苷二磷酸核糖聚合酶 [Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 的活性显著提高,抗凋亡因子 Bcl-2 和 B 淋巴细胞瘤-xL (Bcl-xL) 的表达下调,而在使用 ROS 抑制剂后上述诱导凋亡作用被阻断,说明紫草素诱导的细胞凋亡与细胞内 ROS 升高密切相关^[29-30]。

紫草素还可通过诱导 ROS 水平升高从而对 DNA 造成氧化损伤,进而引起细胞衰老。郑宏明^[31]的研究发现,紫草素可诱导肺癌细胞 A549 和 H1299 大量生成 ROS,并显著上调肺癌细胞的 p53 和 DNA 损伤标志蛋白 p-H2A.X 的蛋白水平,导致 DNA 损伤,引起细胞衰老。Zheng 等^[32]研究发现,相较于诱导细胞凋亡,促进细胞衰老是紫草素发挥抗肿瘤作用的主要机制,且紫草素的

促衰老作用强烈依赖于增加细胞中 ROS 的生成。也有研究发现,紫草素诱导细胞凋亡、衰老的作用主要与 p53 的表达上调有关^[22]。

2.3 阻滞细胞周期

细胞周期有高度的组织性和条理性,以确保遗传物质的完整性。该过程依赖于许多基因和蛋白的共同调节,细胞周期异常可导致细胞增殖失控,细胞凋亡被抑制,最终导致肿瘤的发生,细胞周期的进展在一定程度上与细胞周期蛋白(cyclin)、周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent-kinase inhibitor, CKI)、细胞分裂周期因子 25 (cell division cycle 25, CDC25) 等多种调节因子之间的平衡有关^[33]。多个研究发现紫草素可使肺癌细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞^[18, 27, 31-32],其中 Wang 等^[27]的研究发现紫草素的细胞周期阻滞作用与其靶向 Survivin 信号通路并下调其下游分子 CDK2、CDK4、cyclin E 和 cyclin D1 的蛋白水平有关。王媛等^[16]研究发现紫草素可使肺癌细胞 H1975 发生 S 期阻滞,阻止细胞进入 G₂/M 期。也有研究发现紫草素可使肺癌细胞周期阻滞在 G₂/M 期,并指出这可能与紫草素上调 p21、p53 和 p16 的表达有关^[22, 34]。

总之,紫草素可通过调节 p53、p16、p21 及细胞周期相关蛋白 cyclins、CDKs 的表达,产生细胞周期阻滞作用。

2.4 抑制肺癌细胞侵袭和转移

2.4.1 逆转肺癌细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) EMT 是肿瘤细胞迁移和侵袭过程中的关键环节。沈东等^[35]通过肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)诱导建立了肺癌 PC9 细胞 EMT 模型,研究发现紫草素干预后能明显逆转 EMT,进而抑制 PC9 细胞的侵袭和转移。张小方等^[36]的研究表明紫草素可减弱血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶 14、纤维连接蛋白和波形蛋白的表达,抑制肺癌细胞的 EMT,并通过抑制 PI3K/Akt 信号通路抑制 A549 细胞的活力及侵袭、迁移能力。在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变的肺癌细胞中 c-Met 信号通路被高度激活,Hsieh 等^[37]的研究发现紫草素能呈剂量依赖性地抑制肺癌细胞 HCC827 的侵袭和转移,与紫草素抑制内源性 c-Met 的激活,负调控 c-Met 介导的 PI3K/Akt 和胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路及 EMT 有关。

越来越多的证据表明,炎症性肿瘤微环境可

导致肿瘤细胞迁移, 炎性细胞因子白细胞介素 (IL-6) 的下游因子信号转导及转录激活因子 3 (signal transduction and activator of transcription 3, STAT3) 可在多种癌症中被过度激活从而加重 EMT 和肿瘤迁移。Pan 等^[38] 研究发现紫草素可通过 IL-6/STAT3 信号通路阻断 NSCLC 细胞在炎症微环境中的迁移和侵袭, 表现为肺癌细胞的侵袭和迁移能力、STAT3 磷酸化和 EMT 均受到显著抑制。

2.4.2 抑制 CD54 和整合素家族的表达 细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1/CD54) 和整合素 (integrin) 家族都属于黏附分子家族, 与肿瘤细胞的增殖、黏附、转移等多种生物学功能相关。何刚等^[39] 研究表明紫草素能显著抑制肺癌细胞 H292 的 CD54 和 integrin $\beta 1$ 、integrin $\beta 3$ 、integrin $\beta 4$ 、integrin $\alpha 5$ 的转录及蛋白表达水平, 从而抑制 H292 细胞的活性、黏附、迁移和侵袭能力, 并具有剂量依赖性。Wang 等^[40] 的研究发现, 紫草素通过抑制整合素 integrin $\beta 1$ 的表达和 ERK1/2 信号通路抑制肺癌细胞 A549 对细胞外基质的黏附和转移, 且在较低浓度 ($< 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 区间, 紫草素能呈浓度依赖性抑制 A549 细胞的侵袭和迁移。

2.5 诱导肺癌细胞坏死和自噬

程序性坏死是由死亡受体介导的不依赖于 caspase 的细胞死亡方式, 与细胞凋亡不同, 其具有细胞肿胀、细胞膜完整性丧失等坏死细胞的形态学特征。受体相互作用蛋白 (receptor-interacting protein, RIP) 1/RIP3/混合系列蛋白激酶样结构域 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 轴是介导细胞程序性坏死的重要信号传导途径之一, RIP1 和 RIP3 还可间接地诱导细胞内 ROS 的产生和蓄积, 促进细胞程序性坏死进程。黄静山等^[26] 研究发现, 紫草素可使 RIP1、RIP3 的蛋白表达及 p-MLKL/MLKL 比值升高, 通过 RIP1/RIP3/MLKL 通路诱导 A549 细胞发生程序性坏死。张海鹏^[41] 的研究证明, 紫草素通过提高 RIP1 和 RIP3 的表达诱导 ROS 的异常表达, 最终导致 A549 细胞发生程序性坏死, 并呈浓度依赖性。

PARP 可导致细胞内 ATP 的快速丢失, 其介导的细胞死亡是程序性坏死的另一种重要形式。Kim 等^[42] 的研究发现, 紫草素能浓度依赖性地增加细胞中 RIP1 蛋白的水平, 通过 RIP1 依赖的程序性坏死途径诱导 A549 细胞死亡及自噬。进一步研究发现, 自噬抑制剂能增加 RIP1、cleaved PARP 和 caspase-3 的表达, 这表明抑制紫草素诱导的自噬可促进其诱导的程序性坏死, 并增强

PARP 介导的细胞死亡。

2.6 协同增敏, 逆转肿瘤耐药

EGFR 突变基因是我国晚期 NSCLC 最常见的驱动基因, 目前吉非替尼、埃克替尼、阿法替尼及奥希替尼等表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 类靶向药物是其最主要和首选的治疗方式^[43], 但靶向治疗后易致获得性耐药, 其耐药机制主要有 T790M 突变、c-Met 突变或扩增、EMT 及 NSCLC 向 SCLC 转化等。多项研究报道了紫草素与 EGFR-TKI 联用后可产生协同增敏、逆转耐药作用, 分子机制研究显示以上作用主要与紫草素逆转 EMT 和抑制 Akt 蛋白磷酸化、抑制 PKM2/STAT3/cyclin D1 信号通路和 EGFR 信号通路分子磷酸化、增加 ROS 介导的内质网应激有关^[28, 44-46]。

含铂双药化疗为肺癌治疗的一线化疗方案, 治疗后期肿瘤细胞多药耐药是导致化疗失败的主要原因之一。周娟等^[47] 研究发现紫草素能在不产生细胞毒性的条件下逆转耐药肺癌细胞株 A549 细胞对顺铂的耐药性, 并增强顺铂的杀伤作用。Dai 等^[20] 研究发现紫草素能增加肺癌细胞对顺铂化疗的敏感性, 并提出其逆转耐药机制可能与紫草素阻断外泌体 PKM2 的产生和外分泌有关。

核富集转录体 1 (nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1) 属于长链非编码 RNA, NEAT1 可激活 PI3K/Akt 信号通路影响 NSCLC 的发生发展^[48-49]。值得关注的是, NEAT1 在紫杉醇耐药的 NSCLC 细胞中显著上调, 研究发现, 紫草素可下调紫杉醇耐药肺癌细胞 A549 (A549/PTX) 的 NEAT1 和 Akt 信号传导水平, 通过抑制 NEAT1/Akt 信号通路治疗紫杉醇耐药 NSCLC^[50-51], 且 Li 等^[50] 的进一步研究发现 NEAT1 主要通过激活 Akt/mTOR 信号通路介导 NSCLC 细胞紫杉醇耐药, 且 NEAT1 是 NSCLC 对紫杉醇耐药的基础, 这为后续如何逆转 NSCLC 耐药提供了研究思路。

3 结语

随着对传统中医药研究的逐渐深入, 越来越多的中药有效成分被证明具有多样的药理作用。紫草作为传统中药, 因其表现出多环节、多途径的广泛抗肿瘤效应, 以及其高效低毒的作用模式, 近年来已成为研究热点。综上所述, 紫草素抗肺癌作用机制主要有以下几个方面 (见图 2): ① 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 抑制有氧糖酵解, 抑制肺癌细胞的增殖; ② 通过上调促凋亡蛋白 p53 及 Bax 的表达、下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 及 XIAP 的表达、激活 caspase 依赖的线粒体凋亡途径、上调 ROS 并引起细胞衰老等途径促进肺癌细

胞凋亡；③通过调节 p53、p16、p21 及细胞周期相关蛋白 cyclins、CDKs 等的表达，引起肺癌细胞周期阻滞；④通过逆转肺癌细胞 EMT、抑制 CD54 和整合素家族的表达，抑制肺癌细胞的侵袭和迁移；⑤通过激活 RIP1/RIP3/MLKL 通路、促进 PARP 的表达，诱导肺癌细胞坏死和自噬；⑥通过逆转 EMT，抑制 EGFR 信号通路分子磷酸化，下调 NEAT1、Akt 与 PKM2 的水平，与抗肿瘤药物联合发挥协同增敏、逆转肿瘤细胞耐药作用。除了上述研究所展现的肺癌治疗作用外，有不少研究也证明紫草素还可以通过减轻肺水肿、减少炎症因子释放和中性粒细胞的浸润等多方面作用缓解肺损伤，改善肺功能^[52-53]。这提示紫草素可在肺癌治疗作用的基础上改善肺功能，有利于肺癌患者的预后。紫草素还可选择性地抑制肺癌细胞的增殖，而对人正常肺细胞影响轻微，说明紫草素具有选择性细胞毒性，具有高效低毒的肺癌治疗特性^[23, 29-30]。

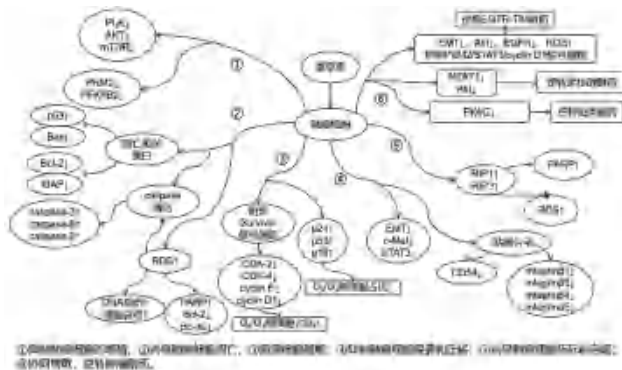


图 2 紫草素抗肺癌作用机制示意图
Fig 2 Diagram of the anti-lung cancer mechanism of shikonin

目前药用紫草以新疆紫草品质最佳^[11]，其经济价值和药用价值均较高，具有广阔的开发应用前景。但紫草的野生资源逐年锐减，在发掘更多药用价值的同时还应关注资源保护及其可持续发展。仍需关注的是，紫草素的抗肿瘤研究大多还停留在分子水平以及肿瘤细胞系的体外实验，需充实异种移植动物模型研究，测定其有效作用的剂量范围，并进一步验证其有效性和安全性，从而更有力地佐证其抗肿瘤效果。除此之外，其肺癌治疗作用的确切分子机制也有待进一步研究，后续还可挖掘更多的潜在治疗靶点，发挥更大效用。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
[2] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解

读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7 (2): 1-14.
[3] Zhang SW, Sun KX, Zheng RS, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2015 [J]. JNCC, 2021, 1 (1): 2-11.
[4] 中华医学会肿瘤学分会, 中华医学会杂志社. 中华医学会肿瘤学分会肺癌临床诊疗指南 (2021 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43 (6): 591-621.
[5] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 355.
[6] 李世玲, 漆毅, 袁晓安, 等. 紫草素对非小细胞肺癌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (16): 2152-2154.
[7] 杜梦鸽, 吕博, 孟凌宇, 等. 基于网络药理学及实验验证探讨新疆紫草抗肝癌作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (24): 75-86.
[8] 高文雅, 张盟, 陶仕英, 等. 基于网络药理学研究紫草抗乳腺癌的作用机制并对紫草素在 MDA-MB-231 细胞中进行验证 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (15): 2030-2034.
[9] 王焱哲, 梁忠喆, 张莹轩, 等. 左旋紫草素靶向 Wnt/β-catenin 通路抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖侵袭迁移的机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41 (6): 724-728.
[10] 陈阳, 倪娟, 高赟, 等. 基于 UPLC-MS 技术的紫草素干预结肠癌移植瘤小鼠血清代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2020, 55 (5): 987-994.
[11] 马生军, 耿阳, 马露, 等. 药用紫草研究进展 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (1): 177-184.
[12] 王焱, 杨曼艳, 韩洪苇, 等. 紫草素 - 中药植物天然产物: 生物合成、遗传调控、结构修饰与医药功能 [J]. 中国科学: 生命科学, 2022, 52 (3): 347-372.
[13] 钱薇, 褚明亮. 基于网络药理学方法研究紫草对癌症疾病的作用机制 [J]. 中外医学研究, 2021, 19 (27): 193-196.
[14] Li BY, Yuan ZG, Jiang J, et al. Anti-tumor activity of Shikonin against afatinib resistant non-small cell lung cancer via negative regulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. Biosci Rep, 2018, 38 (6): BSR20181693.
[15] 余涛, 俞万钧, 王华英. PI3K/AKT 信号通路在非小细胞肺癌中作用的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2021, 34 (2): 248-250.
[16] 王媛, 陆远, 李发凯, 等. 紫草素对肺腺癌 H1975 细胞作用的实验研究 [J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37 (11): 801-805.
[17] 孟燕, 梁永杰. 紫草素诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡及其机制的研究 [J]. 同济大学学报 (医学版), 2015, 36 (6): 40-45.
[18] 芮庄华, 梁永杰. 紫草素对肺腺癌 A549 细胞的生长抑制作用及其机制研究 [J]. 同济大学学报 (医学版), 2014, 35 (3): 30-32.
[19] Sha LY, Lv ZQ, Liu YJ, et al. Shikonin inhibits the Warburg effect, cell proliferation, invasion and migration by downregulating PFKFB2 expression in lung cancer [J]. Mol Med Rep, 2021, 24 (2): 560.
[20] Dai YT, Liu YP, Li JY, et al. Shikonin inhibited glycolysis and sensitized cisplatin treatment in non-small cell lung cancer cells via the exosomal pyruvate kinase M2 pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13 (5): 13906-13918.
[21] Pan JL, Li MY, Yu FL, et al. Up-regulation of p53/miR-

- 628-3p pathway, a novel mechanism of Shikonin on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of A549 and PC-9 non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 766165.
- [22] Yeh YC, Liu TJ, Lai HC. Shikonin induces apoptosis, necrosis, and premature senescence of human A549 lung cancer cells through upregulation of p53 expression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 620383.
- [23] 黄曦文. 紫草素对肺癌 H292、H1299 细胞凋亡的影响及其机制的研究 [D]. 南充: 西华师范大学, 2021.
- [24] 刘晓莉, 姚草原, 熊毅. 紫草素对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18 (19): 2052-2056.
- [25] 李发凯, 张芳, 陆远, 等. 紫草素促进肺癌 A549 细胞凋亡 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18 (9): 1611-1615, 1673.
- [26] 黄静山, 张洪岩, 鲁继斌. 紫草素诱导非小细胞肺癌 A549 细胞程序性坏死的实验研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2021, 26 (6): 488-492.
- [27] Wang HN, Zuo JL. Shikonin inhibits non-small-cell lung cancer H1299 cell growth through Survivin signaling pathway [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2021, 2021: 6435393.
- [28] Hu X, Zhang ZY, Wu LW, et al. A natural anthraquinone derivative shikonin synergizes with AZD9291 against wtEGFR NSCLC cells through reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153189.
- [29] 马建文, 冯伟, 张立平, 等. 紫草素通过促进 ROS 的产生诱导人非小细胞性肺癌 A549 细胞凋亡的机制 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47 (12): 103-109.
- [30] Li X, Fan XX, Jiang ZB, et al. Shikonin inhibits gefitinib-resistant non-small cell lung cancer by inhibiting TrxR and activating the EGFR proteasomal degradation pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 45-55.
- [31] 郑宏明. 紫草素诱导非小细胞肺癌衰老及分子机制 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [32] Zheng HM, Huang QJ, Huang SC, et al. Senescence inducer shikonin ROS-dependently suppressed lung cancer progression [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 519.
- [33] 刘亚鑫, 魏雪娇, 黄惠铭, 等. 中药诱导细胞周期阻滞抗肿瘤研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (2): 222-234.
- [34] Wang FF, Mayca PF, Tian DM, et al. Shikonin inhibits cancer through P21 upregulation and apoptosis induction [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 861.
- [35] 沈东, 王维. 紫草素对 HGF 诱导的人肺癌细胞上皮-间充质转化的逆转作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34 (9): 1622-1626.
- [36] 张小方, 赵影, 李琦. 紫草素抑制非小细胞肺癌 A549 侵袭和迁移能力 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (2): 197-201.
- [37] Hsieh YS, Liao CH, Chen WS, et al. Shikonin inhibited migration and invasion of human lung cancer cells via suppression of c-Met-mediated epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118 (12): 4639-4651.
- [38] Pan T, Zhang F, Li FK, et al. Shikonin blocks human lung adenocarcinoma cell migration and invasion in the inflammatory microenvironment via the IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44 (3): 1049-1063.
- [39] 何刚, 黄曦文, 伍春莲. 紫草素通过 CD54 和整合素抑制人肺癌 H292 细胞转移 [J]. *西华师范大学学报 (自然科学版)*, 2020, 41 (3): 235-241.
- [40] Wang HY, Wu CL, Wan SB, et al. Shikonin attenuates lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by inhibiting integrin beta1 expression and the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Toxicology*, 2013, 308: 104-112.
- [41] 张海鹏. 紫草素上调 RIP1 和 RIP3 表达诱导量引发肺腺癌 A549 细胞程序性坏死的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [42] Kim HJ, Hwang KE, Park DS, et al. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2017, 15 (1): 123.
- [43] 姜寒水, 吴国明. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂在非小细胞肺癌治疗的研究进展及展望 [J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44 (24): 2445-2452.
- [44] 王媛, 刘莉, 陆远, 等. 紫草素逆转埃克替尼对肺癌 EGFR-TKI 耐药及其机制的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16 (16): 3044-3047, 3111.
- [45] Tang JC, Ren YG, Zhao J, et al. Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/stat3/cyclinD1 signal pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 204: 71-77.
- [46] 路京, 陈子龙, 闵朕, 等. 紫草素逆转由肝细胞生长因子诱导的肺癌吉非替尼耐药 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35 (1): 62-67.
- [47] 周娟, 钟询龙, 黄素超, 等. 紫草素逆转人肺腺癌顺铂耐药的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2018, 47 (34): 4327-4330.
- [48] 王天雨, 唐旭东. PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关 lncRNA 在非小细胞肺癌发展中的最新进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28 (4): 692-699.
- [49] 王响, 刀钰洋, 李浩宇, 等. 长链非编码 RNA NEAT1 在肿瘤中的作用及机制研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2021, 11 (6): 26-30.
- [50] Li BY, Gu WW, Zhu XH. NEAT1 mediates paclitaxel-resistance of non-small cell of lung cancer through activation of Akt/mTOR signalling pathway [J]. *J Drug Target*, 2019, 27 (10): 1061-1067.
- [51] Zang FR, Rao YQ, Zhu XH, et al. Shikonin suppresses NEAT1 and Akt signaling in treating paclitaxel-resistant non-small cell of lung cancer [J]. *Mol Med*, 2020, 26 (1): 28.
- [52] 王志强, 常克, 曾靖雯, 等. 紫草素调节新生小鼠缺氧诱导的肺损伤和肺泡巨噬细胞中 M1/M2 型极化及炎症因子水平 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37 (5): 404-409.
- [53] 白光振, 张成生, 陈鹏, 等. 紫草素对脂多糖诱导的小鼠肺损伤的保护作用 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47 (10): 64-68.

(收稿日期: 2023-03-05; 修回日期: 2023-06-02)

靶向嗜酸性肉芽肿性多血管炎的抗体药物研究进展

崔雪萍¹, 彭红艳², 刘灵敏¹, 李娟¹, 邹应梅^{3*} (1.曲靖市第一人民医院呼吸与危重症医学科, 云南 曲靖 655000; 2.曲靖市第一人民医院临床药学科, 云南 曲靖 655000; 3.曲靖市第一人民医院医务部, 云南 曲靖 655000)

摘要: 嗜酸性肉芽肿性多血管炎 (EGPA), 是可累及全身多个系统、罕见的一种自身免疫性疾病, 主要表现为外周血及组织中嗜酸性粒细胞 (EOS) 增多、浸润及中小血管的坏死性肉芽肿炎症。EGPA 治疗的主要药物为糖皮质激素和免疫抑制剂, 但长期使用这些药物可出现骨质疏松、感染、血糖控制不佳等并发症。当前, 靶向 EGPA 的抗体药物已面世, 并逐渐被临床医师用于治疗 EGPA。本文旨在综述靶向 EGPA 的抗体药物研究进展。

关键词: 靶向; 抗 IgE 抗体; 抗 IL-5/IL-5R 抗体; 抗 CD20 抗体; 嗜酸性肉芽肿性多血管炎
中图分类号: R963 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)12-3262-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.025

Research progress in antibody drugs targeting eosinophilic granulomatosis with polyangiitis

CUI Xue-ping¹, PENG Hong-yan², LIU Ling-min¹, LI Juan¹, ZOU Ying-mei^{3*} (1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First People's Hospital of Qujing, Qujing Yunnan 655000; 2. Department of Clinical Pharmacy, The First People's Hospital of Qujing, Qujing Yunnan 655000; 3. Department of Administration, Medical the First People's Hospital of Qujing, Qujing Yunnan 655000)

Abstract: Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA) is a rare autoimmune disease that involves multiple systems throughout the body, mainly presenting by increased eosinophils (EOS) in the peripheral blood and tissues, infiltration and necrotizing granulomatous inflammation of small and medium blood vessels. The main drugs for EGPA treatment are glucocorticoids (GC) and immunosuppressants, but long-term use can cause complications such as osteoporosis, infection and poor blood glucose control. Previously, antibody drugs targeting EGPA have been available and are gradually used for EGPA. This paper reviewed the progress of antibody drugs targeting EGPA.

Key words: target; anti-IgE monoclonal antibody; anti-IL-5/IL-5R monoclonal antibody; anti-CD20 monoclonal antibody; eosinophilic granulomatosis with polyangiitis

嗜酸性肉芽肿性多血管炎 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA) 曾称为 Churg-Strauss 综合征 (Churg Strauss syndrome, CSS) 或变应性肉芽肿性血管炎 (allergic granulomatosis and angiitis, AGA), 是一种罕见但可累及全身多系统 (如呼吸、循环、消化和神经系统), 甚至危及生命的自身免疫性疾病, 其属于抗中性粒细胞胞质抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA) 相关性血管炎^[1]。约 50% 的 EGPA 患

者 ANCA 为阳性, 其总患病率为 (10.7 ~ 17.8) / 百万, 年发病率为 (0.9 ~ 2.4) / 百万^[2]。

当前认为, ANCA 介导的血管壁损伤和嗜酸性粒细胞 (EOS) 浸润为 EGPA 的发病机制^[1]。EGPA 在不同程度上影响肺、鼻窦、心脏、肾脏、皮肤、神经系统, 其中呼吸道和肺脏为最早且最易累及的部位, 大多数首发症状为喘息症状和鼻-鼻窦炎症状, 故大多数患者首先至呼吸与危重症医学科就诊, 并且易误诊为难治性嗜酸性粒细胞性哮喘。

基金项目: 曲靖市第一人民医院院级科研课题 (No.2023YJKTF22)。

作者简介: 崔雪萍, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事过敏性哮喘、嗜酸性粒细胞增多相关性肺疾病方面的研究, email: 1241962279@qq.com * **通信作者:** 邹应梅, 女, 副主任医师, 主要从事呼吸感染性疾病方面的研究, email: erosy520@126.com

2018 年嗜酸性肉芽肿性多血管炎诊治规范多学科专家共识编写组制订了我国首个嗜酸性肉芽肿性多血管炎诊治规范多学科专家共识^[1], 嗜酸性肉芽肿性多血管炎治疗的主要药物为糖皮质激素 (glucocorticoids, GC) 和免疫抑制剂, 但长期使用这些药物可出现骨质疏松、感染、血糖控制不佳等并发症。随着临床医师对 EGPA 重视程度的不断上升, 靶向抗体药物逐渐被临床医师用于治疗 EGPA。本文旨在综述靶向 EGPA 的抗体药物研究进展。

1 抗免疫球蛋白 E (IgE) 抗体——奥马珠单抗 (omalizumab, OMA)

OMA 是一种重组人源化抗 IgE 单克隆抗体, 其通过与 IgE 的 Cε3 区域特异性结合, 降低游离 IgE 水平, 并且通过降低 IgE 高亲和力受体 FcεRI 表达, 阻抑炎症细胞激活和多种炎性介质释放, 从而阻断炎症级联反应。此外, OMA 还有以下免疫调节作用机制: ① 增加干扰素分泌, 减少病毒复制等; ② 减少表达 IgE 的 B 细胞数量, 并且抑制 B 细胞产生 IgE; ③ 调控干扰素 α 和肿瘤坏死因子 α 的表达, 抑制过敏性炎症; ④ 与平滑肌细胞直接及间接作用, 以及下调包括白细胞介素 (IL) -4、IL-5、IL-33 等细胞因子的表达^[3]。OMA 通过与 EOS 膜上的 IgE 受体相互作用和/或减少 IL-5 等 EOS 生长因子, 从而诱导 EOS 凋亡, 最终减少外周血和组织中 EOS^[4]。

2018 年嗜酸性肉芽肿性多血管炎诊治规范多学科专家共识^[1] 推荐, OMA 可减少 EGPA 患者的喘息和/或鼻窦症状及 GC 剂量。王晓旭等^[5] 报道 OMA 治疗 EGPA 的案例显示, 使用 OMA 后 12 h, 患者的荨麻疹、鼻炎、哮喘症状及腹痛症状缓解, 停用所有口服及吸入药物, 给予 OMA 16 周后, 患者外周血 EOS 由 29.1% 降至 13.7%, 肺功能较前改善, 并且未复发, 未发生不良反应。OMA 可成功治疗 EGPA 患者的哮喘症状和鼻-鼻窦炎症^[6-8]。在 EGPA 和中重度过敏性哮喘患者中, OMA 是有益且安全的^[8-9], 并且可减少 GC 剂量, 同时减少 EOS 计数, 改善哮喘症状超过 36 个月^[8]。欧昌星等^[10] 关于 OMA 对以哮喘为首发症状的 EGPA 的疗效和安全性分析的研究显示, 经 OMA 治疗 4 个月后 EGPA 患者的总体应答率为 68.2%, OMA 对 EGPA 哮喘样症状疗效好, 减少口服糖皮质激素 (oral corticosteroids, OCS) 维持用量, 安全性好; 外周血 EOS 比例较低的 EGPA 应答较好。

关于 OMA 治疗 EGPA 的用法和用量方面, 参考奥马珠单抗治疗过敏性哮喘的中国专家共识 (2021 版)^[3], 根据患者治疗前测定的血清总 IgE ($U \cdot mL^{-1}$) 和体重 (kg), 利用剂量表确定 OMA 的给药剂量和给药频率 (每 2 周或 4 周给药 1 次), 每次给药剂量为 75 ~ 600 mg, 若剂量 ≤ 150 mg, 则于 1 个部位皮下注射; 若剂量 > 150 mg, 则按需分 1 ~ 4 个部位分别皮下注射。OMA 每次给药的最大推荐剂量为 600 mg, 每 2 周 1 次。

当前关于 OMA 治疗 EGPA 的疗程无明确规定^[1]。欧昌星等^[10] 研究显示, 使用 OMA 维持治疗 EGPA 患者 6 个月至 1 年能控制患者症状, 有 2 例 EGPA 患者治疗 4 个月为部分应答, 治疗 1 年后变为完全应答, 该研究说明 EGPA 患者有必要使用 OMA 长期维持治疗。

根据欧洲过敏和临床免疫学会 (EAACI) 重度哮喘生物制剂推荐指南建议^[11], 在 OMA 注射后的一段时期内, 应密切观察是否有过敏反应的发生, 推荐前 3 次注射后观察 60 min, 并可由医师根据患者个体反应或既往不良反应史决定注射后观察时间。OMA 治疗 EGPA 安全有效, 常见不良反应为注射部位疼痛、肿胀、红斑、瘙痒, 全身不良反应为发热、头痛、关节痛, 持续时间短, 均可自行消失^[5]。

2 抗 IL-5/IL-5R 抗体

抗 IL-5 单克隆抗体 (抗 IL-5 抗体) 包括美泊利珠单抗 (mepolizumab, MEPO)、瑞利珠单抗 (reslizumab, RESL), 抗 IL-5 受体单克隆抗体 (抗 IL-5R 抗体) 包括贝那利珠单抗 (benralizumab, BENR)。IL-5 是诱导 EOS 性炎症的主要驱动因子。EGPA 患者中 IL-5 升高, 抗 IL-5 可作为潜在的治疗靶点^[12]。

MEPO 是首个 FDA 批准^[13] 用于治疗 EGPA 的抗 IL-5 生物制剂, 其是人源化单克隆 IgG1 抗体, 通过结合游离 IL-5, 阻抑 IL-5 与 EOS 膜表达的 IL-5 受体的 α 亚基结合^[14], 从而阻止 EOS 的活化和积聚, 最终减少 EOS 对组织、器官的损害。

RESL 是 IgG4/k 类人源化抗 IL-5 抗体, 通过与 IL-5 高亲和力结合, 降低外周血 EOS 水平^[14], 从而靶向治疗 EGPA。

BENR 是抗 IL-5R 单克隆抗体, 与 EOS 表面的 IL-5 受体 α 高亲和结合, 抑制 EOS 活化, 导致 EOS 耗竭^[14], 从而减少 EOS 对组织、器官的损害。

2.1 MEPO

国家药品监督管理局于 2021 年 11 月批准 MEPO 用于治疗 EGPA。但当前,国内尚未见 MEPO 治疗 EGPA 的研究报道。2017 年首次见国外一项多中心、双盲、随机试验研究报道,与安慰剂组相比,MEPO 组 EGPA 患者缓解期明显更长^[15],GC 使用剂量减少,并且复发率低。2018 年嗜酸性肉芽肿性多血管炎诊治规范多学科专家共识^[1]推荐,MEPO 可有效降低外周血 EOS 计数,而且显著降低 GC 剂量。MEPO 还可控制哮喘症状和耳鼻喉症状,且复发率低^[16]。Ueno 等^[17]研究显示,给予 EGPA 患者 MEPO 治疗后 12 个月患者的缓解率为 75%,伯明翰血管炎活动度评分(BVAS)、EOS 计数及 GC 剂量均显著降低,同时使用免疫抑制剂的患者数量也随着时间的推移而减少,且复发率低。MEPO 在诱导和维持方面有效,特别是在以哮喘和过敏表现为主的 EGPA 患者中^[7],且诱导和维持难愈性、复发性和 GC 依赖性的 EGPA 病情缓解,GC 剂量减少^[18-19],对于 ANCA 阳性或 EOS 计数增多(≥ 150 个 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)的患者可能有更大的益处^[20]。

MEPO 治疗 EGPA 在最佳剂量和疗程方面,当前无明确规定。在一项欧洲多中心研究评估 MEPO 100 mg/4 周和 300 mg/4 周治疗 EGPA 后 3~24 个月的有效性和安全性的研究中^[21],158 名患者接受 100 mg/4 周治疗,33 名患者接受 300 mg/4 周治疗。结果显示 25 名患者(12.3%)在治疗 3 个月后完全缓解,治疗 12 个月和 24 个月时,完全缓解率分别增加到 30.4% 和 35.7%,MEPO 100 mg/4 周和 300 mg/4 周治疗 EGPA 的完全缓解率差异无统计学意义。治疗 3 个月到 24 个月,BVAS 评分、泼尼松剂量和 EOS 计数显著降低,并且 100 mg/4 周和 300 mg/4 周无显著差异。该研究表明 MEPO 100 mg/4 周和 300 mg/4 周治疗 EGPA 均有效,完全缓解率差异无统计学意义。Özdel Öztürk 等^[22]研究亦显示 MEPO 100 mg/4 周治疗 EGPA 可显著降低口服 OCS 剂量,改善哮喘控制测试(ACT)评分、哮喘生活质量问卷(AQLQ)评分、鼻结膜炎生活质量问卷(RQLQ)和鼻窦结局测试(sot-22)评分,并显著降低第 6 个月和第 12 个月哮喘加重次数和外周血 EOS 计数。多项研究结论^[23-25]与上述研究结论一致。

多项研究提示使用 MEPO 治疗 EGPA 患者没有发生明显的不良反应,总体安全有效^[15, 17, 22-25]。

2.2 RESL

当前,国内尚未见 RESL 治疗 EGPA 的研究。Manka 等^[26]评估了 10 名 EGPA 受试者静脉注射 RESL ($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的安全性和有效性,结果显示 EGPA 患者耐受性良好,RESL 可减少 OCS 剂量。表明 RESL 与其他 IL-5 生物药物具有相似的效果,可能是一种安全有效的 EGPA 治疗方法。但当前 RESL 治疗 EGPA 的研究甚少,还需要更多大规模多中心前瞻性随机试验来研究 RESL 治疗 EGPA 的疗效和安全性。

2.3 BENR

国外一项前瞻性开放标签研究纳入 10 例 EGPA 患者,在 EGPA 治疗前、治疗中和治疗后 40 周评估不良事件、OCS、病情加重和肺功能,结果显示,EGPA 耐受性良好,并减少 OCS 剂量,其中 5 名患者停止使用 OCS;与治疗前和治疗后相比,治疗期间平均年恶化率最低,表明 BENR 耐受性良好,减少 EGPA 病情加重次数及 OCS 剂量,甚至停用 OCS^[27]。

对于 GC 依赖或者难治性有并发症的 EGPA 患者,给予 BENR 治疗后 OCS 剂量减少,其中超过 40% 的 EGPA 患者停用 OCS,并对 MEPO 难治性 EGPA、有顽固性心脏病变和神经病变并发症的患者有效^[28]。亦有 BENR 成功治疗 EGPA 心肌炎的案例^[29]。对于 MEPO 难治性的 EGPA 患者,给予 BENR 治疗 EGPA 后患者症状明显改善,严重哮喘和慢性鼻窦炎伴鼻息肉(CRSwNP)控制良好,并且 OCS 剂量减少,外周血 EOS 计数减少,肺功能、胸部 CT 扫描见肺部病变和皮肤病变较前改善^[30]。对于表现为严重神经病变和严重哮喘 EGPA 患者,经 MEPO 治疗后疗效欠佳,给予 BENR 治疗后患者的神经病变明显改善,患者能够单独行走,并且 BENR 治疗 EGPA 及其并发症的疗效维持了 4 年多^[31]。BENR 可能是 EGPA 表现为神经病变伴严重哮喘的一种有效的治疗方法。对于 OCS 治疗 EGPA 后出现积液性中耳炎和感音神经性耳聋的患者,经 BENR 治疗后,哮喘、积液性中耳炎、鼻窦炎症明显改善^[32]。多项研究结论^[33-36]与上述结论一致。

关于 BENR 治疗 EGPA 安全性方面,多项研究提示使用 BENR 治疗 EGPA 患者没有发生明显不良反应,安全性好、耐受性好^[27-36],并且在 EGPA 重症病例中有效^[29-33]。

当前,BENR 治疗 EGPA 的剂量和疗程尚无明确规定,还需要更多大规模多中心前瞻性随机试验来明确其最佳剂量和疗程。

3 抗 CD20 抗体——利妥昔单抗 (rituximab, RTX)

RTX 是抗 CD20 人鼠嵌合型单克隆抗体, 能与 B 淋巴细胞上的 CD20 抗原特异性结合, 引起 B 细胞消耗, 进而减轻 B 细胞产生 ANCA 对机体造成的损害。

2021 年 ACR/VF 指南^[37] 建议活动性和重症 EGPA 患者在有条件的情况下可使用 RTX 诱导缓解, 复发性 EGPA 患者使用 RTX 维持治疗。目前, RTX 被推荐用于 EGPA 伴严重疾病的诱导缓解, 特别是 ANCA 阳性且有血管疾病的患者^[7]。对免疫抑制剂如环磷酰胺诱导缓解无效的 EGPA 患者, 一项 36 个月随访研究显示, RTX 可以诱导缓解 EGPA, 并且缓解持续时间长, EOS 计数、C-反应蛋白和 IgE 水平下降; 在 36 个月的观察期内无复发, RTX 耐受性良好, 未发生明显的不良反应, 表明 RTX 在诱导缓解方面有效且安全^[38]。RTX 对初诊或复发难治性 EGPA 患者可有效诱导、持续缓解并减少 GC 剂量, 而且对 ANCA 阳性患者比阴性患者有更大的潜在益处^[39]。多位学者观点^[40-42] 与上述观点一致。

对累及多个系统的重症 EGPA, RTX 联合 MEPO 是一种很好的治疗选择。对伴有肺动脉血栓、急性呼吸衰竭、心力衰竭、胃肠道症状和周围神经病变的耐 GC、环磷酰胺和 MEPO 的难治性 EGPA 患者, 使用 RTX 后患者症状改善, 并且未复发^[43]。对累及中枢神经系统、严重肺出血、心脏、胃肠道、肾病和心肌炎, 加用 RTX 联合 MEPO 后达到缓解^[44-45]。

当前, RTX 治疗 EGPA 的最佳剂量和疗程尚无明确规定, 还需要更多大规模多中心前瞻性随机试验来明确。

关于 RTX 治疗 EGPA 安全性方面, 多项研究提示使用 RTX 治疗 EGPA 患者没有发生明显不良反应, 安全性、耐受性好^[38-42], 并且对于累及多个系统的重症 EGPA, RTX 联合 MEPO 是一种很好的治疗选择^[43-45]。

4 总结与展望

综上所述, EGPA 治疗的主要药物为 GC 和免疫抑制剂, 但长期使用不良反应大。当前, 靶向 EGPA 的抗体药物已面世, 在经济条件允许的情况下, 对于 GC 和免疫抑制剂有禁忌, 耐 GC 和免疫抑制剂的难治性、维持治疗或复发性 EGPA 患者, 靶向 EGPA 的抗体药物是一种很好的治疗选择。但目前仅见个案报道或小样本研究, 还需要更多大规模多中心前瞻性随机临床试验来验证

其有效性和安全性, 并且明确最佳剂量和疗程。

MEPO 的说明书适应证为成人 EGPA, 其他具有靶向 EGPA 作用的抗体药物的说明书适应证无 EGPA。目前, 我院已采入抗 IgE 抗体 -OMA 用于治疗中重度过敏性哮喘并且已纳入医保报销范畴, 还未采入其余具有靶向 EGPA 作用的抗体药物, 亦未纳入医保报销范畴, 期待早日采入且早日纳入医保报销范畴, 为更多 EGPA 患者带来福音。

参考文献

- [1] 嗜酸性肉芽肿性多血管炎诊治规范多学科专家共识编写组. 嗜酸性肉芽肿性多血管炎诊治规范多学科专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41 (7): 514-521.
- [2] Furuta S, Iwamoto T, Nakajima H. Update on eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. Allergol Int, 2019, 68 (4): 430-436.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 奥马珠单抗治疗过敏性哮喘的中国专家共识 (2021 版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45 (4): 341-354.
- [4] Janson C, Bjermer L, Lehtimäki L, et al. Eosinophilic airway diseases: basic science, clinical manifestations and future challenges [J]. Eur Clin Respir, 2022, 9 (1): 2040707.
- [5] 王晓旭, 刘菁菁, 王祥杰, 等. 奥马珠单抗治疗嗜酸性肉芽肿性多血管炎 (EGPA) 一例并文献复习 [J]. 饮食保健, 2020, 7 (20): 82.
- [6] Caminati M, Maule M, Bello F, et al. Biologics for eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2023, 23 (1): 36-43.
- [7] Ford JA, Aleatany Y, Gewurz-Singer O. Therapeutic advances in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2022, 34 (3): 158-164.
- [8] Detoraki A, Di Capua L, Varricchi G, et al. Omalizumab in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: a 36-month follow-up study [J]. Asthma, 2016, 53 (2): 201-206.
- [9] Basta F, Mazzuca C, Nucera E, et al. Omalizumab in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: friend or foe? a systematic literature review [J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 38 Suppl 124 (2): 214-220.
- [10] 欧昌星, 吴鹏辉, 谢佳星, 等. 奥马珠单抗对以哮喘为首发症状的嗜酸性肉芽肿性多血管炎的疗效和安全性分析 [J]. 中华医学杂志, 2022, 102 (34): 2684-2689.
- [11] Agache I, Akdis CA, Akdis M, et al. EAAACI biologicals guidelines-recommendations for severe asthma [J]. Allergy, 2021, 76 (1): 14-44.
- [12] Jakiela B, Szczeklik W, Plutecka H, et al. Increased production of IL-5 and dominant Th2-type response in airways of Churg-Strauss syndrome patients [J]. Rheumatology (Oxford), 2012, 51 (10): 1887-1893.
- [13] Office of the Commissioner. Press Announcements-FDA approves first drug for eosinophilic granulomatosis with poly-

- angiitis, a rare disease formerly known as the churg-strauss syndrome[EB/OL]. [2018-07-08]. <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/ressouncements/ucm588594.html>.
- [14] 贾玉萍, 李丹叶. 抗白细胞介素-5 通路在哮喘治疗中的应用[J]. 中日友好医院学报, 2022, 36 (5): 298-301.
- [15] Wechsler ME, Akuthota P, Jayne D, et al. Mepolizumab or placebo for eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376 (20): 1921-1932.
- [16] Ríos-Garcés R, Prieto-González S, Hernández-Rodríguez J, et al. Response to mepolizumab according to disease manifestations in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Eur J Intern Med*, 2022, 95: 61-66.
- [17] Ueno M, Miyagawa I, Nakano K, et al. Effectiveness and safety of mepolizumab in combination with corticosteroids in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2021, 23 (1): 86.
- [18] Canzian A, Venhoff N, Urban ML, et al. Use of biologics to treat relapsing and/or refractory eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: data from a European collaborative study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73 (3): 498-503.
- [19] Hellmich B, Holle J, Moosig F. Eosinophile granulomatose mit polyangiitis: update zu klassifikation und management [J]. *Z Rheumatol*, 2022, 81 (4): 286-299.
- [20] Ennis D, Lee JK, Pagnoux C. Mepolizumab for the treatment of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19 (7): 617-630.
- [21] Bettiol A, Urban ML, Dagna L, et al. Mepolizumab for eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: a European multicenter observational study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74 (2): 295-306.
- [22] Özdel Öztürk B, Yavuz Z, Aydın Ö, et al. Effectiveness of low-dose mepolizumab in the treatment of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA): a real-life experience [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2022, 183 (12): 1281-1290.
- [23] Vultaggio A, Nencini F, Bormioli S, et al. Low-dose mepolizumab effectiveness in patients suffering from eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2020, 12 (5): 885-893.
- [24] Can Bostan O, Duran E, Tuncay G, et al. Sinonasal and respiratory outcomes of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis patients receiving 100 mg mepolizumab in real-life clinical practice: 1-year follow up study [J]. *Asthma*, 2023, 60 (5): 931-937.
- [25] Ueno M, Miyagawa I, Aritomi T, et al. Safety and effectiveness of mepolizumab therapy in remission induction therapy for eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: a retrospective study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24 (1): 159.
- [26] Manka LA, Guntur VP, Denson JL, et al. Efficacy and safety of reslizumab in the treatment of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2021, 126 (6): 696-701.
- [27] Guntur VP, Manka LA, Denson JL, et al. Benralizumab as a steroid-sparing treatment option in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, 9 (3): 1186-1193.
- [28] Koga Y, Aoki-Saito H, Kamide Y, et al. Perspectives on the efficacy of benralizumab for treatment of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 865318.
- [29] Belfeki N, Abroug S, Ghriss N, et al. Successful benralizumab for eosinophilic myocarditis in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 40 (4): 834-837.
- [30] Menzella F, Galeone C, Ghidoni G, et al. Successful treatment with benralizumab in a patient with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis refractory to mepolizumab [J]. *Multidiscip Respir Med*, 2021, 16 (1): 779.
- [31] Koga Y, Yoshimi S, Harada T, et al. Long-term safety and efficacy of benralizumab for eosinophilic granulomatosis with polyangiitis complicated with severe neuropathy [J]. *Intern Med*, 2023, 62 (10): 1553-1556.
- [32] Sugiyama T, Yoshida S, Kikuchi S, et al. Successful treatment for otitis media and sinusitis associated with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis using anti-IL-5 receptor monoclonal antibody benralizumab [J]. *Alerugi*, 2022, 71 (3): 242-247.
- [33] Chica-Guzmán MV, Morillo-Guerrero R, Carrón-Herrero A, et al. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis successfully treated with benralizumab [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2020, 125 (2): 228-230.
- [34] Lee Y, Hojjati M. Benralizumab as a potential adjunctive therapy in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 27 (8S): S401-S402.
- [35] Padoan R, Chieco BF, Marchi MR, et al. Benralizumab as a glucocorticoid-sparing treatment option for severe asthma in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Allergy Clin Immunol Pract*, 2020, 8 (9): 3225-3227.
- [36] Ricciardi L, Soler DG, Bennici A, et al. Case report: severe eosinophilic asthma associated with ANCA-negative EGPA in a young adult successfully treated with benralizumab [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 858344.
- [37] Chung SA, Langford CA, Maz M, et al. 2021 American college of rheumatology/vasculitis foundation guideline for the management of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73 (8): 1366-1383.
- [38] Thiel J, Troilo A, Salzer U, et al. Rituximab as induction therapy in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis refractory to conventional immunosuppressive treatment: a 36-month follow-up analysis [J]. *Allergy Clin Immunol Pract*, 2017, 5 (6): 1556-1563.
- [39] Akiyama M, Kaneko Y, Takeuchi T. Rituximab for the

- treatment of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: a systematic literature review [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20 (2): 102737.
- [40] Canzian A, Venhoff N, Urban ML, et al. Use of biologics to treat relapsing and/or refractory eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: data from a European collaborative study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73 (3): 498-503.
- [41] Hellmich B, Holle J, Moosig F. Eosinophile granulomatose mit polyangiitis: update zu klassifikation und management [J]. *Z Rheumatol*, 2022, 81 (4): 286-299.
- [42] Bettiol A, Urban ML, Bello F, et al. Sequential rituximab and mepolizumab in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA): a European multicentre observational study [J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, 81 (12): 1769-1772.
- [43] Adachi S, Oshikata C, Kaneko T, et al. Rituximab and dupilumab improve eosinophilic granulomatosis with polyangiitis with multiple pulmonary thrombi [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2022, 18 (1): 18.
- [44] Tsioulos G, Kounatidis D, Vallianou NG, et al. Severe eosinophilic granulomatosis with polyangiitis responding to a combination of rituximab and mepolizumab [J]. *Am J Med Sci*, 2023, 365 (1): 93-98.
- [45] Higashitani K, Yoshimi R, Sato Y, et al. Rituximab and mepolizumab combination therapy for glucocorticoid-resistant myocarditis related to eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [J]. *Mod Rheumatol Case Rep*, 2022, 6 (1): 87-92.

(收稿日期: 2023-06-12; 修回日期: 2023-07-19)

神经外科降颅压药物的研究进展

高一铭^{1, 2}, 姜美竹^{1, 2}, 李草^{1*}, 赵志刚¹ (1. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部, 北京 100071; 2. 首都医科大学药学院临床药理学系, 北京 100069)

摘要: 颅内压 (ICP) 升高是神经外科中常见的临床症状, 药物治疗是临床上降颅压分层管理的重要环节, 多种药物可以降低颅内压, 如高渗脱水剂、利尿剂、血容量扩充剂和激素等。高渗脱水剂的应用最普遍, 其中甘露醇的应用时间最长, 是被广泛使用的一线药物; 利尿剂、血容量扩充剂单独降颅压作用较弱, 多与高渗脱水剂配伍使用; 糖皮质激素可用于脑水肿, 治疗其他类型颅内压增高的证据有限; 其他药物如苯巴比妥、乙酰唑胺等也可能起到降颅压的作用, 但临床应用较少。哪一种药物的效果更好、更具应用价值, 是临床需要关注的问题。本文拟就国内外降颅压相关的药物作一综述, 以期为临床制订药物治疗方案提供参考。

关键词: 颅内压; 神经外科; 药物治疗; 甘露醇; 高渗盐水

中图分类号: R651.15 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)12-3267-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.026

Research progress of therapeutic drugs for reducing intracranial pressure

GAO Yi-ming^{1, 2}, JIANG Mei-zhu^{1, 2}, LI Cao^{1*}, ZHAO Zhi-gang¹ (1. *Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100071*; 2. *Department of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069*)

Abstract: Elevated intracranial pressure (ICP) is a common clinical symptom in neurosurgery. Drug therapy is an important part of the hierarchical management of ICP reduction. A variety of drugs can reduce ICP, such as hypertonic dehydrants, diuretics, blood volume expanders, and hormones. The application of hypertonic dehydrants is the most common, among which mannitol has been used

基金项目: 北京市医院管理中心青苗计划 (No. QML20230511); 中国药学会医院药学专委会科研项目 (No. CPA-Z05-ZC-2022-002); 首都医科大学临床专科学院 (系) 培养基金开放课题 (No. CCMU2023ZKYXZ008)。

作者简介: 高一铭, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: 248473967@qq.com * **通信作者:** 李草, 男, 博士, 副主任药师, 主要从事临床药学、药事管理研究, email: livenlife@163.com

for the longest time and is the widely used first-line drug. Diuretics and blood volume expanders alone have a weak effect on reducing intracranial pressure, and are often used in combination with hypertonic dehydrants. Glucocorticoids can be used for the treatment of cerebral edema, and there is limited evidence for the treatment of other types of increased intracranial pressure. Other drugs such as phenobarbital and acetazolamide may also play a role in reducing intracranial pressure, and they are rarely used in clinical practice. Which drug has better effect and more application value is the problem that needs to be paid attention to clinically. This article reviews the drugs related to reducing intracranial pressure at home and abroad, so as to provide reference for clinical drug treatment.

Key words: intracranial pressure; neurosurgery; medical treatment; mannitol; hypertonic saline

颅内压 (intracranial pressure, ICP) 是颅腔内容物 (脑组织、脑脊液、血液) 对颅腔壁产生的压力。颅脑创伤、脑肿瘤、颅内感染等病理损伤可能使颅内压超过正常限度, 从而引起脑缺血、脑水肿、脑疝等神经外科常见的临床综合征。颅内压的绝对值、升高的持续时间与预后相关^[1], 及时进行降颅压治疗有助于降低病死率, 改善神经预后功能。临床上使用分层管理的策略来进行降颅压治疗, 除了基本治疗如头位抬高、维持正常血压和血容量、保持体温, 药物治疗也是重要环节^[1-2]。高渗脱水剂是使用时间最长、应用最普遍的药物类型, 其代表药物甘露醇和高渗盐水是临床的一线常用药。本文就国内外降颅压相关药物及研究现状作一综述。

1 颅内压增高治疗建议

各国指南对需要进行人工干预以降低颅内的标准定义不同, 2018 年欧洲神经重症指南^[3]建议以颅内压 > 25 mmHg 作为开始渗透治疗的标准, 2017 年美国第四版重症颅脑损伤指南^[4]建议干预标准为颅内压 > 22 mmHg, 国内关于治疗脑出血、颅脑损伤、脑水肿等的指南及专家共识多以颅内压 > 20 mmHg 为降颅压治疗的标准^[5-8]。指南建议对颅内增高实施分层管理策略, 根据临床表现、影像资料等情况对患者进行综合评估, 在治疗原发疾病的基础上, 采取抬高头位、维持血压血糖稳定、镇痛镇静等措施, 如基础治疗后患者颅内压仍增高, 实施药物降颅压治疗; 对于药物治疗无效的难治性颅内高压, 可采用手术、低温治疗、过度通气等方式减压。

2 药物治疗现状

2.1 高渗脱水剂

2.1.1 甘露醇 甘露醇具有迅速提高血浆渗透压、增加肾小球滤过率和减少水钠等溶质重吸收等作用, 在静脉注射后 20 min 内起效, 促进脑

组织和脑脊液中的水分转移入血循环并通过肾脏排出, 作用时间持续 4 ~ 6 h。2019 年国内专家共识建议低剂量甘露醇 ($0.25 \sim 1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 应于 10 ~ 20 min 内输注, 每 4 ~ 6 h 给药一次, 脉冲式给药; 大剂量 ($1.0 \sim 2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 甘露醇则常用于紧急降颅内压的短期治疗。如首次给药后颅内压仍高于 20 mmHg, 需重复给药^[1]。在一项纳入 20 例患者的随机对照试验 (randomized controlled trial, RCT) 中^[9], 20% 甘露醇静脉输注 60 min 和 120 min 后颅内压分别下降 45% 和 32%; 与术中给药相比, 切皮后立即给药使甘露醇的作用时间延长, 降压效果更好^[10]; 几项 RCT 比较了甘露醇剂量与降压效果的关系, 与低剂量组相比, 高剂量组甘露醇的脑松弛效果更好, 但不良反应更多^[11-13]。

甘露醇在脑脊液中的排泄较慢, 使用后可引起血容量迅速增多、加重心脏负荷, 也可因过度利尿导致细胞损害和电解质异常, 从而发生颅内压反跳、急性肾损伤、电解质紊乱和心力衰竭等常见不良反应。成人渗透压间隙 (实测血浆渗透压值与计算血浆渗透压值之差) 小于 10 mOsm · L⁻¹ 时需重复给药, 大于 20 mOsm · L⁻¹ 应避免用药^[14], 血浆渗透压超过 320 mOsm · L⁻¹ 时有发生急性肾小管坏死和肾衰竭的风险^[15], 输注速率越高, 急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 越严重。缺血性脑卒中患者的血脑屏障遭到破坏, 甘露醇可从破裂血管进入病灶区, 加重脑水肿, 增加死亡率。

甘露醇作用迅捷、作用时间长, 是临床上使用最普遍的高渗药物, 降颅压效果显著。使用甘露醇治疗期间, 除结合临床和影像学检查评价治疗效果外, 还需及时监测患者血浆渗透压、肾功能、电解质和尿量等指标, 以降低不良反应危害。

2.1.2 高渗盐水 (hypertonic saline, HTS) 渗

透压高于 $320 \text{ mOsm} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含钠盐溶液称为高渗盐水, 通过直接提高细胞外液钠离子浓度、增加血浆渗透压, 促进水分及组织间液回流, 从而降低颅内压。高渗盐水对内环境平衡的影响小, 有利于保持细胞体积及静息电位, 也可以升高平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP) 和脑灌注压 (cerebral perfusion pressure, CPP), 还具有改善炎症反应、增加抗炎因子生成的作用^[16]。HTS 对肾脏相对安全, 在因肾功能损伤不宜使用甘露醇或甘露醇疗效不佳的情况下, 患者可选用 HTS。儿童颅脑创伤 (traumatic brain injury, TBI) 指南唯一推荐使用 HTS 降压^[15], 因为其对儿童的生化及代谢影响较小。

临床常使用的高渗盐水浓度为 3% ~ 23.4%, 各浓度降低颅内压的作用均得到证实。在使用习惯上, 常用的浓度为 3%、5%、7% 和 23.4%, 其中美国通常用 3% 和 23.4%, 欧洲以 5% 和 7% 居多^[17], 我国专家共识推荐 3%^[7]。3% HTS 常用于控制各种类别的颅内压升高, 23.4% HTS 用于颅内高压的紧急降压、甘露醇耐受的颅内压升高及脑疝的逆转^[18], 20% HTS 可在密切监测下长期控制创伤后的激素异常、血钠异常, 改善 CPP; 在 TBI 中, 应用 5% HTS 的患者比起其他浓度 HTS 的死亡率更低, 其中 7.5% HTS 相对于 5% HTS 的死亡率明显更高, 需要指出的是由于样本量限制、患者人群等原因, 还需样本量更大、方法学更完善的研究进一步确证^[19]。

因脑桥对高渗状态更为敏感, 血钠上升速率不应超过 $8 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$, 以防低钠血症纠正过快引起脑桥中央髓鞘溶解症^[7]。使用 HTS 发生肾脏不良反应的可能性较低, 但当血钠浓度超过 $160 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可能造成肾损害^[20]。有研究提出 HTS 可能具有延长凝血时间、减少血小板聚集等作用^[21], 还可能使红细胞溶血, 溶血细胞比例与 HTS 浓度成正相关, 使用期间还需监测血常规及凝血功能。电解质异常 (高钠、低钾、高氯血症等) 是 HTS 最常见的不良反应, 需在监测电解质的情况下及时进行对症处理, 治疗期间血氯应低于 $115 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[22], 连续 7 d 氯离子输入量 $> 2055 \text{ mEq}$ 时发生高氯血症和 AKI 的可能性大^[23]。为降低外周静脉炎的发生率, 3% HTS 的输注速率不应超过 $100 \text{ mOsm} \cdot \text{h}^{-1}$, 使用中心静脉给药可减少不良反应的发生^[24]。

2.1.3 其他高渗脱水剂 甘油作用机制与甘露醇类似, 经肾脏排泄少, 静脉或口服使用均能起到

降低颅内压的作用。国内常使用 10% 的甘油氯化钠注射液。2018 年国内难治性颅内压增高专家共识^[6] 纳入了两项治疗颅脑创伤和缺血性脑水肿的小样本研究, 患者在短时间内发生颅内压反弹, 不推荐首选甘油进行治疗。

甘油果糖是常用的脱水剂, 由 10% 甘油溶液中添加 5% 的果糖制成。甘油果糖经血液进入全身组织, 起效、消除均缓慢, 2 ~ 3 h 达平衡。与单独使用甘露醇相比, 甘油果糖和甘露醇交替使用可起到更好的降颅内压效果, 且有利于维持 CPP^[25]。由于果糖的存在, 甘油组的乳酸水平显著高于甘露醇组, 且乳酸升高幅度与甘油输注时间成正比^[26]。

醋酸盐在肝内外均能代谢, 代谢速度快, 机体可耐受 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 临床上可考虑用醋酸钠缓冲的 HTS 溶液 (hypertonic saline buffered with sodium acetate, HSwSA) 替代 HTS。使用 HTS 和 HSwSA 治疗, HSwSA 组显著较低氯离子负荷和 AKI 发生率^[27]。早期给予 TBI 患者乳酸钠静脉滴注 3 h, 患者乳酸、丙酮酸和葡萄糖的浓度增加, 谷氨酸和颅内压降低, 表明乳酸钠治疗对脑代谢有益^[28]。乳酸钠和醋酸钠的终末代谢产物都是碳酸氢钠, 循环不良的情况下代谢速率减慢, 故禁用于重症代谢性酸中毒、重度低钾、心力衰竭和严重肾功能不全的患者。

山梨醇是甘露醇的异构体, 大部分以原形从肾脏排泄, 静脉注射后迅速进入细胞外液, 在 15 min 内出现降颅内压作用。在常用的三种渗透剂 (甘油、甘露醇、山梨醇) 中, 山梨醇最不易进入脑脊液, 且能影响体内葡萄糖代谢, 导致血糖升高^[29]。山梨醇可增强利尿药和碳酸酐酶抑制剂的作用, 也可与乳酸钠合用治疗有代谢性酸中毒并需补充热量的脱水患者。

需要指出的是, 甘露醇和高渗盐水是临床上使用最多、用途最广的高渗降颅内压药物, 与它们相比, 其他高渗药物的研究总体样本量偏少, 文献质量相对较低, 还需进一步的高质量研究来证实其有效性和安全性。

2.2 利尿剂

呋塞米是强效利尿剂, 作用于肾小管髓袢厚壁段, 抑制氯化钠的重吸收, 也能抑制前列腺素分解酶活性, 扩张肾血管。静脉给药后 5 min 起效, 1 h 内效果达到最大, 利尿作用持续 2 h。单独应用时存在起效慢、持续时间短且易导致电解质紊乱的情况, 降颅内压作用有限, 故多

与其他药物联用。加用呋塞米后,低剂量甘露醇可获得与高剂量甘露醇相似的疗效^[30-31],可替代高剂量甘露醇,降低肾损伤和水电解质紊乱的可能性;另外,呋塞米联合 HTS 也能有效降低颅内压^[32]。

2.3 胶体渗透剂

人血清白蛋白是常用的胶体渗透剂,2018 年欧洲神经重症指南^[3]不推荐神经重症患者使用白蛋白维持液体平衡,不推荐急性缺血性脑卒中患者使用大剂量(20%~25%)白蛋白。在急性颅脑损伤的治疗上,输注白蛋白可导致更严重的不良后果,也不推荐使用^[3]。SAFE-TBI 研究发现第 1 周内白蛋白组颅内压和死亡率显著增加,但有证据表明白蛋白升高颅内压的作用与溶液张力有关,与溶质无关,尚需进一步的临床研究来确定其是否有益^[33]。

羟乙基淀粉(hetastarch, HES)常与氯化钠合并配制成 130/0.4 或 200/0.5(分子量/摩尔取代度)的电解质溶液使用。多项研究表明 HTS-HES 可延长 HTS 的作用时间、提高血浆渗透压,也能起到扩充血容量、改善血流动力学的作用。Harutjunyan 等^[34]的小样本研究比较了 HTS-HES 和甘露醇对颅内压升高的治疗效果,输注 7.2% HTS-HES 降低颅内压的时间更短,使 CPP 和 MAP 升高的效果可能更好。

右旋糖酐是化学合成的多糖类聚合物,可降低血液黏滞性,改善微循环。右旋糖酐 10/20/40/70 可与葡萄糖或氯化钠配伍,静脉滴注给药。一项小样本研究中,右旋糖酐与 HTS 合用时降低颅内压的效果优于甘露醇^[35]。

2.4 镇静剂

治疗浓度的巴比妥类药物可降低谷氨酸的兴奋作用、加强 γ 氨基丁酸的抑制作用,也可通过抑制脑代谢、增加脑血管阻力,明显降低颅内压。巴比妥类不是一线降颅压用药,常用来治疗对传统治疗措施无效的患者。与戊巴比妥相比,使用硫喷妥钠的患者颅内压控制可能更好,两组神经系统结局及低血压发生率无显著差异^[36];使用巴比妥治疗可显著增加 TBI 患者低血压的发生率,但不能明显改善预后和死亡率^[36],使用时需及时监测血压、心电图和颅内压等指标。其他的镇静或麻醉剂如咪达唑仑、丙泊酚应严格掌握使用指征,原因是潜在的颅内压低灌注风险^[15, 37]。

2.5 糖皮质激素

糖皮质激素可以减轻血管源性水肿和细胞内水肿,间接降低颅内压。感染性脑水肿患者常发生炎性综合征,临床选用强效地塞米松大剂量冲击,快速制止炎症发展,大多数患者可于 2~3 剂后缓解^[38];结核性、隐球菌性脑膜炎导致的慢性脑水肿常选用氢化可的松静脉滴注和泼尼松口服,根据病情决定剂量和疗程^[38]。激素在脑损伤性脑水肿中的使用意见尚未达成一致,TBI 管理指南^[4]不建议对重症 TBI 患者使用激素,但在缺乏有效替代方案的情况下,临床上仍在 TBI 后使用激素治疗。鉴于激素存在的副作用,用药时间不宜过长,停药时需逐渐减量。

3 甘露醇和高渗盐水有效性和安全性的系统评价

随着药物治疗研究的深入,甘露醇输注所带来的肾损伤、水电解质紊乱等并发症越发受到重视,关于另一种常用的渗透性脱水剂高渗盐水的研究逐渐增多,两者的对比研究也成为了降颅压治疗的热门话题。3%HTS 的渗透浓度与 20%甘露醇相似(1026 vs 1100 mOsm·L⁻¹),与甘露醇相比,反射系数 HTS 高于甘露醇(1.0 vs 0.9),脱水效果更好,不易引起低血容量、肾损伤和颅内压反跳等现象,多项研究显示其与甘露醇对神经预后的影响类似,降颅压效果和血流动力学稳定性等方面甚至更具优势^[39-41],meta 分析显示 TBI 时 3%HTS 比 20%甘露醇降颅压时间持续更久且能增加脑灌注压,其中低脑灌注压与更差的临床结局相关^[42],也有研究表明由于目前临床证据有限,HTS 在有效性和安全性上并不优于甘露醇^[43]。此外,高渗盐水的电解质较多,快速输注时可能引起高钠血症、高氯血症和脱髓鞘等并发症,需注意输液速度、严密监测离子浓度。目前,输注 HTS 的最适剂量和给药方式尚无统一意见,与两种降颅压药物的疗效、安全性相关的循证证据还需进一步完善。

4 降颅压药物临床注册研究及未来趋势

分别检索国内外降颅压药物治疗相关的临床试验,来源于美国临床试验中心的有 30 个,来源于中国的有 13 个,注册时间为 2002 年 5 月至 2023 年 1 月,目标药物有甘露醇、高渗盐水、乙酰唑胺、乳酸钠等(见表 1)。与高渗药物有效性和安全性相关的研究最多,对降颅压药物选择、使用剂量和方式的研究较少,且样本量较少,未来还需大样本和高质量的 RCT 来对研究结果加以证实。

表 1 降颅压药物临床注册研究数量

Tab 1 Number of clinical studies of intracranial pressure lowering drugs

目标药物	注册数量		试验状态			研究类型			样本量		
	中国	美国	进行	完成	未知	干预性	RCT	观察性	≤ 50	51 ~ 100	≥ 101
甘露醇	4	2	0	4	2	5	5	1	1	3	2
高渗盐水	2	1	0	2	1	2	2	1	1	1	1
甘露醇 / 高渗盐水	6	6	1	7	4	12	10	0	3	6	3
甘露醇 / 乳酸钠	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0
羟乙基淀粉	2	1	0	2	1	3	3	0	1	2	0
地塞米松	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
乙酰唑胺	0	2	0	2	0	2	2	0	2	0	0
AZD4017	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0
氯胺酮	0	2	1	0	1	2	1	0	1	1	0
右美托咪定	0	3	1	2	0	3	2	0	2	1	0
七氟烷	0	2	0	1	1	2	2	0	0	1	1
地氟醚 / 瑞芬太尼	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0

5 小结

各颅内压增高的指南和专家共识中，高渗脱水剂是常见的治疗药物，其中甘露醇和高渗盐水的应用最为广泛（见表 2）。近年来，由于甘露醇治疗中常出现肾损伤、电解质紊乱、颅内压反跳等不良反应，而高渗盐水的疗效和安全性似乎更

具优势，关于两者的对比研究愈发受到重视。针对不同原因导致的颅内压增高，临床使用的药物治疗方式各不相同，关于降颅压药物种类的选择和最佳的药物浓度、剂量和使用时间的推荐意见尚未达成一致，还需更多、更严谨的研究来为临床降颅压药物的使用提供依据。

表 2 国内外各指南对颅内压增高的治疗建议

Tab 2 Recommendations for the treatment of elevated intracranial pressure at home and abroad

指南名称	诊断	颅内监测	分级治疗	激素	推荐药物
2019 SIBICC ^[15]	sTBI	推荐	是	不推荐	推荐使用 HTS；甘露醇在儿童中应用的证据不足；应用镇痛镇静药如咪达唑仑、芬太尼时应严格掌握适应证
2020 NIH ^[2]	sTBI	无	是	未提及	首选 HTS、可选甘露醇；严重时可考虑巴比妥类；不推荐利尿剂
2018 ESICM ^[3]	NIC	推荐	否	未提及	HTS 或甘露醇
2020 NCS ^[44]	TBI	推荐	否	未提及	建议使用 HTS，无法接受者使用甘露醇替代，但两者均可能无法改善预后
2018 SFAR ^[37]	sTBI	推荐	是	条件反对	甘露醇或 250 mOsm HTS；不建议 4% 白蛋白溶液；不建议大剂量糖皮质激素
2018 TBMC NIC ^[45]	TBI	推荐	是	未提及	HTS 或甘露醇；条件推荐苯巴比妥
2021 SINch ^[46]	TBI	推荐	是	条件反对	反对非弹丸（脉冲）式静脉注射甘露醇，未提及 HTS；反对常规应用激素；反对应用咪塞米
2018 颅内压治疗中国共识 ^[6]	难治性颅内压增高	推荐	是	条件反对	首选甘露醇，可选 HTS；镇痛镇静药可条件推荐咪达唑仑、丙泊酚、硫喷妥钠控制躁动以维持颅内压稳定，不推荐芬太尼；不推荐大剂量激素
2019 高渗盐水专家共识 ^[1]	颅内压增高	推荐	是	未提及	甘露醇最常用，也可选 HTS
2022 甘露醇中国共识 ^[7]	颅内压增高	推荐	否	未提及	首选 HTS，也可选甘露醇

注（Note）：西雅图国际严重创伤性脑损伤共识会议（Seattle International Severe Traumatic Brain Injury Consensus Conference, SIBICC）；重型颅脑创伤（severe traumatic brain injury, sTBI）；美国国立卫生研究院（National Institutes of Health, NIH）；欧洲危重病医学会（European Society of Intensive Medicine, ESICM）；神经重症监护（neurointensive care, NIC）；神经重症监护学会（Neurocritical Care Society, NCS）；法国麻醉和复苏学会（Société française d’anesthésie et de réanimation, SFAR）；东京湾医学中心神经重症指南（Tokyo Bay Medical Center neurointensive care, TBMC NIC）；意大利神经外科学会（Italian Society of Neurosurgery, SINch）。

参考文献

[1] 中华医学会神经外科学分会小儿学组, 中华医学会神经外科学分会神经重症协作组, 《甘露醇治疗颅内压增高中国专家共识》编写委员会. 甘露醇治疗颅内压增

高中国专家共识[J]. 中华医学杂志, 2019, 99 (23): 1763-1766.
 [2] Chesnut RM, Temkin N, Videtta W, et al. Consensus-based management protocol (CREVICE Protocol)

- for the treatment of severe traumatic brain injury based on imaging and clinical examination for use when intracranial pressure monitoring is not employed [J]. *J Neurotrauma*, 2020, 37 (11): 1291-1299.
- [3] Oddo M, Poole D, Helbok R, et al. Fluid therapy in neurointensive care patients: ESICM consensus and clinical practice recommendations [J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44 (4): 449-463.
- [4] Carney N, Totten AM, O' Reilly C, et al. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury, fourth edition [J]. *Neurosurgery*, 2017, 80 (1): 6-15.
- [5] 中华医学会神经病学分会神经重症协作组, 中国医师协会神经内科医师分会神经重症专委会. 自发性大容积脑出血监测与治疗中国专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2017, 97 (9): 653-660.
- [6] 中华医学会神经病学分会神经重症协作组, 中国医师协会神经内科医师分会神经重症专业委员会. 难治性颅内压增高的监测与治疗中国专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98 (45): 3643-3652.
- [7] 中华医学会神经外科学分会, 中国神经外科重症管理协作组, 中国神经外科转化与循证医学协作组, 等. 高渗盐水治疗脑水肿及颅内高压的专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2022, 102 (17): 1258-1266.
- [8] 中华医学会神经外科学分会, 中国医师协会急诊医师分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组, 等. 高血压性脑出血中国多学科诊治指南 [J]. *中华神经外科杂志*, 2020, 36 (8): 757-770.
- [9] Francony G, Fauvage B, Falcon D, et al. Equimolar doses of mannitol and hypertonic saline in the treatment of increased intracranial pressure [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36 (3): 795-800.
- [10] Zhang JJ, Liu YH, Tu MY, et al. Comparison of 1.0 g/kg of 20% mannitol initiated at different time points and effects on brain relaxation in patients with midline shift undergoing supratentorial tumor resection: a randomized controlled trial [J]. *J Neurosurg*, 2022, 136 (2): 350-357.
- [11] Li S, Sun HH, Liu XY, et al. Mannitol improves intraoperative brain relaxation in patients with a midline shift undergoing supratentorial tumor surgery: a randomized controlled trial [J]. *J Neurosurg Anesth*, 2020, 32 (4): 307-314.
- [12] Quentin C, Charbonneau S, Moumdjian R, et al. A comparison of two doses of mannitol on brain relaxation during supratentorial brain tumor craniotomy: a randomized trial [J]. *Anesth Analg*, 2013, 116 (4): 862-868.
- [13] Seo H, Kim E, Jung H, et al. A prospective randomized trial of the optimal dose of mannitol for intraoperative brain relaxation in patients undergoing craniotomy for supratentorial brain tumor resection [J]. *J Neurosurg*, 2017, 126 (6): 1839-1846.
- [14] Donnet A, Metellus P, Levrier O, et al. Endovascular treatment of idiopathic intracranial hypertension: clinical and radiologic outcome of 10 consecutive patients [J]. *Neurology*, 2008, 70 (8): 641-647.
- [15] Kochanek PM, Tasker RC, Carney N, et al. Guidelines for the management of pediatric severe traumatic brain injury, third edition: update of the brain trauma foundation guidelines, executive summary [J]. *Neurosurgery*, 2019, 84 (6): 1169-1178.
- [16] Rizoli SB, Rhind SG, Shek PN, et al. The immunomodulatory effects of hypertonic saline resuscitation in patients sustaining traumatic hemorrhagic shock: a randomized, controlled, double-blinded trial [J]. *Ann Surg*, 2006, 243 (1): 47-57.
- [17] Mangat HS, Härtl R. Hypertonic saline for the management of raised intracranial pressure after severe traumatic brain injury [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1345: 83-88.
- [18] Leasure A, Kimberly WT, Sansing LH, et al. Treatment of edema associated with intracerebral hemorrhage [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2016, 18 (2): 9.
- [19] Wang X, He Q, Ma L, et al. Comparison of different concentrations of hypertonic saline in patients with traumatic brain injury: evidence from direct and indirect comparisons [J]. *Injury*, 2022, 53 (11): 3729-3735.
- [20] Froelich M, Ni Q, Wess C, et al. Continuous hypertonic saline therapy and the occurrence of complications in neurocritically ill patients [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37 (4): 1433-1441.
- [21] Adamik KN, Butty E, Howard J. In vitro effects of 3% hypertonic saline and 20% mannitol on canine whole blood coagulation and platelet function [J]. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 242.
- [22] Wagner I, Hauer EM, Staykov D, et al. Effects of continuous hypertonic saline infusion on perihemorrhagic edema evolution [J]. *Stroke*, 2011, 42 (6): 1540-1545.
- [23] Sigmon J, May CC, Bryant A, et al. Assessment of acute kidney injury in neurologically injured patients receiving hypertonic sodium chloride: does chloride load matter? [J]. *Ann Pharmacother*, 2020, 54 (6): 541-546.
- [24] Bhardwaj A, Ulatowski JA. Cerebral edema: hypertonic saline solutions [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 1999, 1 (3): 179-188.
- [25] 李宁, 蒋飞, 杨威, 等. 脱水药治疗儿童创伤性颅高压的临床疗效 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2021, 19 (12): 82-86.
- [26] Katayama S, Tonai K, Goto Y, et al. Transient hyperlactatemia during intravenous administration of glycerol: a prospective observational study [J]. *J Intensive Care*, 2018, 6 (1): 55.
- [27] Sadan O, Singbartl K, Kraft J, et al. Low-chloride-versus high-chloride-containing hypertonic solution for the treatment of subarachnoid hemorrhage-related complications: the ACETatE (A low Chloride hyperTonic solution for brain Edema) randomized trial [J]. *J Intensive Care*, 2020, 8 (1): 32.
- [28] Bouzat P, Sala N, Suys T, et al. Cerebral metabolic ef-

- fects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain [J]. *Intensive Care Med*, 2014, 40 (3): 412-421.
- [29] Nau R. Osmotherapy for elevated intracranial pressure: a critical reappraisal [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 38 (1): 23-40.
- [30] Aboelela MA, Alrefaey AK. Brain-relaxing effect of different diuretic regimens in supratentorial tumor surgery: a comparative study guided by optic nerve sheath diameter [J]. *Anesth Essays Res*, 2020, 14 (3): 531-535.
- [31] Akcil EF, Dilmen OK, Karabulut ES, et al. Effective and safe mannitol administration in patients undergoing supratentorial tumor surgery: a prospective, randomized and double blind study [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2017, 159 (8): 55-61.
- [32] Li YQ, Li ZH, Li M, et al. Efficacy and safety of continuous micro-pump infusion of 3% hypertonic saline combined with furosemide to control elevated intracranial pressure [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 1752-1758.
- [33] Wiedermann CJ. Use of hyperoncotic human albumin solution in severe traumatic brain injury revisited-a narrative review and meta-analysis [J]. *J Clin Med*, 2022, 11 (9): 2662.
- [34] Harutjunyan L, Holz C, Rieger A, et al. Efficiency of 7.2% hypertonic saline hydroxyethyl starch 200/0.5 versus mannitol 15% in the treatment of increased intracranial pressure in neurosurgical patients-a randomized clinical trial [ISRCTN62699180] [J]. *Crit Care*, 2005, 9 (5): R530-540.
- [35] Battison C, Andrews PJ, Graham C, et al. Randomized, controlled trial on the effect of a 20% mannitol solution and a 7.5% saline/6% dextran solution on increased intracranial pressure after brain injury [J]. *Crit Care Med*, 2005, 33 (1): 196-202.
- [36] Roberts I, Sydenham E. Barbiturates for acute traumatic brain injury [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 12 (12): Cd000033.
- [37] Geeraerts T, Velly L, Abdenmour L, et al. Management of severe traumatic brain injury (first 24hours) [J]. *Anaesth Crit Care Pain Med*, 2018, 37 (2): 171-186.
- [38] 虞佩兰. 糖皮质激素在小儿脑水肿与颅内高压治疗中的应用 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2000, 15 (1): 10-12.
- [39] Ali A, Tetik A, Sabanci PA, et al. Comparison of 3% hypertonic saline and 20% mannitol for reducing intracranial pressure in patients undergoing supratentorial brain tumor surgery: a randomized, double-blind clinical trial [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2018, 30 (2): 171-178.
- [40] Singla A, Mathew PJ, Jangra K, et al. A comparison of hypertonic saline and mannitol on intraoperative brain relaxation in patients with raised intracranial pressure during supratentorial tumors resection: a randomized control trial [J]. *Neurol India*, 2020, 68 (1): 141-145.
- [41] Etezadi F, Babaie M, Larijani A, et al. Comparison of preoperative hypertonic saline versus mannitol for intraoperative brain relaxation and early postoperative outcome among patients with cerebral low-grade glioma: a prospective study [J]. *Asian J Neurosurg*, 2020, 15 (4): 941-945.
- [42] Shi JM, Tan LH, Ye J, et al. Hypertonic saline and mannitol in patients with traumatic brain injury: A systematic and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (35): e21655.
- [43] Chen H, Song Z, Dennis JA. Hypertonic saline versus other intracranial pressure-lowering agents for people with acute traumatic brain injury [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 1 (1): Cd010904.
- [44] Cook AM, Morgan Jones G, Hawryluk GWJ, et al. Guidelines for the acute treatment of cerebral edema in neurocritical care patients [J]. *Neurocrit Care*, 2020, 32 (3): 647-666.
- [45] Norisue Y, Fujimoto Y, Nakagawa K. Preliminary guideline-and pathophysiology-based protocols for neurocritical care [J]. *J Intensive Care*, 2018, 6: 45.
- [46] Iaccarino C, Lippa L, Munari M, et al. Management of intracranial hypertension following traumatic brain injury: a best clinical practice adoption proposal for intracranial pressure monitoring and decompressive craniectomy. Joint statements by the Traumatic Brain Injury Section of the Italian Society of Neurosurgery (SINch) and the Neuroanesthesia and Neurocritical Care Study Group of the Italian Society of Anesthesia, Analgesia, Resuscitation and Intensive Care (SIAARTI) [J]. *J Neurosurg Sci*, 2021, 65 (3): 219-238.

(收稿日期: 2023-06-01; 修回日期: 2023-08-16)

基于 UPLC 指纹图谱和多指标成分定量的野生与栽培贯叶金丝桃的质量评价

周海琴, 何雨晴, 陈盛君* (江阴天江药业有限公司, 江苏 江阴 214434)

摘要: **目的** 研究并建立贯叶金丝桃 UPLC 指纹图谱和多指标成分的含量测定方法。**方法** 采用 Eclipse Plus C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 300 nm; 流速为 0.25 mL·min⁻¹; 柱温为 25 °C。建立了同时测定金丝桃苷、芦丁、槲皮苷、槲皮素含量及指纹图谱的方法, 并结合相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 对 22 批贯叶金丝桃样品进行质量分析。**结果** 建立了贯叶金丝桃药材 UPLC 指纹图谱共有模式, 标定了 11 个共有峰, 并指认了其中 9 个, 主成分分析基本可将 22 批贯叶金丝桃按照不同产地分为 5 类; 采用 OPLS-DA 分析, 得到 5 个质量差异标志物, 差异排序依次为峰 10 (槲皮苷) > 峰 5 > 峰 6 (芦丁) > 峰 8 (异槲皮苷) > 峰 1 (绿原酸)。含量测定结果表明, 野生品与栽培品 4 个指标成分总含量差异不甚明显, 不同产地 4 个指标成分总量略有差异, 其中以陕西、新疆产地的含量较高。**结论** 建立的 UPLC 指纹图谱和 4 个指标成分同时测定的方法可用于贯叶金丝桃药材的质量控制及质量标准提升。

关键词: 贯叶金丝桃; 指纹图谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3274-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.027

Quality analysis of wild and home hyperici perforati herba by UPLC fingerprint and multi-component quantitation

ZHOU Hai-qin, HE Yu-qing, CHEN Sheng-jun* (*Jiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Jiangyin Jiangsu 214434*)

Abstract: Objective To establish a UPLC fingerprints and multi-component quantitation of hyperici perforati herba. **Methods** Eclipse Plus C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) column was used. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelength was 300 nm, the flow rate was 0.25 mL·min⁻¹ and the column temperature was 25 °C. The content of hyperoside, rutin, quercitrin, quercetin was determined and the fingerprint was established. Variance analysis of single factor, combined with cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and the partial orthogonal least square discriminant analysis (OPLS-DA) was used to analyze the quality 22 batches of hyperici perforati herba. **Results** The common pattern of UPLC fingerprints was established. We distinguished out 11 common peaks. CA and PCA showed that 22 batches of different origins of hyperici perforati herba were broadly divided into 5 categories. The OPLS-DA showed 5 difference markers, following the order of significance difference: peak 10 (quercitrin) > peak 5 > peak 6 (rutin) > peak 8 (isoquercitrin) > peak 1 (chlorogenic acid). There was no big difference in the wild and cultivated products as to the content of 4 ingredients. The content of the 4 indicators were slightly different from different origins, the content of Shaanxi and Xinjiang production areas was higher. **Conclusion** The

基金项目: 江苏省科技成果转化专项 (No. BA2021018)。

作者简介: 周海琴, 女, 硕士, 主要从事中药资源及中药质量标准研究, email: zhouhq@tianjiang.com *通信作者: 陈盛君, 女, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事中药配方颗粒及经典名方研究开发, email: chensj@tianjiang.com

fingerprint and content determination method can be used to control the quality and improve the quality standard of the hyperici perforati herba.

Key words: hyperici perforati herba; fingerprint; content determination

贯叶金丝桃为藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分^[1], 具有疏肝解郁, 清热利湿, 消肿通乳的功效, 为冷背中药, 又名贯叶连翘、圣约翰草。主产于陕西、甘肃、新疆、湖北、湖南、贵州、四川等地^[2], 贯叶金丝桃含多种生物活性成分^[3], 主要包括苯并二萜酮类、黄酮类(金丝桃苷、槲皮素、芦丁、槲皮苷等)、间苯三酚类等化合物, 此外还有挥发油类等成分, 现代药理研究表明, 贯叶金丝桃有抗抑郁、抗病毒、抗肿瘤、抗菌等作用^[4-5], 贯叶金丝桃提取制成的制剂已在欧美大量上市, 近年来在世界范围内掀起研究、开发和应用热潮^[6]。随着市场需求量的逐年增加, 贯叶金丝桃的野生资源日益减少, 采用栽培品是保护其野生资源和满足市场需求的有效方式。

目前, 对贯叶金丝桃的研究多集中于化学成分、药理作用、栽培技术、提取工艺等方面, 但对野生转栽培后质量的评价研究暂未见报道。本研究发现, 贯叶金丝桃中含有较高含量的芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素, 这些成分均具有一定活性, 结合文献^[7-11]及 2020 年版《中国药典》, 选择芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素等 4 种黄酮类成分的总量作为贯叶金丝桃质量控制的指标性成分。此外, 中药指纹图谱是一种综合的、量化的鉴定手段, 主要用于评价中药材以及中药制剂半成品质量的真实性、优良性和稳定性, 因此, 本研究在 2020 年版《中国药典》贯叶金丝桃评价方法的基础上, 建立指纹图谱技术结合多指标成分定量综合评价野生与栽培贯叶金丝桃的质量差异, 为贯叶金丝桃资源扩展及其栽培品的规模应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪 (Waters 公司); Empower 3 工作站 (Waters 公司); Agilent Technologies 1290 Infinity 超高效液相色谱仪 (配有二极管阵列检测器, 柱温箱, 自动进样器, 四元泵, OpenLAB CDS 2.3 色谱工作站, 美国安捷伦)。METTLER TOLEDO XP6 百万分之一天平、ME204E 型电子分析天平 [梅特勒-托利多 (上海) 仪器有限公司]; KQ-250B 超声清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q IQ 型纯水系统 (Millipore 公司); AS165W 型离心机 [亚速旺 (上海) 商贸有限公司];

GKC114 控温水浴锅 (南通华泰实验仪器有限公司)。乙腈 (色谱纯, Thermo Fisher 公司); 水为超纯水; 磷酸 (色谱纯, Aladdin 公司); 其他试剂均为分析纯。

1.2 试药

芦丁 (批号: 100080-201811, 含量: 91.7%)、金丝桃苷 (批号: 111521-201507, 含量: 94.3%)、槲皮苷 (批号: 111538-201606, 含量: 90.6%)、槲皮素 (批号: 100081-201610, 含量: 99.1%)、原儿茶酸 (批号: 110809-201906, 含量: 97.7%)、绿原酸 (批号: 110753-202018, 含量: 96.1%)、异槲皮苷 (批号: 111809-201804, 含量: 97.2%)、贯叶金丝桃对照药材 (批号: 121506-200501) (中国食品药品检定研究院)。新绿原酸 (批号: 3209, 含量: 99.3%)、隐绿原酸 (批号: 3208, 含量: 98.3%) (上海诗丹德生物技术有限公司)。

14 批野生贯叶金丝桃分别购于陕西、贵州、湖北等地, 8 批栽培品购于新疆、甘肃, 经江阴天江药业有限公司陈盛君主任药师鉴定为藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分, 均符合 2020 年版《中国药典》要求。具体样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Eclipse Plus C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以乙腈 (A)-0.1 磷酸溶液 (B) 为流动相, 进行梯度洗脱 (0~7 min, 5%→9%A; 7~12 min, 9%→16%A; 12~25 min, 16%→21%A; 25~33 min, 21%→40%A; 34~36 min, 40%A); 流速为 0.25 mL·min⁻¹; 柱温为 25℃; 检测波长为 300 nm; 进样量 1 μL。

2.2 参照物溶液的制备

取贯叶金丝桃对照药材 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 25 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为对照品溶液。另取芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成每 1 mL 各含芦丁 100 μg、金丝桃苷 150 μg、槲皮苷 50 μg、槲皮素 30 μg 的溶液, 作为对照品溶液。再取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异槲皮苷、原儿茶酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 15

表 1 贯叶金丝桃样品信息

Tab 1 Sample information of hyperici perforati herba

编号	批号	产地	来源	编号	批号	产地	来源
S1	2203151	陕西省商洛市柞水县	野生	S12	2203084	湖北省恩施来凤县	野生
S2	2203152	陕西省商洛市柞水县	野生	S13	2203085	湖北省恩施利川市	野生
S3	2203153	陕西省商洛市柞水县	野生	S14	2203086	湖北省恩施宣恩县	野生
S4	2204040	湖北省恩施巴东县	野生	S15	2207013	甘肃省陇南市礼县	栽培
S5	2204041	湖北省恩施来凤县	野生	S16	2207014	甘肃省陇南市礼县	栽培
S6	2204042	湖北省恩施利川市	野生	S17	2207015	甘肃省陇南市礼县	栽培
S7	2204043	湖北省恩施宣恩县	野生	S18	2208007	新疆塔城地区塔城市	栽培
S8	2204060	贵州省贵阳市修文县	野生	S19	2208008	新疆塔城地区塔城市	栽培
S9	2204061	贵州省贵阳市修文县	野生	S20	2208009	新疆塔城地区塔城市	栽培
S10	2204062	贵州省贵阳市修文县	野生	S21	2208156	甘肃省陇南市礼县	栽培
S11	2203083	湖北省恩施巴东县	野生	S22	2208158	甘肃省陇南市武都县	栽培

µg、新绿原酸 10 µg、隐绿原酸 15 µg、异槲皮苷 10 µg、原儿茶酸 15 µg 的溶液，作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取贯叶金丝桃样品粉末（过四号筛）约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 50 mL，密塞，称定重量，加热回流 1 h，放冷，再称定重量，用 70% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取贯叶金丝桃（S1）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，以绿原酸对照品为参照物峰（S1），计算峰 1、峰 2、峰 4、峰 5 与 S1 峰的相对保留时间和相对峰面积，以金丝桃苷对照品为参照物峰（S2），计算峰 6、峰 8、峰 9、峰 10、峰 11 与 S2 峰的相对保留时间和相对峰面积。各特征峰的相对保留时间 RSD 值在 0.02% ~ 0.11%，相对峰面积的 RSD 值在 0.05% ~ 0.29%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批号贯叶金丝桃样品（S1），平行 6 份，按“2.3”项下方法制备，进样测定，结果各特征峰的相对保留时间 RSD 值在 0.01% ~ 0.46%，相对峰面积的 RSD 值在 0.11% ~ 1.9%，表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批号样品贯叶金丝桃样品（S1），按“2.3”项下方法制备，分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 进样测定，结果各特征峰的相对保留时间 RSD 值在 0.50% ~ 1.7%，相对峰面积的 RSD 值在 0.22% ~ 1.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 中间精密度试验 由不同分析人员在不同时间、不同厂家色谱仪下操作，取同一批号贯叶金丝桃样品（S1），平行 3 份，按“2.1.3”项下方法制备，进样测定，计算得各特征峰的相对保留

时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 2.0%，表明中间精密度良好。

2.5 指纹图谱建立及相似度评价

2.5.1 共有峰的确定 分别取 14 批野生贯叶金丝桃和 8 批栽培贯叶金丝桃药材样品，按“2.3”项下方法制备，进样测定，记录色谱图，采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”对贯叶金丝桃色谱图进行分析，以样品 S1 的图谱为参照，对 22 批贯叶金丝桃进行多点校正和 Mark 峰匹配，结果共标定 11 个共有峰，见图 1。通过质谱指认及对照品确认，确定了其中 9 种成分，峰 1 为原儿茶酸、峰 2 为新绿原酸、峰 3 为绿原酸、峰 4 为隐绿原酸、峰 6 为芦丁、峰 7 为金丝桃苷、峰 8 为槲皮苷、峰 10 为槲皮素、峰 11 为槲皮素，分别见图 2、图 3。

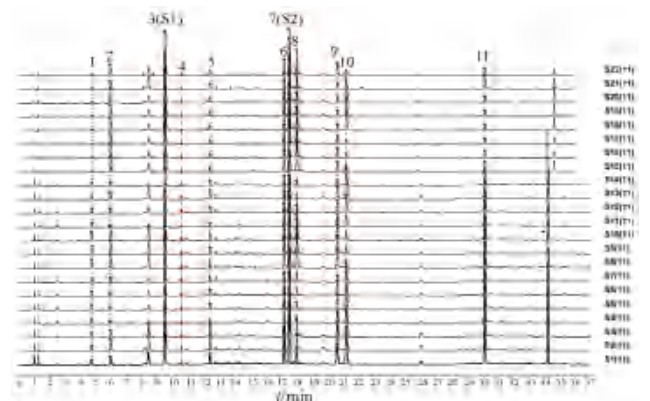


图 1 22 批贯叶金丝桃药材 UPLC 指纹图谱叠加图

Fig 1 UPLC fingerprint overlay chart of 22 batches of hyperici perforati herba

2.5.2 相似度评价 计算各样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度，结果见表 2。22 批贯叶金丝桃指纹图谱与对照指纹图谱的相似度 0.687 ~ 0.994，14 批野生贯叶金丝桃与野生贯叶金丝桃对照指纹图谱的相似度在 0.930 ~ 0.991，

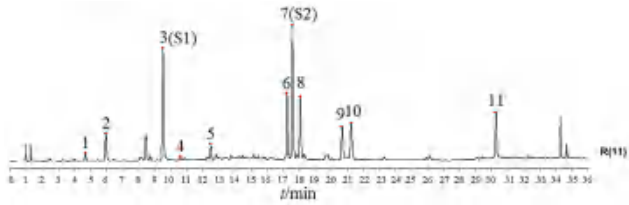


图 2 贯叶金丝桃药材对照指纹图谱

Fig 2 Reference fingerprint (R) of hyperici perforati herba

1. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 2. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 3. 绿原酸 (chlorogenic acid); 4. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid); 6. 芦丁 (rutin); 7. 金丝桃苷 (hyperoside); 8. 异槲皮苷 (isoquercitrin); 10. 槲皮苷 (quercitrin); 11. 槲皮素 (quercetin)

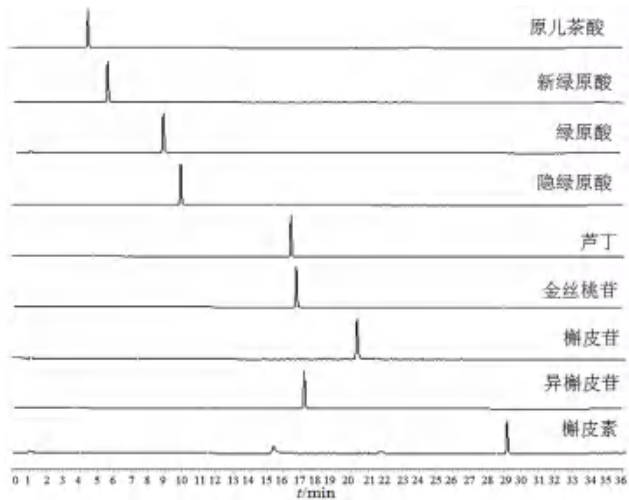


图 3 对照品溶液的 UPLC 色谱

Fig 3 UPLC chromatogram of reference substances

8 批栽培贯叶金丝桃与栽培贯叶金丝桃对照指纹图谱的相似度在 0.916 ~ 0.994, 说明相同来源样品不同批次间药材质量大体一致。野生、栽培一起分析, 相似度略低, 说明野生贯叶金丝桃和栽培贯叶金丝桃样品有相似的物质基础, 但在化学成分上存在一定的差异。

2.5.3 聚类分析 以 11 个共有峰的峰面积为变量, 采用 SPSS 23.0 软件, 以瓦尔德法对 22 批样品进行聚类分析, 结果见图 4, 当参考线大于 20 时, 22 批贯叶金丝桃样品可分为两类, I 类为样品 S1 ~ S14, 均为野生品; II 类为样品 S15 ~ S22, 均为栽培品。当参考线为 7.5 时, 可分为五类, I 类为样品 S8 ~ S10, 产地是贵州贵阳; II 类为样品 S1 ~ S3, 产地是陕西商洛; III 类为样品 S4 ~ S7, S11 ~ S14, 产地是湖北恩施; IV 类为样品 S18 ~ S20, 产地为新疆塔城; V 类为样品 S15 ~ S17, S21 ~ S22, 产地为甘肃陇南, 因此, 通过聚类分析可将贯叶金丝桃野生品和栽培品进行区分, 亦可将贯叶金丝桃不同产地进行区分。

2.5.4 主成分分析 以 11 个共有指纹峰的峰面

表 2 贯叶金丝桃样品指纹图谱相似度评价

Tab 2 Similarity evaluation of fingerprints of hyperici perforati herba

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.908	S12	0.837
S2	0.954	S13	0.882
S3	0.876	S14	0.899
S4	0.687	S15	0.994
S5	0.742	S16	0.993
S6	0.889	S17	0.990
S7	0.846	S18	0.988
S8	0.901	S19	0.990
S9	0.903	S20	0.989
S10	0.904	S21	0.920
S11	0.743	S22	0.990

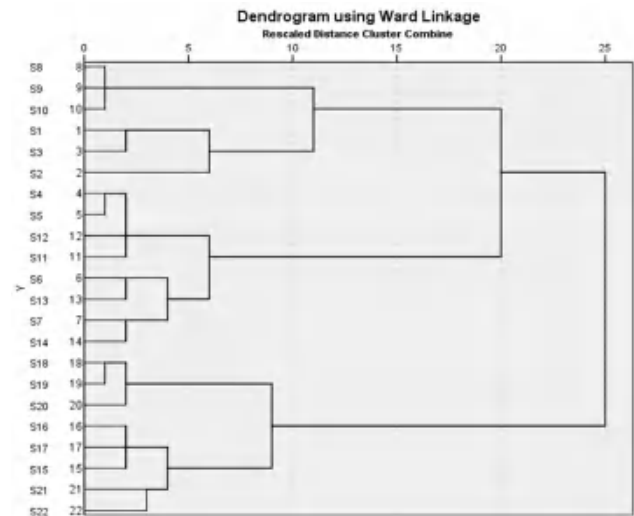


图 4 22 批贯叶金丝桃药材聚类分析树状图

Fig 4 Dendrogram of cluster analysis of 22 batches of hyperici perforati herba

积分值为变量, 采用 SIMCA 14.1 软件对 22 批贯叶金丝桃样品进行主成分分析, 得分图见图 5, 22 批贯叶金丝桃基本可分为 5 类, 贵州贵阳、陕西商洛、湖北恩施、新疆塔城、甘肃陇南分别各自聚类一类, 说明不同来源 (野生、栽培)、不同产地贯叶金丝桃成分上的差异可以通过指纹图谱的差异来体现。

2.5.5 正交偏最小二乘法 - 判别分析 (OPLS-DA) 为了进一步寻找不同批次贯叶金丝桃的差异标志物, 采用 SIMCA 14.1 软件对样品数据进行 OPLS-DA 分析, 以 11 个共有峰峰面积为变量, 得分图见图 6, 每个产地样品可单独聚为一类, 与聚类分析和主成分分析结果均一致; 将该模型随机排列 200 次进行置换检验 (见图 7), 置换参数 $R^2X = 0.908$, $R^2Y = 0.836$, $Q^2 = 0.747 > 0.5$ 结果可靠。VIP 值见图 8, 以 $VIP > 1.0$ 为标准, 得到 5 个差异标志物, 差异排序依次为峰

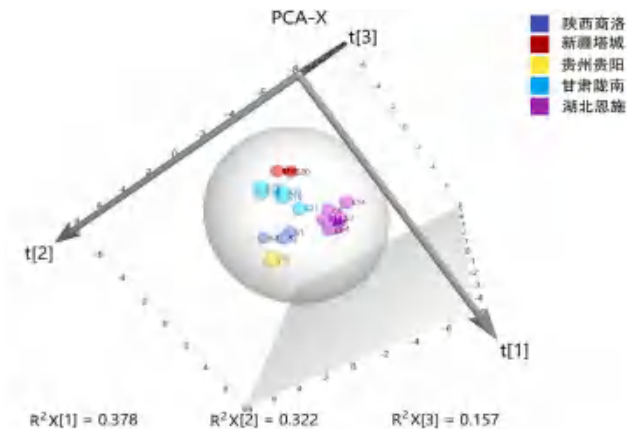


图 5 22 批贯叶金丝桃样品主成分分析得分图

Fig 5 Scatter diagram of PCA of hyperici perforati herba

10 (槲皮苷) > 峰 5 > 峰 6 (芦丁) > 峰 8 (异槲皮苷) > 峰 1 (绿原酸)。这 5 个峰可作为贯叶金丝桃药材质量控制的标志物, 用来区别不同来源 (野生、栽培) 及不同产地的贯叶金丝桃样品。

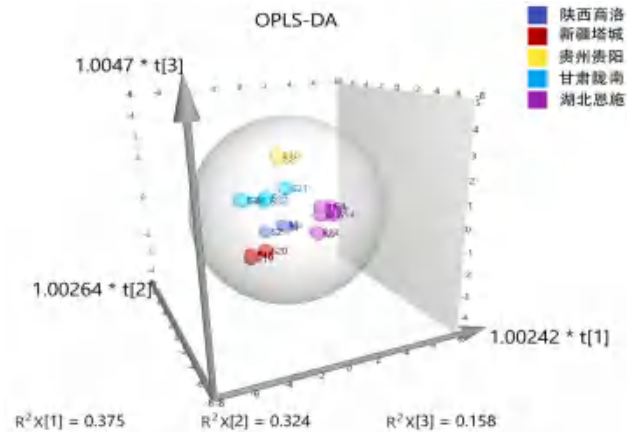


图 6 22 批贯叶金丝桃样品 OPLS-DA 得分

Fig 6 Scatter diagram of OPLS-DA of hyperici perforati herba

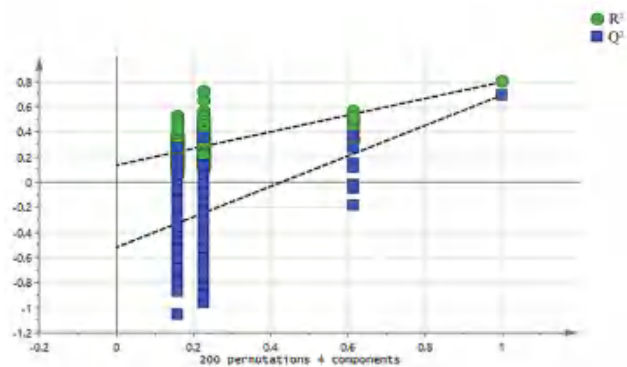


图 7 OPLS-DA 模型置换验证图

Fig 7 OPLS-DA model permutation test diagram

2.6 含量测定

根据指纹图谱测定结果可知, 黄酮类 (芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素) 及酚酸类 (绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、原儿茶酸) 成分为贯叶金丝桃的主要成分, 且芦丁、异



图 8 贯叶金丝桃样品 OPLS-DA VIP 值图

Fig 8 OPLS-DA VIP value plot of hyperici perforati herba

槲皮苷、槲皮素及绿原酸为贯叶金丝桃药材质量评价的标志成分, 因此, 采用 UPLC 法对贯叶金丝桃中相对较为稳定, 专属性较强的黄酮类成分芦丁、金丝桃苷、槲皮苷和槲皮素进行含量测定。

2.6.1 线性关系考察 精密量取“2.2”项下芦丁、金丝桃苷、槲皮苷及槲皮素对照品溶液各 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别置于 5.0 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 配制成不同质量浓度的对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件测定, 以对照品峰面积值为纵坐标 (Y), 以进样质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 求得回归方程, 结果见表 3, 各成分在各自浓度范围内与峰面积的线性关系良好。

表 3 线性关系考察结果

Tab 3 Linearity of content determination

成分	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程	相关系数
芦丁	10.01 ~ 200.10	$Y = 7.131 \times 10^3 X + 8.360 \times 10^3$	0.9993
金丝桃苷	14.98 ~ 299.50	$Y = 9.631 \times 10^3 X + 9.074 \times 10^3$	0.9994
槲皮苷	5.00 ~ 100.00	$Y = 1.041 \times 10^3 X + 5.338 \times 10^3$	0.9993
槲皮素	3.02 ~ 60.33	$Y = 1.349 \times 10^3 X - 9.143 \times 10^3$	0.9995

2.6.2 精密度试验 分别精密吸取芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素对照品溶液, 连续进样 6 次, 结果 4 种对照品峰面积 RSD 值分别为 0.32%、0.75%、0.63%、0.17%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 精密称取同一批贯叶金丝桃样品 (编号: S1), 平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 计算得芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素含量的 RSD 值分别为 1.9%、1.8%、2.0%、1.8%, 表明该方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 精密称取同一批贯叶金丝桃样品 (编号: S1), 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定, 计算得到芦丁、金丝桃苷、槲皮

昔、槲皮素峰面积 RSD 值分别为 0.56%、1.0%、1.2%、0.89%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.5 加样回收试验 取已知含量的贯叶金丝桃粉末约 0.5 g，精密称定，平行 9 份，分别按样品和对照品含量比 (0.5 : 1、1 : 1、1 : 1.5)，加入芦丁、金丝桃昔、槲皮昔、槲皮素对照品，每个比例平行处理 3 份，按“2.1”项下色谱条件进样分析，计算加样回收率及 RSD，结果芦丁在 0.1668、0.3417、0.5115 mg 加入量水平下，平均回收率为分别为 100.9%、101.0%、97.80%，RSD 分别为 0.94%、0.26%、2.0%；金丝桃昔在 0.2275、0.4556、0.6872 mg 加入量水平下，平均回收率分别为 99.75%、99.15%、97.18%，RSD 分别为 1.9%、0.47%、1.4%；槲皮昔在 0.0695、0.1370、0.2085 mg 加入量水平下，平均回收率分别为 97.81%、100.2%、99.61%，RSD 分别为 1.1%、0.22%、1.7%；槲皮素在 0.1905、0.3919、0.5766 mg 加入量水平下，平均回收率分别为 98.40%、98.40%、97.70%，RSD 分别为 1.6%、1.3%、1.2%，表明该方法准确度良好。

2.6.6 样品含量测定 取 22 批贯叶金丝桃样品，按“2.1”项下色谱条件进样分析，结果见表 4，贯叶金丝桃药材中芦丁、金丝桃昔、槲皮昔、槲皮素平均含量分别为 0.26%、0.48%、0.12%、0.18%；不同批次间 4 个成分含量存在差异，RSD 值在 29.0% ~ 80.4%。对不同产地贯叶金丝桃含量进行比较，结果见表 5，陕西省商洛市和新疆维吾尔自治区塔城地区塔城市的样品中 4 个指标性成分总含量较高，不同产地贯叶金丝桃各指标成分含量存在差异，可能与其生长环境、采收时间、产地加工等因素有关。

2.6.7 结果分析 以上述 4 个含量指标为检验变量，野生贯叶金丝桃和栽培贯叶金丝桃为分组变量，采用 SPSS 23.0 软件进行单因素 ANOVA 检验，结果见表 6，可以看出，金丝桃昔及槲皮素含量在野生与栽培贯叶金丝桃中的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)；芦丁和槲皮昔含量及 4 个指标成分总含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。从含量测定结果看，野生贯叶金丝桃各含量指标均值分别为金丝桃昔 0.41%，槲皮素 0.21%，槲皮昔 0.10%，芦丁 0.25%；栽培贯叶金丝桃各含量指标均值分别金丝桃昔 0.60%，槲皮素 0.12%，槲皮昔 0.15%，芦丁 0.28%，野生品与栽培品金丝桃昔、槲皮素及槲皮昔含量差异较大，芦丁几乎没有差异，总含量栽培品略高，但与野生品差异不显著。

表 4 22 批贯叶金丝桃中 4 个成分含量测定结果 (%)

Tab 4 Content of 4 components in 22 batches of hyperici perforati herba (%)

编号	芦丁	金丝桃昔	槲皮昔	槲皮素	总含量
S1	0.53	0.81	0.28	0.24	1.86
S2	0.28	0.51	0.08	0.08	0.95
S3	0.50	0.65	0.12	0.09	1.35
S4	0.16	0.19	0.05	0.17	0.56
S5	0.29	0.39	0.12	0.33	1.12
S6	0.21	0.43	0.16	0.11	0.92
S7	0.06	0.26	0.07	0.33	0.72
S8	0.27	0.42	0.04	0.24	0.98
S9	0.23	0.34	0.03	0.19	0.79
S10	0.29	0.44	0.05	0.25	1.03
S11	0.21	0.23	0.05	0.14	0.63
S12	0.30	0.41	0.03	0.27	1.01
S13	0.19	0.44	0.20	0.14	0.96
S14	0.03	0.20	0.08	0.34	0.66
S15	0.23	0.53	0.06	0.22	1.04
S16	0.33	0.59	0.08	0.18	1.18
S17	0.28	0.64	0.05	0.08	1.05
S18	0.36	0.67	0.30	0.07	1.40
S19	0.38	0.66	0.32	0.07	1.43
S20	0.31	0.58	0.26	0.06	1.21
S21	0.15	0.53	0.10	0.19	0.97
S22	0.19	0.57	0.04	0.06	0.86
平均值	0.26	0.48	0.12	0.18	1.03
RSD	45.3	35.0	80.4	53.1	29.0

表 5 不同产地贯叶金丝桃平均含量比较 (%)

Tab 5 Comparison of the average content of hyperici perforati herba from different origins (%)

产地	芦丁	金丝桃昔	槲皮昔	槲皮素	总含量
陕西商洛	0.44	0.66	0.16	0.14	1.39
湖北恩施	0.18	0.32	0.10	0.23	0.82
贵州贵阳	0.26	0.40	0.04	0.23	0.93
甘肃陇南	0.24	0.57	0.07	0.15	1.02
新疆塔城	0.35	0.64	0.29	0.07	1.35

表 6 单因素 ANOVA 检验分析

Tab 6 One-way ANOVA test analysis

成分	检验方式	P 值
芦丁	单因素 ANOVA 检验	0.645
金丝桃昔	单因素 ANOVA 检验	0.007
槲皮昔	单因素 ANOVA 检验	0.201
槲皮素	单因素 ANOVA 检验	0.021
总含量	单因素 ANOVA 检验	0.196

3 讨论

3.1 指纹图谱分析

由于黄酮类和有机酸类是贯叶金丝桃的活性成分，在 300 nm 波长下，各个特征峰响应值均

较好, 并且基线平稳、分离度佳, 主峰清晰无干扰, 因此选择 300 nm 作为检测波长。考察了 ACQUITY UPLC BEH C18、ZORBAX SB C18、Eclipse Plus C18 等 3 种不同型号的色谱柱, 结果贯叶金丝桃样品在 BEH C18 和 ZORBAX SB C18 色谱柱中峰 6 和峰 7 的分离效果较差, 而 Eclipse Plus C18 分离度和峰形均较好, 因此选择 Eclipse Plus C18 色谱柱。分别考察了不同提取溶剂(甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇、水)、提取方式(超声提取、加热回流、振荡提取)、提取体积(15 mL、25 mL、50 mL)、提取时间(0.5 h、1 h、1.5 h、2 h)对提取效果的影响, 以色谱峰总峰面积/称样量为评价指标, 最后选择 70% 甲醇加热回流提取 1 h。本研究建立了贯叶金丝桃 UPLC 指纹图谱, 共确定 11 个特征峰, 通过对照品指认 9 个成分。通过聚类分析、主成分分析发现, 20 批不同来源(野生、栽培)及不同产地的贯叶金丝桃均能较好地地区分, 可见不同产地贯叶金丝桃药材化学成分存在一定的差异。采用 OPLS-DA 对影响分类的差异性成分进行分析, 得到 5 个差异标志物, 差异排序为峰 10 > 峰 5 > 峰 6 > 峰 8 > 峰 1。

3.2 含量测定

本研究在《中国药典》及文献^[7-11]基础上对黄酮类成分芦丁、槲皮苷、槲皮素的含量进行测定。结果表明, 14 批野生品 4 个指标成分总含量均值为 0.97%, 8 批栽培品 4 个指标成分总含量均值为 1.14% 且较稳定, 野生品与栽培品含量差异相对较小; 不同产地 4 个指标性成分总量略有差异, 其中以陕西、新疆产地的含量较高, 根据 OPLS-DA 分析, 芦丁和槲皮苷均为差异性标志物, 贯叶金丝桃中芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素等黄酮类成分含量较高, 且母核均为槲皮素, 因此 4 个指标成分总量能更好地反映贯叶金丝桃药材中槲皮素及其衍生物的含量, 因此, 建立的多指标成分含量测定法能够更好地评价贯叶金丝桃药材质量, 为其质量标准提升提供参考。

3.3 资源情况

贯叶金丝桃在我国多个省区均有分布, 属多年生草本植物, 花期 7~8 月, 果期 9~10 月^[12]。2018 年以前市场贯叶金丝均为野生品, 因其具有疏肝解郁等作用, 近年来随着抗抑郁功效的开发, 其年用量逐渐增长, 为保护野生资源, 解决用药需求, 2016 年开始对贯叶金丝桃进行栽培试验, 并取得成功, 随后在新疆、甘肃、四川等地开展种植,

目前市场上野生和栽培品共存, 仍以野生为主。本研究对野生及栽培贯叶金丝桃质量进行研究, 结果表明, 栽培品的性状、鉴别、检查项及含量均符合 2020 年版《中国药典》规定, 并在《中国药典》基础上增加指纹图谱和多成分含量为评价指标, 通过指纹图谱确定 11 个共有峰; 4 个指标性成分总含量差异相对较小。目前贯叶金丝桃仍处于推广种植阶段, 今后随着贯叶金丝桃种植技术的逐步完善, 贯叶金丝桃栽培品将可能发展为主流甚至替代野生资源。调研发现野生贯叶金丝桃多每年采一茬, 以夏季 6~7 月为主; 栽培品一年可采收两茬, 以夏季 6~7 月采收较多, 采收后继续生长, 至 8 月中下旬可再次开花, 9~10 月采收第二茬, 具体时间随气候、海拔、温度等不同稍有差异, 一茬采摘量约占 80%, 且质量相对较好。本研究采用 UPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定综合评价了贯叶金丝桃野生品及栽培品的质量, 可为贯叶金丝桃质量标准提升及野生转栽培提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 242.
- [2] 黄璐琦, 屠鹏飞. 新编中国药材学第三卷[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 150.
- [3] 刘发, 斯拉甫·艾白. 维药贯叶金丝桃的研究进展(上)[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 9(9): 53-55.
- [4] 郑清明, 秦路平, 郑汉臣, 等. 贯叶金丝桃抗抑郁作用的神药理学机理[J]. 国外医药·植物药分册, 2001, 16(6): 238-240.
- [5] 尹兴斌, 翟玉静, 曹飒丽, 等. 贯叶金丝桃药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(8): 1634-1637.
- [6] 宋东杰, 李朝晖, 任源浩, 等. 陕川黔贯叶金丝桃居群的分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8): 1951-1953.
- [7] 孟阔, 左力, 沙延淳, 等. 贯叶金丝桃中贯叶金丝桃素提取及含量测定研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(6): 57-58.
- [8] 杨培民, 曹广尚, 张加余. 基于 HPLC-DAD 法测定贯叶金丝桃中 5 个黄酮成分的含量[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2): 263-265.
- [9] 胡君萍, 张焯, 开丽曼·达吾提, 等. 高效液相色谱法测定贯叶金丝桃中绿原酸的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(6): 554-555.
- [10] 田红林, 成杰, 轩辕欢. HPLC 法测定药材贯叶金丝桃中金丝桃苷和槲皮素的含量[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(6): 688-690.
- [11] 陈英红, 董芳, 姜翔之, 等. HPLC 法测定贯叶金丝桃中芦丁和金丝桃苷的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(10): 1429-1430.
- [12] 明兴加, 李登元, 张明. 贯叶连翘生长发育规律的观察研究[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(2): 28-29.

(收稿日期: 2023-06-24; 修回日期: 2023-08-25)

石榴皮菝葜复方搽剂指纹图谱的建立及 3 种成分的含量测定

赛力克阿拉·阿里汗, 赵婷婷, 木合布力·阿布力孜*, 曹仕辰, 麦合苏木·艾克木, 艾克白尔·买买提 (新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 建立石榴皮菝葜复方搽剂 (SLPBQ) 指纹图谱, 结合化学模式识别方法进行分析, 并对主要成分进行含量测定。方法 采用 Waters XBriage C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样体积 10 μL, 检测波长 270 nm, 柱温 30 °C。采用《中药指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》绘制 10 批次 SLPBQ 的 HPLC 指纹图谱, 确认共有峰, 并分析多批次复方搽剂相似度。利用 SPSS22.0 及 SIMCA-P14.1 数据分析软件进行化学模式识别分析。通过单味药材及阴性对照图谱结合对照品比对指认化学成分, 并对部分主要成分进行定量分析。结果 10 批次样品筛选出 22 个共有峰, 且相似度均大于 0.974; 聚类分析将 10 批样品分为两大类; 主成分分析筛选出 5 个主成分, 累计方差贡献率为 98.79%。对 3 种成分进行定量检测, 发现各成分在各自浓度范围内的与峰面积线性关系良好 ($r \geq 0.9999$), 加样回收率为 95.87% ~ 103.76%, RSD 均 ≤ 2%。结论 该方法可用于 SLPBQ 的质量控制, 简便、重复性好、稳定性好、准确度高。

关键词: 中药复方; 主成分分析; 指纹图谱; 含量测定; 石榴皮菝葜复方搽剂

中图分类号: R285, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)12-3281-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.028

Fingerprint construction and 3 components determination of pomegranate peel sarsaparilla compound liniment

Sailikeala Alihan, ZHAO Ting-ting, Mourboul Ablise*, CAO Shi-chen, Maihesumu Aikemu, Akbar Memet (School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract: Objective To establish a fingerprint of pomegranate peel sarsaparilla compound liniment (SLPBQ), combined with chemical pattern recognition method for analyzing and determining the content of main components. **Methods** A Waters XBriage C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisted of acetonitrile (A)-water (B) by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the injection volume was 10 μL, the detection wavelength was 270 nm and the column temperature was 30 °C. The HPLC fingerprints of 10 batches of SLPBQ were plotted using the Fingerprint Similarity Evaluation System for Traditional Chinese Medicine (2012 version). The shared peaks was confirmed and the similarity of multiple batches of the compound liniment was analyzed. Chemical pattern recognition analysis was performed with SPSS22.0 and SIMCA-P14.1 data analysis software. The chemical components were identified by single herb and negative control mapping combined with control comparison, and some of the major components were quantified. **Results** Twenty-two common peaks were screened from 10 batches of samples and all had a similarity greater than 0.974. Ten batches of samples were divided into two main categories by cluster analysis. Five principal component were screened by principal component analysis with a cumulative variance contribution of 98.79%. The 3 components were quantified and had good linearity ($r \geq 0.9999$) in their respective concentration ranges, with the spiked recoveries ranging

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金项目 (No.ZYYD2022C10)。

作者简介: 赛力克阿拉·阿里汗, 男, 硕士, 主要从事天然产物研究与开发, email: 2606002756@qq.com *通信作者: 木合布力·阿布力孜, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物研究与开发, email: 1784383217@qq.com

from 95.87% to 103.76% and *RSDs* all less than 2%. **Conclusion** A simple, reproducible, stable and accurate assay is established for the quality control of SLPBQ traditional preparation.

Key words: traditional Chinese medicine compound; principal component analysis; fingerprint; content determination; pomegranate peel sarsaparilla compound liniment

中药复方因构成药材多样化导致其化学成分繁杂^[1], 药效的物质基础不明确, 这对探索其治疗疾病的作用机制带来一定难度; 在中药复方制剂的制备过程中, 各味中药材中的不同成分会相互作用, 相互影响, 引发助溶、沉淀或化学反应等^[2-3], 导致中药复方制剂中提取制备的有效成分含量改变, 从而影响中药复方制剂的治疗效果。

石榴皮菝葜复方搽剂 (SLPBQ) 是一种治疗白癜风的外用中药搽剂, 由石榴皮、丹参、土茯苓、鸡血藤、菝葜、红花等 6 味中草药组成。本中药配方也是新疆医科大学专利权属的一种中药专利配方 (国家发明专利号: ZL201711230949.0), 本课题组在前期对本配方制剂抗白癜风药效进行了研究, 并结合网络药理学初步确定部分药效成分及作用靶点, 用黑色素细胞实验进行功效验证^[4]。本研究在前期工作基础上, 通过 HPLC 的方法对 SLPBQ 开展指纹图谱建立, 结合化学模式识别分析方法对其进行综合评价及主要成分含量测定等研究, 建立 SLPBQ 制剂的质量控制方法。

1 材料

1.1 仪器

Waters2695 高效液相分析仪 (美国沃特世公司); SartoriusCP225D 十万分之一分析天平 (德国赛利多斯公司); 超声提取仪 (昆山市超声仪器有限公司); 旋转蒸发仪、磁力搅拌水浴锅 (上海艾朗仪器有限公司)。

1.2 试药

乙腈、甲醇 (色谱纯, 弗顿公司), 无水乙醇 (分析纯, 天津致远化学试剂), 丹参酮 II A (批号: wkq22080312)、芒柄花素 (批号: wkq22053108)、落新妇苷 (批号: wkq22012109) 对照品 (四川维克奇生物, 纯度 $\geq 98\%$), 石榴皮, 丹参, 菝葜, 鸡血藤, 红花, 土茯苓药材均从新疆乌鲁木齐百草堂药店分批次购买, 由新疆医科大学维吾尔医学院麦合苏木·艾克木副教授鉴定, 石榴皮为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮, 丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根和根茎, 菝葜为百合科植物菝葜 *Smilax china* L 的根茎, 鸡血藤为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn

的干燥藤茎, 红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L 的干燥花, 土茯苓为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb 的干燥根茎。10 批次 (S1 ~ S10) SLPBQ 均在实验室制备 (25 mL/瓶)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 按专利配方比例称取石榴皮、菝葜、红花、丹参、土茯苓及鸡血藤 6 味干燥药材粉末, 混合, 加入 10 倍量的 75% 乙醇浸泡过夜; 次日超声 (功率 250 W, 频率 80 kHz) 15 min, 连接回流装置, 并加入转子, 加热回流 1 h 提取并抽滤, 滤液浓缩至浸膏, 冷冻干燥为粉末状。精密称取 0.25 g SLPBQ 干燥粉末倒入 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 超声 (功率 250 W, 频率 80 kHz) 20 min, 滤过, 取续滤液即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取适量丹参酮 II A、落新妇苷、芒柄花素对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容, 分别得到 0.45、1.5、1.8 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按“2.1.1”项下方法制备缺少相应药材的干燥药材粉末, 分别制备出阴性样品溶液。

2.1.4 单味药材溶液制备 按“2.1.1”项下方法, 分别制备丹参、鸡血藤、菝葜、石榴皮、土茯苓、红花单味药材溶液。

2.2 色谱条件

采用 Waters XBriage C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 7 min, 3% ~ 12%A; 7 ~ 20 min, 12% ~ 19%A; 20 ~ 60 min, 19% ~ 44%A; 60 ~ 80 min, 44% ~ 75%A; 80 ~ 90 min, 3%A), 检测波长 270 nm, 进样体积 10 μL, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C。

2.3 指纹图谱方法学验证

2.3.1 精密度试验 精密称取 SLPBQ 干燥粉末适量 (S3), 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 重复进样 6 次, 以 10 号峰芒柄花素为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间的 *RSD* 值为 0.040% ~ 0.14%, 相对峰面积的 *RSD* 值为 0.090% ~ 3.6%, 表明仪器

精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密称取 SLPBQ 干燥粉末 1 份 (S3), 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0、4、8、12、18、24 h 进样分析, 以 10 号峰芒柄花素为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间的 *RSD* 值为 0.040% ~ 0.43%, 相对峰面积的 *RSD* 值为 1.1% ~ 3.3%, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取 SLPBQ 干燥粉末 1 份 (S3), 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 以 10 号峰芒柄花素为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间的 *RSD* 值为 0.060% ~ 0.21%, 相对峰面积的 *RSD* 值为 0.87% ~ 3.1%, 表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及对照图谱建立

将 10 批 SLPBQ 供试品溶液分别进样测定, 将图谱以 CDF 格式保存, 导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”中, 以 S3 样品图谱作为参照图谱, 时间宽度设为 0.5 min, 采用中位数法, 多点校正, mark 峰匹配, 绘制 10 批次 SLPBQ 叠加图谱 (见图 1) 及对照图谱 (R, 见图 2), 共确定了 22 个色谱峰为 SLPBQ 指纹图谱的共有峰, 并指认了其中 3 种成分 (见图 3)。

2.5 相似度分析

10 批样品色谱图相似度的相关系数利用中药色谱分析软件与数据管理系统软件对 SLPBQ 共有峰峰面积进行计算得到, 结果见表 1。

2.6 阴性样品图谱

取“2.1.3”项下的阴性样品溶液在“2.2”条件下测定, 色谱图见图 4。

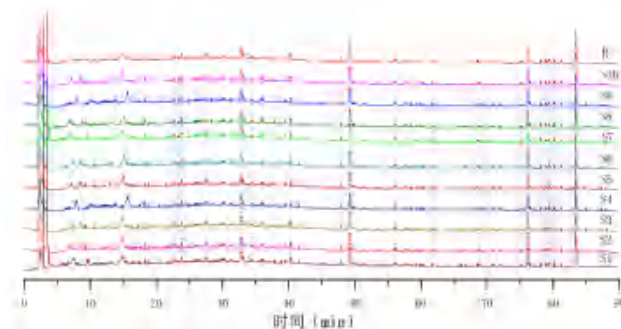


图 1 10 批 SLPBQ 指纹图谱

Fig 1 Fingerprints of 10 batches of SLPBQ

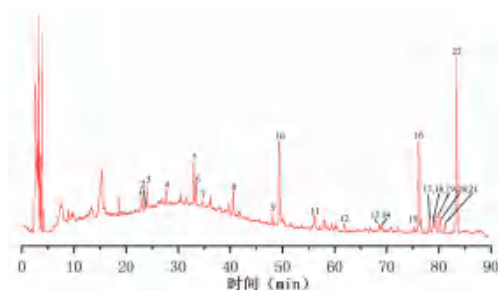


图 2 SLPBQ 对照图谱

Fig 2 Standard chromatogram of SLPBQ

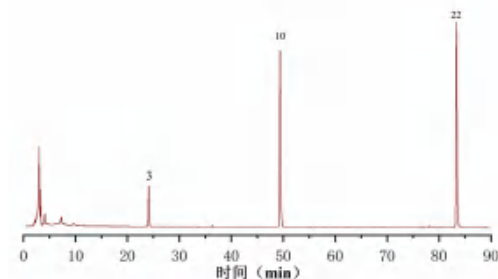


图 3 混合对照品图谱

Fig 3 Chromatogram of mix standard substances

3. 落新妇甘 (astilbin); 10. 芒柄花素 (formononetin); 22. 丹参酮 II A (tanshinone II A)

表 1 10 批样品的相似度

Tab 1 Similarity for 10 batches of samples

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.994	0.993	0.999	0.998	0.998	0.993	0.999	1.000	0.994	0.999
S2	0.994	1.000	1.000	0.996	0.998	0.998	0.977	0.991	0.994	1.000	0.997
S3	0.993	1.000	1.000	0.994	0.998	0.997	0.974	0.989	0.993	1.000	0.996
S4	0.999	0.996	0.994	1.000	0.999	0.999	0.992	0.999	0.999	0.996	1.000
S5	0.998	0.998	0.998	0.999	1.000	1.000	0.987	0.996	0.998	0.998	1.000
S6	0.998	0.998	0.997	0.999	0.998	1.000	0.987	0.997	0.998	0.998	1.000
S7	0.993	0.977	0.974	0.992	0.987	0.987	1.000	0.996	0.993	0.977	0.989
S8	0.999	0.991	0.989	0.999	0.996	0.997	0.996	1.000	0.999	0.991	0.998
S9	0.998	0.993	0.990	0.999	0.998	0.998	0.998	0.999	1.000	0.993	0.999
S10	0.995	1.000	0.997	0.996	0.999	0.993	0.977	0.991	0.999	1.000	0.997
对照	0.999	0.997	0.996	1.000	1.000	1.000	0.989	0.998	0.999	0.997	1.000

2.7 单味药材图谱

取“2.1.4”项下的单味药材溶液在“2.2”项色谱条件下测定单味药材图谱, 结合特征图谱与阴

性样品图谱归属特征峰来源药材, 结果见图 5。

2.8 化学模式识别

2.8.1 聚类分析 (CA) 以共有峰作为参照峰的

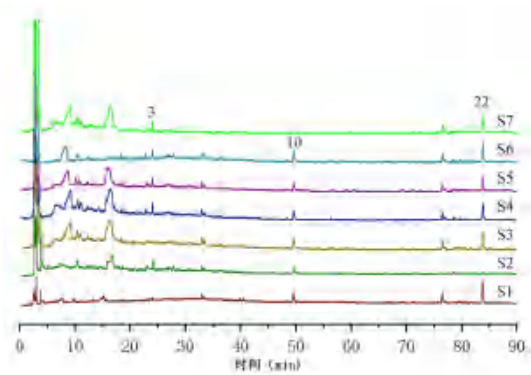


图 4 SLPBQ 阴性样品图谱
 Fig 4 Chromatogram of SLPBQ negative sample
 S1. 对照图谱 (standard chromatogram); S2. 缺丹参药材 (negative sample without *Salvia miltiorrhiza*); S3. 缺土茯苓 (negative sample without *Smilax glabra* Roxb); S4. 缺红花 (negative sample without *Carthamus tinctorius* L); S5. 缺菝葜 (negative sample without *Smilax china* L); S6. 缺石榴皮 (negative sample without Pomegranate peel); S7. 缺鸡血藤 (negative sample without *Spatholobus suberectus* Dunn)

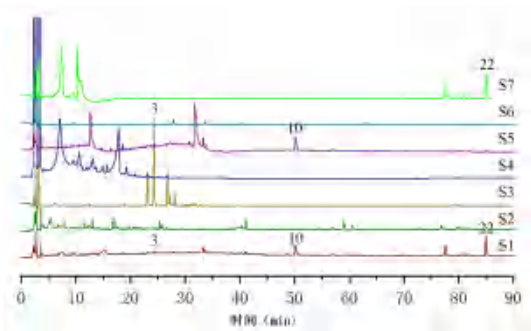


图 5 SLPBQ 中单味药材图谱
 Fig 5 Chromatogram of single herb in SLPBQ
 S1. 对照图谱 (standard chromatogram); S2. 红花药材 (*Carthamus tinctorius* L); S3. 土茯苓药材 (*Smilax glabra* Roxb); S4. 石榴皮药材 (Pomegranate peel); S5. 鸡血藤药材 (*Spatholobus suberectus* Dunn); S6. 菝葜药材 (*Smilax china* L); S7. 丹参药材 (*Salvia miltiorrhiza*)

相似度计算结果对 10 批次 SLPBQ 进行分类, 发现相似度之间的差别很小, 相似的色谱图可能无法区分。为了进一步评估它们之间的相似性和差异性, 进行了 CA 分析。

将 10 批次 SLPBQ 样品中的 10 个特征峰相对峰面积导入 SPSS 软件中, 进行 CA, 形成 25×10 的矩阵。结果如图 6 所示, 在 CA 树状图中^[5], 两个样品间的距离越短, 表明相似性越高, 聚在同一组的样品是最相似的。采用组间聚类法^[6], 以 SPSS 22 软件的欧氏距离为指标, 将 10 批 SLPBQ 样品共有的 22 个峰相对峰面积作为 CA 变量。10 批 SLPBQ 之间的分类距离为 10 时, 样本被分为 2 类, SLPBQ 各批次之间有明显的分类, 其中

S2、S9、S1、S8、S7、S5 为一类、S3、S10、S4、S6 为一类, 表明即使指纹图谱相似度较好的情况下, 由于药材批次及提取时间的不同, 所得制剂的质量也存在差异; S2、S9 被归为一类, S3、S4、S6、S10 被分为一类, S1、S5、S8、S7 被分为一类, 表明即使指纹图谱相似度较好的情况下, 由于药材批次及提取时间的不同, 所得制剂的质量也存在差异。

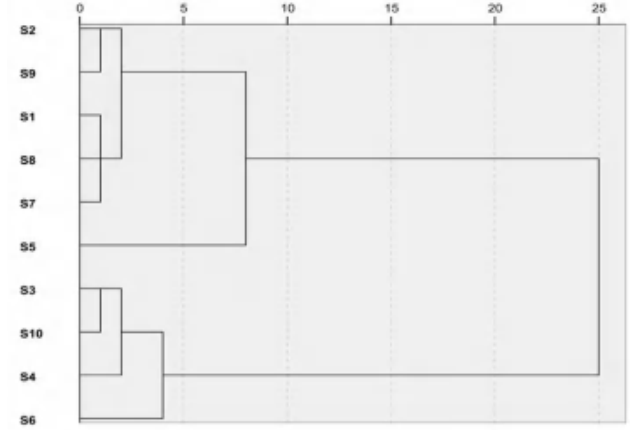


图 6 SLPBQ 的 CA 树状图
 Fig 6 Cluster analysis tree diagram of SLPBQ

2.8.2 主成分分析 (PCA) 为进一步研究 10 批 SLPBQ 样品的差异性, 对其进行 PCA 分析。将 10 批 SLPBQ 样品中的 22 个共有峰峰面积数据导入 SPSS22.0 软件, 进行 PCA 分析。得到了每个成分的碎石图、主成分矩阵表。主成分评估矩阵是用 SIMCA14.1 软件得出的。PCA 结果见图 7, 碎石图表明前 4 个成分变化较剧烈, 其他成分之间比较平缓。

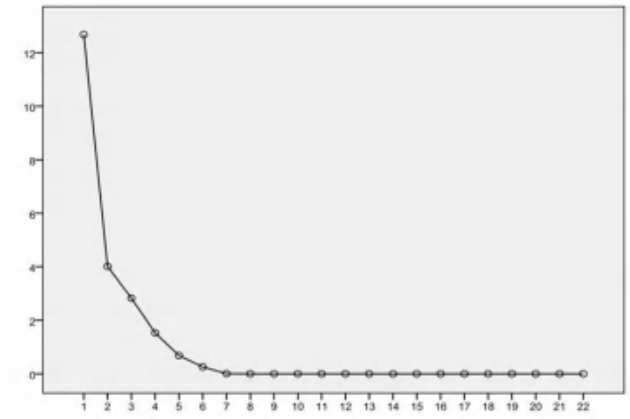


图 7 SLPBQ 主成分分析碎石图
 Fig 7 Principal component analysis gravel plot of SLPBQ

载荷矩阵反映了各主成分与 22 个共有峰之间的相关系数, 结果见表 2, 1 号成分主要显示了色谱峰 12、20、21、9、16 等峰信息, 2 号成

分主要显示了色谱峰 1、2、3 的信息，3 号成分主要显示了色谱峰 7、18、14 的信息，4 号成分主要显示了色谱峰 13、14 的信息，5 号成分主要显示了色谱峰 14、18 的信息。

表 2 SLPBQ 主成分矩阵表

Tab 2 Matrix of principal components of SLPBQ

峰号	1	2	3	4
峰 12	0.988	-0.146	-0.020	-0.041
峰 20	0.984	-0.087	0.137	-0.007
峰 21	0.982	-0.064	-0.083	0.096
峰 9	0.969	0.114	-0.065	-0.208
峰 16	0.967	-0.112	-0.067	-0.193
峰 22	0.959	0.119	-0.217	-0.069
峰 19	0.953	0.255	-0.139	-0.015
峰 10	0.935	-0.079	-0.041	-0.202
峰 17	0.928	0.080	-0.028	-0.173
峰 15	0.927	-0.134	-0.126	0.210
峰 4	0.911	0.137	-0.378	-0.035
峰 13	0.815	0.353	0.405	-0.019
峰 6	0.808	-0.330	-0.177	0.327
峰 14	0.581	-0.106	0.567	0.489
峰 1	0.050	0.882	0.261	0.307
峰 3	0.157	0.831	0.346	-0.278
峰 2	0.347	0.773	0.490	-0.147
峰 8	0.379	0.739	-0.520	0.146
峰 5	0.654	-0.676	-0.166	0.264
峰 7	0.148	-0.453	0.775	-0.276
峰 11	0.433	-0.553	0.554	-0.436
峰 18	0.243	-0.014	0.644	0.647

以 10 批 SLPBQ 指纹图谱中 22 个共有峰的峰面积参数为变量，运用 SPSS 22 软件进行 PCA 分析，以主成分特征值 > 1 为提取标准并生成因子得分系数矩阵。其累积方差贡献率为 98.789%，说明这 5 个主成分可代表所有变量 98% 以上的信息，因此可以通过 5 个成分代替指纹图谱 22 个共有峰评价 SLPBQ 样品，结果见表 3。

表 3 特征值和累积方差贡献率

Tab 3 Eigenvalues and cumulative variance contributions

成分	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	12.678	57.627	57.627
2	4.013	18.240	75.867
3	2.827	12.849	88.716
4	1.529	6.949	95.665
5	0.687	3.124	98.789

以 10 批次 SLPBQ 的指纹图谱的 22 个共有峰峰面积为变量，导入 SIMCA-P 14.1 进行分析，生成得分矩阵图见 8。由得分矩阵图可知，所有数据点均在 95% 置信区内。

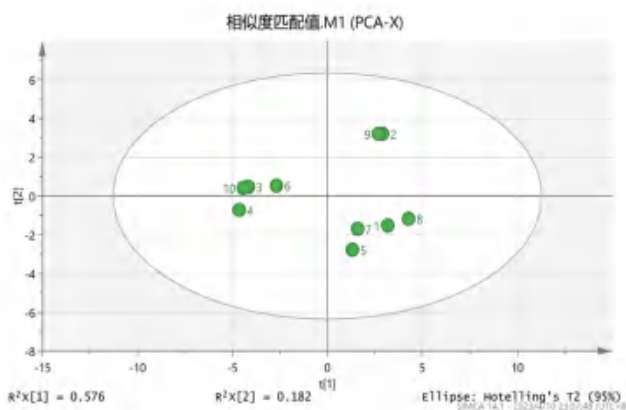


图 8 10 批 SLPBQ 样品主成分分析得分矩阵图

Fig 8 Principal component analysis scores for 10 batches of SLPBQ samples

2.8.3 正交偏最小二乘法 - 判别分析 (OPLS-DA) 将 10 批次 SLPBQ 的指纹图谱共有峰峰面积参数作为变量，导入 SIMCA-P 14.1 软件，进行 OPLS-DA 建模分析，通过自动拟合建立模型。结果见图 9，其中 S2、S9 为一类，S3、S4、S6、S10 为一类，S1、S5、S7、S8 为一类，与 CA 结果相似。根据变量重要性预测^[7] (VIP) 值进行测试差异性关联，得到差异性标志物的 VIP 得分图，见图 10，以 VIP 值 > 1 为阈值，VIP 值越高，对组间差异的影响越大^[8]；筛选出了 15 个峰，按 VIP 值的大小依次排序为 2、3、5、1、9、13、19、16、6、12、8、22、20、17、10 峰，筛选其中 3 (落新妇苷)、10 (芒柄花素)、22 (丹参酮 II A) 号峰进行定量分析，并开展方法学验证。

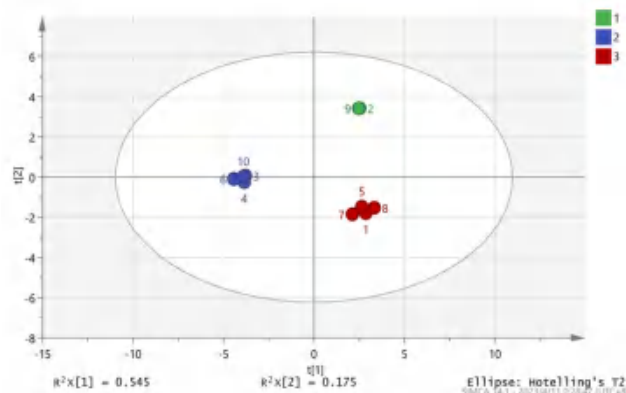


图 9 SLPBQ 的 OPLS-DA 分析得分

Fig 9 OPLS-DA analysis score for SLPBQ

2.9 SLPBQ 主要成分含量测定

2.9.1 标准曲线绘制 分别精密称量落新妇苷、芒柄花素与丹参酮 II A 3 种成分，混合，用甲醇溶解，超声 15 min，过滤，制备母液，将母液依次稀释成 6 个梯度浓度，按照“2.2”项条件进样，绘制标准曲线，线性方程见表 4。结果表

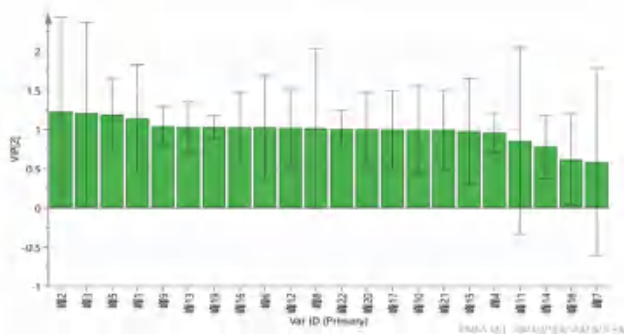


图 10 OPLS-DA 分析 VIP 值图

Fig 10 VIP plot for OPLS-DA

明落新妇苷在 $4.125 \sim 132 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芒柄花素在 $4.413 \sim 141.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丹参酮 II A 在 $6.325 \sim 202.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积具有良好的线性关系。

表 4 线性关系考察结果
Tab 4 Linear relationship

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
落新妇苷	$Y = 8.457 \times 10^3 X - 3.0238 \times 10^3$	0.9999	4.125 ~ 132.0
芒柄花素	$Y = 1.3363 \times 10^4 X + 1.379 \times 10^3$	0.9999	4.413 ~ 141.2
丹参酮 II A	$Y = 5.8019 \times 10^4 X + 1.3172 \times 10^4$	0.9999	6.325 ~ 202.4

2.9.2 重复性试验 分别取同一批 (S4) 样品 6 份 0.25 g, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果显示落新妇苷、芒柄花素、丹参酮 II A 的平均含量分别为 1.97、1.80、0.54 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, *RSD* 为 2.1%、1.7%、1.4%, 表明该方法重复性较好。

2.9.3 稳定性试验 精密称取适量同一批号 (S3) 样品, 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、18、24 h 时进样分析, 计算得落新妇苷、芒柄花素、丹参酮 II A 含量 *RSD* 值为 1.4%、1.4%、0.36%, 结果表明复方在 24 h 内具有较好的稳定性。

2.9.4 精密度试验 取同一批号 (S3) 样品, 按“2.1.1”项下方法制备, 连续进样 6 次, 结果落新妇苷 *RSD* 为 1.4%、芒柄花素 *RSD* 为 1.3%、丹参酮 II A *RSD* 为 1.1%, 表明该方法具有很好的精密度。

2.9.5 加样回收试验 精密称取同一批号 (S3) 已知含量的 SLPBQ 样品约 0.125 g, 取 6 份, 分别按照对照品加入量与供试品中相应成分含量的比为 1 : 1 的量精密加入 3 种成分的对照品 [落新妇苷 $24.27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芒柄花素 $16.81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及丹参酮 II A $5.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$], 进样测定, 结果芒柄花素、落新妇苷、丹参酮 II A 的平均回收率分别为

95.87%、100.55%、103.76%, 且 *RSD* 都在 2% 以内, 表明该方法准确度好。

2.9.6 样品含量测定 按照“2.1.1”项下的方法制备供试品溶液 S3、S4、S7, 进样测定, 计算图谱中落新妇苷、芒柄花素及丹参酮 II A 含量, 结果见表 6, 不同批次的 SLPBQ 各成分含量有差异。

表 6 3 批 SLPBQ 含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 6 Content of 3 batches of sample ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	落新妇苷	芒柄花素	丹参酮 II A
S3	1.97	1.80	0.54
S4	1.83	1.55	0.48
S7	2.13	1.67	0.57

3 讨论

3.1 供试品制备方法的确定

在供试品制备过程中, 以出膏率及指标成分含量作为指标, 考察乙醇浓度、料液比及回流时长等因素对指标的影响, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 最终确定供试品最佳制备工艺为用 75% 乙醇提取, 1 : 10 料液比, 回流时长为 1 h。

3.2 HPLC 检测条件确定

本研究主要对甲醇-水及乙腈-水流动相体系进行筛选, 当使用乙腈-水溶液作为流动相时, 色谱峰分离效果较好, 出峰数较多, 色谱峰分离度较好且基线平滑; 比较 20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 对色谱图测定的影响, 发现在 30 $^{\circ}\text{C}$ 柱温下色谱峰高而窄。比较流速 0.8 与 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 对色谱图测定的影响, 结果流速在 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时色谱峰分离度更高。比较依利特、安捷伦及沃特世 3 种 C18 柱色谱柱, 发现沃特世色谱柱分离效果最好, 出峰最多。对 SLPBQ 溶液进行 200 ~ 400 nm 全波长扫描, 发现在 270 nm 波长下出峰最多, 峰形最好。

3.3 小结

SLPBQ 是一种治疗白癜风的医院制剂, 其药效物质基础及作用机制尚不清楚。现如今白癜风^[9]发病机制尚不清晰, 有研究表明氧化应激^[10]及自身免疫等^[11-12]是引发白癜风的主要因素; 在 SLPBQ 的 HPLC 指纹图谱中指出其中 3 个共有成分, 分别为落新妇苷、芒柄花素和丹参酮 II A; 其中落新妇苷可下调 CD4^+ T 细胞活性, 起到抗炎及保护黑色素细胞的作用^[13]; 芒柄花素具有促进酪氨酸酶活性^[14]且能够抑制活性氧 (ROS) 对黑色素细胞的损伤, 起到保护细胞的作用, 因此对于白癜风疾病治疗有一定的积极效果; 丹参酮 II A 能够抑制 CD8^+ T 细胞侵袭黑色素细胞^[16-17], 且对氧化应激具有抑制作用^[18], 因

此对于白癜风疾病有一定的预防效果。结合前期研究结果,推测这 3 种成分可能与 SLPBQ 抗白癜风的药理活性有关,可为后期的药效物质基础研究及先导化合物筛选提供依据。

本研究通过 HPLC 建立了 SLPBQ 制剂的指纹图谱,确定其 22 个共有峰,10 批制剂相似度在 0.974 以上,表明提取方法误差小,提取药液稳定性较好。本试验中建立了 SLPBQ 制剂的指纹图谱,结合 CA、PCA 及 OPLS-DA 等化学模式识别法进行分析,较全面客观地评价 SLPBQ 质量;对复方中落新妇苷、芒柄花素及丹参酮 II A 进行含量测定,所建立的方法重复性好、准确度高,可作为 SLPBQ 制剂的质量评估方法。

参考文献

- [1] 李小锦,黄莹莹,杨珍,等.基于效应基准的中药质量生物标志物研究策略[J].药学报,2019,54(2):204-210.
- [2] 赖长江生,陈泽炎,邱子栋,等.中药煎煮的化学反应机制研究现状[J].中国中药杂志,2023,48(4):890-899.
- [3] 杨岩涛,吴春英,吴德智,等.指纹图谱段带总量统计矩法对黄连解毒汤提取过程中成分变化的研究[J].中草药,2014,45(15):2157-2164.
- [4] 赛力克阿拉·阿里汗,曹仕辰,木合布力·阿布力孜,等.基于网络药理学及体外细胞实验探讨复方菟蓐丹参擦剂抗白癜风作用机制[J].新疆医科大学学报,2023,46(4):513-521.
- [5] Liu ZH, Wang DM, Li DW, et al. Quality evaluation of *juniperus rigida* Sieb. et Zucc. based on phenolic profiles, bioactivity, and HPLC fingerprint combined with chemometrics[J]. Front Pharmacol, 2017, 19(8): 198.
- [6] Wu D, Yu DM, Zhang YJ, et al. Metabolite Profiles, Bioactivity, and HPLC fingerprint of different varieties of *eucommia ulmoides* oliv: towards the utilization of medicinal and commercial chinese endemic tree[J]. Molecules, 2018, 23(8): 1898.
- [7] 方朝缙,甘力帆,黄醒鹏,等.金银花-连翘药对配方颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分含量测定研究[J].中南药学,2023,21(6):1612-1620.
- [8] 钟民勇,乔日发,罗涛,等.基于指纹图谱定性、多指标成分定量与化学计量学的枳壳质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(4):138-145.
- [9] 李庆.白癜风临床分析及治疗进展[J].医学理论与实践,2019,32(5):660-661,643.
- [10] 李慧,郑水英,李其林.抗氧化剂在白癜风治疗中的应用进展[J].皮肤性病诊疗学杂志,2020,27(5):362-365.
- [11] 魏伟,何奕德,李萌,等.调节性 T 细胞在白癜风发病机制中的作用及治疗应用[J].中国美容医学,2018,27(1):133-136.
- [12] 王禹毅,王小琴,刁庆春,等.白癜风与自身免疫性共病的研究进展[J].重庆医学,2022,51(11):1973-1976.
- [13] Ding SZ, Lu GT, Wang BY, et al. Astilbin activates the reactive oxidative species/PPARgamma Pathway to suppress effector CD4⁺ T cell activities via direct binding with cytochrome P450 1B1[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 848957.
- [14] 付东然.芒柄花素对 A375 细胞的影响[D].哈尔滨:哈尔滨医科大学,2007.
- [15] Sugimoto M, Ko R, Goshima H, et al. Formononetin attenuates H₂O₂-induced cell death through decreasing ROS level by PI3K/Akt-Nrf2-activated antioxidant gene expression and suppressing MAPK-regulated apoptosis in neuronal SH-SY5Y cells[J]. Neurotoxicol, 2021, 34(5): e15086.
- [16] Zhang DC, Wang YJ, Li GZ, et al. Tanshinone II A alleviates vitiligo by suppressing AKT mediated CD8⁺ T cells activation in a mouse model[J]. Dermatol Ther, 2021, 34(5): e15086.
- [17] Roth A, Zhao P, Soukup ST, et al. Chemical stability and bioactivity of tanshinone I, tanshinone II A, cryptotanshinone and dihydrotanshinone in in vitro test systems[J]. Toxicol Lett, 2023, 375: 21-28.
- [18] Hui Z, Xiao HA, Yu L, et al. Sodium tanshinone II A silicate increases melanin synthesis by activating the MAPK and PKA pathways and protects melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress[J]. RSC Adv, 2019, 9(33): 18747-18757.

(收稿日期:2023-06-20;修回日期:2023-08-03)

高效液相色谱法测定孟鲁司特钠中有关物质的含量

张磊 (临沂市检验检测中心, 山东 临沂 276001)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定孟鲁司特钠原料药中 7 种有关物质的含量。方法 采用 ZORBAX SB-Phenyl 苯基色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 0.1% 三氟乙酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 线性梯度洗脱, 检测波长 255 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 进样量 10 μL。结果 7 种有关物质线性范围分别为杂质 A 1.312 ~ 13.116 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$)、杂质 B 0.499 ~ 4.985 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$)、杂质 C 0.952 ~ 9.521 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$)、杂质 D 1.066 ~ 10.659 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$)、杂质 E 0.320 ~ 3.199 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9995$)、杂质 F 0.592 ~ 5.922 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9993$)、杂质 G 0.781 ~ 7.807 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), 平均回收率分别为 95.4%、95.0%、95.3%、97.2%、93.7%、92.4% 和 95.8%, RSD 分别为 3.8%、2.5%、3.0%、2.4%、1.6%、1.3% 和 2.0%。7 种有关物质的含量为 1.376 ~ 6.558 mg·g⁻¹。结论 该方法准确可靠, 灵敏度高, 可用于孟鲁司特钠原料药有关物质的质量控制。

关键词: 孟鲁司特钠; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3288-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.029

Determination of 7 related substances in montelukast sodium by HPLC

ZHANG Lei (*Linyi Inspection and Testing Center, Linyi Shandong 276001*)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the assay of 7 related substances in montelukast sodium. **Methods** A ZORBAX SB-Phenyl (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used, with the mobile phase of 0.1% trifluoroacetic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) by linear gradient elution, and the detection wavelength of 255 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 30℃. The injection volume was 10 μL. **Results** The calibration curves of 7 related substances showed good linearity in the range of impurity A 1.312 ~ 13.116 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), impurity B 0.499 ~ 4.985 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), impurity C 0.952 ~ 9.521 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), impurity D 1.066 ~ 10.659 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$), impurity E 0.320 ~ 3.199 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9995$), impurity F 0.592 ~ 5.922 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9993$), and impurity G 0.781 ~ 7.807 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$). The average recoveries for the 7 related substances were 95.4%, 95.0%, 95.3%, 97.2%, 93.7%, 92.4% and 95.8%, with RSD of 3.8%, 2.5%, 3.0%, 2.4%, 1.6%, 1.3% and 2.0%. The content of 7 related substances were at 1.376 ~ 6.558 mg·g⁻¹. **Conclusion** The method is accurate and reliable, which can be used for the quality control of montelukast sodium.

Key words: montelukast sodium; related substance; HPLC

孟鲁司特钠 (montelukast sodium) 是一种特异性白三烯受体拮抗剂, 其与白三烯受体具有良好的亲和力, 在体内与白三烯竞争受体, 可抑制炎症反应, 从而发挥抗炎与抗哮喘作用^[1]。临床用于成人和儿童哮喘与肺炎的预防和治疗^[2-4]。孟鲁司特钠质量标准收载于《欧洲药典》11.0 版 (EP11.0)^[5]、《美国药典》2023 版 (USP-

NF2023)^[6] 和《日本药典》18 版 (JP18)^[7]。《中国药典》2020 年版并未收载该品种的质量标准。

孟鲁司特钠中存在多种有关物质, 严重影响了其质量和安全性。黄涛^[8] 采用外标法对《欧洲药典》中规定的孟鲁司特钠相关杂质进行检测; 宋杏芳等^[9] 采用 HPLC 法对孟鲁司特钠咀嚼片中 4 种已知杂质进行分析; 刘阿利等^[10] 建立 HPLC

作者简介: 张磊, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事药品质量标准提升研究, email: lei0528@126.com

法分析孟鲁司特钠原料药中 5 种有关物质；以上方法检测的有关物质均为 EP11.0、USP-NF2023 和 JP18 中收录的已知杂质 A、B、C、D、F，并未对杂质 E 和杂质 G 建立定量方法进行分析。本

文建立 HPLC 法对孟鲁司特钠中 7 种有关物质（结构式见图 1）进行分析，以期为全面控制孟鲁司特钠的质量提供技术方法。



图 1 孟鲁司特钠及各杂质的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of montelukast sodium and its impurities

1. 孟鲁司特钠 (montelukast sodium); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C); 5. 杂质 D (impurity D); 6. 杂质 E (impurity E); 7. 杂质 F (impurity F); 8. 杂质 G (impurity G)

1 材料

LC-20AT 高效液相色谱仪（包括自动进样器、四元泵、柱温箱、二极管阵列检测器以及 LC solution 色谱工作站，日本岛津公司）。METTLER XP 205 电子分析天平（瑞士梅特勒公司，精度为 0.01 mg），Milli-Q A10 型超纯水仪（美国密理博公司）。

孟鲁司特钠对照品（含量：98.6%，批号：100893-201902，中国食品药品检定研究院）、杂质 A 对照品（含量：99.2%，批号：20210701）、杂质 B 对照品（含量：97.1%，批号：20210303）、杂质 C 对照品（含量：98.5%，批号：20210707）、杂质 D 对照品（含量：94.8%，批号：20220763）、杂质 E 对照品（含量：96.6%，批号：20220815）、杂质 F 对照品（含量：98.4%，批号：20210523）、杂质 G 对照品（含量：93.7%，批号：20200720）（天津麦迪嘉试剂公司）；孟鲁司特钠原料药（批号：20221101、20221201、20221202，QL 公司），乙腈（色谱纯，默克公司），三氟乙酸（色谱纯，阿拉丁试剂），水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：ZORBAX SB-Phenyl 苯基色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A：0.1% 三氟乙酸水溶液，流动相 B：乙腈，线性梯度洗脱，程序见表 1；流速：1.0 mL·min⁻¹；检测波长：255 nm；柱温：30℃；进样量：10 μL。

表 1 线性梯度洗脱程序

Tab 1 Linear gradient elution procedure		
时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	50	50
10	45	55
15	30	70
25	30	70
40	5	95

2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液 取孟鲁司特钠原料药 100 mg，精密称定，置 100 mL 棕色量瓶中，用溶剂（初始梯度流动相）溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，制得质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.2.2 对照品储备溶液 取孟鲁司特钠对照品 72.60 mg、杂质 A 对照品 66.11 mg、杂质 B 对照品 25.67 mg、杂质 C 对照品 48.33 mg、杂质 D 对

照品 56.22 mg、杂质 E 对照品 16.56 mg、杂质 F 对照品 30.09 mg 和杂质 G 对照品 41.66 mg, 精密称定, 分别置 50 mL 棕色量瓶中, 用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得质量浓度分别为 1.432、1.312、0.499、0.952、1.066、0.320、0.592、0.781 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备溶液。

2.2.3 混合对照品溶液 精密量取各对照品储备溶液 1 mL, 置同一 100 mL 棕色量瓶中, 用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得混合对照品溶液。

2.2.4 系统适用性试验溶液 精密量取混合对照品溶液 1 mL, 置 50 mL 棕色量瓶中, 用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得系统适用性试验溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下系统适用性试验溶液、供试品溶液与空白溶剂, 进样测定, 记录色谱图 (见图 2)。结果显示, 在该色谱条件下, 各色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 各色谱峰理论板数均大于 5000, 各色谱峰拖尾因子均小于 1.5。

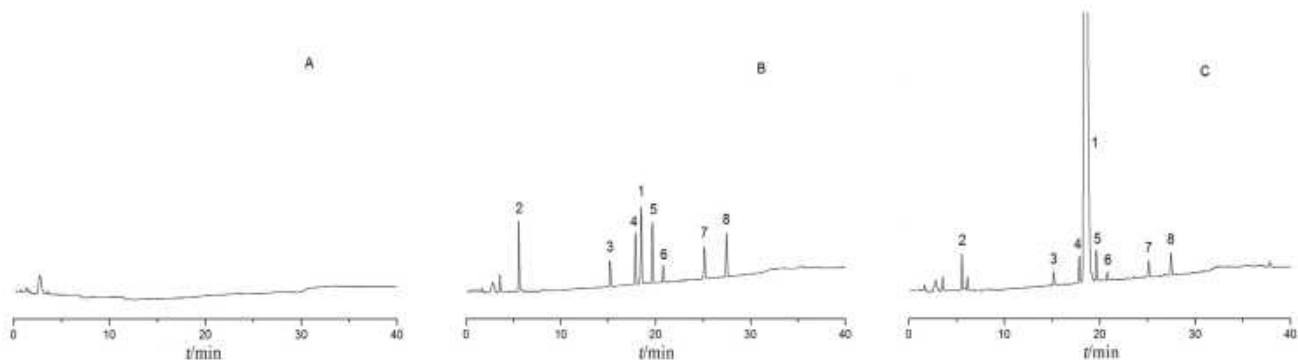


图 2 孟鲁司特钠高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of montelukast sodium

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 系统适用性试验溶液 (system suitability test solution); C. 供试品溶液 (sample solution); 1. 孟鲁司特钠 (montelukast sodium); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C); 5. 杂质 D (impurity D); 6. 杂质 E (impurity E); 7. 杂质 F (impurity F); 8. 杂质 G (impurity G)

2.4 专属性试验

称取孟鲁司特钠原料药 5 份, 各约 50 mg, 分别置 50 mL 棕色量瓶中, 进行以下破坏性试验。

① 酸破坏试验: 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL, 使溶解, 暗处放置 30 min, 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀; ② 碱破坏试验: 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 1 mL, 暗处放置 30 min, 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀; ③ 氧化破坏试验: 精密加入 3% 过氧化氢溶液 1 mL, 暗处放置 1 h, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀; ④ 高温破坏试验: 将样品用溶剂溶解, 于 80°C 水浴加热 2 h, 摇匀; ⑤ 光照破坏试验: 将样品用溶剂溶解后倒入石英吸收皿中, 放在紫外光灯 (245 nm) 下照射 10 min。按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (见图 3)。结果显示, 孟鲁司特钠在高温和碱破坏条件下相对较为稳定; 在酸破坏条件下, 杂质 F 增加较为显著; 在氧化破坏条件下, 杂质 A 和杂质 G 增加的量较大, 杂质 D 和杂质 E 增加的量较少; 在光照破坏条件下, 杂质 C 的量增加非常大。通过破坏试验, 推测杂质 F 为酸降解产物, 杂质 A、杂质 G、杂质 D 和杂质 E 为氧化

降解产物, 杂质 C 为光降解产物。破坏试验结果表明, 孟鲁司特钠在光照条件下稳定性较差, 提示在各种溶液配制和检测过程中应注意避光操作。

2.5 线性关系考察

精密量取对照品储备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL, 分别置 100 mL 棕色量瓶中, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 制得标准系列溶液, 进样检测, 记录色谱图。以孟鲁司特钠和各杂质溶液质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X), 以峰面积 Y 为纵坐标, 采用偏最小二乘法进行线性回归, 制得标准曲线方程。孟鲁司特钠与各杂质的标准曲线方程、相关系数 (r) 和线性范围结果见表 2。

2.6 检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ)

取混合对照品溶液用溶剂逐步稀释, 以各成分色谱峰信噪比 S/N 约等于 10 时测得孟鲁司特钠与各杂质 LOQ, 以各成分色谱峰信噪比 S/N 约等于 3 时测得孟鲁司特钠与各杂质 LOD, 结果见表 2。

2.7 精密度试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录孟鲁司特钠与各杂质色谱峰的峰面积, 结果孟鲁司特钠与杂质 A ~ G 峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.74%、0.59%、0.92%、

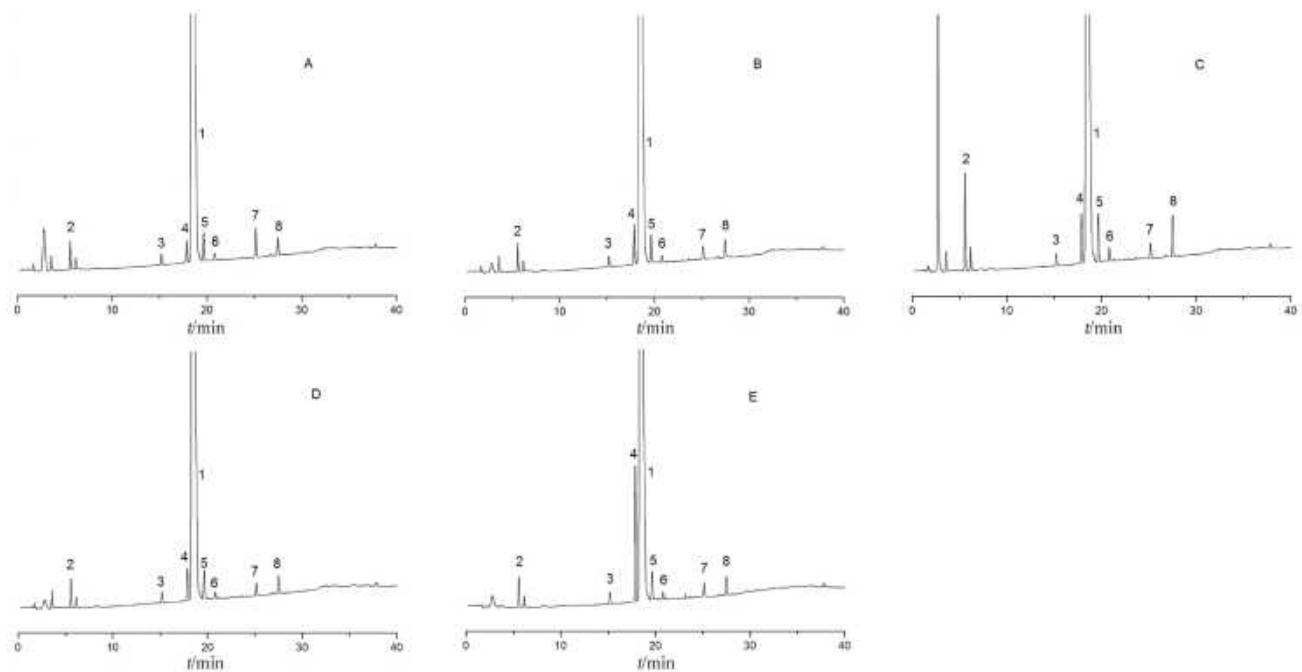


图 3 孟鲁司特钠破坏试验色谱图

Fig 3 Chromatograms of destruction test of montelukast sodium

A. 酸破坏试验 (acid degradation); B. 碱破坏试验 (alkali degradation); C. 氧化破坏试验 (oxidative degradation); D. 高温破坏试验 (heat degradation); E. 光照破坏试验 (light degradation); 1. 孟鲁司特钠 (montelukast sodium); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C); 5. 杂质 D (impurity D); 6. 杂质 E (impurity E); 7. 杂质 F (impurity F); 8. 杂质 G (impurity G)

表 2 孟鲁司特钠与各杂质线性关系、LOD、LOQ 结果

Tab 2 Linearity, LOD and LOQ of montelukast sodium and related substance

化合物	标准曲线方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	LOD / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
孟鲁司特钠	$Y = 954.23X + 10.15$	1.432 ~ 14.317	0.9996	30	90
杂质 A	$Y = 923.17X + 55.84$	1.312 ~ 13.116	0.9997	33	100
杂质 B	$Y = 997.31X + 74.60$	0.499 ~ 4.985	0.9997	40	120
杂质 C	$Y = 785.36X + 46.08$	0.952 ~ 9.521	0.9997	30	90
杂质 D	$Y = 658.27X + 65.75$	1.066 ~ 10.659	0.9999	33	100
杂质 E	$Y = 891.47X + 57.25$	0.320 ~ 3.199	0.9995	30	90
杂质 F	$Y = 1885.2X + 55.64$	0.592 ~ 5.922	0.9993	33	100
杂质 G	$Y = 795.85X + 78.45$	0.781 ~ 7.807	0.9997	40	120

0.76%、0.98%、0.70%、0.38%、0.87%，结果表明仪器的精密度良好。

2.8 重复性试验

取孟鲁司特钠原料药 (批号: 20221101), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 分别进样检测, 记录 7 种杂质峰面积并计算平均含量。结果杂质 A ~ G 含量的 RSD ($n = 6$) 分别为 1.2%、1.5%、1.3%、1.8%、1.5%、1.8% 和 1.8%, 表明方法的重复性良好。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号: 20221101), 于暗处放置 0、2、4、8、12、16 和 24 h 进样检测, 记录 7 种杂质色谱峰面积。结果杂质 A ~ G 峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.3%、0.95%、0.93%、0.82%、1.3%

和 1.1%, 表明样品溶液在暗处放置 24 h 内稳定。

2.10 加样回收试验

精密称取同一批孟鲁司特钠原料药 (批号: 20221101) 约 50 mg, 共 6 份, 置 100 mL 棕色量瓶中, 精密加入各对照品储备溶液 0.25 mL, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各杂质的回收率。结果杂质 A ~ G 的平均回收率分别为 95.4%、95.0%、95.3%、97.2%、93.7%、92.4% 和 95.8%, RSD 分别为 3.8%、2.5%、3.0%、2.4%、1.6%、1.3% 和 2.0%。

2.11 样品中杂质的含量测定

取孟鲁司特钠原料药, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别进样测定, 7 种杂质 A ~ G 的含量测定结果见表 3。

表 3 杂质含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)
Tab 3 Content of impurities ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

批号	杂质 A	杂质 B	杂质 C	杂质 D	杂质 E	杂质 F	杂质 G
20221101	6.558	2.493	4.761	5.330	1.600	2.961	3.904
20221201	6.409	2.344	4.803	5.116	1.398	2.403	3.626
20221202	6.417	2.312	4.808	5.120	1.376	2.225	3.471

3 讨论

在已经报道的孟鲁司特钠有关物质检测方法中,使用的流动相水相有 0.15% 三氟乙酸溶液、0.15% 高氯酸钠溶液、0.1% 磷酸溶液等,有机相有乙腈和甲醇。经过对 3 种水相流动相进行比较,采用三氟乙酸溶液时,各色谱峰的峰形对称性良好,拖尾因子均小于 1.5,基线平直且基线噪音较低。采用另外两种水相流动相时,色谱峰对称性较差,拖尾因子均大于 2。同时,本文考察了三氟乙酸溶液的浓度 (0.1% 和 0.15%),发现选用上述浓度的三氟乙酸溶液作流动相时的色谱图没有差异,为保护色谱柱,本文采用 0.1% 三氟乙酸溶液。本文考察了甲醇与乙腈两种有机流动相对分离的影响,结果采用甲醇作为流动相时,色谱图中会出现其他的杂质峰,这与张琳琳等^[11]报道的结果一致,其推测流动相甲醇与孟鲁司特钠发生了反应产生了其他的杂质。因此,本文采用 0.1% 三氟乙酸溶液-乙腈作为流动相,并对梯度洗脱条件进行优化,结果所有待测成分分离度均良好。

本文采用二极管阵列检测器,对 7 种待测杂质成分进行全波长扫描,发现所有待测成分在 255 nm 波长处均具有较大吸收,因此选择 255 nm 作为检测波长。同时,对样品的色谱图进行光谱学纯度检查,所有待测成分均为单一的色谱峰,待测成分不受其他成分干扰。

孟鲁司特钠原料药中存在一些工艺杂质和降解杂质,其本身稳定性较差,在光照、高温和酸性条件下容易降解,严重影响其纯度。国外药典与文献报道对其中的杂质 A、B、C、D、F 进行检测,王英新等^[12]采用液质联用方法对孟鲁司特钠颗粒中的有关物质进行分离并分析其降解途径和各杂质的来源,首次报道了杂质 G (孟鲁司特钠喹啉环氮氧化物),并推测杂质 G 是孟鲁司

特钠喹啉环结构上的氮原子在弱氧化条件下加热接受氧原子而生成喹啉环氮氧化物。杂质 E 为药品生产企业的内控杂质,并未见文献报道杂质 E 的检测方法。根据本文降解破坏试验考察,杂质 E 和杂质 G 是属于其氧化降解产物,应该控制其含量。本文在 EP11.0 方法的基础上,对液相色谱条件进行优化,建立同时检测其中的 7 种有关物质的方法,该方法准确、可靠、灵敏度高,为孟鲁司特钠的质量控制提供方法参考。

参考文献

- [1] 刘锋,钟丽球.孟鲁司特钠药理作用及临床应用研究[J].临床合理用药,2017,10(4):83-84.
- [2] 王朋朋,张季红.孟鲁司特钠辅助治疗小儿支气管哮喘的疗效及对免疫功能和炎症因子水平的影响[J].临床合理用药,2023,16(4):90-93.
- [3] 陈永琳.孟鲁司特钠联合布地奈德治疗老年支气管哮喘的临床效果[J].临床合理用药,2022,15(4):58-60.
- [4] 徐培丽.孟鲁司特钠咀嚼片联合阿奇霉素治疗小儿重症肺炎的效果分析[J].北方药学,2021,18(8):168-169.
- [5] EP11.0[S].2023:3441-3443.
- [6] USP-NF2023[S].2023:1-2.
- [7] JP18[S].2021:1374-1377.
- [8] 黄涛.HPLC 外标法测定孟鲁司特钠的有关物质[J].天津药学,2014,26(5):10-13.
- [9] 宋杏芳,赵翠,胡紫艳.孟鲁司特钠咀嚼片中有关物质测定方法研究[J].中国新药杂志,2016,25(6):681-711.
- [10] 刘阿利,于治国,张贵民.HPLC 法测定孟鲁司特钠的有关物质的含量[J].沈阳药科大学学报,2015,32(9):685-689.
- [11] 张琳琳,刘阿利,张继环,等.孟鲁司特钠片酸降解未知杂质结构及来源分析[J].中南药学,2022,20(7):1564-1568.
- [12] 王英新,刘玲,李树英,等.HPLC/MS/MS 法分析孟鲁司特钠颗粒中的有关物质[J].中国药科大学学报,2019,50(3):330-336.

(收稿日期:2023-05-06;修回日期:2023-06-05)

UPLC-MS/MS 同时测定止咳平喘类保健食品和中成药中的 25 种非法添加化学成分

张珊珊, 贾昌平, 郑佳新* (苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215000)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 同时测定止咳平喘保健食品和中成药中 25 种非法添加的化学成分。方法 样品采用甲醇超声提取, 经色谱柱分离, 以甲醇 (含 0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸溶液梯度洗脱, 采用电喷雾离子源正负离子模式, 多反应监测 (MRM) 模式检测。结果 25 种止咳平喘药物在各自线性范围内与测定值线性关系良好, 相关系数均 ≥ 0.9990 ; 检测限为 $1.5 \sim 37.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 平均回收率 $72.0\% \sim 109.8\%$, RSD 为 $0.10\% \sim 8.7\%$ 。应用该方法对 10 批样品进行筛查, 共有 2 批中成药胶囊剂中检出标识外成分, 其中 1 批检出茶碱, 另 1 批检出那可丁和盐酸麻黄碱。结论 该方法操作简便, 具有良好的选择性、灵敏度及准确度, 能够用于止咳平喘类保健食品和中成药中非法添加药物的测定。

关键词: 止咳平喘; 保健食品; 中成药; 非法添加; 超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R284.1, R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)12-3293-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.030

Simultaneous determination of 25 illegally added chemical components in anti-cough and anti-asthmatic health food and traditional Chinese medicine by UPLC-MS/MS

ZHANG Shan-shan, JIA Chang-ping, ZHENG Jia-xin* (*Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou Jiangsu 215000*)

Abstract: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method to simultaneously determine 25 illegally added chemical components in anti-cough and anti-asthmatic health food and traditional Chinese medicine. **Methods** The samples were extracted by methanol ultrasonic extraction, the separation was executed on a column with mobile phase consisting of methanol (containing 0.1% formic acid)-0.1% formic acid solution, and detected by electrospray ionization source in positive and negative ion mode with multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The 25 anti-cough and anti-asthmatic drugs had good linearity with the correlation coefficients no less than 0.9990. The limits of detection ranged $1.5 \sim 37.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, the average recoveries ranged $72.0\% \sim 109.8\%$, and the RSD ranged $0.10\% \sim 8.7\%$. The method was applied to screen 10 batches of samples, two batches of unlabeled components were detected in two traditional Chinese medicine capsules, among which theophylline was detected in 1 batch and noscapine and ephedrine hydrochloride were detected in 1 batch. **Conclusion** The method is easy to operate, has good selectivity, sensitivity and accuracy, and can be used for the determination of illegally added drugs of anti-cough and anti-asthmatic components in health food and traditional Chinese medicine.

Key words: anti-cough and anti-asthmatic; health food; traditional Chinese medicine; illegally addition; UPLC-MS/MS

作者简介: 张珊珊, 女, 主管中药师, 主要从事保健食品与化妆品检验检测研究, email: zss1303@163.com *通信作者: 郑佳新, 女, 主管药师, 主要从事保健食品与化妆品检验检测研究, email: jiaxin.zheng@163.com

由于现代环境、个人生活习惯等因素的影响,越来越多的人深受呼吸系统疾病的困扰,其中咳嗽、哮喘是最常见的两种,针对中国成人肺部健康的相关研究结果显示:我国 20 岁以上成人哮喘患病率为 4.2%,全国总患病人数为 4570 万,近年来随着人口老龄化和环境污染,哮喘患病率在我国有逐年增长的趋势^[1]。目前关于止咳平喘类保健食品及中成药中非法添加化学成分的相关研究较少,已报道 40 余种,多为常见临床治疗药物,如抗组胺药物苯海拉明、氯苯那敏,镇咳类药物喷托维林、氯哌丁,祛痰类药物氨溴索、溴己新,平喘类药物沙丁胺醇、茶碱,糖皮质激素醋酸泼尼松,抗菌类药物磺胺甲噁唑等,而针对这些非法添加成分的检测手段主要以液相色谱和液相色谱质谱联用方法为主^[2-8]。为加强对止咳平喘类中成药及保健食品的监管,杜绝不法分子为获利而向其中非法添加化学成分的行为,保

护消费者的合法权益,本研究参考《支气管哮喘基层合理用药指南》及《咳嗽的诊断与治疗指南(2021)》^[9-10]中指导使用治疗用药种类及化合物类型结合国家药品补充检验方法(批准文件编号 2009031)中规定的 8 种化合物,共挑选了有较大添加风险的 25 种化合物,采用 UPLC-MS/MS 法为检测手段,以期能够为相关监管部门在日常监督止咳平喘类保健食品及中成药中是否有非法添加化学成分提供一种科学且客观的判断依据,以减少因非法添加化学成分而可能带来的安全问题。

1 试剂与仪器

甲醇、乙腈(质谱纯,美国 Fisher 公司);甲酸铵、甲酸(质谱纯,德国 Merck 公司);25 种化合物相关信息见表 1,来源分别为中国食品药品检定研究院(简称中检院),上海安谱瑾世标准技术服务有限公司(简称安谱);所用样品购于网络平台。

表 1 25 种对照品信息

Tab 1 Standard product information of 25 components

化合物	来源	批号	含量/%	化合物	来源	批号	含量/%
茶碱	中检院	100121-201805	99.9	富马酸酮替芬	中检院	100230-201904	99.9
吡嘧司特钾	中检院	100700-200401	99.3	盐酸氨溴索	安谱	2106872	99.9
曲尼司特	安谱	2251846	98.3	氢溴酸右美沙芬	中检院	100201-202205	94.8
硫酸特布他林	安谱	2101132	99.8	盐酸苯海拉明	中检院	100066-202108	99.8
沙丁胺醇	中检院	100204-201103	99.7	盐酸溴己新	中检院	100427-202204	100.0
盐酸丙卡特罗	中检院	100275-202104	96.9	盐酸异丙嗪	中检院	100422-202004	99.5
二羟丙茶碱	中检院	100417-201603	100.0	氯化可的松	中检院	100152-202008	99.7
盐酸麻黄碱	中检院	171241-201809	99.7	枸橼酸喷托维林	中检院	100432-201803	99.8
多索茶碱	中检院	100625-202003	99.9	磷酸苯丙哌林	中检院	100237-201804	99.8
磺胺甲噁唑	中检院	100025-201906	99.8	盐酸氯哌丁	中检院	100529-201001	100.0
盐酸二氧丙嗪	中检院	100299-201803	99.8	醋酸泼尼松	中检院	100012-202108	99.7
那可丁	中检院	171224-201605	100.0	地西洋	中检院	171225-201805	99.9
马来酸氯苯那敏	中检院	100047-202008	99.7				

Sciex Q-trap 5500⁺三重四极杆-线性离子阱复合质谱仪(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司);XS205DU 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Biofuge primo R 型高速离心机[赛默飞世尔(中国)有限公司];SK8210HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);MilliQ 超纯水仪(美国 Millipore 公司);0.22 μm 有机相针式过滤器。

2 方法与结果

2.1 液相条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C18(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流速:0.3 mL·min⁻¹;柱温:30℃;进样体积:0.5 μL;流动相:甲醇(含 0.1%甲酸)(A)-0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~3.0 min, 35%A; 3.0~5.0 min, 35%~50%A;

5.0~11.0 min, 50%~95%A)。

2.2 质谱条件

电喷雾正负离子模式(ESI^{+/-}),检测模式为多反应监测(MRM);离子源喷雾电压(IS):5500 V(-4500 V);离子源温度:500℃;气帘气(CUR)、雾化气(GAS1)、加热辅助气(GAS2)、碰撞气(CAD)均为高纯氮气;监测离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)等信息见表 2。结果见图 1。

2.3 混合对照品储备溶液的制备

精密称取各对照品 20 mg 置于 20 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,即得质量浓度为 1 mg·mL⁻¹的各对照品储备液。使用时按需分别吸取 25 种对照品储备溶液适量混合,用甲醇稀释成混合对照品储备溶液。

表 2 25 种化合物特征选择离子及质谱参数

Tab 2 Characteristic selection ions and MS/MS parameters of 25 compounds

化合物	保留时间 /min	母离子 (m/z)	主要碎片离子 (m/z)	DP/V	CE/V
茶碱	1.88	178.9	164.0, 122.0	- 80, - 80	- 27, - 29
吡嘧司特钾	3.35	227.1	171.1, 117.1	- 18, - 30	- 20, - 20
曲尼司特	9.88	326.1	266.0, 251.0	- 70, - 70	- 31, - 43
硫酸特布他林	1.41	226.1	152.2, 125.1	30, 30	22, 23
沙丁胺醇	1.42	240.1	148.2, 166.1	40, 40	26, 19
丙卡特罗	1.56	291.1	273.2, 231.2	35, 35	19, 27
二羟丙茶碱	1.75	254.9	181.1, 124.0	40, 40	27, 38
盐酸麻黄碱	1.81	166.0	133.1, 148.2	20, 20	27, 16
多索茶碱	2.61	267.1	181.1, 87.1	30, 30	28, 26
磺胺甲噁唑	2.68	254.0	156.2, 108.0	40, 40	23, 32
盐酸二氧丙嗪	3.82	317.1	86.2, 272.2	50, 50	28, 28
那可丁	4.50	414.1	220.1, 205.1	70, 70	30, 57
马来酸氯苯那敏	5.46	275.0	230.1, 167.0	30, 30	20, 52
富马酸酮替芬	5.79	310.1	96.1, 213.0	125, 125	30, 38
盐酸氨溴索	6.00	379.0	264.0, 114.2	40, 40	30, 24
氢溴酸右美沙芬	7.18	272.1	215.2, 171.2	110, 110	32, 51
盐酸苯海拉明	7.28	256.1	167.1, 152.0	10, 10	14, 47
盐酸溴己新	8.09	377.0	114.3, 264.0	45, 45	24, 38
盐酸异丙嗪	8.18	285.1	86.0, 198.2	20, 20	20, 27
氢化可的松	8.40	363.3	121.1, 105.1	90, 60	30, 68
枸橼酸喷托维林	8.54	334.2	100.1, 145.2	80, 80	30, 33
磷酸苯丙哌林	8.96	310.1	126.1, 91.0	85, 85	31, 43
盐酸氯哌丁	9.00	329.9	201.0, 166.0	20, 20	23, 49
醋酸泼尼松	9.11	401.2	295.3, 147.0	60, 70	22, 30
地西洋	9.64	285.0	193.1, 154.1	115, 115	43, 36

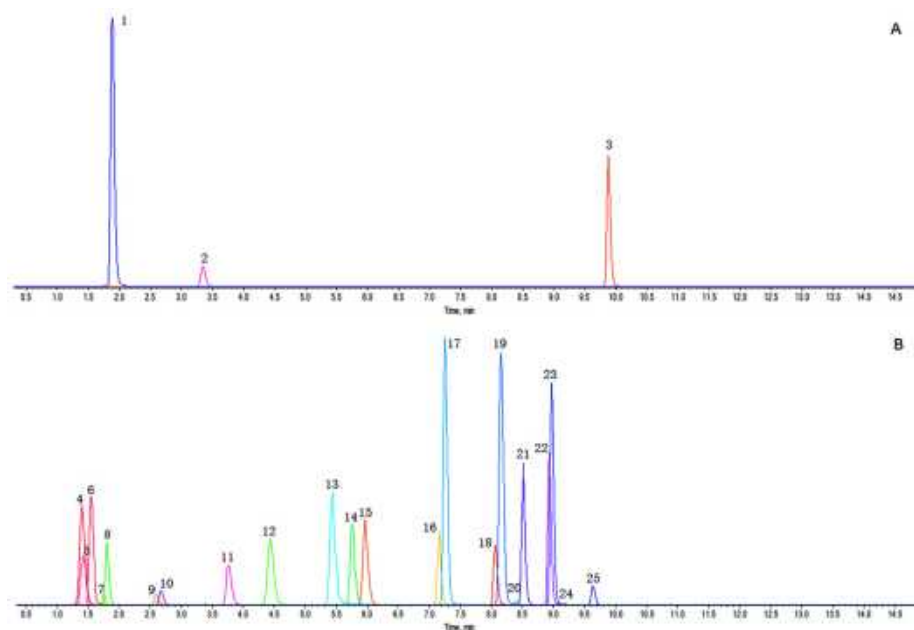


图 1 25 种化合物负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 典型提取离子流叠加上色谱图

Fig 1 Typical extracted ion chromatogram of negative ion mode (A) and positive ion mode (B) for 25 compounds

1. 茶碱 (theophylline); 2. 吡嘧司特钾 (pemirolast potassium); 3. 曲尼司特 (tranilast); 4. 硫酸特布他林 (terbutaline sulfate); 5. 沙丁胺醇 (salbutamol); 6. 盐酸丙卡特罗 (procaterol hydrochloride); 7. 二羟丙茶碱 (diphylline); 8. 盐酸麻黄碱 (ephedrine hydrochloride); 9. 多索茶碱 (doxofylline); 10. 磺胺甲噁唑 (sulfamethoxazole); 11. 盐酸二氧丙嗪 (dioxopromethazine hydrochloride); 12. 那可丁 (noscapine); 13. 马来酸氯苯那敏 (chlorphenamine maleate); 14. 富马酸酮替芬 (ketotifen fumarate); 15. 盐酸氨溴索 (ambroxol hydrochloride); 16. 氢溴酸右美沙芬 (dextromethorphan hydrobromide); 17. 盐酸苯海拉明 (diphenhydramine hydrochloride); 18. 盐酸溴己新 (bromhexine hydrochloride); 19. 盐酸异丙嗪 (promethazine hydrochloride); 20. 氢化可的松 (hydrocortisone); 21. 枸橼酸喷托维林 (pentoxifyverine citrate); 22. 磷酸苯丙哌林 (benproperine phosphate); 23. 盐酸氯哌丁 (cloperastine hydrochloride); 24. 醋酸泼尼松 (prednisone acetate); 25. 地西洋 (diazepam)

2.4 供试品溶液的制备

精密称取各剂型样品适量(胶囊剂:取出 1 粒内容物,必要时研细,混合均匀作为供试样品;水剂:直接吸取 0.5 mL 称重;颗粒剂:取一袋研细后进行称量)置于 20 mL 棕色量瓶中,加入甲醇适量,涡旋振荡混匀后超声 20 min,冷却至室温后用甲醇定容至刻度,混匀,置于 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液过 $0.22 \mu\text{m}$ 有机滤膜,即得供试品溶液(可根据检出情况进行适当稀释进样)。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围及检测限

分别精密吸取“2.3”项下混合对照品储备溶液适量,用甲醇逐级稀释,即得系列对照品溶液,进样分析,以各化合物的峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度($X, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标,进行线性拟合,计算回归方程。

取不含上述 25 种组分的各剂型阴性样品等质量混合作为空白基质样品。在空白基质中加入适量“2.3”项下混合对照品储备溶液,按“2.4”项下方法操作,以 3 倍信噪比计算方法检测限(LOD)和 10 倍信噪比确定方法定量限(LOQ),结果见表 3。

表 3 25 种化合物的线性范围、线性方程、相关系数、检出限、定量限

Tab 3 Linear range, linear equation, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit of the 25 compounds

化合物名称	线性范围 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程	相关系数 (r)	LOD / ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	LOQ / ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)
茶碱	2.22 ~ 221.58	$Y = 4.47 \times 10^3 X + 2.68 \times 10^3$	0.9997	13.3	44.4
吡嘧司特钾	2.23 ~ 446.5	$Y = 1.18 \times 10^4 X + 1.48 \times 10^4$	0.9998	37.2	123.9
曲尼司特	1.97 ~ 197.29	$Y = 1.93 \times 10^3 X + 1.10 \times 10^3$	0.9995	9.9	33.0
硫酸特布他林	0.87 ~ 87.37	$Y = 2.26 \times 10^5 X + 1.19 \times 10^5$	0.9999	4.6	15.4
沙丁胺醇	1.25 ~ 125.02	$Y = 2.41 \times 10^5 X + 1.42 \times 10^5$	0.9995	7.6	25.2
盐酸丙卡特罗	4.07 ~ 407.37	$Y = 1.37 \times 10^5 X + 8.22 \times 10^4$	1.000	23.1	77.0
二羟丙茶碱	1.78 ~ 177.80	$Y = 9.49 \times 10^4 X + 1.16 \times 10^5$	1.000	11.1	37.1
盐酸麻黄碱	1.16 ~ 116.25	$Y = 3.95 \times 10^5 X + 3.49 \times 10^5$	0.9999	5.4	17.8
多索茶碱	1.33 ~ 133.37	$Y = 5.75 \times 10^4 X + 6.16 \times 10^4$	0.9999	7.3	24.4
磺胺甲噁唑	1.21 ~ 121.16	$Y = 1.05 \times 10^5 X + 8.47 \times 10^4$	0.9999	4.9	16.3
盐酸二氧丙嗪	0.99 ~ 98.95	$Y = 2.50 \times 10^5 X + 6.82 \times 10^4$	0.9996	2.9	9.8
那可丁	0.55 ~ 54.50	$Y = 4.86 \times 10^5 X + 1.09 \times 10^5$	0.9999	1.6	5.4
马来酸氯苯那敏	1.16 ~ 116.05	$Y = 2.50 \times 10^5 X - 9.91 \times 10^5$	0.9996	7.0	23.2
富马酸酮替芬	1.15 ~ 115.38	$Y = 1.52 \times 10^5 X + 4.78 \times 10^3$	0.9995	5.5	18.4
盐酸氨溴索	0.66 ~ 65.90	$Y = 1.62 \times 10^4 X + 1.39 \times 10^2$	0.9999	4.4	14.7
氢溴酸右美沙芬	0.72 ~ 72.29	$Y = 2.28 \times 10^5 X + 8.94 \times 10^4$	0.9999	4.3	14.4
盐酸苯海拉明	0.52 ~ 52.07	$Y = 3.75 \times 10^5 X + 7.09 \times 10^4$	0.9998	3.1	10.4
盐酸溴己新	0.63 ~ 62.77	$Y = 2.52 \times 10^5 X + 6.44 \times 10^4$	0.9990	1.9	6.2
盐酸异丙嗪	0.58 ~ 58.16	$Y = 3.27 \times 10^5 X + 1.05 \times 10^5$	1.000	1.7	5.8
氢化可的松	1.95 ~ 195.41	$Y = 5.15 \times 10^3 X + 3.17 \times 10^3$	0.9999	19.6	65.3
枸橼酸喷托维林	0.56 ~ 55.59	$Y = 3.53 \times 10^5 X + 2.71 \times 10^4$	0.9992	1.7	5.6
磷酸苯丙哌林	0.50 ~ 49.90	$Y = 3.66 \times 10^5 X + 2.50 \times 10^4$	0.9997	1.5	5.0
盐酸氯哌丁	0.59 ~ 58.65	$Y = 9.06 \times 10^4 X - 5.28 \times 10^3$	0.9997	1.7	5.8
醋酸泼尼松	2.02 ~ 202.49	$Y = 6.41 \times 10^2 X - 2.06 \times 10^3$	0.9998	20.2	67.3
地西洋	0.53 ~ 52.95	$Y = 1.32 \times 10^5 X - 1.72 \times 10^3$	0.9994	2.9	9.8

2.5.2 回收率

以检测结果阴性的水剂、胶囊剂、颗粒剂 3 种类型的样品为基质,进行 3 个浓度水平 [11.08 、 44.32 、 $110.79 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以茶碱计)] 的加标回收率试验,每个浓度水平配制 6 份,按“2.4”项下方法样品处理,进样测定。分别计算该样品溶液中待分析物质谱响应与同浓度的对照品溶液比值,以评价该方法的回收率。结果显示 3 种基质平均回收率范围为 $72.0\% \sim 109.8\%$, RSD 为 $0.10\% \sim 8.7\%$,表明方法回收率良好。

2.5.3 精密度

以 $2.22 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以茶碱计) 的 25 种混合对照品溶液置于自动进样器中,连续进样 6 次,计算各组分的响应值 RSD 。结果显示 25 种组分响应值 RSD ($n = 6$) 均小于 6.3% ,表明

精密度良好。

2.5.4 溶液稳定性

取 $2.22 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以茶碱计) 的 25 种混合对照品溶液置于自动进样器中,分别于配制后 1、4、12、24 h 进样测定,计算各组分的响应值 RSD ,结果显示 25 种组分在 24 h 内响应值 RSD 均小于 8.9% ,表明溶液稳定性良好。

2.5.5 样品含量测定

用所建立的 UPLC-MS/MS 法对 10 批保健食品和中成药样品(包含 2 批保健食品水剂,4 批中成药胶囊剂及 3 批中成药颗粒剂)进行测定(典型离子图见图 2、3)。结果显示:其中 2 批中成药胶囊剂检出有非法添加成分,1 批检测到茶碱 ($0.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),另 1 批检测到那可丁 ($0.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和麻黄碱 ($1.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

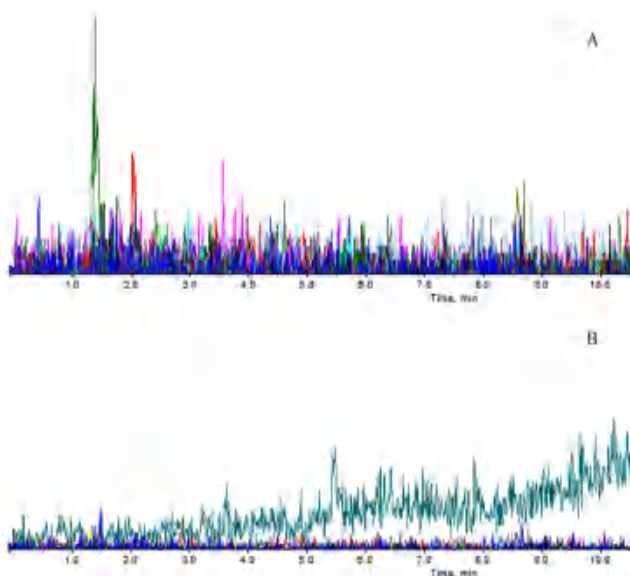


图 2 阴性样品负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 典型提取离子流叠加色谱图

Fig 2 Typical extracted ion chromatograms of negative ion mode (A) and positive ion mode (B) for negative sample

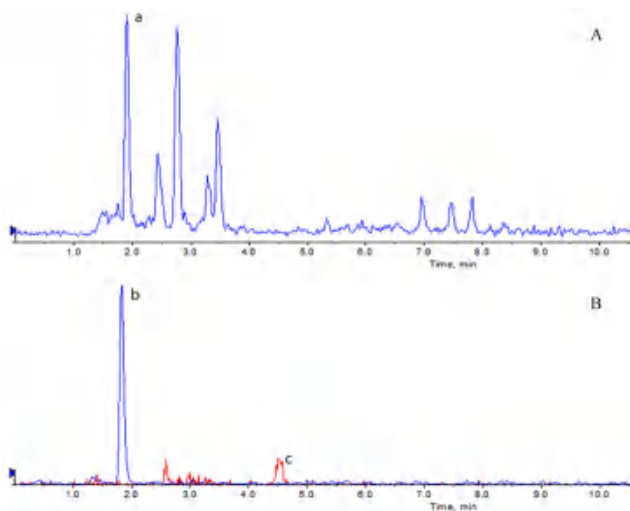


图 3 阳性样品负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 典型离子流叠加色谱图

Fig 3 Typical extracted ion chromatogram of negative ion mode (A) and positive ion mode (B) for positive sample

a. 茶碱 (theophylline); b. 盐酸麻黄碱 (ephedrine hydrochloride); c. 那可丁 (noscapine)

3 讨论

3.1 色谱柱

25 种化合物性质差异较大, 参考相关文献报道^[2-8], 发现本试验中目标化合物在反相色谱柱 (C18 柱) 上分离效果较好。因此考察了 ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Phenomenex Luna Omega C18 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 和 Phenomenex Kinetex C18 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm) 4 种色谱柱对目标化合物分离的影

响。结果显示在同一流动相洗脱体系下, ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 对于目标化合物的分离效果均优于其他色谱柱, 因此选用该色谱柱进行后续的相关试验。

3.2 流动相的选择

本试验考察了不同浓度甲酸铵、乙酸铵、甲酸配合甲醇或乙腈等不同流动相体系及不同初始比例对 25 种化合物的色谱峰形、出峰时间及信号强度的影响, 发现甲醇 (含 0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸溶液初始比例为 35:65 时对于各组分的分离效果和峰形最优。

3.3 提取溶剂的选择

由于本试验研究的 25 种化合物的极性有一定的差异, 如茶碱、沙丁胺醇、特布他林等极性较大, 而地西洋和曲尼司特则极性相对较小, 因此试验比较了以不同浓度甲醇、乙腈分别作为提取溶剂时的提取回收率情况。综合对于不同剂型和不同化合物提取回收率的结果, 选择提取效率相对较好的甲醇作为提取溶剂, 能够同时满足对于不同剂型的提取需求。

4 结论

本试验依据相关文献和补充检验方法, 并结合实际检测情况选取了有较大添加风险的 25 种化合物, 建立了快速的筛查、定量检测方法。结果表明该方法灵敏、快速、高效, 可用于止咳平喘类保健食品和中成药中 25 种非法添加化学成分的检验。同时在使用上述条件对实际样品的检测中发现存在同时检出一种及以上具有止咳平喘类功效的非法添加化学成分的情况, 说明不法分子对于非法添加化学成分的选择具有一定的目的性, 且由于化学成分的添加具有一定隐蔽性且添加量不明确, 消费者在自行购买服用时存在用药配伍冲突及服用过量风险, 如麻黄碱虽常与苯海拉明等止咳平喘药物联合用于缓解支气管哮喘症状, 但如大量使用可引起震颤、焦虑、失眠等不良反应, 因此对于止咳平喘类中成药和保健食品建立一种准确的定性及定量方法确有必要。

本试验建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定止咳平喘保健食品和中成药中的 25 种非法添加化学成分的检测方法, 应用该方法对 10 批样品进行检测, 其中 2 批中成药胶囊剂检出有标识外成分。本方法操作简便, 具有良好的选择性、灵敏度及准确度, 涵盖了国家药品补充检验方法 (批准文件编号 2009031) 中规定的及其他具有较大添加风险的 25 种化合物, 检测容量大, 适用范围广, 可为止咳平喘类保健食品和中成药中非法添加药物的监督检验工作提供技术支撑。

参考文献

- [1] Huang KW, Yang T, Xu JY, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *The Lancet*, 2019, 394 (10196): 407-418.
- [2] 陈燕, 齐衍超, 赵海鹏, 等. HPLC-MS/MS 法快速测定小儿止咳平喘贴剂中非法添加 35 种化学成分 [J]. *中国药品标准*, 2022, 23 (4): 386-390.
- [3] 汪瑾彦, 梁祈, 庄玥, 等. UPLC-MS/MS 法测定止咳平喘中药制剂中 16 种非法添加化学药物 [J]. *中成药*, 2022, 44 (1): 127-131.
- [4] 王艳红, 王广珠, 张任男, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定止咳平喘类中成药中添加的 7 个化学抗菌类药物 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41 (8): 1399-1407.
- [5] 张科明, 许杨彪, 刘向红, 等. QuEChERS-液质联用法快速测定凉茶中非法添加的 10 种止咳平喘类化学药物 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39 (24): 294-297, 308.
- [6] 夏方亮, 王玉林, 王建强, 等. 止咳平喘类制剂中可能违禁添加的 14 种药物的 UPLC-DAD 法检测 [J]. *中国医药工业杂志*, 2018, 49 (5): 651-655.
- [7] 李奕婧, 李晓琳, 韩家忠, 等. HPLC-DAD-MS/MS 检测止咳平喘类中药制剂中非法添加的 12 种化学药品 [J]. *药学学报*, 2017, 52 (6): 959-963.
- [8] 高辉, 李冰, 王杰. HPLC-DAD-MS/MS 法用于止咳平喘类中成药中添加 14 种肾上腺皮质激素的筛查和定量研究 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35 (8): 1458-1465.
- [9] 中华医学会, 中华医学会临床药学分会, 基层医疗卫生机构合理用药指南编写专家组, 等. 支气管哮喘基层合理用药指南 [J]. *中华全科医师杂志*, 2020, 19 (7): 572-581.
- [10] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南 (2021) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2022, 45 (1): 13-46.

(收稿日期: 2023-06-07; 修回日期: 2023-08-17)

一测多评法同时测定肺气肿片中 14 种成分的含量

杨婷^{1, 2}, 邓芳², 刘涛², 李顺祥^{1, 3*}, 傅黎春^{2*} (1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410000; 2. 衡阳市市场监督管理局检验检测中心, 湖南 衡阳 421001; 3. 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心, 长沙 410000)

摘要: 目的 建立一测多评法同时测定肺气肿片中 14 种指标性成分 (绿原酸、苦杏仁苷、咖啡酸、补骨脂苷、异补骨脂苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、淫羊藿苷、槲皮素、补骨脂素、异补骨脂素、野马追内酯 B、丹参酮 II A、补骨脂酚) 的含量。方法 用甲醇提取肺气肿片, 采用 Shimadzu Shim-pack GIST-C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 检测波长 246 nm 和 210 nm; 进样量 10 μL。以补骨脂素为内标, 计算其他 13 种成分的相对校正因子, 测定其含量。结果 采用一测多评法测定了肺气肿片中 14 种成分的含量, 所得结果与外标法接近。结论 该方法快速、准确、可靠、简便, 可用于肺气肿片的质量控制。

关键词: 肺气肿片; 化学成分; 特征图谱; 一测多评法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3298-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.031

Simultaneous determination of 14 constituents in Feiqizhong tablets by QAMS method

YANG Ting^{1, 2}, DENG Fang², LIU Tao², LI Shun-xiang^{1, 3*}, FU Li-chun^{2*} (1. *School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000*; 2. *Inspection and Testing Center, Hengyang Market Supervision, Hengyang Hunan 421001*; 3. *Hunan Engineering Technology Research Center for Bioactive Substance Screening of Chinese Medicine, Changsha 410000*)

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项课题 (No.2020ZX09301038); 长沙市自然科学基金 (No.kq2202267); 湖南中医药大学中药学一流学科项目 (校行科字 [2018]3 号)。

作者简介: 杨婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药品质量检测与监控研究, email: 835283536@qq.com *通信作者: 李顺祥, 男, 二级教授, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础与作用机制研究, email: lishunxiang@hotmail.com; 傅黎春, 女, 主任药师, 主要从事药品质量分析与控制研究, email: 1968675502@qq.com

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for the simultaneous content determination of 14 index constituents (chlorogenic acid, amygdalin, caffeic acid, psoralenoside, isopsoralenoside, calycosin-7-*O*- β -D-glucoside, salvianolic acid B, icariin, quercetin, psoralen, isopsoralen, eupalinolide B, tanshinone II A, and bakuchiol) in Feiqizhong tablets. **Methods** The methanol extract of this drug was analyzed on a 30 °C thermostatic Shimadzu Shim-pack GIST-C18 column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), with the mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL \cdot min⁻¹ in a gradient elution manner. The detection wavelength was set at 246/210 nm, and the sample size was 10 μ L. Psoralen was used as the internal standard to calculate the relative correction factors of the other 13 constituents. **Results** The content of 14 components in Feiqizhong tablets has been measured by QAMS. The results are close to those of the external standard method. **Conclusion** This rapid, accurate, reliable and simple method can be used for the quality control of Feiqizhong tablets.

Key words: Feiqizhong tablet; chemical constituent; specific chromatogram; quantitative analysis of multi-components by single marker

肺气肿片是中西结合复方处方用药, 具有补肾益气、活血化瘀、止咳祛痰等功效^[1-2]; 临床上主要用于肺肾不足, 痰浊阻肺, 胸闷憋气, 动辄喘乏, 咳嗽痰多, 腰膝酸痛, 慢性气管炎阻塞性肺气肿属上述症候者。肺气肿片由野马追、淫羊藿、丹参、红花、补骨脂、桃仁、黄芪、盐酸克伦特罗、牡荆油制成。肺气肿片的现行质量标准《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十七册》未对肺气肿片中组成成分进行精确的含量测定。目前国内外关于肺气肿片中化学成分含量的研究鲜有, 仅位岩平等^[3]采用 HPLC 法测定肺气肿片中淫羊藿苷的含量; 罗春华等^[4]采用 HPLC 法测定肺气肿片中补骨脂素和异补骨脂素的含量。

一测多评法 (QAMS) 已广泛应用于中药及复方制剂的质控研究^[5-7], 通过中药有效成分内在函数关系和比例关系, 以中药中价廉易得的典型成分为内标, 得到该成分与其他成分间的相对校正因子, 再通过校正因子同步计算出其他成分的含量, 从而实现多成分的同时测定。为提高制剂质量, 本研究采用一测多评法建立肺气肿片的多成分质控体系, 为该制剂的质量监控提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

SHIMADZU LC-20AT 型高效液相色谱仪 (岛津公司); Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (赛默飞公司); AE240S 型电子分析天平 (十万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); XMTD-4000 型八孔电热恒温水浴锅 (北京永光明医疗器械厂); KQ-500E 型超声清洗仪 (昆山美美超声仪

器有限公司)。

1.2 试药

绿原酸 (批号: 110753-202119, 纯度: 96.10%)、苦杏仁苷 (批号: 111637-202111, 纯度: 88.20%)、咖啡酸 (批号: 110885-201703, 纯度: 99.7%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号: 111920-201907, 纯度: 96.8%)、丹酚酸 B (批号: 111562-201917, 纯度: 97%)、淫羊藿苷 (批号: 110737-202017, 纯度: 94.2%)、槲皮素 (批号: 100081-201610, 纯度: 99.10%)、补骨脂素 (批号: 110739-201918, 纯度: 99.9%)、丹参酮 II A (批号: 110766-202022, 纯度: 99.5%)、异补骨脂素 (批号: 110738-202016, 纯度: 99.4%) (中国食品药品检定研究院)。野马追内酯 B (成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-21110721, 纯度: 96.85%); 补骨脂酚 (Chem Faces 公司, 批号: CFS202101, 纯度: 98.0%); 补骨脂苷 (批号: 020163-202112, 纯度: 98.00%)、异补骨脂苷 (批号: 250299-202112, 纯度: 98.00%) (上海鸿永生物科技有限公司)。乙腈、甲醇均为色谱纯, 水为去离子蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。肺气肿片样品均为市购, S1 ~ S11 均来自 A 公司 (批号: 210904、210906、210601、210901、201204、221104、221001、210702、211005、220203、220407); S12 ~ S20 均来自 B 公司 (批号: 210302、200504、210301、220402、220403、210323、210302、210204、220702)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: SHIMADZU Shim-pack GIST-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 以 0.1% 磷酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B; 梯度洗脱 (0 ~ 10

min, 88%A; 10 ~ 30 min, 88% ~ 50%A; 30 ~ 60 min, 50% ~ 30%A; 60 ~ 65 min, 30%A; 65 ~ 70 min, 30% ~ 88%A; 70 ~ 75 min, 88%A); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 246 nm,

210 nm; 进样量: 10 μL。补骨脂素与异补骨脂素的分离度应大于 2.0; 理论塔板数按补骨脂素峰计算应不低于 10 000, 色谱图见图 1。

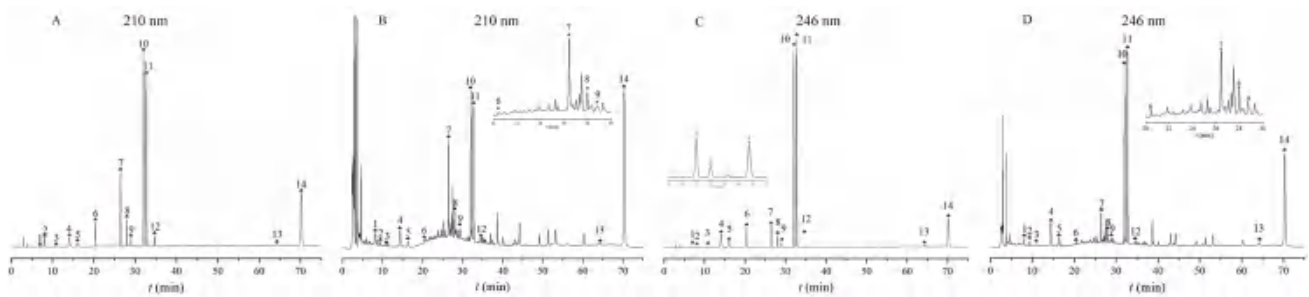


图 1 肺气肿片中各成分 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of various constituents in Feiqizhong tablet

1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 2. 苦杏仁苷 (amygdalin); 3. 咖啡酸 (caffeic acid); 4. 补骨脂苷 (psoralenoside); 5. 异补骨脂苷 (isopsoralenoside); 6. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-O-β-D-glucoside); 7. 丹酚酸 B (salvianolic acid B); 8. 淫羊藿苷 (icariin); 9. 槲皮素 (quercetin); 10. 补骨脂素 (psoralenoside); 11. 异补骨脂素 (isopsoralenoside); 12. 野马追内酯 B (eupalinolide B); 13. 丹参酮 II A (tanshinone II A); 14. 补骨脂酚 (bakuchiol); A、C. 混合对照品 (mixed reference); B、D. 供试品 (sample)

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 精密称取绿原酸、苦杏仁苷、咖啡酸、补骨脂苷、异补骨脂苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、淫羊藿苷、槲皮素、补骨脂素、异补骨脂素、野马追内酯 B、丹参酮 II A、补骨脂酚对照品适量, 加入甲醇超声溶解, 制成质量浓度分别为 112.16 μg · mL⁻¹、7.96 mg · mL⁻¹、178.54 μg · mL⁻¹、3.10 mg · mL⁻¹、1.31 mg · mL⁻¹、200.68 μg · mL⁻¹、2.67 mg · mL⁻¹、1.25 mg · mL⁻¹、373.75 μg · mL⁻¹、3.94 mg · mL⁻¹、4.94 mg · mL⁻¹、3.15 mg · mL⁻¹、591.83 μg · mL⁻¹ 和 16.17 mg · mL⁻¹ 的单一对照品储备液, 备用; 分别精密量取上述对照品溶液适量, 置同一 50 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 即得质量浓度分别为 2.24、159.20、3.57、62.06、26.21、4.01、53.39、

25.00、7.47、78.87、98.72、63.06、11.84、323.33 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 精密称取 2 g, 置 250 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 擦干外壁水分, 称定重量, 用甲醇补足损失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围 取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 用甲醇稀释配制为梯度浓度的混合对照品溶液, 进样测定。分别以 14 个成分的质量浓度为 X 轴, 峰面积为 Y 轴, 进行线性拟合, 结果见表 1。相关系数 (r) 均大于 0.999, 表明各成分在相应范围内与峰面积线性关系良好。

表 1 肺气肿片中各成分线性关系

Tab 1 Linear relationships of various constituents in Feiqizhong tablet

成分	线性方程	线性范围 / (μg · mL ⁻¹)	r
绿原酸	$Y = 1.746 \times 10^4 X + 122.2$	0.36 ~ 3.61	1.000
苦杏仁苷	$Y = 8.785 \times 10^3 X + 1.269 \times 10^3$	10.38 ~ 259.50	1.000
咖啡酸	$Y = 4.140 \times 10^4 X + 313.3$	0.21 ~ 5.28	1.000
补骨脂苷	$Y = 3.735 \times 10^4 X + 9.952 \times 10^3$	5.45 ~ 136.30	0.9999
异补骨脂苷	$Y = 3.809 \times 10^4 X + 3.736 \times 10^3$	2.40 ~ 59.90	1.000
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 7.780 \times 10^4 X + 9.299 \times 10^3$	2.11 ~ 52.80	0.9998
丹酚酸 B	$Y = 1.242 \times 10^4 X - 1.921 \times 10^3$	10.40 ~ 260.00	1.000
淫羊藿苷	$Y = 3.031 \times 10^4 X + 4.097 \times 10^3$	4.30 ~ 172.16	1.000
槲皮素	$Y = 3.875 \times 10^4 X + 7.744 \times 10^3$	0.69 ~ 27.49	0.9991
补骨脂素	$Y = 7.593 \times 10^4 X + 9.947 \times 10^4$	1.98 ~ 198.00	0.9995
异补骨脂素	$Y = 6.602 \times 10^4 X + 1.411 \times 10^5$	24.49 ~ 244.92	0.9991
野马追内酯 B	$Y = 2.252 \times 10^3 X - 11.90$	2.46 ~ 61.52	0.9999
丹参酮 II A	$Y = 2.345 \times 10^4 X + 3.349 \times 10^3$	2.46 ~ 55.64	0.9998
补骨脂酚	$Y = 2.122 \times 10^4 X + 5.828 \times 10^4$	24.78 ~ 991.20	0.9999

2.3.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 分别计算 14 个成分峰面积的 RSD, 结果见表 2。精密度 RSD 值均不大于 2%, 表明精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取“2.2.2”项下方法制备的供试品(批号:210906)溶液, 分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样测定各成分的峰面积, 结果见表 2, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 精密称取同一批肺气肿片样品(批号: 210906) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定各成分的峰面积, 计算出 14 个成分的质量分数, 结果见表 2, RSD 均小于 2%, 表明该方法重复性良好。

表 2 肺气肿片中 14 个分析物的方法学考察结果 (n = 6)

Tab 2 Methodology of 14 detected compounds (n = 6)

分析物	精密度 RSD/%	稳定性 RSD/%	重复性	
			质量分数 /%	RSD/%
绿原酸	0.04	0.78	0.006	0.86
苦杏仁苷	0.03	1.0	0.31	0.91
咖啡酸	0.02	0.92	0.006	0.77
补骨脂苷	0.18	0.78	0.12	1.8
异补骨脂苷	0.09	1.2	0.049	1.4
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.20	0.96	0.003	1.3
丹酚酸 B	0.12	0.77	0.17	1.2
淫羊藿苷	0.14	1.48	0.056	1.7
槲皮素	0.11	0.84	0.019	1.3
补骨脂素	0.10	1.3	0.25	1.6
异补骨脂素	0.11	1.15	0.29	1.5
野马追内酯 B	0.06	0.99	0.097	0.79
丹参酮 II A	0.08	0.77	0.039	1.70
补骨脂酚	0.03	1.4	1.1	1.8

2.3.5 回收试验 精密称取同一批肺气肿片样品(批号: 210906) 6 份, 各精密称取 1 g, 按照 1:1 分别依次精密加入“2.1.2”项下 14 个单一对照品储备液, 氮气流挥干溶剂后, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率。结果绿原酸、苦杏仁苷、咖啡酸、补骨脂苷、异补骨脂苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、淫羊藿苷、槲皮素、补骨脂素、异补骨脂素、野马追内酯 B、丹参酮 II A、补骨脂酚平均加样回收率分别为 106.14%、104.20%、98.26%、100.49%、98.03%、104.94%、104.58%、99.65%、97.25%、98.06%、94.04%、90.71%、98.52%、100.90%, RSD 分别为 1.1%、1.2%、0.58%、1.2%、1.2%、0.61%、0.23%、0.38%、0.38%、0.36%、0.45%、1.3%、0.42%、0.84%, 均小于 2%, 表明该方法回收率良好。

2.4 相对校正因子 ($f_{s/i}$) 的建立

采用标准曲线相对斜率法及浓度法, 以补骨

脂素为内标参照物, 测定其他 13 个指标性成分相对于补骨脂素的校正因子。

2.4.1 斜率法 $f_{s/i}$ 的计算 分别使用各成分标准曲线的过原点的线性斜率和不过原点的线性斜率, 以补骨脂素斜率 / 待测成分斜率计算各成分 $f_{s/i}$, 结果见表 3。

表 3 斜率法 $f_{s/i}$ 结果

Tab 3 Relative correction factor calculated by slope method

成分	校正因子代码	不过原点		过原点	
		线性斜率	校正因子	线性斜率	校正因子
绿原酸	f_{ja}	17 456	4.350	17 499	4.376
苦杏仁苷	f_{jb}	8785	8.643	8792	8.709
咖啡酸	f_{jc}	41 399	1.834	41 478	1.846
补骨脂苷	f_{jd}	37 354	2.033	37 450	2.045
异补骨脂苷	f_{je}	38 091	1.993	38 174	2.006
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	f_{jf}	77 802	0.976	78 035	0.981
丹酚酸 B	f_{jg}	12 424	6.112	12 414	6.168
淫羊藿苷	f_{jh}	30 310	2.505	30 345	2.523
槲皮素	f_{ji}	38 747	1.960	39 160	1.955
异补骨脂素	f_{jk}	66 024	1.150	66 756	1.147
野马追内酯 B	f_{jl}	2253	33.711	2252	33.997
丹参酮 II A	f_{jm}	23 451	3.238	23 540	3.253
补骨脂酚	f_{jn}	21 219	3.579	21 305	3.594

2.4.2 浓度法 (多点法) $f_{s/i}$ 的计算 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、5、10 μL (n = 3) 注入液相色谱仪中, 记录峰面积, 根据 QAMS 的 $f_{s/i}$ 计算公式 $f_{s/i} = f_s/f_i = A_s \times C_i / (A_i \times C_s)$ (式中 C_i 为待测组分的浓度, A_i 为待测组分的峰面积, C_s 为内标参物 s 的浓度, A_s 为内标参物 s 的峰面积), 以补骨脂素为内标参物, 计算各组分的 $f_{s/i}$, 结果见表 4。由表 4 可知, 由 (过原点和不过原点) 标准曲线线性斜率及浓度法计算得出的 $f_{s/i}$ 差距不大, RSD 不大于 2.0%, 表明三种计算方法均可行。后续试验选取不过原点的标准曲线线性斜率 $f_{s/i}$ 进行考察。

2.5 $f_{s/i}$ 耐用性评价

2.5.1 不同色谱柱柱温对 $f_{s/i}$ 的影响 采用 SHIMADZU LC-20AT 型高效液相色谱系统, SHIMADZU Shim-pack GIST-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。考察不同柱温 (20、25、30、35、40 °C) 对 $f_{s/i}$ 的影响, 结果见表 5。其 RSD 均小于 2.0%, 表明各色谱柱柱温对 $f_{s/i}$ 无显著性差异。

2.5.2 不同流速对 $f_{s/i}$ 的影响 考察了不同流速 (0.9、1.0、1.1 mL · min⁻¹) 对 $f_{s/i}$ 的影响, 精密吸取混合对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪中, 记录峰面积, 结果见表 6。各成分 $f_{s/i}$ 的 RSD 均小于 2.0%, 表明不同体积流量对各成分 $f_{s/i}$ 无显著影响。

表 4 浓度法 $f_{s/i}$ 结果

Tab 4 Relative correction factor calculated by concentration method

进样量 / μL	$f_{j/a}$	$f_{j/b}$	$f_{j/c}$	$f_{j/d}$	$f_{j/e}$	$f_{j/f}$	$f_{j/g}$	$f_{j/h}$	$f_{j/i}$	$f_{j/k}$	$f_{j/l}$	$f_{j/m}$	$f_{j/n}$
1	4.397	9.048	1.997	2.110	2.080	1.021	6.519	2.655	1.999	1.131	35.139	3.339	3.540
5	4.527	9.067	1.881	2.090	2.057	1.004	6.380	2.604	1.953	1.135	35.361	3.332	3.665
10	4.338	8.555	1.810	2.011	1.971	0.962	6.149	2.490	1.870	1.150	33.453	3.222	3.514
平均值	4.421	8.890	1.896	2.070	2.036	0.995	6.350	2.583	1.941	1.139	34.651	3.298	3.573

表 5 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响

Tab 5 Relative correction factor of different column temperatures

柱温 / $^{\circ}\text{C}$	$f_{j/a}$	$f_{j/b}$	$f_{j/c}$	$f_{j/d}$	$f_{j/e}$	$f_{j/f}$	$f_{j/g}$	$f_{j/h}$	$f_{j/i}$	$f_{j/k}$	$f_{j/l}$	$f_{j/m}$	$f_{j/n}$
20	4.32	8.572	1.856	2.067	1.973	0.966	6.134	2.495	1.866	1.132	33.604	3.27	3.564
25	4.284	8.543	1.848	2.023	1.979	0.972	6.297	2.497	1.849	1.137	33.269	3.245	3.572
30	4.338	8.358	1.833	2.006	1.98	0.956	6.406	2.501	1.876	1.142	33.576	3.241	3.601
35	4.346	8.605	1.884	2.054	1.984	0.989	6.232	2.491	1.887	1.134	33.355	3.233	3.559
40	4.381	8.533	1.863	2.067	1.998	0.969	6.193	2.502	1.874	1.148	33.644	3.256	3.547
平均值	4.33	8.52	1.86	2.04	1.98	0.97	6.25	2.50	1.87	1.14	33.49	3.25	3.57
RSD/%	0.82	1.2	1.1	1.4	0.47	1.3	1.7	0.18	0.75	0.57	0.50	0.44	0.57

表 6 不同流动相流速对 $f_{s/i}$ 的影响

Tab 6 Relative correction factor of different volume flow rates

流速 / ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	$f_{j/a}$	$f_{j/b}$	$f_{j/c}$	$f_{j/d}$	$f_{j/e}$	$f_{j/f}$	$f_{j/g}$	$f_{j/h}$	$f_{j/i}$	$f_{j/k}$	$f_{j/l}$	$f_{j/m}$	$f_{j/n}$
0.9	4.575	8.461	1.868	2.001	1.957	0.955	6.721	2.436	1.858	1.152	33.479	3.196	3.516
1.0	4.557	8.482	1.857	2.003	1.978	0.956	6.715	2.484	1.856	1.150	33.547	3.182	3.519
1.1	4.578	8.426	1.831	2.017	1.992	0.966	6.761	2.430	1.853	1.146	33.567	3.142	3.546
平均值	4.57	8.46	1.85	2.01	1.98	0.96	6.73	2.45	1.86	1.15	33.53	3.17	3.53
RSD/%	0.25	0.33	1.1	0.43	0.89	0.63	0.37	1.3	0.14	0.27	0.14	0.88	0.47

2.6 目标化合物色谱峰的定位

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液进样测定，记录 14 种成分的色谱峰保留时间，以内参物补骨脂素色谱峰为基准峰，采用相对保留时间法（待测目标化合物保留时间与内参物保留

时间的比值）在不同仪器、色谱柱条件下对待测化合物色谱峰进行定位，结果见表 7。在不同仪器、色谱柱条件下计算出的各相对保留时间值的 RSD 均 $\leq 2.0\%$ ，表明不同仪器、色谱柱对各色谱峰的相对保留时间影响较小。

表 7 不同仪器、色谱柱对相对保留时间值的影响

Tab 7 Effect of different instruments and columns on relative retention time values

仪器	色谱柱	$f_{j/a}$	$f_{j/b}$	$f_{j/c}$	$f_{j/d}$	$f_{j/e}$	$f_{j/f}$	$f_{j/g}$	$f_{j/h}$	$f_{j/i}$	$f_{j/k}$	$f_{j/l}$	$f_{j/m}$	$f_{j/n}$
仪器 1	色谱柱 1	0.207	0.243	0.320	0.428	0.493	0.633	0.831	0.883	0.906	1.024	1.091	2.012	2.203
	色谱柱 2	0.218	0.251	0.337	0.439	0.500	0.636	0.827	0.875	0.905	1.023	1.084	2.009	2.192
	色谱柱 3	0.211	0.248	0.330	0.430	0.497	0.644	0.818	0.853	0.900	1.021	1.059	1.999	2.198
仪器 2	色谱柱 1	0.212	0.251	0.330	0.430	0.496	0.646	0.812	0.875	0.891	1.025	1.099	2.079	2.276
	色谱柱 2	0.212	0.244	0.321	0.441	0.497	0.660	0.818	0.883	0.897	1.025	1.095	2.075	2.280
	色谱柱 3	0.207	0.240	0.331	0.419	0.501	0.655	0.805	0.887	0.892	1.022	1.064	1.990	2.275
平均值		0.21	0.25	0.33	0.43	0.50	0.65	0.82	0.88	0.90	1.02	1.08	2.03	2.24
RSD/%		2.0	1.8	2.0	1.9	0.56	1.7	1.2	1.5	0.68	0.14	1.6	2.0	2.0

2.7 QAMS 与外标法 (EMS) 测定的比较

取样品，分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，依法测定各批次样品，采用 EMS 计算肺气肿片中 14 种成分的含量；依据不过原点的线性斜率得出 14 种成分的 $f_{s/i}$ ，并计算出各成分的含量，各批次样品测定 2 次，取平均值。比较 QAMS

与 EMS 的含量，结果见表 8。两种方法所得到的 14 个成分含量基本一致，RSD 均小于 4%，表明 QAMS 法可以代替 EMS 进行多成分质量评价。

3 讨论

3.1 指标成分选取依据

肺气肿片由野马追、淫羊藿、丹参、红花、补

表 8 ESM 与 QAMS 测定肺气肿片中 14 个成分的含量比较 (mg/片, n = 3)
 Tab 8 Content of 14 components by external standard methods and QAMS (mg/tablet, n = 3)

编号	补骨脂素		绿原酸		苦杏仁苷		咖啡酸		补骨脂苷		异补骨脂苷		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.83	0.02	0.02	1.07	1.06	0.03	0.03	0.44	0.45	0.17	0.18	0.01	0.01	
S2	0.77	0.02	0.02	0.95	0.93	0.02	0.02	0.38	0.39	0.15	0.15	0.01	0.01	
S3	0.61	0.02	0.02	0.95	0.94	0.02	0.02	0.45	0.47	0.17	0.18	0.02	0.02	
S4	0.56	0.02	0.02	0.76	0.75	0.02	0.02	0.35	0.36	0.15	0.16	0.01	0.01	
S5	0.83	0.03	0.03	1.01	1.00	0.03	0.03	0.58	0.59	0.25	0.25	0.03	0.03	
S6	0.76	0.02	0.02	1.12	1.11	0.02	0.02	0.47	0.48	0.18	0.18	0.01	0.01	
S7	0.70	0.02	0.02	0.99	0.98	0.02	0.02	0.39	0.41	0.15	0.16	0.01	0.01	
S8	0.69	0.02	0.02	0.97	0.96	0.02	0.02	0.39	0.40	0.15	0.16	0.01	0.01	
S9	0.67	0.02	0.02	0.93	0.91	0.02	0.02	0.41	0.42	0.17	0.18	0.01	0.01	
S10	0.81	0.03	0.03	1.09	1.08	0.02	0.02	0.48	0.50	0.21	0.21	0.01	0.01	
S11	0.62	0.02	0.02	0.81	0.80	0.02	0.02	0.42	0.43	0.23	0.23	0.01	0.01	
S12	0.52	0.01	0.01	2.12	2.09	0.03	0.03	0.66	0.68	0.35	0.36	0.02	0.02	
S13	0.56	0.02	0.02	0.79	0.78	0.02	0.02	0.33	0.34	0.15	0.16	0.01	0.01	
S14	0.77	0.02	0.02	1.13	1.12	0.02	0.02	0.45	0.47	0.18	0.19	0.01	0.01	
S15	0.56	0.01	0.01	2.10	2.07	0.04	0.04	0.72	0.74	0.45	0.47	0.02	0.02	
S16	0.60	0.02	0.02	1.10	1.08	0.02	0.02	0.45	0.47	0.17	0.18	0.02	0.02	
S17	0.56	0.02	0.02	0.79	0.78	0.02	0.02	0.34	0.35	0.15	0.16	0.01	0.01	
S18	0.50	0.01	0.01	1.85	1.82	0.04	0.04	0.66	0.68	0.42	0.43	0.01	0.02	
S19	0.48	0.01	0.01	1.95	1.92	0.04	0.04	0.67	0.69	0.35	0.36	0.01	0.01	
S20	0.56	0.01	0.01	2.10	2.07	0.04	0.04	0.72	0.74	0.45	0.47	0.02	0.02	

编号	丹酚酸 B		淫羊藿苷		槲皮素		异补骨脂素		野马追内酯 B		丹参酮 II A		补骨脂酚	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.55	0.56	0.18	0.19	0.06	0.06	0.96	0.96	0.34	0.35	0.13	0.13	3.54	3.67
S2	0.52	0.54	0.17	0.17	0.06	0.06	0.89	0.89	0.30	0.31	0.12	0.12	3.33	3.45
S3	0.28	0.29	0.16	0.16	0.07	0.07	0.85	0.85	0.32	0.33	0.12	0.13	2.80	2.90
S4	0.42	0.43	0.15	0.15	0.06	0.06	0.70	0.70	0.28	0.30	0.10	0.10	2.79	2.89
S5	0.55	0.56	0.28	0.28	0.08	0.09	1.09	1.10	0.40	0.42	0.15	0.15	3.24	3.36
S6	0.57	0.59	0.20	0.21	0.06	0.06	0.94	0.95	0.39	0.41	0.12	0.12	3.54	3.67
S7	0.58	0.59	0.18	0.19	0.06	0.06	0.89	0.90	0.36	0.37	0.12	0.12	3.35	3.47
S8	0.57	0.59	0.18	0.18	0.06	0.06	0.89	0.89	0.35	0.36	0.12	0.12	3.40	3.52
S9	0.54	0.55	0.19	0.19	0.06	0.06	0.83	0.83	0.39	0.41	0.12	0.12	3.40	3.53
S10	0.77	0.78	0.21	0.22	0.06	0.07	0.95	0.96	0.42	0.43	0.14	0.14	3.78	3.92
S11	0.57	0.58	0.19	0.19	0.05	0.06	0.76	0.76	0.37	0.39	0.11	0.11	3.18	3.29
S12	0.10	0.10	0.14	0.14	0.05	0.05	0.61	0.61	0.27	0.28	0.05	0.05	1.58	1.63
S13	0.46	0.47	0.16	0.16	0.05	0.06	0.69	0.70	0.29	0.31	0.10	0.10	2.77	2.87
S14	0.61	0.62	0.20	0.20	0.06	0.07	0.97	0.97	0.38	0.40	0.13	0.13	3.62	3.75
S15	0.43	0.44	0.20	0.20	0.07	0.08	0.60	0.61	0.39	0.41	0.07	0.07	2.77	2.87
S16	0.31	0.32	0.17	0.17	0.06	0.07	0.84	0.84	0.39	0.40	0.13	0.13	2.76	2.86
S17	0.43	0.44	0.16	0.16	0.05	0.06	0.70	0.70	0.32	0.34	0.10	0.10	3.33	3.45
S18	0.38	0.38	0.18	0.18	0.07	0.07	0.54	0.54	0.35	0.36	0.07	0.07	2.55	2.64
S19	0.10	0.10	0.13	0.14	0.04	0.05	0.56	0.56	0.24	0.25	0.05	0.05	1.50	1.56
S20	0.10	0.10	0.20	0.20	0.07	0.08	0.61	0.61	0.39	0.41	0.07	0.08	2.71	2.81

骨脂、桃仁和黄芪等多味药材制成。通过对肺气肿片制备药材进行文献检索, 预筛选了各药材的有效性指标成分。经测定发现野马追中野马追内酯 B、绿原酸, 淫羊藿中的淫羊藿苷, 丹参中的丹参酮

II A、丹酚酸 B, 红花中的槲皮素、咖啡酸, 补骨脂中的补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂酚, 桃仁中的苦杏仁苷, 黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷在同一色谱条件下均有较强响应

且分离度良好, 该 14 个成分能满足 QAMS 的检测分析, 可全面较好地实现肺气肿片的质量控制。

3.2 色谱条件选择

本试验对流动相(甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸)、柱温(20、25、30、35、40℃)进行考察。结果, 在柱温 30℃、流动相乙腈-0.1%磷酸的色谱条件下梯度洗脱时, 各色谱峰与相邻峰分离较好, 而且基线平稳。

3.3 检测波长选择

本试验参考文献^[8-13], 采用二极管阵列检测器, 在 190~760 nm 波长范围内进行全波长扫描。对不同检测波长下色谱峰的数目、分离度和峰面积进行考察。最终, 选择双波长检测, 在 210 nm 波长下测定苦杏仁苷、咖啡酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷, 在 246 nm 波长下测定绿原酸、补骨脂苷、异补骨脂苷、丹酚酸 B、槲皮素、补骨脂素、异补骨脂素、野马追内酯 B、丹参酮 II A、补骨脂酚, 此时各成分色谱峰响应好, 相邻色谱峰之间分离度高, 干扰较少。

3.4 内标选择

通过对比肺气肿片中 14 种化学成分的特性, 发现补骨脂素化学性质稳定、无毒、对照品廉价易得, 来源可靠; 且补骨脂素在肺气肿片中含量高, 色谱峰峰形好, 与相邻色谱峰分离度高, 故选择其作为内标。

3.5 供试品溶液制备方法选择

本试验对提取方法(超声、加热回流、研磨溶解)、提取溶剂(90%甲醇、50%甲醇和纯甲醇)、提取时间(0.2、0.5、1、1.5 和 2 h)进行考察, 确定最佳提取条件为甲醇超声提取 30 min。

4 结论

本试验采用 QAMS 同时测定肺气肿片绿原酸、苦杏仁苷、咖啡酸、补骨脂苷、异补骨脂苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、淫羊藿苷、槲皮素、补骨脂素、异补骨脂素、野马追内酯 B、丹参酮 II A、补骨脂酚的含量, 该方法简便准确,

所得结果与外标法接近, 可为肺气肿片全面科学的质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 甘延平, 白德琴, 刘永梅. 肺气肿片、核酪注射液联合可必特治疗局限性慢性阻塞性肺气肿患者疗效观察[J]. 内科, 2017, 12(4): 537-539.
- [2] 王光杰, 陆文栋, 谈琪云, 等. 猪胎盘脂多糖和肺气肿片治疗慢性支气管炎时血浆环磷酸腺苷的改变[J]. 江苏医药, 1979(10): 24-26.
- [3] 位岩平, 王琦, 姜明章, 等. 肺气肿片质量标准研究[J]. 齐鲁药事, 2008, 27(6): 352-354.
- [4] 罗春华, 管伦兴. HPLC 法测定肺气肿片中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(6): 405-406.
- [5] 王瑜婷, 邝敏, 何荣荣, 等. 一测多评法同时测定艾叶配方颗粒中 6 个酚酸类成分[J]. 中南药学, 2023, 21(2): 497-502.
- [6] 石海培, 严辉, 申美玉, 等. HPLC 指纹图谱与一测多评法相结合的姜炭质量控制方法探索[J]. 中国试验方剂学杂志, 2020, 26(5): 95-100.
- [7] 郭燕, 孙岚萍, 顾志荣, 等. 高效液相色谱指纹图谱结合一测多评法评价扶正救肺颗粒的质量[J]. 中南药学, 2022, 20(10): 2385-2389.
- [8] 黄露, 徐顶巧, 乐世俊, 等. 基于层次分析-熵权法和网络药理学的野马追质量标志物研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5545-5554.
- [9] 王丹妮, 郭佳铭, 柴欣, 等. 基于一测多评法和薄层鉴别的补骨脂质量评价方法研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(15): 4089-4097.
- [10] Su YT, Peng Y, Ren J, et al. Quantitative analysis of *Berberidis Cortex* via quantitative analysis of multicomponents by single marker (QAMS) combined with fingerprint and chemometrics methods[J]. J Anal Methods Chem, 2022, 2022: 8042631.
- [11] 周晓洁, 姚辛敏, 周妍妍. 淫羊藿的药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(11): 112-115.
- [12] 马晓晶, 杨健, 马桂荣, 等. 中药丹参的现代化研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5131-5139.
- [13] 马艳春, 胡建辉, 吴文轩, 等. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(4): 92-95.

(收稿日期: 2023-06-15; 修回日期: 2023-08-14)

气相色谱法测定不同产地艾叶中 9 种挥发性成分含量

张文静, 李海燕, 王晓伟, 王海波*, 李桂本, 李向阳, 耿怡玮 (河南省药品医疗器械检验院 (河南省疫苗批签中心) 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室, 郑州 450008)

摘要: 目的 建立艾叶中 9 种挥发性成分的含量测定方法, 比较不同产地艾叶挥发性成分的差异。方法 采用水蒸气蒸馏法提取艾叶挥发性成分, 色谱柱为 HP-5 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 程序升温: 初始温度为 60℃, 先以 3℃·min⁻¹ 的速率升温至 120℃, 再以 15℃·min⁻¹ 的速率升温至 250℃, 载气流速为 1 mL·min⁻¹。结果 α-蒎烯、桉油精、侧柏酮、樟脑、龙脑、4-萜品醇、α-萜品醇、反式石竹烯、氧化石竹烯在各自的质量浓度范围内与测定值线性关系良好, 平均加样回收率均在 90.8%~98.2%。聚类分析中 20 批艾叶样品分为 2 类, 不同类别艾叶主要差异成分为樟脑、龙脑、反式石竹烯、侧柏酮。结论 该方法操作便捷、重复性好, 可用于艾叶挥发性成分的质量评价。

关键词: 艾叶; 气相色谱法; 挥发性成分; 含量测定; 聚类分析; 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)12-3305-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.032

Determination of 9 volatile components in artemisia argyi from different habitats by gas chromatography

ZHANG Wen-jing, LI Hai-yan, WANG Xiao-wei, WANG Hai-bo*, LI Gui-ben, LI Xiang-yang, GENG Yi-wei (Henan Institute for Drug and Medical Device Inspection (Henan Vaccine Issuance Center), NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography (GC) method to determine the content of 9 volatile components in artemisia argyi, to compare the volatile components of artemisia argyi from different origins. **Methods** The volatile oil of artemisia argyi was extracted by steam distillation. GC was performed on HP-5 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm) chromatographic column. The column temperature was set as follows: initial temperature strated at 60℃, increased to 120℃ at the rate of 3℃·min⁻¹, and then to 250℃ at 15℃·min⁻¹. The flow rate of carrier gas was 1 mL·min⁻¹. **Results** Eucalyptus essence, α-pinene, platycladone, camphor, borneol, 4-terpineol, α-terpineol, trans caryophyllene and oxidized caryophyllene had good linearity in the range of mass concentration, and the average recoveries ranged 90.8%~98.2%. Cluster analysis showed that 20 batches of artemisia argyi were belonged to 2 categories. The partial least squares discriminant analysis showed that the differences in the compositions of artemisia argyi were mainly caused by platycladone, camphor, trans caryophyllene and platycladone. **Conclusion** The method is convenient and accurate, and can be used for the quality evaluation of volatile components in artemisia argyi.

Key words: artemisia argyi; gas chromatography; volatile component; content determination; cluster analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl.et Vant. 的干燥叶, 在我国使用历史悠久。艾叶药 用始载于《名医别录》, 其后历代本草均有记载。现行标准为《中国药典》2020 年版: 艾叶辛、苦、

基金项目: 中国药品监管科学行动计划第二批重点项目 (No.NMPAJGKX-2023-030); 河南省科技厅科技攻关项目 (No.222102310110)。
作者简介: 张文静, 女, 主管药师, 主要从事中药质量评价研究, email: 878348987@qq.com *通信作者: 王海波, 男, 主任药师, 主要从事中药质量评价研究, email: haibowang99@163.com

温, 有小毒, 具有温经止血、散寒止痛的功效, 主要用于吐血、衄血、崩漏、经寒不调、宫冷不孕等^[1]。艾叶具有特殊的清香气味, 其中含有大量挥发性成分, 研究表明, 艾叶挥发性成分具有平喘、镇咳、祛痰、抗过敏、抗炎活血、抗病毒等药理作用^[2-3]。

艾叶主产于湖北、河南、河北、安徽等地, 受气候、土壤等环境因素及品种差异的影响, 不同产地艾叶挥发性成分有一定差异^[4-5]。艾叶挥发性成分主要包括单萜及其衍生物、倍半萜及其衍生物^[2], 其中桉油精具有抑菌、抗炎的药理作用^[6], 龙脑具有开窍醒神、消肿止痛、抗菌的功效^[7], α -蒎烯有抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用^[8], 萜品醇类成分和石竹烯类成分与艾叶平喘作用密切相关^[9], 樟脑有兴奋、强心、消炎、镇痛、抗菌、止咳等药理作用, 但对卵巢、睾丸、神经、肝脏、心脏、胎儿、孕妇有明显毒性^[10], 侧柏酮具有一定的神经毒性, 也是苦艾酒中致幻的主要成分, 推测可能是引起痉挛、惊厥等毒副作用的成分之一^[11-12]。关于不同产地艾叶挥发性成分的差异, 现有研究多对挥发性成分种类及相对含量进行初步评价^[13-14], 建立的含量测定方法较少^[15]。因此, 本研究建立气相色谱法测定艾叶中 α -蒎烯、桉油精、侧柏酮、樟脑、龙脑、4-萜品醇、 α -萜品醇、反式石竹烯、氧化石竹烯等9种成分的含量测定, 进一步结合聚类分析、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)^[16-17]对不同产地的艾叶9种成分的差异进行分析, 为艾叶挥发性成分质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

XPE205 电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; 挥发油测定仪(上海那艾实验仪器有限公司); Agilent 7890B 气相色谱仪(美国安捷伦公司)

1.2 试药

α -蒎烯(批号: AF210929-14, 纯度: 98.38%)、侧柏酮(批号: THJ-982234, 纯度: 98.4%)、反式石竹烯(批号: CYH-207225, 纯度: 95.40%)、 α -萜品醇(批号: AL210810-20, 纯度: 98.05%)、氧化石竹烯(批号: CHO-222076, 纯度: 97.40%) (Stanford Analytical Chemicals Inc); 樟脑(批号: 110747-202011, 纯度: 98.8%)、龙脑(批号: 110881-201709, 纯度: 99.6%)、桉油精(批号: 110788-202108, 纯度: 99.4%)、4-萜品醇(批号:

11196-201501, 纯度: 95.4%)(中国食品药品检定研究院); 乙酸乙酯为分析纯, 水为去离子水。

本研究中的20批样品均来自2022年国家样品评价性抽检工作, 经河南省药品医疗器械检验院雷留成主任鉴定为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl.et Vant. 的干燥叶。其中 S1~S5 产地为河北, S6~S10 产地为安徽, S11~S15 产地为河南, S16~S20 产地为湖北。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 参照《中国药典》2020年版一部, 取艾叶适量, 剪碎成约0.5 cm的碎片, 取约2.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加水300 mL, 连接挥发油测定器。自测定器上端加水使充满刻度部分, 并溢流入烧瓶为止, 再加乙酸乙酯2.5 mL, 连接回流冷凝管。加热至沸腾, 再加热5 h, 放冷, 分取乙酸乙酯液, 置10 mL量瓶中, 用乙酸乙酯分次洗涤测定器及冷凝管, 转入同一量瓶中, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取各对照品适量, 精密称定, 加乙酸乙酯制成每1 mL约含 α -蒎烯37 μ g、桉油精766 μ g、侧柏酮1858 μ g、樟脑3374 μ g、龙脑291 μ g、4-萜品醇203 μ g、 α -萜品醇210 μ g、反式石竹烯166 μ g、氧化石竹烯156 μ g的混合对照品溶液, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent HP-5 19091J (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m); 柱温为程序升温, 初始温度60 $^{\circ}$ C, 先以3 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹的速率升温至120 $^{\circ}$ C, 再以15 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹的速率升温至250 $^{\circ}$ C; 流速为1 mL \cdot min⁻¹。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量, 加乙酸乙酯进行梯度稀释, 分别精密吸取各溶液1 μ L, 注入气相色谱仪, 进行测定, 色谱图见图1。以各成分质量浓度为横坐标(X)、以峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 结果见表1, 各成分在浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 取艾叶(S1)适量, 剪碎成约0.5 cm的碎片, 取约2.5 g, 精密称定, 按照“2.1.1”项下方法制备, 连续进样6次, 记录色谱峰面积。9种成分峰面积的RSD均 \leq 0.44%, 表明仪器精密度良好。

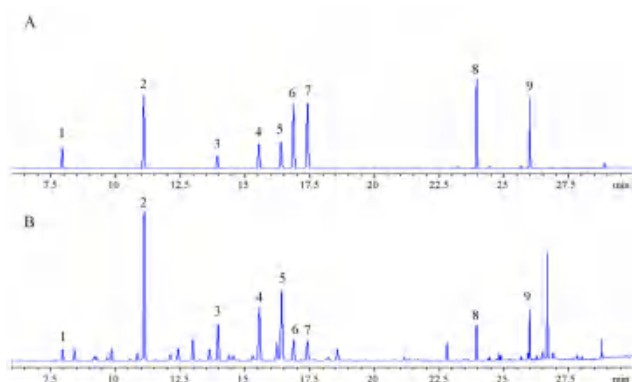


图 1 混合对照品 (A) 和艾叶 (B) 气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms of mixed reference substances (A) and artemisia argyi (B)

1. α -蒎烯 (apinene); 2. 桉油精 (eucalyptol); 3. 侧柏酮 (thujone); 4. 樟脑 (camphor); 5. 龙脑 (borneol); 6. 4-萜品醇 (4-terpenol); 7. α -萜品醇 (α -terpenol); 8. 反式石竹烯 (trans-caryophyllene); 9. 氧化石竹烯 (caryophyllene oxide)

表 1 艾叶中 9 种成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of 9 components in artemisia argyi

化合物	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
α -蒎烯	$Y = 3.156X + 0.75$	0.9999	0.3747 ~ 37.47
桉油精	$Y = 2.850X + 6.48$	0.9999	38.30 ~ 766.0
侧柏酮	$Y = 2.560X - 2.16$	0.9998	0.3712 ~ 1858
樟脑	$Y = 2.743X - 0.66$	0.9998	0.6695 ~ 3374
龙脑	$Y = 2.861X - 2.04$	0.9998	14.55 ~ 291.0
4-萜品醇	$Y = 2.402X - 0.92$	0.9999	2.037 ~ 203.7
α -萜品醇	$Y = 2.471X - 1.02$	0.9999	2.098 ~ 209.8
反式石竹烯	$Y = 2.107X - 0.92$	0.9998	1.656 ~ 165.6
氧化石竹烯	$Y = 2.323X - 1.55$	0.9998	1.555 ~ 155.5

2.3.3 重复性试验 取艾叶 (S1) 适量, 剪碎成约 0.5 cm 的碎片, 取约 2.5 g, 精密称定, 按照“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 结果 9 种成分含量的 *RSD* 均 $\leq 1.5\%$, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取艾叶 (S1) 适量, 剪碎成约 0.5 cm 的碎片, 取约 2.5 g, 精密称定, 按照“2.1.1”项下方法制备, 分别于 0、2、4、8、10、12 h 进样分析, 记录色谱峰峰面积, 结果 9 种成分峰面积的 *RSD* 均 $\leq 1.1\%$, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 回收试验 取艾叶 (S1) 适量, 剪碎成约 0.5 cm 的碎片, 取约 1.25 g, 精密称定, 加入 α -蒎烯、桉油精、侧柏酮、樟脑、龙脑、4-萜品醇、 α -萜品醇、反式石竹烯、氧化石竹烯对照品 0.044、0.919、0.028、0.676、0.872、0.348、0.304、0.277、0.156 mg, 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份样品溶液, 进样测定, 记录峰面积并计算各成分回收

率。结果 α -蒎烯、桉油精、侧柏酮、樟脑、龙脑、4-萜品醇、 α -萜品醇、反式石竹烯、氧化石竹烯回收率分别为 90.8%、97.2%、91.4%、98.3%、95.7%、98.2%、97.9%、95.0%、97.1%, *RSD* 分别为 1.7%、0.48%、2.0%、1.8%、1.8%、0.40%、1.4%、2.0%、0.84%, 符合《中国药典》2020 年版规定。

2.4 样品含量测定结果

取艾叶饮片样品, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 4 个产地艾叶中 9 种成分的含量测定结果柱状图见图 2。9 种成分含量平均值排序为: 桉油精 > 龙脑 > 樟脑 > 4-萜品醇 > α -萜品醇 > 氧化石竹烯 > 反式石竹烯 > 侧柏酮 > α -蒎烯。不同产地艾叶挥发性成分含量差异较大, 河北、安徽、河南地区侧柏酮含量较低, 湖北地区侧柏酮含量较高, 同产地不同批次间样品含量波动较大。

2.5 聚类分析

以 20 批艾叶样品 9 种挥发性成分的含量为变量, 得到 20×9 的数据矩阵, 采用 SPSS 25.0 软件, 进行系统聚类分析。采用组间连接聚类方法, 区间测量选择平方欧氏距离, 聚类分析结果见图 3。当分类间距为 25 时 20 批艾叶可以分为 2 类, 产地为河北的 S1 ~ S5 聚为一类, 其余河南、安徽、湖北的样品 S6 ~ S20 聚为一类。可能是由于河北地区艾叶不含侧柏酮, 樟脑、龙脑含量较高, 反式石竹烯、氧化石竹烯、反式石竹烯含量较低, 与其他 3 个主产区存在明显差别。

2.6 OPLS-DA 分析

基于聚类分类结果, 将 20 批样品分为两类, 采用 SIMCA 14.0 软件对 20 批样品 9 个成分的含量进行有监督模式的 OPLS-DA 分析, 得分散点图见图 4。所建立的 OPLS-DA 模型的拟合参数为: R^2X 0.669 (X 为矩阵结实率参数, 应高于 0.5), R^2Y 0.905 (Y 为模型稳定性参数, 应高于 0.5), Q^2 0.877 (预测能力参数, 应高于 0.5), 说明所建 OPLS-DA 模型稳定性、预测能力均较好。OPLS-DA 模型中的 VIP 值可以进一步反映各成分含量对模型的贡献度, VIP 值 > 1 的成分为樟脑 (VIP 值为 1.42)、龙脑 (VIP 值为 1.31)、反式石竹烯 (VIP 值为 1.10)、侧柏酮 (VIP 值为 1.02), 是引起不同类别艾叶差异的主要成分 (见图 5)。

3 讨论与结论

艾叶挥发性成分的提取方法包括浸提法、水蒸气蒸馏法、超临界萃取法等^[18], 试验前期分别

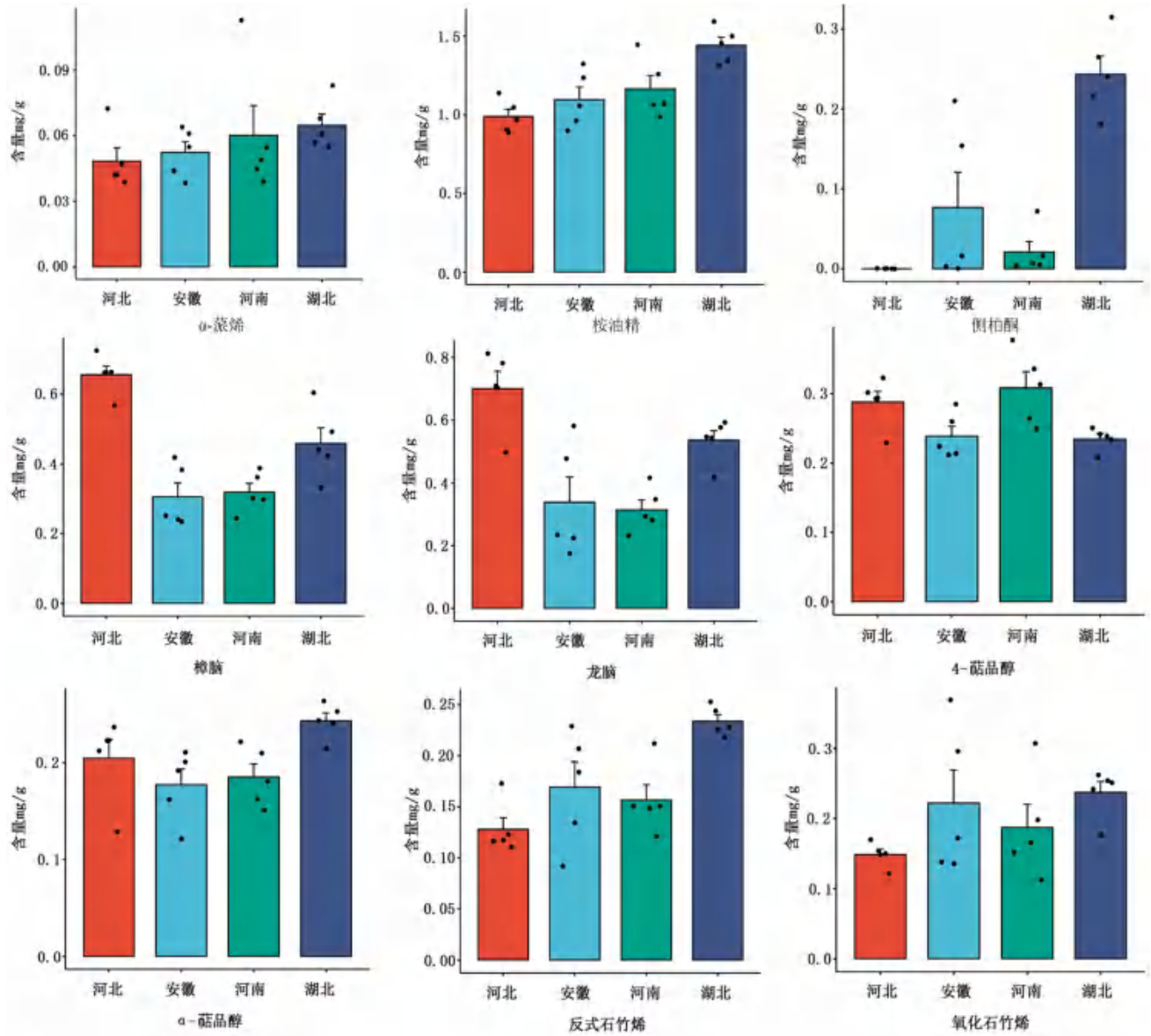


图 2 艾叶中 9 种挥发性成分测定结果
Fig 2 Content of 9 volatile components in artemisia argyi

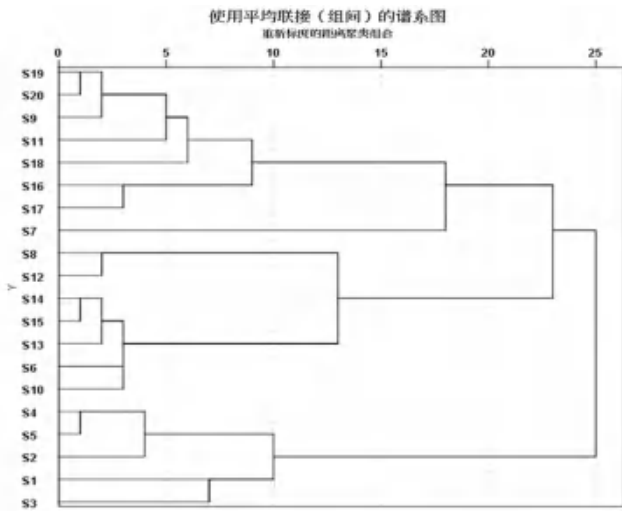


图 3 20 批艾叶聚类分析的树状图
Fig 3 CA dendrogram of 20 samples of artemisia argyi

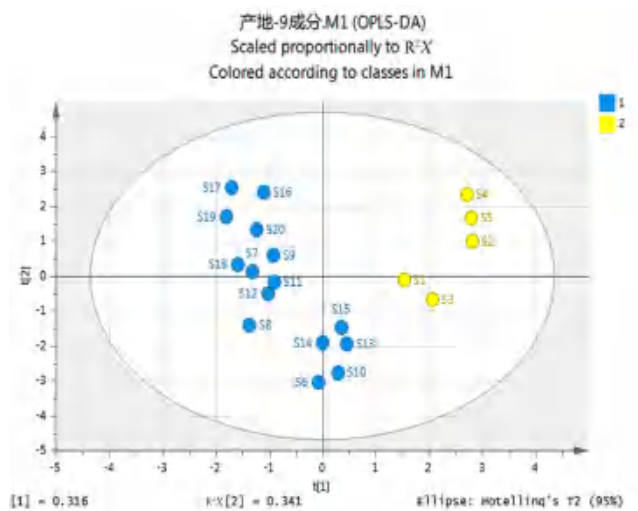


图 4 20 批艾叶 OPLS-DA 分析得分图
Fig 4 OPLS-DA scatter plot of 20 samples of artemisia argyi

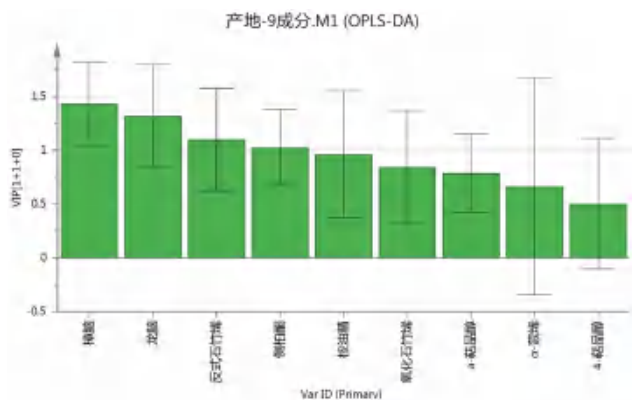


图 5 OPLS-DA 模型中 9 种成分 VIP 值
Fig 5 VIP value of 9 components in OPLS-DA model

采用正己烷回流法、正己烷超声法、水蒸气蒸馏法提取艾叶挥发性成分，结果发现以水蒸气蒸馏法提取效率较高，待测成分峰形较好。有研究比较水蒸气蒸馏法与 CO₂ 超临界萃取法提取艾叶挥发性成分的差异，结果发现水蒸气蒸馏法提取的艾叶挥发性成分以小分子萜类为主，CO₂ 萃取法提取的以长链的蜡质、酯、醇等为主^[19-20]，含量测定结果亦表明前者所得桉油精含量较高^[21]。综上，以小分子单萜、倍半萜类成分为含量测定指标时，采用水蒸气蒸馏法提取效率较高。

本试验建立了 GC 法同时测定艾叶中的 9 种挥发性成分，并结合聚类分析及 OPLS-DA 评价不同产地艾叶挥发性成分的差异。聚类结果表明，不同产地样品分为 2 类：湖北、安徽、河南的样品聚为一类，河北的样品聚为第二类。结合含量测定结果发现第一类样品反式石竹烯、氧化石竹烯、侧柏酮含量较高，第二类样品樟脑、龙脑含量较高。OPLS-DA 发现不同类别样品差异成分主要成分为樟脑、龙脑、反式石竹烯、侧柏酮，提示在艾叶挥发性成分质量评价中应关注上述成分的含量。

本研究采用气相色谱法对艾叶中 9 种挥发性成分 (α -蒎烯、桉油精、侧柏酮、樟脑、龙脑、 α -萜品醇、 α -萜品醇、反式石竹烯、氧化石竹烯) 进行了含量测定，所建立的方法简便、精密度、重复性、准确性良好，可为艾叶的挥发性成分质量评价提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 91.
[2] 兰晓燕, 张元, 朱龙波, 等. 艾叶化学成分、药理作

用及质量研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (17): 4017-4030.
[3] 张雪琳, 陈新旺, 吴毅明. 近 10 年来艾叶挥发油的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (5): 111-118.
[4] 戴卫波, 李拥军, 梅全喜, 等. 12 个不同产地艾叶挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2015, 38 (12): 2502-2506.
[5] 闫婷, 周正繁, 罗苗, 等. 不同产地艾叶挥发油的成分及含量分析[J]. 中药材, 2022, 45 (10): 2425-2431.
[6] 侯明楮, 常聪, 陈林霖, 等. 桉油精的药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (16): 2023-2032.
[7] 高雅, 李友明, 罗燕, 等. 右旋龙脑的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2021, 36 (7): 1537-1540.
[8] 凌旭怡, 林晓静, 黄琳璇, 等. 阳春砂 2 个蒎烯合酶的催化功能和表达模式比较[J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (3): 642-648.
[9] 卞如廉. 艾叶油平喘有效成分的系统药理研究[J]. 中药药理与临床, 1985: 194-195.
[10] 孙蓉, 李素君. 基于功效和物质基础的艾叶毒性研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 35 (1): 86-88.
[11] 张蒙, 于丹, 崔磊, 等. 艾叶挥发油化学成分研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2019, 4 (38): 777-782.
[12] 张元, 康利平, 詹志来, 等. 不同采收时间对艾叶挥发油及其挥发性主成分与毒性成分变化的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18 (3): 410-419.
[13] 肖宇硕, 卢金清, 孟佳敏, 等. 气质联用法对蕪艾及不同产地艾叶中挥发油成分分析比较[J]. 中国药师, 2018, 21 (3): 404-410.
[14] 宋叶, 张云鹏, 戴卫波, 等. 不同产地艾叶挥发油成分的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (4): 845-851.
[15] 李皓翔, 吴梦奇, 周妙霞, 等. GC-MS 测定不同产地艾叶 4 种挥发性成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (10): 2381-2383.
[16] 周丽娟, 杨晓宁, 王雅芝, 等. 基于 HPLC-CAD 指纹图谱结合化学计量学方法分析不同产地北柴胡药材质量[J]. 中南药学, 2022, 20 (10): 2253-2258.
[17] 丁泽贤, 姜悦航, 张越, 等. 基于 ICP-MS 及化学计量学研究不同产地茯苓微量元素的差异[J]. 中南药学, 2021, 19 (10): 2133-2140.
[18] 郑昆, 钟肖飞, 张华. 艾叶挥发油类成分及其药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (18): 224-234.
[19] 刘红杰, 白杨, 洪燕龙, 等. 不同提取方法制备的艾叶挥发油化学成分分析与急性肝毒性比较[J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (11): 1439-1446.
[20] 李杰, 朱丹霞, 余平, 等. 红脚艾和汤阴北艾精油的化学成分及抗菌活性[J]. 精细化工, 2022, 39 (2): 330-336.
[21] 李静, 熊维政, 李磊, 等. 2 种不同方法提取艾叶挥发油的效果比较[J]. 中国药房, 2016, 27 (28): 3981-3983.
(收稿日期: 2023-06-16; 修回日期: 2023-08-29)

香卿止痛喷雾剂指纹图谱建立及指标成分含量测定研究

汤溟, 李金慈, 姜俊翔, 苏华, 高茗* (东部战区总医院药剂科, 南京 210002)

摘要: **目的** 建立香卿止痛喷雾剂 UPLC 指纹图谱和 HPLC 含量测定方法, 结合化学模式识别分析, 为其质量评价提供依据。**方法** 采用 Waters CORTECS T3 色谱柱 (4.6 mm×50 mm, 2.7 μm), 以 0.1% 磷酸水溶液-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 220 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 建立 10 批香卿止痛喷雾剂指纹图谱并计算相似度, 采用 SIMCA 软件进行主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析。采用 Agilent 5 TC-C18 (2) 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 1% 冰醋酸水溶液-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 274 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 建立丹皮酚、槲皮苷含量测定方法。**结果** 建立了香卿止痛喷雾剂的共有模式指纹图谱, 标定 19 个共有峰, 指认了丹皮酚、槲皮苷 2 个成分, 10 批样品相似度均大于 0.99, 化学模式识别分析得到丹皮酚等 3 个质量差异标志物, 含量测定结果显示槲皮苷为 3.932 ~ 4.168 mg·mL⁻¹, 丹皮酚为 1.973 ~ 2.403 mg·mL⁻¹, 批次间差异趋势与化学模式识别分析结果一致。**结论** 所建指纹图谱和含量测定方法简便可靠, 可为香卿止痛喷雾剂的全面质量评价和生产过程质量控制提供参考。

关键词: 香卿止痛喷雾剂; 指纹图谱; 含量测定; 槲皮苷; 丹皮酚

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3310-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.033

Fingerprint establishment and determination of index components in Xiangqing Zhitong spray

TANG Hao, LI Jin-ci, JIANG Jun-xiang, SU Hua, GAO Ming* (Department of Pharmacy, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002)

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprint and HPLC content determination of Xiangqing Zhitong spray, and combine with chemical pattern recognition to provide basis for its quality evaluation. **Methods** The UPLC fingerprint was performed on a Waters CORTECS T3 column (4.6 mm×50 mm, 2.7 μm) with 0.1% phosphoric acid solution-methanol as the mobile phase in a gradient elution mode. The detection wavelength was 220 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 25℃. The fingerprints of 10 batches of Xiangqing Zhitong spray were established and the similarity was evaluated. SIMCA software was used for principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. The index components were determined on an Agilent 5 TC-C18 (2) column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with 1% glacial acetic acid-methanol as the mobile phase in a gradient elution mode. The detection wavelength was 274 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was 25℃. **Results** The common pattern fingerprint of Xiangqing Zhitong spray was established. Totally 19 common peaks were marked, and two components were identified as paeonol and quercetin. The similarity of 10 batches of samples was higher than 0.99. Three quality difference markers, including paeonol, were obtained by chemical pattern recognition. The content of quercetin was 3.932 ~ 4.168 mg·mL⁻¹, and paeonol was 1.973 ~ 2.403 mg·mL⁻¹. The difference between batches was consistent with the results of chemical pattern analysis. **Conclusion** The fingerprint and content determination methods are simple

作者简介: 汤溟, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事中药制剂研究, email: tang_hao0518@sina.com *通信作者: 高茗, 女, 副主任药师, 主要从事医院药学研究, email: njzygaoming@163.com

and reliable, which can provide reference for the overall quality evaluation control of Xiangqing Zhitong spray.

Key words: Xiangqing Zhitong spray; fingerprint; content determination; quercitrin; paeonol

香卿止痛喷雾剂为我院药剂科针对军事训练伤开发的外用中药复方制剂,处方由红茴香、徐长卿、冰片等组成,具有活血化瘀、消肿止痛之功效,主要用于跌打损伤、瘀血肿痛、风湿痹痛等的治疗^[1-2]。目前香卿止痛喷雾剂的质量控制方法仅限于采用 HPLC 对槲皮苷、丹皮酚进行含量测定^[3],质控方法的整体性表征较弱,个别化学成分含量无法反映制剂的整体质量。且对于该制剂生产工艺的稳定性、批次间差异性也未有文献报道。指纹图谱技术作为一种专属性强的、可量化的整体质量控制方法,不仅推动了中药质量标准进步和产业技术革新,而且为安全、有效、稳定、可控的现代中药研制提供了必要的手段,目前在中药质量一致性评价、过程质量控制中起到越来越重要的作用^[4-6]。采用化学计量学方法挖掘指纹图谱的数据信息,可有效提取数据背后的深层次化学信息,进而可寻找不同样品之间的质量差异物^[7]。因此,本研究在参考前期质量控制方法的基础上,建立了香卿止痛喷雾剂的 UPLC 指纹图谱分析方法,对原槲皮苷和丹皮酚含量测定方法进行了改进和完善,并采用化学模式识别方法寻找到不同批次样品间的质量差异物,可为香卿止痛喷雾剂的整体质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪、1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Waters CORTECS T3 色谱柱(4.6 mm×50 mm, 2.7 μm, 沃特世科技有限公司); Agilent 5 TC-C18 (2) 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 安捷伦科技有限公司); AE240 十万分之一电子天平(Mettler Toledo); KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); GM-0.33A 型真空泵、0.22 μm 针头过滤器(天津津腾科技有限公司)。

1.2 试剂

甲醇为色谱纯(西陇科学股份有限公司,批号: B2103011),无水乙醇为分析纯(上海振兴化工一厂,批号: 202011330),冰醋酸(南京化学试剂有限公司,批号: 22083085F);水为自制纯化水。

槲皮苷对照品(纯度: 93.5%,批号: 111538-202007)、丹皮酚对照品(纯度: 99.9%,批号: 110708-201908)(中国食品药品检定研究院); 10 批

香卿止痛喷雾剂(自制,编号 S1~S10,批号分别为 20210306、20210313、20210319、20210326、20210406、20210410、20210414、20210422、20210511、20210516)。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 Agilent 1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪, Waters CORTECS T3 色谱柱(4.6 mm×50 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.1% 磷酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(见表 1); 检测波长 220 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25℃; 进样量 1 μL。

表 1 指纹图谱梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution program for fingerprint

时间/min	流动相 A/%
0	94
8	85
23	75
30	72
37	70
47	48
64	26
72	16

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮苷、丹皮酚对照品,加 75% 乙醇溶解制成质量浓度分别为 0.7160、0.7480 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。分别精密移取上述对照品储备液 4 mL,置 20 mL 量瓶中,用 75% 乙醇定容,即得槲皮苷和丹皮酚的混合对照品溶液,4℃ 储存备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取香卿止痛喷雾剂 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加 75% 乙醇稀释并定容至刻度,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。按处方中药味比例和制备工艺,分别制备缺红茴香、缺徐长卿的阴性样品,同法制备阴性样品溶液。

2.1.4 精密度试验 取 S5 号香卿止痛喷雾剂适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次。以 10 号峰(槲皮苷)为参照峰(S),计算得各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.0010%~0.033%,相对峰面积 RSD 为 0.098%~2.2%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取 S5 号香卿止痛喷雾剂适

量,按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以 10 号色谱峰为参照(S),计算得各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.0010%~0.059%,相对峰面积 RSD 为 0.39%~2.7%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取 S5 号香卿止痛喷雾剂按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后的 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,以 10 号色谱峰为参照(S),计算得各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.0090%~0.078%,相对峰面积 RSD 为 0.20%~2.6%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 指纹图谱的建立及相似度评价 取 S1~S10 共 10 批香卿止痛喷雾剂供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,将 10 批样品分析数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以 S5 号色谱图为参照,时间窗设为 0.1 s,采用中位数法生成对照图谱(R),采用全谱峰匹配建立 10 批样品的指纹图谱共有模式(见图 1),共确定了 19 个共有峰,通过与对照品进行比对,指认了其中 9 号、10 号峰分别为丹皮酚、槲皮苷(见图 2)。分别取缺红茴香、缺徐长卿的阴性样品溶液进样测定,色谱图见图 3,由图中可看出第 2、9、11、12、15、16、19 号峰来源于徐长卿,第 1、2、3、4、5、6、7、8、11、12、13、14、15、16、17、18、19 号峰来源于红茴香,其中 2、11、12、15、16、19 号峰为两种药材共有。S1~S10 样品的相似度分别为 0.996、0.999、0.995、0.994、0.998、0.999、1.00、0.996、0.997、0.999,均大于 0.99,表明香卿止痛喷雾剂的生产工艺较稳定,制剂批次间差异较小。

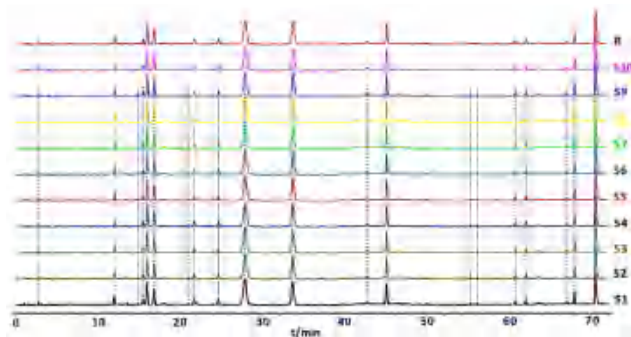


图 1 香卿止痛喷雾剂 UPLC 指纹图谱(S1~S10)及对照图谱(R)
Fig 1 UPLC fingerprints (S1~S10) and control fingerprint (R) of Xiangqing Zhitong spray

2.1.8 化学模式识别分析 以 10 批香卿止痛喷雾剂样品中的 19 个共有峰峰面积作为变量,建立 10*19 阶原始数据矩阵,导入 SMICA 14.1 软件

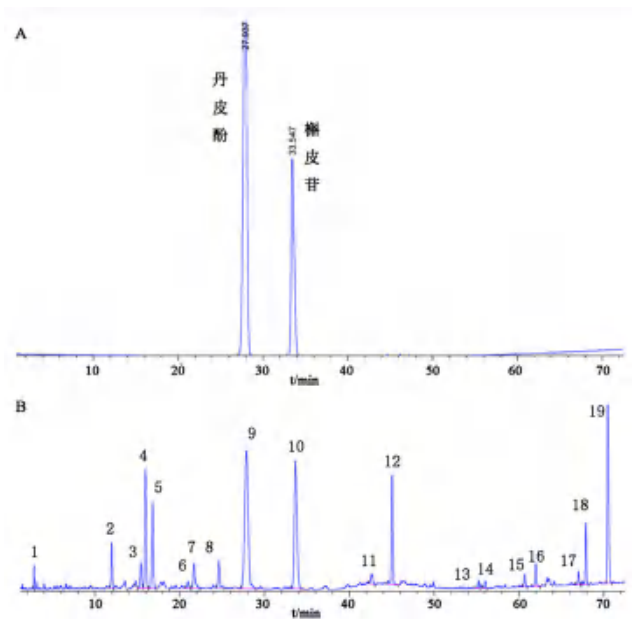


图 2 对照品(A)和香卿止痛喷雾剂供试品(B)的色谱图
Fig 2 UPLC chromatogram of mixed reference substances (A) and Xiangqing Zhitong spray (B)

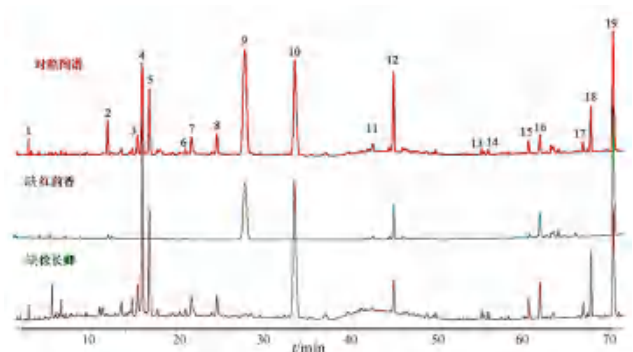


图 3 香卿止痛喷雾剂阴性样品色谱图
Fig 3 UPLC chromatogram of negative sample of Xiangqing Zhitong spray

进行无监督模式的聚类分析建模,拟合选择 3 个主成分,模型拟合参数 $R^2X = 0.921$,模型预测参数 $Q^2 = 0.522$ 。分析结果见图 4,由主成分分析(PCA)得分图可见,不同批次样品之间尚存在一定差异,由 PCA 载荷图可见,峰 9、峰 19 和峰 2 距离原点较远,对样品之间分类起到主要作用。为进一步确认各批次样品之间的显著性差异成分,对 10 批样品进行有监督的正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)建模。在该模型下 X 矩阵解释率 $R^2X = 0.729$,模型稳定性参数 $R^2Y = 0.857$,模型预测参数 $Q^2 = 0.67$,均大于 0.5,表明该模型具有较好的预测能力。由图 5A 可知样品聚类良好,分离显著,在 0.95 置信区间内,由图 5B 可知变量重要性投影值(VIP)大于 1 的色谱峰为峰 9 (VIP = 3.41)、峰 19 (VIP = 1.51)、峰 2 (VIP = 1.22),为各批次样品间具有统计学意义的差异标志物。

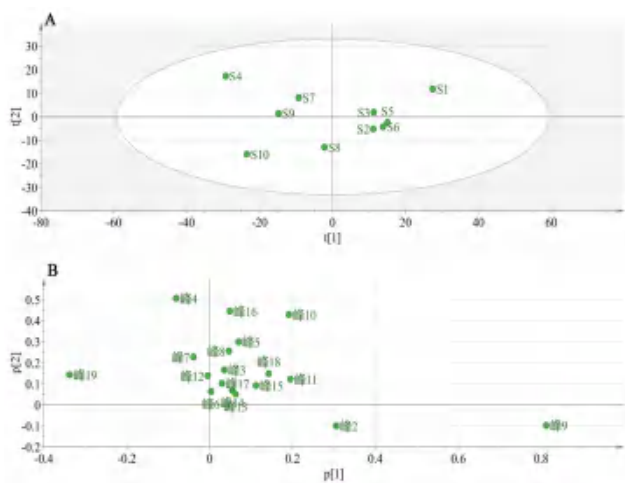


图 4 10 批香卿止痛喷雾剂 PCA 得分图 (A) 和载荷图 (B)
Fig 4 PCA score plot (A) and loading plot (B) of 10 batches of Xiangqing Zhitong spray

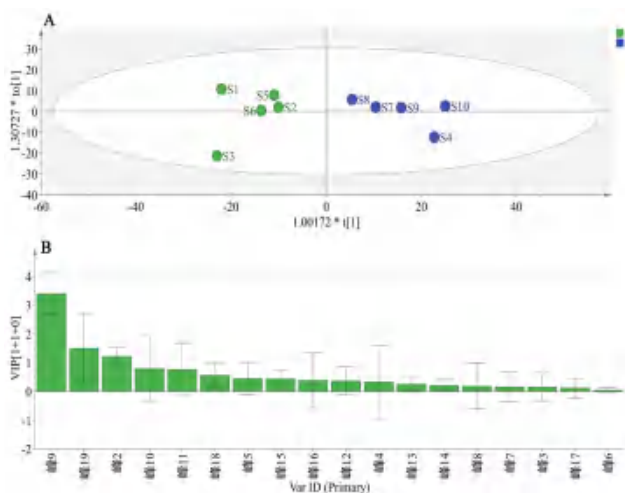


图 5 10 批香卿止痛喷雾剂 OPLS-DA 得分图 (A) 和 VIP 图 (B)
Fig 5 OPLS-DA score plot (A) and VIP plot (B) of 10 batches of Xiangqing Zhitong spray

2.2 指标性成分的含量测定

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪, Agilent 5 TC-C18 (2) 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A)-1% 冰醋酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 44% A; 15~35 min, 44%~60% A); 检测波长 274 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25℃; 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 取槲皮苷、丹皮酚对照品适量, 精密称定, 加 75% 乙醇制成槲皮苷质量浓度为 0.1876 mg·mL⁻¹、丹皮酚质量浓度为 0.1135 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。精密量取各储备液 4 mL 置 20 mL 量瓶中, 75% 乙醇定容至刻度, 即得混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取本品 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 75% 乙醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作

为供试品溶液。另按处方量 1% 的量, 取除红茴香、徐长卿以外的其余辅料按制剂工艺及供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液。

2.2.4 专属性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果见图 6, 丹皮酚在 16.9 min 处出峰, 槲皮苷在 22.3 min 处出峰, 阴性样品无干扰。

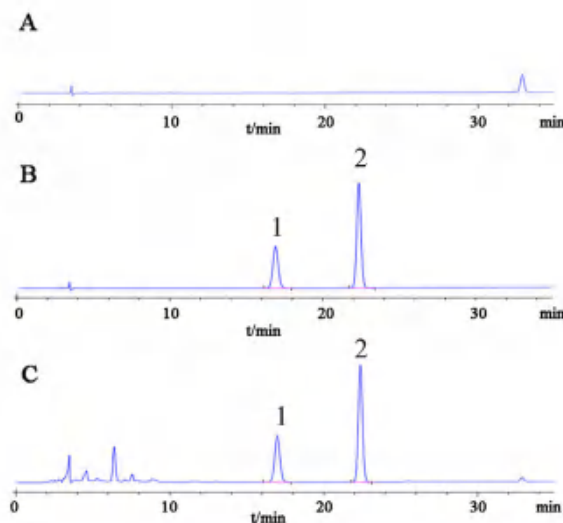


图 6 香卿止痛喷雾剂阴性样品 (A)、混合对照品 (B) 和供试品 (C) HPLC 图

图 6 HPLC chromatogram of negative sample (A), mixed reference substance (B), and Xiangqing Zhitong spray (C)

1. 丹皮酚 (paeonol); 2. 槲皮苷 (quercetin)

2.2.5 线性关系考察 精密吸取上述对照品储备液 0.5、1、2、4、8、10 mL 分别置 20 mL 量瓶中, 75% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 制成系列浓度的混合对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积 (y) 为纵坐标, 对照品溶液质量浓度 (x) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得槲皮苷的回归方程为 $y = 14.44x + 4.956$ ($r = 0.9999$); 丹皮酚的回归方程为 $y = 48.60x + 4.426$ ($r = 0.9998$)。结果表明, 槲皮苷与丹皮酚分别在 4.69~93.8 μg·mL⁻¹ 和 2.84~56.75 μg·mL⁻¹ 内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 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测定 6 次, 记录峰面积, 计算得丹皮酚与槲皮苷 RSD 分别为 0.067% 和 0.066%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取 S5 号香卿止痛喷雾剂, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果得丹皮酚的含量平均值为 2.428 mg·mL⁻¹, RSD 为 0.37%; 槲皮苷的含量平均值为 3.966 mg·mL⁻¹, RSD 为 0.46%, 表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取 S5 号同一供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、6、8、12 h 进样测定, 记录峰面积, 丹皮酚与槲皮苷的 *RSD* 分别为 0.33% 和 0.46%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收试验 精密吸取 S5 号香卿止痛喷雾剂 0.5 mL 置 100 mL 量瓶, 共取 9 份, 3 份一组, 每组分别加入低、中、高浓度对照品溶液, 75% 乙醇定容至刻度, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得丹皮酚的平均加样回收率为 102.38%, *RSD* 为 1.4%; 槲

皮苷的平均加样回收率为 103.01%, *RSD* 为 0.93%。

2.2.10 耐用性试验 取 S5 号香卿止痛喷雾剂按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别在不同流速 (0.9、1.0、1.1 mL · min⁻¹)、不同柱温 (23、25、27 °C)、不同检测波长 (272、274、276 nm)、不同冰醋酸浓度 (0.9%、1.0%、1.1%) 条件下, 进样测定, 记录峰面积, 分别计算丹皮酚和槲皮苷的含量, 结果见表 2, 表明该方法耐用性良好。

表 2 香卿止痛喷雾剂含量测定方法耐用性试验结果

Tab 2 Durability test for content determination of Xiangqing Zhitong spray

耐用性变化参数		丹皮酚			槲皮苷		
		含量 / (mg · mL ⁻¹)	平均值 / (mg · mL ⁻¹)	<i>RSD</i> / %	含量 / (mg · mL ⁻¹)	平均值 / (mg · mL ⁻¹)	<i>RSD</i> / %
流速	0.9 mL · min ⁻¹	2.542	2.541	0.44	3.959	3.965	0.37
	1.0 mL · min ⁻¹	2.535			3.957		
	1.1 mL · min ⁻¹	2.546			3.979		
柱温	23 °C	2.574	2.574	0.081	4.007	3.935	2.1
	25 °C	2.574			3.959		
	27 °C	2.574			3.841		
波长	272 nm	2.580	2.579	0.18	3.975	3.975	0.063
	274 nm	2.581			3.977		
	276 nm	2.577			3.975		
冰醋酸浓度	0.9%	2.529	2.545	0.97	3.972	3.967	0.22
	1.0%	2.574			3.959		
	1.1%	2.532			3.971		

2.2.11 样品含量测定 取 S1 ~ S10 号香卿止痛喷雾剂, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定丹皮酚和槲皮苷的含量, 结果见表 3。槲皮苷在不同批次间含量基本一致, 而丹皮酚指标含量变化稍大, 与指纹图谱 OPLS-DA 结果互相印证。

表 3 10 批香卿止痛喷雾剂中槲皮苷与丹皮酚的含量测定结果 (n = 2)

Tab 3 Content of paeonol and quercitrin in Xiangqing Zhitong spray (n = 2)

编号	丹皮酚 / (mg · mL ⁻¹)	槲皮苷 / (mg · mL ⁻¹)
S1	2.403	4.168
S2	2.300	4.096
S3	2.403	4.081
S4	1.973	4.083
S5	2.317	4.092
S6	2.359	4.069
S7	2.109	4.090
S8	2.198	4.027
S9	2.082	4.082
S10	2.045	3.932
平均值	2.22	4.07
<i>RSD</i> / %	7.14	1.47

3 讨论

中药是以多成分相互协调发挥药理作用的复杂整体, 中药及制剂有其特定的药效成分群或质量标志物, 建立指纹图谱是为获取与药效、质量相关的物质成分群的特征, 因此指纹图谱构建过程中样品预处理应以获得尽量多的指纹特征为前提^[4]。香卿止痛喷雾剂是将红茴香和徐长卿两味中药经 75% 乙醇溶液进行浸渍、渗漉、浓缩等一系列工艺提取制备, 并加入冰片、月桂氮草酮等经皮促渗剂而开发出的外用喷雾剂。制剂生产过程即为药材中化学成分的提纯过程, 因此试验中样品预处理选择了 75% 乙醇溶液直接稀释, 试验过程中比较了直接稀释和稀释后超声两种方法, 结果发现两者无明显区别, 因此保留了简便省时的直接稀释法。

红茴香药材中主要含有黄酮类成分, 已有文献报道其指纹图谱在 222 nm 处响应较多且较稳定^[8], 但紫外扫描发现槲皮苷在 256 nm 处有最大吸收。徐长卿中化学成分以挥发油类、C₂₁ 甙体类和多糖为主, 其中丹皮酚占挥发油成分的 90%^[9], 已有文献报道其指纹图谱在 220 nm 检测波长下色谱峰较多^[10], 但紫外扫描发现丹皮酚在 274 nm 处有最大吸收。因此, 本研究比较了 220、

260、280 nm 处香卿止痛喷雾剂指纹图谱的出峰情况,结果显示 220 nm 波长下色谱信息最丰富。试验考察了甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液、甲醇-1%冰醋酸溶液、乙腈-1%冰醋酸溶液 4 种流动相体系的分离效果,并筛选了 0.8、1.0、1.2 mL·min⁻¹ 不同流速的分析效果,结果显示在 1.0 mL·min⁻¹ 的流速下以甲醇-0.1%磷酸溶液进行梯度洗脱,所获得的指纹图谱基线更平稳、色谱峰分离度更佳、峰形更好。

槲皮苷是地方炮制规范中红茴香的质量评价成分^[11],丹皮酚是药典中徐长卿的质量评价成分^[12],两者均有镇痛、抗炎、抗氧化等功效^[13-14],因此本研究选择槲皮苷、丹皮酚作为含量测定指标性成分。本研究中 HPLC 含量测定方法是在原方法基础上进行的改进,原方法仪器设备过于陈旧,在方法转移过程中存在峰形较差、分离度不高等问题,因此本研究针对当前药检仪器水平和要求进行了改进和完善,并增加耐用性考察,以确保条件发生微小变化时方法也可靠。

10 批香卿止痛喷雾剂指纹图谱相似度均大于 0.99,说明不同批次制剂之间化学信息轮廓基本一致,批次间质量具有一定的稳定性,但进一步的 PCA 和 OPLS-DA 化学模式识别挖掘出不同样品之间存在微小差异,差异标志物为 9 号峰、19 号峰和 2 号峰,其中 9 号峰是丹皮酚,含量测定结果也显示此成分含量 RSD 为 7.1%,波动范围较大,进一步印证了模式分析结果。2 号峰、19 号峰为红茴香和徐长卿中共有的成分,其中 2 号峰在药材中含量均较低,但在制剂中含量较高,可能是生产过程中发生了某些化学成分变化所导致,具体还需后续进行过程质量研究,并借助质谱等仪器进行深入研究。

丹皮酚为小分子酚类化合物,熔点为 52℃,性质不稳定,见光易分解,且极易挥发,在 40℃ 时即有挥发的现象,在处理和贮存过程中均应避免高温、强光的环境^[15-16]。香卿止痛喷雾剂生产过程主要包括渗漉、浓缩等步骤,渗漉工艺设备简单,操作容易,有利于充分提取热不稳定成分^[17],但浓缩工艺影响因素较多,如加热时间、温度、受热均匀性等^[18],可能直接影响到制剂的质量均一性。因此,后期应增进制药过程理解,以指纹图谱及含量测定为基础,探索过程建模技术,寻找影响工艺的关键参数,以期实现精准质量控制,提升制剂质量的均一稳定性。

综上,本研究首次建立了香卿止痛喷雾剂的指纹图谱,提升了现有质量控制方法,并筛选出

丹皮酚等 3 个影响制剂质量的潜在差异标志物,为香卿止痛喷雾剂的全面质量控制和生产过程质量控制提供了可靠依据。

参考文献

- [1] Wang SD, Li T, Qu W, et al. The effects of Xiangqing anodyne spray on treating acute soft-tissue injury mainly depend on suppressing activations of AKT and p38 pathways [J]. Evid-based Compl Alt, 2016, 2016: 9213489.
- [2] 武涛,刘文雅,王争,等.香卿止痛喷雾剂镇痛抗炎作用的药效学研究[J].医学研究生学报,2015,28(6):637-641.
- [3] 王曙东,王争,刘文雅,等.高效液相色谱法测定香卿止痛喷雾剂中槲皮苷和丹皮酚含量[J].中国药业,2014,23(2):44-45.
- [4] 鄢海燕,邹纯才.《中国药典》(2010年版~2020年版)中药指纹(特征)图谱应用进展与展望[J].南方医科大学学报,2022,42(1):150-155.
- [5] 赵娟,谢世静,赵兴华,等.中药指纹图谱质控方法研究进展[J].云南中医中药杂志,2020,41(1):82-86.
- [6] 王雅琪,焦姣姣,伍振峰,等.基于“整体观”的中药制剂质量过程控制体系探讨[J].中国中药杂志,2018,43(1):197-203.
- [7] 孙立丽,王萌,任晓亮.化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J].中草药,2017,48(20):4339-4345.
- [8] 郑成.红茴香及红茴香注射液指纹图谱的研究[D].杭州:浙江大学,2010.
- [9] 李葆林,杨梦婷,支雅婧,等.徐长卿化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2021,52(12):3725-3735.
- [10] 刘训红,陈斌,蔡宝昌.徐长卿 HPLC 指纹图谱的初步研究[J].现代中药研究与实践,2005,19(3):29-30.
- [11] 浙江省食品药品监督管理局.浙江省中药炮制规范 2015 年版[S].2015:297.
- [12] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:298.
- [13] Chen JR, Li GM, Sun C, et al. Chemistry, pharmacokinetics, pharmacological activities, and toxicity of quercitrin [J]. Phytother Res, 2022, 36(4): 1545-1575.
- [14] Zhang L, Li DC, Liu LF. Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 413-421.
- [15] 蔡雅琴.“丹皮酚-薄荷脑”低共熔物纳米乳凝胶的制备与评价[D].银川:宁夏医科大学,2017.
- [16] 金明杨,李雪娇,董建伟,等.徐长卿中丹皮酚的快速提取和 HPLC 含量检测[J].海峡药学,2021,33(1):40-42.
- [17] 王婉莹,瞿海斌,龚行楚.中药渗漉提取工艺研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(5):1039-1046.
- [18] 李舒艺,伍振峰,岳鹏飞,等.中药提取液浓缩工艺和设备现状及问题分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2016,18(10):1782-1787.

(收稿日期:2023-02-03;修回日期:2023-04-05)

牛黄益金片 GC 特征图谱研究及 4 种挥发性成分的含量测定

朱伟堃¹, 王静¹, 周春峰¹, 周欣¹, 林永强^{2*}, 赵彤彤^{1, 3*} (1. 菏泽市食品药品检验检测研究院, 山东 菏泽 274000; 2. 山东省食品药品检验研究院/山东省中药标准创新与质量评价工程实验室, 济南 250101; 3. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

摘要: **目的** 建立牛黄益金片的气相色谱 (GC) 特征图谱, 并同时测定柠檬烯、桉油精、(一)-薄荷酮、薄荷脑 4 种成分的含量。 **方法** 采用 GC 分析方法, Agilent DB-FFAP 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 火焰离子化检测器 (FID), 进样口温度 250 °C, 检测器温度 250 °C。载气为氮气, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。柱温为程序升温: 初始温度 60 °C, 保持 4 min, 以 1.5 °C·min⁻¹ 的速率升温至 130 °C¹, 再以 20 °C·min⁻¹ 的速率升温至 200 °C; 进样量为 2 μL, 分流比为 2:1。应用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版) 对 3 家企业的 15 批次牛黄益金片特征图谱的相似度进行分析, 同时对 4 种成分的含量进行测定和分析。 **结果** 15 批样品色谱图与对照特征图谱相似度均在 0.99 以上, 特征图谱共有 7 个特征峰, 指认了其中 4 个共有峰。15 批样品中柠檬烯、桉油精、(一)-薄荷酮、薄荷脑的质量浓度分别在 0.1246~6.232 μg·mL⁻¹ ($R^2 = 0.9994$)、0.1893~1.893 μg·mL⁻¹ ($R^2 = 0.9994$)、1.384~276.8 μg·mL⁻¹ ($R^2 = 0.9999$)、67.76~677.6 μg·mL⁻¹ ($R^2 = 0.9999$) 与峰面积线性关系良好, 平均回收率 ($n = 6$) 及 RSD 分别为 91.61% (1.5%)、91.25% (1.5%)、96.05% (1.5%)、99.21% (1.1%)。 **结论** 建立的 GC 特征图谱结合 4 种成分的含量测定方法, 能较全面地反映牛黄益金片中挥发性成分的质量, 可用于牛黄益金片中挥发性成分的质量控制。

关键词: 牛黄益金片; 挥发性成分; 特征图谱; 气相色谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3316-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.034

GC characteristic chromatogram and content determination of 4 volatile components of Niu Huang Yi Jin tablets

ZHU Wei-kun¹, WANG Jing¹, ZHOU Chun-feng¹, ZHOU Xin¹, LIN Yong-qiang^{2*}, ZHAO Dantong^{1, 3*} (1. Heze Institute for Food and Drug Control, Heze Shandong 274000; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Jinan 250101; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography (GC) characteristic chromatogram of Niu Huang Yi Jin tablets and simultaneously determine the content of its 4 components, namely, limonene, eucalyptol, (一)-menthone, and menthol. **Methods** GC analysis was performed on an Agilent DB-FFAP capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with a flame ionization detector (FID). The injector temperature was 250 °C, and the detector temperature was maintained at 250 °C. Nitrogen gas was used as the carrier gas at 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was programmed as follows: initial temperature of 60 °C held for 4 min, then ramped to 130 °C at a rate of 1.5 °C·min⁻¹, and finally increased to 200 °C at a rate of 20 °C·min⁻¹. The injection volume was 2 μL, and the

基金项目: 2022 年山东省药品质量风险监测项目; 山东省重点研发计划 (No.2021CXGC010511); 山东省人文社会科学课题 (No.2021-YYGL-44); 菏泽市社会科学规划课题 (No.2022-135)。

作者简介: 朱伟堃, 女, 主管中药师, 主要从事中药质量控制研究, email: 450836450@qq.com *通信作者: 林永强, 男, 主任药师, 主要从事药品质量评价与标准研究, email: 13864067104@163.com; 赵彤彤, 女, 主任药师, 主要从事中药质量控制与研究, email: dantongzhao2020@163.com

split ratio was 2 : 1. The Chinese herbal medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation software (2012 edition) was used to analyze the similarity of the characteristic chromatograms of Niu Huang Yijin tablets from 3 different companies, based on a total of 15 batches. Simultaneously, the content of the 4 components was determined and analyzed. **Results** The similarities of chromatographic and reference characteristic chromatograms of 15 batches of samples were above 0.99. Totally 7 characteristic peaks, among which 4 common peaks were identified. The quantitative analysis of the 4 components in the 15 batches of samples revealed the mass concentrations of limonene, eucalyptol, (-)-menthone, and menthol within $0.1246 \sim 6.232 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($R^2 = 0.9994$), $0.1893 \sim 1.893 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($R^2 = 0.9994$), $1.384 \sim 276.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($R^2 = 0.9999$), and $67.76 \sim 677.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($R^2 = 0.9999$), respectively. The linear relationships showed good correlation coefficients. The average recovery and RSD were 91.61% (1.5%) for limonene, 91.25% (1.5%) for eucalyptol, 96.05% (1.5%) for (-)-menthone, and 99.21% (1.1%) for menthol ($n = 6$). **Conclusion** The GC characteristic chromatogram and content determination of 4 components can provide a comprehensive reflection of the quality of volatile components in Niu Huang Yijin tablets, which is suitable for the quality control of volatile components in Niu Huang Yijin tablets.

Key words: Niu Huang Yijin tablet; volatile; characteristic chromatogram; GC; content determination

牛黄益金片处方由黄柏、硼砂、玄明粉、人工牛黄、薄荷脑、薄荷素油组成^[1-3], 具清热利咽、消肿止痛之功效, 临床常用于急、慢性咽喉的治疗^[4]。处方中薄荷脑和薄荷素油为制剂的挥发性成分, 分别以原粉和喷洒方式入药, 两者是制剂清热利咽、消肿止痛的重要物质基础。经查询, 牛黄益金片为口服中药含片, 全国共 3 家生产企业, 涉及 3 个法定质量标准^[1-3], 生产工艺基本相同, 制剂规格均为 0.5 g/片, 但样品处方量存在差异, 其中一家企业样品处方量为其余企业的一半。3 个法定质量标准中对于挥发性成分均仅以薄荷脑为指标进行定性薄层鉴别, 目前尚无牛黄益金片中挥发性成分的整体性研究报道, 因此制剂中薄荷脑和薄荷素油的内在质量无法有效控制。本研究在参考相关文献的基础上^[5-8], 收集了 3 家生产企业的 15 批次牛黄益金片, 进行了挥发性成分的特征图谱研究, 并对其中 4 种成分进行定量分析, 旨在控制该制剂中挥发性药味的质量, 为进一步全面控制牛黄益金片的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 7890B 气相色谱仪 - 配置火焰离子化检测器 (FID)(美国安捷伦科技有限公司); XS105 电子天平 (精度: 0.01 mg)、XPR2 电子天平 (精度: 0.001 mg)(瑞士梅特勒托利多公司); GN-12A 歌能超声波清洗机 (深圳市重子声学清洗设备有限公司)。

1.2 试药

对照品柠檬烯 (批号: 100470-201503, 含量以 96.0% 计)、桉油精 (批号: 110788-202108, 含量以 99.4% 计)、(-)-薄荷酮 (批号: 111705-202106, 含量以 98.5% 计)、薄荷脑 (批号: 110728-201707, 含量以 99.8% 计)、薄荷素油对照提取物 (BHSY, 批号: 111551-201704)(中国食品药品检定研究院), 无水乙醇 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司)。牛黄益金片样品共 15 批次, 来自 3 家企业, 其中 A 企业 5 批 (编号为 A1 ~ A5), B 企业 8 批 (编号为 B6 ~ B13), C 企业 2 批 (编号为 C14 ~ C15)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent 7890B 气相色谱仪; Agilent DB-FFAP 毛细管色谱柱 ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$, $0.25 \mu\text{m}$); 载气为氮气; 进样口温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测器温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$; 柱温为程序升温: 初始温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 4 min, 以 $1.5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 $130 \text{ }^\circ\text{C}$, 再以 $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 $200 \text{ }^\circ\text{C}$; 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 $2 \mu\text{L}$, 分流比为 2 : 1。

2.2 特征图谱研究

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取柠檬烯对照品 16.23 mg、桉油精对照品 9.52 mg、(-)-薄荷酮对照品 14.05 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 精密称取薄荷脑对照品 67.90 mg 置 20 mL 量瓶中, 加无水乙醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取柠檬烯、桉油精、(-)-薄荷酮、薄荷脑对照品储备液 0.50、0.50、

5.00、5.00 mL 置同一 100 mL 量瓶中，加无水乙醇定容至刻度，摇匀，作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量，研细，取约 2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入无水乙醇 20 mL，密塞，称定重量，冰浴超声处理 15 min，再称定重量，用无水乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 根据牛黄益金片处方组成和制备工艺（B 和 C 企业），制备缺薄荷脑和薄荷素油的阴性样品，并按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.4 薄荷素油对照提取物溶液的制备 精密量取薄荷素油对照提取物 0.10 mL 置 10 mL 量瓶中，加无水乙醇至刻度，摇匀，作为薄荷素油对照提取物溶液。

2.2.5 精密度试验 取牛黄益金片（C15）适量，按“2.2.2”项下方法制备，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。以薄荷脑峰（7 号峰）为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间的 $RSD < 0.44\%$ ，相对峰面积的 $RSD < 1.6\%$ ，表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取牛黄益金片（C15）适量，按“2.2.2”项下方法制备，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录色谱图。以薄荷脑峰（7 号峰）为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间的 $RSD < 0.51\%$ ，相对峰面积的 $RSD < 1.7\%$ ，表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取牛黄益金片（C15）适量，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样测定，记录色谱图。以薄荷脑峰（7 号峰）为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间的 $RSD < 0.19\%$ ，相对峰面积的 $RSD < 2.0\%$ ，表明本方法重复性良好。

2.2.8 特征图谱的建立 取 15 批次牛黄益金片，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样测定，记录色谱图。将 15 批次样品色图谱与薄荷素油对照提取物色谱图数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版），截取 5 ~ 45 min 的色谱图信息，以 C15 样品的图谱作为参照图谱，采用多点校正进行匹配，生成对照特征图谱（R），各共有峰保留时间相对稳定，并计算相似度。15 批次样品图谱叠加图谱见图 1，对照特征

图谱（R）见图 2，结合峰面积信息，选定峰面积相对百分比在 1% 以上的 7 个共有色谱峰作为共有特征峰，选定的 7 个共有特征峰峰面积所占比例在 90% 以上，说明所选择的共有峰可以较为全面地反映样品中化学成分的信息。其中 7 号色谱峰与相邻色谱峰得到良好的分离，确定为参照峰，并计算各共有特征峰的平均相对保留时间及 RSD ，结果分别为峰 1（0.217，0.10%）、峰 2（0.228，0.46%），峰 3（0.605，0.04%），峰 4（0.659，0.04%），峰 5（0.821，0.04%），峰 6（0.904，0.03%），峰 7（1.000，0.11%）。

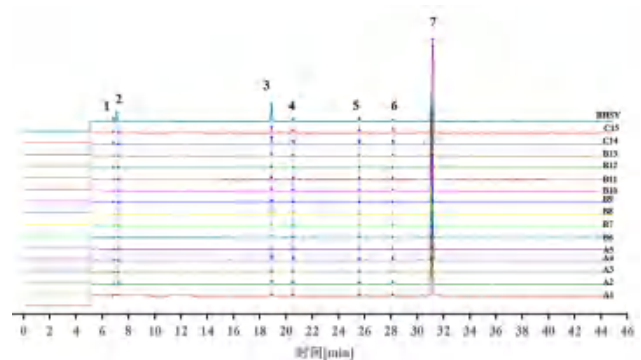


图 1 15 批次牛黄益金片和薄荷素油对照提取物特征图谱叠加图

Fig 1 Characteristic chromatogram of 15 batches of samples and peppermint oil reference extract

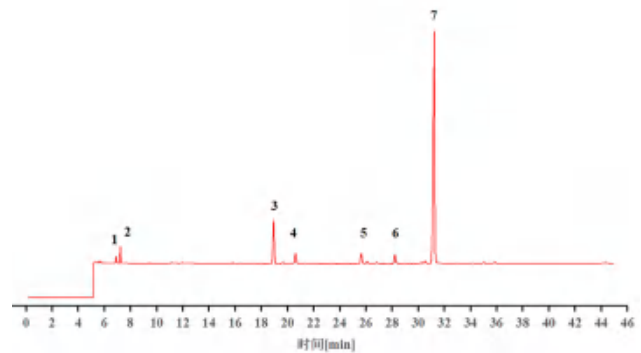


图 2 牛黄益金片对照特征图谱

Fig 2 Reference specific chromatogram of Niu Huang Yi Jin tablet

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）对 15 批次牛黄益金片进行分析，计算 15 批次样品的特征图谱相对于对照特征图谱的相似度，均在 0.99 以上，说明各样品间成分组成较为相似。

2.3 4 种成分的含量测定与分析

采用建立的牛黄益金片中挥发性成分特征图谱方法，对制剂中挥发性药味进行特征图谱定性鉴别，结果企业间样品特征图谱相似度虽然较高，但峰面积差异较大。经对照品对照，确认特征图谱中的 1 号峰为柠檬烯、2 号峰为桉油精、3 号峰为（-）-薄荷酮、7 号峰为薄荷脑，为更好地控制挥发性药味的质量，分析厂家间峰面积差

表 2 15 批次牛黄益金片 4 种成分的含量测定结果 (n = 3, mg/片)

Tab 2 Contents of 4 components in 15 batches of Niu Huang Yijin tablets (n = 3, mg/片)

编号	批号	柠檬烯	桉油精	(-)-薄荷酮	薄荷脑
A1	20201101	0.0013	0.0034	0.0225	0.7420
A2	20210301	0.0013	0.0021	0.0519	1.3109
A3	20210302	0.0011	0.0020	0.0216	0.7272
A4	20211101	0.0031	0.0017	0.0801	1.7206
A5	20211102	0.0007	0.0023	0.0087	0.4239
B6	042111003	0.0016	0.0016	0.0308	0.7962
B7	042111004	0.0020	0.0021	0.0326	0.8383
B8	042112005	0.0025	0.0018	0.0357	0.8558
B9	042112006	0.0025	0.0020	0.0392	0.9431
B10	042201001	0.0019	0.0019	0.0396	1.0413
B11	042201002	0.0019	0.0020	0.0441	1.0990
B12	042203003	0.0016	0.0023	0.0215	0.9261
B13	042203004	0.0033	0.0018	0.0389	1.0218
C14	0085001	0.0091	0.0018	0.1247	2.1005
C15	1085001	0.0099	0.0018	0.1029	2.0608

征图谱中 7 个共有峰的相对峰面积为变量，导入 SPSS 19.0 软件，降维进行因子分析。当特征值为 1 时，共提取了 2 个主成分，其累计贡献率为 94.8%，其中第一主成分贡献率为 78.0%，第二主成分贡献率为 16.8%，以主成分得分绘制散点图，结果见图 5。分析结果可知，15 批次样品可明显分为两类，其中 A4、A2、C14、C15 为一类，其他样品为另一类，与聚类分析结果一致。

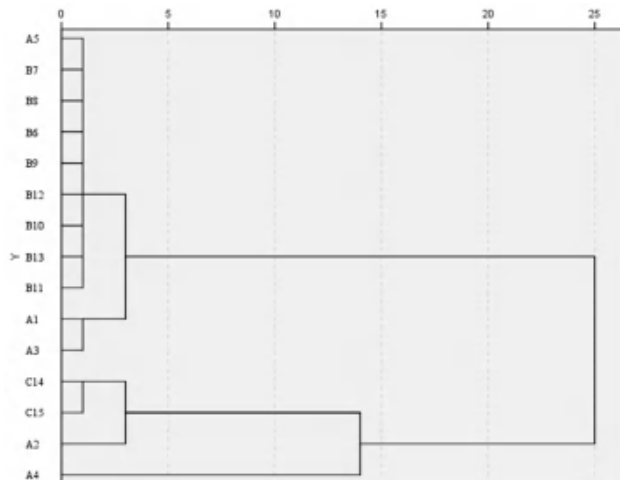


图 4 15 批次牛黄益金片聚类分析图
Fig 4 Cluster analysis of 15 batches of Niu Huang Yijin tablets

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

根据牛黄益金片中挥发性药味主要成分的极性^[9-10]，对弱极性 Agilent HP-5 色谱柱和强极性 Agilent DB-FFAP 色谱柱进行了考察，发现采用弱极性色谱柱时待测成分保留时间较长，但改

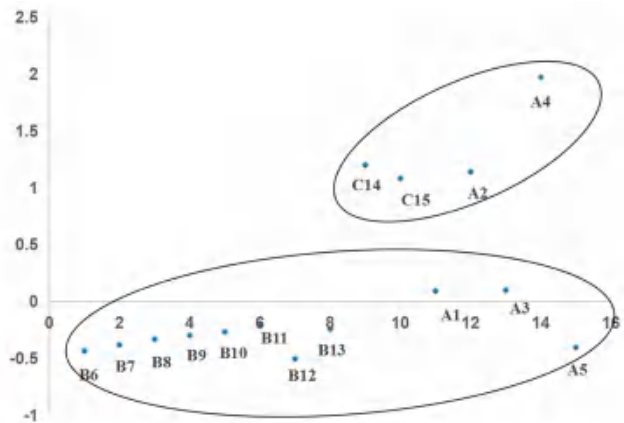


图 5 15 批次牛黄益金片主成分得分图
Fig 5 Principal component score chart for 15 batches of Niu Huang Yijin tablets

用强极性色谱柱后在分离度、峰形等满足要求的基础上可缩短保留时间，因此选择了强极性的 Agilent DB-FFAP 色谱柱。

3.2 提取方法的优化

参考有关挥发性成分测定的文献报道^[11-18]，对供试品溶液制备的提取方式、溶剂、温度、时间进行了考察。首先对提取方式（回流、超声）的考察，发现回流提取法回收率偏低且耗时过长、不易操作，超声提取法回收率较好且提取效率较高；其次对提取溶剂进行了比较（乙醚、乙酸乙酯、无水乙醇），乙醚在样品处理过程中易挥发，影响待测成分的定量分析，乙酸乙酯和无水乙醇提取效果相当，但乙酸乙酯更易挥发，注入气相色谱仪时易导致进样体积不准确，最终选择无水乙醇作为提取溶剂；而后对比了不同超声温度（冰浴、25℃、室温）对提取效率的影响，发现随着温度的升高，挥发性成分有下降的趋势，为求结果更为准确，选择了冰浴超声处理；最后对提取时间（10、15、20、30 min）进行了优化，发现在 15 min 以后各成分提取效率有下降的趋势，故提取时间选择为 15 min。

3.3 特征图谱和含量测定结果分析

15 批牛黄益金片中，4 种成分各批次样品均有检出，说明各企业牛黄益金片对于薄荷脑和薄荷素油均有投料；但不同企业样品 4 种成分含量差异较大。由聚类分析和主成分分析结果可知，B 企业和 C 企业样品中 4 种成分含量测定结果较为均一、稳定，A 企业样品含量测定结果较为离散。说明 B 企业和 C 企业的投料、生产工艺等在样品批次间相对稳定、一致，A 企业产品可能由于药材质量、生产工艺等方面的不稳定因素，导

致批间质量波动大, 建议企业对批间药材质量及生产工艺稳定性等方面进行持续考察。

综上所述, 牛黄益金片存在同一制剂规格处方量不同、现行法定质量标准关键项目缺失等问题。本研究以完善牛黄益金片质量标准、提升该制剂质量标准为目的, 建立了牛黄益金片 GC 特征图谱, 并同时对其其中 4 种成分进行了含量测定。结果表明, 15 批次牛黄益金片特征图谱与对照特征图谱的相似度在 0.99 以上, 共确定了 7 个共有峰, 指认出柠檬烯、桉油精、(-)-薄荷酮、薄荷脑 4 个共有峰。3 家生产企业样品的成分组成虽较为相似, 但 4 种成分的含量高低、一致性差异较大, 个别企业产品批间一致性有待提高, 说明需加强对牛黄益金片药材质量、生产工艺稳定性方面的管理, 同时对该制剂的规格和质量标准进行进一步规范和提高, 完善了原有质量标准中挥发性成分的质量控制方法, 以更加系统、全面地评价牛黄益金片的质量, 从而保障牛黄益金片的用药安全。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂. 第 16 册. 1998: 35.
- [2] WS₃-B-3041-98-1. 国家食品药品监督管理局国家药品标准[S]. 国家食品药品监督管理局. 2015.
- [3] WS₃-B-3041-98-2. 国家食品药品监督管理局国家药品标准[S]. 国家食品药品监督管理局. 2015.
- [4] 张新美. 牛黄益金片治疗慢性咽炎 100 例报告[J]. 山东医药, 2004, 44(9): 61.
- [5] 曾兰花, 刘潇潇, 陈漫丽, 等. 薄荷素油的质量标准研究[J]. 药学研究, 2021, 40(4): 224-228.
- [6] 刘斌. 气相色谱法测定银柴颗粒中薄荷脑和薄荷酮含量[J]. 中国药业, 2022, 31(5): 79-81.
- [7] 宋霞, 林鹏程, 刘亚蓉, 等. 明目蒺藜丸中挥发性成分的 GC 特征图谱及有效成分的含量测定[J]. 中药材, 2017, 40(8): 1880-1883.
- [8] Su L, Wang YM, Zhong KR, et al. Chemical constituents of mentha haplocalyx [J]. Chem Nat Compd, 2019, 55(2): 351-353.
- [9] 牛辰瑾, 周军. 顶空气相色谱法测定半夏止咳糖浆中(-)-薄荷酮和薄荷脑的含量[J]. 中国药品标准, 2020, 21(3): 274-280.
- [10] 陈在敏. 薄荷素油特征图谱的研究及多组分含量测定[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1957-1960.
- [11] 马丽端, 于密密, 傅欣彤, 等. 感冒清热颗粒挥发油特征图谱及薄荷酮和胡薄荷酮的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1374-1393.
- [12] 陈芳园, 张云静, 赵兵, 等. 华佗救心丸 GC-MS 特征图谱及 3 个成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11): 1917-1926.
- [13] Zhao D, Xu YW, Yang GL, et al. Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China [J]. Ind Crop Prod, 2013, 42: 251-260.
- [14] 李皓翔, 吴梦奇, 周妙霞, 等. GC-MS 测定不同产地艾叶 4 种挥发性成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(10): 2381-2383.
- [15] 刘杰, 刘长河, 王艳艳. 清眩丸中 5 种挥发性成分含量测定气相色谱法的建立[J]. 中国药房, 2022, 33(17): 2097-2101.
- [16] 李靖云, 孙辉, 曾蒲军, 等. 气相色谱法测定枇杷止咳颗粒中薄荷脑含量[J]. 中国药业, 2022, 31(24): 55-57.
- [17] Su X, Chen KL, Liu YP. Analysis on volatile components in mentha haplocalyx of special herbs in Qinghai Province [J]. Asian J Chem, 2014, 26(2): 555-558.
- [18] 杨宝, 刘佳, 陈繁华, 等. 气相色谱法测定八宝惊风散中薄荷脑、龙脑、丁香酚和麝香酮的含量[J]. 中南药学, 2016, 14(10): 1113-1116.

(收稿日期: 2023-04-05; 修回日期: 2023-06-08)

甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液中有有关物质定性研究

周成, 吴湖平, 路珊珊, 吴青青, 张晓, 肖志超* (扬子江药业集团有限公司 克服递药屏障高端制剂全国重点实验室, 江苏 泰州 225300)

摘要: **目的** 通过对甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液中相对保留时间 (RRT) 约为 0.9 的未知杂质 (杂质 A) 进行溯源、定性研究和来源分析, 以期阐明杂质产生机制, 为本品的杂质谱分析和质量控制提供依据。**方法** 通过高效液相色谱、制备色谱及核磁共振波谱等对本品中杂质 A 进行溯源和结构解析研究。**结果** 鉴定出本品中杂质 A 结构, 其为本品原料药合成过程中产生的副产物, 此外, 对杂质 A 在原料工艺过程中的产生源头进行分析, 制订出杂质 A 控制策略。**结论** 本方法测定结果准确可靠, 为甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液的杂质谱分析和质量控制提供参考。

关键词: 甲磺酸帕珠沙星; 有关物质; 定性研究; 液相色谱质谱联用; 核磁共振

中图分类号: R927 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)12-3322-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.035

Qualitative study on related substances in pazufloxacin mesylate and sodium chloride injection

ZHOU Cheng, WU Hu-ping, LU Shan-shan, WU Qing-qing, ZHANG Xiao, XIAO Zhi-chao* (*National Key Laboratory of Complex Drug Formulations for Overcoming Delivery Barriers of Yangtze Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou Jiangsu 225300*)

Abstract: Objective To elucidate production mechanism of a unknown impurity (impurity A) with relative retention time (RRT) approximately 0.9 in pazufloxacin mesylate and sodium chloride injection via traceability, qualitative and source analysis, and to provide evidence for the spectrum analysis and quality control of this impurity. **Methods** High performance liquid chromatography, preparation chromatography, and nuclear magnetic resonance were used to analyze the source and structure of impurity A. **Results** The structure of impurity A was identified and a byproduct was generated during the synthesis of active pharmaceutical ingredients. In addition, the source of impurity A was analyze. **Conclusion** This method is reliable, providing a reference for impurity profile analysis and quality control of pazufloxacin mesylate and sodium chloride injection.

Key words: pazufloxacin mesylate; related substance; qualitative study; LC-MS; NMR

甲磺酸帕珠沙星是由日本三菱制药株式会社和富山化学工业株式会社联合开发的第四代喹诺酮类抗菌药物, 通过抑制 DNA 旋转酶和 DNA 拓扑异构酶 IV 活性, 阻碍 DNA 合成而导致细菌死亡。具有抗菌谱广、抗菌作用强的特点。帕珠沙星对革兰氏阳性菌和部分厌氧菌有良好的抗菌效果, 临床主要用于治疗革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌引起的各种感染^[1-4]。

我司产品甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液多批

次产品在检测过程中发现本品中相对保留时间 (RRT) 约为 0.9 的未知杂质 (命名为: 杂质 A) 含量在 0.03% ~ 0.15% 内波动, 接近本品质量标准的控制限度 (0.2%), 给生产造成了较大困扰, 此外, 由于对该杂质来源及结构未知, 无法判断其产生条件以及在稳定性过程中是否有增长, 因此, 为保证公司产品质量, 对该未知杂质溯源和结构研究, 以期阐明其产生机制, 为本品质量控制提供保障。喹诺酮类药物的不良反应的发生机

作者简介: 周成, 男, 工程师, 主要从事药物的质量研究, email: zhouch@yangzijiang.com ***通信作者:** 肖志超, 男, 主管药师, 主要从事药物的处方工艺研究, email: xzc@yangzijiang.com

制与其化学结构有直接关系^[5-9], 阐明杂质的产生机制和控制条件有助于提高本品杂质控制水平, 减少本品的毒副作用。此外, 经查询目前关于本品中杂质研究的文献较少, 汪鑫等^[10]曾对甲磺酸帕珠沙星中杂质进行过定性研究, 确定了两个原料工艺杂质。国外有文献报道帕珠沙星水溶液的多个光降解产物^[11], 甲磺酸帕珠沙星及文献报道杂质见图 1。Liu 等^[12]对帕珠沙星的光毒性开展过研究。目前, 各国药典均未收载甲磺酸帕珠沙星及其制剂标准^[13], 无本品中杂质的相关信息。基于此, 对本品中的未知杂质进行溯源和定性研究, 对丰富本品杂质谱及保证产品质量具有重要意义。

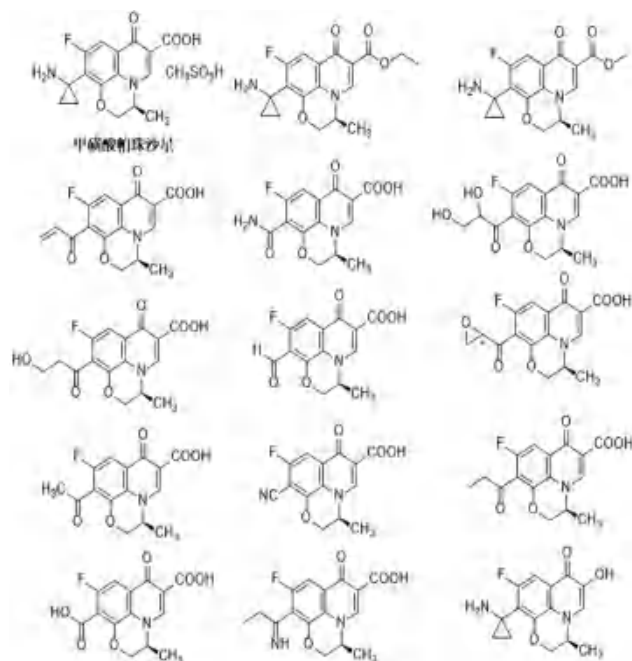


图 1 甲磺酸帕珠沙星及杂质结构

Fig 1 Structure of pazufloxacin mesylate and impurities

本文通过高效液相色谱、制备色谱及核磁共振等手段, 确认了甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液中杂质 A 的来源和结构, 并对杂质 A 来源进行分析, 确认杂质 A 为原料合成工艺过程中的副产物, 并制订了控制策略, 现报道如下。

1 仪器及试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Agilent Technologies Prestar 制备色谱仪 (美国安捷伦公司); Bruker 500M 核磁共振仪 (德国布鲁克公司); Agilent 6200 series TOF/6500 series 高分辨质谱仪 (美国安捷伦公司); Waters Xbridge C18 色谱柱 (250 mm×19 mm, 5 μm 和 250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国沃特世公司); XP205 十万分之一电子天平 (梅特勒); 乙腈、

三氟乙酸 (色谱纯, 默克公司); 磷酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 庚烷磺酸钠 (含量 > 98%, 东京化成工业株式会社)。

甲磺酸帕珠沙星原料 (批号: 161001), 起始物料 (批号: Z027-1711209), 中间体 A08-5、A08-7、A08-7-1 (批号: 171204、171101、I04701180224) (湖南华纳大药厂股份有限公司); 甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液 (扬子江药业集团有限公司, 批号: 17031051)。

2 方法

2.1 杂质溯源研究方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Waters Xbridge C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 以 1.01 g 庚烷磺酸钠溶解于 1 L 0.1% 磷酸溶液-乙腈 (38:12) 中即得; 检测波长: 247 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹, 进样量: 10 μL。

2.1.2 溶液配制

①甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液供试品溶液: 移取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

②定位溶液: 称取甲磺酸帕珠沙星、起始物料、中间体 A08-5、中间体 A08-7、中间体 A08-7-1 适量, 置不同 20 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至约 0.5 mg·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2 杂质定性方法

2.2.1 色谱条件 流动相: 0.1% 三氟乙酸水溶液-乙腈 (85:15), 色谱柱: Waters XBridge C18 (250 mm×19 mm, 5 μm), 检测波长: 247 nm, 流速: 20 mL·min⁻¹, 进样量: 100~800 μL。

2.2.2 制备溶液配制 称取中间体 A08-7-1 (杂质含量最高) 约 1.0 g, 置 10 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 摇匀, 即得。

取制备溶液, 注入制备色谱仪, 将分离得到的溶液浓缩, 得到杂质 A 约 5 mg, 用于定性研究, 确定该杂质的结构。

3 结果

3.1 杂质溯源

利用高效液相色谱仪对甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液供试品溶液和定位溶液进行检测, 图谱显示甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液中的杂质 A 并非本品原料的起始物料、中间体, 但本品原料、中间体及制剂成品中均含有该杂质且在中间体 A08-7-1 (帕珠沙星) 中含量最大, 见图 2, 上述结果表明杂质 A 是在原料工艺过程中产生的, 为原料工艺杂质。

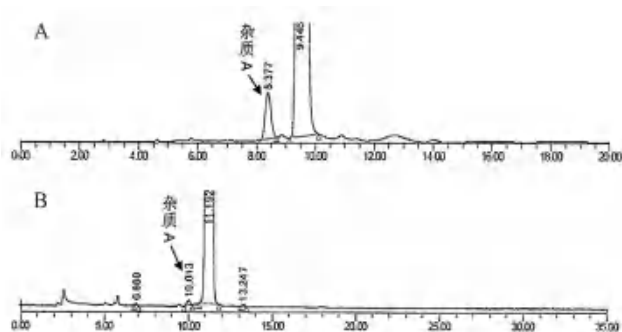


图 2 中间体 A08-7-1 (A) 及甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液 (B) 色谱图

Fig 2 Chromatogram of intermediate A08-7-1 (A) and pazufloxacin mesylate and sodium chloride injection (B)

3.2 杂质结构确证

3.2.1 杂质结构信息 杂质 A 为羟基取代的帕珠沙星, 结构见图 3, 分子式为 $C_{16}H_{15}FN_2O_5$ 。从结构分析, 杂质 A 不易降解得到, 为工艺副产物可能性较大, 与杂质溯源结果一致。

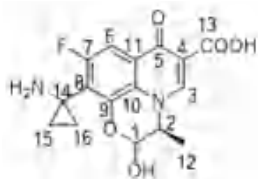


图 3 杂质 A 结构

Fig 3 Structure of impurity A

3.2.2 核磁共振 1H -NMR (500 M, DMSO, TMS), 显示该化合物结构中共有 15 个氢原子, 质子数由高场到低场为 2:3:2:1:1:1:2:1:1:1。 1H -NMR 及 1H - 1H COSY 谱显示, δ 4.86 ~ 4.91 与 δ 1.40 ~ 1.43 的 3 个氢原子互为相关, 为组成 $-CH(CH_3)$ 的结构片段; δ 1.44 ~ 1.50 与 δ 1.24 ~ 1.30 的 4 个氢原子互为相关, 组成 $-CH_2CH_2-$ 的结构片段; δ 5.98 与负电性较强的氧原子相连, 化学位移移至低场区; δ 7.67 ~ 7.69, δ 9.15 为 2 个孤立 $-CH$, 为芳环上氢原子的特征峰; δ 8.59 ~ 8.64, δ 8.15, δ 14.74 为 3 个活泼氢 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$ 的特征峰, 以上数据提示化合物中含有 $-CH(CH_3)$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$ 。

^{13}C -NMR (125 M, DMSO, TMS), 显示核磁共振碳谱中共有 19 个峰, 其中有 3 组碳原子裂分为 d 峰, 是由于与相连或相邻的氟原子耦合造成, 表明样品分子应有 16 个碳原子, 与结构式相符。样品分子中的 16 个碳原子分别为 1 个伯碳原子, 2 个仲碳原子, 4 个叔碳原子, 9 个季碳原子, 与 DEPT135° 谱一致。 δ 26.70, 108.38, 117.5, 123.53, (126.61, 126.69), (144.85, 144.90), 158.37, 165.48, 176.50 为 9 个季碳原子的化学位

移, δ 59.02, 92.60, 102.48, 147.59 为 4 个叔碳原子的化学位移, δ 11.88, 11.95 为 2 个仲碳原子的化学位移, δ 17.97 为 1 个伯碳原子的化学位移。由 1H - 1H COSY 谱可知, δ 1.44 ~ 1.50 的氢与 δ 1.24 ~ 1.30 的氢耦合, 表明 δ 1.44 ~ 1.50 的氢与 δ 1.24 ~ 1.30 的氢处于相邻的碳上; δ 1.44 ~ 1.50 的氢与 δ 4.86 ~ 4.91 的氢耦合, 表明 δ 1.44 ~ 1.50 的氢与 δ 4.86 ~ 4.91 的氢处于相邻的碳上; 根据 HSQC 谱可知, δ 11.88, 11.95 的碳原子与 δ 1.24 ~ 1.30, 1.44 ~ 1.50 的氢相连, δ 17.97 的碳原子与 δ 1.40 ~ 1.43 的氢相连, δ 59.02 的碳原子与 δ 4.86 ~ 4.91 的氢相连, δ 92.60 的碳原子与 δ 5.98 的氢相连, δ 102.28, 102.48 的碳原子与 δ 7.67 ~ 7.69 的氢相连, δ 147.59 的碳原子与 δ 9.15 的氢相连。再结合 HMBC 谱, 可以确证 δ (11.88, 11.95), 17.97, 26.70, 59.02, 92.60, (102.28, 102.48), 108.38, 117.55, 123.53, (126.61, 126.69), (144.85, 144.90), 147.59, 158.37, 165.48, 176.50 分别为 (15, 16), 12, 14, 2, 1, 6, 4, 11, 10, 7, 8, 3, 9, 13, 5 号碳。

1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 具体归属, 见表 1 ~ 2。

表 1 核磁共振氢谱和 1H - 1H COSY 谱数据
Tab 1 Data of 1H -NMR and 1H - 1H COSY

质子序号	化学位移	多重性	质子数	相应质子	1H - 1H COSY 相关 H
15, 16	1.24 ~ 1.30	m	2	CH ₂	1.44 ~ 1.50
12	1.40 ~ 1.43	m	3	CH ₃	/
15, 16	1.44 ~ 1.50	m	2	CH ₂	1.24 ~ 1.30
2	4.86 ~ 4.91	m	1	CH	1.40 ~ 1.43
1	5.98	s	1	CH	/
6	7.67 ~ 7.69	m	1	CH	/
/	8.59 ~ 8.64	m	2	NH ₂	/
/	8.15	s	1	OH	/
3	9.15	s	1	CH	/
/	14.74	s	1	COOH	/

3.2.3 质谱 (ESI-MS) 样品质谱图中 m/z 335.1046 的离子峰为 $[M + H]^+$ 的峰, m/z 357.0861 的离子峰为 $[M + Na]^+$ 的峰, $[M + H]^+$ 的分子式为 $C_{16}H_{16}FN_2O_5$, 不饱和度 $\Omega = 10$, 由此可知高分辨质谱给出信息与样品结构一致。

4 讨论

4.1 杂质来源分析及控制策略

本研究甲磺酸帕珠沙星氯化钠注射液原料的合成工艺为采用左氧氟沙星合成中间体左氧环合酯为起始物料, 经多步反应得到本品原料。起始物料左氧环合酯是采用四氟苯甲酰氯、 N, N -二甲氨基丙烯酸及 L -氨基丙醇为原料经多步反应得到, 其中, 物料 L -氨基丙醇为 L -氨基丙酸经还原得到, 上述反应的具体合成路线见图 4。由

表 2 核磁共振碳谱、HMBC 和 HSQC 谱数据

Tab 2 Data of ¹³C-NMR, HMBC and HSQC

碳序号	化学位移	DEPT 谱	HSQC 相关 H	HMBC 相关 H
15, 16	11.88, 11.95	CH ₂	1.24 ~ 1.30, 1.44 ~ 1.50	/
12	17.97	CH ₃	1.40 ~ 1.43	/
14	26.70	C	/	/
2	59.02	CH	4.86 ~ 4.91	1.40 ~ 1.43, 9.15
1	92.60	CH	5.98	1.40 ~ 1.43
6	102.28, 102.48	CH	7.67 ~ 7.69	/
4	108.38	C	/	9.15
11	117.55	C	/	7.67 ~ 7.69
10	123.53	C	/	7.67 ~ 7.69, 9.15
7	126.61, 126.69	C	/	/
8	144.85, 144.90	C	/	7.67 ~ 7.69, 9.15
3	147.59	CH	9.15	/
9	158.37	C	/	7.67 ~ 7.69
13	165.48	C	/	9.15
5	176.50	C	/	7.67 ~ 7.69, 9.15

图 4 可知, L-氨基丙酸在合成过程中过度还原产生 2-氨基-1, 1-丙二醇, 参与左氧环合酯合成, 形成杂质 SMZ1, 杂质 SMZ1 参与帕珠沙星合成, 得到本品制剂中杂质 A, 因此, 将杂质 SMZ1 定入起始物料质量标准中, 通过杂质加标挑战性试验, 制订合理限度, 可保证本品制剂产品中杂质 A 含量符合要求。

4.2 杂质 A 与光毒性

根据文献^[14], 喹诺酮类药物的副作用主要与喹诺酮类母核结构的 1、2、5、7、8 位置有关,

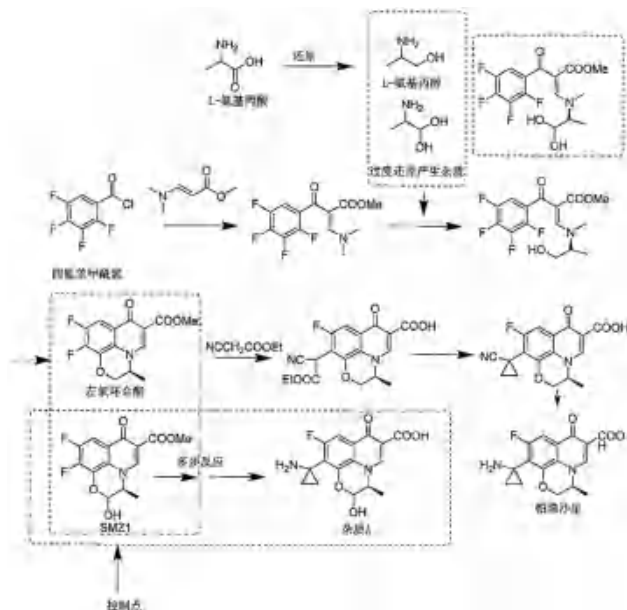


图 4 帕珠沙星及杂质 A 工艺流程图

Fig 4 Flow diagram of pazufloxacin and impurity A

具体结构与副作用及药效之间的关系, 见图 5。喹诺酮母核 8 位主要与喹诺酮类药物的光毒性相关。据文献^[12, 15], 甲磺酸帕珠沙星光毒性产生机制主要与 3 位的羧基发生电离, 与溶菌酶进行电子转移, 从而产生光损伤, 杂质 A 在 8 位产生半缩醛结构, 相较帕珠沙星, 多了 1 个电子转移位点, 可产生更强的光毒性, 因此, 对本品中杂质 A 进行控制, 可降低本品光毒性。

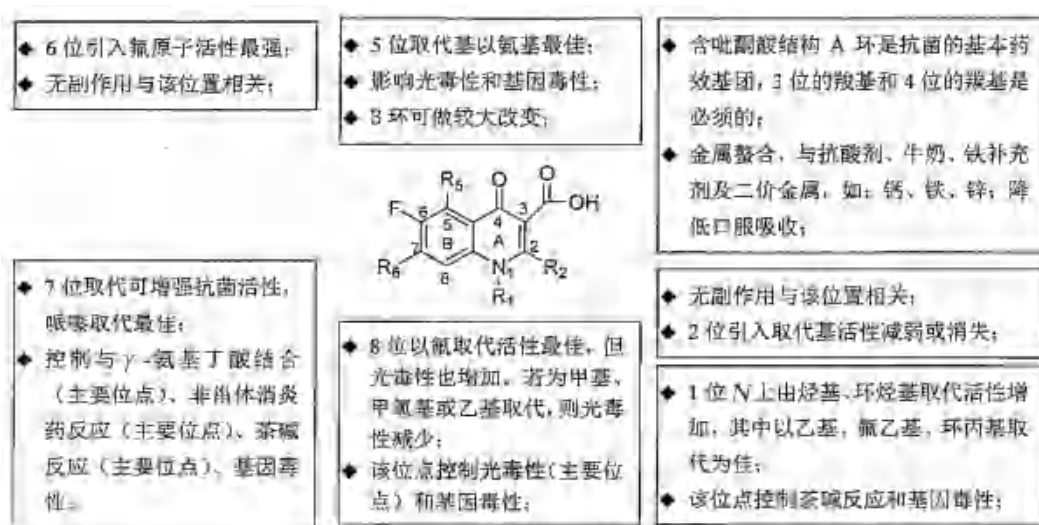


图 5 喹诺酮类药物结构与副作用及药效关系总结

Fig 5 Relationship between the structure, side effects, and pharmacodynamics of quinolone drugs

5 结论

综上, 本文对甲磺酸帕珠沙星原料及氯化钠注射液中杂质 A 进行了溯源、定性以及来源分析, 鉴定出杂质 A 结构, 制订了杂质 A 控制策

略, 丰富了本品杂质谱, 对控制本品制剂质量和原料合成工艺具有重要意义。此外, 讨论了杂质 A 与本品光毒性之间的关系, 降低本品中杂质 A 含量, 可降低本品固有的光毒性。

参考文献

- [1] 南新三郎, 服部力三, 松田朗. Characteristics and clinical localization of the novel quinolone antibacterial drug pazufloxacin mesylate for injection [J]. *Folia Pharmacol Jpn*, 2005, 122: 161-178.
- [2] Mikamo H, Sato Y, Hayasaki Y, et al. In vitro activities of pazufloxacin, a novel injectable quinolone, against bacteria causing infections in obstetric and gynecological patients [J]. *Chemotherapy*, 1999, 45: 154-157.
- [3] Higa F, Akamine M, Haranaga S, et al. In vitro activity of pazufloxacin, tosufloxacin, and other quinolones against legionella species [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2005, 56: 1053-1057.
- [4] 刘明亮, 郭慧元. 新喹诺酮类抗菌药甲磺酸帕珠沙星 [J]. *中国新药杂志*, 2004, 13 (12): 1164-1168.
- [5] 章伟, 吴友良, 赵小凤. 甲磺酸帕珠沙星原料药的急性毒性作用研究 [J]. *中国药业*, 2007, 16 (15): 16-17.
- [6] 周淦, 谭志荣, 韩春婷, 等. 甲磺酸帕珠沙星在中国健康受试者体内的药物代谢动力学研究 [J]. *中南药学*, 2006, 4 (2): 113-115.
- [7] 梁秀群, 黄天国, 尹桃. 帕珠沙星致急性肾功能衰竭 1 例 [J]. *中南药学*, 2008, 6 (6): 765.
- [8] Sawada Y, Nakamura M, Tokura Y. Generalized fixed drug eruption caused by pazufloxacin [J]. *Acta Derm Venereol*, 2011, 91: 600-602.
- [9] Rubinstein E. History of quinolones and their side effects [J]. *Chemotherapy*, 2001, 47 (3): 3-8.
- [10] 汪鑫, 陈蓉, 晏菊姣. 甲磺酸帕珠沙星原料及注射剂中有关物质的定性研究 [J]. *中国药师*, 2019, 22 (12): 2331-2335.
- [11] Demachi K, Maeda H, Todd Y, et al. Studies on structure of light degradation products of (-) - (S) - 10- (1-amino-cyclopropyl) -9-fluoro-3-methyl-7-oxo-2, 3-dihydro-7H-pyrrolo[1, 2, 3-de][1, 4]benzoxazine-6-carboxylic acid (T-3761) in aqueous solution and solid state [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1995, 115 (9): 716-731.
- [12] Liu YC, Zhang P, Li HX, et al. Photochemical properties and phototoxicity of pazufloxacin: a stable and transient study [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2013, 118: 58-65.
- [13] Abdallah N. Validated stable-indicating HPLC and thin layer lensitometric methods for the determination of pazufloxacin: application to pharmaceutical formulation and degradation kinetics [J]. *J Chromatogr Sep Tech*, 2014, 5 (2): 218-225.
- [14] Domagala JM. Structure-activity and structure-side-effect relationships for quinolone antibacterials [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 33: 685-706.
- [15] Xu YL, Liu YC, Li HX, et al. Photosensitive damage of lysozyme caused by pazufloxacin and the protective effect of ferulic acid [J]. *Sci China Chem*, 2015, 58 (3): 508-513.

(收稿日期: 2023-01-02; 修回日期: 2023-03-08)

HPLC-PDA 波长切换法测定远志 - 石菖蒲药对中 4 种主要成分的含量

孟雪, 张瑜, 王娣, 张玉茹, 崔小敏, 任慧, 陈志永, 陈娟* (陕西省中医药研究院, 西安 710003)

摘要: 目的 建立高效液相色谱 - 二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 波长切换法同时测定远志 - 石菖蒲药对提取液中 4 种主要成分远志卞酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚的含量。方法 采用 Agilent TC-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为甲醇 - 0.2% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 检测波长分别为 257 nm、320 nm, 流速为 0.8 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C。结果 远志卞酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚在各自质量浓度范围与峰面积线性关系良好 (r 均 \geq 0.9998), 精密度、重复性、稳定性 RSD 值均小于 5.0%; 低、中、高浓度的平均加样回收率在 100.79% ~ 103.57%; 远志 - 石菖蒲药对远志卞酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚含量平均值分别为 0.5829、3.7005、6.3593、1.4827 mg \cdot g⁻¹。结论 所建立的多成分含量测定方法简单、准确、重复性好, 可用于远志 - 石菖蒲药对的质量控制。

关键词: 远志 - 石菖蒲; 药对; 切换波长; 含量测定; 高效液相色谱 - 二极管阵列检测器

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3326-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.036

基金项目: 陕西省重点研发计划一般项目 (No.2019SF-280, 2023-YBSF-471/491, 2021SF-279); 西安市科技局一般项目 (No.21YXYJ0101); 陕西省中医药管理局项目 (No.SZY-KJCYC-2023-052/026)。

作者简介: 孟雪, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事中药复方配伍研究, email: mengxuenir@163.com *通信作者: 陈娟, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事中药资源研究, email: 158501243@qq.com

Content of determination of 4 main components in *Polygala tenuifolia* Willd.-*Acorus tatarinowii* Schott. herb pair by HPLC-PDA wavelength-switching method

MENG Xue, ZHAGN Yu, WANG Di, ZHAGN Yu-ru, CUI Xiao-min, REN Hui, CHEN Zhi-yong, CHEN Juan* (Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003)

Abstract: Objective To simultaneous determine the content of 4 main components (polygalaxanthone III, 3, 6'-disinapoyl sucrose, β -asarone and α -asarone) in the extract of *Polygala tenuifolia* Willd. -*Acorus tatarinowii* Schott. herb pair by HPLC-PDA wavelength-switching method. **Methods** Agilent TC-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) column was used in gradient elution with methanol and 0.2% aqueous formic acid as the mobile phase. Detection wavelengths were 257 nm and 320 nm. The flow rate was 0.8 mL \cdot min⁻¹ and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. **Results** There was a good linearity between the concentration of polygalaxanthone III, 3, 6'-disinapoyl sucrose, β -asarone and α -asarone and the peak area ($r \geq 0.9998$). The RSD values of the precision, repeatability and stability of the 4 main components were less than 5.0%. The average recoveries of low, medium, and high concentrations were between 100.79% \sim 103.57%. The average content of 4 main components in herb-pair of *Polygala tenuifolia* Willd. -*Acorus tatarinowii* Schott. was 0.5829, 3.7005, 6.3593, and 1.4827 mg \cdot g⁻¹. **Conclusion** This method is simple, accurate, reproducible and can be used for the quality control of *Polygala tenuifolia* Willd. -*Acorus tatarinowii* Schott. herb pair.

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd. -*Acorus tatarinowii* Schott.; herb pair; wavelength switching; content determination; HPLC-PDA

远志、石菖蒲配伍为防治痴呆的传统常用药对^[1], 痴呆是以智力衰退、记忆损害、行为人格改变及语言障碍等为特征的一种慢性进行性病征。我国痴呆患者数量较大^[2-3], 目前, 尚无能延缓或者终止疾病进展的有效药物。弓箭等^[4]统计了常用治疗阿尔茨海默病的单方药物, 其中用药频率石菖蒲居首位, 远志排第七; 平洋等^[5]整理治疗痴呆药对发现“远志-石菖蒲”为临床常用, 两者配伍见于开心散、定志小丸等方剂, 临床常用于安神益智。远志性温行散, 石菖蒲辛散温通, 两药配伍, 安神益智、开窍豁痰、启闭宁神之力更强。

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根, 具有安神益智, 交通心肾, 祛痰消肿之效; 主要含有三萜皂苷、甾酮、寡糖酯质等成分; 现代研究其具有抗痴呆、神经保护、抗衰老等多种生物活性^[6-10]。石菖蒲为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的干燥根茎, 具有开窍豁痰、醒神益智、化湿开胃之功效; 化学成分包括挥发油、氨基酸和糖类等, 挥发油主要活性成分为 β -细辛醚、 α -细辛醚等^[11-12]; 现代药理研究表明其具有抗痴呆、抗炎、抗惊厥等作用^[13-15]。

远志-石菖蒲药对配伍现代研究方面, 化学成分含量研究较少^[16], 主要集中于药理药效研究^[17-19]。目前, 尚未见采用 HPLC 法同时测定远志-石菖蒲药对主要成分含量的报道, 远志单味药材定量测定通常采取 HPLC 法测定^[20-21], 而石菖蒲成分多具有挥发性, 故定量测定常采用 GC 或 GC-MS 法测定^[22-23]。

本研究选取远志活性成分也是入血成分^[24]的 3, 6'-二芥子酰基蔗糖, 远志甾酮 III, 石菖蒲活性成分 α -细辛醚及 β -细辛醚为指标性成分, 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 切换波长法, 同时测定 4 种化学成分的含量, 为两者配伍或含有该药对的复方制剂的质量控制提供研究基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), KH-300D 型数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); Sartorius BP61 万分之一天平、Sartorius BP125D 十万分之一天平 (北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试药

3, 6'-二芥子酰基蔗糖, 远志吡酮Ⅲ, β -细辛醚对照品 (纯度均 $\geq 98\%$, 批号分别为 19031208、19051001、19052204, 上海圻明生物科技有限公司), α -细辛醚对照品 (纯度 $\geq 98\%$, 批号: S18779-459, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。远志、石菖蒲药材 (批号分别为 20230101、20230701, 陕西兴盛德药业有限责任公司) 经任慧副研究员鉴定, 符合药典要求。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 分别取远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 配制质量浓度分别为 $22.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $120.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $180.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $45.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液 精密称取干燥至恒重的远志、石菖蒲药材粉末各 0.2000 g (质量比为 1:1), 置 100 mL 锥形瓶中, 精密量取 80% 甲醇 20.0

mL, 称重, 超声 (300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放至室温, 再次称重, 补足甲醇至原始重量, 摇匀、滤过、取续滤液, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔有机滤膜过滤, 4°C 冷藏备用。

2.2 远志-石菖蒲中 4 种主要成分含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件与专属性考察 色谱柱 Agilent TC-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$), 流动相为甲醇 (A) - 0.2% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 38%A; 10 ~ 21 min, 38% ~ 43%A; 21 ~ 25 min, 43% ~ 74%A; 25 ~ 38 min, 74%A); 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 0 ~ 19.2 min, 257 nm (测定远志吡酮Ⅲ); 19.2 ~ 24.0 min, 320 nm (测定 3, 6'-二芥子酰基蔗糖); 24.0 ~ 38.0 min, 257 nm (测定 β -细辛醚及 α -细辛醚); 柱温: 30°C ; 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。取“2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液, 进样测定, 结果见图 1, 远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚理论塔板数均大于 4000, 峰形较好, 表明方法专属性较好。

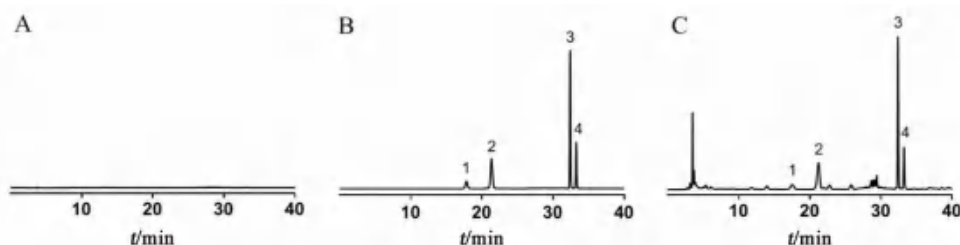


图 1 专属性考察 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of specific test

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 混合对照品 (mixed reference); C. 供试品 (sample); 1. 远志吡酮Ⅲ (polygalactoneone III); 2. 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (3, 6'-disinapoyl sucrose); 3. β -细辛醚 (β -asarone); 4. α -细辛醚 (α -asarone)

2.2.2 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液, 用甲醇逐步稀释, 得到系列混合对照品溶液。远志吡酮Ⅲ质量浓度分别为 22.5、18.0、15.0、12.0、9.0、6.0、3.0、1.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖质量浓度分别为 120.0、96.0、80.0、64.0、48.0、32.0、16.0、8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, β -细辛醚质量浓度分别为 180.0、144.0、120.0、96.0、72.0、48.0、24.0、12.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; α -细辛醚质量浓度分别为 45.0、36.0、30.0、24.0、18.0、12.0、6.0、3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。精密吸取上述各溶液 $10 \mu\text{L}$, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 以对照品中化合物的质量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程、相关系数 (r) 和线性范围, 化合物的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别以信噪比 (S/N) 的 3:1 和 10:1 为基准推算, 结果见表 1。

2.2.3 精密度考察 精密吸取同一混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算日间精密度。结果远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚的精密度 RSD 分别为 0.48%、0.38%、0.17%、0.28%, 均符合要求。

2.2.4 稳定性考察 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、16、20、24 h 进样分析, 记录色谱峰峰面积, 结果测得远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚的 RSD 分别为 2.3%、0.71%、0.50%、0.82%, 表明该方法稳定性较好。

2.2.5 重复性考察 称取远志-石菖蒲粉末共 6 份, 每份约 0.4 g, 置于 100 mL 量瓶中, 按“2.1.2”项下方法制备药材供试品溶液, 进样分析。结果测得远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛

表 1 4 种成分的线性回归分析及检测限、定量限

Tab 1 Regression, LOD and LOQ of 4 components

成分	回归方程	r	线性范围/μg	LOD/μg	LOQ/μg
远志吡酮Ⅲ	$Y = 4.144 \times 10^3 X - 13.98$	0.9998	0.015 ~ 0.225	0.004	0.006
3, 6'-二芥子酰基蔗糖	$Y = 2.927 \times 10^3 X - 15.31$	0.9999	0.080 ~ 1.200	0.006	0.009
β-细辛醚	$Y = 3.653 \times 10^3 X - 12.69$	0.9998	0.120 ~ 1.800	0.004	0.005
α-细辛醚	$Y = 5.375 \times 10^3 X - 16.27$	0.9999	0.030 ~ 0.450	0.003	0.004

醚及 α-细辛醚的平均含量分别为 0.5819 mg · g⁻¹、3.6902 mg · g⁻¹、6.3889 mg · g⁻¹、1.4878 mg · g⁻¹，RSD 值分别为 1.7%、1.4%、1.4%、1.5%，说明该方法重复性较好。

2.2.6 加样回收试验 称取已知含量的远志-石菖蒲粉末共 9 份，每份约 0.2 g，分别加入低、中、高浓度的远志吡酮Ⅲ (0.1000、0.1500、0.2000 mg)、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (0.4000、0.8000、1.2000 mg)、β-细辛醚 (0.6000、1.2000、1.8000 mg) 及 α-细辛醚 (0.1500、0.3000、0.4500 mg) 对照品，每个浓度测定 3 份重复样品，按“2.1.2”项下方法制备药材供试品溶液，进样分析。结果测得远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、β-细辛醚及 α-细辛醚的低、中、高浓度平均回收率分别为 101.45%、102.93%、101.63%，100.79%、102.4%、102.07%，102.16%、102.32%、101.56%，101.75%、103.57%、102.23%；RSD 值分别为 2.8%、1.8%、2.3%，2.0%、0.89%、2.2%，1.4%、1.6%、0.63%，1.6%、0.92%、2.3%，表明方法的准确性良好。

2.2.7 耐用性考察 取“2.1.2”项下供试品溶液，改变柱温、流动相中甲酸添加量、流速以及选取同品牌不同批号 Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 (批号: 570525、575472、563408)，考察较小范围内改变色谱条件对检测结果的影响。结果发现，4 种化合物均能实现良好分离，其含量 RSD 值均 < 3.0%，表明方法耐用性良好，结果见表 2。

表 2 耐用性测定结果

Tab 2 Durability test

RSD/%	化合物			
	远志吡酮Ⅲ	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	β-细辛醚	α-细辛醚
柱温 (±3℃)	2.1	1.8	0.3	2.3
流速 (±0.05 mL·min ⁻¹)	2.8	2.5	2.3	1.3
甲酸的添加量 (±0.5%)	1.4	1.6	1.4	0.61
色谱柱 (不同批次)	1.2	1.1	1.7	0.67

2.3 远志-石菖蒲药对 4 个化学成分含量的测定 称取远志-石菖蒲粉末共 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进样分析。计算 4 种成分的含量，结果见表 3。

表 3 远志-石菖蒲中各成分含量测定结果 (n = 6, mg · g⁻¹)

Tab 3 Sample determination of *Polygala tenuifolia* Willd. - *Acorus tatarinowii* Schott. (n = 6, mg · g⁻¹)

样品	远志吡酮Ⅲ	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	β-细辛醚	α-细辛醚
1	0.5698	3.7670	6.1772	1.4477
2	0.5857	3.6754	6.4112	1.5177
3	0.5928	3.7021	6.2762	1.4466
4	0.5877	3.7423	6.5037	1.5050
5	0.5781	3.5989	6.4205	1.5062
6	0.5834	3.7175	6.3670	1.4731
均值	0.5829	3.7005	6.3593	1.4827
RSD/%	1.4	1.6	1.8	2.1

3 讨论

3.1 指标成分和检测方法的选择

远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖为远志中重要的活性成分和质量标志物^[25]，具有镇静、抗抑郁作用，也为 2020 年版《中国药典》远志项下含量测定指标。石菖蒲药材挥发油中的主要活性成分为 β-细辛醚及 α-细辛醚，药理作用报道较多，有明显的抗痴呆、抗癫痫作用^[26-27]；目前，2020 年版《中国药典》检测项下并无石菖蒲具体成分的含量测定，只有挥发油测定；文献中对于石菖蒲中 β-细辛醚及 α-细辛醚的测定大多采用气相色谱-质谱法^[28]，对于仪器要求较高，适合测定挥发性成分，无法同时测定远志中的水溶性成分；若同时用两种方法分别检测，则样品处理方法较为复杂，增加了系统误差；考虑到临床中药复方多为水煎煮提取，HPLC 方法对于非挥发性成分检测适用性更广；目前采取同一色谱方法检测远志-石菖蒲药对含量测定的文献报道尚无，故本文选择 HPLC-PDA 波长切换法，同时测定远志-石菖蒲药对中 4 种化学成分的含量。

3.2 流动相的选择

本试验考察了甲醇-水溶液、乙腈-水溶液、甲醇-0.2% 甲酸水溶液、乙腈-0.2% 甲酸水溶液等流动相，水相添加 0.2% 甲酸溶液后，峰形较好；有机相甲醇和乙腈对待测成分峰形影响不大，最终选择甲醇-0.2% 甲酸水溶液作为流动相，能够对远志-石菖蒲药对中 4 种成分实现基线分离。

3.3 检测波长的选择

对远志吡酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、β-

细辛醚及 α -细辛醚在 200 ~ 400 nm 的紫外吸收进行全扫描,并结合文献资料,选定 254、257、280、310、316、320 nm 波长进一步考察 4 个指标性成分的最佳吸收波长。结果远志吡酮Ⅲ、 α -细辛醚在 257 nm 有最大吸收; β -细辛醚在 254 nm 有最大吸收,但在 257 nm 处吸收也较大;3,6'-二芥子酰基蔗糖在 320 nm 处有最大吸收。所以最终选择分段波长,设置不同时间段选取 257 nm 与 320 nm,保证每个待测物均有最大吸收,能够准确测定其含量。

3.4 小结

本文建立 HPLC-PDA 波长切换法同时测定远志-石菖蒲药对中远志吡酮Ⅲ、3,6'-二芥子酰基蔗糖、 β -细辛醚及 α -细辛醚 4 种化学成分的含量,方法精密度高、稳定性好、重现性好,且操作简便,可为远志-石菖蒲药对配伍研究和质量控制研究提供参考。

参考文献

- [1] 吕景山.《施今墨对药》第三版[M].北京:人民军医出版社,2005:265-266.
- [2] 张鹤,张允岭.我国老年期痴呆现状、困境及中药防治研究进展[J].世界中医药,2023,18(8):1202-1205.
- [3] Huang YQ, Wang Y, Wang H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross sectional epidemiological study [J]. Lancet Psychiat, 2019, 6 (3): 211-224.
- [4] 弓箭,钱佳怡,王烨兴,等.中药治疗阿尔茨海默病的用药规律分析[J].齐齐哈尔医学院学报,2020,41(16):2040-2042.
- [5] 平洋,李英鹏,朱婷,等.中药对改善老年痴呆症研究进展[J].辽宁中医杂志,2019,46(5):1100-1102.
- [6] 李斌,李佳欣,郝彦伟,等.远志散对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆能力及海马紧密连接蛋白表达的影响[J].中医杂志,2022,63(6):557-563.
- [7] 刘艳丽,梁小裕,周妍妍.细叶远志皂苷通过 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞损伤对氧化应激及炎症因子的影响[J].辽宁中医杂志,2022,49(7):140-143.
- [8] 杨素德,吴信华,高洪邨,等.基于网络药理学和指纹图谱的远志抗抑郁质量标志物的预测[J].中南药学,2023,21(7):1820-1826.
- [9] Zhao X, Cui YL, Wu P, et al. Polygalae Radix: a review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics [J]. Fitoterapia, 2020, 147: 104759.
- [10] 姚辛敏,周晓洁,周妍妍,等.远志化学成分及药理作用研究进展[J].中医药学报,2022,50(2):103-107.
- [11] 杨鹤年,吴宿慧,李寒冰,等.石菖蒲的研究进展及质量标志物预测分析[J].中国新药杂志,2021,30(13):1213-1219.
- [12] 杨悦,谢文婷,魏涛华,等.中药石菖蒲防治阿尔茨海默病研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2021,23(9):168-172.
- [13] 冯茜,董波,吴树宏,等.石菖蒲单体 α -细辛醚对耐药性癫痫大鼠的作用机制研究[J].亚太传统医药,2023,19(6):11-18.
- [14] 邱路雅,杨刚,金琼,等.石菖蒲根茎化学成分及抗炎活性研究[J].中草药,2022,53(15):4617-4624.
- [15] 王昊,赵振宇,马辉,等.石菖蒲治疗阿尔茨海默病的物质基础的研究[J].中南药学,2017,15(7):933-936.
- [16] 张慧,王颖,侯林.石菖蒲-远志药对配对前后水煎液中挥发性成分的含量变化分析[J].药学研究,2015,34(5):269-271.
- [17] 房敏峰,张文娟,李云峰,等.GC-MS 分析药对远志-石菖蒲中的脂溶性成分[J].中国药业,2009,18(23):3-5.
- [18] 苏世杰,陈依,杨虹颖,等.基于网络药理学和实验验证远志-石菖蒲药对治疗阿尔茨海默病的作用机制[J].中国中药杂志,2022,47(12):3348-3360.
- [19] 孙灵芝,艾邸.菖蒲-远志药对组对 $A\beta_{1-42}$ 诱导 PC12 细胞凋亡和钙离子浓度的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(18):2991-2995.
- [20] 洪占梅,熊晓莉,肖俊萍,等.基于高效液相色谱法测定不同产地、不同抽芯程度远志药材中 4 种成分的含量[J].中南药学,2023,21(2):503-507.
- [21] 王海波,栾泽柱,刘勇,等.HPLC 法测定远志饮片中 7 种指标成分含量[J].中药材,2018,41(6):1404-1407.
- [22] 刘宏伟,王虹,王威,等.GC-FID 同时测定石菖蒲油中七种成分的含量[J].广东化工,2021,48(21):157-158,154.
- [23] 张影,阮旭东,程旺兴.安徽 4 个不同地区石菖蒲中挥发油成分及其质量差异分析[J].生物资源,2021,43(3):225-231.
- [24] Liu JY, Liu AL, Mao FY, et al. Determination of the active ingredients and biopotency in *Polygala tenuifolia* Willd. and the ecological factors that influence them [J]. Industr Crops Amp, 2019, 134: 113-123.
- [25] 王小雨,刘传鑫,周佳丽,等.中药远志的化学成分和药理作用研究进展及其潜在质量标志物预测分析[J].国际药学研究杂志,2020,47(7):483-495,513.
- [26] 石坚宏,李瑞芝,杨元宵,等. α -细辛醚、 β -细辛醚改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞损伤及机制[J].浙江大学学报(医学版),2021,50(5):591-600.
- [27] 袁斯远,刘金民. α 细辛醚药理学研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(8):1247-1249.
- [28] 罗球珠,杨棣华,巫资彝,等.石菖蒲挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J].中国药物经济学,2021,16(8):116-120.

(收稿日期:2023-08-14;修回日期:2023-10-16)

不同产地首乌藤指纹图谱及 4 种成分的含量测定

曹斯琼, 周湘媛, 陈康梅, 李国卫* (广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

摘要: **目的** 建立首乌藤药材高效液相色谱指纹图谱, 并同时测定 4 种有效成分的含量, 评价不同产地首乌藤药材质量的差异。**方法** 采用高效液相色谱法进行测定, 色谱柱为 Waters Xselect HSS T3 C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30℃, 波长为 290 nm, 进样量为 10 μL; 建立 15 批首乌藤药材指纹图谱, 通过对照品比对, 对共有峰进行指认, 并对 4 种有效成分的含量进行测定; 对 15 批首乌藤药材指纹图谱进行相似度评价和主成分分析 (PCA), 并利用正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 寻找不同产地首乌藤药材的差异性成分。**结果** 首乌藤药材指纹图谱有 8 个共有峰, 指认出其中 4 个峰, 分别为 2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚; 除四川产区的样品外, 同一省份样品的相似度值均大于 0.80; PCA 分析将 15 批首乌藤药材聚成 5 类, 分别对应 5 个不同的产区, OPLS-DA 法确定 4 个差异标志物。不同产地首乌藤主要化学成分含量差异很大, 说明不同产地间首乌藤的化学成分存在较大的差异。**结论** 该方法能有效地分析不同产地首乌藤药材质量的差异性, 为不同产地首乌藤药材质量的评价提供参考。

关键词: 首乌藤药材; 指纹图谱; 多指标定量; 差异标志物

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3331-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.037

Fingerprints and determination of 4 components in *Polygoni Multiflori* Caulis from different origins

CAO Si-qiong, ZHOU Xiang-yuan, CHEN Kang-mei, LI Guo-wei* (*Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Foshan Guangdong 528244*)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of *Polygoni Multiflori* Caulis (PMC) and determine the content of 4 active components to evaluate the quality difference of PMC from different origins. **Methods** HPLC was used for the determination. The column was Waters Xselect HSS T3 C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-0.1% formic acid solution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ in a gradient elution, with the column temperature of 30℃. The detection wavelength was 290 nm and the injection volume was 10 μL. The fingerprints of 15 batches of PMC were established. The common peaks were identified through the comparison of standards, while the content of the 4 active components determined. The fingerprints of PMC were analyzed by similarity evaluation, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to determine the different components of PMC from different origins. **Results** There were 8 common peaks in the fingerprints of PMC by comparing with the reference substances, 4 common peaks were identified, namely 2, 3, 5, 4-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, emodin-8-O-β-D-glucoside, emodin, and emodin-3-methyl ether. Totally 15 batches of PMC were clustered into 5 categories, corresponding to 5 origins by PCA respectively. Four differential markers were determined by OPLS-DA indicating great

基金项目: 国家工业和信息化部 2019 年产业技术基础公共服务平台项目 (No.2019-00902-1-2)。

作者简介: 曹斯琼, 女, 副主任中药师, 主要从事中药质量控制及标准研究, email: 769430436@qq.com *通信作者: 李国卫, 男, 主任中药师, 主要从事中药新药研发及中药质量评价研究, email: 769430436@qq.com

differences in the main contents of PMC, and in the accumulation of chemical components of PMC from different origins. **Conclusion** The method effectively analyzes, the quality difference of PMC from different origins and provides a reference for the quality evaluation of PMC.

Key words: Polygoni Multiflori Caulis; fingerprint; multi-index content determination; differential marker

首乌藤又名夜交藤,为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥藤茎,为安神类中药,具养血安神、祛风通络功效。用于失眠多梦,血虚身痛,风湿痹痛,皮肤瘙痒^[1]。现代研究表明^[2-3],首乌藤含有的主要成分包括蒽醌类、黄酮类、多糖类、二苯乙烯类等。全国大部分区域均有分布,主产于西南、华南以及长江流域各省区,广东、广西、贵州、四川等地为首乌藤主要产地。文献研究发现,不同产地不同采收期首乌藤中 2020 年版《中国药典》规定指标 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷含量差异很大^[4]。药材质量差异较大的主要影响因素有产地、采收、炮制、储藏等^[5]。目前有关首乌藤研究的文献多以单一成分测定或指纹/特征图谱研究为主^[6-8],普遍存在样品量较少、药材的来源不明确等问题,样品大都购自药材市场或者药店。本研究首乌藤的道地产区及主产区收集多个批次的样品进行分析,通过保证药材来源的道地性和代表性,使研究结果具有客观性和普遍性。近年来,有学者采用化学计量学对中药材质量进行评价,更能客观地反映中药材质量^[9-11]。为了全面评价首乌藤药材质量,以建立完善的首乌藤药材质量评价体系,本试验采用 HPLC 法对 15 批不同产地的首乌藤药材进行指纹图谱研究,结合主成分分析,并对大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素共 4 个成分进行定量分析,对首乌藤药材质量作出综合评价,为首乌藤药材质量控制提供了理论依据。

1 材料

超高效液相色谱仪(沃特世公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),ME204E 型万分之一天平、XP26 型百万分之一天平(梅特勒-托利多公司),Milli-Q Direct 超纯水系统(默克股份有限公司)。甲醇、甲酸为色谱纯,其他试剂为分析纯;水为超纯水。

对照品大黄素(纯度:98.7%,批号:110756-201512),2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(纯度:93.6%,批号:110844-201713),大黄素甲醚(纯度:99.2%,批号:110758-

201817)(中国食品药品检定研究院);大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(纯度:98.0%,批号:1902903,成都普菲德生物技术有限公司)。收集了 6 个产地共 15 批首乌藤样品,经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥藤茎。样品信息表见表 1。

表 1 首乌藤样品信息
Tab 1 Sample information

编号	来源	编号	来源
SWT1	四川省凉山州	SWT9	湖南省怀化市
SWT2	四川省凉山州	SWT10	湖南省怀化市
SWT3	云南省红河州	SWT11	贵州省黔东南
SWT4	云南省红河州	SWT12	贵州省黔东南
SWT5	云南省红河州	SWT13	贵州省兴义市
SWT6	湖北省随州市	SWT14	广东省肇庆市
SWT7	湖北省随州市	SWT15	广东省肇庆市
SWT8	湖北省宜昌市	/	/

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制

分别称取各对照品适量,精密称定,加 70% 乙醇制成含 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷 852.134 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 270.750 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 大黄素 97.728 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 大黄素甲醚 40.966 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称定首乌藤样品(过四号筛)0.5 g,精密加入 70% 乙醇 25 mL,称定重量,加热回流 30 min,放冷,补重,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

Waters Xselect HSS T3 C18 为色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1% 甲酸(B),梯度洗脱(0~40 min, 35%~68%A; 40~50 min, 68%~95%A; 50~60 min, 95%A);检测波长:290 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL \cdot min $^{-1}$;进样量:10 μL 。

2.4 指纹图谱方法学验证

2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液(SWT1),按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次,以 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(1号峰)为参照峰,分别计算 8 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD,均小于 3.0%。

表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批次首乌藤药材粉末 (SWT1), 采用“2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.3”项下色谱条件连续进样, 以 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷为参照峰, 分别计算 8 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD, 均小于 3.0%。表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (SWT1), 采用“2.3”项下色谱条件, 分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 以 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷为参照峰, 计算 8 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD, 均小于 3.0%, 表明样品在室温放置 24 h 稳定。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 共有峰的标定 取 15 批样品, 按“2.2”项下方法制备, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 以 SWT1 为参照图谱, 采用多点校正自动匹配, 选择平均数法生成对照指纹图谱, 见图 1、2, 选择首乌藤药材中的主要成分且分离较好的色谱峰作为共有峰, 共标定了 8 个共有峰, 总面积占总峰面积的 90% 以上。与对照品的保留时间进行比对, 并结合紫外吸收光谱图, 确定峰 1 为 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷, 峰 3 为大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷, 峰 7 为大黄素, 峰 8 为大黄素甲醚。由于 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷为首乌藤的主要有效成分之一, 对照品易得, 并且该成分色谱峰面积最大, 分离度较好, 因此选为参照峰, 各指纹峰的相对保留时间的 RSD 为 0.14% ~ 0.32%, 相对峰面积的 RSD 为 81.47% ~ 131.09%, 结果见表 2、3。

2.5.2 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 计算各样品的相似度, 结果见表 4, 结果显示, 同一省份样品的相似度值均大于 0.80, 云南、湖北、湖南、贵州和广东 5 个产地的样品相似度也大于 0.80, 但四川凉山产地的相似度只有 0.553 ~ 0.892, 说明该产地的样品在化学成分上与其他产地的药材存在较大的差异。

2.5.3 PCA 和 OPLS-DA 分析

① PCA 分析: 采用 SIMCA 14.1 软件, 以峰面积为变量进行 PCA 分析, 共生成 3 个主成分, 累计贡献率达到 94.3%, Q^2 为 0.73, 证明模型有效。以主成分得分和峰面积变量得到 Score 图和 Loading 图 (见图 3 和图 4), 结果显示, 15 批首乌藤药材被聚成 5 类, 湖南和广东 2 个产地的首

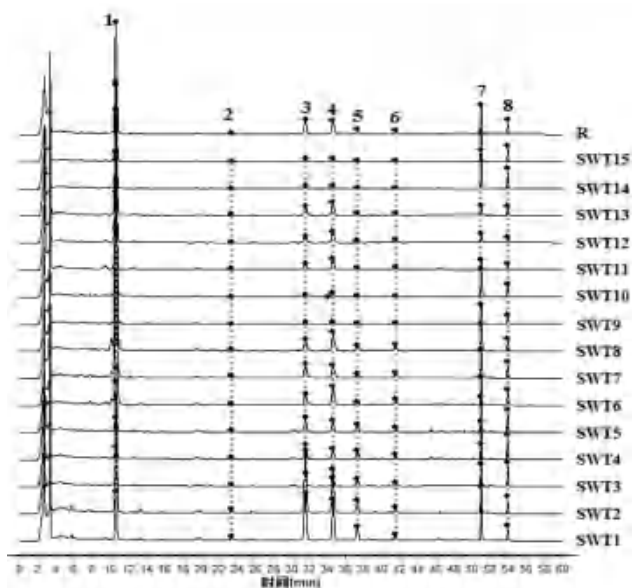


图 1 15 批首乌藤药材 HPLC 特征图谱共有峰

Fig 1 Common peaks of HPLC fingerprints of 15 batches of *Polygonum multiflorum* Thunb.

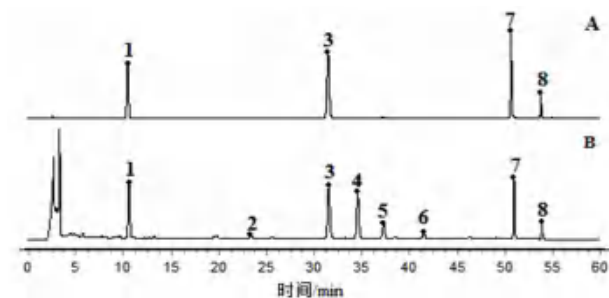


图 2 首乌藤药材共有峰对照品归属图

Fig 2 Chromatogram of standards and *Polygonum multiflorum* Thunb.

A. 对照品 (reference); B. 首乌藤药材 (*Polygonum multiflorum* Thunb.); 1. 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 (2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside); 3. 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷 (emodin-8-O-β-D-glucoside); 7. 大黄素 (emodin); 8. 大黄素甲醚 (emodin-3-methyl ether)

乌藤药材聚为一类, 四川、云南、湖北、贵州产区各聚为一类, 分类结果与药材产地密切相关, 且四川产区样品的得分离原点较远, 这与相似度结果一致, 说明不同产地的样品化学成分具有较大差异。根据分析变量对主成分 1 的影响权重, 大小依次为峰 2、峰 5、大黄苷、峰 4, 变量对主成分 2 的影响权重, 大小依次为大黄素甲醚、2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素。

② OPLS-DA 分析: 以 8 个共有指纹峰峰面积为变量进行 OPLS-DA 分析, 所建立的模型 $R^2X = 0.986$, $R^2Y = 0.938$, $Q^2 = 0.882$, 表明该模型可以用于不同产地首乌藤的模式识别。通过 OPLS-DA 的 Scores 图 (见图 5) 可知, 不同产地首乌藤药材也明显分为 5 类, 且通过 8 个变量的 VIP 值

表 2 15 批首乌藤药材共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks of 15 batches of *Polygonum multiflorum* Thunb.

编号	峰号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
SWT1	1.000	2.205	2.977	3.263	3.519	3.915	4.811	5.086
SWT2	1.000	2.208	2.981	3.267	3.523	3.920	4.820	5.097
SWT3	1.000	2.209	2.982	3.271	3.525	3.922	4.819	5.096
SWT4	1.000	2.205	2.975	3.264	3.517	3.914	4.812	5.088
SWT5	1.000	2.203	2.972	3.258	3.509	3.904	4.806	5.082
SWT6	1.000	2.201	2.966	3.253	3.503	3.900	4.784	5.058
SWT7	1.000	2.202	2.968	3.255	3.505	3.902	4.788	5.062
SWT8	1.000	2.204	2.974	3.263	3.514	3.913	4.805	5.081
SWT9	1.000	2.198	2.962	3.250	3.500	3.893	4.771	5.044
SWT10	1.000	2.201	2.968	3.256	3.507	3.903	4.790	5.064
SWT11	1.000	2.207	2.976	3.262	3.519	3.913	4.815	5.093
SWT12	1.000	2.207	2.976	3.263	3.519	3.914	4.817	5.095
SWT13	1.000	2.207	2.975	3.261	3.517	3.912	4.815	5.093
SWT14	1.000	2.205	2.975	3.265	3.517	3.915	4.810	5.085
SWT15	1.000	2.203	2.971	3.261	3.512	3.911	4.807	5.083
均值	1.00	2.20	2.97	3.26	3.51	3.91	4.80	5.08
RSD/%	0.00	0.14	0.18	0.17	0.21	0.20	0.30	0.32

表 3 15 批首乌藤药材共有峰的相对峰面积

Tab 3 Relative peak area of common peaks of 15 batches of *Polygonum multiflorum* Thunb.

编号	峰号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
SWT1	1.000	0.087	1.238	1.036	0.369	0.141	0.701	0.182
SWT2	1.000	0.035	0.540	0.364	0.110	0.050	0.210	0.067
SWT3	1.000	0.050	0.417	0.282	0.234	0.109	0.688	0.367
SWT4	1.000	0.058	0.419	0.324	0.250	0.119	0.590	0.346
SWT5	1.000	0.051	0.356	0.276	0.184	0.103	0.441	0.267
SWT6	1.000	0.007	0.063	0.101	0.021	0.027	0.079	0.041
SWT7	1.000	0.009	0.075	0.072	0.025	0.026	0.082	0.041
SWT8	1.000	0.008	0.059	0.093	0.027	0.029	0.073	0.030
SWT9	1.000	0.002	0.018	0.028	0.009	0.010	0.133	0.058
SWT10	1.000	0.002	0.018	0.036	0.009	0.011	0.132	0.055
SWT11	1.000	0.013	0.105	0.165	0.038	0.043	0.077	0.043
SWT12	1.000	0.016	0.133	0.203	0.047	0.051	0.085	0.045
SWT13	1.000	0.021	0.177	0.239	0.049	0.046	0.098	0.076
SWT14	1.000	0.006	0.038	0.045	0.022	0.017	0.315	0.148
SWT15	1.000	0.008	0.045	0.050	0.024	0.015	0.242	0.117
均值	1.00	0.02	0.25	0.22	0.09	0.05	0.26	0.13
RSD/%	0.00	102.82	131.09	114.15	118.06	81.47	87.83	91.03

表 4 15 批首乌藤药材相似度评价表

Tab 4 Similarity analysis of 15 batches of *Polygonum multiflorum* Thunb.

编号	相似度	编号	相似度
SWT1	1.000	SWT9	0.553
SWT2	0.892	SWT10	0.557
SWT3	0.856	SWT11	0.652
SWT4	0.873	SWT12	0.684
SWT5	0.851	SWT13	0.722
SWT6	0.600	SWT14	0.615
SWT7	0.595	SWT15	0.609
SWT8	0.593		

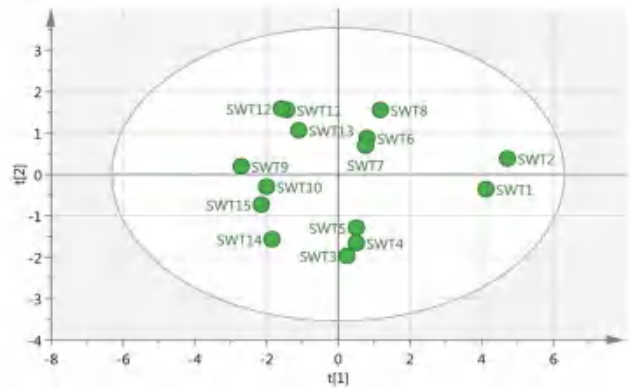


图 3 15 批首乌藤药材 Scores 图

Fig 3 Score plot of *Polygonum multiflorum* Thunb.

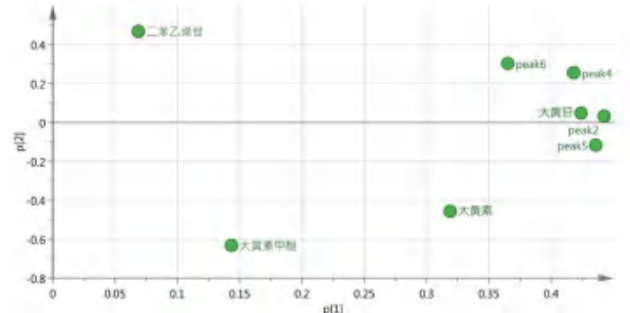


图 4 首乌藤药材色谱峰变量 Loading 图

Fig 4 Variable loading plot of *Polygonum multiflorum* Thunb.

图 (见图 6) 可知, 以 $VIP > 1.0$ 为显著影响, 共找到 4 个差异标志物, 对其影响显著性排序, 分别为 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 > 大黄素甲醚 > 大黄素 > 峰 6, 提示这几个化学成分对于区分不同产地首乌藤贡献较大, 且不同产地的含量具有明显区别。

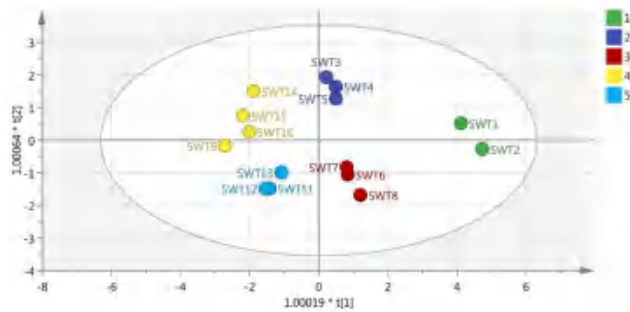


图 5 首乌藤药材的 OPLS-DA 分析 Scores 图

Fig 5 OPLS-DA score plot of *Polygonum multiflorum* Thunb.

2.6 多指标成分含量测定

进一步对明确成分的 4 个差异标志物 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素及大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷进行含量测定, 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷具有改善睡眠的作用^[12], 与首乌藤用于失眠多梦的功效相关。

2.6.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL

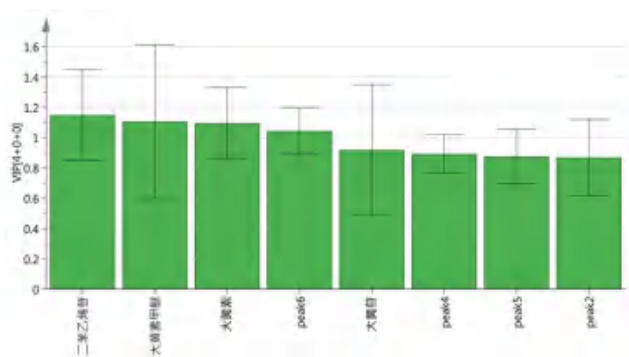


图 6 首乌藤药材 VIP 图

Fig 6 VIP score plot of *Polygonum multiflorum* Thunb.

表 5 4 个成分的标准曲线、相关系数、线性范围

Tab 5 Regression equation, correlation coefficient and linear range of 4 components

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r
2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷	$Y = 2.87 \times 10^4 X + 1963.4$	8.521 ~ 852.13	0.9997
大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷	$Y = 2.39 \times 10^4 X + 4049.0$	2.708 ~ 27.075	0.9999
大黄素	$Y = 4.69 \times 10^4 X - 8636.8$	0.9770 ~ 97.728	0.9993
大黄素甲醚	$Y = 2.79 \times 10^4 X + 3372.3$	0.4100 ~ 40.966	0.9997

品溶液, 进样分析, 计算得 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的平均含量依次为 4.248、6.320、1.831、0.792 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 依次为 0.12%、0.30%、0.27%、0.96%, 表明该方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 计算得 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 稳定。

2.6.5 加样回收试验 精密称取已知含量的首乌藤药材粉末 0.25 g (SWT1), 共称取 6 份, 分别加入一定量的对照品溶液, 按“2.2”项下方法制备, 进样分析并计算回收率, 结果 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚平均加样回收率分别为 96.72%、97.47%、95.01%、93.93%。RSD 分别为 2.1%、2.0%、1.7%、1.5%, 表明方法准确性良好。

2.6.6 样品含量测定 取 15 批样品粉末进行分析测定, 计算上述 4 个成分的含量, 结果见表 6。

结果显示, 不同产地首乌藤含量差异很大, 15 批首乌藤样品间 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷含量相差 7 倍以上, 其中首乌藤中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷湖北宜昌产地的含量最高, 达到 26.084 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 云南红河产地的含量最低为 3.383 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 但来自四川凉山的不同批次之间含量差异也较大, 表明

置 10 mL 量瓶中, 稀释定容, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 以待测成分质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与峰面积拟合标准曲线, 线性关系结果见表 5。

2.6.2 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算得 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的峰面积 RSD 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 取同一批首乌藤药材粉末 (SWT1), 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试

表 6 首乌藤药材中 4 个成分含量测定结果

Tab 6 Content determination of 4 components

批号	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	大黄素 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	大黄素甲醚 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
SWT1	4.248	6.320	1.831	0.792
SWT2	12.789	8.300	1.649	0.869
SWT3	3.383	1.687	1.434	1.273
SWT4	3.539	1.774	1.286	1.255
SWT5	4.373	1.864	1.190	1.195
SWT6	24.099	1.826	1.166	1.014
SWT7	23.679	2.123	1.193	0.981
SWT8	26.084	1.851	1.168	0.797
SWT9	9.623	0.194	0.791	0.566
SWT10	14.300	0.308	1.166	0.803
SWT11	8.956	1.122	0.431	0.386
SWT12	7.028	1.115	0.376	0.319
SWT13	7.319	1.548	0.447	0.563
SWT14	6.940	0.310	1.346	1.055
SWT15	6.885	0.360	1.026	0.823

2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷在首乌藤中具有不稳定性。15 批首乌藤样品间大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷含量差异最大, 相差 40 倍以上, 其中来自湖南怀化的大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷含量最低, 仅有 0.194 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 而来自四川凉山的首乌藤大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷含量高达 8.300 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。15 批首乌藤样品大黄素、大黄素甲醚的含量最高值和最低值分别相差 5 倍和 4 倍, 来自云南红河的 2 批样品 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷含量最低, 而大黄素甲醚含量最高。说明不同产地间首乌藤的化学成分的积累存在较大的差异。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化和供试品溶液制备方法的考察

选择甲醇-0.1% 甲酸溶液为流动相, 选取 290 nm 为检测波长, 并优化其洗脱程序, 各特征峰分离度达到 1.5 以上, 各指纹峰的响应值最大, 基线平稳且无干扰。对提取方式(超声提取、加热回流提取)进行了考察, 最终确定了首乌藤药材指纹图谱和含量测定方法采用同一供试品制备方式, 该方法既最大限度地保留了化学成分, 又实现了良好的色谱分离。

3.2 指纹图谱的构建及分析评价

首乌藤在我国分布十分广泛, 以野生居多, 本研究用样品分别来自广东、贵州、四川、湖南、湖北、云南等 6 个产地, 共标识出 8 个共有指纹峰, 通过对照品指认出 4 个有效成分, 分别为 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚。相似度评价结果显示, 同省区的药材, 相似度较高, 除了四川产地外, 不同产地的首乌藤药材指纹图谱的相似度值均大于 0.80; PCA 和 OPLS-DA 分析将 15 批首乌藤药材被聚成 5 类, 湖南和广东 2 个产地的首乌藤药材聚为一类, 四川、云南、湖北、贵州产地各聚为一类, 分类结果与药材产地密切相关, 说明不同产地首乌藤药材化学成分具有较大差异。OPLS-DA 分析找到了 4 个差异标志物, 分别为 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素、峰 6, 说明不同产地首乌藤药材的化学成分存在较大差异, 这种差异可能与药材产地的土壤类型、气候类型、光照等生态因子有关^[13]。

3.3 多指标成分的测定与分析

2020 年版《中国药典》首乌藤药材项下规定 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量应不低于 0.20%, 15 批样品均符合药典的规定, 其中湖北产地的 3 批药材 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量是药典限度的 10 倍, 均高于其他 5 个产地, 而云南产地的首乌藤药材 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量则整体均低于其他 5 个产地。多指标成分的含量测定结果表明, 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚 4 个成分含量差异均较大。四川产地的首乌藤药材大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷含量最高, 比含量最低的湖南产地和广东产地高 20 倍以上, 贵州产地的首乌藤药材 2 个蒽醌类成分大黄素及大黄素甲醚含量整体较低。2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷有降血脂、降胆固醇及调节机体免疫功能的作用^[14]; 蒽

醌类成分(大黄素、大黄素甲醚及其苷类等)能够改善脑缺血导致的神经损伤^[15-16]。因此, 根据发挥作用的药效物质不同, 可选择合适产地的药材。

本文在指纹图谱的基础上, 增加对有效成分 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚的测定, 从多角度研究不同产地首乌藤药材质量的差异性, 该方法简便, 专属性强, 重复性良好, 能有效地分析首乌藤药材质量的差异性, 为首乌藤药材的质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 277-278.
- [2] 刘成基, 孟宝华, 刘静涵, 等. 中药夜交藤化学成分的研究[J]. 南京药学院学报, 1983, 5(3): 48-50.
- [3] 范宋玲, 孙冬梅, 王洛临, 等. 首乌藤药材质量标准的研究[J]. 中国试验方剂学杂志, 2006, 12(3): 7-9.
- [4] 廖力, 黄倩, 陈胜利, 等. 首乌藤不同部位有效成分含量考察[J]. 山地农业生物学报, 2016, 35(6): 81-86.
- [5] 董云英, 张红蕊. 影响中药质量的五大因素[J]. 中国医药指南, 2011, 9(14): 302-303.
- [6] 肖宗崇, 卢识礼, 郑晓英, 等. 首乌藤配方颗粒的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国试验方剂学杂志, 2017, 23(10): 50-54.
- [7] 范帅帅, 高乐, 田伟, 等. 首乌藤饮片标准汤剂质量标准研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(1): 90-94.
- [8] 周亚楠, 孙菡, 白洁, 等. UHPLC 特征图谱结合多组分含量评价首乌藤饮片的质量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(8): 1203-1207.
- [9] 李振雨, 吕渭升, 何民友, 等. 辛夷配方颗粒 UPLC 指纹图谱及含量测定研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(12): 112-117.
- [10] 周丽娟, 杨晓宁, 王雅芝, 等. 基于 HPLC-CAD 指纹图谱结合化学计量学方法分析不同产地北柴胡药材质量[J]. 中南药学, 2022, 20(10): 2253-2258.
- [11] 符丽娜, 王立涛, 王建栋, 等. 基于 RP-HPLC-DAD 指纹图谱结合化学计量学评价不同品种木豆叶质量及主要成分含量测定[J]. 中草药, 2022, 53(24): 7880-7886.
- [12] 汲广全, 杨娟, 杨小生. 夜交藤改善睡眠活性成分研究[J]. 中成药, 2011, 33(3): 514-516.
- [13] 廖保生, 宋经元, 谢彩香, 等. 道地药材产地溯源研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3881-3888.
- [14] 凌晓, 谷捷, 金一, 等. 益肾通络方中二苯乙烯苷的含量测定[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2015, 12(1): 142-144.
- [15] 侯文文, 石燕红, 宋嫵, 等. 一测多评法同步测定何首乌中 4 种蒽醌类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(1): 133-141.
- [16] 蔡友德, 何前松, 樊梓媛, 等. 基于抗氧化作用探讨大黄游离蒽醌类成分对脑缺血再灌注损伤的脑保护机制[J]. 贵阳中医学院学报, 2019, 41(4): 5-10.

(收稿日期: 2023-06-02; 修回日期: 2023-09-02)

基于 FAERS 数据库的神经激肽 -1 受体拮抗剂 不良事件信号挖掘与分析

王凤蝶^{1, 2}, 王静^{2, 3}, 陈力^{2*} (1. 四川大学华西医院眉山医院/眉山市人民医院药剂科, 四川 眉山 620010; 2. 四川大学华西第二医院药学部/循证药学中心, 成都 610041; 3. 四川绵阳四〇四医院/绵阳市第一人民医院药学部, 四川 绵阳 621000)

摘要: **目的** 通过对神经激肽 -1 受体拮抗剂 (NK-1RA) 药品不良事件 (ADE) 信号挖掘分析, 探讨 NK-1RA (阿瑞匹坦、福沙匹坦、奈妥匹坦) 潜在的不良反应, 为临床安全合理用药提供参考。**方法** 从美国食品药品监督管理局 (FDA) 不良事件报告系统 (FAERS) 数据库中提取 2014 年第一季度至 2022 年第四季度 NK-1RA 的 ADE 报告数据, 采用报告比值比 (ROR) 法和综合标准 (MHRA) 法对相关报告进行数据挖掘和危险因素分析。**结果** 三种 NK-1RA 共获得 263 个有效 ADE 信号, 其中阿瑞匹坦 144 个, 福沙匹坦 98 个, 奈妥匹坦 21 个; 有效信号共涉及 19 个系统器官分类 (SOC)。阿瑞匹坦与关节沉积、脑病、口腔黏膜变粗糙关联性强, 福沙匹坦与注射部位血管炎、输液部位静脉炎、速发严重过敏反应关联性较强, 奈妥匹坦则与中性粒细胞减少性结肠炎关联性强。**结论** 三种 NK-1RA 的 ADE 涉及的主要系统器官不同, 与各系统器官某些 ADE 的关联性也不同; 发现了说明书收录不全之处, 挖掘出多个新的不良反应。建议临床应用时, 密切监测患者的不良反应, 及时采取措施进行干预。

关键词: 神经激肽 -1 受体拮抗剂; 比例失衡法; FAERS; 药品不良事件; 信号挖掘

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3337-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.038

Data-mining and analysis of adverse event signals of neurokinin-1 receptor antagonists based on FAERS database

WANG Feng-die^{1, 2}, WANG Jing^{2, 3}, CHEN Li^{2*} (1. Department of Pharmacy, Meishan Hospital of West China Hospital of Sicuan University/Meishan City People's Hospital, Meishan Sichuan 620010; 2. Department of Pharmacy/Evidence-based Pharmacy Center, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041; 3. Department of Pharmacy, Sichuan Mianyang the 404th Hospital/Mianyang First People's Hospital, Mianyang Sichuan 621000)

Abstract: Objective To provide reference for safe and rational drug use, signal mining and analysis of adverse events (ADEs) neurokinin-1 receptor antagonists (NK-1RA) and determine the potential adverse reactions of aprepitant, fosapitant and netopitant. **Methods** Adverse event reports of NK-1RA from the first quarter of 2014 to the fourth quarter of 2022 were collected from the FAERS database. The reported odds ratio and the comprehensive standard were used for the data mining and risk factor analysis. **Results** Totally 263 effective ADEs signals were obtained from the three types of NK-1RA, including 144 effective signals of aprepitant, 98 effective signals of fosapitant and 21 effective signals of netopitant. These signals involved 19 system organs class. Aprepitant was strongly correlated with joint deposition, encephalopathy and oral mucosal roughness; fosapitant was strongly correlated with injection

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82073921); 四川省自然科学基金项目 (No.2022NSFSC1356)。

作者简介: 王凤蝶, 女, 主管药师, 主要从事临床药学方面的研究, email: 986942589@qq.com *通信作者: 陈力, 男, 主任药师, 主要从事临床药学与合理用药方面的研究, email: chenl_hxey@scu.edu.cn

site vasculitis, infusion site phlebitis and rapid severe allergic reaction; while netopitant was strongly correlated with neutropenic colitis. **Conclusion** The major systems involved in the three common ADE of NK-1RA vary. The intensity of some adverse events associated with each system also varies. The instructions are not complete, and many new adverse reactions are revealed. Adverse reactions among patients should be closely monitored and timely measures taken.

Key words: neurokinin-1 receptor antagonist; proportional imbalance method; FAERS; adverse drug event; signal mining

化疗引起的恶心呕吐 (chemotherapy-induced nausea and vomiting, CINV) 病理生理学因素涉及多种神经递质和受体^[1], 显著降低患者的生活质量以及对抗肿瘤治疗的依从性^[2]。控制不佳或严重的 CINV 可导致化疗剂量减少或周期延迟^[3], 最终影响化疗结果^[4]。神经激肽-1 受体拮抗剂 (neurokinin-1 receptor antagonist, NK-1RA) 通过结合中枢神经系统及其外围的 NK-1 受体阻滞 P 物质的释放而达到止吐作用, 是一类具有独特抗焦虑、抗抑郁和止吐特性的止吐药^[5]。阿瑞匹坦作为全球第一个 NK-1RA, 于 2003 年在美国获批上市^[6]。多项研究结果证实 NK-1RA 与标准止吐治疗联合使用是预防 CINV 的有效药物^[7]。鉴于支持性数据, 美国临床肿瘤学会指南 (ASCO) 认为 NK-1RA 是接受中致吐化疗方案 (middle emetogenic chemotherapy, MEC) 和 / 或高致吐化疗方案 (highly emetogenic chemotherapy, HEC) 患者的标准治疗^[8]。

美国食品药品监督管理局不良事件报告系统 (FDA adverse event reporting system, FAERS) 作为药品不良事件 (ADE) 自发报告的全球权威开源数据库, 可以弥补说明书的滞后性、不确定性和不完整性等缺点^[9]。作者对近几年真实世界中 NK-1RA 的 ADE 信号进行挖掘和分析, 探讨 NK-1RA 药品 ADE 的差异, 为 NK-1RA 药物的临床选择和安全使用提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源

本研究数据来源于 FAERS 数据库, 提取 2014 年第一季度至 2022 年第四季度共 36 个季度的所有数据, 导入 MySQL 软件, 根据 FDA 的建议^[10] 当 CASEID 相同时选择最新 FDA_DT, 当 CASEID 和 FDA_DT 都相同时选择更高的 PRIMARYID, 去重后得到以 “role_code” 为 “首要怀疑药物” 的数据共 11 946 763 条, 从中筛选出首要怀疑药物为阿瑞匹坦、福沙匹坦、奈妥匹坦的报告数分别为 1319、1269、229 例。

1.2 方法

本研究采用报告比值比法 (ROR) 和综合标准法 (MHRA)^[11-12] 分别计算 ROR 值和比例报告比值 (proportional reporting ratio, PRR), 并筛选潜在 ADE 信号。同时满足 ROR 法中 95%CI 下限 > 1 且报告数 $a \geq 3$ 例条件和 MHRA 法中 $PRR \geq 2$ 、 $\chi^2 \geq 4$ 且 $a \geq 3$ 例条件则提示生成一个 ADE 信号^[13-14]。ROR 与 PRR 值越大, 则表示信号越强, 目标药物与目标 ADE 的相关性就越大。

本文采用国际医学科学组织理事会《药品监管活动医学词典》(Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA) 中药物不良反应术语集的首选系统器官分类 (system organ class, SOC)^[15] 和首选术语 (preferred term, PT)^[16], 对每例报告的不良反应名称按照系统和器官进行规范化编码, 可有效减少因不良反应报告术语不同导致的差异性, 从而提高研究的准确度和可信度。

1.3 数据处理

所有统计分析使用 GraphPad Prism 8 和 Microsoft Excel 2019 软件完成。

2 结果

2.1 ADE 报告病例基本信息

如表 1 所示, 以阿瑞匹坦为主要怀疑药物的报告数为 1319 例, 以福沙匹坦为主要怀疑药物的报告数为 1269 例, 以奈妥匹坦为主要怀疑药物的报告数为 229 例。在已知年龄的患者中, 18 ~ 60 岁的患者所占比例最大, 其次是 60 岁以上的患者; 在已知性别的患者中, 三种 NK-1RA 的 ADE 报告女性占比均明显高于男性。ADE 报告主要来源于美国。

2.2 ADE 信号累及系统器官分析

根据 MedDRA 的 SOC 中规定的 PT-SOC 对应关系对有信号的 PT 进行分类, 结果显示 NK-1RA 的 ADE 信号共累及 19 个 SOC (阿瑞匹坦涉及 19 个 SOC、福沙匹坦涉及 16 个 SOC、奈妥匹坦涉及 8 个 SOC)。阿瑞匹坦主要集中在全身性疾病及

表 1 NK-1RA 相关 ADE 报告基本信息
Tab 1 Basic information of the NK-1RA related ADEs

信息	分类	报告例数 [n (%)]		
		阿瑞匹坦	福沙匹坦	奈妥匹坦
性别	男性	409 (31.01%)	423 (33.33%)	88 (38.43%)
	女性	704 (53.37%)	581 (45.78%)	133 (58.08%)
	不清楚	206 (15.62%)	265 (20.88%)	8 (3.49%)
年龄 / 岁	≤ 18	54 (4.09%)	25 (1.97%)	2 (0.87%)
	18 ~ 60	408 (30.93%)	445 (35.07%)	93 (40.61%)
	≥ 60	398 (30.17%)	356 (28.05%)	91 (39.74%)
	不清楚	459 (34.80%)	443 (34.91%)	43 (18.78%)
报告国家 (前 5)	1	美国 [403 (30.59%)]	美国 [494 (30.02%)]	美国 [113 (49.56%)]
	2	法国 [256 (19.43%)]	韩国 [332 (36.22%)]	德国 [19 (8.33%)]
	3	加拿大 [235 (17.84%)]	加拿大 [195 (15.40%)]	法国 [11 (4.82%)]
	4	埃及 [122 (9.26%)]	埃及 [54 (4.26%)]	澳大利亚 [9 (3.95%)]
	5	日本 [82 (6.22%)]	日本 [48 (3.79%)]	英国 [8 (3.51%)]

给药部位各种反应、胃肠系统疾病、各类神经系统疾病；福沙匹坦主要集中在全身性疾病及给药部位各种反应、胃肠系统疾病、呼吸系统；奈妥匹坦主要集中在全身性疾病及给药部位各种反应、胃肠系统疾病、血液及淋巴系统疾病 (见图 1)。

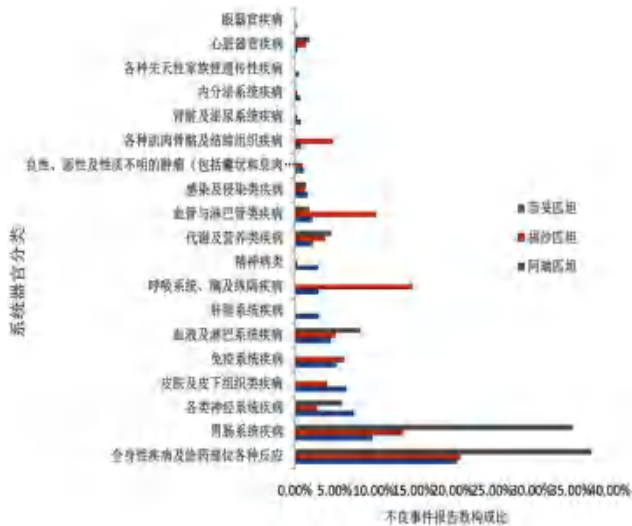


图 1 三种 NK-1RA 的 ADE 累及系统和 / 或器官
Fig 1 Systems and/or organs of the three NK-1RA ADEs involved

2.3 ADE 信号分析

经 ROR 和 PPR 筛选, 排除产品问题、社会环境、各种手术及医疗操作等与药物无关和 / 或适应证无关的信号, 最终获得有效信号 263 个 (阿瑞匹坦 144 个, 福沙匹坦 98 个, 奈妥匹坦 21 个), PT 报告总数 3799 例 (阿瑞匹坦 1428 例, 福沙匹坦 2153 例, 奈妥匹坦 218 例); 对关联性前 20 位且信号强度大于阈值的 PT 进行分析, 并与说明书进行详细对比, 结果见表 2。阿瑞匹坦关联性较强 PT 为关节沉积、口腔黏膜变粗糙、发育不全; 福沙匹坦为注射部位血管炎、输液部位静脉炎; 奈妥

匹坦则与中性粒细胞减少性结肠炎关联性较强。发现未列入药品说明书的 ADE 信号共 22 个 (阿瑞匹坦 9 个, 福沙匹坦 4 个, 奈妥匹坦 9 个), 新信号主要集中在血管与淋巴管系统、胃肠道系统、各类神经系统。

2.4 各 NK-1RA 显著 ADE 信号分析

通过数据挖掘, 各 NK-1RA 在各 SOC 相关不良事件和信号强度差异较大。胃肠道系统疾病是 NK-1RA 常见 ADE, 阿瑞匹坦与口腔黏膜变粗糙关联性较强 (ROR 495.11, χ^2 1399.63); 奈妥匹坦则在中性粒细胞减少性结肠炎方面强信号检出 (ROR 345.24, χ^2 2314.41) (见图 2)。

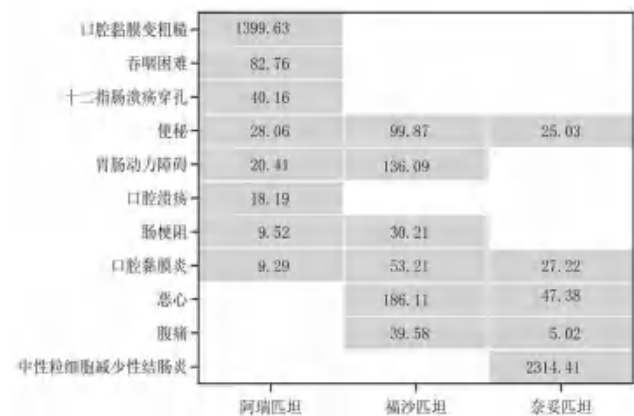


图 2 NK-1RA 胃肠道系统相关 ADE
Fig 2 NK-1RA gastrointestinal system-associated ADEs

注: 图中数值为各 PT 对应的卡方值 (χ^2)。

Note: The values in the figure is the χ^2 corresponding to each PT.

此外, 福沙匹坦在血管及淋巴系统疾病 ADE 关联性显著高于阿瑞匹坦及奈妥匹坦, 表现在静脉炎 (ROR 153.25, χ^2 5628.90) 及潮红 (ROR 31.01, χ^2 3629.53)。在呼吸系统、胸及纵隔疾病方面, 阿瑞匹坦及福沙匹坦与呃逆关联性较强, 福沙匹坦

表 2 NK-1RA ADE 信号强度前 20 的 PT 排序

Tab 2 PT sequence of the top 20 ADEs signal intensity of NK-1RA

PT	阿瑞匹坦			福沙匹坦			奈妥匹坦				
	例数	ROR (95% CI 下限)	PRR (χ^2)	PT	例数	ROR (95% CI 下限)	PRR (χ^2)	PT	例数	ROR (95% CI 下限)	PRR (χ^2)
关节沉积*	3	939.01 (285.69)	936.87 (2541.70)	注射部位血管炎	4	2221.90 (746.59)	2214.90 (7165.59)	中性粒细胞减少结肠炎*	7	345.24 (162.31)	334.72 (2314.41)
口腔黏膜变粗糙*	3	495.11 (154.70)	493.99 (1399.63)	输液部位静脉炎	3	349.47 (110.25)	348.64 (1002.80)	脑病	5	21.67 (8.93)	21.22 (96.37)
发育不全*	7	48.53 (23.05)	48.28 (322.44)	静脉炎	39	153.25 (111.15)	148.57 (5628.90)	血清素综合征	3	16.52 (5.29)	16.32 (43.17)
黏膜出血*	3	40.58 (13.04)	40.49 (115.04)	输液部位荨麻疹	5	116.10 (47.98)	115.64 (561.38)	疾病进展	17	15.41 (9.40)	14.34 (212.05)
脑病	49	37.58 (28.24)	36.22 (1673.31)	输液相关超敏反应	3	114.14 (36.51)	113.87 (331.63)	白细胞减少症	5	9.88 (4.07)	9.69 (39.05)
压抑感	3	36.40 (11.70)	36.32 (102.65)	静脉变色	3	101.46 (32.48)	101.22 (294.52)	药物相互作用	14	9.12 (5.31)	8.63 (95.07)
呃逆	16	35.45 (21.63)	35.03 (527.15)	输液部位刺激	7	98.89 (46.87)	98.35 (667.57)	低钠血症*	5	8.85 (3.65)	8.68 (34.05)
发热性骨髓再生障碍*	7	26.47 (12.58)	26.34 (170.17)	输液部位皮疹	6	72.01 (32.19)	71.67 (415.00)	口腔黏膜炎*	5	7.43 (3.06)	7.29 (27.22)
麻疹样皮疹	3	19.19 (6.17)	19.15 (51.49)	输液部位反应	9	69.25 (35.86)	68.77 (596.73)	心动过缓*	4	7.37 (2.74)	7.26 (21.65)
阵挛	3	18.91 (6.08)	18.87 (50.66)	输液部位疼痛	40	48.90 (35.66)	47.39 (1808.65)	感染性休克*	3	6.96 (2.23)	6.88 (15.10)
IV 型超敏反应	3	18.61 (5.99)	18.57 (49.78)	注射部位萎缩	4	46.06 (17.22)	45.92 (174.92)	死亡*	51	6.61 (4.85)	5.36 (188.92)
尿路阻塞	3	18.16 (5.84)	18.12 (48.45)	呃逆*	18	41.56 (26.07)	40.99 (699.40)	中性粒细胞减少症	9	6.31 (3.24)	6.10 (38.62)
非心源性胸痛	3	17.44 (5.61)	17.41 (46.30)	外渗	7	31.28 (14.86)	31.11 (203.37)	发热性中性粒细胞减少症	4	5.90 (2.20)	5.82 (16.01)
角膜炎*	3	17.40 (5.60)	17.36 (46.17)	潮红*	141	31.01 (26.02)	27.68 (3629.53)	呕吐	21	4.72 (3.01)	4.38 (55.89)
红斑*	5	16.81 (6.98)	16.75 (73.94)	癫痫样现象*	3	27.35 (8.79)	27.28 (75.75)	潮红*	4	4.40 (1.64)	4.34 (10.32)
中毒性脑病	5	16.56 (6.88)	16.50 (72.70)	脉搏异常*	4	26.65 (9.97)	26.57 (98.18)	便秘	10	4.39 (2.33)	4.24 (25.03)
抗利尿激素分泌失调	9	16.41 (8.51)	16.30 (129.12)	注射部位硬结	18	25.06 (15.73)	24.72 (408.81)	脱水*	5	3.75 (1.55)	3.69 (9.87)
肌肉不自主收缩	3	15.70 (5.05)	15.67 (41.13)	静脉疾病	7	24.04 (11.42)	23.91 (153.30)	恶心	28	3.65 (2.46)	3.33 (47.38)
骨髓功能衰竭*	22	15.45 (10.13)	15.20 (291.78)	输液部位红斑	12	23.56 (13.34)	23.35 (256.16)	惊厥发作*	5	3.26 (1.34)	3.21 (7.68)
舌溃疡*	3	14.95 (4.81)	14.92 (38.90)	速发严重过敏反应	60	21.09 (16.27)	20.14 (1091.60)	腹痛	6	2.45 (1.09)	2.41 (5.02)

注：*表示未在说明书中出现的 PT。

Note: *Expression the PT that does not appear in the instructions.

体还存在呼吸困难 (ROR 6.43, χ^2 749.97) 较强信号。免疫系统疾病方面福沙匹坦与速发严重过敏反应 (ROR 21.09, χ^2 1091.60)、过敏性休克 (ROR 18.81, χ^2 396.34)、输液相关超敏反应 (ROR 114.14, χ^2 331.63) 关联性较强。本研究结果提示阿瑞匹坦可能存在肝胆系统相关 ADE (见图 3)。

2.5 说明书中未提及的新的显著 ADE 信号分析

表 3 提示阿瑞匹坦与关节沉积强关联性 (ROR 939.01, χ^2 2541.70), 这一点在阿瑞匹坦说明书中未提及。

3 讨论

3.1 NK-1RA 的 ADE 发生的人口学特征

如表 1 所示, 在已知年龄的患者中, 18 ~ 60 岁的患者所占比例略高于 60 岁以上的患者, 但

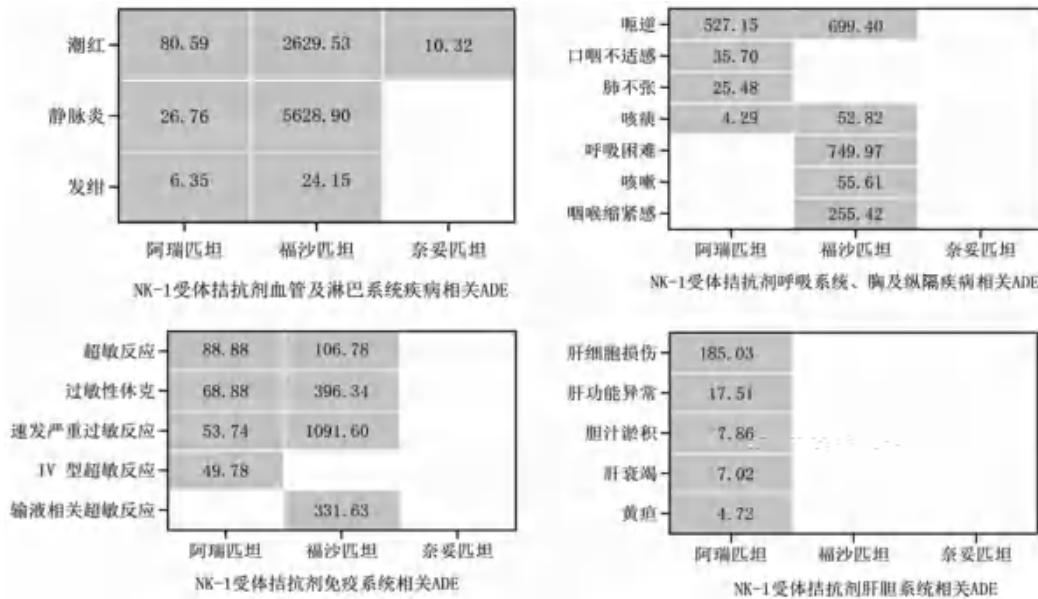


图 3 NK-1RA 其他系统相关 ADE
Fig 3 NK-1RA other system-related ADEs

注：图中数值为各 PT 对应的卡方值 (χ^2)。
Note: The values in the figure is the χ^2 corresponding to each PT.

表 3 NK-1RA 肌肉骨骼与结缔组织相关 ADEs
Tab 3 NK-1RA musculoskeletal and connective tissue-associated ADEs

PT	阿瑞匹坦					福沙匹坦					奈妥匹坦
	报告例数	ROR	95%CI 下限 (ROR)	PRR	χ^2	报告例数	ROR	95%CI 下限 (ROR)	PRR	χ^2	—
关节沉积	3	939.01	285.69	936.87	2541.70	—	—	—	—	—	—
手畸形	4	4.34	1.62	4.33	10.23	—	—	—	—	—	—
滑膜炎	4	3.00	1.12	2.99	5.32	—	—	—	—	—	—
背痛	—	—	—	—	—	103	7.68	6.28	7.14	549.79	—

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；在已知性别的患者中，女性患者的报告例数明显高于男性患者，提示 NK-1RA 的 ADE 发生率可能具有性别特异性^[17]，但中老年、女性等是否为 NK-1RA ADE 的危险因素有待进一步验证。从上报国家来看，三种 NK-1RA 的 ADE 报告国家主要为美国及其他欧美国家，这可能与药品在不同国家上市时间有关，且 FAERS 数据库为美国 FDA 不良事件报告系统，存在上报者地域信息的差异性；亚洲地区（韩国、日本除外）报告数相对较少且可能严重被低估^[18]。

3.2 三种 NK-1RA 主要涉及的 SOC 分析

本研究通过 FAERS 数据库得到三种 NK-1RA 的 ADE 信号，经 ROR 法和 MHRA 法阈值筛选后，信号主要集中在全身性疾病及给药部位各种反应、胃肠道系统疾病、各类神经系统疾病等方面，包括食欲减退、呃逆、消化不良、疲乏等。这些 ADE 均收录在药品说明书，也与一些文献报道、临床随机试验的结果类似^[19-21]，证明了 FAERS 数据的可靠性及研究方法的可行性。

本研究结果显示，福沙匹坦在全身性疾病

及给药部位各种反应相关 ADE 发生率及关联性均较高，尤以注射部位血管炎、输液部位静脉炎、输液相关超敏反应突出。注射用福沙匹坦双葡甲胺是阿瑞匹坦的前药，含有非离子表面活性剂聚山梨酯 80。聚山梨酯 80 是一种生物活性化合物，广泛应用于多种静脉注射制剂中，如多西他赛和重组人促红素注射液^[22]。在使用这些药物期间和之后的超敏全身反应 (HSRs) 和输液不良事件 (ISAEs) 可能部分是由于聚山梨酯 80 的存在，常表现为过敏、注射或输注部位疼痛、红斑和血栓性静脉炎等^[23]。一项 III 期临床试验结果显示，与阿瑞匹坦相比，福沙匹坦的 ISAEs 总发生率分别为 2.2% 和 0.4%^[24]。本研究结果也提示在免疫系统疾病、血管及淋巴系统疾病中福沙匹坦的速发严重过敏反应、输液相关超敏反应、潮红及静脉炎的发生率和关联性显著高于阿瑞匹坦及奈妥匹坦。日本一项关于福沙匹坦 ISAEs 的回顾性研究表明，在使用 HEC 的乳腺癌患者中，经由中心静脉导管输注福沙匹坦可降低 ISAEs 的发生率^[25]。国内有关文章建议临床在输注福沙匹坦

时还可考虑使用低浓度的福沙匹坦溶液和延长输注时间 30 min 以上^[26]。此外,一项关于静脉注射用阿瑞匹坦 (HTX-019) 和福沙匹坦在健康受试者中的安全性的研究显示:不含聚山梨酯 80 和其他合成表面活性剂的阿瑞匹坦制剂比福沙匹坦更安全^[27]。奈妥匹坦虽无数据检出,但其复方制剂中的另一成分帕洛诺司琼注射液上市后报道过十分罕见的过敏反应、速发过敏反应及休克。

NK-1RA 胃肠道系统的 ADE 主要表现为消化不良、便秘、食欲不佳等。阿瑞匹坦已被证明具有促溃疡愈合作用,当作为抗恶心和呕吐药物给予接受化疗的癌症患者时,显示出对胃肠道疾病的保护作用,并被认为没有必要添加新的胃保护剂^[28]。奈妥匹坦/帕洛诺司琼 (NEPA; Akynzeo) 是一种新型口服固定剂量复方药物,由 300 mg 奈妥匹坦和 0.50 mg 帕洛诺司琼 (第二代 5-HT₃ 受体拮抗剂,是第一个也是目前唯一一个具有预防迟发性 CINV 特定适应证的 5-HT₃ 受体拮抗剂^[29]) 组成。奈妥匹坦/帕洛诺司琼已在美国和欧盟获批用于预防成人 CINV^[30]; 一项关于奈妥匹坦/帕洛诺司琼预防中度致吐化疗后引起的恶心和呕吐的有效性和安全性的随机 III 期临床研究显示:最常见的 ADE 是头痛和便秘,没有导致停药或死亡的相关不良事件^[31]。综上, NK-1RA 胃肠道系统 ADE 虽然常见但不严重。值得关注的是本研究结果显示阿瑞匹坦、奈妥匹坦在延迟性恶心方面关联性较福沙匹坦低。延迟性恶心的控制效果不如呕吐,目前仍然是临床上亟待解决的问题^[32-33]。一项基于接受顺铂的 HEC 的 II 期临床试验结果证实服用奈妥匹坦的患者在治疗延迟性恶心方面获益^[34]。但一项关于注射用福沙匹坦双葡甲胺对比阿瑞匹坦预防国人高致吐性化疗所致的恶心、呕吐的随机、双盲、III 期临床试验结果显示,试验组和对照组中无显著恶心率、无恶心率以及对恶心呕吐的总体满意度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)^[35]。迄今为止,只有很少研究表明,添加 NK-1RA 到双药止吐方案可以显著改善恶心^[4],也没有关于 NK-1RA 对化疗相关恶心的预防或治疗确切有效的结论^[7],还需要更多的研究及更好的止吐方案来改善恶心控制效果。

3.3 其他显著 ADE 分析

注射用福沙匹坦双葡甲胺说明书指出,其在与异环磷酰胺合用后有报告出现异环磷酰胺诱导的神经毒性事件;一些研究也表明,给予阿瑞匹坦后神经毒性事件发生率高达 26%^[36]。但有研究

指出异环磷酰胺诱导的神经毒性与阿瑞匹坦给药之间并没有统计学上的显著关联^[37],同时使用阿瑞匹坦和异环磷酰胺在神经毒性方面具有安全的结局^[38-39]。为解释相关神经毒性 ADE 的发生,有文献指出由于阿瑞匹坦或福沙匹坦的 CYP3A4 抑制作用,异环磷酰胺浓度的药代动力学发生显著变化;但一项评估阿瑞匹坦对异环磷酰胺药代动力学影响的研究却显示在使用阿瑞匹坦后未检测到异环磷酰胺浓度的实质性变化^[37]。综上,临床需要进一步的研究及更大的数据来对 NK-1RA 与异环磷酰胺诱导的神经毒性之间的关联性进行论证。对于呃逆、呼吸困难、喉咙紧缩感等 ADE,福沙匹坦的发生率和关联性显著高于阿瑞匹坦、奈妥匹坦。一项基于阿瑞匹坦用于肺癌咳嗽的临床随机双盲对照试验结果显示阿瑞匹坦组的咳嗽频率较对照组有所改善,这可能与阻断 NK-1RA 的 P 物质 (SP) 激活有关^[40]。另一项关于阿瑞匹坦用于预防急性肺损伤的随机、对照试验结果显示,阿瑞匹坦可能是减少脓毒症引起的肺损伤的新的潜在治疗选择^[41]。对于原有呼吸系统疾病的患者,使用阿瑞匹坦的安全性可能更高。

NK-1RA 被认为是治疗肌腱病、类风湿关节炎和骨关节炎有希望的药物^[42]。肌肉骨骼疾病是一组影响脊柱和四肢肌肉、肌腱和骨骼的异质性疾病。SP 是一种神经炎症介质,由感觉神经纤维和局部炎症细胞产生^[43],在许多生理和病理生理功能 (如炎症、血管生成和疼痛) 中起重要作用。SP-NK1R 通路在各种炎症性疾病中的异常表达为其参与炎症过程提供了可能性^[44]。本研究结果显示阿瑞匹坦与关节沉积的发生率不高但关联性较强,提示这一 ADE 虽然罕见但可能与阿瑞匹坦密切相关,这一点在药品说明书中并未提及;其发生可能与 SP-NK1R 通路的激活有关。注射用福沙匹坦为阿瑞匹坦的前药,其结果中却未提示这一 ADE,可能与阿瑞匹坦上市时间最早,药品使用率高, ADE 上报例数多有关;这也提示临床在后续治疗中注意识别福沙匹坦及奈妥匹坦有无关节沉积等 ADE 并积极上报。有研究表明阿瑞匹坦与治疗期间血清肝酶升高有关,但临床特异性肝损伤病例与黄疸之间没有证实的相关性^[38];一些临床前研究结果却显示,阿瑞匹坦对化疗药物顺铂诱导的肝毒性和肾毒性具有保护作用^[45-46]。综上,阿瑞匹坦引起的严重肝损伤可能罕见。

3.4 研究局限性

本研究为上市后 ADE 信号研究,数据来源于真实世界,样本量大,是评价药品安全风

险的重要方法,但仍存在一定的局限性。首先,FAERS 数据库是自发呈报系统,报告来源比较复杂,且多数为欧美国家,不可避免发生报告不准确、少报和漏报的现象,可能导致研究结果产生偏倚^[47]。其次,虽然已有研究证明 ROR 法和 MHRA 法能减少数据偏倚使结果获得较好的一致性^[48],但在特定条件下依然会出现假阳性信号^[49]。再次,由于数据库的局限性,缺少全部用药人群的信息,没有分母,不能计算目标药物 NK-1RA 的 ADE 发生率;其挖掘到的 ADE 信号仅阐述了 NK-1RA 与该信号存在统计学上的关联性^[50],仅对临床选用药物提供参考,临床决策时仍需依据高质量的临床试验研究。

4 结论

三种 NK-1RA 不良反应主要累及 SOC 为全身性疾病及给药部位各种反应、胃肠道疾病、血液及淋巴系统疾病等。其中,阿瑞匹坦与关节沉积、脑病、口腔黏膜变粗糙有很强的相关性,这一类不良反应可能与 SP 的激活相关;福沙匹坦在注射部位血管炎、静脉炎、输液部位静脉炎、速发严重过敏反应强相关性则与聚山梨酯 80 密切相关;奈妥匹坦与中性粒细胞减少性结肠炎强关联除了 SP 激活,其是否与奈妥匹坦另一组成成分帕洛诺司琼相关则需进一步的临床研究及数据来论证。本研究对临床安全用药提供了一定的参考,发现多个新的不良反应信号,丰富了 NK-1RA 的 ADE 信息,有助于降低用药风险。

参考文献

- Frame DG. Best practice management of CINV in oncology patients: I. physiology and treatment of CINV. multiple neurotransmitters and receptors and the need for combination therapeutic approaches [J]. *J Support Oncol*, 2010, 8 (2 Suppl 1): 5-9.
- Desch CE, Mcniff KK, Schneider EC, et al. American society of clinical oncology/national comprehensive cancer network quality measures [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26 (21): 3631-3637.
- Kin HK, Hsieh R, Chan A, et al. Impact of CINV in earlier cycles on CINV and chemotherapy regimen modification in subsequent cycles in Asia pacific clinical practice [J]. *Support Care Cancer*, 2015, 23 (1): 293-300.
- Navari RM, Schwartzberg LS. Evolving role of neurokinin 1-receptor antagonists for chemotherapy-induced nausea and vomiting [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6459-6478.
- Pojawa-Gołęb M, Jaworecka K, Reich A. NK-1 receptor antagonists and pruritus: review of current literature [J]. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2019, 9 (3): 391-405.
- Aapro M, Carides A, Rapoport BL, et al. Aprepitant and fosaprepitant: a 10-year review of efficacy and safety [J]. *Oncologist*, 2015, 20 (4): 450-458.
- Bosnjak SM, Gralla RJ, Schwartzberg L. Prevention of chemotherapy-induced nausea: the role of neurokinin-1 (NK (1)) receptor antagonists [J]. *Support Care Cancer*, 2017, 25 (5): 1661-1671.
- Hesketh PJ, Kris MG, Basch E, et al. Antiemetics: ASCO guideline update [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38 (24): 2782-2797.
- Wichelmann TA, Abdulmujeeb S, Ehrenpreis ED. Bevacizumab and gastrointestinal perforations: a review from the FDA adverse event reporting system (FAERS) database [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2021, 54 (10): 1290-1297.
- Hu YY, Gong J, Zhang LF, et al. Colitis following the use of immune checkpoint inhibitors: a real-world analysis of spontaneous reports submitted to the FDA adverse event reporting system [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106601.
- Kadoyama K, Sakaeda T, Tamon A, et al. Adverse event profile of tigecycline: data mining of the public version of the U. S. food and drug administration adverse event reporting system [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35 (6): 967-970.
- Sakaeda T, Tamon A, Kadoyama K, et al. Data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10 (7): 796-803.
- Shu YM, Ding YF, Dai B, et al. A real-world pharmacovigilance study of axitinib: data mining of the public version of FDA adverse event reporting system [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2022, 21 (4): 563-572.
- Hu WP, Chen L, Li HL, et al. Eye disorders associated with newer antiepileptic drugs: a real-world disproportionality analysis of FDA adverse event reporting system [J]. *Seizure*, 2022, 96: 66-73.
- Trotti A, Colevas AD, Setser A, et al. Patient-reported outcomes and the evolution of adverse event reporting in oncology [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25 (32): 5121-5127.
- Schaeffer C, Booton L, Halleck J, et al. Big data management in US hospitals: benefits and barriers [J]. *Health Care Manag (Frederick)*, 2017, 36 (1): 87-95.
- Zhao YY, Zhao B, Chen G, et al. Validation of different personalized risk models of chemotherapy-induced nausea and vomiting: results of a randomized, double-blind, phase III trial of fosaprepitant for cancer patients treated with high-dose cisplatin [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2023, 43 (2): 246-256.
- 谈仪炯, 席宇飞, 范国荣, 等. 唑来膦酸注射液不良反应信号的挖掘与评价 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (2): 441-447.
- 于丽婷, 王卓, 周芬, 等. 神经激肽 1 受体拮抗剂预防肿瘤患儿高致吐化疗药物相关恶心呕吐的有效性和安全性评估 [J]. *临床儿科杂志*, 2022, 40 (1): 34-39.
- 何斯怡, 张敏, 陆筱灵, 等. 福沙匹坦双葡甲胺联合 5-HT3 拮抗剂及地塞米松预防高致吐化疗药物所致恶心呕吐的疗效及安全性 [J]. *当代医学*, 2022, 28 (11): 66-68.
- 陆浩威. 奈妥匹坦帕洛诺司琼联合沙利度胺预防高致吐化疗所致恶心呕吐的疗效观察 [D]. 青海: 青海大学, 2022.
- Garnock-jones KP. Fosaprepitant dimeglumine: a review in the prevention of nausea and vomiting associated with che-

- motherapy [J]. *Drugs*, 2016, 76 (14): 1365-1372.
- [23] Boccia R, Geller RB, Clendeninn N, et al. Hypersensitivity and infusion-site adverse events with intravenous fosaprepitant after anthracycline-containing chemotherapy: a retrospective study [J]. *Future Oncol*, 2019, 15 (3): 297-303.
- [24] Schwartzberg LS, Navari RM. Safety of polysorbate 80 in the oncology setting [J]. *Adv Ther*, 2018, 35 (6): 754-767.
- [25] Tsuda T, Kyomori C, Mizukami T, et al. Infusion site adverse events in breast cancer patients receiving highly emetic chemotherapy with prophylactic anti-emetic treatment with aprepitant and fosaprepitant: a retrospective comparison [J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 4 (4): 603-606.
- [26] 刘迅, 陈力, 陈乾, 等. 基于 FAERS 数据库的福沙匹坦不良事件信号挖掘 [J]. *中国药业*, 2023, 32 (11): 102-107.
- [27] Ottoboni T, Lauw M, Keller MR, et al. HTX-019 via 2-min injection or 30-min infusion in healthy subjects [J]. *Future Oncol*, 2019, 15 (8): 865-874.
- [28] Ugan RA, Un H, Kose D, et al. Can aprepitant used for nausea and vomiting be good gastrointestinal complaints? [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393 (12): 2463-2472.
- [29] Celio L, Niger M, Ricchini F, et al. Palonosetron in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: an evidence-based review of safety, efficacy, and place in therapy [J]. *Core Evid*, 2015, 10: 75-87.
- [30] Shirley M. Netupitant/palonosetron: a review in chemotherapy-induced nausea and vomiting [J]. *Drugs*, 2021, 81 (11): 1331-1342.
- [31] Aapro M, Rugo H, Rossi G, et al. A randomized phase III study evaluating the efficacy and safety of NEPA, a fixed-dose combination of netupitant and palonosetron, for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting following moderately emetogenic chemotherapy [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25 (7): 1328-1333.
- [32] Feyer P, Jordan K. Update and new trends in antiemetic therapy: the continuing need for novel therapies [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22 (1): 30-38.
- [33] Roila F, Herrstedt J, Aapro M, et al. Guideline update for MASCC and ESMO in the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting: results of the Perugia consensus conference [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21 Suppl 5: v232-v243.
- [34] Hesketh PJ, Rossi G, Rizzi G, et al. Efficacy and safety of NEPA, an oral combination of netupitant and palonosetron, for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting following highly emetogenic chemotherapy: a randomized dose-ranging pivotal study [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25 (7): 1340-1346.
- [35] 赵宁莉, 李歆, 秦叔逵, 等. 注射用福沙匹坦双葡甲胺对比阿瑞匹坦预防国人高致吐性化疗所致的恶心、呕吐的随机、双盲双模拟、平行对照的多中心 III 期临床试验报告 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2020, 25 (8): 702-709.
- [36] Howell JE, Szabatura AH, Hatfield Seung A, et al. Characterization of the occurrence of ifosfamide-induced neurotoxicity with concomitant aprepitant [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2008, 14 (3): 157-162.
- [37] Vazirian F, Samadi S, Rahimi H, et al. Aprepitant, fosaprepitant and risk of ifosfamide-induced neurotoxicity: a systematic review [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2022, 90 (1): 1-6.
- [38] Xiong J, Zhao GF, Yang SL, et al. Efficacy, tolerability and pharmacokinetic impact of aprepitant in sarcoma patients receiving ifosfamide and doxorubicin chemotherapy: a randomized controlled trial [J]. *Adv Ther*, 2019, 36 (2): 355-364.
- [39] Kusaba H, Kumagai H, Inadomi K, et al. Efficacy analysis of the aprepitant-combined antiemetic prophylaxis for non-round cell soft-tissue sarcoma patients received adriamycin and ifosfamide therapy [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95 (49): e5460.
- [40] Smith JA, Harle A, Dockry R, et al. Aprepitant for cough in lung cancer: a randomized placebo-controlled trial and mechanistic insights [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203 (6): 737-745.
- [41] Kose D, Un H, Ugan RA, et al. Aprepitant: an antiemetic drug, contributes to the prevention of acute lung injury with its anti-inflammatory and antioxidant properties [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73 (10): 1302-1309.
- [42] Ko KR, Lee H, Han SH, et al. Substance P, a promising therapeutic target in musculoskeletal disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (5): 2583.
- [43] Janelins BM, Sumpter TL, Tkacheva OA, et al. Neurokinin-1 receptor agonists bias therapeutic dendritic cells to induce type 1 immunity by licensing host dendritic cells to produce IL-12 [J]. *Blood*, 2013, 121 (15): 2923-2933.
- [44] Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology [J]. *Amino Acids*, 2014, 46 (7): 1727-1750.
- [45] Un H, Ugan RA, Kose D, et al. A novel effect of aprepitant: protection for cisplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 880: 173168.
- [46] Alfieri AB, Cubeddu LX. Role of NK1 receptors on cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2000, 361 (3): 334-338.
- [47] 陈乾, 陈力, 程艺. 基于美国 FAERS 数据库亮丙瑞林和戈舍瑞林不良反应信号检测 [J]. *医药导报*, 2020, 39 (10): 1366-1374.
- [48] 江静, 侯永芳, 刘秀娟, 等. 药品不良反应信号检测方法概述 [J]. *中国药物警戒*, 2010, 7 (2): 78-80.
- [49] 张琪琳, 丁玉峰, 陈力, 等. 基于 FAERS 数据库的芳香化酶抑制剂不良事件信号挖掘研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40 (2): 224-231.
- [50] Rodriguez EM, Staffa JA, Graham DJ. The role of databases in drug postmarketing surveillance [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2001, 10 (5): 407-410.

(收稿日期: 2023-06-16; 修回日期: 2023-07-11)

SWOT 分析儿童专科医院门诊处方前置审核规则库建设的应用与成效

吴国丽¹, 卢晓林², 王荟^{1*} (1. 山西省儿童医院药剂科, 太原 030013; 2. 山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要: 目的 建立儿童专科医院门诊处方前置审核规则库, 提高处方审核效率, 降低儿科不合理处方比例。方法 应用 SWOT 分析法分析处方前置审核规则库建设的优势、劣势、机会、威胁, 据此制订相应的策略并实施。比较规则库实践前后的各项指标, 对实践结果进行评价。结果 实施后, 不合理处方、假阳性处方、假阴性处方率及不合理处方类型均显著低于规则库修改前 ($P < 0.05$)。结论 将 SWOT 分析法运用于儿科门诊处方前置审核规则库建设, 可有效提升处方审核质量, 为门诊处方前置审核在儿科用药安全领域的研究提供有益的思路与经验。

关键词: SWOT 分析; 儿科; 处方前置审核; 规则库; 合理用药

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3345-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.039

Application and effectiveness of outpatient prescriptions pre-audit rules in children's specialist hospitals based on SWOT analysis method

WU Guo-li¹, LU Xiao-lin², WANG Hui^{1*} (1. Department of Pharmacy, Children's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030013; 2. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

Abstract: Objective To establish outpatient prescriptions pre-audit rules in children's specialist hospitals, thereby improving the efficiency of prescription review, and reducing the unreasonable prescription ratio of pediatrics. **Methods** Using SWOT analysis (situation analysis), this paper investigated the strengths, weaknesses, opportunities and threats for the establishment of outpatient prescriptions pre-audit rules in children's specialist hospitals, to develop development strategies. We evaluated practical results by comparing the various indicators before and after the rule base. **Results** After the implementation, the unreasonable prescription, the false positive prescription and the false negative prescription, unreasonable prescription types were substantially lower than those before the regular library modification. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Accordingly, the SWOT analysis method is applied to create a set of outpatient prescriptions pre-audit rules of children's specialist hospitals, which can effectively enhance prescription quality, and provide favorable ideas and experiences for the prevention of outpatient prevention in the field of pediatric medication safety.

Key words: SWOT analysis; pediatrics; prescription pre-audit; rule base; reasonable medication

为促进临床合理用药, 保障患者用药安全。在 2018 年 7 月, 国家卫生健康委员会发布了《医疗机构处方审核规范》^[1], 并要求“所有处方均应当经审核通过后方可进入划价收费和调配环节, 未经审核通过的处方不得收费和调配”“医疗机构应当积极推进处方审核信息化, 通过信息系统为处方审核

提供必要的信息”。为落实国家政策, 全国各地医疗机构逐渐开展了通用型合理用药软件辅助的处方前置审核工作, 使用单位多为综合医院, 服务对象主要是成人患者^[2-3]。由于儿童特殊的生理特征及用药特点^[4], 目前尚无统一的适合儿童的合理用药软件的处方前置审核规则库^[5-6]。

基金项目: 山西省基础研究计划青年科学基金项目 (No. 20210302124586); 山西省儿童医院院内基金项目 (No. 2021042)。

作者简介: 吴国丽, 女, 主管药师, 主要从事医院药学和处方审核工作, email: 940371919@qq.com *通信作者: 王荟, 女, 主任药师, 主要从事医院药学和临床药学研究, email: 13834131534@139.com

SWOT 分析法即态势分析法, 是 20 世纪 80 年代初由美国旧金山大学的管理学教授韦里克提出的一种战略选择工具^[7], 是在密切分析所需研究对象的主要内部优势 S (strength)、劣势 W (weakness)、外部机会 O (opportunity) 和威胁 T (threat) 等因素的基础上, 再构建 SWOT 分析矩阵, 从而得出相应的带有决策性质的结论。

本文通过应用 SWOT 分析法对当前通用型合理用药软件辅助的儿童专科医院门诊处方前置审核中发现的共性和特殊问题进行汇总及科学分析, 结合儿童的特殊性, 制订儿童专科医院门诊处方前置审核规则库, 提高处方的合理比例。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集合理用药软件 (即处方前置审核系统) 在 2020 年 3—8 月处方前置审核规则库修改前与 2021 年 3—8 月规则库修改后的数据信息。

1.2 方法

门诊处方前置审核规则库修改前期, 药剂科成员通过查阅政策和文献, 结合医院门诊出诊医师访谈内容, 对合理用药软件运行状态进行实地调研, 探讨存在的问题, 提出规则库修改的合理建议。资料整合后, 通过 SWOT 分析法, 集思广益找出儿童专科医院门诊处方前置审核规则库建立的内部优势 S 和劣势 W, 以及外部机会 O 和威胁 T, 并提出儿童专科医院门诊处方前置审核规则库建设的发展策略。

1.2.1 不合理处方 选取 2020 年 3—8 月与 2021 年 3—8 月两个期间的不合理处方。

1.2.2 假阳性处方 假阳性处方为实际合理而点评系统筛选出的问题处方。每月抽查合理用药软件审核为不合理的处方 1000 张, 审方药师复查并判断假阳性处方。

1.2.3 假阴性处方 假阴性处方在实际审方过程中发现, 但系统筛选不出来的问题处方。每月抽查合理用药软件审核通过的合理处方 1000 张, 审方药师复查并判断假阴性处方。

1.2.4 不合理处方类型分析 对随机抽取的处方进行回顾性处方点评分析, 比较规则库修改前后的不合理处方类型变化。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学处理, 计数资料选择 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 SWOT 在儿童专科医院门诊处方前置审核规则库建设的应用

该院在使用通用型合理用药软件辅助门诊

处方前置审核中发现许多影响因素, 因此应用 SWOT 调查、列举、分析儿科处方前置审核规则库建设相关的 S、W、O、T 因素, 并据此制订策略方案加以实施。

2.1 优势分析

2.1.1 医院综合实力与科室优势 山西省儿童医院, 是一所为全省妇女儿童提供全方位多层次医疗、保健、预防、康复技术服务的三级甲等省级医院。年诊疗 140 万余人次, 平台优良, 处方前置审核信息资源丰富。

2.1.2 合理用药软件技术支持 本院使用上海卫宁公司合理用药软件 V5.0, 进行“系统审核+问题处方人工复核”的审方模式。合理用药软件针对临床工作需求, 可以提供知识库功能, 进行相关知识查询^[8]。审方药师可以借助强有力的信息系统, 高效快捷地全方位审核, 既提高了审方效率, 又避免了系统的非智能化, 系统实现了院内互联互通, 可以在线实时与临床医师进行处方审核问题联络沟通 (流程详见图 1)。

2.1.3 学习培训资源丰富 科室为加速药师转型, 提升药学技术服务质量, 先后选派药师参加了“山西省医院药师处方审核能力”培训班。药剂科每月定期更新药学期报, 实时了解药学信息。组建处方前置审核小组, 每月对门诊处方前置审核总结、维护, 这些处方审核经验, 都是我们丰富的学习资源。

2.2 劣势分析

2.2.1 工作量大、相关临床专业知识缺乏 基于儿童专科医院处方量大、儿科用药复杂、处方审核时间短、超说明书用药等原因, 处方审核很难细致、全面地对患儿同科室和跨科室处方用药的合理性进行审核。比如戊酸雌二醇片说明书中儿童用药项下写明不用于儿童和青少年, 系统会判定儿童和青少年使用戊酸雌二醇片为不合理处方, 但是特纳综合征青少年可以使用雌激素^[9]。

2.2.2 目前尚无较成熟的儿科处方前置审核规则库可供参考 有研究对我国医疗机构处方前置审核开展的现状进行分析, 发现目前我国开展医疗机构处方前置审核的主要是综合性医院, 儿童专科医院较少^[10-11]。目前通用型的合理用药软件, 主要服务对象是成人患者, 存在“假阳性”和“假阴性”比例较高的问题。由于儿童特殊的生理特征及用药特点, 合理用药软件在使用时除了成人医院使用已有问题以外, 还存在一些儿童专科医院特有的问题^[11]。因此需要建立针对儿童的合理用药软件规则库。

2.2.3 缺乏专业性审方药师 审方药师不仅要有

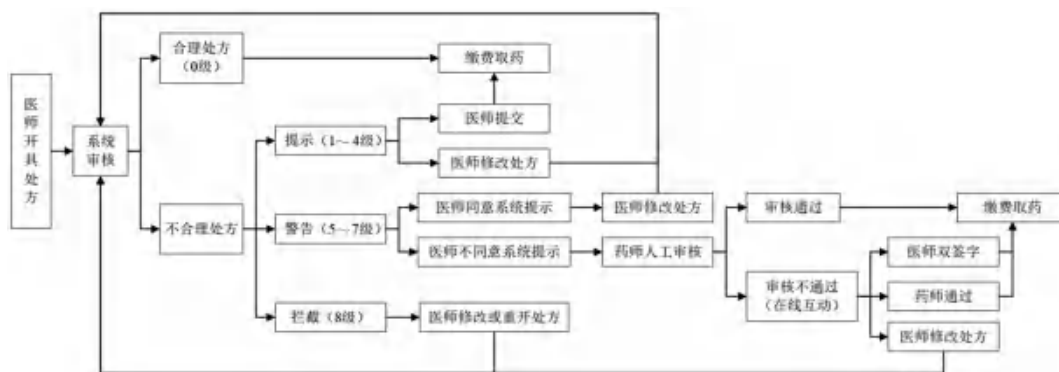


图1 处方前置审核系统流程

Fig 1 Workflow of prescriptions pre-audit system

相关工作经验，还需要经过系统的处方审核培训方能胜任。审方药师的多少与水平直接影响规则库建立的数据准确性、深入程度、研究可持续性，进而影响到医院合理用药工作的进行。

2.2.4 返聘老专家实行难度大，旧规难破 处方前置审核规则库修改前走访本院 37 位医师对合理用药软件的意见，发现返聘的老专家对软件的信息提示和警示信息不关注，习惯性地使用传统的用药经验。对合理用药软件缺乏认知，认为其提示预警信息较为烦琐，限制了医师开药的权限。

2.3 机会分析

2.3.1 宏观政策扶持：国家政策战略的需求 2020 年 2 月 21 日，《关于加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见》^[12] 的通知，要求强化药师或其他药学技术人员对处方的审核。所有处方均应经过药师审核后，才可进入划价收费与处方调配的环节。这意味着处方前置审核已经成为硬性要求，药师审核处方是保证患者用药安全的一道屏障。

2.3.2 增强竞争力，模式新颖，研究趋势明显 目前国内处方前置审核开展的并不多，但是相关研究的热度和趋势却很明显。因此，我们应加快儿科处方前置审核规则库的建立，进一步拓宽医院的服务功能，增强医院在医疗卫生事业中的竞争力，全面提高医院的服务水平。

2.3.3 临床医师对合理用药软件的需求增加 合理用药软件可以实现个体化审核配制，比如超说明书用药的药品信息、特殊人群（儿童、妊娠、哺乳、肝肾功能受损等）用药，方便医师进行相关信息的使用，提高工作效率，防止患者意外的发生，减少患者往返医院的时间。

2.4 威胁分析

2.4.1 药学服务模式的转变，对药师自身素质和能力要求更高 信息化的合理用药处方前置审核工作逐渐成为药学服务的重要组成部分^[13]。要

求审方药师自身应具有更高要求的药学专业素质^[14]，尤其是针对儿童专科处方前置审核的审方药师。目前国内对药师素质的关注主要集中在专业知识和综合技能的培养方面，隐性素质培养方面相对较少，未来仍需提升内涵素养，推动药学服务整体发展。

2.4.2 规则库标准不一，儿科处方审核规则库建立实施周期较长 我国合理用药软件的应用仍处于初级阶段，因此迫切需要探索建立标准化、同质化、规范化的规则库建设体系^[15]。由于儿科用药的复杂性，儿科规则库的完善必须有前期积累的病例或丰富的经验才能够顺利完成，如此周而复始，不断促进处方审核质量的提高，因此儿科处方审核规则库建立实施周期更长。

2.4.3 药师与医师沟通不畅 审方药师发现问题处方后需及时与医师沟通，目前主要采用合理用药软件在线交流平台的方式，缺乏面对面沟通的直接性，存在问题的滞后性。药师修改规则库应及时发布到医药交流群，方便医师快速、准确开具处方。药师应通过多渠道（交流会、讲座）向医师介绍和宣传处方前置审核规则库，加强药师的沟通能力以及处方前置审核工作对医师的宣传力度。

随着医疗改革的深化，审方药师应明确自身定位，从而抓住机遇、立足优势、克服劣势、化解威胁，积极探索处方前置审核的药学服务模式，建立全方位的儿科处方前置审核规则库，逐步获得医患认可。

3 效果评价

现对我院儿科处方前置审核规则库建设前后的实施结果进行分析及评价。

3.1 假阳性处方率

2020 年 3—8 月规则库修改前假阳性处方率基本大于 5%，主要问题为用法用量不适宜。2021 年 3—8 月规则库修改后，假阳性处方率低于 1%，效果理想。

3.2 假阴性处方率

2020 年 3—8 月规则库修改前假阴性处方率基本大于 5%，主要问题为常见含毒性成分饮片的中成药不宜联合使用；药品剂型或给药途径不适宜等。2021 年 3—8 月规则库修改后，假阴性处方率低于 1%，效果理想。

3.3 不合理处方占比明显下降

合理用药软件进行门诊处方前置审核大大简化了传统人工处方审核的压力。门诊处方前置审核中 1~4 级处方，5~8 级处方占总处方的比例分别从 2020 年 3—8 月规则库修改前的 19.87%、1.83% 下降至 2021 年 3—8 月规则库修改后的 14.47%、0.40% ($P < 0.001$)，门诊医师对系统的适应性和用药的合理性逐月提高 (见表 1)。

表 1 处方前置审核规则库建设前后的不合理处方比例

时间	门诊处方审核总数	不合理处方 [n (%)]	1~4 级不合理处方 [n (%)]	5~8 级不合理处方 [n (%)]
2020 年 3—8 月 (规则库修改前)	320 078	69 458 (21.7)	63 612 (19.87)	5846 (1.83)
2021 年 3—8 月 (规则库修改后)	317 036	47 138 (14.87)	45 874 (14.47)	1264 (0.40)
χ^2		4972.30	3268.64	2942.15
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001

3.4 不合理处方类型分析

规则库修改前后的不合理处方中，给药剂量错误、适应证不适宜的占比均较高，其他不合理处方类型在规则库修改后比例显著下降，见表 2。

表 2 处方前置审核规则库建设前后的不合理处方类型变化 [n(%)]

Tab 2 Changes of unreasonable prescription types before and after the construction of the prescription pre-audit rule library [n(%)]

不合理处方类型	2020 年 3—8 月 (规则库修改前)	2021 年 3—8 月 (规则库修改后)
给药途径错误	35 (3.5)	0 (0.0)
给药频次错误	27 (2.7)	5 (0.5)
给药剂量错误	89 (8.9)	59 (5.9)
重复用药	15 (1.5)	79 (0.7)
超说明书用药	5 (0.5)	1 (0.1)
适应证不适宜	56 (5.6)	32 (3.2)

① 给药途径错误：处方诊断为支气管炎，处方开具注射用头孢孟多酯钠 (0.5 g po bid)。注射用头孢孟多酯钠给药途径应为肌肉注射。系统审核发现为不合理处方，审方药师经过复核，将这一类型问题，统一设置为 8 级处方，属于处方绝对错误情况，系统直接驳回，无需药师审核，直接提示医师必须修改处方。规则库修改后，给药途径错误比例降为 0。

② 给药频次错误：处方诊断为性早熟，处方开具注射用醋酸亮丙瑞林微球 (3.75 mg ih qd)。注射用醋酸亮丙瑞林微球给药频次应为每 4 周 1 次。系统审核发现为不合理处方，审方药师经过复核，将这一类型问题统一汇总与医师沟通后，医师更改处方。处方诊断为支气管炎，处方开具注射用头孢孟多酯钠 (0.5 g im bid)。注射用头孢孟多酯钠说明书婴幼儿给药频次为每隔 4~8 h 给药一次，由于实际工作的限制，婴幼儿肌肉注射目前为一日两次，审方药师继续和医师沟通中。目前给药频次错误问题比例明显下降。

③ 给药剂量错误：占有提示问题的 50% 以上。一方面，有可能是医师剂量单位书写错误，比如 125 mg 书写为 125 g，超过单次给药最大剂量，系统直接拦截。另一方面，对于儿童用法用量信息缺失的药品，临床实际使用时需要根据患儿年龄或体重等进行剂量调整，用药剂量往往低于成人剂量，而审方系统以说明书中成人剂量为标准，判为用法用量不适宜，往往属于误判。同时临床上会考虑经济学因素，如体重 11 kg 患儿使用阿奇霉素干混悬剂 (规格为 0.1 g) 时，其医嘱用量可能为 0.1 g (1 包) 而不是 0.11 g。因此审方药师需要根据儿童专科医院的临床需求，建立适合儿童专科医院的用法用量审核规则库，进一步提高审核效率。

④ 重复用药：处方诊断为支气管炎，处方开具氨溴特罗口服溶液和盐酸丙卡特罗口服溶液。其中克仑特罗和丙卡特罗均为 β 受体激动剂，起到舒张支气管平滑肌的作用，属于重复用药。系统审核为不合理处方，审方药师与医师沟通后，医师更改处方。

⑤ 超说明书用药：处方诊断为癫痫，医师开具左卡尼汀口服液。处方为超说明书用药，建议医师填写超说明书备案表，经过医院药事委员会审核通过后，方可开具。

⑥ 适应证不适宜：处方诊断为系统性红斑狼疮，使用大剂量激素冲击疗法时，为预防不良反应，医师会开具维生素 D 和钙制剂。适应证的审核是基于药品说明书，若诊断字段在说明书适应证以外，则系统弹框提示，系统审核缺乏逻辑。建议针对不同适应证完善预防不良反应的用药规则库。

4 讨论与总结

目前处方前置审核软件的发展处于初级阶段，以通用审核规则库为基础，其内容框架、数

据来源与临床实际契合程度不高, 缺乏儿童专科特色的个体化审核规则库。因此本文运用 SWOT 分析法充分了解处方前置审核合理用药软件的 S、W、O、T 等情况, 从而针对儿童特殊的生理特征及用药特点, 建立儿童专科医院特有的处方前置审核规则库。

儿童专科医院自主的处方审核信息规则库的建立, 可以较好地解决本院药师人工审核出现的问题, 使处方审核质量达到同质化, 提高处方审核的审核效率, 降低了处方不合理比率, 提高医师对问题处方的重视度, 规范医师处方开具, 降低患者的用药风险。

本研究结果显示规则库修改后用法用量问题占不合理处方类型提示问题的 50% 以上。对于药品说明书缺失儿童用法用量信息以及儿童用药酌减的情况, 临床实际使用时医师需要根据患儿年龄、体重以及其特定发育过程进行全面评价以进行剂量调整, 而软件严格按照说明书中的成人剂量进行审核, 判为用法用量不适宜。对于有儿童用药信息的药品, 年龄、体重及医嘱用量均与说明书匹配的情况下才会认为合理, 任何一项与说明书不符即予以提示。比如地氯雷他定干混悬剂 (规格: 0.5 g/2.5 mg), 软件按照其主要成分地氯雷他定进行年龄段划分审核, 有的医师按照每袋的重量进行开具, 软件判为用法用量不适宜。

解决措施: 审方中心药师增强事后处方点评, 定期进行归纳总结、讨论分析。药品基本信息维护应增加儿童常用剂量以及剂量误差范围设置等。进一步增进与临床的沟通交流, 邀请临床医师对软件使用过程中发现的问题进行讨论, 达成临床共识后, 纳入数据库。当更换来自不同厂家的同种药品或新药时, 应加强审核监控, 及时更新用药信息, 手动维护针对该药品的自定义规则。

除此之外, 适应证不适宜占不合理处方类型的第二位。软件审核规则的数据绝大多数来源于药品说明书, 若临床诊断在说明书适应证以外, 则系统弹框提示, 软件审核缺乏临床逻辑。这种无效提示会导致医师引起视疲劳, 使潜在的不合理用药的发生率增加。

解决措施: 审方药师根据临床实际使用需求, 定期对处方进行抽查和复审, 针对系统漏判和误判的处方及时调整用药规则。对新药、药品说明书修改及指南共识推荐的信息及时进行系统维护和更新, 添加新的适应证以扩大其涵盖面, 确保处方审核规则设置的准确性, 同时不断精细化不同适应证对应的用法用量。

具有儿科特色的处方前置审核规则库的建立和持续完善可降低前置审核中问题处方的发生率, 提高医师工作效率及临床满意度。审方药师应充分发挥合理用药软件的优势, 完善其审核规则, 积极探索药学服务模式, 为患儿提供更好的全程药学服务。

参考文献

- [1] 黄蓓. 医疗机构处方审核规范 [J]. 中医药管理杂志, 2018, 26 (14): 68-69.
- [2] 洪灵鸿, 吴妙莲, 赵永根, 等. 儿科医院应用通用型合理用药软件及系统改进探讨 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51 (17): 1532-1536.
- [3] Liu JB, Zhang YM, Chen NN, et al. Remote pharmacy service in primary care: the implementation of a cloud-based pre-prescription review system [J]. J Am Pharm Assoc (2003), 2021, 61 (2): 176-182.
- [4] 刘彤, 王娟, 管钰. 我院儿科药房药学服务 SWOT 分析及改进 [J]. 中国药业, 2022, 31 (3): 23-26.
- [5] 吴家锋, 韩媛媛. 医药分开综合改革背景下三级医院门诊改善医疗服务实践探索 [J]. 中国医院, 2017, 21 (10): 14-15.
- [6] 蒋志平, 彭骞, 何莉梅, 等. 儿科药品知识库和合理用药规则库的建立与探讨 [J]. 中南药学, 2020, 18 (6): 1078-1080.
- [7] 李文涛, 尹惠茹, 安力彬. 我国灾难护理学发展的 SWOT 分析 [J]. 中华现代护理杂志, 2009, 15 (35): 3769-3771.
- [8] Moghadam ST, Sadoughi F, Velayati F, et al. The effects of clinical decision support system for prescribing medication on patient outcomes and physician practice performance: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Med Inform Decis Mak, 2021, 21 (1): 98-124.
- [9] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. Turner 综合征儿科诊疗共识 [J]. 中华儿科杂志, 2018, 56 (6): 406-413.
- [10] 李文睿, 李岷, 赵春景, 等. 我国医疗机构处方前置审核开展的现状分析 [J]. 中国药房, 2021, 32 (5): 524-529.
- [11] 洪灵鸿. 大数据技术在儿科临床合理用药中的应用初探 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [12] 卫生健康委教育部财政部人力资源社会保障部医保局药监局. 关于印发加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见的通知 [EB/OL]. (2020-02-26). [2021-10-15]. <https://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/202002/ea3b96d1ac094c47a1fc39cf00f3960e.shtml>.
- [13] 刘玲, 王益富, 沈伟芳, 等. 门诊药房前置审方系统的规则制订与应用效果评价 [J]. 中国药业, 2021, 30 (12): 17-20.
- [14] 李爱国, 杨宏图, 常翠, 等. 审培一体化的医院处方前置审核药师培养模式实践 [J]. 中国药业, 2022, 31 (5): 19-22.
- [15] 武明芬, 史卫忠, 赵志刚. 国内处方前置审核系统的比较 [J]. 中南药学, 2019, 17 (9): 1547-1552.

(收稿日期: 2023-07-08; 修回日期: 2023-08-09)

体外膜氧合支持治疗患者治疗药物监测的文献计量分析

董瑜霜^{1, 2}, 沈丹天², 钟晗^{1*}, 潘波波³, 王卫华³ (1.上海交通大学医学院附属仁济医院药剂科, 上海 200127; 2.宁波市杭州湾医院药学部, 浙江 宁波 315300; 3.宁波市第二医院药学部, 浙江 宁波 315300)

摘要: **目的** 探索体外膜氧合 (ECMO) 支持治疗患者治疗药物监测 (TDM) 的研究现状、热点和发展趋势。**方法** 检索 Web of Science 数据库 ECMO 治疗患者 TDM 相关文献, 以“ECMO”“PK”“TDM”为关键词, 检索年限为 2011—2021 年, 利用 VOSviewer 和 CiteSpace 软件对作者、期刊、国家、机构等进行分析, 可视化展示本领域的研究热点和趋势。**结果** 共纳入 311 篇文献, 发表文献最多的杂志是 *Critical Care*, 机构是昆士兰大学, 作者是 Roberts JA。ECMO 支持治疗患者 TDM 研究热点及趋势是镇静、抗感染、婴幼儿用药、药物体外试验模型研究。**结论** ECMO 支持治疗患者 TDM 研究的地域发展不均衡, 聚焦不足, 作者、机构、国家间的合作关系有待加强, 需进一步在世界范围内展开多中心、对照研究。

关键词: 体外膜氧合; 治疗药物监测; 镇静药; 抗感染药物; 婴幼儿用药

中图分类号: R473.54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)12-3350-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.040

Bibliometric analysis of therapeutic drug monitoring in extracorporeal membrane oxygenation-supported therapy patients

DONG Yu-shuang^{1, 2}, SHEN Dan-tian², ZHONG Han^{1*}, PAN Bo-bo³, WANG Wei-hua³ (1. Department of Pharmacy, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127; 2. Department of Pharmacy, Ningbo Hangzhou Bay Hospital, Ningbo Zhejiang 315300; 3. Department of Pharmacy, Ningbo Second Hospital, Ningbo Zhejiang 315300)

Abstract: Objective To explore the research status, hotspot and development trend of therapeutic drug monitoring (TDM) in patients with extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support therapy. **Methods** The literature related to TDM of ECMO patients was searched from Web of Science database, with “ECMO” “PK” and “TDM” as keywords, and the search period was 2011—2021. Using VOSviewer and CiteSpace software to analyze authors, journals, countries, institutions, visualizing the research hotspots and trends in this field. **Results** Totally 311 literatures were included. The journal with the most publications was *Critical Care*, the institution was the University of Queensland, and the author was Roberts JA. The hot spots and trends in the study of TDM in ECMO patients were sedation, anti-infection, infantile medicine, and in vitro drug test model research. **Conclusion** The regional development of TDM research in ECMO patients is uneven, the focus is insufficient, and the cooperation between authors, institutions and countries needs to be strengthened. This study needs to be further carried out in a multi-center, controlled study worldwide.

Key words: extracorporeal membrane oxygenation; therapeutic drug monitoring; sedative; anti-infective drug; infantile medicine

基金项目: 中华国际医学交流基金会中青年医学研究专项基金 (No.Z-2018-35-2003); 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划-临床药师项目 [No. 沪卫人事 (2021) 99]。

作者简介: 董瑜霜, 女, 初级药师, 主要从事临床药学工作, email: Dongys07@163.com * **通信作者:** 钟晗, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: zhonghan@renji.com

体外膜氧合 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 是严重心肺功能衰竭患者循环支持的重要手段, ECMO 为拯救 COVID-19 重症患者生命发挥了重大作用^[1-2]。ECMO 支持治疗的危重症患者药物药动学 (pharmacokinetics, PK) 受 ECMO 回路、药物性质、重症疾病因素的多重影响, 药物表观分布容积 (apparent volume of distribution, V_d) 和清除率 (clearance, CL) 发生变化, 导致血药浓度不达标, 从而影响其治疗效果^[1, 3]。因此, 探索药物 PK 特点, 对 ECMO 患者开展治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM), 制订个体化给药方案, 对提高治疗成功率有重大意义^[4]。本研究应用文献计量分析工具, 对 ECMO 患者 TDM 研究进行深度挖掘和分析。以期科学识别本领域的研究现状和趋势, 进一步开展高质量 ECMO 相关 TDM 研究, 为优化疾病-药物-装置之间的和谐统一提供参考。

1 材料与方法

1.1 文献检索与数据来源

在 Web of Science (WOS) 数据库检索关于 ECMO 治疗患者 TDM 的文献, 检索策略: TS = (Extracorporeal Membrane Oxygenation OR Extracorporeal Life Support OR ECMO OR ECLS) AND TS = (Pharmacokinetics OR Drug Kinetics OR ADMET OR ADME OR LADMER) AND TS = (Therapeutic Drug Monitoring OR TDM); 检索年限: 2011—2021 年, 文献类型: 论著和综述, 语种无限制。纳入与 ECMO 患者 TDM 研究相关的期刊论文, 剔除个案、新闻、学位论文、会议论文等不相关及重复的文献, 最终纳入 311 篇文献。

1.2 文献计量分析

采用 Endnote X9 对文献去重, 并通过阅读标题和摘要去除与主题无关的文献。将纳入的文献以纯文本形式导出, 导出文件包含文献标题、作者、来源、摘要和引文记录等内容, 以 download_**.txt 命名。使用 Excle 2019 对纳入文献数据进行统计。利用 VOSviewer 软件 (1.6.10 版) 对国家、机构、作者、被引文献、关键词进行分析。使用 gCLUTO (1.0 版) 对高频关键词双聚类进行分析, 探索新兴热点研究领域。运用 CiteSpace 软件 (6.1.R2 版) 进行突现关键词检测, 发现研究趋势并预测未来研究方向^[5]。参数设置: 时间跨度为 2011 年 1 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日, 时间分区为 1 年, 阈值为 Top 50, 剪切选项为关键路径、修剪图形。节点类型选择关键词, 在关键词共现图谱基础上进行突现词分析。

2 结果

2.1 发文情况

对纳入的 311 篇文献按发表年份进行统计。发文量从 2011 年 (12 篇) 至 2021 年 (49 篇) 呈波动式上升, 见图 1。热门研究领域包括药理学、内科学、儿科学、感染病学和心脏病学。

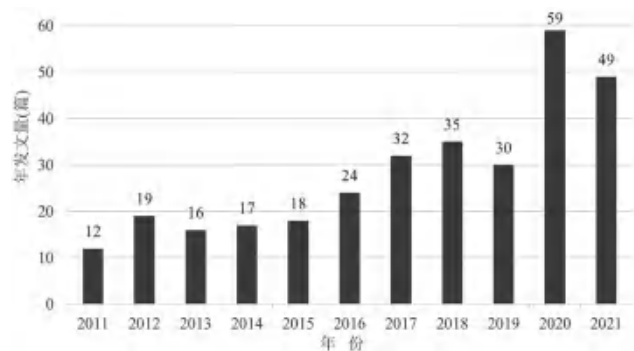


图 1 年发文量统计

Fig 1 Annual publication statistics

2.2 合作关系分析

共 1143 位作者发表了相关论文, 发表 5 篇以上的有 29 位 (见图 2A)。图谱中不同的颜色表示不同的集群, 圆圈大小表示文献发表量, 线条粗细表示关联强度。其中来自昆士兰大学烧伤创伤和重症医学研究中心的 Roberts JA 排名第一 (22 篇), 且与其他作者关联度最大 (被引 850 次, 总关联度为 63), 其研究主要集中在 ECMO 回路中药物的滞留和 ECMO 治疗期间常用药物的 PK。Tibboel D 排名第二 (20 篇), Shekar K 第三 (15 篇), Cohen-Wolkowicz M、Fraser JF 并列第四 (11 篇) (见表 1)。

共 427 个机构发表了相关论文, 发表 5 篇以上的有 29 个 (见图 2B)。其中发文量最多的是 Queensland University (昆士兰大学) (29 篇, 被引 897 次, 总关联度为 39), 主要合作伙伴是 Royal Brisbane & Womens Hospital (皇家布里斯班妇女医院)。排名第二为 Duke University (杜克大学) 20 篇, 见表 1。

共 34 个国家对该领域的出版作出贡献, 发表 5 篇以上的有 16 个 (见图 2C), 其中美国是发文量最多的国家 (116 篇, 被引 1081 次, 总关联度为 56), 说明美国在 ECMO 患者 TDM 的研究占核心地位。其次是澳大利亚 38 篇、荷兰 34 篇、法国 29 篇、比利时 19 篇 (见表 1)。

2.3 高被引文献分析

ECMO 患者 PK 研究文献总被引频次最高的 10 篇见表 2。大部分文献是关于 ECMO 治疗期间常用镇静、镇痛和抗菌药物 PK 变化的队列研究或离体实验。Kiran 等^[6]于 2012 年发表在 *Criti-*

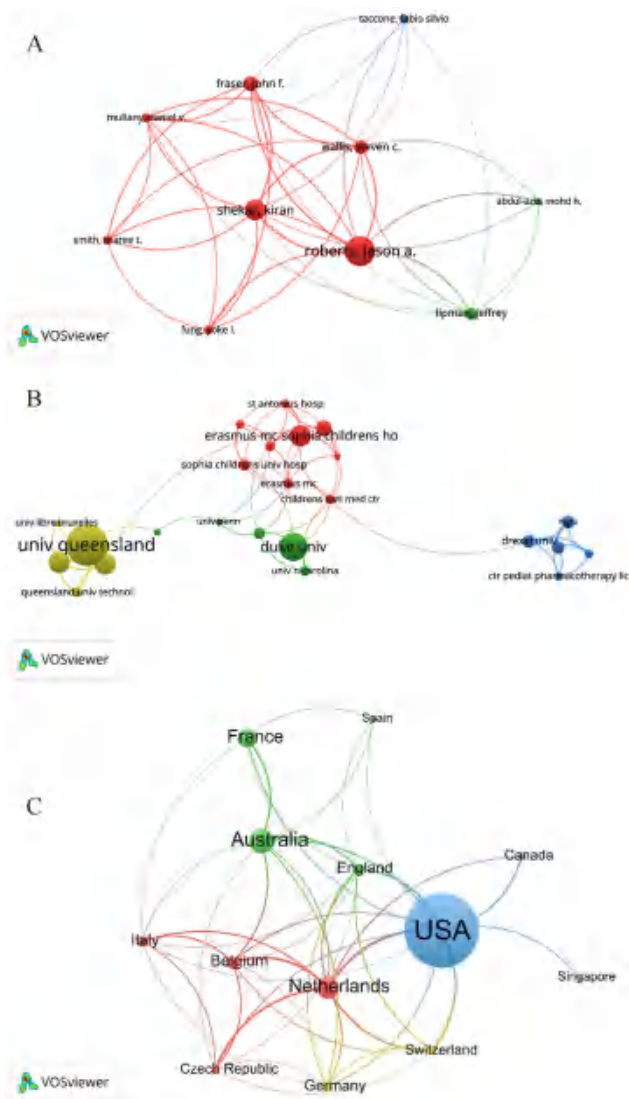


图2 作者 (A)、机构 (B) 及国家 (C) 合作分析图谱
Fig 2 Cooperation analysis map of author (A), institution (B), and country (C)

cal Care 上的“Sequestration of drugs in the circuit may lead to therapeutic failure during extracorporeal membrane oxygenation”是被引用次数最多的文章

(被引用 124 次)。该文章旨在通过离体实验研究 ECMO 回路中常用抗菌药物、镇静剂、镇痛药的隔离程度，发现回路中药物的隔离对药物的选择和剂量都有影响。其次是“Protein-bound drugs are prone to sequestration in the extracorporeal membrane oxygenation circuit: results from an ex vivo study” (被引用 87) 与“Predictors of insufficient amikacin peak concentration in critically ill patients receiving a 25 mg/kg total body weight regimen” (被引用 64 次)。说明以上高被引文献已经成为 ECMO 患者 TDM 研究领域发展的重要知识基础。

2.4 高频关键词共现分析

在检索到的 435 个关键词中，出现 5 次以上的共有 27 个，被定义为高频关键词并纳入共现分析，最常见的关键词是“体外膜氧合” (出现频次 116, 总关联度 220)、“药代动力学” (出现频次 101, 关联度 205)、“药效学” (出现频次 31, 关联度 91)，“儿科” (出现频次 22, 关联度 40)、“治疗药物监测” (出现频次 17, 关联度 36)(见图 3)。

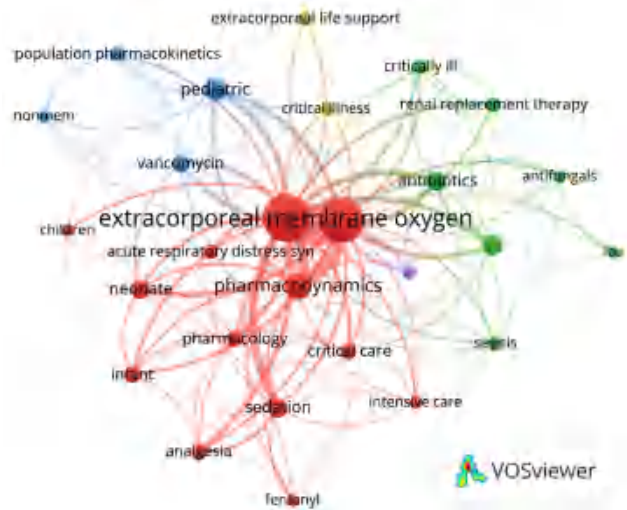


图3 高频关键词共现分析
Fig 3 Co-occurrence analysis of high-frequency keywords

表 1 发文量前 5 的作者、机构、国家

Tab 1 Top 5 authors, institutions and countries in the number of publications

排名	作者	数量	机构	数量	国家	数量
1	Roberts JA	22	Queensland University	29	USA (美国)	116
2	Tibboel D	20	Duke University	20	Australia (澳大利亚)	38
3	Shekar K	15	Erasmus MC Sophia Childrens Hospital	15	Netherlands (荷兰)	34
4	Cohen-Wolkowicz M	11	Prince Charles Hospital	15	France (法国)	29
5	Fraser JF	11	Royal Brisbane & Womens Hospital	15	Belgium (比利时)	19

2.5 高频关键词双聚类分析与研究热点

高频关键词经 gCLUTO 双聚类分析后被分为 5 个集群，并进一步被可视化为热图 (见图 4A) 和山图 (见图 4B)。热图以源文献的序号为横轴，

以高频关键词为纵轴，红色方块颜色越深表示出现频次越高。山图的每个峰代表一个集群，山峰高度与聚类内部相似性成正比，山峰体积与聚类包含的元素数量成正比，峰顶颜色与聚类内部

表 2 被引频次排名前 10 的文章
Tab 2 Top 10 articles cited frequently

排序	标题	杂志	研究类型	出版年	引用频次
1	Sequestration of drugs in the circuit may lead to therapeutic failure during extracorporeal membrane oxygenation	<i>Critical Care</i>	体外研究	2012	124
2	Protein-bound drugs are prone to sequestration in the extracorporeal membrane oxygenation circuit: results from an ex vivo study	<i>Critical Care</i>	体外研究	2015	87
3	Predictors of insufficient amikacin peak concentration in critically ill patients receiving a 25 mg/kg total body weight regimen	<i>Intensive Care Medicine</i>	前瞻性观察性研究	2014	64
4	Fluconazole loading dose pharmacokinetics and safety in infants	<i>Pediatric Infectious Disease Journal</i>	队列研究	2011	62
5	ASAP ECMO: antibiotic, sedative and analgesic pharmacokinetics during extracorporeal membrane oxygenation: a multi-centre study to optimise drug therapy during ecmo	<i>BMC Anesthesiology</i>	多中心药代动力学研究	2012	58
6	Propofol, midazolam, vancomycin and cyclosporine therapeutic drug monitoring in extracorporeal membrane oxygenation circuits primed with whole human blood	<i>Critical Care</i>	体外和细胞实验	2015	52
7	Increased sedation requirements in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation for respiratory and cardiorespiratory failure	<i>Anaesthesia and Intensive Care</i>	回顾性研究	2012	51
8	Vancomycin population pharmacokinetics during extracorporeal membrane oxygenation therapy: a matched cohort study	<i>Critical Care</i>	队列研究	2014	46
9	Scaling clearance in paediatric pharmacokinetics: All models are wrong, which are useful?	<i>British Journal of Clinical Pharmacology</i>	药代动力学研究	2017	45
10	Beta-lactam pharmacokinetics during extracorporeal membrane oxygenation therapy: a case-control study	<i>International Journal of Antimicrobial Agents</i>	病例对照研究	2015	44

的偏差成反比（红色表示标准差小，蓝色表示标准差大）。各聚类描述如下：

聚类 0：万古霉素在儿科中的群体 PK 研究。该类包含万古霉素、人群药代动力学、儿科等 5 个关键词，Cies 等^[7]研究新生儿 ECMO 接受 14 个疗程的万古霉素治疗，表明万古霉素 PK 与非 ECMO 的差异，特别是快速清除的情况下，ECMO 可能导致万古霉素浓度降低。

聚类 1：合并感染或脓毒症的危重患者的抗感染治疗药物监测。该类包含 ICU、抗真菌、感染等 6 个关键词，Jef 等^[8]概述了危重儿童抗菌药物治疗的最佳选择、持续时间、剂量和给药途径。

聚类 2：入住 ICU 的危重症患者的镇静、镇痛治疗。该类包含镇静、重症监护、芬太尼等 6 个关键词，Yang 等^[9]探讨 ECMO 危重成人患者中瑞芬太尼的总体 PK，发现相比非 ECMO 患者，ECMO 患者瑞芬太尼用量和 CL 增加，建议增加剂量达到镇静水平。

聚类 3：ECMO 支持治疗的新生儿或婴儿的 PK/PD 研究。该类包含药效学、ECMO、新生儿等 7 个关键词，Wildschut 等^[10]的文章概述了新生儿和儿童 ECMO 中可用的 PK/PD 研究，提出了改变两者的可能机制，并确定了进一步研究领域。

聚类 4：危重症患者的体外生命支持和肾脏替代治疗（renal replacement therapy, RRT）。该类

包含危重症、肾脏替代疗法、体外生命支持等 5 个关键词，Cheng 等^[11]将 27 例 ECMO 患者入组，其中 14 例接受 RRT，研究哌拉西林 / 他唑巴坦在 ECMO 患者中接受和不接受 RRT 的群体 PK，结果为哌拉西林 / 他唑巴坦的剂量应符合危重症患者的标准建议，以肌酐清除率和 RRT 为指导。

2.6 高频主题词聚类分析

出现频次超过 10 次的主题词定义为高频主题词。本次研究共有 98 个高频主题词，VOSviewer 聚类分析后被分为 4 个集群。红色集群的主题为新生儿、婴儿、儿童人群中的 ECMO 药代动力学模型。绿色集群的主题为 ECMO 回路对镇静镇痛药物和抗菌药物的影响。蓝色集群的主题为 ECMO 治疗患者或非 ECMO 治疗患者和连续肾脏替代治疗患者的群体 PK 研究（见图 5A）。“非线性混合效应”出现 11 次，属于热门主题（见图 5B）。

2.7 突现词分析

利用 CiteSpace 软件对关键词进行突现词检索，按突发起始时间顺序，得到 6 个。由图 6 可见，2011—2016 年突现词“庆大霉素的药代动力学”“体外试验”“失败”，此阶段重点通过体外试验研究庆大霉素在 ECMO 患者中的药代动力学。2018—2021 年突现词为“模型”“影响”“治疗药物监测”，此阶段主要构建药物 PK 模型以及 TDM 研究，其中强度最大的关键词是影响（impact），

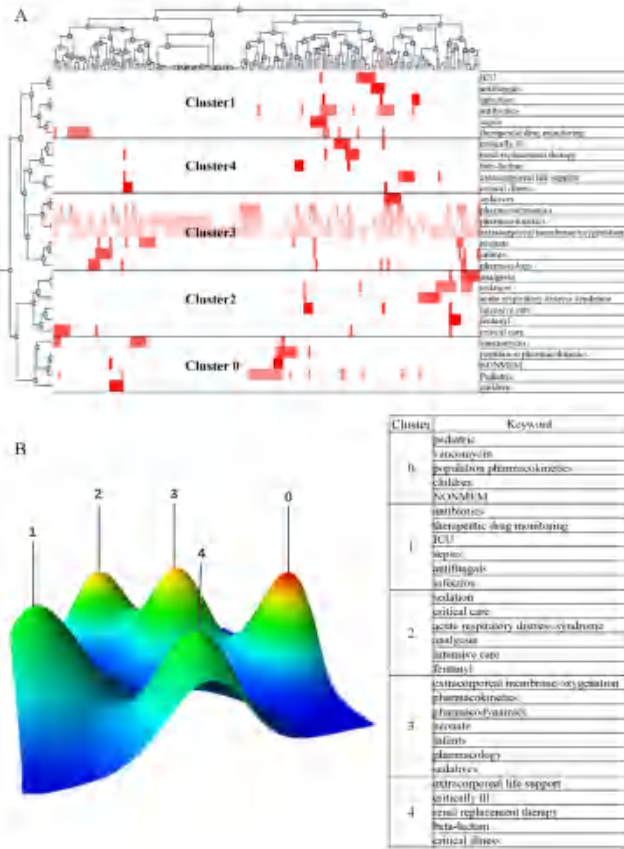


图 4 高频关键词双聚类分析的热图 (A) 和山图 (B)
Fig 4 Heat map (A) and mountain map (B) of dual-cluster analysis for high-frequency keywords

同时这几年的发文量较高,说明 TDM 在 ECMO 患者治疗中的应用越来越广泛。

3 讨论

3.1 ECMO 支持治疗患者 TDM 研究现状

本研究共纳入 311 篇 ECMO 支持治疗患者 TDM 研究相关文献进行文献计量分析。由发文量趋势可见,年发表文献 < 70 篇,可见过去十年 ECMO 支持治疗患者 TDM 相关研究聚焦不足,医疗机构和科研机构对该领域的关注、投入和产出均较少。研究合作分析可见,作者、机构、国家间的合作关系松散,研究以单中心研究为主,缺乏国家/国际层面的多中心研究。且研究主要集中在欧美国家,亚洲及其他地区研究较少见,提示 ECMO 支持治疗患者 TDM 相关研究的地域发展不均衡。研究类型方面,以体外研究和回顾性观察性研究为主,前瞻性、对照研究较少。提示学者未来可加强跨地区合作,开展前瞻性、多中心、对照研究。

3.2 ECMO 支持治疗患者 TDM 研究热点及趋势

高频关键词共现和聚类分析可在一定程度上反映某领域的研究热点,突现强度可预测该领域研究的前沿内容。通过以上分析了解到 ECMO 患

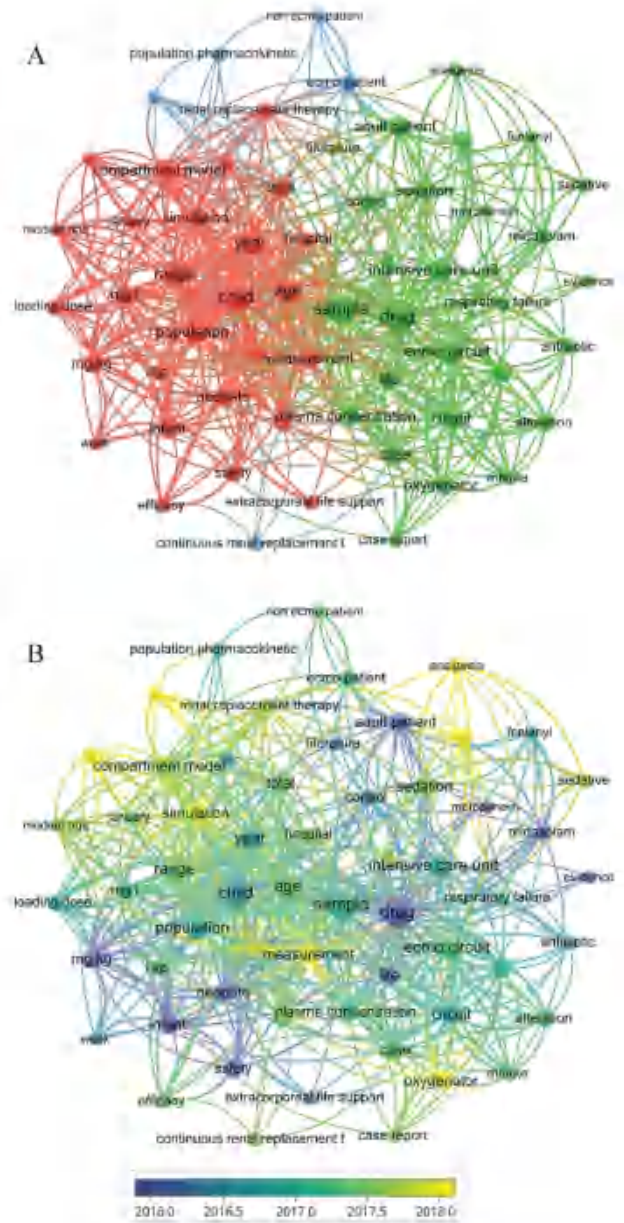


图 5 高频主题词聚类分析的 4 个集群 (5A) 和热门主题 (5B)
Fig 5 4 clusters (5A) and popular topics (5B) of clustering analysis of high-frequency subject words

Keywords	Year	Strength	Begin	End	2011-2021
gentamicin pharmacokinetics	2011	2.76	2011	2012	█
in vitro	2011	2.61	2011	2014	█
failure	2011	2.62	2013	2016	█
model	2011	2.97	2018	2019	█
impact	2011	3.31	2019	2021	█
therapeutic drug monitoring	2011	3.17	2019	2021	█

图 6 突现关键词分析
Fig 6 Bursts keywords

者 TDM 的研究热点和趋势是新生儿、婴儿、儿童患者、危重症患者药物的 PK 研究,抗感染、镇静镇痛药物的 PK 和 TDM 研究。

3.2.1 ECMO 支持治疗患者镇静药 TDM 研究

镇静是 ECMO 辅助治疗的重要部分。合理的镇静不但可减轻患者应激反应,减少氧耗,还能促进人机同步,防止患者躁动,减轻不适感。然而在临床实践过程中,镇静药物血药浓度难以控制,长时间镇静会造成药物 *CL*、*PK* 和耐受性等改变^[12]。美国于 2017 年出版了“Sedation management in children supported on extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory failure”,该研究发现 ECMO 支持治疗者比非 ECMO 支持治疗者使用阿片类受体和苯二氮草类药物的剂量在第 3 日增加 36% 和 58%^[13];另有研究^[14-15]显示无论是 ECMO 新回路还是旧回路,右美托咪定的浓度在 24 h 的 ECMO 过程中都有所下降,丙泊酚由于蛋白结合率高被回路吸附较多,表明右美托咪定和丙泊酚药物在 ECMO 时需要更大的剂量才能达到有效镇静^[14-15],而氯胺酮只需低剂量就可实现深度镇静。因此在 ECMO 患者的镇静管理中,调整个体剂量、监测血药浓度、研究镇静药的 *PK* 至关重要。

3.2.2 ECMO 支持治疗患者抗感染药物 TDM 研究 使用 ECMO 的患者感染风险增加,会常规给予抗菌药物预防或治疗感染。Shekar 等^[16]于 2015 年发表了“Protein-bound drugs are prone to sequestration in the extracorporeal membrane oxygenation circuit: results from an ex vivo study”,该文章被引频次排名第二,通过对等量的头孢曲松、环丙沙星、利奈唑胺、卡泊芬净等药物进行稳定性试验,结果为在 24 h 内 ECMO 中头孢曲松、卡泊芬净的回收率明显降低。Donggyu 等^[17]发现 ECMO 治疗时亲水性的氨基糖苷类、 β 内酰胺类 V_d 会显著增加,万古霉素、庆大霉素的 *CL* 显著降低;而碳青霉烯类药物的 *CL* 降低和 V_d 增加同时存在,*PK* 变化显著,若一并进行 RRT,情况则更复杂,说明 ECMO 使抗感染药物的 *PK* 呈现复杂变化。危重患者检出的细菌多为多重耐药菌,致替加环素、多黏菌素使用增加,但缺乏大规模研究数据^[18]。可见,探索患者 ECMO 期间各种抗感染药物的 *PK* 特征仍是研究的方向和热点。

3.2.3 ECMO 支持治疗患者新生儿、婴儿、儿科用药 TDM 研究 “儿科”和“新生儿”在高频关键词共现分析中出现频次分别排第四和第八,说明 ECMO 患者 TDM 研究对象主要是新生儿、婴儿、儿童。该类患者由于本身生理结构具有特殊性,各组织和器官的功能发育尚不成熟,使用 ECMO 可能加重肝肾损伤、肝肾灌注减少,使药物在肝肾的代谢率、排泄率降低,造成药物清除

下降^[19]。Wells 等^[20]发现 ECMO 新生儿使用布美他尼的 V_d 和消除半衰期增加,虽达到有效利尿效果,但作用时间比预期短,表明 ECMO 期间布美他尼的药物剂量或给药频率可能需要适当增加。一旦给药剂量不适宜也可能会导致患儿心血管、神经系统等发育不良。有研究建议对于 ECMO 患者为达到治疗效果,阿米卡星的负荷剂量应增大到 30 ~ 35 mg · kg⁻¹,由于氨基糖苷类的毒副作用,患儿使用时建议进行 TDM^[21]。随着 ECMO 在儿科临床应用的增多,为了确保用药的安全性和有效性,需开展更全面的 *PK* 变化研究。

通过文献计量分析,本文探讨了近十年 ECMO 患者 TDM 研究的现状、热点和趋势。该领域虽然研究逐年增多,但发文量较少,而且学者、国家、机构间缺乏紧密合作,地域发展不均衡,缺少国际性的多中心研究。然而本研究存在一些局限性,本文仅检索了 WOS 核心数据库,在数据的收集上会有所缺漏,对结果产生一定影响,但其结论仍具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Ha MA, Sieg AC. Evaluation of altered drug pharmacokinetics in critically ill adults receiving extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Pharmacotherapy*, 2017, 37 (2): 221-235.
- [2] Paccard P, Dechamps M, Jacquet LM. Feasibility of sedation with sevoflurane inhalation via AnaConDa for COVID-19 patients under venovenous extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Acta Anaesthesiologica Belgica*, 2020, 71 (4): 183-188.
- [3] Shekar K, Roberts JA, Smith MT, et al. The ECMO PK project: an incremental research approach to advance understanding of the pharmacokinetic alterations and improve patient outcomes during extracorporeal membrane oxygenation [J]. *BMC Anesthesiol*, 2013, 13 (7): 1471-2253.
- [4] Abdul-Aziz MH, Roberts JA. Antibiotic dosing during extracorporeal membrane oxygenation: does the system matter? [J]. *Curr Opin Anesthesiol*, 2020, 33 (1): 71-82.
- [5] Synnstedt MB, Chen C, Holmes JH. CiteSpace II: visualization and knowledge discovery in bibliographic databases [J]. *AMIA Annu Symp Proc*, 2005, 2005: 724-728.
- [6] Kiran S, Roberts JA, McDonald CI, et al. Sequestration of drugs in the circuit may lead to therapeutic failure during extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Critical Care (London, England)*, 2012, 16 (5): R194.
- [7] Cies JJ, Moore WS, Nichols K, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamic target attainment of vancomycin in neonates on extracorporeal life support [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2017, 18 (10): 977-985.
- [8] Jef W, Eline H, Petra S, et al. Optimizing the use of antibiotic agents in the pediatric intensive care unit: a narrative review [J]. *Paediatric Drugs*, 2021, 23 (1): 39-53.

- [9] Yang S, Noh H, Hahn J, et al. Population pharmacokinetics of remifentanyl in critically ill patients receiving extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 16276.
- [10] Wildschut ED, Ahsman MJ, Houmes RJ, et al. Pharmacotherapy in neonatal and pediatric extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) [J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13 (6): 767-777.
- [11] Cheng V, AbdulAziz MH, Burrows F, et al. Population pharmacokinetics of piperacillin and tazobactam in critically ill patients receiving extracorporeal membrane oxygenation (an ASAP ECMO study) [J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2021, 65 (11): e0143821.
- [12] Biscotti M, Gannon WD, Agerstrand C, et al. Awake extracorporeal membrane oxygenation as bridge to lung transplantation: a 9-year experience [J]. *Ann Thorac Surg*, 2017, 104 (2): 412-419.
- [13] Schneider JB, Sweberg T, Asaro LA, et al. Sedation management in children supported on extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory failure [J]. *Critical Care Med*, 2017, 45 (10): e1001-e1010.
- [14] Wagner D, Pasko D, Phillips K, et al. In vitro clearance of dexmedetomidine in extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Perfusion*, 2013, 28 (1): 40-46.
- [15] Floroff CK, Hassig TB, Cochran JB, et al. High-dose sedation and analgesia during extracorporeal membrane oxygenation: a focus on the adjunctive use of ketamine [J]. *J Pain Palliat Care Pharmacother*, 2016, 30 (1): 36-40.
- [16] Shekar K, Roberts JA, McDonald CI, et al. Protein-bound drugs are prone to sequestration in the extracorporeal membrane oxygenation circuit: results from an ex vivo study [J]. *Critical Care*, 2015, 19 (1): 164.
- [17] Donggyu M, Su NL, Ki-Dong Y, et al. Extracorporeal membrane oxygenation improved survival in patients with massive pulmonary embolism [J]. *Ann Saudi Med*, 2018, 38 (3): 174-180.
- [18] 胡付品. 2005—2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测网 5 种重要临床分离菌的耐药性变迁 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17 (1): 93-99.
- [19] 李珊, 柳熠鑫, 任菲菲, 等. 体外膜肺氧合下儿童抗感染治疗最新研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38 (2): 175-179.
- [20] Wells TG, Fasules JW, Taylor BJ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bumetanide in neonates treated with extracorporeal membrane oxygenation [J]. *J Pediatr*, 1992, 121 (6): 974-980.
- [21] Cheng V, Abdul-Aziz MH, Roberts JA, et al. Optimising drug dosing in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10 (5): S629-S641.
- (收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-07-08)

《中南药学》2024 年“毕业季”论文征稿

为了促进药理学学术交流, 本刊现在开始启动 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, 带基金项目文章优先刊登;
7. 投稿网址: <https://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

1 例海曲泊帕致药物性肝损伤的药学监护暨文献复习

刘小林^{1, 2}, 吴义来¹, 陈阳¹, 汪硕闻^{1*} (1. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200080; 2. 上海市浦东医院药剂科, 上海 201399)

关键词: 海曲泊帕; 药物性肝损伤; 药学监护

中图分类号: R969.3 文献标识码: A
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.041

文章编号: 1672-2981(2023)12-3357-04

药物性肝损伤 (DILI) 是由药物及其代谢产物乃至辅料等所诱发的肝损伤, 是常见的药品不良反应之一^[1]。我国人口基数庞大, 临床药物种类繁多, 公众不规范用药较为普遍、对药物安全性问题和 DILI 的认知不够, DILI 发病率有逐年升高的趋势^[2]。海曲泊帕是一种新型小分子、口服、非肽类血小板生成素受体激动剂 (TPO-RA), 其作用机制为激活 TPO-R 依赖的 STAT 和 MAPK 信号转导通路, 刺激巨核细胞增殖和分化, 促进血小板生成^[3]。海曲泊帕于 2021 年 6 月获得国家药品监督管理局 (NMPA) 批准用于既往对糖皮质激素、免疫球蛋白等治疗反应不佳的慢性原发性免疫性血小板减少症 (ITP) 成年患者以及对免疫抑制治疗反应不佳的重型再生障碍性贫血 (SAA) 成年患者^[4], 其常见的不良反应包括谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、血小板计数 (PLT)、 γ -谷氨酰转氨酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP) 升高和头痛等。虽然肝功能指标异常是海曲泊帕常见的不良反应, 但由于 DILI 发病时间差异大, 与用药的关联常较隐蔽, 且缺乏特异性诊断标志物, 易被原发疾病掩盖, 故常被漏诊或误诊^[5]。本文通过 1 例海曲泊帕致 DILI 患者的药学监护与分析, 探讨海曲泊帕致 DILI 的可能发病机制、影响因素及处理措施等, 旨在加强医务人员对海曲泊帕引起的 DILI 的关注和重视, 保障患者用药安全。

1 病例概况

患者, 女性, 34 岁, 身高 160 cm, 体重 50 kg, 体质指数 (BMI): $19.53 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, 体表

面积 1.52 m^2 , 皮层脑电图 (ECOG) 评分 1 分, 因“腹部不适半年余”于 2023 年 1 月 12 日收入结直肠外科。患者半年前无明显诱因下出现腹部不适, 表现为上腹部隐痛, 半个月前出现呕血, 伴黑便。胃镜显示 (2023 年 1 月 9 日): 胃小弯侧见巨大浸润样溃疡灶, 累及胃角, 周围黏膜呈结节样隆起, 余未见异常。病理结果: 胃窦小弯侧及胃角, 腺癌, 部分呈低分化腺癌。诊断为: 胃癌, 贫血, 低血小板症。

2 主要治疗经过

2023 年 1 月 16 日, PET-CT 提示胃癌伴多发转移, 暂无手术指征, 于 1 月 17 日转入肿瘤科继续治疗。入科后完善相关检查, 生化指标显示: ALP $1220.60 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 其他肝肾功能指标均无异常; 血细胞分析: 红细胞 (RBC) $2.23 \times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 血红蛋白 (HB) $62.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, PLT $56.00 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$ 。1 月 17 日, 予重组人血小板生成素针 ($15\ 000 \text{ U qod ih}$)、海曲泊帕乙醇胺片 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 220817JE, 5.0 mg qd po) 升血小板治疗; 予以琥珀酸亚铁缓释片 (0.2 g bid po)、人促红素注射液 (1.0 mL qd ih) 促红细胞生成。1 月 19 日患者出院, 继续以海曲泊帕升血小板治疗。

1 月 24 日, 患者因“胃恶性肿瘤, 进一步治疗”入院。入院诊断: 胃腺癌 (cTxNxM1 IV 期), ERBB2 突变型 (MSI-H); 血细胞分析: RBC $2.41 \times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, HB $70.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, PLT $112.00 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 生化常规 (异常指标): AST $45.15 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, GGT $42.05 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, ALP $785.50 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$; 入院继续以海曲泊帕乙醇胺 (5.0 mg

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82003844); 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划-临床药师项目 [No. SHWSRS (2020)_087]。

作者简介: 刘小林, 女, 主管药师, 主要从事肿瘤临床药学工作, email: xiaolinstayreal@126.com *通信作者: 汪硕闻, 女, 副主任药师, 主要从事肿瘤临床药学工作, email: wangshuowensy@163.com

qd po) 升血小板, 异甘草酸镁注射液 (200 mg qd ivgtt) 保肝治疗, 人促红素注射液 (1 mL qd ih) 促红细胞生成。1 月 28 日, 患者肝酶指标未见好转, ALT 115.80 U · L⁻¹ ↑, AST 179.95 U · L⁻¹ ↑, GGT 97.49 U · L⁻¹ ↑, ALP 821.10 U · L⁻¹ ↑, 谷氨醇脱氢酶 (GLDH) 135.55 U · L⁻¹ ↑, 进一步询问用药史, 患者出院后只服用海曲泊帕, 同时, 排除疾病进展的可能, 考虑海曲泊帕引起药物性肝损伤的可能, 暂予海曲泊帕乙醇胺减量 (2.5 mg qd po)。1 月 30 日, 患者部分肝功能指标有所好转, ALT、GGT 持续异常, 如图 1 所示, 故暂停用海曲泊帕乙醇胺, 加用熊去氧胆酸 (250 mg bid po) 利胆保肝治疗。2 月 2 日, 患者生化常规显示, 肝功能明显好转, 并于当日开始帕博利珠单抗免疫治疗, 治疗结束予以出院。

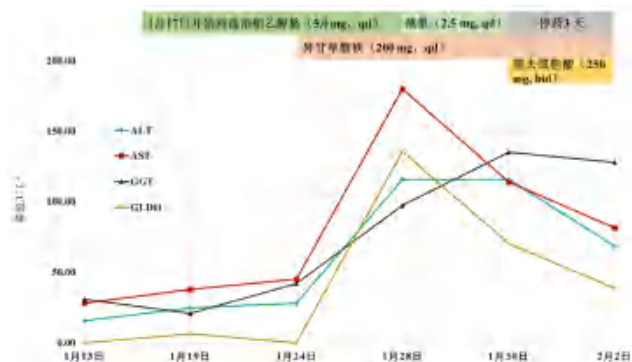


图 1 患者用药情况及肝酶指标变化趋势图

注: 标准值为 ALT < 35 U · L⁻¹, AST 14 ~ 36 U · L⁻¹, GGT 12 ~ 43 U · L⁻¹, GLDH ≤ 7 U · L⁻¹。

3 临床药学监护

3.1 血小板减少症治疗方案评价

根据《中国成人血小板减少症诊疗专家共识》^[6], 实体瘤患者出现血小板减少症主要考虑与治疗、骨髓侵犯和免疫性因素有关, 治疗原则为首先治疗原发病, 为避免因为血小板过低引起致命性出血, 可采取血小板输注、药物和脾切除等治疗方式, 药物治疗包括重组人血小板生成素 (TPO)、TPO-RA、糖皮质激素等。TPO-RA 与内源性 TPO 作用机制不同, 不会与内源性 TPO 产生竞争, 联合用药具有协同效应^[7]。目前, 海曲泊帕已获批的适应证包括成人 ITP 与 SAA, 用于肿瘤治疗相关血小板减少症^[6, 8]、移植后血小板减少等适应证尚未获批^[9]。由此可知, 该患者属于超说明书用药。根据超药品说明书用药有关指南^[10]、专家共识^[11]及院内管理制度, 临床药师建议医师向药事管理与药物治疗学委员会和伦理委员会提交超说明书用药申请, 同时, 充分告

知患者及家属用药方案、预后情况及可能出现的风险, 超说明书用药经药事会和伦理会审批通过及获得患者知情同意后方可使用。治疗期间, 临床药师须同临床医师一起对患者用药疗效及不良反应进行监测、分析和评价。

3.2 不良反应关联性评价

根据国家药品不良反应监测中心制定的关联性评价标准^[12], 对本例患者的肝酶异常进行关联性评价: ① 患者既往无肝损伤病史, 肝酶异常是在使用海曲泊帕 14 d 后出现, 且停药后患者肝酶指标明显好转, 不良反应的发生与海曲泊帕的使用具有时间相关性; ② 海曲泊帕说明书中关于“不良反应”的描述中提示, 常见的不良反应包括 ALT、AST 升高, 发生率分别为 11.2% 和 10.6%, 本例患者不良反应的发生符合海曲泊帕已知的不良反应类型; ③ 查阅患者同期使用的其他药品说明书及有关文献, 未见有致肝酶异常的报道, 药师进一步询问患者病史及用药史, 患者表示未使用过其他化疗药物、传统中药、保健品和膳食补充剂等, 排除其他药物、食物的影响。同时, 根据患者目前疾病情况, 医师已排除原患疾病和疾病进展的影响; ④ 临床药师考虑本例患者肝酶异常可能由海曲泊帕所致, 故建议医师停用海曲泊帕, 加用熊去氧胆酸利胆保肝治疗, 医师采纳药师意见, 1 月 30 日停用海曲泊帕, 给予异甘草酸镁和熊去氧胆酸联合保肝治疗后, 肝酶指标明显下降。综上, 采用 Naranjo 评估量表法进行因果关系等级评分, 结果为 7 分, 因此, 患者肝酶异常“很可能”由海曲泊帕所致。

3.3 DILI 的可能机制及影响因素

DILI 的发病机制很复杂, 目前仍不明了, 但已有相当多的研究从各个方面探讨其可能的发生机制。研究发现通过肝脏代谢率越高的药物其发生肝损伤的概率越大, 大多数 DILI 是由药物反应性代谢物引起^[13]。海曲泊帕的代谢主要通过胍键裂解、葡糖醛酸结合、乙酰化和丙酰化, 血浆中的主要代谢产物为葡糖醛酸结合物。在体内, 海曲泊帕原形药物不经过 CYP450 酶代谢, 非临床研究显示, 其主要通过二磷酸尿苷葡糖醛酸转移酶 (UGT) 家族代谢, 多种亚型的 UGT 参与了葡糖醛酸结合反应^[3]。根据海曲泊帕的体内代谢情况, 推测其 DILI 的可能机制及影响因素。

海曲泊帕中含有羧酸基团, 如图 2 所示, 含羧酸基团的药物在体内易与葡糖醛酸结合, 经过 UGT 酶催化形成酰基葡糖醛酸苷 (AGs)。肝细胞

通过基底膜上的有机阴离子转运多肽将 AGs 摄取进入肝细胞中, AGs 化学性质较为活泼, 具有亲电子活性, 易与细胞内功能大分子蛋白共价结合形成药物-蛋白加合物, 促使内源性功能蛋白失活, 影响细胞器正常功能, 当 AGs 在肝细胞中大量蓄积, 达到一定水平后诱发肝毒性反应。此外, 肝细胞亦可将 AGs 转运至胆汁, AGs 与胆管膜蛋白形成加合物, 这可能是引起胆汁淤积型 DILI 的原因之一。也有免疫反应的观点认为, AGs 与肝内蛋白质结合形成抗原决定簇, 刺激免疫细胞引发特异性的免疫应答, 受 CD8⁺T 淋巴细胞攻击, 引起肝细胞型 DILI^[13-15]。综上所述, UGT 诱导的代谢激活物的生成可能是海曲泊帕诱发肝毒性的原因之一, 但还需要进一步的研究证实。

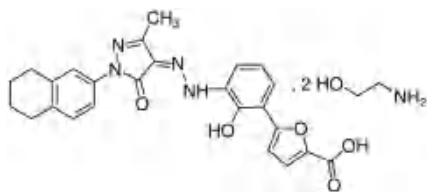


图 2 海曲泊帕乙醇胺结构式

DILI 的影响因素复杂, 不仅与所使用的药物种类、剂量疗程、患者肝功能、疾病状态、合并用药有关, 还与患者的年龄、性别、营养状况、遗传等因素相关^[16]。海曲泊帕主要通过 UGT 家族代谢, 基因多态性、UGT 底物间药物相互作用可能是导致 DILI 不可忽视的因素。在艾曲泊帕致急性肝衰竭的病例报道中, 携带 *CYP2C8*、*UGT1A1* 和 *ABCG2* 等位变异基因的患儿具有高的血药浓度^[17]。虽然, 海曲泊帕缺少相关遗传学临床研究数据, 但东亚人群代谢酶 *UGT1A1* 具有遗传多态性^[18], 基因多态性可能也会导致血药浓度个体差异及不良反应的发生。

3.4 DILI 处理措施

DILI 首要治疗措施是及时停用导致肝损伤的可疑药物, 尽量避免再次使用可疑或同类药物, 并根据患者受损靶细胞类型, 予保肝降酶治疗。根据《药物性肝损伤诊治指南 (2023)》^[5] 及患者指标情况, 评估患者 DILI 严重程度为 I 级 (轻度肝损伤), 计算 R 值 ≤ 2 ($R = 0.51$), 判断 DILI 为“胆汁淤积型”。胆汁淤积是由于胆汁合成缺陷、排泄异常或功能性障碍等因素使得胆汁成分入血所致的临床症候群, 对于胆汁淤积型 DILI 患者, 指南建议使用熊去氧胆酸或 S 腺苷蛋氨酸, 以降低 ALP 水平。因此, 临床药师建议加用熊去氧胆酸利胆保肝治疗。该病例中患者联合

使用异甘草酸镁和熊去氧胆酸两种保肝药物, 研究表明异甘草酸镁可有效降低 DILI 患者的 ALT 和 AST 水平, 促进肝损伤恢复, 是目前唯一具有急性 DILI 适应证的药物。熊去氧胆酸是一种亲水、非细胞毒的胆汁酸, 具有多种作用机制, 可保护受损胆管细胞, 促进胆汁排泄, 导致肝细胞的凋亡, 降低 ALP 水平^[19-20]。患者经过联合保肝治疗, 肝酶指标明显改善。

关于保肝药物的联合使用, 目前无证据显示 2 种或以上抗炎保肝药物对 DILI 有更好的疗效, 因此, 指南不推荐 2 种或以上都以降低 ALT 为主的肝损伤治疗药物联合应用, 以防加重肝脏的代谢负担或增加药物之间相互作用的可能^[5], 但一种降低 ALT 为主的保肝药物和一种改善胆汁淤积的药物联合使用是被接受的。

3.5 肝功能异常患者 TPO-RA 类药物的选择

血小板减少症和肝损伤是肿瘤患者常见且严重的临床问题, 肿瘤合并肝损伤患者血小板减少症 (TCLI) 的病因复杂, 常见于肝损伤和肿瘤治疗, 血小板减少症和肝损伤的叠加进一步增加了肿瘤治疗的难度。TPO-RA 可在多种临床情境下有效提升血小板水平, 在 TCLI 领域具有良好的应用前景。目前, 我国上市的 TPO-RA 药物有艾曲泊帕、阿伐曲泊帕、海曲泊帕, 药物间的区别如表 1 所示^[21]。对于肝功能异常的患者, 可选择阿伐曲泊帕, 其关键临床研究显示, 阿伐曲泊帕无肝毒性不良事件, 对于肝功能障碍患者也无需减少剂量^[22]。

表 1 中国获批上市口服小分子 TPO 受体激动剂的比较

指标	艾曲泊帕	阿伐曲泊帕	海曲泊帕
国内获批适应证	ITP	择期行诊断性操作或 者手术的肝病相关 血小板减少症	ITP、SAA
TPO 受体结合形式	跨膜	跨膜	跨膜
健康受试者的效力	+	++++	+++
饮食影响	是	否	是
阳离子相互作用	++	否	++
东亚人减少剂量	是	否	是
肝功能障碍减少剂量	是	否	是
增加肝功能检查	+	否	?
用于肾衰竭	可能可以	可能可以	无数据

4 讨论

DILI 虽然是海曲泊帕较为常见的药物不良反应, 但 DILI 患者往往无症状, 容易被忽视, 该案例中临床药师对 DILI 及时识别、处理, 开展药学监护, 使得患者尽早化疗。对于使用 TPO-RA 的

患者,建议从以下几个方面开展药学监护:①使用前,评估药物选择的适宜性,为临床提供合理的循证建议;②使用期间,重点关注药物不良反应(如血栓形成/血栓栓塞并发症、肝毒性等),药物间相互作用(BCRP底物、CYP450抑制剂和诱导剂、UGT抑制剂)等;③加强对患者及家属的安全用药教育,告知患者应空腹用药,服药2h内,避免食用乳制品(如牛奶、酸奶和冰淇淋等)或含多价阳离子的矿物质补充剂(如铝、钙、镁、铁等),服药2h后方可进餐;定期监测血小板数量、肝功能指标,以降低不良反应发生率。

本研究具有一定局限性,对海曲泊帕的肝损伤机制尚不明确,推测的可能机制也需要进一步研究证实。此外,对于TPO-RA是否需要基因检测或血药浓度监测指导用药,还有待进一步研究,为确保患者用药安全,对于携带UGT变异基因的患者,建议使用海曲泊帕和艾曲泊帕时重点监测患者肝功能。

参考文献

- [1] 肇丽梅, 缪丽燕. 药物性肝损伤研究进展及展望 [J]. 药学进展, 2023, 47 (2): 8183.
- [2] 沈琴, 王晓萍, 强磊. 药物引起的肝损伤发病机制研究进展 [J]. 药学研究, 2022, 41 (9): 595-599.
- [3] Syed YY. Heterombopag: first approval [J]. *Drugs*, 2021; 81, 1581-1585.
- [4] 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 抗肿瘤药物治疗安全管理专家委员会. 海曲泊帕临床应用指导原则 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2022, 31 (10): 577-582.
- [5] 中国医药生物技术协会药物性肝损伤防治技术专业委员会, 中华医学会肝病学会分会药物性肝病学组. 中国药物性肝损伤诊治指南 (2023年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31 (4): 355-384.
- [6] 中华医学会内科学分会, 王建祥, 张奉春, 等. 中国成人血小板减少症诊疗专家共识 [J]. 中华内科杂志, 2020, 59 (7): 498-510.
- [7] Ghanima W, Cooper N, Rodeghiero F, et al. Thrombopoietin receptor agonists: ten years later [J]. *Haematologica*, 2019, 104 (6): 1112-1123.
- [8] 中国临床肿瘤协会指南工作委员会. 中国临床肿瘤协会 (CSCO) 肿瘤治疗所致血小板减少症诊疗指南 (2023) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023.
- [9] Bussel J, Kulasekararaj A, Cooper N, et al. Mechanisms and therapeutic prospects of thrombopoietin receptor agonists [J]. *Semin Hematol*, 2019, 56 (4): 262-278.
- [10] 左玮, 刘容吉, 孙雅佳, 等. 《中国超药品说明书用药管理指南 (2021)》推荐意见及要点解读 [J]. 协和医学杂志, 2023, 14 (1): 86-93.
- [11] 杨敏, 劳海燕, 曾英彤. 医疗机构超药品说明书用药管理专家共识 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34 (3): 436-438.
- [12] 陈静静, 钱佩佩, 曹凯, 等. 我国药品不良反应关联性评价方法与诺氏评估量表法的对比与分析 [J]. 中国药事, 2020, 34 (8): 988-992.
- [13] Lammert C, Bjornsson E, Niklasson A, et al. Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events [J]. *Hepatology*, 2010, 51 (2): 615-620.
- [14] 谢彤, 梁艳, 郝海平, 等. 葡萄糖醛酸转移酶 (UGTs) 诱导羧酸药物代谢激活的研究进展 [J]. 药科学报, 2009, 44 (11): 1193-1199.
- [15] Jee A, Sernoskie SC, Utrecht J. Idiosyncratic drug-induced liver injury: mechanistic and clinical challenges [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 2954.
- [16] Daly AK, Day CP. Genetic association studies in drug-induced liver injury [J]. *Drug Metab Rev*, 2012, 44: 116-126.
- [17] Marano M, Serafinelli J, Cairoli S, et al. Eltrombopag-induced acute liver failure in a pediatric patient: a pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis [J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40 (4): 386-388.
- [18] Chen X, Liu L, Guo Z, et al. UGT1A1 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities and treatment outcome in Asians with lung cancer: a meta-analysis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79: 1109-1117.
- [19] 国家感染性疾病临床医学研究中心. 肝内胆汁淤积症诊治专家共识 (2021年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30 (2): 137-146.
- [20] 王宁, 吴颖其. 临床药师参与1例白蛋白结合型紫杉醇致重度肝损伤治疗的病例分析 [J]. 中南药学, 2020, 18 (6): 1064-1067.
- [21] Kuter DJ. Treatment of chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with non-hematologic malignancies [J]. *Haematologica*, 2022, 107 (6): 1243-1263.
- [22] Markham A. Avatrombopag: a review in thrombocytopenia [J]. *Drugs*, 2021, 81 (16): 1905-1913.

(收稿日期: 2023-07-02; 修回日期: 2023-08-20)

我国药师主导的华法林患者抗凝管理模式发展现状

郭艳¹, 罗娟¹, 廖雅琪¹, 吴健¹, 刘志清¹, 谭胜蓝^{2*} (1. 桃源县人民医院药剂科, 湖南 常德 415700; 2. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011)

摘要: 华法林是临床广泛使用的口服抗凝药物, 由于其治疗窗窄、个体差异大、易受食物及药物影响, 华法林使用患者通常需要进行抗凝管理。近年来, 我国对于抗凝管理越来越重视, 专人随访、抗凝药师门诊、“互联网+”管理模式以及基于即时检测 (POCT) 的管理等模式逐渐发展起来。本文拟对国内抗凝模式进行总结, 以期后续开展华法林患者抗凝管理提供指导。

关键词: 华法林; 抗凝管理; 国际标准化比值; 治疗范围内的时间比

中图分类号: R95, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)12-3361-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.042

随着社会的发展和人口老龄化进程的加速, 血栓栓塞性疾病的发病率越来越高, 目前已成为全球性的重大健康问题。研究显示全球四分之一的住院死亡原因与血栓相关, 前三位的心血管病死因均与血栓有关。血栓栓塞性疾病已成为导致全球人口死亡的第一位原因^[1]。

目前, 包括房颤、冠心病、心脏瓣膜置换术后、深静脉血栓、脑卒中、肺栓塞及肿瘤等疾病需要进行抗凝的预防和治疗, 规范应用抗凝药物能明显降低血栓栓塞的发生率。华法林作为世界上使用最广泛、应用最悠久的抗凝药物, 在治疗血栓性疾病中显示出明显的益处。虽然新型口服抗凝药物因其安全性、有效性以及无需监测凝血功能等优点, 在许多疾病的治疗上逐渐取代华法林的使用, 但在某些情形下华法林仍处于一线地位, 如机械瓣膜置换术后、严重的二尖瓣狭窄等。由于华法林治疗窗窄, 个体差异大, 容易受食物、药物的影响, 必须常规监测国际标准化比值 (INR), 根据 INR 结果调整剂量, 才能有效预防血栓的形成, 减少不良反应的发生。因此, 华法林患者的抗凝管理就显得尤为重要。

20 世纪 70 年代起, 美国的药师开始参与到抗凝管理中, 随后药师主导的抗凝管理模式逐渐扩大到全世界, 药师对使用华法林的患者进行服药指导、剂量调整、对药物不良反应采取合适的应对措施等。目前国外的抗凝管理模式主要包括药师抗凝门诊、基于即时检测 (POCT) 的自我检测和管理、基于计算机软件和远程医疗的管理等, 抗凝管理服务的开展, 可以明显提高患者的生活质量及患者 INR 达标率, 降低治疗相关不良事件

发生后的住院率和急诊就诊率^[2-5]。

与国外的抗凝管理相比, 我国传统模式对抗凝患者的管理主要由医师在门诊完成。受就诊人数和就医时长的影响, 门诊医师无法对每位华法林患者提供详细的用药教育和后续的随访管理, 存在抗凝治疗率低、达标率低、患者依从性低的“三低”情形, 导致患者的出血和血栓风险较高^[6]。与欧美国家相比, 我国华法林患者 INR 监测频率、治疗范围内的时间比 (TTR) 普遍偏低。为提高我国华法林患者抗凝管理效率与质量, 国内学者进行了相关研究与探索, 各种药师主导的华法林抗凝管理模式应运而生。本文拟对目前国内的抗凝模式进行总结, 以期后续开展华法林患者抗凝管理提供指导。

1 药师专人随访

有学者对专人随访管理模式进行了探讨, 由专人负责对患者进行全程干预、全方位防治, 每周进行电话随访及门诊随访, 干预内容包括健康教育咨询、生活方式指导和行为干预, 告知患者需要注意的问题、INR 监测、华法林的剂量调整、不良反应的识别与处理, 督促患者按时服药及随访^[7-8]。结果表明, 专人随访可显著提升患者的 INR 达标率, 减少 INR 首次达标后的监测次数以及全程监测频次, 同时显著降低缺血性卒中、皮肤黏膜出血、牙龈出血等不良事件的发生率。

2 抗凝药学门诊

2010 年南京鼓楼医院率先引入抗凝管理模式, 建立了国内首家药师管理的抗凝门诊。目前我国已有多家三级医院已经开展了抗凝门诊, 包括单独药师主导的抗凝门诊以及医-药联合的抗凝门诊等。

基金项目: 湖南省医学会医学科研基金临床药学项目 (No.HMA202001018); 美国中华医学基金会 (No.19-343)。

作者简介: 郭艳, 女, 副主任药师, 主要从事慢病管理和抗菌药物合理使用研究, email: 949081812@qq.com *通信作者: 谭胜蓝, 女, 副主任药师, 主要从事心血管疾病和抗凝药物的研究, email: 94794635@qq.com

成熟的抗凝门诊通常由具备药物治疗学和药代动力学等专业知识的药师对需要接受长期抗凝药物治疗的患者进行抗凝管理服务^[9]。服务的内容包括：①明确抗凝适应证；②明确实验室检查；③药物剂量调整；④明确复查时间；⑤评估相互作用；⑥对需要手术的患者提供用药指导；⑦为患者及医疗护理团队进行抗凝治疗教育^[10]。研究表明，与普通门诊相比，抗凝门诊提高了抗凝药物的有效性、安全性和患者依从性，患者服用华法林期间 INR 的 TTR 较传统模式下显著提升（70% vs 45%），同时异常性波动事件（INR > 4.5 和 INR < 1.5）的发生率有所下降，血栓栓塞和出血并发症的风险及医疗费用降低，患者满意度增加^[11-12]。

3 基于“互联网+”管理模式

2014 年福建医科大学附属协和医院首次利用 QQ 群分组管理的方式对心脏瓣膜置换术后患者进行统一的抗凝管理^[13]，此后随着微信的推广，以微信为平台的抗凝管理模式也逐渐发展起来。何显荣等^[14]建立华法林抗凝微信群及 QQ 群，定期发布房颤教育知识、服用华法林注意事项等，定期举办线上抗凝知识讲座，接受患者咨询，并提醒患者准时复查 INR，调整剂量。与常规管理组相比，采取“互联网+”管理能显著提高患者的 INR 达标率（80% vs 50%， $P < 0.05$ ）。邱莎^[15]基于“互联网+”建立了一个由临床药师管理的房颤抗凝管理平台，该平台以网页浏览器和手机微信为端口，包含药学门诊、患者管理、用药评估、随访管理、药品管理、健康教育、患者提醒等多个功能模块，可以对患者进行及时且长期的随访，并且可以对随访数据进行记录和保存，有利于药师或医师全面了解每位患者的疾病情况，为患者制订个体化的治疗方案。另外，还有一些人工智能软件如“抗凝助手”也逐渐用于抗凝管理，药师可基于平台线上给患者提供药物剂量调整和下次监测时间建议，保障患者用药安全^[16-17]。

4 POCT 的管理

POCT 是指利用便携式凝血检测仪，只需一滴血即可报告结果。这种装备不仅避免了静脉采血的不便与痛苦，还可解除患者检测的时空限制，其便利、及时、准确的特性受到广泛欢迎。而且检测仪器为一次性投入，对于长期用药人群可进一步降低医疗支出。多数研究表明，POCT 检测 INR 的准确性并不亚于大型实验室检测^[18-19]。此外，有研究者认为，由于避免血样转运中的凝血反应等过程，及时快速的 POCT 可能准确性更高。POCT 的使用，华法林患者可以进行家庭管理，模式有两种：一种是患者自我监测模式，由患者自行检测 INR，通过在线沟通，由医疗保健者提供剂量调整意见；另一

种模式为患者自我管理模式，由患者进行 INR 测试并自行调整剂量，这种模式要求患者具有较强的学习能力、自我管理能力以及风险控制能力^[20-22]。黄煜^[23]进行了一项基于便携式凝血仪和远程医疗的抗凝管理模式的研究，结果表明此种模式能显著提升患者的 INR 检测频率以及达标率，患者满意度更高。中南大学湘雅二医院谭胜蓝团队在 2019 年初正式提出了华法林管理之 SMART 模式，通过培训湖南省县市级医院的医务工作者建立医师药师多学科治疗团队，利用 POCT 仪和手机 APP 小程序，采用远程医疗手段对华法林患者进行居家抗凝指导，并且根据患者 PT/INR 结果和是否发生不良反应，对患者进行危险分层管理，以确保患者的安全^[24]。

5 小结

华法林目前在血栓栓塞性疾病的治疗中仍发挥着举足轻重的作用。国内外的研究结果表明，药师主导的抗凝管理模式较传统模式而言更佳，不仅能够显著提高患者的 INR 达标率，降低血栓及出血的风险，还可提升患者依从性和满意度，并在一定程度上降低患者的医疗成本^[25-28]。但也还存在一些不足，详见表 1。

表 1 各种抗凝管理模式的不足

抗凝管理模式	不足之处
药师专人随访	药师管理水平有参差，缺乏管理规范，工作量较大，能够提供服务的人数有限
抗凝药学门诊	主要集中在大城市，偏远地区患者路程遥远，昂贵的路费导致经济负担较大；药师处方权受限
基于“互联网+”管理	网络信息安全问题
基于 POCT 管理	POCT 仪器以及配套使用试纸未进入医保收费项目，患者一次性投入的成本较高

随着医疗技术的发展，我国抗凝管理也在不断优化。2019 年我国发布首个《抗凝（栓）门诊标准操作规程专家共识》，对于开展抗凝（栓）门诊的基本设施要求、诊疗流程与诊疗内容、工作记录、信息化管理、风险控制及防范等方面进行了推荐。此外，为解决药师处方权和检查权受限的问题，广东省药学会也进行了一些新的尝试，组织专家制定了《药师与医师抗栓治疗协议推荐文本》，通过与医师达成协议进行处方调整来解决药师的处方权，目前已在广东的 19 家医院开展，这一举措可补齐药师的短板，给患者带来更好的就医体验。

《“健康中国 2030”规划纲要》中指出，做好慢性病防治工作，降低疾病负担，提高居民健康期望寿命，努力全方位、全周期保障人民健康。抗凝管理对于慢性血栓性疾病患者的生命健康与安全具有重要意义，目前我国的药师已经建立了多种华法林抗凝管理模式，并取得了一定成效。然

而, 探寻高效的抗凝管理模式将是一个长期的过程。笔者认为, 基于 POCT 仪的患者自我管理结合智能化远程监测模式是未来进行华法林抗凝管理的一种较好的选择。在此模式下, 患者可以自行监测并调整华法林剂量, 不仅可以降低患者的支出, 也可减少药师的工作量; 同时智能化远程监测可在患者的 INR 持续异常时对药师及时预警, 药师能够及时参与到患者的抗凝方案调整, 增加患者的安全保障。在此, 笔者呼吁国家层面出台更多的慢病管理相关政策, 将部分基于患者自我管理的费用纳入医保报销, 实施患者-医务人员的共管模式, 同时加大科普宣传, 落实“提前预防”, 增加健康意识, 保障全民健康。

参考文献

- [1] 高申, 陆方林. 血栓栓塞性疾病防治的药学监护 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [2] Zhou S, Sheng XY, Xiang Q, et al. Comparing the effectiveness of pharmacist-managed warfarin anticoagulation with other models: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Pharm Ther*, 2016, 41 (6): 602-611.
- [3] Pugh AN, Murphy BL. Self-testing and self-management of warfarin anticoagulation therapy in geriatric patients [J]. *Consult Pharm*, 2013, 28 (5): 319-321.
- [4] Verret L, Couturier J, Rozon A, et al. Impact of a pharmacist-led warfarin self-management program on quality of life and anticoagulation control: a randomized trial [J]. *Pharmacotherapy*, 2012, 32 (10): 871-879.
- [5] Brasen CL, Madsen JS, Parkner T, et al. Home management of warfarin treatment through a real-time supervised telemedicine solution: a randomized controlled trial [J]. *Telemed J E Health*, 2019, 25 (2): 109-115.
- [6] 董敏, 邹彤, 李雨薇, 等. 心房颤动合并冠心病患者的抗栓治疗现状和血栓栓塞事件分析 [J]. *中国循环杂志*, 2018, 33 (9): 856-860.
- [7] 郭美花, 李志强, 傅咏华, 等. 专人随访管理对心房颤动患者华法林抗凝达标的影响 [J]. *同济大学学报 (医学版)*, 2016, 37 (3): 101-106.
- [8] 李志强, 李锦玉, 蒋庆渊, 等. 专人随访管理在持续性心房颤动病人服用华法林抗凝治疗中的作用 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14 (10): 1064-1067.
- [9] 郑英丽, 丁征. 抗凝 (栓) 门诊标准操作规程专家共识 [J]. *中国循环杂志*, 2019, 34 (10): 944-950.
- [10] Bounda Guy-Armel, 郝智慧, 葛卫红, 等. 世界各地抗凝门诊简介及其对中国内地抗凝管理的启示 [J]. *中国临床药学杂志*, 2010, 19 (4): 6.
- [11] 韩家赞, 徐慧敏, 吴英, 等. 临床药师参与综合医院门诊华法林抗凝患者管理的效果 [J]. *中国临床药学杂志*, 2022, 31 (2): 102-106.
- [12] 王依蕾, 袁易. 药学抗凝门诊建立规范化抗凝管理实例分析 [J]. *上海医药*, 2018, 39 (23): 100-103.
- [13] Cao H, Wu J, Zhang JH. Outcomes of warfarin therapy managed by pharmacists via hospital anticoagulation clinic versus online anticoagulation clinic [J]. *Int J Clin Pharm-Net*, 2018, 40 (5): 1072-1077.
- [14] 何显荣, 余新东, 瞿珍清. 基于“互联网+”的华法林抗凝治疗管理心房颤动患者研究 [J]. *内科*, 2018, 13 (3): 389-390.
- [15] 邱莎. 基于“互联网+”的房颤患者抗凝管理平台的构建与应用 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
- [16] 张永春, 李海琳, 李业涛, 等. 人工智能辅助华法林抗凝自我管理系统可靠性评价的前瞻性队列研究 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2021, 28 (5): 6.
- [17] 陈信步, 李业涛, 龙娟, 等. 基于移动医疗技术及人工智能的抗凝管理模式的效果评价 [J]. *中华健康管理学杂志*, 2021, 15 (4): 368-372.
- [18] Nichol MB, Knight TK, Dow T, et al. Quality of anticoagulation monitoring in nonvalvular atrial fibrillation patients: comparison of anticoagulation clinic versus usual care [J]. *Ann Pharmacother*, 2008, 42: 62-70.
- [19] Barcellona D, Fenu L, Marongiu F. Point-of-care testing INR: an overview [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55: 800-805.
- [20] Dhipayom T, Boonpattharathiti K, Thammathuros T, et al. Clinical outcomes of different warfarin self-care strategies: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Thromb Haemost*, 2022, 122 (4): 492-505.
- [21] Bloomfield HE, Krause A, Greer N, et al. Meta-analysis: effect of patient self-testing and self-management of long-term anticoagulation on major clinical outcomes [J]. *Ann Intern Med*, 2011, 154 (7): 472-482.
- [22] Entezari-Maleki T, Dousti S, Hamishehkar H, et al. A systematic review on comparing 2 common models for management of warfarin therapy; pharmacist-led service versus usual medical care [J]. *J Clin Pharmacol*, 2016, 56 (1): 24-38.
- [23] 黄煜. 基于便携式凝血仪和远程医疗的抗凝管理模式的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2022.
- [24] Chen L, Zhou YZ, Zhou XM, et al. Evaluation of the “safe multidisciplinary app-assisted remote patient-self-testing (SMART) model” for warfarin home management during the COVID-19 pandemic: study protocol of a multi-center randomized controlled trial [J]. *BMC Health Serv Res*, 2021, 21 (1): 875.
- [25] Entezari-Maleki T, Dousti S, Hamishehkar H, et al. A systematic review on comparing 2 common models for management of warfarin therapy; pharmacist-led service versus usual medical care [J]. *J Clin Pharmacol*, 2016, 56 (1): 24-38.
- [26] Hou KL, Yang H, Ye ZK, et al. Effectiveness of pharmacist-led anticoagulation management on clinical outcomes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2017, 20 (1): 378-396.
- [27] 戴亨纷, 郑彩云, 郑巧文, 等. 基于互联网的远程医疗应用于华法林管理的系统评价与 Meta 分析 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2020, 27 (12): 1454-1459.
- [28] Schulman S, Anderson DR, Bungard TJ, et al. Direct and indirect costs of management of long-term warfarin therapy in Canada [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8 (10): 2192-2200.

(收稿日期: 2023-07-26; 修回日期: 2023-10-10)

药物与临床

使用中文版 EDIN 量表与 Wong-Baker 量表评价对乙酰氨基酚与布洛芬改善 0 ~ 5 岁发热儿童舒适度的效果

王文莉¹, 史金平^{1*}, 张先霞² (1. 西安国际医学中心医院药学部, 西安 710100; 2. 西安国际医学中心医院儿内科, 西安 710100)

摘要: 目的 评价对乙酰氨基酚与布洛芬在发挥退热作用的同时, 改善患儿舒适度的疗效。方法 依据临床用药品种, 将患儿分为对乙酰氨基酚治疗组与布洛芬治疗组, 分别使用中文版 EDIN 量表及 Wong-Baker 量表, 在给药前, 给药第 1 日、第 2 日、第 3 日对两组患儿进行舒适度评分, 比较治疗后两组患儿舒适度评分差异。结果 共纳入 94 名患儿, 其中对乙酰氨基酚组 36 人, 给药前中文版 EDIN 量表评分 6.03 ± 2.50 , Wong-Baker 量表评分 4.86 ± 2.43 ; 布洛芬组 58 人, 给药前中文版 EDIN 量表评分 5.66 ± 2.34 , Wong-Baker 量表评分 5.03 ± 2.43 。给药第 3 日, 对乙酰氨基酚组、布洛芬组中文版 EDIN 量表评分较前分别显著降低 3.50 ± 1.76 、 4.69 ± 1.74 。Wong-Baker 量表评分虽均有所改善, 但改善幅度差异无统计学意义。结论 对乙酰氨基酚与布洛芬均可改善 0 ~ 5 岁急性发热患儿舒适度, 以中文版 EDIN 量表评分作为衡量标准时, 布洛芬改善患儿舒适度的疗效优于对乙酰氨基酚。

关键词: 对乙酰氨基酚; 布洛芬; 发热; 舒适度; 新生儿疼痛与不适量表; Wong-Baker 面部表情疼痛量表

中图分类号: R72

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)12-3364-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.043

Evaluation of the effect of acetaminophen and ibuprofen on comfort improvement in 0 ~ 5-year-olds with fever by Chinese EDIN scale and Wong-Baker scale

WANG Wen-li¹, SHI Jin-ping^{1*}, ZHANG Xian-xia² (1. Department of Pharmacy, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100; 2. Department of Pediatrics, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy of acetaminophen and ibuprofen in relieving fever and improving comfort in children. **Methods** Children with fever were divided into a acetaminophen treatment group and an ibuprofen treatment group. The Chinese version of the neonatal pain and discomfort (EDIN) scale and the Wong-Baker scale were used respectively to score the comfort of children in both groups before the administration, on day 1, 2, and 3 after the administration. The difference between the comfort scores in both groups after the treatment was compared. **Results** Totally 94 children were included: 36 in the acetaminophen group, with a Chinese version of the EDIN scale score of 6.03 ± 2.50 and a Wong-Baker scale score of 4.86 ± 2.43 before the administration; 58 in the ibuprofen group, with the score of the Chinese EDIN scale of 5.66 ± 2.34 , and the score of the Wong-Baker scale of 5.03 ± 2.43 . Three days after the administration, the scores of Chinese EDIN scale in the acetaminophen group and the ibuprofen group were 3.50 ± 1.76 and 4.69 ± 1.74 , lower

作者简介: 王文莉, 女, 主管药师, 主要从事处方审核工作, email: wangwenli199107@163.com * 通信作者: 史金平, 男, 主管药师, 主要从事抗凝药物治疗, email: 903442614@qq.com

than before, respectively. Although the scores of the Wong-Baker scale all improved, the improvement was not significant. **Conclusion** Both acetaminophen and ibuprofen can improve the comfort in children aged 0 ~ 5 years with acute fever. When the Chinese EDIN scale score is used as the measurement standard, ibuprofen is better than acetaminophen in improving the comfort in children.

Key words: acetaminophen; ibuprofen; fever; comfort level; neonatal pain and discomfort scale; Wong-Baker FACES rating scale

退热是儿童发热的最常见的对症治疗方式之一,其主要目的是改善患儿舒适度,而非单纯恢复正常体温^[1]。对乙酰氨基酚与布洛芬是儿童常用的解热镇痛药,目前国内外研究较多强调两者用于儿童解热时的疗效,大部分研究认为两者疗效相似,部分研究认为布洛芬解热疗效略优于对乙酰氨基酚,但这些研究均忽略了两者改善发热患儿舒适度的疗效^[2-3]。目前国内外尚缺乏统一的量表来评价儿童急性发热的舒适度,因此尚无统一的指标来衡量对乙酰氨基酚与布洛芬改善发热患儿舒适度的疗效。我国学者龚宗容等汉化了新生儿疼痛与不适量表(neonatal pain and discomfort scale, EDIN),证明了其与 Wong-Baker 面部表情疼痛量表(Wong-Baker FACES rating scale)(简称:Wong-Baker 量表)关联效度较好,可用于评价 0 ~ 5 岁儿童急性发热时的舒适度,并将其纳入 2020 年国内《解热镇痛药在儿童发热对症治疗中的合理用药专家共识》,因此其或可作为衡量对乙酰氨基酚与布洛芬改善发热患儿舒适度的疗效指标^[1-4]。本文使用中文版 EDIN 量表和 Wong-Baker 量表评价对乙酰氨基酚与布洛芬改善 0 ~ 5 岁发热儿童舒适度的疗效,并比较两种量表评估结果的差异,为发热患儿舒适度评价及用药提供参考。

1 资料

某院 2022 年 6 月—12 月因发热于门诊就诊且入院治疗,并首次使用对乙酰氨基酚口服混悬液或布洛芬混悬滴剂的患儿。纳入标准:年龄 0 ~ 5 岁;用药疗程 ≥ 3 d;符合急性发热的诊断标准,即入院时用玻璃水银体温计测腋温 ≥ 37.5 °C^[5];药物给药剂量由医师根据患儿病情调整。排除标准:危重症患者,如意识不清、昏迷及生命体征不平稳者;患儿家属不配合调查者;交替使用对乙酰氨基酚与布洛芬者;使用其他非甾体抗炎药者。本研究经我院伦理委员会批准(批件号为:GJYX-KY-2023-046)。

2 方法

2.1 调查方法

由临床医师(临床医师难以兼顾时由临床药师代替)对首次使用对乙酰氨基酚口服混悬液或布洛芬混悬滴剂的患儿(在患儿家属的配合下),分别在用药前、用药第 1 日、用药第 2 日、用药第 3 日,使用中文版 EDIN 量表和 Wong-Baker 量表逐条对患儿舒适度进行评分。

2.2 中文版 EDIN 量表的使用^[1-4]

中文版 EDIN 量表从面部活动、身体活动、睡眠质量、与父母或抚育者的接触、安抚时的反应 5 个维度评价 0 ~ 5 岁急性发热患儿舒适度,每个维度有 4 个行为描述,分别赋值 0 ~ 3 分,总分 15 分,得分由低到高,代表患儿疼痛与不适加重。该量表克朗巴赫系数为 0.892、重测信度 0.734、量表各条目的相关系数在 0.513 ~ 0.782,各条目与量表总分间的相关系数在 0.788 ~ 0.896,证明中文版 EDIN 信效度良好。

2.3 Wong-Baker 量表的使用^[4-6]

研究显示,中文版 EDIN 量表与 Wong-Baker 量表的评分相关系数为 0.885,标准关联效度较好,理论上也可用于评价急性发热患儿的舒适度。该量表依据患儿面部表情分别赋值 0 ~ 10 分,得分由低到高,代表患儿疼痛与不适加重。其中 0 分提示患儿无痛;2 分提示患儿有点痛;4 分提示轻微疼痛;6 分提示明显疼痛;8 分提示严重疼痛;10 分提示剧烈疼痛。

2.4 统计学方法

使用 SPSS 26 软件进行统计分析,计数资料用频数及频率表示,采用卡方检验进行差异比较;计量资料用均数 \pm 标准差表示,采用方差分析进行差异比较;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 纳入患者的基础资料分析

共纳入 94 名患者,其中对乙酰氨基酚组 36 人,布洛芬组 58 人,两组患者性别、年龄、体温分层、平均给药疗程差异均无统计学意义,见表 1。

表 1 纳入患者基本情况

Tab 1 Basic information of included patients				
项目	对乙酰氨基酚组 (n = 36)	布洛芬组 (n = 58)	χ^2/F	P
性别(男)	17 (47.22%)	36 (62.07%)	1.99	0.16
年龄/岁	2.62±1.45	2.42±1.22	0.51	0.48
体温> 39℃	21 (58.33%)	37 (63.79%)	0.28	0.60
平均给药疗程/d	3.67±0.93	3.86±0.96	0.94	0.33

3.2 给药前后中文版 EDIN 量表评分

两组患者治疗前中文版 EDIN 量表评分表差异无统计学意义, 给药第 1~2 日两组患者的评分均有所改善, 但改善幅度差异无统计学意义, 给药第 3 日布洛芬组评分改善幅度(4.69±1.74)显著大于对乙酰氨基酚组(3.50±1.76)($P = 0.02$)。结果提示(见表 2), 以中文版 EDIN 量表评分作为衡量 0~5 岁急性发热患儿舒适度的标准时, 布洛芬改善患儿舒适度的疗效优于对乙酰氨基酚。

3.3 给药前后 Wong-Baker 量表评分

对乙酰氨基酚、布洛芬两组患者治疗前 Wong-Baker 量表评分分别为 4.86±2.43 与 5.03±2.43, 差异无统计学意义, 给药第 3 日两组患者的评分均有所改善, 但改善幅度差异无统计学意义(见表 2)。与中文版 EDIN 量表评分结果不一致。

表 2 治疗前后中文版 EDIN 量表评分(分)

Tab 2 Chinese EDIN scale before and after the treatment (score)					
量表	时间	对乙酰氨基酚组 (n = 36)	布洛芬组 (n = 58)	χ^2/F	P
中文版 EDIN 量表	给药前	6.03±2.50	5.66±2.34	0.54	0.47
	△ 1 d	1.00±1.22	1.28±1.24	1.11	0.29
	△ 2 d	2.28±1.56	2.84±1.40	3.34	0.07
	△ 3 d	3.50±1.76	4.69±1.74	10.28	0.02
Wong-Baker 量表	给药前	4.86±2.43	5.03±2.43	0.11	0.74
	△ 1 d	0.92±1.05	0.98±1.05	0.09	0.77
	△ 2 d	2.75±1.46	2.91±1.77	0.22	0.64
	△ 3 d	3.67±1.71	4.31±2.20	2.24	0.14

注 (Note): △ 1 d = 给药前 - 给药第 1 日 (Subtract the score before the administration from score on the first day of administration); △ 2 d = 给药前 - 给药第 2 日 (Subtract the score before the administration from the score on the second day of administration); △ 3 d = 给药前 - 给药第 3 日 (Subtract the score before the administration from the score on the third day of administration)。

4 讨论

发热是儿童常见的住院原因之一, 此类患儿血液或组织吞噬细胞大量合成与释放内生致热源, 使大脑中的前列腺素 E2 大量释放, 因此急性发热的儿童通常合并肌肉、关节疼痛等症状, 增加患儿的不适感^[7-8]。2016 年《中国 0 至 5 岁儿童病因不明急性发热诊断和处理若干问题循证指

南》指出发热是机体的一种应激反应, 不能仅凭体温的高低预测疾病的严重程度^[9], 同时, 2017 年 Corrad 等^[10]的一项多中心观察研究也证实了发热儿童的疾病行为与发热的程度无关, 因此退热治疗的目标不应是将患儿体温恢复至正常水平, 而应是在改善患儿舒适度的基础上, 积极寻找发热原因, 治疗原发病。

适宜的物理措施可改善发热患儿的舒适度, 2019 年英国国家卫生与临床优化研究所指南推荐, 适当减少衣物可降低患儿体温, 增加舒适感^[11]。但不适当的物理措施可能导致患儿不适感加重, Thomas 等^[12]的一项随机研究证明, 与单纯使用退热药物相比, 退热药物联合温和海绵擦拭身体虽然可起到快速降温的作用, 但对最终降温没有任何优势, 且可能导致其他不适; Josna 等^[13]的研究指出相比温和海绵擦拭, 使用温热海绵擦拭可提高患儿舒适度。同时多国指南也不推荐使用乙醇擦身、冰水灌肠等方法, 因为其可能致患儿寒战、哭闹、起鸡皮疙瘩, 增加患儿不适感^[14]。

同时药物治疗也是改善发热患儿舒适度的主要方式, 对乙酰氨基酚与布洛芬是被证实可安全用于儿童的退热治疗, 其中国外一项专家共识推荐, 对乙酰氨基酚是唯一一种可用于 0~3 个月儿童退热治疗的药物^[15]。但两者改善患儿舒适度的疗效优劣性尚不明确, 同时缺乏有统一、有效的评价标准。2015 年我国学者龚宗容等^[4]汉化了 EDIN 量表, 证明了其与 Wong-Baker 量表关联度较好, 可用于评价 0~5 岁急性发热儿童舒适度的有效性, 因此本文以中文版 EDIN 量表评分和 Wong-Baker 量表评分作为衡量对乙酰氨基酚与布洛芬改善发热患儿舒适度的疗效指标。结果显示, 对乙酰氨基酚与布洛芬均可改善 0~5 岁急性发热患儿舒适度, 以中文版 EDIN 量表评分作为衡量标准时, 在用药 3 日后布洛芬改善患儿舒适度的疗效优于对乙酰氨基酚, 以 Wong-Baker 量表评分作为衡量标准时, 在用药 3 日后, 两组患儿的舒适度改善幅度仍无明显差异。探究其原因, 可能与两种量表的特点差异有关, Wong-Baker 量表主要依据患儿面部表情评分, 虽然使用简便, 但主观差异较大, 不同评分者对患儿面部表情的识别能力不同, 容易造成偏差; 而中文版 EDIN 量表从面部活动、身体活动、睡眠质量、与父母或抚育者的接触、安抚时的反应 5 个维度进行评分, 虽然较为烦琐, 但可操作性更强, 不易受评价者主观因素的影响。

综上所述, 本文使用中文版 EDIN 量表与 Wong-Baker 量表评价对乙酰氨基酚与布洛芬改善 0~5 岁发热儿童舒适度的疗效, 结果证实, 两种量表对发热患儿舒适度的评价结果可能存在差异, 且使用中文版 EDIN 量表评估时, 布洛芬在改善急性发热患儿舒适度方面的疗效可能优于对乙酰氨基酚, 但由于两种量表的评价结果并不一致, 尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心, 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中国医师协会呼吸医师分会儿科呼吸工作委员会, 等. 解热镇痛药在儿童发热对症治疗中的合理用药专家共识 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35 (3): 161-169.
- [2] Paul IM, Walson PD. Acetaminophen and ibuprofen in the treatment of pediatric fever: a narrative review [J]. *Curr Med Res Opin*, 2021, 37 (8): 1363-1375.
- [3] 陈华武. 布洛芬混悬液与对乙酰氨基酚在小儿高热治疗中的效果 [J]. 中国实用医药, 2022, 17 (9): 133-135.
- [4] 龚宗容, 舒敏, 万朝敏, 等. 中文版《新生儿疼痛和不适量表》在 0 至 5 岁儿童急性发热舒适度的信度和效度研究 [J]. 中国循证儿科杂志, 2015, 10 (5): 328-331.
- [5] Wang Y. Guidelines for the diagnosis and treatment of acute fever without source in children 0 to 5 years of age in China (explaining version): the definition of fever and the measure of body temperature [J]. *Chin J Evid Based Pediatr*, 2009, 4 (1): 60-64.
- [6] 龚宗容, 舒敏, 万朝敏, 等. Wong-Baker 面部表情疼痛量表对 0 至 5 岁急性发热儿童舒适度评估的效果 [J]. 中国循证儿科杂志, 2015, 10 (6): 401-404.
- [7] 王建枝, 钱睿哲. 病理生理学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 107-115.
- [8] Koeberle A, Werz O. Perspective of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 98 (1): 1-15.
- [9] 罗双红, 舒敏, 温杨, 等. 中国 0 至 5 岁儿童病因不明急性发热诊断和处理若干问题循证指南 (标准版) [J]. 中国循证儿科杂志, 2016, 11 (2): 81-96.
- [10] Corrad F, Copin C, Wollner A, et al. Sickness behavior in feverish children is independent of the severity of fever. An observational, multicenter study [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (3): e0171670.
- [11] National Institute for Health and Care Excellence. Fever in under 5s: assessment and initial management. 2019. Available from URL: www.nice.org.uk/guidance/ng143.
- [12] Thomas S, Vijaykumar C, Naik R, et al. Comparative effectiveness of tepid sponging and antipyretic drug versus only antipyretic drug in the management of fever among children: a randomized controlled trial [J]. *Indian Pediatr*, 2009, 46 (2): 133-136.
- [13] Josna J, Mony K, Sheela SNA, et al. Effect of tepid sponging versus warm sponging on body temperature and comfort among under-five children with pyrexia [J]. *Indian J Pediatr*, 2021, 89 (5): 516.
- [14] Meremikwu MM, Oyo-Ita A. Physical methods for treating fever in children [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003, 2: CD004264.
- [15] Chiappini E, Vitale A, Badolato R, et al. The effective management of fever in pediatrics and insights on remote management: experts' consensus using a delphi approach [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10: 834673.

(收稿日期: 2023-05-24; 修回日期: 2023-08-03)

药品不良反应

1 例富马酸替诺福韦二吡呋酯致低磷酸盐血性骨软化症的
案例报道及文献汇总分析

杨燕¹, 刘迎², 李文渊^{3*} (1. 成都市第四人民医院/成都市精神卫生中心, 成都 610000; 2. 成都市武侯区玉林社区卫生服务中心, 成都 610000; 3. 四川省医学科学院·四川省人民医院/电子科技大学附属医院药理学部, 个体化药物治疗四川省重点实验室, 成都 610000)

关键词: 富马酸替诺福韦二吡呋酯; 低磷酸盐血性骨软化症; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)12-3368-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.044

富马酸替诺福韦二吡呋酯 (TDF) 是一种核苷酸逆转录酶抑制剂, 于 2001 年和 2008 年分别被美国食品药品监督管理局批准用于治疗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和乙型肝炎病毒 (HBV) 感染^[1], 也是我国目前抗 HIV 和 HBV 感染的常用一线治疗药物。低磷酸盐血症性佝偻病 (HR) / 低磷酸盐血性骨软化症 (HO) 是一种以低磷酸盐血症为主要特征的罕见骨骼矿化障碍疾病, 发生在儿童期为 HR, 发生在成人期为 HO。患病原因主要为遗传性因素和少数获得性原因, 其中获得性原因包括肿瘤性骨软化症、药物或毒物对肾小管的损害等^[2]。引起 HO 的药物报道较多的是阿德福韦酯, 然而研究表明 TDF 也具有一定的肾毒性和骨毒性, 可导致散发性范可尼综合征以及骨密度降低、骨软化等骨病^[3-4]。药物所致 HO 可表现为乏力、骨痛、身材变矮、多发骨折、活动受限等, 发病率低, 存在诊断不及时、漏诊、误诊、治疗不规范的问题, 具有较高的致残率和致畸率^[4]。本文报道 1 例 TDF 所致 HO 病例, 并对 TDF 所致 HR/HO 进行文献汇总分析, 总结其临床特点, 为 TDF 的安全使用提供参考。

1 病例资料

患者女性, 54 岁, 绝经后 5 年, 身高 150 cm, 体重 35 kg, 体质指数 (BMI) $16 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, 因“反复骨折 1 年, 全身疼痛 10 个月”于 2023 年 2 月 28 日入四川省人民医院住院治疗。既往病史: 2017 年诊断获得性免疫缺陷综合征 (AIDS), 之后长期口服 TDF 0.3 g qn、拉米夫定 0.1 g qn、洛

匹那韦利托那韦 250 mg bid, 余无特殊。否认高血压、糖尿病史, 无食物、药物过敏史, 无家族遗传病史, 否认激素使用史。2022 年 2 月患者出现非暴力性左侧肋骨骨折, 经院外保守治疗后疼痛好转, 后自行间断服用碳酸钙、维生素 AD 剂。2022 年 4 月患者无明显诱因出现双膝关节持续性隐痛, 院外予以玻璃酸钠注射治疗后未见好转。2022 年 6 月患者无明显诱因先后出现腰部、双踝关节、肩背部持续性隐痛, 体位改变、用力时疼痛加重, 症状逐步加重并影响行走。2022 年 8 月前患者因行走时不慎摔倒, 双膝着地致左侧髌骨骨折, 股骨外髁软骨下骨折, 予以保守治疗后好转。2022 年 10 月前患者再次出现非暴力性左侧肋骨骨折, 予以保守治疗后患者全身疼痛仍存在。2022 年 12 月患者感全身疼痛明显, 行走、翻身坐起困难, 影响日常生活, 自觉身高下降 4 ~ 5 cm, 伴有食欲下降, 夜尿增多。2023 年 1 月 29 日, 患者血电解质检查提示低血磷 ($0.37 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 立即停用 TDF, 调整抗病毒药物为比克恩丙诺 (含比克替拉韦钠 50 mg, 恩曲他滨 200 mg, TDF 25 mg) 每日 1 片。

入院体格检查: 体形消瘦, 精神差, 浅表淋巴结、甲状腺未扪及肿大, 心肺腹查体阴性, 脊柱无侧弯无畸形, 各胸腰椎体均有压痛及叩痛; 步行困难, 轮椅助行。实验室及辅助检查: 肌酐 $80.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 估算肾小球滤过率 $71.59 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \downarrow$, 血钙 $2.49 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (参考值: $2.11 \sim 2.52$), 血磷 $0.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$ (参考值:

基金项目: 成都市医学科研课题 (No.2022406)。

作者简介: 杨燕, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 714754548@qq.com *通信作者: 李文渊, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: wenyuanli74@163.com

0.85 ~ 1.51), 碱性磷酸酶 (ALP) $319 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ (参考值: 50 ~ 135), 甲状旁腺素 (PTH) $14.40 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$ (参考值: 15 ~ 64)。骨代谢指标: β 胶原降解产物 $2985 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, I 型前胶原氨基端肽 $180 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 25-羟基维生素 D $28.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$ 。24 h 尿量 2.5 L、24 h 尿钙 $11.25 \text{ mmol} \uparrow$ 、24 h 尿磷 $7.25 \text{ mmol} \uparrow$, 尿蛋白 (+)、pH 值 7.5, 磷廓清指数: $0.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$; 肾小管磷重吸收率 $79.59\% \downarrow$ (正常范围 $84.7\% \sim 90.8\%$)。双能 X 线骨密度检查提示重度骨质疏松 (T 值: 腰 1-4.4, 腰 2-5.5, 腰 3-4.4, 腰 4-4.9, L_1-L_4 -4.8, 左侧股骨颈 -4.4, 左髌关节 -4.4)。胸腰椎 DR 检查: 胸椎序列连续, 曲度正常, 椎间隙未见异常, 软组织无肿胀, 部分椎体缘骨质增生, 胸腰椎骨质密度稍减低。血常规、心肌损伤标志物、肿瘤标志物、凝血功能、促肾上腺皮质激素、性激素、甲状腺功能、生长激素、胰岛素样生长因子 1、肾素、醛固酮、抗核抗体谱、大便常规未见明显异常。

入院后治疗: 2023 年 3 月 6 日经骨质疏松及代谢性骨病多学科门诊会诊后诊断 HO, 排除遗传性及肿瘤性来源病因学, 考虑 TDF 所致 HO。继续停用 TDF, 予以参芪补肾口服液 10 mL qd 、金水宝片 1.68 g tid 促肾小管恢复, 碳酸钙 D_3 片 1.2 g qn 、维生素 D_3 800 iu qd 、阿法骨化醇 $0.25 \text{ } \mu\text{g qd}$ 治疗。2023 年 3 月 28 日, 患者复查血钙 $2.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 血磷 $1.06 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 患者恢复部分活动, 病情好转。2023 年 7 月 31 日, 临床药师电话随访患者, 患者诉骨痛明显好转, 能室内行走, 未再发生骨折。

TDF 所致 HO 的关联性分析: 该例中年女性 HIV 感染患者在使用 TDF 治疗 5 年后出现乏力、骨痛、身材变矮、多发骨痛、行走及活动受限等临床症状, 患者无遗传性疾病及肿瘤病史, 实验室检查提示, 血磷水平显著降低、尿磷增加、肾磷阈降低、ALP 升高、肾小球滤过率降低、25-羟基维生素 D 不足、PTH 接近正常、血钙正常, 骨密度检查提示重度骨质疏松。停用 TDF, 换用比克恩丙诺治疗 2 个月后, 患者血清磷恢复至正常水平, 部分活动恢复。根据药品不良反应关联性评价原则进行分析: ① 该患者 TDF 的使用与 HO 的出现有合理的时间关系; ② 符合 TDF 已知的不良反应类型; ③ 停药后 HO 的症状减轻; ④ 患者未再次使用 TDF; ⑤ 患者 HO 不能用合并用药的作用、患者病情的进展及其他治疗的影响来解释。因此该案例 TDF 导致 HO 不良反应的关联性评价为很可能。换用抗病毒药物、护肾、补充钙和维生素 D 治疗后患者症状明显好转, 治疗效果佳。

2 文献汇总分析及结果

2.1 纳入和排除标准

纳入标准: ① 国内外有关 TDF 导致 HR/HO 的案例报道或临床研究; ② 研究对象为 HIV 或 HBV 感染的患者。排除标准: ① 与主题无关的研究, 如仅报道范可尼综合征、骨密度降低等; ② 仅有摘要的会议论文。

2.2 检索策略

以“Tenofovir、Hypophosphatemic、Osteomalacia、Fanconi Syndrome”为英文检索词, 以“替诺福韦、低血磷、骨软化、范可尼综合征”为中文检索词, 计算机检索 PubMed、EMbase、中国知网和万方医学数据库, 检索时间为建库至 2023 年 3 月 15 日。语言限制为中文或英文。

2.3 数据提取及统计分析

由两位研究者按照纳入与排除标准独立筛选纳入文献、提取数据, 如有分歧, 经讨论达成共识。提取纳入文献的以下信息: 研究作者、发表年份、发表期刊、纳入患者基本信息、病毒感染类型、TDF 使用时间、血磷、血钙、ALP、PTH、25-羟基维生素 D 以及疾病相关的其他特征。

使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计数资料采用例数 (构成比) 描述, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述。采用 t 检验进行组间的比较, $P < 0.05$ 即差异有统计学意义。

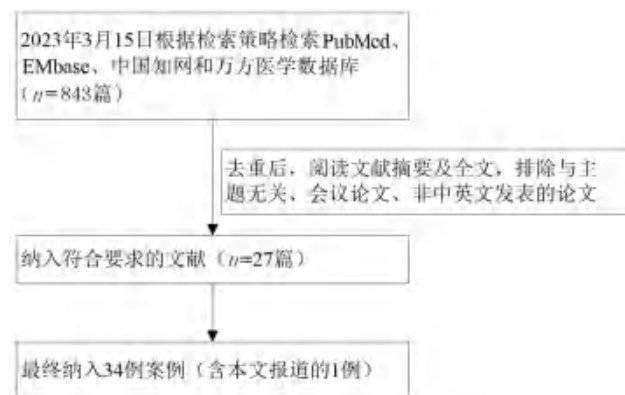


图 1 TDF 导致 HR/HO 案例纳入流程图

2.4 结果

共纳入 27 篇文献^[5-31], 其中英文 25 篇, 中文 2 篇, 最终纳入 33 例 TDF 所致 HR/HO 的案例, 详见表 1。除 Zúñiga 等^[18]报道的 1 例 HIV 感染的 11 岁女孩经 TDF 治疗 18 个月 after 出现 HR, 其余案例报道均为 HO。

包括本文报道案例在内, 共计 34 例纳入汇总分析。分析结果显示, TDF 所致 HR/HO 患者中, 男性与女性数量相同, 各 17 例 (50%)。患者平均年龄为 (46.94 ± 12.03) (11 ~ 58) 岁, 使用 TDF 平均时

间为 (4.36±3.59) 年 (6 周~12 年)。纳入的案例中, TDF 治疗 HIV 感染的最多, 共 19 例 (55.88%); 治疗 HBV 感染 12 例 (35.29%); 还有 3 例 (8.82%) 合并 HIV 和丙型肝炎病毒 (HCV) 感染。HR/HO 发生时, 患者平均血磷水平为 (0.49±0.16) mmol·L⁻¹, 血钙水平为 (2.26±0.16) mmol·L⁻¹, ALP 水平

为 (462.17±0.16) U·L⁻¹, PTH 为 (46.73±44.51) pg·mL⁻¹, 25-羟基维生素 D 为 (26.76±19.56) ng·mL⁻¹, 详见表 2。对 TDF 治疗 HIV 或 HBV 导致的 HO 进行分组分析, 发现两组在年龄, TDF 使用时长, 血清 Ca、P、ALP、25-羟基维生素 D、PTH 差异均无统计学意义 (P > 0.05), 详见表 3。

表 1 TDF 导致 HR/HO 的案例报道

序号	文献	原发疾病	性别	年龄/岁	病毒感染 时长/年	TDF 使 用时长	Ca/ (mmol·L ⁻¹)	P/ (mmol·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	25-羟基 维生素 D/ (ng·mL ⁻¹)	PTH/ (pg·mL ⁻¹)
1	Joseph 2023 ^[5]	HIV	女	46	12	12 年	2.30	0.68	577	17.60	65.40
2	Rao 2021 ^[6]	HIV	女	54	NA	10 年	2.15	0.55	258	33.00	80.00
3	Iatan 2021 ^[7]	HBV	女	61	NA	NA	2.52	0.30	NA	37.60	22.64
4	Hadzimuratovic 2021 ^[8]	HBV	女	33	NA	15 年	2.20	0.69	279	48.00	69.00
5	Francis 2021 ^[9]	HIV	女	56	8	8 年	2.42	0.73	375	22.30	12.50
6	钮含春 2021 ^[10]	HBV	男	37	4	1 年	2.41	0.50	435	NA	NA
7	Cundy 2020 ^[11]	HBV	女	68	7	5 年	2.17	0.70	174	NA	NA
8	Woo 2020 ^[12]	HIV/HCV	男	44	NA	NA	NA	0.54	NA	NA	NA
9	Chung 2019 ^[13]	HBV	男	58	NA	2.5 年	2.00	0.39	281	17.80	222.00
10	Moon 2018 ^[14]	HBV	男	51	NA	3 年	NA	0.26	1197	NA	NA
11	Wang 2018 ^[15]	HBV	男	31	10	0.5 年	2.13	0.30	473	20.30	12.32
12	Sarikaya 2018 ^[16]	HBV	女	55	8	2 年	2.02	0.36	303	14.50	37.00
13	祝玲 2017 ^[17]	HIV/HCV	女	37	3	3 年	NA	0.63	417	NA	NA
14	Zúñiga 2017 ^[18]	HIV	女	11	11	1.5 年	2.40	0.84	660	15.40	25.90
15	Suh 2017 ^[19]	HBV	男	45	13	4 年	2.25	0.65	288	6.42	54.24
16	Hajek 2017 ^[20]	HIV	男	45	10	5 年	NA	NA	1223	NA	NA
17	Khoo 2017 ^[21]	HBV	男	51	NA	1 年	NA	NA	NA	NA	NA
18	Kim 2016 ^[22]	HBV	男	47	9	2 年	2.42	0.58	310	12.80	40.20
19	Mateo 2016 ^[23]	HIV	男	64	24	6 年	2.51	0.41	355	16.50	39.60
		HIV	女	46	19	5 年	2.20	0.59	170	5.90	54.00
		HIV	女	41	20	10 年	2.15	0.44	158	20.00	28.00
		HIV	男	42	18	7 年	2.17	0.32	295	46.00	15.00
		HIV	男	58	24	6 年	2.19	0.68	139	88.00	44.60
20	Gómez Martinez 2014 ^[24]	HBV	女	49	NA	1 年	NA	0.55	438	NA	NA
21	Koenig 2014 ^[25]	HIV	男	42	12	5 年	2.12	0.22	447	44.00	1.71
22	Lucey 2013 ^[26]	HIV	男	17	15	4 年	NA	0.37	353	8.40	70.75
23	De Socio 2012 ^[27]	HIV	女	45	22	1 年	2.22	0.48	1365	5.00	47.00
24	Haverkort 2011 ^[28]	HIV	男	42	14	4 年	NA	0.29	NA	33.20	33.02
		HIV	男	53	15	5 年	NA	0.41	312	48.00	38.68
25	Di Biagio 2009 ^[29]	HIV/HCV	女	48	12	6 周	NA	0.52	1247	NA	NA
26	Wanner 2009 ^[30]	HIV	女	62	8	1 年	2.40	0.60	349	NA	NA
27	Parsonage 2005 ^[31]	HIV	男	47	15	2.08 年	NA	0.43	358	NA	NA
		HIV	女	56	4	0.92 年	NA	0.47	310	NA	NA
28	本文患者	HIV	女	54	6	6 年	2.49	0.37	319	28.1	14.4

注 (Note): NA 原文未提供数据 (No data provided in the original text)。

3 讨论

HR/HO 是 TDF 已知的一种罕见不良反应, 其发生机制目前仍不清楚, 但研究大多认为与近端肾小管功能障碍有关^[5-11]。TDF 是水溶性双酯前体药物, 在体内首先水解转化为替诺福韦 (TFV), 然

后通过细胞酶磷酸化为活性代谢产物二磷酸替诺福韦, 二磷酸替诺福韦通过与天然底物 5'-三磷酸脱氧腺苷竞争, 并且在与 DNA 整合后终止 DNA 链, 从而抑制 HIV-1 反转录酶和 HBV 反转录酶的活性, 发挥抗病毒的作用^[1, 3]。TFV 主要经肾小球滤过和

表 2 TDF 导致 HR/HO 的案例特点 (n = 34)

项目	数值
年龄 / 岁	46.94 ± 12.03
< 18	2 (5.88)
18 ~ 30	0 (0)
31 ~ 40	4 (11.76)
41 ~ 50	14 (41.18)
51 ~ 60	10 (29.41)
61 ~ 68	4 (11.76)
性别 [n (%)]	
男	17 (50)
女	17 (50)
病毒感染类型 [n (%)]	
HIV	19 (55.88)
HIV/HCV	3 (8.82)
HBV	12 (35.29)
病毒感染时长 / 年 (n = 26)	12.42 ± 6.00
TDF 使用时长 / 年 (n = 32)	4.36 ± 3.59
入院血清检查	
Ca (n = 22) / (mmol · L ⁻¹)	2.26 ± 0.16
P (n = 32) / (mmol · L ⁻¹)	0.49 ± 0.16
ALP (n = 30) / (U · L ⁻¹)	462.17 ± 0.16
25-羟基维生素 D (n = 22) / (ng · mL ⁻¹)	26.76 ± 19.56
PTH (n = 22) / (pg · mL ⁻¹)	46.73 ± 44.51

表 3 TDF 导致 HR/HO 在 HIV 和 HBV 感染患者中的差异

感染类型	年龄 / 岁	TDF 使用 时长 / 年	Ca/ (mmol · L ⁻¹)	P/ (mmol · L ⁻¹)	ALP/ (U · L ⁻¹)	25-羟基维生素 D/ (ng · mL ⁻¹)	PTH/ (pg · mL ⁻¹)
HIV 感染	46.37 ± 13.42	5.24 ± 3.21	2.29 ± 0.14	0.49 ± 0.17	445.72 ± 335.58	28.76 ± 21.58	38.04 ± 22.83
HBV 感染	48.83 ± 11.17	3.36 ± 4.10	2.23 ± 0.18	0.48 ± 0.17	417.80 ± 288.67	22.49 ± 14.84	65.34 ± 71.59
P	0.59	0.21	0.47	0.82	0.83	0.5	0.19

步研究。Joseph 等^[5]研究表明, TDF 诱发 HO 的危险因素包括治疗时间、低 CD4 细胞计数的晚期 HIV、ABCC4 转运蛋白基因多态性、高龄、糖尿病、合并 HCV 感染、肾功能不全、低肌酐清除率、低体质量指数、使用非甾体抗炎药, 以及联合使用蛋白酶抑制剂等。本文报道的 1 名女性 HIV 感染患者在使用 TDF 治疗 5 年后出现 HO, 具备治疗时间长、肾功能不全、低体质量指数, 以及联合使用蛋白酶抑制剂等危险因素。因此临床在使用 TDF 时应充分评估患者是否存在相关危险因素, 做好用药监护。

目前国内较多关注阿德福韦酯相关 HO, 对于长期使用 TDF 引起的 HR/HO 的关注相对不足。2015 年欧洲艾滋病临床协会指南建议使用 TDF 患者每 3 ~ 12 个月检测一次肌酐, 每 6 ~ 12 个月检查骨骼指标 (钙、磷酸盐和 ALP), 如果在接受治疗时出现低血磷、高 ALP 水平, 持续或

近端肾小管分泌排泄, 70% ~ 80% 的药物以原形经尿液排泄。TDF 的血浆稳定性差, 进入血浆后迅速被水解为生物利用度低的 TFV, 大量的 TFV 经有机阴离子转运蛋白 (OAT1) 转运积聚在近端肾小管并导致其功能异常^[5]。因肾小管功能异常, 对磷的重吸收减少, 从而导致 HR/HO^[2]。

本文通过文献系统分析发现, TDF 致 HR/HO 多发于青中年, 偶发于儿童, 以 HO 为主。在性别方面无差异, 患病平均年龄为 (46.94 ± 12.03) 岁, 发病年龄早于原发性骨质疏松患病年龄^[32], 晚于遗传性或肿瘤相关 HO, 有助于鉴别诊断。服用 TDF 后发生 HR/HO 的时间不一, 大部分患者在使用药 2 ~ 5 年后出现症状, 与阿德福韦酯使用后发生时间相似^[4]。纳入分析的患者血磷水平显著降低, 血钙正常, ALP 水平升高, PTH 正常或轻度升高, 25-羟基维生素 D 多为正常或偏低, 符合 HO 的特点^[2]。TDF 治疗 HIV 导致的 HR/HO 病例多于 TDF 治疗 HBV, 有可能不同病毒感染对骨损伤有差异, 但分组分析发现两组在上述血清学指标差异无统计学意义, 因此不同疾病下使用 TDF 后引起 HR/HO 的临床特点是否会有不同有待进一

恶化的骨骼或肌肉症状, 则应考虑继发于近端肾小管损伤的低磷血症和骨软化症, 应立即停用 TDF^[20]。虽然一定程度的肾小管损伤可能是永久性的, 但停用 TDF 后肾功能趋于逐渐改善, 补充磷酸盐和和维生素 D 可以帮助骨愈合和再矿化, 因此在使用 TDF 时应及时进行安全性监测。

本研究仍存在一些不足之处, 如纳入的样本量较少, 本研究是基于已报道的案例进行分析, TDF 导致的 HR/HO 虽然是罕见的, 但许多病例可能没有被发现和报道。

参考文献

- [1] 丁天然, 卢洪洲. 替诺福韦抗病毒感染最新研究进展 [J]. 世界临床药物, 2014, 35 (8): 453-457.
- [2] 徐潮, 赵家军, 夏维波. 中国低血磷性佝偻病 / 骨软化症诊疗指南 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2022, 15 (2): 107-125.
- [3] 程艳红. 替诺福韦酯对神经的损伤与机制研究 [D]. 开封: 河南大学, 2017.

- [4] 孙搏, 徐瑛, 刘皋林. 药源性骨软化及佝偻病的发病机制、致病药物和防治 [J]. 中南药学, 2020, 18 (1): 84-88.
- [5] Joseph A, Cherian KE, Kapoor N, et al. Tenofovir-induced hypophosphatemic osteomalacia: how do bone mineral density, trabecular bone score and proximal hip geometry change with treatment [J]. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, 2023, 2023 (1): 22-0259.
- [6] Rao M, Dadey L, Glowa T, et al. Fanconi syndrome leading to hypophosphatemic osteomalacia related to tenofovir use [J]. *Infect Dis Rep*, 2021, 13 (2): 448-453.
- [7] Iatan I, Lee TC, McDonald EG. Tenofovir-induced osteomalacia with hypophosphataemia [J]. *BMJ Case Rep*, 2021, 14 (5): e240387.
- [8] Hadzimuratovic B, Haschka J, Hartmann MA, et al. Impact of tenofovir disoproxil-induced fanconi syndrome on bone material quality: a case report [J]. *JBMR Plus*, 2021, 5 (6): e10506.
- [9] Francis AK, Jacob M, Koshy JM, et al. Tenofovir induced fanconi syndrome complicated by bilateral neck of femur fractures [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2021, 25 (6): 569-571.
- [10] 钮含春, 刘瑞雪, 宋真真, 等. 获得性低磷骨软化症两例 [J]. 新医学, 2021, 52 (9): 721-724.
- [11] Cundy T, Que L, Hassan IM, et al. Bisphosphonate-induced deterioration of osteomalacia in undiagnosed adult fanconi syndrome [J]. *JBMR Plus*, 2020, 4 (8): e10374.
- [12] Woo E, Kumbhare D, Winston P. Incapacitating pain from tenofovir induced hypophosphatemic osteomalacia in a hemophilia patient-a case report [J]. *Can J Pain*, 2020, 4 (1): 287-291.
- [13] Chung TL, Chen NC, Chen CL. Severe hypophosphatemia induced by denosumab in a patient with osteomalacia and tenofovir disoproxil fumarate-related acquired Fanconi syndrome [J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30 (2): 519-523.
- [14] Moon NH, Shin WC, Do MU, et al. An uncommon case of bilateral pathologic hip fractures: antiviral drug-induced osteomalacia in a patient with hepatitis B [J]. *Hip Pelvis*, 2018, 30 (2): 109-114.
- [15] Wang YJ, Lou HY, Shan LZ, et al. Hypophosphatemic osteomalacia with pathological fractures during tenofovir therapy in a chronic hepatitis B patient: a case report and literature review [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2018, 11 (5): 5263-5268.
- [16] Sarikaya NO, Kırdar NN, Ates MY, et al. Hypophosphatemic osteomalacia due to tenofovir-induced Fanconi syndrome in chronic hepatitis B patient [J]. *Clin Cases Miner Bon*, 2018, 15 (2): 276-279.
- [17] 祝玲, 李勤. 艾滋病伴骨痛及多发骨质破坏 1 例 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4 (21): 4137, 4144.
- [18] Zúñiga M, Galindo A, Galaz MI, et al. Síndrome de Fanconi y raquitismo hipofosfatémico asociado al uso de tenofovir en una niña infectada con VIH Tenofovir-associated Fanconi's syndrome and rickets in a HIV infected girl [J]. *Rev Chil Pediatr*, 2017, 88 (1): 148-152.
- [19] Suh YS, Chun DI, Choi SW, et al. Pathologic femoral fracture due to tenofovir-induced Fanconi syndrome in patient with chronic hepatitis B: a case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96 (46): e8760.
- [20] Hajek J, Ouma S, Hemmett J, et al. Chest deformity and disability due to tenofovir-induced hypophosphatemic osteomalacia: case report and call for improved global access to laboratory testing [J]. *J Int Assoc Provid AIDS Care*, 2017, 16 (5): 430-432.
- [21] Khoo ACH, Lee YF. Bone scintigraphy and tenofovir-induced osteomalacia in chronic hepatitis B [J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2017, 51 (2): 195-196.
- [22] Kim D, Lee J, Kim DH, et al. A case of tenofovir-associated fanconi syndrome in patient with chronic hepatitis B [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2016, 68 (6): 317-320.
- [23] Mateo L, Holgado S, Mariñoso ML, et al. Hypophosphatemic osteomalacia induced by tenofovir in HIV-infected patients [J]. *Clin Rheumatol*, 2016, 35 (5): 1271-1279.
- [24] Gómez Martínez MV, Gallardo FG, Pirogova T, et al. Bone scintigraphy and secondary osteomalacia due to nephrotoxicity in a chronic hepatitis B patient treated with tenofovir [J]. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*, 2014, 33 (2): 103-105.
- [25] Koenig KF, Kalbermatter S, Menter T, et al. Recurrent bone fractures due to tenofovir-induced renal phosphate wasting [J]. *Scand J Infect Dis*, 2014, 46 (3): 221-224.
- [26] Lucey JM, Hsu P, Ziegler JB. Tenofovir-related Fanconi's syndrome and osteomalacia in a teenager with HIV [J]. *BMJ Case Rep*, 2013, 9 (2013): bcr2013008674.
- [27] De Socio GV, Fabbriciani G, Massarotti M, et al. Hypophosphatemic osteomalacia associated with tenofovir: a multidisciplinary approach is required [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012, 4 (1): e2012025.
- [28] Haverkort ME, van der Spek BW, Lips P, et al. Tenofovir-induced Fanconi syndrome and osteomalacia in two HIV-infected patients: role of intracellular tenofovir diphosphate levels and review of the literature [J]. *Scand J Infect Dis*, 2011, 43 (10): 821-826.
- [29] Di Biagio A, Rosso R, Monteforte P, et al. Whole body bone scintigraphy in tenofovir-related osteomalacia: a case report [J]. *J Med Case Rep*, 2009, 22 (3): 8136.
- [30] Wanner DP, Tyndall A, Walker UA. Tenofovir-induced osteomalacia [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27 (6): 1001-1003.
- [31] Parsonage MJ, Wilkins EG, Snowden N, et al. The development of hypophosphataemic osteomalacia with myopathy in two patients with HIV infection receiving tenofovir therapy [J]. *HIV Med*, 2005, 6 (5): 341-346.
- [32] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会, 章振林. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2022) [J]. 中国全科医学, 2023, 26 (14): 1671-1691.

(收稿日期: 2023-06-02; 修回日期: 2023-07-02)

奥美沙坦相关肠病 1 例及文献复习

闻超¹, 刘锋^{2*}, 王敏³ (1.孝感市中心医院药学部, 湖北 孝感 432000; 2.孝感市中心医院全科医学科, 湖北 孝感 432000; 3.孝感市妇幼保健院手术室, 湖北 孝感 432000)

关键词: 奥美沙坦; 相关肠病; 体重减轻; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)12-3373-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.045

奥美沙坦是一种血管紧张素 II 受体拮抗剂, 于 2002 年在美国获批上市, 主要用于治疗高血压。这种药物最常见的不良反应包括高血钾、横纹肌溶解、急性肾损伤、荨麻疹等。2012 年, 梅奥诊所首次报道了服用奥美沙坦后出现奥美沙坦相关肠病 (olmesartan-associated enteropathy, OAE) 的病例, 并在停止使用该药后症状得到缓解^[1]。继而美国食品药品监督管理局于 2013 年发布了关于使用奥美沙坦后可能出现 OAE 的安全警告。OAE 是一种比较罕见的药品不良反应, 说明书已经有明确记载。OAE 在国外已经有较多的病例报道, 但是在国内鲜有报道, 且在日常诊疗活动中很难识别, 极易漏诊和误诊。本文对 1 例 OAE 病例进行报道及文献复习, 以期引起临床医师对 OAE 的重视, 提高鉴别不良反应的能力。

1 病历资料

1.1 病例介绍

患者, 男, 40 岁, 因“体检发现血压升高 1 个月, 乏力伴体重下降 20 d”于我院门诊全科医学科就诊。该患者既往体健, 1 个月前体检发现血压偏高, 后多次测量血压波动在 160 ~ 140/90 ~ 80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 心内科医师建议给予奥美沙坦酯片 (40 mg qd) 口服降血压治疗。患者服用奥美沙坦 3 d 后出现反复轻度腹痛、腹胀、腹泻, 四肢乏力, 食欲减退, 体重 20 d 内减轻约 8 kg。患者自诉近期无感染症状, 无糖尿病、甲状腺功能亢进等疾病病史, 无旅行史, 无饮食结构改变。

1.2 诊疗经过

入院时血压 128/81 mmHg, 体重 69 kg, 体质指数 (BMI) 24.8 kg · m⁻²。体格检查示腹部轻度压痛。实验室检查未发现明显异常: 血红蛋白 132 g · L⁻¹, 白蛋白 45 g · L⁻¹, 总胆固

醇 3.8 mmol · L⁻¹, 葡萄糖 5.6 mmol · L⁻¹, 肌酐 61 μmol · L⁻¹, 钠 143.6 mmol · L⁻¹, 钾 4.1 mmol · L⁻¹, 钙 2.31 mmol · L⁻¹, 糖化血红蛋白 5.4%。甲状腺功能五项正常, 粪便潜血试验以及沙门氏菌、志贺氏菌、弯曲杆菌、大肠埃希菌、艰难梭菌抗原和 A/B 毒素测定的粪便培养物结果均为阴性。胸部、腹部 CT 扫描均显示正常。

接诊医师认为此患者乏力和体重下降可能是奥美沙坦药物的不良反应, 建议患者到药学科门诊进行专业咨询。接诊药师详细了解了患者临床症状及近期使用的药物, 发现患者目前仅使用奥美沙坦 (南京正大天晴制药有限公司, 规格: 20 mg/片, 批号: 230203) 一种药物, 且使用的是常规剂量 (40 mg qd)。药师通过 Naranjo 评定法进行不良反应因果评价, 患者得分 7 分, 结果判定为很可能 (具体评分见表 1)。药师与医师沟通后, 建议患者进行食管、胃、十二指肠活检, 以进一步明确诊断, 患者以准备不足为由表示拒绝。药师建议患者立即停用奥美沙坦, 改为氨氯地平 10 mg qd 降压。1 周后患者复诊显示相关症状有较好缓解, 1 个月后随访显示体重基本恢复正常, 无明显腹胀和乏力等症状。

2 文献复习

2.1 奥美沙坦相关肠病的流行病学特点

近年来, OAE 在临床上的报道越来越多。Rubio-Tapia 等^[2]研究发现, 在一组患有慢性腹泻、体重减轻或不明原因肠病的患者中, 高达 25% 的患者使用了奥美沙坦。Dong 等^[3]通过 Cox 回归模型, 研究了 2002—2015 年美国 5 个医疗保险数据库中使用奥美沙坦或其他血管紧张素转换酶受体抑制剂 (ARB) 类药物共计 1 928 469 患者, 结果显示使用奥美沙坦与乳糜泻、慢性腹泻、

基金项目: 湖北省卫健委联合基金科研项目 (No.WJ2019H253)。

作者简介: 闻超, 男, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: 363428320@qq.com *通信作者: 刘锋, 男, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事全科医学及慢病管理方面研究, email: windyleou@163.com

表 1 Naranjo 评分量表

相关问题	是	否	得分
1. 该反应先前是否有结论性报告	+1	0	+1
2. 该反应是否是在使用可疑药物后发生的	+2	-1	+2
3. 该反应是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	+1	0	+1
4. 该反应是否在再次使用可疑药物后重复出现	+2	-1	-
5. 是否存在其他原因能单独引起该反应	-1	+2	+2
6. 该反应是否在应用安慰剂后重复出现	-1	+1	-
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	+1	0	-
8. 该反应是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少而缓解	+1	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	-
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	+1	0	+1
得分			7

注: “肯定” ≥ 9 分, “很可能” 5 ~ 8 分, “可能” 1 ~ 4 分, “可疑” ≤ 0 分。

体重减轻和非感染性肠病的发生率增加显著相关。尤其是年龄 > 65 岁、治疗时间 > 1 年和大剂量使用奥美沙坦患者发病率更高。文献表明, OAE 在男性和女性当中发病率大致相当^[4]。OAE 通常表现为非血性腹泻、痉挛性腹痛、呕吐、乏力和体重减轻^[5]; 使用奥美沙坦到出现症状之间的时间范围为 6 ~ 120 个月^[6]。

2.2 奥美沙坦相关肠病的病理生理学机制

OAE 的病理生理学确切机制尚不清楚。有研究发现 OAE 和乳糜泻具有相似的特征, 包括 CD8⁺ 细胞数量增加和白细胞介素 -15 过度表达^[7]。由于十二指肠活检中 CD8⁺ 细胞数量的增加以及奥美沙坦治疗开始后与临床症状出现之间的长时间延迟, Rubio-Tapia 等^[8] 认为 OAE 是细胞介导的免疫损伤, 而不是 I 型超敏反应。也有研究认为人体存在两种不同类型的血管紧张素 II 受体, 即 AT1 和 AT2。其中 AT1 受体在整个消化道中表达, 并参与血管紧张素 II 介导的转化生长因子 β (TGF- β) 信号传导, 它是维持肠道免疫稳态所必需的^[9]。而 AT2 受体表达于十二指肠和空肠, 并可能诱导肠上皮细胞凋亡。奥美沙坦主要通过 AT1 受体不可逆结合发挥药理作用, 当 AT1 被阻断后, 人体内 AT2 受体在细胞膜的表达增多。血管紧张素 II 与 AT2 结合, 上调上皮细胞内促凋亡蛋白 Bax、GATA-6 的表达, 并下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 导致肠上皮细胞死亡, 发挥非炎症相关的致病作用^[10]。

2.3 奥美沙坦相关肠病的诊断方法

OAE 通常难以诊断, 食管胃十二指肠活检发现绒毛萎缩, 可能有助于本病的早期诊断^[11]。OAE

患者贫血、电解质紊乱和低蛋白血症很常见, 乳糜泻的血清学检查结果一般为阴性^[12]。值得注意的是, 有些 OAE 患者可能不伴随腹泻症状, Gade 等^[13] 首次报道了 1 例不伴腹泻症状的 OAE 病例。OAE 患者胃和结肠活检可能分别显示淋巴细胞性胃炎和显微镜下结肠炎^[14]。对于出现腹泻、严重体重减轻和不明原因的十二指肠黏膜绒毛萎缩的患者, 必须将药物诱发的肠病视为潜在诊断^[15]。在乳糜泻血清学阴性的情况下, 对患者的药物进行全面审查后, 奥美沙坦诱发性肠病是最可能的诊断^[16]。

2.4 奥美沙坦相关肠病的治疗方法

OAE 一般采取立即停止使用奥美沙坦以及对症支持治疗。Ianiro 等^[4] 的一项系统评价显示, OAE 患者停用奥美沙坦后, 100% 的患者出现临床症状缓解, 几乎所有患者均显示十二指肠组织学恢复。停止使用奥美沙坦后, 一般需要几周到几个月才能缓解症状^[17]。小肠黏膜改变大多在停药 3 ~ 6 个月内消失。对于症状严重、因脱水而反复住院或症状改善缓慢的患者, 短疗程使用糖皮质激素可能会获益^[18]。

对于既往出现过 OAE 的患者, 应避免再次使用奥美沙坦。Gallivan 等^[19] 报告了 1 例严重腹泻患者的病例, 其临床症状在停用奥美沙坦后消退, 在重新使用奥美沙坦后患者腹泻症状复发。目前已有除奥美沙坦以外其他 ARB 类药物出现相关肠病的病例报道, 涉及的药物有厄贝沙坦^[20]、替米沙坦^[21]、缬沙坦^[22], 这些报道提示 ARB 类药物有导致相关肠病的类效应。法国一项全国性观察性队列研究显示, 血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 也可以导致相关肠病, 但是奥美沙坦导致相关肠病发病率更高^[23]; 2018 年德国和意大利的一项关于 ARB 和 ACEI 导致肠病的研究也得到了同样的结论^[24]。因此, 对于出现 OAE 的患者, 不建议更换为其他 ARB 药物或 ACEI 药物, 可以考虑使用未见肠病不良反应报道的钙离子通道阻滞剂 (CCB) 或 β 受体阻滞剂替代。

3 结论

奥美沙坦是一种常用的降压药物, 其不良反应较少, 但也有可能导致罕见的 OAE 发生。OAE 患者乳糜泻血清学检查结果一般为阴性, 十二指肠活检发现绒毛萎缩有利于早期诊断。本文报道了 1 例高血压患者使用奥美沙坦后出现慢性腹泻、体重减轻和乏力等症状, 停用奥美沙坦后症状缓解。尽管未进行食管、胃、十二指肠活检明确诊断, 但根据药品不良反应相关性可以确

定患者出现了 OAE。临床医师在日常诊疗中,对于长期使用奥美沙坦且出现类似症状的患者,特别是患有多种疾病、长期使用多种药物的患者,应加强 OAE 鉴别诊断,警惕 OAE 发生的可能,并在确诊 OAE 后立即停用奥美沙坦。

参考文献

- [1] Rubio-Tapia A, Herman ML, Ludvigsson JF, et al. Severe spruelike enteropathy associated with olmesartan [J]. *Mayo Clin Proc*, 2012, 87 (8): 732-738.
- [2] Rubio-Tapia A, Talley NJ, Gurudu SR, et al. Gluten-free diet and steroid treatment are effective therapy for most patients with collagenous sprue [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2010, 8 (4): 344-349. e3.
- [3] Dong YH, Jin Y, Tsacogianis TN, et al. Use of olmesartan and enteropathy outcomes: a multi-database study [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47 (6): 792-800.
- [4] Ianiro G, Bibbò S, Montalto M, et al. Systematic review: sprue-like enteropathy associated with olmesartan [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 40 (1): 16-23.
- [5] Choi EYK, McKenna BJ. Olmesartan-associated enteropathy: a review of clinical and histologic findings [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2015, 139 (10): 1242-1247.
- [6] Adike A, Corral J, Rybnicek D, et al. Olmesartan-induced enteropathy [J]. *Methodist Debaquey Cardiovasc J*, 2016, 12 (4): 230.
- [7] Marietta EV, Nadeau AM, Cartee AK, et al. Immunopathogenesis of olmesartan-associated enteropathy [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 42 (11-12): 1303-1314.
- [8] Rubio-Tapia A. Sprue-like enteropathy associated with olmesartan-broadening the differential diagnosis of enteropathy [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 40 (11-12): 1362-1363.
- [9] Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, et al. Regulatory T cells and intestinal homeostasis [J]. *Immunol Rev*, 2005, 204 (1): 184-194.
- [10] Sun LH, Wang WS, Xiao WD, et al. Angiotensin II induces apoptosis in intestinal epithelial cells through the AT2 receptor, GATA-6 and the Bax pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424 (4): 663-668.
- [11] Abbruzzi F, Loconte I, Carparelli S, et al. Olmesartan associated enteropathy: usefulness of video capsule endoscopy in a case with doubtful upper endoscopic/histological picture [J]. *Curr Drug Saf*, 2020, 15 (1): 65-68.
- [12] de Azevedo SM, Rocha DI, Neto D, et al. Olmesartan-induced enteropathy [J]. *Med Clin Practica*, 2023, 6 (1): 100348.
- [13] Gade K, Shanahan C, Frye J, et al. Olmesartan-associated enteropathy without chronic diarrhea: an atypical presentation of a difficult diagnosis: 2139 [J]. *Am J Gastroenterol*, 2016, 111: S1021-S1022.
- [14] Karakonstantis S, Tzagkarakis E, Giannikaki E, et al. Olmesartan-associated enteropathy. A rare but easily treatable entity [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2017, 80 (4): 541-543.
- [15] Matos ARF, Coelho E, Caridade S. Olmesartan-induced enteropathy: a case of recurrent diarrhoea [J]. *Eur J Case Rep Intern Med*, 2020, 7 (8): 001614.
- [16] Sotiropoulos C, Sakka E, Diamantopoulou G, et al. Olmesartan-induced enteropathy: a report of an unusual cause of chronic diarrhea [J]. *Cureus*, 2021, 13 (8): e17004.
- [17] Teixeira M, Macedo S, Martins A, et al. Olmesartan-associated enteropathy: an unexpected cause of chronic diarrhoea [J]. *Eur J Case Rep Intern Med*, 2019, 6 (4): 001093.
- [18] Hujoel IA, Rubio-Tapia A. Sprue-like enteropathy associated with olmesartan: a new kid on the enteropathy block [J]. *GE Port J Gastroenterol*, 2016, 23 (2): 61-65.
- [19] Gallivan C, Brown I. Olmesartan induced enterocolitis [J]. *Pathology*, 2014, 46 (4): 360-361.
- [20] Marthey L, Cadiot G, Seksik P, et al. Olmesartan-associated enteropathy: results of a national survey [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 40 (9): 1103-1109.
- [21] Cyrany J, Vasatko T, Machac J, et al. telmisartan-associated enteropathy-is there any class effect? [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 40 (5): 569-570.
- [22] Herman M, Rubio-Tapia A, Marietta E, et al. Severe enteropathy in a patient on valsartan: 1011 [J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108: S302.
- [23] Basson M, Mezzarobba M, Weill A, et al. Severe intestinal malabsorption associated with olmesartan: a French nationwide observational cohort study [J]. *Gut*, 2016, 65 (10): 1664-1669.
- [24] Malfertheiner P, Ripellino C, Cataldo N. Severe intestinal malabsorption associated with ACE inhibitor or angiotensin receptor blocker treatment. An observational cohort study in Germany and Italy [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2018, 27 (6): 581-586.

(收稿日期: 2023-05-27; 修回日期: 2023-07-03)

艾司奥美拉唑致 Stevens-Johnson 综合征 1 例

张梁, 李柯, 吴雄 (平江县第一人民医院, 湖南 岳阳 414500)

关键词: 艾司奥美拉唑; 不良反应; Stevens-Johnson 综合征; 质子泵

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)12-3376-02

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.046

1 病史资料

75 岁男性患者, 考虑“乙状结肠中分化腺癌”, 为求手术治疗于 2020 年 2 月 14 日入住我院。当日未予特殊处理。2 月 15 日上午使用艾司奥美拉唑、维生素 B₆、维生素 C、氯化钠注射液进行治疗。2 月 16 日患者出现发热, 最高 39.5 °C, 全身多处出现红疹且左手手掌、阴囊、口腔黏膜出现水疱, 进展迅速。检查结果示: 碳酸氢根离子 28 mmol · L⁻¹; 尿素 4.45 mmol · L⁻¹, 血糖 5.99 mmol · L⁻¹, 查体: 心率最高 110 次 · min⁻¹。继续使用上述药物后症状进一步加重。请皮肤科会诊: 患者前期有发热; 且口腔、生殖器黏膜受到损伤、形成水疱; Stevens-Johnson 综合征相关的先兆性体检特征: Nikolsky 征阳性^[1-2]; 考虑为药物所致的 Stevens-Johnson 综合征。建议完善病理检查, 明确诊断; 并停用相关药物, 使用地塞米松抗过敏、苯扎溴铵涂洗伤口对症治疗。患者拒绝相关检查, 管床医师按会诊意见对症治疗。2 月 19 日, 患者无明显畏寒发热, 全身红疹明显减退, 左手掌水疱较前稍减轻、阴囊会阴部皮肤局部破溃。2 月 21 日, 患者会阴部及包皮多处溃烂、水肿明显, 余无特殊不适。患者自觉好转, 强烈要求回家, 劝阻无效, 于 2 月 21 日签字出院。3 月 21 日, 患者为求手术治疗再次入院。此时, 仅阴茎处稍有破溃、有色素沉着, 口腔黏膜等破溃已经好转。详细追问病史, 患者自诉在家使用抗菌药物预防感染, 未使用糖皮质激素。期间水疱逐渐加大、破溃, 约半个月后达峰值, 口腔黏膜严重溃疡致吞咽困难, 手掌、会阴处皮肤逐步剥离、脱落, 随后慢慢恢复。

2 讨论

Stevens-Johnson 综合征一般是通过体格检查发现, 并通过组织病理学检查确定。其中, 组织病理学虽有助于诊断, 但不是必须条件^[3]。故患者虽未完善组织病理检查, 但是根据其发热、黏膜损伤、Nikolsky 征等典型的临床表现, 仍诊断

为 Stevens-Johnson 综合征。Stevens-Johnson 综合征多由抗惊厥药、抗抑郁药、磺胺类、非甾体抗炎药、抗菌药物等引起, 而质子泵抑制剂引起的可能性极低^[4]。分析患者用药情况, 在发生 Stevens-Johnson 综合征前仅使用艾司奥美拉唑、维生素 B₆、维生素 C、氯化钠注射液, 且维生素 B₆、维生素 C、氯化钠注射液说明书、文献检索均无导致 Stevens-Johnson 综合征的相关报道。故考虑 Stevens-Johnson 综合征可能是艾司奥美拉唑引起的。查《中国药典临床用药须知》, 艾司奥美拉唑十分罕见的不良反应中有 Stevens-Johnson 综合征。在 PubMed 中用质子泵抑制剂、Stevens-Johnson 综合征为关键词进行检索, 发现由质子泵引起 Stevens-Johnson 综合征的报道 6 篇^[5-10]。根据不良反应评价标准, 该患者药物不良反应得分为 6 分 (见表 1), 提示很可能有关。而根据中国国家药品不良反应关联性评价标准: 该患者使用艾司奥美拉唑及发生 Stevens-Johnson 综合征时间顺序合理, 停药后反应减轻, 有文献资料佐证并排除其他疾病、药物等因素干扰, 评价结果为很可能。综合以上分析, 该患者所发生的 Stevens-Johnson 综合征为艾司奥美拉唑所致不良反应。

3 总结

Stevens-Johnson 综合征是一种严重的皮肤-黏膜反应, 绝大多数由药物引起, 具有较高的死亡风险。Stevens-Johnson 综合征前期可有发热不适, 可发生皮损, 甚至形成水疱、大疱。眼、口腔、鼻、生殖器黏膜损伤是其临床特征之一, 大约 93% 的患者出现口腔黏膜损伤, 63% 的患者出现生殖器黏膜损伤, 78% 的患者出现眼周围黏膜损伤, 66% 的患者可同时累及这 3 个部位^[1, 4]。Stevens-Johnson 综合征病死率高, 应予积极治疗, 可分为系统治疗和支持治疗。目前, 针对 Stevens-Johnson 综合征的最佳治疗方案充满争议, 尚无定论。中国的专家共识表明系统应用糖皮质激素、静脉注射免疫球蛋白 (IVIG)、肿瘤坏死因子

表 1 诺氏药物不良反应评估量表

相关问题	问题分值			
	是	否	未知	得分
1. 该反应先前是否有结论性报告	+ 1	0	0	1
2. 该反应是否是在使用可疑药物后发生的	+ 2	- 1	0	2
3. 该反应是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	+ 1	0	0	1
4. 该反应是否在再次使用可疑药物后重复出现	+ 2	- 1	0	
5. 是否存在其他原因能单独引起该反应	- 1	+ 2	0	2
6. 该反应是否在应用安慰剂后重复出现	- 1	+ 1	0	
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	+ 1	0	0	
8. 该反应是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少而缓解	+ 1	0	0	
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	+ 1	0	0	
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	+ 1	0	0	
总分值				6

(TNF- α)受体、血浆置换疗法、联合治疗等可以发挥一定作用^[4]; 英国的指南认为及时停用致不良反应药物并支持治疗比系统治疗更有益^[1]; 日本的研究持相反意见, 认为系统治疗比支持治疗更有效, 推荐首选糖皮质激素, 效果不佳时再联用 IVIG 等^[11]。本案例中, 我们结合患者的疾病情况及经济状况, 并充分尊重患者的自身意愿, 选择使用地塞米松进行全身性系统治疗。经过 4 d 住院治疗, 患者红疹明显消退、水疱进展不明显, 病情较稳定。患者出院后未进行规范治疗, 病情迅速进展, 水疱出现大破溃, 且半个月后达到顶峰, 大面积破溃皮肤剥离、脱落, 一个月后才逐步恢复, 病程延长。提示规范治疗对于 Stevens-Johnson 综合征进展有重要意义, 应予以重视。此外, 我们对该患者出院时疾病的严重程度进行评估。根据 SCORTEN 评分, 患者得分为 2 分 (见表 2), 预测死亡风险为 12% (评分为 0 到 7 时, 对应的预测的死亡风险依次为 1%、4%、12%、32%、62%、85%、95%、99%)^[4, 12]。死亡风险较低, 这可能是患者后期未进行规律治疗但仍然痊愈的原因。

表 2 SCORTEN 评分

相关数据	分值	得分
年龄 > 40 岁 (75 岁)	1	1
心率 > 120 次 \cdot min ⁻¹ (110 次 \cdot min ⁻¹)	1	0
伴恶性肿瘤 (直肠癌)	1	1
初始表皮松解面积 > 10% 体表面积 (否)	1	0
血清尿素氮水平 > 10 mmol \cdot L ⁻¹ (4.45 mmol \cdot L ⁻¹)	1	0
血清葡萄糖水平 > 14 mmol \cdot L ⁻¹ (5.99 mmol \cdot L ⁻¹)	1	0
血清碳酸氢盐水平 < 20 mmol \cdot L ⁻¹ (28 mmol \cdot L ⁻¹)	1	0
总分		2

参考文献

[1] Creamer D, Walsh SA, Dziewulski P, et al. UK guidelines for the management of Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in adults 2016 [J]. J Plast Reconstr Aesthet

Surg, 2016, 69 (6): e119-e153.

- [2] Griffiths C, Barker J, Bleiker T, et al. Rook's textbook of dermatology [M]. 9th ed. USA: Wiley-Blackwell, 2016, 58: 1-8.
- [3] Woolum JA, Bailey AM, Baum RA, et al. A review of the management of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis [J]. Adv Emerg Nurs J, 2019, 41 (1): 56-64.
- [4] 中华医学会皮肤性病学分会药物不良反应研究中心. Stevens-Johnson 综合征 / 中毒性表皮坏死松解症诊疗专家共识 [J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54 (5): 376-381.
- [5] Lin YT, Yang JC, Chu CY. Esomeprazole-induced Stevens-Johnson syndrome in a patient who underwent nivolumab therapy for advanced lung adenocarcinoma [J]. Lung Cancer, 2020, 148: 177-178.
- [6] Van Tendeloo E, Gutermuth J, Grosber M. Positive patch testing with omeprazole in Stevens-Johnson syndrome: a case report [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2021, 35 (1): e74-e75.
- [7] Fracaroli TS, Miranda LQ, Sodr  JL, et al. Toxic epidermal necrolysis induced by lansoprazole [J]. An Bras Dermatol, 2013, 88 (1): 117-120.
- [8] Thakor AS, Burke A, Handfield-Jones S, et al. Toxic epidermal necrolysis and neutropaenia: complications of omeprazole [J]. Australas J Dermatol, 2009, 50 (3): 207-210.
- [9] Severino G, Chillotti C, De Lisa R, et al. Adverse reactions during imatinib and lansoprazole treatment in gastrointestinal stromal tumors [J]. Ann Pharmacother, 2005, 39 (1): 162-164.
- [10] Heaton NR, Edmonds EV, Francis ND, et al. Fatal toxic epidermal necrolysis due to lansoprazole [J]. Clin Exp Dermatol, 2004, 29 (6): 612-613.
- [11] Hasegawa A, Abe R. Recent advances in managing and understanding Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis [J]. F1000Res, 2020, 9: F1000.
- [12] Frantz R, Huang S, Are A, et al. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a review of diagnosis and management [J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57 (9): 895.

(收稿日期: 2023-05-06; 修回日期: 2023-07-02)

硫酸依替米星注射液致迟发型过敏性休克 1 例

马晓东 (泰安市食品药品检验检测研究院, 山东 泰安 271000)

关键词: 硫酸依替米星注射液; 过敏性休克; 药品不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)12-3378-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.12.047

依替米星为我国自主研发的半合成氨基糖苷类抗菌药物^[1], 具有抗菌谱广、抗菌活性强、交叉耐药性小等优点, 被临床广泛应用于治疗呼吸道感染、肾脏和泌尿生殖系统感染、皮肤软组织感染和其他感染等^[2-3]。目前一般认为其安全性较高, 注射前无须做皮肤过敏试验, 不良反应相对较少, 说明书未记载过敏性休克。本文报道 1 例硫酸依替米星注射液致迟发型过敏性休克的病例, 以期提高临床对此类不良反应的重视, 保障患者安全用药。

1 病例资料

患者, 男, 57 岁, 体重 65 kg, 身高 170 cm, 主诉“发现肺癌 3 月余, 放化疗后”于 2023 年 1 月 6 日收入某三级医院。患者既往“结肠癌术后”病史 2 年; 对青霉素过敏; 否认糖尿病、高血压、冠心病史; 新冠感染转阴半月余, 否认其他传染病史; 否认外伤史; 否认食物过敏史。入院体检: 体温 (T) 36.5 °C, 脉搏 (P) 86 次·min⁻¹, 呼吸频率 (R) 21 次·min⁻¹, 血压 (BP) 125/72 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa); 一般状况可, 神志清, 心律齐, 未闻及病理性杂音, 右肺呼吸音低, 左肺呼吸音粗, 余未见明显阳性体征。胸部计算机断层扫描 (CT): 右肺癌治疗后, 双肺纹理增强、紊乱, 双肺野透光度增强。双肺见多发斑片状及结节状密度增高影, 部分呈磨玻璃样密度增高影, 边缘模糊, 较 2022 年 9 月 CT 片部分为新发病变。实验室检查, 血常规示: 白细胞计数 (WBC) $2.93 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↓, 中性粒细胞百分比 (NEUT%) 62.3%, 淋巴细胞百分比 (LYMPH%) 29.5%, 红细胞计数 (RBC) $3.74 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↓, 血红蛋白 (Hb) $119 g \cdot L^{-1}$ ↓, 血小板计数 (PLT) $164 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 超敏 C 反应蛋白 $1.84 mg \cdot L^{-1}$ 。肿瘤标志物: 癌胚抗原 $1.62 ng \cdot mL^{-1}$, 神经元烯醇化酶 $17.35 \mu g \cdot L^{-1}$ ↑, 细胞角蛋白 19 片段 $7.07 \mu g \cdot L^{-1}$ ↑, 鳞状细胞癌相

关抗原 $1.82 ng \cdot mL^{-1}$ 。入院诊断: ① 右肺小细胞癌 (cT2NOMO, II A 期, 局限期), 双肺多发磨玻璃病变; ② 结肠癌术后; ③ 荨麻疹。患者目前已行 3 周期化疗, 方案为“依托泊苷 0.1 g d1 ~ d5 + 卡铂 0.6 g d1”, 其间以“右肺门病灶”为靶区, 行超分割放疗 30 次, 放疗剂量 45 Gy。由于患者出现双肺多发磨玻璃病变, 近日咳嗽伴有黄痰等症状, 结合新型冠状病毒感染后期治疗实践经验, 考虑新型冠状病毒后期合并细菌感染可能, 遂建议选择依替米星作为初始经验性抗感染治疗方案, 并予以糖皮质激素治疗, 减轻肺内炎症反应。

2023 年 1 月 7 日医嘱给予地榆升白片 2 粒 po tid 升白细胞治疗; 强力枇杷露 15 mL po tid 止咳; 注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL ivgtt qd 抗炎 (1 月 7 日开始应用, 1 月 12 日停用, 未与其他药物配伍); 硫酸依替米星注射液 0.2 g (无锡济煜山禾药业股份有限公司, 规格: 2 mL/100 mg, 批号: 22042020) + 0.9% 氯化钠注射液 250 mL ivgtt qd 抗感染等治疗。1 月 12 日查血常规示: WBC $10.11 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑, NEUT% 84.6% ↑, LYMPH% 8.5% ↓, RBC $3.63 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↓, Hb $121 g \cdot L^{-1}$ ↓, PLT $158 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 。连续应用硫酸依替米星注射液第 6 日 (1 月 12 日), 9: 20 开始输注, 9: 27 在输注过程中患者突然出现呼吸困难, 伴有皮肤发红、全身瘙痒。随之视物模糊、头晕、呕吐、意识不清。心电监护示: T 36.2 °C, P 85 次·min⁻¹, R 19 次·min⁻¹, BP 89/45 mmHg, 血氧饱和度 94%。考虑过敏性休克, 立即停用硫酸依替米星注射液, 给予地塞米松磷酸钠注射液 5 mg iv, 盐酸肾上腺素注射液 1 mg iv, 盐酸异丙嗪注射液 25 mg im, 同时吸氧。经过上述治疗措施后, 患者于 9: 50 意识清醒, 自觉胸闷, 随即给予盐酸多巴胺注射液 20 mg iv, 心电监护示: T 36.0 °C, P 89 次·min⁻¹, R 20 次·min⁻¹, BP

作者简介: 马晓东, 男, 硕士, 主管中药师, 主要从事药品不良反应监测工作, email: xdma1990@163.com

116/60 mmHg, 血氧饱和度 98%。患者生命体征恢复平稳, 症状明显改善, 持续观察。11: 50 心电图监护示: T 36.1 °C, P 88 次·min⁻¹, R 20 次·min⁻¹, BP 106/70 mmHg, 血氧饱和度 100%。患者意识清楚, 精神尚可, 未诉其他不适。后续住院期间使用“依托泊苷 0.1 g d1 ~ d5 + 卡铂 0.6 g d1”化疗, 未再使用硫酸依替米星注射液, 患者未再出现过敏性休克症状。1 月 15 日患者出院。

2 讨论

2.1 不良反应关联性评价

本例患者入院时生命体征平稳, 用药后出现血压下降、呼吸困难、胸闷、视物模糊、意识不清等症状, 符合“过敏性休克”判定标准^[4]。根据国家药品不良反应监测中心制定的关联性评价方法^[5]进行分析: ① 患者第 6 日静脉滴注硫酸依替米星注射液 7 min 后出现过敏性休克症状, 用药与不良反应发生时间存在合理的时间关系; ② 说明书未记载过敏性休克, 但有相关个案文献报道^[6-11], 过敏性休克发生时间为首次给药后 20 s ~ 10 min; ③ 立即停药并及时给予抗休克、抗过敏等治疗后患者病情好转; ④ 停药后未再次使用该药; ⑤ 患者既往肺癌病情相对稳定, 其他并用药品说明书中未记载过敏性休克, 该不良反应无法用原发疾病及其进展、其他并用药品的作用解释。综上, 关联性评价判断为“很可能”。

2.2 不良反应原因分析

依替米星致过敏性休克的发生机制尚不明确, 本例患者发生过敏性休克的原因可能为以下几点:

① 药物因素: 依替米星为氨基糖苷类抗菌药物, 其本身无免疫原性^[9], 但可能作为半抗原进入体内与蛋白质或多肽分子结合成全抗原, 诱发过敏反应, 过敏严重者进而出现过敏性休克。本例患者在连续使用硫酸依替米星注射液的第 6 日开始输注 7 min 后发生过敏性休克, 考虑为迟发型过敏性休克。

② 辅料因素: 硫酸依替米星注射液的辅料为无水亚硫酸钠 (Na₂SO₃), 其分子结构与硫代硫酸钠 (Na₂S₂O₃) 类似, 注射用硫代硫酸钠的说明书中有记载过敏性休克, 推测辅料无水亚硫酸钠亦有可能引发过敏性休克。

③ 个体因素: 本例患者对青霉素过敏, 可能属于过敏体质, 对该药耐受性较差, 易发生不良反应。大样本的药源性过敏性休克文献回顾表明, 发生过敏性休克的患者, 有药物过敏史的占

15% ~ 20%, 其中有青霉素等抗菌药物过敏史的占有药物过敏史的 50% ~ 70%^[12-15]。因此, 既往有药物过敏史, 尤其是有青霉素等抗菌药物过敏史, 可能为依替米星致过敏性休克的重要危险因素。此外, 患者在入院前感染新型冠状病毒, 尽管转阴半月余, 但可能造成机体免疫功能紊乱, 导致过敏风险和过敏发生机制不确定性增加。既往个案文献报道中患者均否认或者未提及新型冠状病毒感染史、药物过敏史。综上, 新型冠状病毒感染和过敏体质的影响可能为本例患者与既往个案文献报道有所不同的重要原因。

2.3 建议及时修订完善依替米星相关制剂的说明书

硫酸依替米星注射液的说明书记载其不良反应主要为耳毒性、肾毒性、神经肌肉阻滞作用, 其他罕见的反应有恶心、皮疹、静脉炎、心悸、胸闷及皮肤瘙痒等, 未记载过敏性休克。但近年来, 依替米星致呕血、高热、呼吸困难、多形性红斑、重症大疱型药疹等不良反应时有报道^[16-19]。因此, 建议生产企业及时修订完善说明书, 补充临床使用中发现的新的和严重不良反应, 进一步提高临床对该药安全性的认识, 最大程度地降低用药风险。

3 小结

过敏性休克是依替米星的罕见严重不良反应, 既往个案报道依替米星导致的过敏性休克均为速发型。本病例提示, 需对依替米星致迟发型过敏性休克的风险保持高度警惕, 患者的过敏体质可能为一项重要危险因素。建议临床用药严格掌握适应证, 强化用药前的过敏史询问, 有药物、食物等过敏史及药物过敏家族史、特别是有青霉素等抗菌药物过敏史的患者, 要慎用该药, 如必须使用应结合患者自身特点, 考虑适当调整给药浓度, 且具备急救条件。静脉滴注时要严格控制滴速, 按照说明书要求每次滴注应至少 1 h。加强连续用药过程中的监护, 尤其是每次用药前的 30 min, 一旦出现过敏性休克和其他严重过敏反应, 立即停药, 保持静脉通道畅通, 及时给予抗组胺药、钙注射剂、糖皮质激素、肾上腺素等急救药物进行抢救, 严密监测患者生命体征变化, 确保患者生命安全。

参考文献

- [1] 范瑾, 赵敏. 一个氨基糖苷类创新药物依替米星的研发和产业化[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44 (11): 1229-1231.
- [2] Yao L, Zhang JW, Chen B, et al. Mechanisms and phar-

- macokinetic/pharmacodynamic profiles underlying the low nephrotoxicity and ototoxicity of etimicin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41 (6): 866-878.
- [3] 张蕊, 张明芳, 陈代杰, 等. 依替米星对斑马鱼细菌感染过程中中性粒细胞增殖及功能的影响 [J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48 (5): 547-553.
- [4] 国家药品不良反应监测中心. 常见严重药品不良反应技术规范及评价标准 [S]. 2010: 1-4.
- [5] 陈静静, 钱佩佩, 曹凯, 等. 我国药品不良反应关联性评价方法与诺氏评估量表法的对比与分析 [J]. *中国药事*, 2020, 34 (8): 988-992.
- [6] 戴红辉, 姜冬九. 新型氨基苷类药物——爱大致过敏性休克 1 例 [J]. *当代护士 (学术版)*, 2003 (5): 65-66.
- [7] 全金斋, 左万里. 依替米星注射液致严重不良反应 1 例 [J]. *临床荟萃*, 2007, 22 (6): 457.
- [8] 贺尔. 注射用硫酸依替米星静脉滴注致过敏性休克 1 例 [J]. *中国药业*, 2011, 20 (23): 63.
- [9] 薛玉门, 王丽娟, 王晓君. 硫酸依替米星致急性过敏性休克一例 [J]. *中国卫生产业*, 2012, 9 (16): 74.
- [10] 刘云波, 余群. 硫酸依替米星致过敏性休克一例 [J]. *海军医学杂志*, 2014, 35 (3): 182.
- [11] 潘波波, 徐晓红, 芦小燕, 等. 静脉滴注依替米星致过敏性休克 [J]. *药物不良反应杂志*, 2021, 23 (12): 661-663.
- [12] 刘峰, 刘锐锋. 191 例药物致过敏性休克不良反应文献分析 [J]. *中国药房*, 2013, 24 (30): 2854-2856.
- [13] 李奎春. 药源性过敏性休克 300 例分析 [J]. *中国药物经济学*, 2016, 11 (2): 27-29.
- [14] 巫建群. 165 例药源性过敏性休克文献分析 [J]. *北方药学*, 2019, 16 (3): 192-194.
- [15] 徐元杰, 张晶, 郭代红, 等. 1230 例药物致过敏性休克不良反应报告分析 [J]. *中国药物应用与监测*, 2020, 17 (2): 99-103.
- [16] 杨秀婷, 刘桂凤, 陈红红, 等. 静脉滴注依替米星注射液致不良反应 4 例分析 [J]. *药品评价*, 2021, 18 (21): 1320-1323.
- [17] 陆春苓. 硫酸依替米星致呕血 1 例 [J]. *中国药物滥用防治杂志*, 2012, 18 (4): 232.
- [18] 黄艳芳, 王小双, 吴柳婷. 临床药师参与依替米星致重症大疱型药疹治疗方案制定 1 例分析 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36 (10): 1264-1267.
- [19] 刘敏, 袁丹. 依替米星致多形性红斑 1 例 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38 (9): 1105-1106.

(收稿日期: 2023-06-26; 修回日期: 2023-07-27)