



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第22卷 第1期(总第216期) 2024年1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》编辑部

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 30.00 元，全年 360.00 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

2024 年版权归《中南药 学》

编辑部所有

指南或规范

(1) 医疗机构住院患者临床药 学巡诊服务规范(试行)··· 湖南省药学会

STAT3 在神经退行性疾病中的研究进展专题

(6) STAT3 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展

····· 王珏, 陈佩弦, 何玲, 等

(17) STAT3 在阿尔茨海默病小鼠认知障碍发生发展中的作用及机制研究

····· 王珏, 陈佩弦, 何玲, 等

营养药 学在肿瘤患者治疗中的临床实践专题

(24) 多种油脂乳对癌症患者术后非特异性炎症、肝肾功能和营养状 态的影响 ····· 王小芊, 秦侃

(30) 不同营养状态对结直肠癌患者奥沙利铂化疗致周围神经毒性(OIPN) 的影响 ····· 卞芸, 丁永娟, 谢芬, 等

研究论文

(36) 基于 GC-TOF-MS 和 UHPLC-QE-MS 的苏合香化学成分分析

····· 牟菲, 张倩, 蔺瑞, 等

(43) 不同晶型丹皮酚的药动力学及抗痛经作用研究

····· 周洪亮, 王海丹, 王泽琨, 等

(48) Nrf2 调控的氧化应激在 Adropin 抑制低氧肺动脉平滑肌细胞增殖中 的作用研究 ····· 陈昌贵, 易春峰, 王栋, 等

(56) 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的胃康灵胶囊化学成分分析

····· 刘润花, 谭征, 杨畅, 等

(65) 鬼臼毒素脂质体的制备及其质量评价

····· 张朗朗, 戴粤湘, 张涵, 等

(71) 平衡透析结合 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中游离 SN-38 浓度及其 药代动力学应用 ····· 罗珍华, 宋成慧, 李小川, 等

(78) 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的柳叶鼠李化学成分分析

····· 孟祎, 赵伊君, 薛志鹏, 等

(86) 川枳壳黄酮类成分及其对成骨细胞增殖作用的研究

····· 向丹, 李玉玫, 王靖雯, 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
姜志平 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 睢大策 肇丽梅 翟 青
黎 敏 颜 苗 潘卫三 魏高文

- (92) 葛根芩连汤联合益生菌对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群及相关炎症因子的影响 李子伊, 李淋雨, 张紫园, 等
- (100) 金星散水提液诱导 ECA-109 细胞凋亡和氧化应激的作用及机制研究 李博, 雷琨, 刘家邑, 等
- (107) 脂多糖对气道上皮细胞损伤后炎症因子的影响 支文冰, 姜盛楠, 孙婷婷, 等
- (111) 基于片段生长技术的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的设计 赵东升, 程铖, 廖伟科
- (116) 白藜芦醇纳米结构脂质载体的制备与体外释放研究 崔欣冉, 张程皓, 唐景玲
- (121) 培养基添加剂对双特异性抗体产量和糖基化的影响 朱国梁, 罗顺, 张晓莹
- (129) 槐米药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究及量值传递分析 任晶, 刘俊潼, 鄢必新, 等
- (134) 基于 QbD 理念的经典名方研究: 真武汤的提取工艺优化研究 李明慧, 张钰明, 卢新颖, 等
- (141) 静脉注射吴茱萸碱 - 甘草酸纳米胶束后吴茱萸碱在大鼠体内药代动力学研究 邓英光, 银雪艳, 郭秀彩, 等

综述

- (145) 雷公藤对肾脏的毒性与保护作用及机制的研究进展 刘灵, 张慧民, 曹蓉, 等
- (154) 肺动脉高压治疗药物新靶点的研究进展 李昱辰, 李欣玫, 吴凡, 等
- (160) 中药活性肽发现方法研究进展 王鸿杰, 王锐, 高雯
- (168) Toll 样受体在冠心病中的研究进展及靶向药物分析 张景, 王可, 来利红
- (174) β - 谷甾醇调控信号通路治疗乳腺癌的作用机制研究进展 董秋艳, 程哲, 吕良晨, 等
- (180) 中药煮散的历史渊源、应用特点及现代化研究进展 谢翡翠, 卢晓莹, 何广铭, 等
- (186) 青皮的炮制历史沿革、效应物质及古今临方配伍研究进展 黄艺婷, 苏丹, 鲍毅, 等

药物分析与检验

- (194) 盐酸氨溴素注射液玻璃安瓿包装中 20 种元素迁移量的测定与风险评估 齐艳菲, 贾菲菲, 王颖, 等
- (200) 离子色谱法测定别嘌醇中吗啉残留 赵晓亚, 郑文惠, 耿一楠, 等
- (204) 高效液相色谱法测定醋酸氟卡尼片的含量 徐硕, 邝咏梅, 徐文峰, 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
陆窈窕

本刊声明:

本刊已入编中国知网、万方等数据库,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。

- (209) 九节茶药材质量标准研究 苏锐辉, 于小庆, 江涛, 等
(213) 壮药火索藤汤剂指纹图谱的建立及含量测定研究
..... 罗鑫, 陈彦洁, 蒋学青, 等

医院药学

- (219) 抗菌药物预防人工流产后感染效果的系统性评价
..... 冉江玲, 张家兴, 赵华叶, 等
(227) 佐剂重组带状疱疹疫苗用于 50 岁以上人群的快速卫生技术评估
..... 华敏凡, 宋沧桑, 李兴德, 等
(233) 环硅酸锆钠治疗慢性肾脏病和血液透析伴高钾血症患者有效性与安全性的 meta 分析 安兴宇, 李兴德, 宋沧桑, 等
(240) 口服中成药治疗慢性脑供血不足的用药规律研究
..... 秦瓔琳, 金香兰

药物与临床

- (246) CDK4/6 抑制剂联合芳香化酶抑制剂类药物用于 HR⁺/HER2⁻晚期乳腺癌一线治疗的临床综合评价 ... 张佳雯, 李琴, 范国荣, 等
(253) 五酯胶囊联合他克莫司在肾移植患者中的疗效及安全性研究
..... 叶倩倩, 李思曼, 蒋跃平, 等

临床药师在临床

- (259) 米非司酮终止妊娠经逆转治疗继发宫颈机能不全妊娠的临床分析与药学监护 李小波, 杨龙娜, 容玉仪, 等
(263) 药师在肝癌合并梗阻性黄疸患者营养支持治疗中的实践
..... 张卿, 张攀, 侯敏, 等
(267) 临床药师参与 1 例肺部感染患者血小板减少的病例分析
..... 李海滨, 龚卫静

药品不良反应

- (271) 阿糖胞苷致重度横纹肌溶解症继发多器官功能衰竭 1 例
..... 杨钰华, 刘月, 黄晓娜
(274) 奈玛特韦片 / 利托那韦片致血管性水肿
..... 张婷, 聂晶磊, 付敏, 等
(276) 复方磺胺甲噁唑致全血细胞减少伴药物性肝损伤 1 例
..... 张灵, 张津翌, 范茂飞, 等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*278*zh*P*30.0*46*2024-1

本期责任编辑: 彭金飞, 陆窈窕, 邬志娟, 李科

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 1 January 20 2024

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

- (6) **Research progress in STAT3 signal pathway in neurodegenerative diseases**
..... *WANG Jue, CHEN Pei-xian, HE Ling, et al*
- (17) **STAT3 inhibitor niclosamide improves the cognitive impairment in mice with Alzheimer's disease and related mechanism**
..... *WANG Jue, CHEN Pei-xian, HE Ling, et al*
- (25) **Effect of multi-oil fat emulsion injection on non-specific inflammation, liver and kidney function and nutritional status in cancer patients**
..... *WANG Xiao-qian, QIN Kan*
- (30) **Effect of different nutritional status on oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity (OIPN) in colorectal cancer patients**
..... *BIAN Yun, DING Yong-juan, XIE Fen, et al*
- (36) **Chemical constituents in the extract of styrax by GC-TOF-MS and UH-PLC-QE-MS** *MU Fei, ZHANG Qian, LIN Rui, et al*
- (43) **Pharmacokinetics and anti-dysmenorrheal effect of paeonol polymorphs**
..... *ZHOU Hong-liang, WANG Hai-dan, WANG Ze-kun, et al*
- (48) **Role of Nrf2 regulated oxidative stress in inhibition of hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by Adropin**
..... *CHEN Chang-gui, YI Chun-feng, WANG Dong, et al*
- (56) **Chemical components of Weikangling capsules by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS** *LIU Run-hua, TAN Zheng, YANG Chang, et al*
- (65) **Preparation optimization and quality evaluation of podophyllotoxin liposomes** *ZHANG Lang-lang, DAI Yue-xiang, ZHANG Han, et al*
- (71) **Determination of free SN-38 concentration in rat plasma by equilibrium dialysis combined with LC-MS/MS and its pharmacokinetic application**
..... *LUO Zhen-hua, SONG Cheng-hui, LI Xiao-chuan, et al*
- (78) **Analysis of chemical constituents in *Rhamnus erythroxylum* Pallas by HPLC-Q-TOF-MS**
..... *MENG Yi, ZHAO Yi-jun, XUE Zhi-peng, et al*
- (86) **Flavonoids from Sichuan Aurantii Fructus and their effects on the proliferation of osteoblasts**
..... *XIANG Dan, LI Yu-mei, WANG Jing-wen, et al*
- (92) **Effect of Gegen Qinlian decoction combined with probiotics on intestinal microbiota and related inflammatory factors in mice with ulcerative colitis**
..... *LI Zi-yi, LI Lin-yu, ZHANG Zi-yuan, et al*

Postal code

42-290

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

¥ 30.00 an issue

¥ 360.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2024 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.

- (101) **Aqueous extract of Jinxing powder induces the apoptosis and oxidative stress in ECA-109 cells** *LI Bo, LEI Kun, LIU Jia-yi, et al*
- (107) **Changes in inflammatory factors in a model of lipopolysaccharide-induced airway epithelial cell injury** *ZHI Wen-bing, JIANG Sheng-nan, SUN Ting-ting, et al*
- (111) **De novo design of PD-1/PD-L1 small molecule inhibitors based on fragment growth technology** *ZHAO Dong-sheng, CHENG Cheng, LIAO Wei-ke*
- (116) **Preparation and in vitro release of resveratrol nanostructured lipid carriers** *CUI Xin-ran, ZHANG Cheng-hao, TANG Jing-ling*
- (121) **Effect of culture medium additives on the production and glycosylation of bispecific antibodies** *ZHU Guo-liang, LUO Shun, ZHANG Xiao-ying*
- (129) **Correlation and value transfer of HPLC characteristic chromatogram of raw herbs, decoction pieces, standard decoction and formula granules of Flos Sophora Immaturus** *REN Jing, LIU Jun-tong, YAN Bi-xin, et al*
- (134) **Classical prescription based on QbD concept: optimization of extraction for modified Zhenwu decoction** *LI Ming-hui, ZHANG Yu-ming, LU Xin-ying, et al*
- (141) **In vivo pharmacokinetics of evodiamine in rats after intravenous injection of evodiamine-glycyrrhizic acid micelles** *DENG Ying-guang, YIN Xue-yan, GUO Xiu-cai, et al*
- (145) **Research progress in effect of *tripterygium wilfordii* on the kidney: mechanism of toxicity and efficacy** *LIU Ling, ZHANG Hui-min, CAO Rong, et al*
- (154) **Research progress in new drug targets for the treatment of pulmonary hypertension** *LI Yu-chen, LI Xin-mei, WU Fan, et al*
- (160) **Advances in discovery of active peptides from traditional Chinese medicine** *WANG Hong-jie, WANG Rui, GAO Wen*
- (168) **Research progress of Toll-like receptors in coronary heart disease and target drug analysis** *ZHANG Jing, WANG Ke, LAI Li-hong*
- (174) **Research progress of mechanism of action of β -sitosterol-regulated signaling pathway in the treatment of breast hyperplasia** *DONG Qiu-yan, CHENG Zhe, LYU Liang-chen, et al*
- (180) **Historical origin, application characteristics and modernization research of traditional Chinese medicine powder for boiling** *XIE Fei-fei, LU Xiao-ying, HE Guang-ming, et al*
- (186) **Research progress in process evolution, effector substances, and compatibility of *Citri reticulatae pericarpium viride*** *HUANG Yi-ting, SU Dan, BAO Yi, et al*
- (194) **Migration determination and risk assessment of 20 elements in ambroxol hydrochloride injection in glass ampoule packaging** *QI Yan-fei, JIA Fei-fei, WANG Ying, et al*

- (200) **Determination of morpholine residues in allopurinol by ion chromatography**
..... *ZHAO Xiao-ya, ZHENG Wen-hui, GENG Yi-nan, et al*
- (204) **Content determination of flecainide acetate tablets by high-performance liquid chromatography**
..... *XU Shuo, KUANG Yong-mei, XU Wen-feng, et al*
- (209) **Quality standard of *Sarcandra glabra***
..... *SU Rui-hui, YU Xiao-qing, JIANG Tao, et al*
- (213) **Establishment of fingerprint and content determination of Zhuang medicine Huosuoteng decoction**
..... *LUO Xin, CHEN Yan-jie, JIANG Xue-qing, et al*
- (219) **Evaluation of the effectiveness of antimicrobials in infection prevention after induced abortion surgery: a systematic review and meta-analysis**
..... *RAN Jiang-ling, ZHANG Jia-xing, ZHAO Hua-ye, et al*
- (227) **Rapid health technology assessment of adjuvanted recombinant herpes zoster vaccine in people over 50 years old**
..... *HUA Min-fan, SONG Cang-sang, LI Xing-de, et al*
- (233) **Efficacy and safety of sodium zirconium cyclosilicate for chronic kidney disease with hyperkalemia and hemodialysis with hyperkalemia: a meta-analysis**
..... *AN Xing-yu, LI Xing-de, SONG Cang-sang, et al*
- (240) **Medication rules of oral Chinese patent medicine for chronic cerebral circulation insufficiency** *QIN Ying-lin, JIN Xiang-lan*
- (246) **Clinical comprehensive evaluation of CDK4/6 inhibitor combined with aromatase inhibitors drugs for first-line treatment for patients with HR⁺ / HER2⁻ advanced breast cancer**
..... *ZHANG Jia-wen, LI Qin, FAN Guo-rong, et al*
- (253) **Efficacy and safety of Wuzhi capsules combined with tacrolimus for kidney transplantation patients**
..... *YE Qian-qian, LI Si-man, JIANG Yue-ping, et al*
- (267) **Clinical pharmacist participating in the analysis of thrombocytopenia in a patient with pulmonary infection**
..... *LI Hai-bin, GONG Wei-jing*

指南或规范

医疗机构住院患者临床药学巡诊服务规范(试行)

湖南省药学会

摘要: 医疗机构住院患者临床药学巡诊服务是由符合资质要求的临床药师为保障患者用药安全、优化治疗效果和节约治疗费用而提供的服务,旨在发现和解决与患者用药有关的问题。为了加强医疗机构住院患者临床药学巡诊服务管理,确保药学服务质量,根据相关法律法规和规章制度,湖南省药学会组织专家制定了本规范。本规范适用于各级各类医疗机构,医疗机构应制定适合本机构的住院患者临床药学巡诊服务管理制度,并在药事管理与药物治疗学委员会的指导下,由药学部门负责实施和管理。住院患者临床药学巡诊服务的对象是住院患者,药学服务工作包括通过药学问诊查房,综合研判患者、疾病、用药情况和相关检测结果,协同制订药物治疗方案,实施药物定量计算和药物重整,开展疗效观察和药品不良反应监测,进行临床用药干预、提供用药建议等,并同时记录药师的服务内容。医疗机构应提供规范的住院患者临床药学巡诊服务,并制定相关的安全保密制度,以保护患者个人信息。

关键词: 药学巡诊; 服务规范; 医疗机构

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0001-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.001

2023 年 10 月 8 日湖南省医疗保障局发布《关于新增和修订药学类医疗服务价格项目的通知(湘医保发〔2023〕46号)》,广大药师根据国家卫生健康委财务司《关于印发全国医疗服务项目技术规范(2023年版)的通知》(国卫财务发〔2023〕27号)国家卫生健康委《国家卫生健康委办公厅关于印发医疗机构药事门诊服务规范等5项规范的通知》(国卫办医函〔2021〕520号)等文件和政策,在具体实施各项收费类药学服务项目过程中,仍存在诸多困惑。为了加强医疗机构住院患者临床药学巡诊服务的规范管理,促进药学服务转型和发展湖南省药学会组织相关专家和资深一线临床药师编写了这份服务规范,供广大医疗机构参考。

第一部分 基本要求

一、职责范围

医疗机构临床药学巡诊是指符合规定资质的临床药师参与住院患者临床巡诊,应用药学专业知识为住院患者提供的与药物使用相关的药学服务,以提高药物治疗的安全性、有效性、经济性与依从性。

二、人员要求

医疗机构从事临床药学巡诊工作的药师应符合以下条件:取得临床药师岗位培训证书,经本医疗

机构认定在临床药师岗位上工作的药学专业人员。

第二部分 工作内容

一、入院阶段(患者入院 24 h 内)

(一) 药学查房与问诊

对新入院患者,药师通过药学查房与问诊,及时收集以下信息:

1. 患者一般情况;
2. 入院诊断和治疗药物;
3. 既往用药史;
4. 药物及食物过敏史;
5. 近期药物治疗的疗效和不良反应等。

(二) 入院药物重整

1. 服务对象

入院药物重整的服务对象,重点为以下新入院患者:

① 接受多系统、多专科同时治疗的慢性病患者,如慢性肾脏病、高血压、糖尿病、高脂血症、冠心病、脑卒中等患者。

② 同时使用 5 种及以上药物的患者。

③ 医师提出有药物重整需求的患者。

2. 工作内容

① 通过与患者或其家属面谈、查阅患者既往

病历及处方信息等方式,采集入院患者初始临床信息。具体包括目前正在使用的药物、既往使用过的与疾病密切相关的药物和保健品的名称、剂型规格、用法用量、用药起止时间、停药原因、依从性等。

② 药师根据诊断及采集的用药信息,对比患者正在使用的药物与医嘱的差异。如正在使用的药物与医嘱存在不适宜用药或出现不一致的情况,药师应当提出用药方案调整建议,并与经治医师沟通,由医师确认后调整。

③ 药师根据上述信息建立药物重整记录表(可参考《医疗机构药事管理与药学服务》团体标准规范中的药物重整部分)。

3. 入院时药物重整核查要点

① 核查用药适应证及禁忌证。

② 核查用法用量是否正确。

③ 核查是否存在重复用药。

④ 关注特殊剂型/装置药物给药方法是否恰当。

⑤ 核查是否需要调整用药剂量,重点关注需根据肝肾功能调整剂量的药物。

⑥ 关注有潜在临床意义的药物相互作用、发生不良反应的药品,考虑是否需要调整药物治疗方案。

⑦ 关注有症状缓解作用的药品,明确此类药品是否需要长期使用。

⑧ 核查拟行特殊检查或医疗操作前是否需要临时停用某些药物,检查或操作结束后,需评估是否继续使用。

⑨ 关注静脉药物及有明确疗程的药物是否需继续使用。

⑩ 关注特殊人群用药,如老年人、儿童、妊娠期及哺乳期妇女、肝肾功能不全者、精神疾病患者等,综合考虑患者药物治疗的安全性、有效性、经济性、适宜性及依从性。

(三) 初始药学监护

药学监护是指药师应用药学专业知识为住院患者提供直接的、与药物使用相关的药学服务,以提高药物治疗的合理性与依从性。患者初入院阶段药学监护的重点包括:

1. 初始用药方案合理性评估:包括药物的适应证、禁忌证、用法用量、配伍禁忌、相互作用、用药疗程等;针对不合理的药物治疗方案,药师应给出恰当的调整意见并及时将具体建议、参考依据向医师/护士反馈。

2. 初始药物治疗过程监护:关注药物治疗方案的正确实施,包括输液治疗的安全性监护和首次使用特殊剂型药物的用药指导等。

3. 药物治疗依从性监护:对患者执行治疗方案的情况进行监护,包括药品的及时供应、恰当储存以及患者对药物治疗方案的理解与接受程度等。

4. 药师根据上述信息建立新入院患者药学监护记录表(可参考《医疗机构药事管理与药学服务》团体标准规范中的药学监护部分)。

二、住院期间

(一) 住院药学监护

1. 监护对象

药学监护的服务对象为住院患者,重点监护存在如下情况的患者:

① 特殊病理生理状态:存在脏器功能损害的患者、儿童、老年人、存在并发症的患者、妊娠期及哺乳期妇女等。

② 特殊疾病:重症感染、高血压危象、急性心力衰竭、急性心肌梗死、哮喘持续状态、癫痫持续状态、甲状腺危象、糖尿病酮症酸中毒、凝血功能障碍、出现临床检验危急值、慢性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病、药物中毒等,既往有药物过敏史、上消化道出血史或癫痫病史等。

③ 特殊用药:应用治疗窗窄的药物、抗感染药物、抗肿瘤药物、免疫抑制剂、血液制品等,接受溶栓治疗,有基础病的患者围手术期用药,血药浓度监测值异常,出现严重药品不良反应,联合应用有明确相互作用的药物,联合用药 5 种及以上,接受静脉泵入给药、鼻饲或首次接受特殊剂型药物治疗。

④ 特殊治疗:接受血液透析、血液滤过、血浆置换、体外膜肺氧合(ECMO)等的患者。

2. 监护时限

① 住院患者药学监护应贯穿于患者药物治疗的全过程,从确认患者为监护对象开始,至治疗目标完成、转科或出院。

② 如患者有转科,再次转回病区后,应重新评估是否将其列为药学监护对象。

3. 监护内容

① 用药方案合理性评估:包括药物的适应证、禁忌证、用法用量、配伍禁忌、相互作用、用药疗程等;针对不合理的药物治疗方案,药师应给出专业的调整意见并及时将具体建议、参考依据向医师/护士反馈。对于共性问题,药学部门应定期与临床科室进行沟通并纠正,记录沟通过程和改正效果。

② 药物治疗方案的实施过程监护:关注用药方案的正确实施,包括输液治疗的安全性监护和首次使用特殊剂型药物的用药指导。

③ 用药方案疗效监护:判断药物治疗的效果,

若疗效不佳或无效，药师应协助医师分析原因并讨论重新调整药物治疗方案。

④ 药品不良反应监护：对可能发生的药品不良反应进行预防和监测，及时发现、判断并予以处置。

⑤ 药物相互作用监护：关注患者使用的药物是否存在或潜在具有临床意义的相互作用，并及时进行预防或处理。

⑥ 依从性监护：对患者执行治疗方案的情况进行监护。

⑦ 个体化药学监护：药师应对药物基因检测、治疗药物监测等结果进行解读，并根据结果实施药学监护。

⑧ 用药教育：对住院患者进行用药教育和指导，应当根据其病理、生理状态及药物代谢动力学、药效学等情况，制订个体化的用药教育方案，保障患者用药安全、有效。

4. 结果与记录

① 药师应重视药学监护的工作成效，即通过与医师、护士、患者或家属沟通诊疗问题、药物治疗方案与治疗目标，达到优化给药方案、确保药品正确使用、降低用药差错或避免药品不良事件的目的。

② 药师应主动获知医师、护士、患者或家属对用药建议的采纳情况、接受程度及反馈意见。

③ 药师应书写药学监护记录表，如实记录患者药学监护情况，内容至少应包括监护日期、患者基本信息、患者基本生命体征及重要化验结果、药学监护计划制订及执行情况、药物治疗方案调整、药师干预内容等，可参考《医疗机构药事管理与药学服务》团体标准规范中的药学监护部分，亦可根据药学监护对象的疾病特征、用药情况和其他个体化需求设计表格。

④ 文档记录应清晰、简明，尊重并保护患者隐私。

(二) 协助制订个体化药物治疗方案

1. 服务对象

① 药学监护过程中发现需要进行个体化药物治疗方案制订和管理的患者。

② 疑难危重症患者。

③ 医师提出有药物治疗方案调整需求的患者。

2. 服务内容

① 药师通过收集患者病史信息、检查结果及用药记录等，综合评估其病理生理状态，明确患者的药物治疗需求。

② 药师提出个体化药物治疗方案的建议，包括药物品种选择、给药剂量、给药途径、治疗疗

程等，与临床医师协商制订最终治疗方案。

③ 药师追踪治疗方案的执行情况，确保方案的有效实施，并密切监护治疗方案对患者的疗效和不良反应。

三、出院阶段（患者出院前 48 h 内）

(一) 出院药物重整

出院药物重整是指药师根据出院医嘱，对比患者正在使用的药物与出院医嘱的差异，如正在使用的药物与出院医嘱存在不一致的情况或出现不适宜用药，药师应当提出用药方案调整建议，并与主管医师沟通，由医师确认后调整，并书写药物重整记录表。

出院药物重整流程及核查要点同入院药物重整。

(二) 出院用药教育

1. 工作内容

药师应当在患者床旁以口头、书面材料、实物演示、视频音频等方式进行用药教育，主要内容包括：

① 药物（或药物装置）的通用名、商品名或其他常用名称，以及药物的分类、用药目的及预期疗效。

② 药物剂型、给药途径、剂量、用药时间和疗程，主要的用药注意事项。

③ 药物的特殊剂型、特殊装置、特殊配制方法的给药说明和指导。

④ 用药期间应当监测的症状体征、检验指标及监测频率，解释药物可能对相关临床检验结果的干扰以及可能对排泄物颜色造成的改变。

⑤ 对可能出现的常见和严重不良反应，可采取预防措施；发生不良反应后应当采取应急措施；发生用药错误（如漏服药物）时的应对措施。

⑥ 潜在的药物-药物、药物-食物/保健品相互作用，药品的适宜贮存条件，过期药或废弃装置的处理。

⑦ 增加患者对药物和疾病的认知，提高患者的依从性；饮食、运动等健康生活方式的指导。

⑧ 指导患者做好用药记录和自我监测，以及告知如何及时联系到医师、药师。

⑨ 对特殊人群，如老年人、儿童、妊娠期及哺乳期妇女、肝肾功能不全者、多重用药患者以及认知、听力或视力受损的患者等，应当根据其病理、生理特点及药物代谢动力学、药效学等情况，进行针对性指导。

2. 工作步骤

① 和患者交流，说明此次教育的目的和预计时间。

② 根据掌握情况，充分考虑患者的特殊情况，如视力障碍、听力障碍、语言不通等，确定

用药教育的方式。

③ 评估患者对自身健康问题和用药情况的了解及期望、能正确使用药物的能力以及对治疗的依从性。

④ 通过询问，了解患者对用药目的、药物服用方法、剂量、疗程、用药注意事项、常见不良反应等的掌握程度，制订个体化用药教育方案。

⑤ 结合患者实际情况，采取口头、书面材料、实物演示等方式进行用药教育，使患者充分了解药物治疗的重要性和药品的正确使用使用方法。

⑥ 用药教育结束前，通过询问患者或请其复述等方式，确认患者对药物使用知识的掌握程度。掌握情况欠佳的，应当对其再次进行用药教育。

⑦ 药师填写用药教育记录（可参考《医疗机

构药事管理与药学服务》团体标准规范中的用药教育部分）。

第三部分 其他

一、工作记录

1. 临床药学巡诊工作内容要记录在电子病历系统和/或临床药师服务工作模块中，临床医护人员可以随时查阅所记录内容；对于保障患者用药安全的重要记录，药师要及时与医护人员沟通，尽早防范。

2. 工作内容记录的频次与药学巡诊分级密切相关，不同分级对应不同的记录频次，但最低记录频率为三次（入院时、住院中、出院前）。具体参见表 1 和表 2。

表 1 药学巡诊分级的参考标准

项目	一级监护	二级监护	三级监护
病理生理状态	严重肾功能不全 (CLcr ≤ 30 mL·min ⁻¹)；中度肾功能不全 (30 mL·min ⁻¹ < CLcr ≤ 60 mL·min ⁻¹)；中度肝功能不全 (ALT/AST/ALP > 2~4 倍 ULN 或 TBIL > 2~3 倍 ULN 或 CTP 评分 7~9 分)；儿童；高龄；妊娠期患者；哺乳期患者	严重肝功能不全 (ALT/AST/ALP > 5 倍 ULN 或 TBIL > 3 倍 ULN 或 CTP 评分 ≥ 10 分)	慢性疾病 (如 2 型糖尿病，原发性高血压，高脂血症，哮喘等) 需长期药物治疗或定期就诊的患者；肾功能基本正常，不需要常规进行剂量调整
特殊疾病	重症感染、高血压危象、急性心力衰竭、急性心肌梗死、哮喘持续状态、癫痫持续状态等	既往药物过敏史、上消化道出血史、癫痫史；中度感染、甲状腺危象、糖尿病酮症酸中毒、凝血功能障碍、临床检验出现危急值者、慢性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、药物中毒者	—
特殊用药情况	用药超过 15 种、应用治疗窗窄的药物 (如强心苷类药物或华法林)、联合应用 ≥ 3 种抗肿瘤药物、接受溶栓治疗、血药浓度监测异常或出现严重不良反应的患者、有基础疾病 (既往使用抗栓药物 / NSAIDs / 降糖药物 / 糖皮质激素 / 胆碱酯酶抑制剂 / 免疫抑制剂 / 抗肿瘤药物) 患者的围术期用药	同时应用药物超过 10 种或同时使用 2 种以上有明确相互作用药物的患者；使用特殊管理级抗菌药物、氨基糖苷类抗菌药物或存在抗菌药物不良反应高危因素者 (凝血功能异常、中枢神经系统损伤等)；接受静脉糖皮质激素、抗心律失常药、质子泵抑制剂、降脂药、抗血小板聚集药、免疫抑制剂、抗精神病药物、化疗药物、血液制品治疗者、有基础疾病 (除外一级监护中提及的既往用药情况) 患者的围术期用药	药物治疗方案确定，用药品种数不超过 10 种者
特殊治疗情况	住院接受血液透析 / 血液滤过 / 血浆置换 / 血液灌流 / 持续肾脏替代治疗 / ECMO 治疗者	接受静脉泵入给药、鼻饲给药的患者	接受特殊剂型药物治疗者
其他	具有其他严重情况的高危患者		

注：CLcr：肌酐清除率；ALT：谷丙转氨酶；AST：谷草转氨酶；ALP：碱性磷酸酶；TBIL：总胆红素；CTP：肝功能 Child-Turcotte-Pugh 分级法；NSAIDs：非甾体抗炎药。符合分级项目中任意一项者即可列入相应级别；若同时符合多项，以最高监护级别为准。

表 2 不同级别药学巡诊的记录频次

项目	时间 / 频次		
	一级监护	二级监护	三级监护
药学查房问诊、入院药物重整	入院 24 h 内进行	入院 24 h 内进行	入院 24 ~ 48 h 内进行
药学监护	病情及用药发生变化时，且每周 ≥ 3 次	病情及用药发生变化时，且每周 ≥ 2 次	病情及用药发生变化时，且每周 ≥ 1 次
协助制订个体化药物治疗方案	必要时	必要时	必要时
出院药物重整、出院用药教育	出院前 48 h 内完成	出院前 48 h 内完成	出院前 48 h 内完成

二、收费标准

药师开展巡诊服务、提交相应工作内容记录, 记账收取相关费用。按照每位患者每日 10 元收取; 住院天数 ≤ 30 d 的, 收取总费用不高于 60 元; 住院天数 > 30 d 的, 收取总费用不高于 100 元。或参考国家及各地方医保局出台的医保相关法规、政策核准的收费标准。

参考文献

- [1] 湖南省医疗保障局. 关于新增和修订药品类医疗服务价格项目的通知 [EB/OL]. [2023-10-09]. http://ybj.hunan.gov.cn/ybj/first113541/firstF/f3113607/202310/t20231009_31641865.html.
- [2] 国家卫生健康委, 国家中医药局. 关于开展全面提升医疗质量行动 (2023-2025 年) 的通知 [EB/OL]. [2023-05-26]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202305/content_6883704.htm.
- [3] 国家卫生健康委, 国家中医药局, 国家疾控局. 关于印发全国医疗服务项目技术规范 (2023 年版) 的通知 [EB/OL]. [2023-09-28]. <http://www.nhc.gov.cn/caiwusi/s7785t/202309/914acc9618944ee2b36621d33517e576.shtml>.
- [4] 国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于印发医疗机构药事门诊服务规范等 5 项规范的通知 [EB/OL]. [2021-10-09]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/202110/f76fc77acd87458f950c86d7bc468f22.shtml>.
- [5] 中国医院协会. 医疗机构药事管理与药学服务 (团体标准) [S]. T/CHAS 20-1-1—2022, 2022.
- [6] 闫雪莲, 戴婷婷, 王春晖, 等. 医疗机构药学服务规范 第 3 部分 药物重整 [J]. 中国药房, 2019, 30 (23): 3178-3180.
- [7] 侯文婧, 卜一珊, 金朝辉, 等. 医疗机构药学服务规范 第 7 部分 用药监护 [J]. 中国药房, 2019, 30 (24): 3318-3321, 3324.
- [8] 都丽萍, 樊萍, 金朝辉, 等. 医疗机构药学服务规范第 5 部分 用药教育 [J]. 中国药房, 2019, 30 (24): 3315-3316, 3324.
- [9] 中国药师协会. 药师药学服务胜任力评价标准 (试行) [J]. 中国合理用药探索, 2017, 14 (9): 1-2.
- [10] 曾繁典. 临床药学与药学服务的核心价值与实践 [J]. 医药导报, 2016, 35 (1): 1-3.
- [11] 秦静静, 杜书章, 阚全程, 等. 医院药师服务质量评价指标的研究 [J]. 医药论坛杂志, 2017, 38 (12): 19-21.
- [12] 康震, 金有豫, 朱珠, 等. 药学监护实践方法: 以患者为中心的药物治疗管理服务 [M]. 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2016: 30-53.
- [13] 刘治军. 国外临床药师药物重整工作简介 [J]. 药品评价, 2012, 9 (32): 6-9.
- [14] 中国健康促进基金会医药知识管理专项基金专家委员会, 中国药学会医院药专业委员会, 中国医院协会药事管理专业委员会, 等. 中国药学服务标准与收费专家共识 [J]. 药品评价, 2016, 13 (14): 8-15, 24.
- [15] 张威, 张宇晴, 陆进, 等. 医疗机构药事管理与药学服务团体标准体系设计及构建 [J]. 医药导报, 2023, 42 (10): 1455-1459.

(收稿日期: 2023-11-02; 修回日期: 2023-11-23)

规范主持:

李焕德 (湖南省药学会)

规范专家组成员:

张毕奎 (中南大学湘雅二医院)
彭向东 (中南大学湘雅三医院)
杨志玲 (湖南省人民医院)
张赞玲 (中南大学湘雅医院)
廖德华 (湖南省肿瘤医院)
原海燕 (中南大学湘雅二医院)
杜洁 (中南大学湘雅医院)

执笔专家:

徐萍 (中南大学湘雅二医院)
周艳钢 (中南大学湘雅二医院)
谭胜蓝 (中南大学湘雅二医院)

学术秘书:

王清 (中南大学湘雅二医院)

张毕奎 (中南大学湘雅二医院)

刘韶 (中南大学湘雅医院)
左笑丛 (中南大学湘雅三医院)
龙明辉 (湖南省肿瘤医院)
徐萍 (中南大学湘雅二医院)
潘勇 (湖南省肿瘤医院)
吴翠芳 (中南大学湘雅三医院)

唐甜甜 (中南大学湘雅二医院)
屈健 (中南大学湘雅二医院)
肖轶雯 (中南大学湘雅二医院)

STAT3 在神经退行性疾病中的研究进展专题

【编者按】

信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 信号通路是机体重要的信号通路, 在肿瘤发生、免疫调控、炎症反应等方面发挥重要的作用。近年来多项研究证明, STAT3 与神经元凋亡、神经炎症的表达与氧化应激的发生密切相关, 在神经退行性疾病领域同样有着不容忽视的作用, 但尚处于起步阶段。本专栏综述 STAT3 通路在阿尔茨海默病、帕金森病、血管性痴呆、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化等神经退行性疾病中的作用, 旨在为国内从事相关基础和临床研究的医药工作者了解该领域的最新动态提供新的科研思路。

【专题主持人简介】



孙逸, 女, 中国药科大学讲师, 中国药理学会会员。长期开展神经精神类疾病病理生理机制、糖尿病病理机制及药物靶点研究, 主持并参与国家自然科学基金项目、宁夏回族自治区重点研发计划、国家“十二五”重大新药创制专项课题、广东省重大科技专项项目等十余项, 研究成果发表于 *Redox Biol*、*Nat Rev Urol*、*J Med Chem*、*Antioxidants* 等期刊。获得“江苏省五一创新能手”“江苏省青年岗位能手”等称号。

STAT3 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展

王珏, 陈佩弦, 何玲, 孙逸* (中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要: 信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 信号通路是机体重要的信号通路, 大量体内外研究显示该通路与神经退行性疾病密切相关, 其激活引发的神经炎症等在疾病的发生发展中起着重要作用。在阿尔茨海默病和帕金森病中, 多项生理生化研究显示 STAT3 信号通路在患者体内激活并与多项病理特征存在潜在联系, 但其具体作用还存在争议; 关于 STAT3 在其他神经退行性疾病 (如血管性痴呆、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化) 的病理生理作用的研究较少, 大多集中于药效研究, 有待进一步探索发现。本文对 STAT3 信号通路在神经退行性疾病中的作用进行综述, 并列举靶向 STAT3 药物的最新研究进展, 旨在为治疗该类疾病提供有潜力的新靶点。

关键词: 信号传导及转录激活蛋白 3; 神经炎症; 神经退行性疾病

中图分类号: R741.02 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0006-11
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.002

Research progress in STAT3 signal pathway in neurodegenerative diseases

WANG Jue, CHEN Pei-xian, HE Ling, SUN Yi* (School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 81703520); 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目 (No. 2019BFG02017); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目成果 (No. 202310316044Y)。

作者简介: 王珏, 男, 硕士研究生, 主要从事神经退行性疾病病理机制研究及药物靶点的发现, email: 1053887045@qq.com

***通信作者:** 孙逸, 女, 博士, 讲师, 主要从事神经退行性疾病病理机制研究及药物靶点的发现, email: bio_lunar@163.com

Abstract: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is an important signal pathway in the body, and many in vitro and in vivo studies have shown that this pathway is closely related to neurodegenerative diseases. Neuroinflammation caused by the activation of STAT3 plays an important role in the occurrence and development of neurodegenerative diseases. In Alzheimer's disease and Parkinson's disease, many physiological and biochemical studies have shown that STAT3 pathway is activated in patients and has a potential relationship with many pathological features, but its specific role remains controversial. In other neurodegenerative diseases, such as vascular dementia, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis, STAT3 has less pathophysiological effects, and most studies focus on pharmacodynamics, which need further confirmation. This article reviewed the role of STAT3 signaling pathway in neurodegenerative diseases, and the latest research progress in STAT3 drugs targeting, to provide potential new targets for such diseases.

Key words: signal transducer and activator of transcription 3; neuroinflammation; neurodegenerative disease

神经退行性疾病是以神经元进行性丢失和退行性病变为基础的慢性疾病，主要包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、血管性痴呆 (vascular dementia, VaD)、亨廷顿病 (Huntington's disease, HD)、肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 等^[1]。免疫系统中的多种细胞参与了神经退行性疾病的发展，包括小胶质细胞、星形胶质细胞和一些外周炎症细胞 (例如巨噬细胞^[2])。信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是信号传导及转录激活蛋白 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 家族的一员，是存在于神经元、血管内皮细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞中的转录因子^[3]。STAT3 通过 Janus 激酶 (Janus kinase, JAKs) 磷酸化激活，响应上游信号 (如细胞因子、生长因子等) 的作用，进一步引起细胞增殖、分化和凋亡等^[4]。近年来研究表明，STAT3 信号通路神经疾病病理状态下胶质细胞的激活和分裂密切相关，在神经退行性疾病的发生发展中发挥着重要作用^[5-6]。本文就 STAT3 信号通路在神经退行性疾病中的作用及其潜在治疗意义进行综述。

1 STAT3 信号通路

STAT3 是 STAT 蛋白家族的一员，该家族迄今为止已经在人类基因组中确定了 7 个 STAT 基因 *STAT1*、*STAT2*、*STAT3*、*STAT4*、*STAT5a*、*STAT5b* 和 *STAT6*，在细胞增殖、分化、凋亡和血管生成等生理过程中起着复杂而重要的调节作用^[7]。如图 1 所示，与其他家族成员相同，STAT3 由一

些在结构和功能上保守的区域组成，SH2 结构域 (Src homology 2 domain, SH2 domain) 和 N 端结构域 (N-terminal domain, ND)，在 STAT3 单体激活过程中介导二聚化，SH2 结构域高度保守，是大多数 STAT3 抑制剂的靶点；螺旋线圈结构域 (coiled-coil domain, CCD) 通过蛋白-蛋白相互作用作为核定位信号，而 C 端转录激活结构域 (C-terminal transcriptional activation domain, AD) 经历丝氨酸磷酸化，从而招募更多的转录激活因子，增强 STAT3 的转录活性；DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD)，决定 DNA 的结合；另外有连接子结构域 (linker domain, LK) 负责 DBD 和 SH2 结构域的连接^[8]。



图 1 STAT3 的组成

Fig 1 Structure of STAT3

Y705/S727: 磷酸化位点 (Tyr705/Ser727)

JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 信号通路介导 STAT3 的激活过程^[9]。JAK/STAT 级联由三个主要成分组成：一个细胞表面受体，一个 Janus 激酶 (JAKs) 和两个 STATs 蛋白^[9]。如图 2 所示，当细胞因子与其受体结合时，JAKs 被激活并传递调节信号；激活的 JAKs 使受体酪氨酸残基磷酸化，为具有 SH2 结构域的蛋白质创造结合位点；随即招募包含 SH2 结构域的 STAT3，其酪氨酸残基被 JAKs 磷酸化并激活；这些激活的 STAT3 形成二聚体，并转移到细胞核，诱导靶基因的转录^[10]。

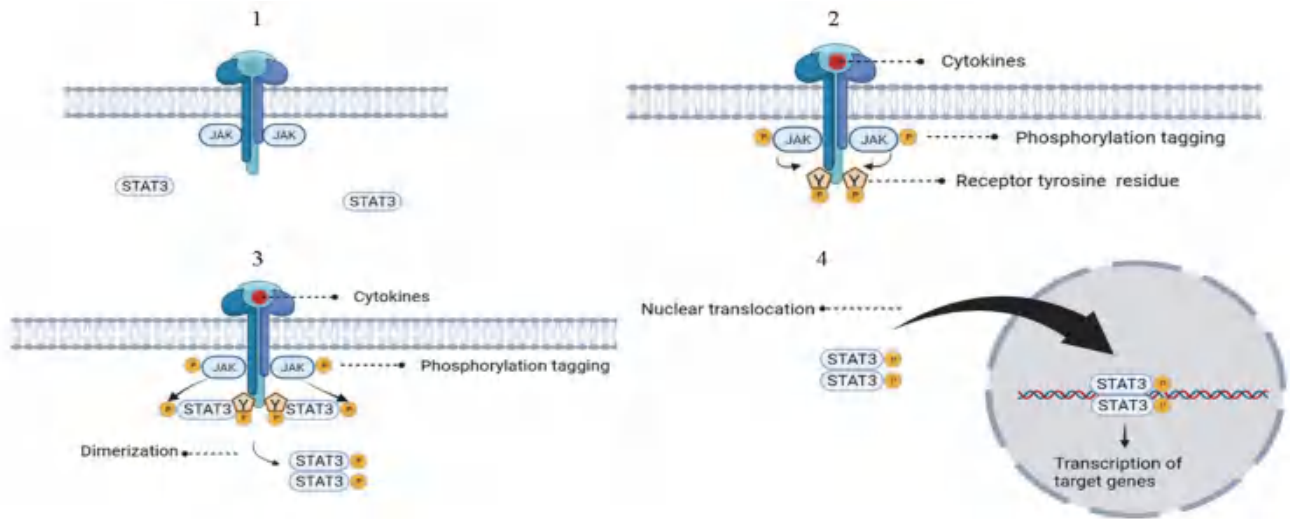


图 2 JAK/STAT 信号通路

Fig 2 JAK/STAT signaling pathway

STAT3 的调控复杂而精密，主要通过磷酸化、乙酰化、甲基化、泛素化和酪氨酸磷酸化等翻译后修饰进行^[11]。从图 2 可知，酪氨酸残基的磷酸化是 STAT3 的激活标志，一些激酶与 STAT3 磷酸化有关，包括 p38 蛋白、细胞外信号调节蛋白激酶、JUN 的 N 端激酶和蛋白激酶 C δ 等^[12]。此外，JAK/STAT3 信号通路也受到不同机制负调节因子的调节，例如细胞因子信号传导抑制（suppressors of cytokine signaling, SOCS）蛋白，作为经典的负反馈因子，可使 JAKs 失活并阻止 STAT3 进入受体结合位点^[13]。此外，STAT 家族成员间的交叉调控对细胞因子信号有着关键影响，STATs 形成同源或异源二聚体，产生三种可能的 DNA 结合活性，包括 STAT1-STAT1、STAT3-STAT3 和 STAT1-STAT3^[14]。

STAT3 通过改变效应细胞中的基因转录，响应细胞外信号分子的作用^[15]。然而，在 STAT3 参与的通路中可能发生许多异常现象，导致 STAT3 调控异常，引发各种病理事件，如癌症、免疫缺陷综合征、炎症和神经退行性疾病等^[16]。目前，关于 STAT3 的探索和研究主要集中在肿瘤病理领域，其在肿瘤细胞的免疫逃逸、扩散和转移方面发挥了至关重要的作用^[8]。但近年来，多项研究证明，STAT3 与神经元凋亡、神经炎症的表达及氧化应激的发生密切相关，在神经疾病领域同样有着不容忽视的作用^[17]。

2 STAT3 信号通路在神经退行性疾病中的作用

STAT3 在中枢神经系统（central nervous system, CNS）中扮演着重要角色，不仅参与神经发育的多个生理过程，还在神经细胞存活和再生中起到关键作用^[18-20]。值得注意的是，STAT3 与神

经胶质细胞的分化、分裂以及激活密切相关，而这类细胞对神经功能的影响巨大^[21]。星形胶质细胞作为人类 CNS 中含量最为丰富的细胞，能够对 CNS 中的各种损伤作出反应从而激活；小胶质细胞作为神经系统的固有免疫细胞，是 CNS 的第一道防线，其在细菌感染或 CNS 损伤时迅速激活并释放多种细胞因子，并且小胶质细胞也被证明能参与到星形胶质细胞反应性增生中^[22-23]。已有研究证实，在 AD、癫痫和脑缺血等多种神经疾病的患者体内观察到 STAT3 的激活，同时伴有严重的神经炎症和氧化应激反应^[24-26]。STAT3 信号通路与神经退行性疾病的发生发展之间存在复杂而密切的联系，提示干预 STAT3 可能成为治疗该类疾病潜在的新策略。STAT3 信号通路在神经退行性疾病中的研究尚属新兴领域，但其研究前景不容忽视。本文将对 STAT3 信号通路在神经退行性疾病中的研究加以综述。

2.1 AD

AD 是一种典型的神经退行性疾病，表现为认知和记忆功能障碍^[27]。AD 在临床上难以被逆转，现有的药物仅能延缓病情发展^[28]。AD 最显著的病理特征是神经纤维缠结以及老年斑产生，因此衍生出相应的两种假说： β -淀粉样蛋白（amyloid β -protein, A β ）的毒性假说和 Tau（microtubule-associated protein tau, Tau）蛋白过度磷酸化假说^[29]。但以上两种假说与 AD 发生发展之间的因果关系仍未得到完全证实^[30-31]。面对 AD 研究的难关，我们应寻求更新的解决办法。

AD 患者的早期特征是神经元内 A β 的积累，进而引起斑块周围的星形胶质细胞发生增生^[32]。体内外实验证明 A β 与 STAT3 激活有关。

在海马注射 $A\beta$ 诱导的 AD 模型小鼠及 APP/PS1 (amyloid beta precursor protein/ presenilin 1, APP/PS1) 转基因小鼠、5×FAD 转基因小鼠的皮层和海马中均观察到 STAT3 的酪氨酸磷酸化升高^[33]。体外用 $A\beta$ 刺激原代培养的大鼠神经元或胶质细胞也会诱导 STAT3 磷酸化水平升高^[33-34]，说明抑制 STAT3 有可能改善 AD 病理损伤。在星形胶质细胞中通过 siRNA 干扰 *Stat3* 的表达可以减少白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)，抑制星形胶质细胞激活，并部分缓解神经元损伤^[35]。在体实验表明，在星形胶质细胞中特异性敲除 *Stat3* 下调了促炎因子，恢复了轴突功能，改善了老年 APP/PS1 小鼠的空间学习记忆能力^[36]。有研究表明，在另一种 AD 模型动物 5×E4 小鼠中抑制 STAT3 可降低 β -分泌酶 1 (β -secretase 1, BACE1) 活性及上调脑内低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (low density lipoprotein receptor related protein 1, LRP-1) 水平，从而减少大脑淀粉样蛋白斑块，减轻神经炎症和氧化应激反应，改善脑血管功能和脑血流动力学，最终提高小鼠的认知功能^[24]。由此表明 STAT3 是星形胶质细胞增生相关通路中的关键调节因子，与该细胞介导的神经元存活、轴突再生和突触恢复密切相关^[37]。综上，STAT3 可通过调节神经元及异常激活的胶质细胞在 AD 的发生发展中发挥广泛而多样的作用，抑制 STAT3 有助于 $A\beta$ 的清除，有望成为 AD 治疗的新方向。

作为 AD 的另一重要特征，Tau 病理是指神经系统中过度磷酸化的 Tau 蛋白错误折叠并蓄积^[38]。补体 3a 受体 (complement C3a receptor, C3aR) 是调节中枢免疫动态平衡的关键因子，而 P-STAT3 是 C3aR 的直接下游靶点^[39]。Alexandra 等^[40] 在 PS19 小鼠的原代小胶质细胞中敲除 *C3ar1* 基因或抑制 STAT3 磷酸化都能减少 Tau 蛋白蓄积，改善突触损伤和神经元丢失^[39]。然而，关于 STAT3 与磷酸化 Tau 蛋白之间的关系尚存在不同观点。有体内研究发现，在 P301L (fronto-temporal dementia with Parkinsonism-17 mutation, P301L) 转基因小鼠中过表达的全长人 Tau 蛋白 (full-length human tau40, hTau) 通过增加乙酰化 STAT1 和胞质中 STAT3 的相互作用，抑制 STAT3 从胞质转运到细胞核，导致 STAT3 失活，而 STAT3 失活会进一步造成自噬障碍，引起可溶性及不溶性 Tau 蛋白的增加，从而恶化认知障碍^[41]。这说明 STAT3 在 Tau 病理中发挥的作用是复杂的，有待进一步研究。

除了 $A\beta$ 的毒性假说和 Tau 蛋白过度磷酸化假说，载脂蛋白 E 基因 (apolipoprotein-E, *ApoE*) 的 $\epsilon 4$ 等位基因是 AD 最重要的遗传诱因^[42]。一项蛋白质组学研究发现，相较于非携带者和老年 AD 患者，携带 *ApoE* 基因的年轻患者 (没有显著 AD 症状) 体内存在 STAT3 的激活，同时体外研究发现抑制 STAT3 缓解了神经炎症、减少了 Tau 蛋白磷酸化和 $A\beta_{1-42}$ 的积累，这提示 STAT3 或许是联系 AD 和 *ApoE* 基因的关键分子，为遗传性 AD 发病机制的研究提供了新的方向^[43]。以上研究表明，STAT3 信号通路与 AD 的发生发展密切相关，可能成为治疗 AD 的潜在靶点，但后续还需要更多的临床前及临床证据证实。

2.2 PD

PD 是一种常见的神经退行性疾病，主要表现为多巴胺能黑质-纹状体系统受损导致的运动功能障碍^[44]。更具体地说，由于从黑质致密部投射到纹状体尾壳核的多巴胺能神经元异常死亡，导致多巴胺神经传递的丧失，机体出现各种运动症状，包括静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍。尽管 PD 最初被描述为一种没有痴呆的运动障碍疾病，但现在普遍认为 PD 的进展会影响其他黑质外多巴胺能、胆碱能和血清素能神经，导致包括嗅觉丧失、睡眠障碍和便秘在内的非运动症状，以及痴呆和抑郁症等认知和精神症状^[45]。

PD 中聚集的 α -突触核蛋白会使小胶质细胞向促炎表型 (M1) 转化，从而加速疾病进程^[46]。有研究者通过定量蛋白质组学光谱分析法，发现重组 α -突触核蛋白刺激的小胶质细胞及脑内注射 α -突触核蛋白预制纤维的小鼠中均存在 STAT3 通路激活^[47]，说明 STAT3 参与小胶质细胞的活化及 PD 的发病过程。还有体外研究表明 M1 型小胶质细胞释放的过氧化氢能诱导原代星形胶质细胞中 STAT3 的激活，使得胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的表达升高，导致反应性星形胶质细胞增生，进一步损伤多巴胺能黑质-纹状体系统，导致运动障碍^[48]。由于在大鼠和人 GFAP 启动子中都发现了潜在的 STAT3 结合位点^[49-50]，故 STAT3 可能通过诱导编码 GFAP 的 *Gfa* 基因表达上调从而介导星形胶质细胞活化，影响 PD 的疾病发展。钙离子是细胞功能的重要次级信使，储存在内质网和线粒体中，而钙稳态失调是 PD 发病机制的另一个关键特征^[51]。Bo 等^[52] 在小胶质细胞中敲低 *Calhm2* (calcium homeostasis modulator 2, *Calhm2*) 或 *EFhd2* (EF-hand domain family member D2, *EFhd2*) 均可显著抑制细菌脂多

糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 STAT3 激活, 抑制炎症因子释放, 保护神经元。这表明 STAT3 功能与钙稳态失调息息相关, 调控 STAT3 可通过钙稳态参与 PD 的病理过程。然而关于 STAT3 在 PD 发生发展中的作用也存在争议。有研究证明在 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenyl-pyridine, MPP⁺) 处理的星形胶质细胞模型和 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的 PD 小鼠中激活星形胶质细胞的 IL-6/JAK/STAT3 通路, 可上调谷氨酸转运蛋白 (glutamate transporter, GLT), 阻止 MPP⁺/MPTP 诱导的谷氨酸再摄取能力的降低及脑内谷氨酸能系统的过度激活, 有利于改善 PD 中多巴胺能神经元的退化^[53]。

综上, STAT3 与 PD 的多个病理特征具有不容忽视的相关性, 但与 PD 发病机制的关系仍不明确, 大多数研究集中于体外, 有待进一步探索。

2.3 VaD

VaD 是一种由脑血管疾病引起的认知功能障碍综合征, 由出血或缺血造成的急慢性脑缺氧是其发生发展过程中的高危诱因^[54]。目前, VaD 的发病机制尚未完全阐明, 但多项体内外研究证实神经炎症是 VaD 发生的重要机制之一, 而 STAT3 是 VaD 病理过程中重要的炎症诱导因子^[55-56]。血管性认知障碍患者在 VaD 的临床前、临床和严重阶段均存在广泛慢性炎症反应^[57-59]。慢性白质缺血性损伤引起的 VaD 模型动物脑内 STAT3 表达水平和磷酸化水平的升高, 小胶质细胞向 M1 表型极化, 胼胝体脱髓鞘和 Ranvier 结节紊乱, 工作记忆表现下降^[60]。除了人体和动物模型, 在体外以低氧刺激诱导海马神经元细胞损伤模拟 VaD 的病理环境时, 也观察到 STAT3 磷酸化水平升高, 促炎因子增多, 内质网应激增强^[61]。由此可见, STAT3 与 VaD 的发生发展密切相关, 抑制 STAT3 可能改善 VaD。在双侧颈总动脉闭塞诱导的 VaD 模型大鼠中, 采用电针刺激可下调海马和杏仁核中 STAT3 的表达水平, 可降低神经炎症反应, 改善模型动物的学习和记忆能力^[62]。此外, 一些中药制剂或天然产物改善 VaD 的作用也与 STAT3 有关。清脑益智汤可抑制体外培养的原代神经元中 STAT3 的表达及磷酸化水平, 抑制胶质细胞的活化^[63]。脑保健颗粒可通过抑制 JAK2/STAT3 通路, 减少 VaD 模型大鼠促炎细胞因子的产生, 并进一步降低神经炎症反应, 从而保护缺血性脑损伤, 显著缓解 VaD 症状^[64]。经典的汤剂加味二陈汤可通过 JAK2/STAT3 通路降低 VaD 大鼠脑内 $\beta_{1,42}$ 的水平, 提高抗氧化能力, 并降低炎症因子水平,

增加神经元的数量, 改善认知功能障碍^[65]。木兰叶中分离出来的天然化合物厚朴酚在体内和体外实验中均可以通过靶向沉默调节蛋白-3 (sirtuin 3, SIRT3) 来抑制转录因子 STAT3 的磷酸化和核易位, 减少星形胶质细胞 A1 型的极化, 改善神经炎症和突触损伤, 从而缓解慢性脑灌注不足诱导的 VaD 症状^[66]。因此, STAT3 可能是治疗 VaD 的靶点, 抑制 STAT3 信号通路可以有效减少神经炎症损伤并改善症状, 但目前还缺乏关于临床应用的安全性和有效性数据, 未来还需进一步的深入研究。

2.4 HD

HD 是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病, 其特征是认知、运动和精神障碍^[67]。HD 的主要病因是亨廷顿基因中显性遗传的 CAG 三核苷酸重复扩增, 表达出了异常的亨廷顿蛋白, 该蛋白聚集后形成大分子团, 最终在脑中积聚; 在细胞水平上, 异常的亨廷顿蛋白通过多种机制导致神经元功能障碍和死亡, 包括破坏蛋白质内稳态、蛋白转录、线粒体功能, 随着病情恶化, 纹状体早期可见表观变化并累及皮层^[68]。在 HD 的诸多发病机制中, 氧化应激和炎症的级联反应是使 HD 恶化的两个重要因素^[69]。HD 患者和许多模型动物均表现出炎症反应及 STAT3 激活。有研究者通过流式细胞术在 HD 患者离体的外周单核细胞中发现促炎细胞因子 IL-6 水平升高, JAK/STAT 信号通路激活^[70]。还有研究者发现 HD 患者的壳核中 STAT3 表达显著升高^[71]。在小鼠和非人类灵长类动物 HD 遗传模型的反应性星形胶质细胞中也存在 STAT3 激活^[5]。对野生型小鼠双侧纹状体注射能表达突变亨廷顿蛋白的腺相关病毒, 小鼠的神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞中均出现 STAT3 表达量和磷酸化水平升高, 小鼠也表现出明显的运动能力障碍^[72]。这说明 STAT3 信号通路在神经炎症中发挥重要作用, 通过抑制 STAT3 介导的炎症反应通路可能可以作为治疗 HD 的潜在新疗法。Jang 等^[73] 研究显示, 一种从五味子根中分离出来的去甲三萜类化合物五味子内酯 C 在体内和体外模型中都表现出通过抑制小胶质细胞的 STAT3 信号通路发挥缓解行为功能障碍、纹状体变性和减少神经炎症反应的作用。但是与抑制 STAT3 信号通路降低神经炎症而发挥神经元保护作用不同, 其他研究者还发现激活 STAT3 信号通路可以改善 HD 患者病理特征。HD 发病与衰老密切相关的原因在于患者体内 miR-29b-3p 随着年龄逐渐增多, miR-29b-3p 可通过抑制 STAT3 抑制自噬, 使突变的

亨廷顿蛋白聚集, 而进一步损伤纹状体中型棘神经元 (medium spiny neuron, MSN), 说明维持 STAT3 的正常活性对延缓 HD 的发生和疾病进展具有积极意义^[74]。在过表达人亨廷顿蛋白的纹状体祖细胞系中上调 STAT3 信号通路可诱导碱性螺旋-环-螺旋转录因子 1 (twist1) 的表达, 减少脑细胞凋亡和损伤, 进而对 HD 患者纹状体的变性产生保护作用^[75]。Abjean 等^[71]研究发现在 HD 小鼠的星形胶质细胞中激活 JAK2-STAT3 信号通路可以增强溶酶体和泛素蛋白酶体降解系统的蛋白水解能力, 减少突变亨廷顿蛋白的聚集, 改善 HD 小鼠的神经缺陷^[71]。重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rhEPO) 和干扰素- β -1b (interferon- β -1b, IFN- β -1b) 也可通过激活 JAK1/STAT3 通路显著改善 3-硝基丙酸诱导的 HD 大鼠的运动和行为能力, 恢复线粒体功能以及脑源性神经营养因子水平, 减少纹状体中的氧化应激和炎症反应^[76]。由此可见, STAT3 的作用机制十分复杂, STAT3 信号通路在 HD 中的作用仍存在争议, 可能在反应性星形胶质细胞和神经元之间存在双向作用, 还需进一步的研究。

2.5 ALS

ALS 是一种以脑和脊髓中运动神经元进行性损失为特征的神经退行性疾病, 表现为进行性运动无力和神经源性肌萎缩, 目前缺乏有效的治疗药物^[77]。有研究发现, ALS 患者存在轴突病变和神经炎症, 其脊髓内神经元和胶质细胞中 STAT3 表达增多, 肌肉组织中 STAT3 和促炎细胞因子 IL-6 表达都上调^[78-79]。有研究对 ALS 患者的成纤维细胞进行原代培养, 发现细胞中的 STAT3 也持续上调^[80]。此外, 一种 ALS 小鼠模型——SOD1G93A 转基因小鼠的脊髓运动神经元、反应性星形胶质细胞和激活的小胶质细胞中也存在 STAT3 的磷酸化活化和核转位水平升高, 并进一步诱导多种促炎基因产物表达上调^[81]。同样, 在另一种家族性 ALS 的遗传模型动物的脊髓 α -运动神经元中, STAT3 在轴突损伤、缺血和过量谷氨酸等多种刺激下可被激活^[82]。这些发现说明, STAT3 在 ALS 患者和动物模型中会发生不同程度的激活, STAT3 信号介导的炎症反应可能与 ALS 的发病机制有关, STAT3 信号通路可能是阐明 ALS 病理过程的关键。TDP-43 (TAR DNA binding protein-43, TDP-43) 是由 *Tardbp* 基因编码的核内蛋白, 在 ALS 患者神经元细胞质中以异常的不溶性聚集体形式积累, 是 ALS 重要的病理特征^[83]。而 STAT3 抑制剂氯硝柳胺可以阻止 TDP-43 由细胞核向细胞质的错误转移并降解胞质

中的 TDP-43 聚集体, 进而减弱应激状态下神经元的形态变化, 这一发现为 ALS 的发病机制研究及治疗提供了新的思路^[84]。上述研究结果表明, STAT3 信号通路与 ALS 发病机制密切相关, 研究 STAT3 在 ALS 发生发展中的作用可能对阐明 ALS 的发病机制并发现新的药物靶点具有重要意义。

2.6 MS

MS 是一种慢性神经系统疾病, 以中枢神经系统炎症和脱髓鞘为主要特征, 并伴有不同程度的轴突和神经元损伤^[85]。近几年的研究发现, STAT3 信号通路与 MS 的病理过程密切相关^[86]。蛋白肽 PLP139-151 诱导的实验性变态反应性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 模型小鼠中的脾脏和脑内及酮胺诱导的脱髓鞘小鼠的脑组织中均存在 STAT3 信号通路的激活^[87-88]。此外, STAT3 信号通路在髓系细胞和淋巴系细胞中也发挥关键作用, 通过对该通路的阻断可减弱神经元的炎症反应, 从而改善 MS 疾病症状, 这说明抑制 STAT3 可能是治疗 MS 的一种潜在策略^[89]。目前已有报道, 一些小分子化合物、天然产物可通过抑制 STAT3 介导的炎症反应来改善 MS 的相关病理症状。葫芦素 B 可以阻断 STAT3 的磷酸化过程, 在神经炎症和自身免疫性疾病中发挥免疫调节作用, 减少 MS 早期阶段的神经元缺陷^[90]。古古甾醇是一种来自 *Commiphora Wightii* 树的植物甾醇, 具有强大的抗炎作用, 而且可以通过调控 JAK/STAT 信号通路来改善与较低 STAT3 水平相关的行为缺陷, 提高大鼠脑内过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR- γ) 和髓鞘碱性蛋白的水平, 保护神经^[91-92]。而新型药物 β -D-甘露糖醛酸 (β -D-mannuronic acid, M2000) 可通过下调继发型 MS 患者中的白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)、STAT1 和 STAT3 的相关基因, 并降低外周血单核细胞中 TLR2 (Toll like receptor 2, TLR2) 和 TLR4 (Toll like receptor 4, TLR4) 的表达, 从而降低炎症反应^[93]。芬戈莫德 (fingolimod, FTY720) 最初被证明是一种 1-磷酸鞘氨醇受体的调节剂, 可通过抑制自身免疫反应治疗 MS。后来发现芬戈莫德通过调节 STAT3 信号通路减弱脑白质缺血后小胶质细胞产生的神经炎症, 进而使小胶质细胞向抗炎状态转化, 提示芬戈莫德可用于治疗其他神经炎症为主要病理特征的疾病^[60]。在 MS 的诸多发病机制中, 免疫反应也是推动疾病复发和进展的重要因素, 而 STAT3 也可通过调节免疫反应缓解疾病^[94]。Aqel 等^[95]研究发现新型小分子前药 LLL12b 通过特异性抑制 STAT3 进而重

建 Teff (effector T cell, Teff) 与 Treg (regulatory T cell, Treg) 的平衡, 可以阻止致病的 Teff 细胞增多, 避免进一步的炎症反应。上述研究结果提示 STAT3 信号通路具有作为 MS 靶点的潜力, 抑制 STAT3 介导的炎症反应为治疗 MS 开辟了新的维度, 并为阐明 MS 的病理机制提供新的角度。

3 STAT3 通路相关调控剂

在大多神经退行性疾病中, 抑制 STAT3 能改善胶质细胞的过度激活, 减轻神经炎症和氧化应激。因此, 寻找合适的 STAT3 抑制剂或许是可行的治疗手段。

3.1 靶向 STAT3 的小分子抑制剂

目前关于靶向 STAT3 的小分子抑制剂的研究较多, 但大多集中于肿瘤领域, 在神经退行性疾病中的研究还十分有限。大多数小分子抑制剂可以选择性地结合到 STAT3 的 DBD、SH2 结构域, 从而抑制其表达或激活。然而, 大部分小分子抑制剂由于水溶性和细胞渗透性较低, 临床预期较差^[10]。BBI608 (napabucasin) 是迄今为止唯一进入 III 期临床试验的 STAT3 抑制剂, 通过选择性结合 DBD 结构域发挥抑制 STAT3 的作用, 用于晚期肿瘤治疗。该抑制剂在临床使用中常见的不良反应是腹泻、恶心、呕吐、腹部痉挛和疲劳^[96]。

氯硝柳胺是 FDA 批准的抗绦虫药物^[97], 是 STAT3 抑制剂, 其通过抑制 STAT3, 阻止了运动神经元内 TDP-43 (TAR DNA binding protein-43, TDP-43) 从胞核向胞浆的转移, 并降解 TDP-43 聚集体, 减少了应激条件下细胞线粒体三磷酸腺苷 (ATP) 的产生, 氧化应激反应和细胞凋亡, 并缓解了细胞损伤, 从而改善了 ALS 的病理特征^[84]。一项随机、双盲的临床研究显示, 与安慰剂组相比, 除轻微的刺激反应外, 未见显著的不良反应^[98]。但是与大多数小分子 STAT3 抑制剂相似, 氯硝柳胺的水溶性有待进一步改善^[99]。有研究者在氯硝柳胺中引入了亲水基团得到化合物 NGT 02, 水溶性和生物利用度得到改善, 有效地诱导肿瘤细胞的凋亡并抑制癌细胞的迁移^[99]。笔者前期也研究了氯硝柳胺对 AD 小鼠的作用, 发现 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 小鼠给予氯硝柳胺后, 小鼠脑内神经炎症和氧化应激反应均降低, 学习能力提高, 这提示了氯硝柳胺在治疗认知障碍相关疾病中具有潜在价值; 研究还表明氯硝柳胺在 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下连续给药 7 d 对小鼠的心、肝、肺、脾、肾等主要器官的正常组织结构无明显影响, 说明该给药策略安全有效^[100]。羟氯喹也是一种 FDA 批准的抗风湿药物, 已被证明是一种能穿透血脑屏障的 STAT3 抑制剂。动物实验结果显示

APP/PS1 小鼠给予羟氯喹后海马突触可塑性和认知功能均得到改善^[101], 说明 STAT3 是老药新用的潜在靶点。一项荟萃分析显示, 与安慰剂组相比, 羟氯喹临床研究中最为显著的不良反应是皮肤色素沉积, 其次是视网膜病变^[102]。

一些处于临床前研究阶段的人工合成的小分子化合物也可通过抑制 STAT3 改善认知功能。LLL-12 是根据姜黄素的结构合成的小分子 STAT3 抑制剂, 能直接抑制 STAT3 的 705 位酪氨酸磷酸化并阻止其激活, 可减少 $5 \times E4$ 小鼠大脑淀粉斑块沉积并改善其认知功能^[24]。C188-9 是计算机辅助合成的磺胺类化合物, 可选择性地与 STAT3 中 SH2 结构域结合, 抑制 STAT3 激活的过程^[103]。在 BV2 细胞的炎症模型和 $A\beta_{1-42}$ 清除实验中使用该抑制剂可下调促炎因子、降低 $A\beta_{1-42}$ 的水平, 并且在 SH-SY5Y-hTau441 细胞中能减少磷酸化 Tau 蛋白的水平^[43]。

3.2 抑制 STAT3 的天然产物

除了小分子抑制剂, 在自然界中存在具有抑制 STAT3 活性的天然化合物, 它们大多药理作用复杂且作用广泛, 对其作用机制的研究有助于开发结构新颖、活性更强的新药。

染料木素是一种从大豆提取物中提取的异黄酮。它是一种蛋白酪氨酸酶抑制剂, 具有强烈的抗血管生成、抗自由基、抗氧化、抗炎症和抗肿瘤作用, 可通过抑制 JAK2/STAT3 通路以及激活 KEAP1/NRF2 通路, 抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的激活, 减轻癫痫发作的强度和持续时间, 增加抗凋亡蛋白和神经元存活^[104]。三七总皂苷是血栓通注射液的主要成分, 可通过抑制 JNK 介导的 JAK2/STAT3 和 NF- κ B 信号通路, 缓解炎症反应, 从而改善脑缺血再灌注大鼠脑微血管结构的损伤和功能障碍^[105]。

相关靶向 STAT3 通路的小分子抑制剂及抑制 STAT3 的天然产物总结见表 1。

4 总结与展望

神经退行性疾病是目前困扰患者的广发慢性疾病, 难以治愈且症状严重, 已经引起了社会广泛的关注。然而其发病机制研究尚不全面。本文总结了 STAT3 信号通路在 CNS 中的相关机制研究, 该通路是神经胶质细胞激活的关键诱因, 与神经退行性疾病中常见的神经炎症、病理性蛋白聚集、突触和神经网络障碍、细胞骨架异常、蛋白质内稳态异常、能量稳态失调等特征都有着潜在的联系。进一步阐明 STAT3 通路在神经退行性疾病中的重要作用, 对于理解疾病的发病机制至关重要, 并且可能为神经退行性疾病的治疗提供潜在新靶点。

表 1 STAT3 抑制剂
Tab 1 STAT3 inhibitors

类别	抑制剂	作用机制	动物 / 细胞模型	文献		
小分子抑制剂	NIC	选择性抑制 STAT3 磷酸化 与 STAT3 的 SH2 结构域结合，抑制其激活过程	人源诱导多能干细胞分化的运动神经元	[84]		
	LLL-12		5×E4 小鼠模型	[24]		
	HCQ		APP/PS1 小鼠模型	[101]		
	NGT 06		人源 HCT-116 肿瘤细胞	[99]		
	HJC0152		人源 U87、U251 和 LN229 肿瘤细胞	[106]		
	FTY720		大鼠脑白质损伤模型 / 原代小胶质细胞	[60]		
	LYW-6		偶氮甲烷 / 葡聚糖硫酸钠诱导的结肠直肠癌裸鼠模型 / 人源 HCT116 肿瘤细胞	[107]		
	LL1		异种移植 HCT-116 裸鼠模型 / 相应人源肿瘤细胞	[108]		
	C188-9		营养因子剥夺的原代神经元模型、SH-SY5Y-hTau411 细胞、LPS 诱导的 BV2 细胞模型	[43]		
	SD-36		降解 STAT3	异种移植 MOLM-16、SUP-M2、SU-DHL-1 裸鼠模型 / 相应人源肿瘤细胞	[109]	
	BB1608		选择性结合 STAT3 的 DBD 结构域，抑制其与 DNA 结合	临床晚期肿瘤患者	[96]	
	天然产物		GEN	抑制 STAT3 磷酸化	戊四氮诱导的大鼠癫痫模型	[104]
			PNS		大鼠大脑中动脉闭塞模型 / bEnd.3 细胞	[105]
MC			三硝基丙酸诱导的 HD 小鼠模型 / STHdh 细胞	[73]		
QNYZD			原代神经元	[63]		
CG			双支血管闭塞 VaD 大鼠模型	[64]		
ECD			LPS 刺激的 BV2 细胞模型	[65]		
HNK			CoCl ₂ 诱导缺氧的原代星形胶质细胞	[66]		
CuB			髓鞘少突胶质细胞糖蛋白及百日咳毒素诱导的小鼠 MS 模型	[90]		
GST			溴化乙啶诱导的大鼠 MS 模型	[92]		

注 (Note): 氯硝柳胺 (niclosamide, NIC); 羟氯喹 (hydroxychloroquine, HCQ); 染料木素 (genistein, GEN); 三七总皂苷 (panax notoginseng saponins, PNS); 五味子内酯 C (micrandilactone C, MC); 清脑益智汤 (qingnaoyizhi decoction, QNYZD); 脑保健颗粒 (cerebralcare granule, CG); 加味二陈汤 (erchen decoction, ECD); 厚朴酚 (honokiol, HNK); 葫芦素 B (cucurbitacin B, CuB); 古古甾醇 (gugululsterone, GST)。

参考文献

- [1] Wilson DM 3rd, Cookson MR, Van Den Bosch L, et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases [J]. Cell, 2023, 186 (4): 693-714.
- [2] Wan HL, Hong XY, Zhao ZH, et al. STAT3 ameliorates cognitive deficits via regulation of NMDAR expression in an Alzheimer's disease animal model [J]. Theranostics, 2021, 11 (11): 5511-5524.
- [3] Xu ZC, Xue T, Zhang ZX, et al. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy [J]. Neurochem Res, 2011, 36 (12): 2208-2215.
- [4] Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling [J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13 (2): 211-217.
- [5] Ben Haim L, Ceyzériat K, Carrillo-de Sauvage MA, et al. The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases [J]. J Neurosci, 2015, 35 (6): 2817-2829.
- [6] Feldman RA. Microglia orchestrate neuroinflammation [J]. Elife, 2022, 11: e81890.
- [7] Darnell JE. STATs and gene regulation [J]. Science, 1997, 277 (5332): 1630-1635.
- [8] Philips RL, Wang Y, Cheon H, et al. The JAK-STAT pathway at 30: much learned, much more to do [J]. Cell, 2022, 185 (21): 3857-3876.
- [9] Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease [J]. Neuron, 2014, 81 (2): 229-248.
- [10] Zou SL, Tong QY, Liu BW, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy [J]. Mol Cancer, 2020, 19 (1): 145.
- [11] Rusek M, Smith J, El-Khatib K, et al. The role of the JAK/STAT signaling pathway in the pathogenesis of Alzheimer's disease: new potential treatment target [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (1): 864.
- [12] Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3 (11): 900-911.
- [13] Luo W, Li YX, Jiang LJ, et al. Targeting JAK-STAT signaling to control cytokine release syndrome in COVID-19 [J]. Trends Pharmacol Sci, 2020, 41 (8): 531-543.
- [14] Costa-Pereira AP, Tinini S, Strobl B, et al. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (12): 8043-8047.
- [15] Bowman T, Garcia R, Turkson J, et al. STATs in oncogenesis [J]. Oncogene, 2000, 19 (21): 2474-2488.
- [16] Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, et al. The role of JAK-STAT signaling within the CNS [J]. Jakstat, 2013, 2 (1): e22925.
- [17] Zheng ZV, Chen J, Lyu H, et al. Novel role of STAT3 in microglia-dependent neuroinflammation after experimental subarachnoid haemorrhage [J]. Stroke Vasc Neurol, 2022, 7 (1): 62-70.
- [18] Leibinger M, Andreadaki A, Diekmann H, et al. Neuronal

- STAT3 activation is essential for CNTF-and inflammatory stimulation-induced CNS axon regeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4 (9): e805.
- [19] Nicolas CS, Peineau S, Amici M, et al. The JAK/STAT pathway is involved in synaptic plasticity [J]. *Neuron*, 2012, 73 (2): 374-390.
- [20] Selvaraj BT, Sendtner M. CNTF, STAT3 and new therapies for axonal degeneration: what are they and what can they do [J]. *Expert Rev Neurother*, 2013, 13 (3): 239-241.
- [21] Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function [J]. *Science*, 2018, 362 (6411): 181-185.
- [22] Rossi D. Astrocyte physiopathology: at the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death [J]. *Prog Neurobiol*, 2015, 130: 86-120.
- [23] Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9 (1): 42.
- [24] Mehla J, Singh I, Diwan D, et al. STAT3 inhibitor mitigates cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques while improving cognitive functions and brain networks [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9 (1): 193.
- [25] Tipton AE, Cruz Del Angel Y, Hixson K, et al. Selective neuronal knockout of STAT3 function inhibits epilepsy progression, improves cognition, and restores dysregulated gene networks in a temporal lobe epilepsy model [J]. *Ann Neurol*, 2023, 94 (1): 106-122.
- [26] Zhu H, Jian ZH, Zhong Y, et al. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation via JAK2/STAT3 pathway inhibition [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 714943.
- [27] Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231-255.
- [28] 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19 (4): 1598-1695.
- [29] Rostagno AA. Pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24 (1): 107.
- [30] Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14 (4): 535-562.
- [31] Morris GP, Clark IA, Vissel B. Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 136 (5): 663-689.
- [32] Bellaver B, Povala G, Ferreira PCL, et al. Astrocyte reactivity influences amyloid- β effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease [J]. *Nat Med*, 2023, 29 (7): 1775-1781.
- [33] Wan J, Fu AK, Ip FC, et al. Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2010, 30 (20): 6873-6881.
- [34] Choi M, Kim H, Yang EJ, et al. Inhibition of STAT3 phosphorylation attenuates impairments in learning and memory in 5XFAD mice, an animal model of Alzheimer's disease [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 143 (4): 290-299.
- [35] Chen E, Xu DS, Lan XQ, et al. A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation-induced human neural progenitor cell differentiation [J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13 (9): 1474-1484.
- [36] Reichenbach N, Delekate A, Plescher M, et al. Inhibition of STAT3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11 (2): e9665.
- [37] Abubakar MB, Sanusi KO, Ugusman A, et al. Alzheimer's disease: an update and insights into pathophysiology [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 742408.
- [38] Feng Q, Luo Y, Zhang XN, et al. MAPT/Tau accumulation represses autophagy flux by disrupting IST1-regulated ESCRT-III complex formation: a vicious cycle in Alzheimer neurodegeneration [J]. *Autophagy*, 2020, 16 (4): 641-658.
- [39] Litvinchuk A, Wan YW, Swartzlander DB, et al. Complement C3aR inactivation attenuates Tau pathology and reverses an immune network deregulated in tauopathy models and Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2018, 100 (6): 1337-1353.
- [40] Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2015, 85 (1): 101-115.
- [41] Li XG, Hong XY, Wang YL, et al. Tau accumulation triggers STAT1-dependent memory deficits by suppressing NMDA receptor expression [J]. *EMBO Rep*, 2019, 20 (6): e47202.
- [42] Fernández-Calle R, Konings SC, Frontiñán-Rubio J, et al. APOE in the bullseye of neurodegenerative diseases: impact of the APOE genotype in Alzheimer's disease pathology and brain diseases [J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17 (1): 62.
- [43] Roberts JA, Varma VR, An Y, et al. A brain proteomic signature of incipient Alzheimer's disease in young APOE ϵ 4 carriers identifies novel drug targets [J]. *Sci Adv*, 2021, 7 (46): eabi8178.
- [44] Moore DJ, West AB, Dawson VL, et al. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2005, 28: 57-87.
- [45] Pistacchi M, Gioulis M, Sanson F, et al. Gait analysis and clinical correlations in early Parkinson's disease [J]. *Funct Neurol*, 2017, 32 (1): 28-34.
- [46] Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 109 (Pt B): 249-257.
- [47] Sarkar S, Dammer EB, Malovic E, et al. Molecular signatures of neuroinflammation induced by α synuclein aggregates in microglial cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 33.
- [48] Hou LY, Zhou XY, Zhang C, et al. NADPH oxidase-derived H₂O₂ mediates the regulatory effects of microglia on astrogliosis in experimental models of Parkinson's disease [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 162-170.
- [49] Besnard F, Brenner M, Nakatani Y, et al. Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266 (28): 18877-18883.
- [50] Condorelli DF, Nicoletti VG, Barresi V, et al. Tissue-specific DNA methylation patterns of the rat glial fibrillary acidic protein

- gene[J]. *J Neurosci Res*, 1994, 39 (6): 694-707.
- [51] Post MR, Lieberman OJ, Mosharov EV. Can interactions between α -synuclein, dopamine and calcium explain selective neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 161.
- [52] Bo XN, Xie F, Zhang JD, et al. Deletion of Calhm2 alleviates MPTP-induced Parkinson's disease pathology by inhibiting EF-HD2-STAT3 signaling in microglia[J]. *Theranostics*, 2023, 13 (6): 1809-1822.
- [53] Zhang YL, He XL, Wu XJ, et al. Rapamycin upregulates glutamate transporter and IL-6 expression in astrocytes in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (2): e2611.
- [54] Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia[J]. *Neuron*, 2013, 80 (4): 844-866.
- [55] Poh L, Sim WL, Jo DG, et al. The role of inflammasomes in vascular cognitive impairment[J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17 (1): 4.
- [56] Li MX, Meng N, Guo X, et al. DL-3-*n*-butylphthalide promotes remyelination and suppresses inflammation by regulating AMPK/SIRT1 and STAT3/NF- κ B signaling in chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 137.
- [57] Zuliani G, Ranzini M, Guerra G, et al. Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia[J]. *J Psychiatr Res*, 2007, 41 (8): 686-693.
- [58] Schmitz M, Hermann P, Oikonomou P, et al. Cytokine profiles and the role of cellular prion protein in patients with vascular dementia and vascular encephalopathy[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36 (9): 2597-2606.
- [59] Belkhef M, Beder N, Mouhoub D, et al. The involvement of neuroinflammation and necroptosis in the hippocampus during vascular dementia[J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 320: 48-57.
- [60] Qin C, Fan WH, Liu Q, et al. Fingolimod protects against ischemic white matter damage by modulating microglia toward M2 polarization via STAT3 pathway[J]. *Stroke*, 2017, 48 (12): 3336-3346.
- [61] Zhou SM, Zhong ZF, Huang P, et al. IL-6/STAT3 induced neuron apoptosis in hypoxia by downregulating ATF6 expression[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 729925.
- [62] Zhao J, Li WQ, Wang Y, et al. The effect of electroacupuncture on the expression of Sirt1 and STAT3 in hippocampus and amygdala of vascular dementia rats[J]. *Neuroreport*, 2022, 33 (12): 534-542.
- [63] Wu YQ, Jing ZW, Qin XD, et al. Qingnaoyizhi decoction suppresses the formation of glial fibrillary acidic protein-positive cells in cultured neural stem cells by inhibiting the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway[J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 35 (1): 69-76.
- [64] Zhang XY, Jing SS, Qiao O, et al. Cerebralcare granule (R) combined with nimodipine improves cognitive impairment in bilateral carotid artery occlusion rats by reducing lipocalin-2[J]. *Life Sci*, 2021, 286: 120048.
- [65] Gao YH, Ma K, Zhu ZB, et al. Modified Erchen decoction ameliorates cognitive dysfunction in vascular dementia rats via inhibiting JAK2/STAT3 and JNK/BAX signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154797.
- [66] Hu Y, Zhang M, Liu BH, et al. Honokiol prevents chronic cerebral hypoperfusion induced astrocyte A1 polarization to alleviate neurotoxicity by targeting SIRT3-STAT3 axis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 202: 62-75.
- [67] Kim A, Lalonde K, Truesdell A, et al. New avenues for the treatment of Huntington's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (16): 8363.
- [68] Ha AD, Fung VS. Huntington's disease[J]. *Curr Opin Neurol*, 2012, 25 (4): 491-498.
- [69] Labanca F, Ullah H, Khan H, et al. Therapeutic and mechanistic effects of curcumin in Huntington's disease[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2021, 19 (7): 1007-1018.
- [70] Trager U, Magnusson A, Lahiri SN, et al. JAK/STAT signaling in Huntington's disease immune cells[J]. *PLoS Curr*, 2013, 5: ecurrents.hd.5791c897b5c3bebeed93b1d1da0c0648.
- [71] Abjean L, Ben HL, Riquelme-Perez M, et al. Reactive astrocytes promote proteostasis in Huntington's disease through the JAK2-STAT3 pathway[J]. *Brain*, 2023, 146 (1): 149-166.
- [72] Jang M, Lee SE, Cho IH. Adeno-associated viral vector serotype DJ-Mediated overexpression of N171-82Q-mutant huntingtin in the striatum of juvenile mice is a new model for Huntington's Disease[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 157.
- [73] Jang M, Choi JH, Jang DS, et al. Micrandilactone C, a nortriterpenoid isolated from roots of schisandra chinensis, ameliorates Huntington's disease by inhibiting microglial STAT3 pathways[J]. *Cells*, 2023, 12 (5).
- [74] Oh YM, Lee SW, Kim WK, et al. Age-related Huntington's disease progression modeled in directly reprogrammed patient-derived striatal neurons highlights impaired autophagy[J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25 (11): 1420-1433.
- [75] Jen WP, Chen HM, Lin YS, et al. Twist1 plays an anti-apoptotic role in mutant Huntingtin expression striatal progenitor cells[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57 (3): 1688-1703.
- [76] Sayed RH, Ghazy AH, Yammany MFE. Recombinant human erythropoietin and interferon-beta-1b protect against 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats: possible role of JAK/STAT signaling pathway[J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30 (2): 667-681.
- [77] Feldman EL, Goutman SA, Petri S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Lancet*, 2022, 400 (10360): 1363-1380.
- [78] Ohgomori T, Yamasaki R, Takeuchi H, et al. Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Eur J Neurosci*, 2017, 46 (4): 2001-2014.
- [79] Madaro L, Passafaro M, Sala D, et al. Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20 (8): 917-927.
- [80] Milani M, Mammarella E, Rossi S, et al. Targeting S100A4 with niclosamide attenuates inflammatory and profibrotic pathways in models of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18 (1): 132.
- [81] Shibata N, Yamamoto T, Hiroi A, et al. Activation of STAT3 and inhibitory effects of pioglitazone on STAT3 activity in a

- mouse model of SOD1-mutated amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neuropathology*, 2010, 30 (4): 353-360.
- [82] Ohgomori T, Yamasaki R, Kira JI, et al. Upregulation of vesicular glutamate transporter 2 and STAT3 activation in the spinal cord of mice receiving 3, 3'-iminodipropionitrile [J]. *Neurotox Res*, 2018, 33 (4): 768-780.
- [83] Meneses A, Koga S, O' Leary J, et al. TDP-43 pathology in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2021, 16 (1): 84.
- [84] Kato Y, Sakamoto K. Niclosamide affects intracellular TDP-43 distribution in motor neurons, activates mitophagy, and attenuates morphological changes under stress [J]. *J Biosci Bioeng*, 2021, 132 (6): 640-650.
- [85] Correale J, Gaitán MI, Ysraelit MC, et al. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment [J]. *Brain*, 2017, 140 (3): 527-546.
- [86] Seprehnezhad A, Shahbazi A, Bozorgmehr A, et al. STAT3 and NTRK2 genes predicted by the bioinformatics approach may play important roles in the pathogenesis of multiple sclerosis and obsessive-compulsive disorder [J]. *J Pers Med*, 2022, 12 (7): 1043.
- [87] Al-Mazroua HA, Nadeem A, Ansari MA, et al. CCR1 antagonist ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of Th9/Th22-related markers in the brain and periphery [J]. *Mol Immunol*, 2022, 144: 127-137.
- [88] Elbaz EM, Senousy MA, El-Tanbouly DM, et al. Neuroprotective effect of linagliptin against cuprizone-induced demyelination and behavioural dysfunction in mice: a pivotal role of AMPK/SIRT1 and JAK2/STAT3/NF-kappaB signalling pathway modulation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 352: 153-161.
- [89] Alhazzani K, Ahmad SF, Al-Harbi NO, et al. Pharmacological inhibition of STAT3 by statin ameliorates clinical symptoms and reduces autoinflammation in myeloid, lymphoid, and neuronal tissue compartments in relapsing-remitting model of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (7): 925.
- [90] Reiszadeh-Jahromi S, Haddadi M, Mousavi P, et al. Prophylactic effects of cucurbitacin B in the EAE model of multiple sclerosis by adjustment of STAT3/IL-23/IL-17 axis and improvement of neuropsychological symptoms [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37 (8): 2937-2953.
- [91] Yamada T, Sugimoto K. Guggulsterone and its role in chronic diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 929: 329-361.
- [92] Kumar N, Sharma N, Khera R, et al. Guggulsterone ameliorates ethidium bromide-induced experimental model of multiple sclerosis via restoration of behavioral, molecular, neurochemical and morphological alterations in rat brain [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36 (5): 911-925.
- [93] Najafi S, Saadat P, Beladi MN, et al. The effects of mannuronic acid on IL-1beta, IL-17A, STAT1, and STAT3 gene expressions and TLR2 and TLR4 molecules in multiple sclerosis [J]. *J Clin Pharmacol*, 2022, 62 (6): 762-769.
- [94] Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15 (9): 545-558.
- [95] Aqel SI, Yang X, Kraus EE, et al. A STAT3 inhibitor ameliorates CNS autoimmunity by restoring Tef: Treg balance [J]. *JCI Insight*, 2021, 6 (4): e142376.
- [96] Shao ZY, Wang H, Ren HY, et al. The anticancer effect of napabucasin (BBI608), a natural naphthoquinone [J]. *Molecules*, 2023, 28 (15): 5678.
- [97] Chen W, Mook RA, Premont RT, et al. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug [J]. *Cell Signal*, 2018, 41: 89-96.
- [98] Backer V, Sjöbring U, Sonne J, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 trial of inhaled and intranasal niclosamide: a broad spectrum antiviral candidate for treatment of COVID-19 [J]. *Lancet Reg Health Eur*, 2021, 4: 100084.
- [99] Wang XB, Wu KQ, Fang LC, et al. Discovery of N-substituted sulfamoylbenzamide derivatives as novel inhibitors of STAT3 signaling pathway based on niclosamide [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 218: 113362.
- [100] 王珏, 陈佩弦, 何玲, 等. STAT3 在阿尔茨海默病小鼠认知障碍发生发展中的作用及机制研究 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (1): 17-23.
- [101] Varma VR, Desai RJ, Navakkode S, et al. Hydroxychloroquine lowers Alzheimer's disease and related dementias risk and rescues molecular phenotypes related to Alzheimer's disease [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28 (3): 1312-1326.
- [102] Eljaaly K, Alireza KH, Alshehri S, et al. Hydroxychloroquine safety: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Travel Med Infect Dis*, 2020, 36: 101812.
- [103] Ono Y, Saito M, Sakamoto K, et al. C188-9, a specific inhibitor of STAT3 signaling, prevents thermal burn-induced skeletal muscle wasting in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1031906.
- [104] Hu QP, Yan HX, Peng F, et al. Genistein protects epilepsy-induced brain injury through regulating the JAK2/STAT3 and Keap1/Nrf2 signaling pathways in the developing rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912: 174620.
- [105] Wang GR, Chen ZY, Song YY, et al. Xueshuantong injection alleviates cerebral microcirculation disorder in middle cerebral artery occlusion/reperfusion rats by suppressing inflammation via JNK mediated JAK2/STAT3 and NF-κB signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115592.
- [106] Li ZQ, Zhu TT, Xu YN, et al. A novel STAT3 inhibitor, HJC0152, exerts potent antitumor activity in glioblastoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9 (4): 699-713.
- [107] Wang H, Liu Z, Guan LN, et al. LYW-6, a novel cryptotanshinone derived STAT3 targeting inhibitor, suppresses colorectal cancer growth and metastasis [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104661.
- [108] Liu Z, Wang H, Guan L, et al. LL1, a novel and highly selective STAT3 inhibitor, displays anti-colorectal cancer activities in vitro and in vivo [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (2): 298-313.
- [109] Bai LC, Zhou HB, Xu RQ, et al. A potent and selective small-molecule degrader of STAT3 achieves complete tumor regression in vivo [J]. *Cancer Cell*, 2019, 36 (5): 498-511. e417.

(收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-11-28)

STAT3 在阿尔茨海默病小鼠认知障碍发生发展中的作用及机制研究

王珏, 陈佩弦, 何玲, 孙逸* (中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要: **目的** 研究信号传导及转录激活因子 3 (STAT3) 在阿尔茨海默病小鼠认知障碍发生发展中的作用及机制。**方法** 利用 C57BL/6J 小鼠双侧海马脑立体定位注射 β -淀粉样蛋白建立阿尔茨海默病模型, 给予 STAT3 抑制剂氯硝柳胺, 运用动物行为学分析检测、Western blot 分析检测等探究 STAT3 在认知障碍中的作用及机制。**结果** 行为学实验表明, 与模型组小鼠相比, 给药组小鼠的焦虑症状、空间探索能力、物体识别能力和学习记忆能力均得到改善; Western blot 分析结果表明, 给药后小鼠阿尔茨海默病的病理标志物改善, 促炎因子表达下调; 试剂盒分析结果显示给药组小鼠氧化应激相关指标改善; HE 染色结果显示给药组小鼠海马神经元组织形态的改善。**结论** 本研究初步证明了抑制 STAT3 可减轻神经炎症和氧化应激, 从而改善阿尔茨海默病小鼠的认知障碍。

关键词: 阿尔茨海默病; 神经炎症; 信号传导及转录激活因子 3; 氯硝柳胺

中图分类号: R749.16 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0017-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.003

STAT3 inhibitor niclosamide improves the cognitive impairment in mice with Alzheimer's disease and related mechanism

WANG Jue, CHEN Pei-xian, HE Ling, SUN Yi* (School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: Objective To determine the effect and mechanism of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) in the occurrence and development of cognitive impairment in mice with Alzheimer's disease. **Methods** Alzheimer's disease model was established by stereotaxic injection of β -amyloid protein into the bilateral hippocampus of C57BL/6J mice. Then niclosamide, an inhibitor of STAT3 was given. Animal behavior analysis and Western blot were used to determine the effect and mechanism of STAT3 in the cognitive impairment. **Results** The behavior test showed that compared with the model group, the anxiety symptoms, spatial exploration ability, object recognition ability and learning and memory were improved ability in the treatment group. Western blot showed that the pathological markers of Alzheimer's disease were improved and the expression of pro-inflammatory factors was down-regulated. The oxidative stress related indexes of the treatment group were improved by kit analysis. HE staining showed that the histomorphology of the hippocampal neurons in the treatment group was improved. **Conclusion** It is preliminarily proved that inhibition of STAT3 can reduce the neuroinflammation and oxidative stress and improve the cognitive impairment in mice with Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease; neuroinflammation; signal transducer and activator of transcription 3; niclosamide

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No. 81703520); 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目 (No. 2019BFG02017); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目成果 (No. 202310316044Y)。

作者简介: 王珏, 男, 硕士研究生, 主要从事神经退行性疾病病理机制研究及药物靶点的发现研究, email: 1053887045@qq.com

***通信作者:** 孙逸, 女, 博士, 讲师, 主要从事神经退行性疾病病理机制研究及药物靶点的发现研究, email: bio_lunar@163.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种慢性神经退行性疾病, 是老年痴呆症的主要病因, 其临床特征是以记忆力减退为常见症状的进行性认知障碍^[1]。《世界阿尔茨海默病报告》指出, 目前全球范围内的 AD 患者约有 5000 万名, 预计到 2060 年, 将增长到 1.38 亿^[2]。AD 的两个主要组织病理学标志物是细胞内的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 和细胞外的 β -淀粉样蛋白斑块沉积 (β -amyloid protein plaque, SP), 分别由过度磷酸化的 Tau (microtubule-associated protein tau, Tau) 蛋白和 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 组成^[3]。但是, 基于清除 A β 或降低过度磷酸化的 Tau 蛋白的药物开发策略屡次失败^[4]。

随着实验技术的提高, 在对 A β 假说进行修正和深入研究的同时, 新的致病假说也不断被提出, 其中颅内神经炎症已经被确定为 AD 的关键驱动因素^[5]。流行病学研究显示, 使用非甾体抗炎药可预防或减缓 AD 的进程^[6]。AD 患者脑组织和脑脊液中包含多种促炎介质, 脑内淀粉样斑块周围激活的胶质细胞增多^[7]。近期的研究发现, 信号传导及转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription, STAT3) 是炎症信号的重要调节因子^[8]。AD 模型病理过程和 AD 患者脑中也检测到了活化形式的 STAT3 上调^[9]。STAT3 表达上升伴随着小胶质细胞的活化和星形胶质细胞的激活和增殖, 这些反应加剧了脑内的神经炎症, 使脑内的病理环境进一步恶化, 形成恶性循环, 导致患者的认知和学习能力进一步降低^[8]。STAT3 的抑制或许可以成为改善 AD 症状的新途径。

氯硝柳胺 (niclosamide, NIC) 是 WHO 批准的首选灭螺药, 已在临床应用 50 余年^[10], 主要通过影响细胞线粒体、溶酶体以及乳酸脱氢酶等多种细胞酶的活性, 参与细胞的氧化磷酸化, 引起细胞凋亡和自噬性死亡^[11-12]。氯硝柳胺是公认的 STAT3 抑制剂, 可抑制巨噬细胞诱导的炎症反应, 在治疗肿瘤、细菌病毒感染、糖尿病、心血管系统疾病、神经退行性疾病等方面具有潜在的应用效果^[13]。因此, 本研究拟以氯硝柳胺为工具药, 探讨 STAT3 在 AD 小鼠认知障碍发生发展中的作用和机制。

1 材料

旷场实验视频分析系统、新物体识别视频分析系统、Y 迷宫、穿梭实验视频分析系统 (北京众实迪创科技有限公司); Morris 水迷宫 (上海吉量软件科技有限公司); ANY-maze 动物行为分析系统 (美国 Stoelting 公司); 脑立体定位仪及适

配器、动物颅骨钻 (成都泰盟科技); 微量注射泵 (保定兰格恒流泵); 分析天平 (上海舜宇恒平科学仪器); 涡旋混合器 (海门市其林贝尔仪器制造); KD-160 型电子秤 (TANITA 公司); 手持组织匀浆器 (宁波新芝生物科技); 台式高速冷冻离心机 (长沙湘仪); 恒温孵箱 (德国 Heraeus); 酶标仪 (深圳雷杜生命科学); 恒温磁力搅拌器 (江苏省金坛市荣华仪器); PHS-25 pH 计 (上海仪电科学仪器); 掌上离心机 (大龙兴创实验仪器); Mini-PROTEAN Tetra 手灌胶系统、Mini-PROTEAN Tetra 电泳和转印系统 (Bio-Rad); 全自动化学发光成像分析系统 (上海天能); 水平摇床 (海门市其林贝尔仪器); 切片扫描仪 (滨松); 冰冻切片机 (Leica)。

β -淀粉样蛋白₁₋₄₂ (A β ₁₋₄₂) 粉末 (Sigma-Aldrich); 单克隆抗体 A β 、Tau 和 P-Tau (Ser396) (Santa Cruz), PSD95、 β -actin、白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α (Proteintech), STAT3、P-STAT3 (Tyr705)、HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 (Proteintech); SOD、MDA 检测试剂盒 (南京建成); GSH 试剂盒 (Boxbio); ECL 试剂盒 (上海雅酶); HE 染色试剂盒 (Solarbio)。氯硝柳胺 (MedChemExpress, 批号: 15718)。

2 方法

2.1 实验动物及分组

8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 体重 22 ~ 25 g [上海必凯科翼生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2018-0006]。饲料和垫料来自中国药科大学江宁校区药理学动物实验中心, 温度 22 ~ 25 °C, 相对湿度 50% ~ 70%, 自然光线, 自由饮水和进食。小鼠先适应性喂养 7 d, 再进行后续具体实验。

36 只 C57BL/6J 雄性小鼠按体重随机分为 3 组, 每组 12 只, 分别为模型组 (model)、氯硝柳胺给药组 [NIC, 25 mg/(kg·d)^[14]]、对照组 (control)。模型组和给药组在适应性饲养结束后进行双侧海马注射 A β 溶液, 对照组注射相同体积的生理盐水。给药组灌胃给予氯硝柳胺溶液 (溶媒为 1% DMSO、4% 聚乙二醇、95% 生理盐水), 剂量为 25 mg/(kg·d)^[14], 持续 7 d, 对照组和模型组灌胃相同体积的溶媒。

2.2 小鼠 AD 模型的建立

2.2.1 A β ₁₋₄₂ 溶液的配制 将冻存的 A β ₁₋₄₂ 粉末从冰箱中取出, 梯度升温至室温, 加入适量生理盐水溶解并超声 10 min, 使其终浓度为 82 pmol· μ L⁻¹, 37 °C 孵育 7 d。之后分装老化好的 A β ₁₋₄₂ 寡聚体, 于 -20 °C 冰箱中冻存备用。

2.2.2 小鼠双侧海马脑立体定位注射 $A\beta$ 剪除小鼠后眼角到两耳间的毛发, 使用 75% 乙醇消毒表皮后剪开头皮暴露颅骨, 棉签蘸取少量 30% 过氧化氢溶液擦拭创面, 使得颅骨缝清晰可见。定位坐标由小鼠脑立体定位图谱确定, 使用小动物颅骨钻钻穿颅骨; 将打孔后的小鼠于脑立体定位仪上固定, 微量进样器与小鼠颅骨钻孔平面垂直, 缓慢匀速进针。使用自动进样泵缓慢匀速推入 5 μ L 生理盐水或 $A\beta_{1-42}$ 溶液。结束注射后留针 90 s, 再缓慢完成出针; 注射完成后, 缝合头皮, 消毒创口。

2.3 行为学实验方法

2.3.1 旷场实验 将小鼠活动区域 (50 cm \times 50 cm \times 40 cm 的敞口箱体) 划分为中央区域和四周区域, 将小鼠置于旷场装置中央, 记录 5 min 内小鼠自由探索活动轨迹, 评价指标为活动距离和中央区停留时间。

2.3.2 新物体识别实验 实验分为适应日、训练日和测试日。第 1 日为适应日, 将小鼠放入未放置物体的敞口箱中令其自由活动 10 min 以减少环境压力。第 2 日为训练日, 在敞口箱内放置两个相同物体, 置入小鼠令其探索 5 min。第 3 日为测试日, 与第 2 日过程相同, 只是将其中一个物体替换成不同的物体。记录测试日小鼠对两个物体的探索时间, 即对旧物体探索时间 (familiar) 和对新物体探索时间 (novel), 可由此计算偏好指数 = novel / (familiar + novel), 评价小鼠对新物体的好奇程度, 大于 0.5 则视为小鼠更乐于探索新物体。

2.3.3 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫实验周期为 6 d, 分为空间记忆采集实验和空间搜索实验。空间记忆采集实验: 每只小鼠依次从四个入水点背对池壁置入水池, 每次时间为 90 s, 全程录像并记录游泳轨迹; 若小鼠成功站上台面超过 10 s 则自动停止采集, 并将第一次碰到台面的时间记为潜伏期。如在 90 s 内未成功登上台面 10 s, 则需人为牵引小鼠至平台并使其在平台逗留 30 s, 此时潜伏期记为 90 s。平台低于水面 1 cm 为不可见平台。空间探索实验: 第 6 日撤去平台, 选取目标象限对角象限的入水点将小鼠置于水中, 每只小鼠均需完成 90 s 的游泳并全程记录轨迹。

2.4 Western blot 实验

将从小鼠海马和皮层获得的组织放在含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液中。按照试剂盒说明书从新鲜组织中提取细胞蛋白质和核蛋白。蛋白样品用 SDS-PAGE 凝胶分离, 转移到 PVDF 膜上。用封闭液在室温下封闭 3 h, 并与单克隆抗体 $A\beta_{1-42}$, Tau 和 P-Tau (Ser396), PSD95, β -actin, IL-1 β , TNF- α , STAT3, P-STAT3 (Tyr705)

孵育过夜, 然后将膜与 HRP 的山羊抗兔抗体和抗小鼠 IgG 抗体分别在室温下孵育 60 min。使用 ECL 试剂盒曝光蛋白质条带, 并使用化学发光检测系统扫描。通过灰度分析 (ImageJ 软件) 定量相对蛋白表达水平, 并使用 β -actin 灰度进行归一化分析。

2.5 血清 SOD、GSH 和 MDA 水平检测

每只小鼠眼眶取血, 置于 1.5 mL 离心管中, 室温条件静置 30 min 后, 3000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min 获得血清, 根据相应试剂盒操作说明书分别测定 SOD、MDA 和 GSH 含量。

2.6 苏木精-伊红染色法 (HE 染色)

新鲜取材, 经固定、石蜡包埋, 切片 5 μ m。苏木素染液染色 2 ~ 20 min, 蒸馏水洗去浮色。分化液分化 10 ~ 60 s, 纯水滴加或浸洗 2 次, 每次 3 ~ 5 min。置伊红染液 60 s, 倾去多余染色液后快速脱水。经透明和封片后用扫描仪观察。

2.7 数据分析

Western blot 结果采用 ImageJ 软件进行灰度值分析, 所有实验数据经 GraphPad Prism 7.0 软件分析后以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SEM) 表示, 进行单因素方差分析和多重比较检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计结果采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图。

3 结果

3.1 抑制 STAT3 改善 AD 小鼠认知功能障碍

3.1.1 抑制 STAT3 对 AD 小鼠自发活动和探索能力的影响 如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠的总活动距离无显著性差异 ($P > 0.05$), 但中央区停留时间显著减少 ($P < 0.001$), 表明小鼠呈现明显的焦虑情绪, 且空间探索欲望能力显著降低。与模型组相比, 氯硝柳胺给药组小鼠的中央区停留时间显著增加 ($P < 0.01$)。以上研究表明抑制 STAT3 可以显著改善 AD 小鼠的焦虑症状, 提高其空间探索能力。

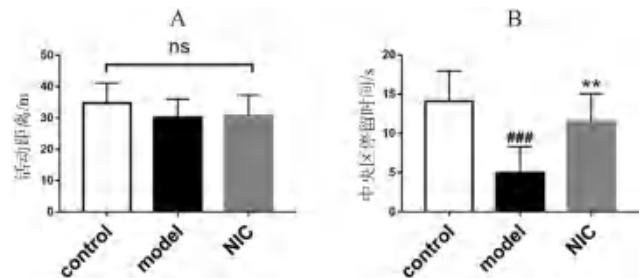


图 1 抑制 STAT3 对旷场实验中 AD 小鼠的自发活动和探索能力的影响
Fig 1 Effect of STAT3 inhibition on spontaneous activity and exploratory ability of mice with Alzheimer's disease in open field experiment

注 (Note): vs the model group, ** $P < 0.01$; vs the control group, ### $P < 0.001$ 。

3.1.2 抑制 STAT3 对新物体识别实验中识别记忆能力的影响 如图 2A 所示, 与对照组相比, 模型

组小鼠对旧物体的探索时间显著增多 ($P < 0.01$), 对新物体的探索时间显著减少 ($P < 0.01$)。同时如图 2B 所示, 模型组小鼠对新物体的识别指数显著降低 ($P < 0.01$), 表明 AD 模型小鼠存在物体识别记忆能力缺陷。与模型组相比, 氯硝柳胺给药组小鼠的新物体识别指数显著增高 ($P < 0.01$), 以上研究表明抑制 STAT3 可以显著改善 AD 小鼠的物体识别和记忆能力。

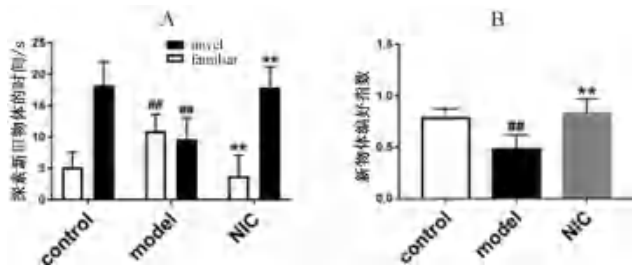


图 2 抑制 STAT3 对新物体识别实验中识别记忆能力的影响
Fig 2 Effect of STAT3 inhibition on recognition and memory ability in New object recognition experiment

注 (Note): vs the model group, ** $P < 0.01$; vs the control group, ### $P < 0.001$ 。

3.1.3 抑制 STAT3 对小鼠空间学习记忆能力的影响 Morris 水迷宫的第 1 ~ 5 日为不可见平台训练期。如图 3A 所示, 在共计 5 d 的定位航行实验中, 各组小鼠游泳速度无显著差异 ($P > 0.05$), 说明各组小鼠的视力和游泳能力基本一致。图 3B 结果显示, 定位航行 1 ~ 5 d 各组小鼠逃避潜伏期随着训练时间的增加而呈现不同程度的缩短。与同时期对照组小鼠相比, 模型组小鼠潜伏期显著升高 ($P < 0.01$), 而氯硝柳胺给药组小鼠的逃避潜伏期相对于模型组显著降低 ($P < 0.01$), 说明模型组小鼠存在明显的空间学习记忆障碍, 且与 STAT3 的激活相关, 抑制 STAT3 后可在一定程度上改善 AD 小鼠的空间学习记忆障碍。

水迷宫实验第 6 日, 通过穿台次数以及目标象限停留时间考察了各组小鼠的空间记忆能力, 结果如图 3C 及 3D 所示。与对照组相比, 模型组小鼠的穿台次数和目标象限停留时间显著减少 ($P < 0.001$), 表明模型组小鼠出现了明显的空间记忆损害。与模型组相比, 氯硝柳胺给药组小鼠穿台次数和目标象限停留时间均显著增加 ($P < 0.01, P < 0.001$), 说明抑制 STAT3 后可在一定程度上改善 AD 小鼠的空间记忆能力。

3.1.4 抑制 STAT3 对 AD 小鼠皮层和海马区中病理及功能性蛋白表达影响 如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠海马和皮层中 $A\beta_{1-42}$ 和 P-Tau 的表达水平显著升高 ($P < 0.01, P < 0.001$), 而

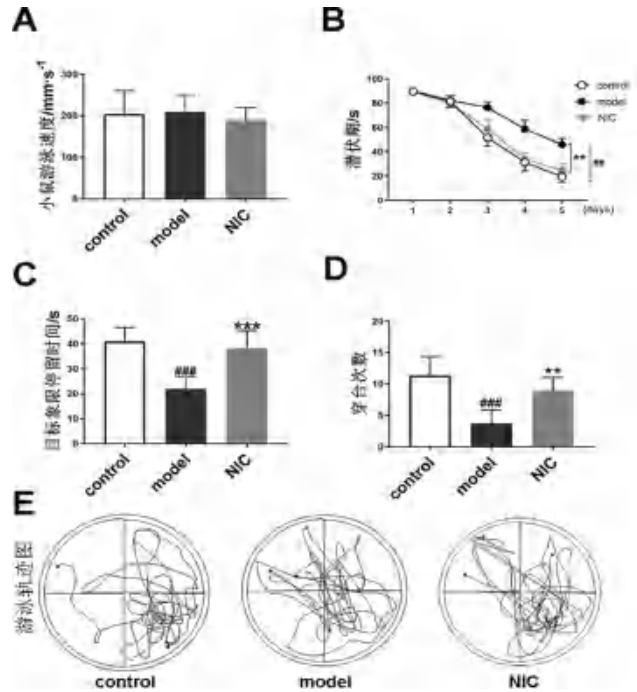


图 3 抑制 STAT3 对 Morris 水迷宫实验中空间学习记忆能力的影响
Fig 3 Effect of STAT3 inhibition on spatial learning and memory in Morris water maze test

注 (Note): vs the model group, ** $P < 0.01, ***P < 0.001$; vs the control group, ### $P < 0.01, ###P < 0.001$ 。

PSD95 表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 氯硝柳胺给药组小鼠海马和皮层中的 P-Tau 和 $A\beta_{1-42}$ 表达量显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 PSD95 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。结果提示 AD 的发生与 STAT3 的激活有关, 且抑制 STAT3 能改善 AD 病理标志物的表达和神经元的损伤。

3.2 抑制 STAT3 减轻 AD 小鼠神经炎症

如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠海马和皮层中 P-STAT3、IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平显著升高 ($P < 0.01, P < 0.001$), 而 STAT3 的表达水平没有显著差异 ($P > 0.05$), 表明 STAT3 在 Tyr705 的磷酸化水平显著提高, STAT3 被激活后炎症因子水平显著提高则表明神经炎症发生发展。与模型组相比, 氯硝柳胺给药组小鼠海马和皮层中的 P-STAT3、IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明 STAT3 在 Tyr705 位点的磷酸化水平显著降低, STAT3 被抑制后炎症因子水平显著降低则表明神经炎症的发生发展被抑制。结果提示神经炎症的发生发展与 STAT3 的激活有关, 且抑制 STAT3 能减轻神经炎症, 最终改善 AD 小鼠的认知障碍。

3.3 抑制 STAT3 减轻 AD 小鼠氧化应激

如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠血清中 GSH 和 SOD 含量均显著降低, MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 氯硝柳胺

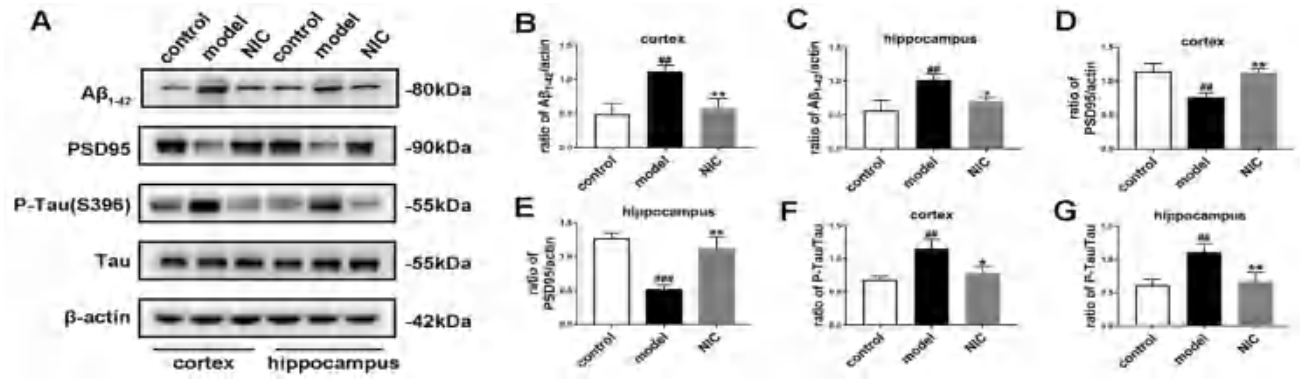


图 4 抑制 STAT3 对阿尔茨海默病小鼠皮层和海马区中病理及功能性蛋白表达影响

Fig 4 Effect of STAT3 inhibition on pathological and functional protein expression in cortex and hippocampus of mice with Alzheimer's disease

注 (Note): 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对照组比较, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (vs the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs the control group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

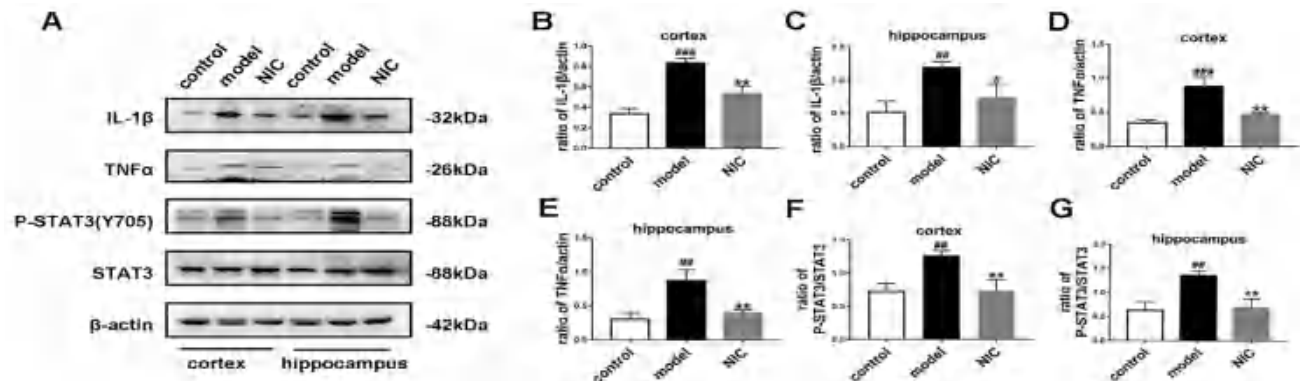


图 5 抑制 STAT3 对阿尔茨海默病小鼠皮层和海马区中炎症因子表达的影响

Fig 5 Effect of STAT3 inhibition on the expression of inflammatory factors in cortex and hippocampus of mice with Alzheimer's disease

注 (Note): 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对照组比较, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (vs the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs the control group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

给药组小鼠血清中 GSH 和 SOD 含量均显著升高, MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。结果显示抑制

STAT3 能够增加小鼠体内抗氧化物质的产生。

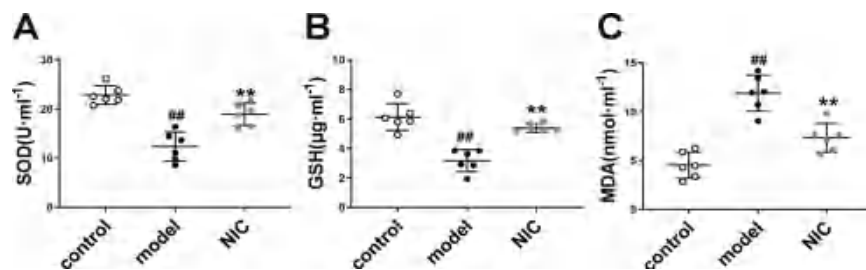


图 6 抑制 STAT3 对阿尔茨海默病小鼠血清中氧化应激相关因子表达的影响

Fig 6 Effect of STAT3 inhibition on the expression of oxidative stress related factors in serum of mice with Alzheimer's disease

注 (Note): vs the model group, ** $P < 0.01$; vs the control group, ## $P < 0.01$ 。

3.4 抑制 STAT3 治疗 AD 小鼠脑结构损伤且抑制剂氯硝柳胺无明显毒性

AD 患者的海马神经元结构会随着疾病发展出现不同程度的损伤, 而病理组织切片可以观察到这一现象^[15]。图 7A 显示, 模型组小鼠海马细胞数量减少, 并出现形态学损伤, 但氯硝柳胺给药组细胞数量和形态均有不同程度恢复。给药后锥体细胞排

列整齐结构完整, 细胞无明显肿胀以及数量增加。这表明抑制 STAT3 会改善海马神经结构受损。另外图 7D 显示, 氯硝柳胺给药 7 d 对小鼠的心、肝、肺、脾、肾的正常组织结构无明显影响, 说明其安全性较好。

4 讨论

现代社会, 随着人口老龄化的增加以及人们

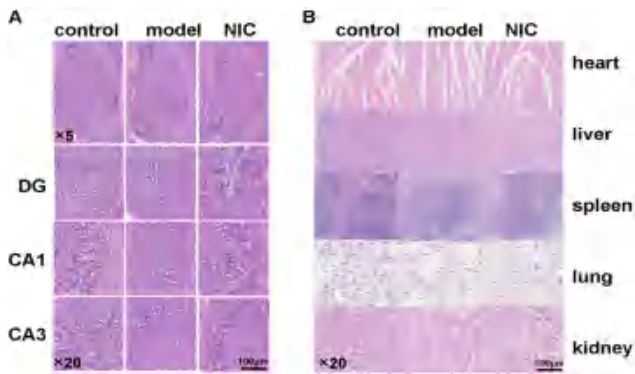


图 7 抑制 STAT3 对改善小鼠脑结构的作用及毒性

Fig 7 Effect of STAT3 inhibition on improving brain structure and biocompatibility in mice

注 (Note): 小鼠大脑海马区全景放大倍数为 $\times 5$; 海马齿状回脑区, 海马脑区 CA1 和 CA3 放大倍数为 $\times 20$; 心肝脾肺肾放大倍数为 $\times 20$ (The panoramic magnification of the hippocampal region of the mouse brain is $\times 5$, and the magnification of the dentate gyrus, CA1 and CA3 brain region is $\times 20$, and the magnification of the heart, spleen, lung and kidney is $\times 20$).

生活水平的提高, AD 发病率日益升高^[2]。由于认知功能障碍发生的生理机制复杂, 寻求多靶点治疗方案具有相当重要的意义。既往研究着眼于 SP 和 Tau 蛋白过度磷酸化两大假说, 但接连面临的难关驱使人们寻求更新的治疗靶点^[16]。神经炎症被证明在 AD 发生发展过程中起到重要作用, 同时有研究表明 STAT3 通路的激活显著加剧胶质细胞介导的神经炎症^[17]。这提示以 STAT3 通路为靶点的药物可能对 AD 有改善作用。STAT3 通路的重要作用在于其影响胶质细胞分裂及活化的能力, 小胶质细胞的过度激活和星形胶质细胞的反应性增生都会加剧颅内神经炎症, 使得疾病进一步恶化^[18]。STAT3 的主要激活过程是胞外信号刺激受体使得偶联的 JAKs 磷酸化, 激活的 JAKs 招募游离的非活性 STAT3 并使其磷酸化, 磷酸化后的 STAT3 经二聚化后转移至细胞核发挥作用^[19]。抑制 STAT3 磷酸化能缓解神经炎症, 对神经细胞起到保护作用, 这在神经疾病研究领域是一个有希望的方向, 但报道尚少见^[20]。

本实验选取的工具药氯硝柳胺是临床上常用于治疗肠道寄生虫病的小分子化学药物, 近年来研究表明其具有相当的安全性、良好的血脑屏障穿透能力以及非糖蛋白 P 底物的特性, 且具有突出的抗炎能力, 这让氯硝柳胺在帕金森病^[21]、肌萎缩侧索硬化^[20]、脑缺血^[14]等中枢神经疾病领域展现出不俗的治疗潜力^[22], 但在 AD 中鲜有应用。此外有报道氯硝柳胺是通过抑制 STAT3 来控制胶质细胞的过度激活, 延缓神经炎症的发生, 促进神经修复^[20]。因此, 本文采用双侧海马立体

定位注射 $A\beta_{1-42}$ 建立 AD 模型小鼠, 给予 STAT3 抑制剂氯硝柳胺, 探讨 STAT3 在认知障碍发生发展中的作用。

首先, 在旷场实验中, 可以观察到抑制 STAT3 能提高 AD 小鼠中央区停留时间, 这符合正常小鼠探索空旷地带的天性, 表明小鼠的焦虑症状和空间探索能力都有所改善; 在新物体识别实验中, 观察到抑制 STAT3 能让 AD 小鼠对新物体的探索次数增加, 这提示小鼠的识别能力和记忆能力都有所恢复; 在 Morris 水迷宫实验中, 抑制 STAT3 能降低训练期 AD 小鼠的逃避潜伏期, 提高测试期 AD 小鼠的目标象限停留时间和穿台次数, 这说明小鼠空间记忆能力的改善。通过动物行为学实验初步证明了抑制 STAT3 能改善 AD 小鼠的学习记忆能力。

AD 的发生发展主要累及脑组织中的海马及皮层区域, 形成神经原纤维缠结和 $A\beta$ 斑块, 造成神经元损伤, 突触丢失和功能下降, 进而引起认知记忆障碍^[23]。PSD95 是一种支架蛋白, 该蛋白的表达水平可以用来衡量突触的数量以及功能^[24]。通过对各组小鼠皮层及海马区组织的分析检测我们发现抑制 STAT3 能降低 $A\beta_{1-42}$ 和 P-Tau 的表达水平, 提高 PSD95 的表达水平, 这初步证明了抑制 STAT3 能从蛋白分子层面降低 AD 小鼠的病理标志物, 改善突触功能。

与神经炎症密切相关的多种细胞参与了 AD 的发展, 包括小胶质细胞、星形胶质细胞和一些外周炎症细胞, IL- 1β 和 TNF- α 是由这些细胞分泌的炎症因子^[25]。近年来研究发现, STAT3 信号通路与神经疾病病理状态下胶质细胞的激活和分裂密切相关, 是影响胶质细胞介导神经炎症的关键因素^[26]。因此我们进一步利用 Western blot 对各组小鼠皮层及海马组织中 IL- 1β 、TNF- α 进行检测分析。结果表明, 抑制 STAT3 能使这两种炎症指标下调, 这表明抑制 STAT3 能减轻 AD 小鼠海马和皮层的神经炎症。

AD 患者脑组织由于长期处于 $A\beta$ 斑块等的刺激, 氧化应激诱导物质 ROS 在 AD 发病过程中会显著增多并因此激活抗氧化系统^[27]。内源性抗氧化物是抗氧化系统重要的一环, 其中 SOD 是其中重要的酶类抗氧化物; MDA 是体内脂质过氧化的产物, 其含量能反映体内氧化应激水平; GSH 是重要的抗氧化剂, 其随着年龄增加出现全身性的表达下调, 在 AD 中该变化更为显著^[27]。在临床治疗中, 血液指标的变化也可以作为 AD 病症发展程度的参考依据^[28]。因此我们利用试剂盒对各组小鼠血清进行了检测分析。结果表明, 抑制 STAT3 能降低 MDA 的表达, 并且提高 SOD

和 GSH 的表达, 这提示抑制 STAT3 能减轻 AD 小鼠体内的氧化应激水平。

以上实验结合组织切片结果证明, 抑制 STAT3 蛋白的磷酸化, 可使 STAT3 蛋白激活受阻, 减缓神经炎症反应和氧化应激反应的发生, 保护神经细胞, 最终改善 AD 小鼠的认知障碍, 但是深入的机制还需要后续进一步的探索以及验证。目前关于通过抑制 JAK-STAT3 通路从而延缓 AD 病情进展的研究较少, 并且临床上也没有类似的药物。本研究表明 STAT3 有可能成为药物开发的新靶点, 并为 AD 的药物研发以及在临床上的应用提供新的思路。

参考文献

- [1] Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231-255.
- [2] 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19 (4): 1598-1695.
- [3] Prince M, Bryce R, Albanese E, et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 9 (1): 63-75. e2.
- [4] Morris GP, Clark IA, Vissel B. Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 136 (5): 663-689.
- [5] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17 (3): 157-172.
- [6] McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies [J]. *Neurobiol Aging*, 2023, 28 (5): 639-647.
- [7] Benarroch EE. Microglia: multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury [J]. *Neurology*, 2013, 81 (12): 1079-1088.
- [8] Xu ZC, Xue T, Zhang ZX, et al. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36 (12): 2208-2215.
- [9] Reichenbach N, Delekate A, Plescher M, et al. Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11 (2): e9665.
- [10] Chen W, Mook RA, Premont RT, et al. Niclosamide: beyond an antihelminthic drug [J]. *Cell Signal*, 2018, 41: 89-96.
- [11] Wang Z, Ren JY, Du JX, et al. Niclosamide as a promising therapeutic player in human cancer and other diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (24): 16116.
- [12] 《氯硝柳胺及其应用》出版 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2022, 34 (3): 299.
- [13] Misra SK, Jensen TW, Pan D. Enriched inhibition of cancer and stem-like cancer cells via STAT-3 modulating niclocelles [J]. *Nanoscale*, 2015, 7 (16): 7127-7132.
- [14] Pan XF, Song YM, He MJ, et al. Mitochondrial uncouplers confer protection by activating AMP-activated protein kinase to inhibit neuroinflammation following intracerebral hemorrhage [J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43 (8): 1210-1219.
- [15] Mu YL, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6: 85.
- [16] Jack CRJ, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14 (4): 535-562.
- [17] Serrano A, Apolloni S, Rossi S, et al. The S100A4 transcriptional inhibitor niclosamide reduces pro-inflammatory and migratory phenotypes of microglia: implications for amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Cells*, 2019, 8 (10): 1261.
- [18] Ben Haim L, Ceyzériat K, Carrillo-de Sauvage MA, et al. The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases [J]. *J Neurosci*, 2015, 35 (6): 2817-2829.
- [19] Luo W, Li YX, Jiang LJ, et al. Targeting JAK-STAT signaling to control cytokine release syndrome in COVID-19 [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41 (8): 531-543.
- [20] Natarajan R, Singal V, Benes R, et al. STAT3 modulation to enhance motor neuron differentiation in human neural stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e100405.
- [21] Barini E, Miccoli A, Tinarelli F, et al. The anthelmintic drug niclosamide and its analogues activate the Parkinson's disease associated protein kinase PINK1 [J]. *Chem Biochem*, 2018, 19 (5): 425-429.
- [22] Apolloni S, D' Ambrosi N. Repurposing niclosamide for the treatment of neurological disorders [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18 (12): 2705-2706.
- [23] Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18 (11): 1106-1125.
- [24] Coley AA, Gao WJ. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 82: 187-194.
- [25] Hong XY, Wan HL, Li T, et al. STAT3 ameliorates cognitive deficits by positively regulating the expression of NMDARs in a mouse model of FTDP-17 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 295.
- [26] Mehla J, Singh I, Diwan D, et al. STAT3 inhibitor mitigates cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques while improving cognitive functions and brain networks [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9 (1): 193.
- [27] Praticò D, Delanty N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease [J]. *Am J Med*, 2000, 109 (7): 577-585.
- [28] Varma VR, Oommen AM, Varma S, et al. Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: a targeted metabolomics study [J]. *PLoS Med*, 2018, 15 (1): e1002482.

(收稿日期: 2023-07-03; 修回日期: 2023-08-15)

营养药学在肿瘤患者治疗中的临床实践专题

【编者按】

营养药学一方面用药学理论研究营养素在体内的效应和代谢过程；另一方面研究营养素和药物相互作用及营养素的药理作用机制等。临床实践中营养药学可以研究营养状态对药物代谢动力学和药效学的影响，不同疾病（状态）肠内营养制剂和肠外营养组方的选择和优化，治疗药物与营养药物相互作用，肠外与肠内营养制剂和其他药物混合后的稳定性，肠外肠内营养疗法中的用药安全监护及药物经济学评价等。恶性肿瘤患者常发生一系列代谢变化，肿瘤本身、放化疗均可能影响营养素的吸收，不同营养制剂对营养支持治疗有效性也存在差异，本专栏从肿瘤患者营养制剂选择、营养状态对化疗药物代谢影响等临床实践研究出发，旨在为营养支持药师提供临床药学研究的思路。

【专题主持人简介】



秦侃，安徽医科大学第三附属医院（合肥市第一人民医院）主任药师，硕士研究生导师，临床药理学学科带头人。中华医学会肠外肠内营养学分会药理学协作组副组长、NUSOC 协作组委员；中国抗癌协会肿瘤营养专业委员会委员；安徽省药学会临床营养药专业委员会主任委员；安徽省医学会肠外肠内营养学分会副主任委员兼药理学组组长。主要从事药事管理及外科系统的临床药学工作，研究方向为肠外肠内营养支持、抗感染药物合理应用及药物警戒等。发表论文 80 多篇，主编专著 3 部，参编 5 部；主持安徽省科技厅年度重点科研项目 2 项，合肥市科技局科研项目 5 项；负责国家科技部科技支撑项目子课题 4 项；参与国家自然科学基金项目 1 项；获合肥市政府科技进步奖 4 项，省级科研成果证书 5 项。

多种油脂肪乳对癌症患者术后非特异性炎症、肝肾功能和营养状态的影响

王小芊^{1, 2}, 秦侃^{1, 2*} (1. 安徽医科大学药学院, 合肥 230061; 2. 安徽医科大学第三附属医院药学部, 合肥 230061)

摘要: **目的** 探讨多种油脂肪乳 (SMOF) 对癌症患者术后非特异性炎症、肝肾功能和营养状态的影响, 指导临床合理应用。 **方法** 回顾性纳入某院 2020 年 1 月 1 日至 2023 年 5 月 31 日使用 SMOF 和中长链脂肪乳 (MCT/LCT) 的患者, 根据脂肪乳剂的种类分为 SMOF 组 (试验组, $n = 47$) 和 MCT/LCT 组 (对照组, $n = 79$), 记录两组患者非特异性炎症、肝肾功能和营养指标的变化。 **结果** 重复测量方差分析结果显示, 在不限年龄的癌症组中, 两组患者的 CRP、WBC、TBIL、TP 的时间效应和组间效应差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ALB 的时间效应差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 试验组治疗后 7 日 CRP 水平低于对照组, 治疗后 3 日和治疗后 7 日 WBC 水平低于对照组, TBIL 上升的幅度小于对照组, TP 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其他指标差异无统计学意义。在老年癌症组中, 两组患者的 CRP、WBC、TBIL、TP 的时间效应和组间效应差异显著 ($P < 0.05$), ALB 的时间效应差异显著 ($P < 0.05$); 试验组治疗后 3 日和治疗后 7 日 CRP、WBC 水平低于对照组, TP 水平显著高于对照组; 试验组治疗后 3 日 TBIL 上升的幅度小于对照组 ($P < 0.05$), 其他指标差异无统计学意义。 **结论** 与 MCT/LCT 相比, SMOF 应用于癌症患者术后包括老年癌症患者术后均有减轻炎症反应、保护患者肝脏功能和改善患者营养状态的作用, 并且安全, 在营养治疗方面有优势。

关键词: 多种油脂肪乳; 癌症; 非特异性炎症; 肾功能; 营养状态

中图分类号: R730.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0024-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.004

基金项目: 2021 年安徽省医疗卫生重点专科建设项目 (皖卫函 [2021]273 号)。

作者简介: 王小芊, 女, 硕士, 主要从事临床药学研究, email: wangxiaqianan@163.com *通信作者: 秦侃, 男, 硕士研究生导师, 主任药师, 主要从事临床药学研究, email: qinkan99@163.com

Effect of multi-oil fat emulsion injection on non-specific inflammation, liver and kidney function and nutritional status in cancer patients

WANG Xiao-qian^{1,2}, QIN Kan^{1,2*} (1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230061; 2. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061)

Abstract: Objective To determine the effect of multi-oil fat emulsion injection (SMOF) on the non-specific inflammation, liver and kidney function and nutritional status in cancer patients after the surgery. **Methods** Patients who received SMOF and medium and long chain fat emulsion injection (MCT/LCT) from January 1st 2020 to 31st May 2023 were classified into a SMOF (the test group, $n = 47$) and a MCT/LCT group (the control group, $n = 79$) according to the type of fat emulsion, and recorded changes in non-specific inflammation, liver and kidney function, and nutritional indicators in both groups. **Results** Repeated measurement of analysis of variance (ANOVA) showed that in the non-age-limited cancer group, the time effect and intergroup effect differences in C-reactive protein (CRP), white blood cell count (WBC), total bilirubin (TBIL) and total protein (TP) of patients in both groups were significant ($P < 0.05$). The time effect difference in ALB was significant ($P < 0.05$). The CRP level of the test group was lower than that of the control group 7 days after the treatment, the WBC level 3 days and 7 days after the treatment was lower than that of the control group, the increase in TBIL was less than in the control group, and the TP level was higher than that of the control group ($P < 0.05$). The difference in other indicators was not significant. In the elderly cancer group, the time effect and intergroup differences in CRP, WBC, TBIL and TP of both groups of patients were significant ($P < 0.05$), and the time effect difference in ALB was significant ($P < 0.05$). The CRP and WBC levels of the experimental group were lower than those of the control group 3 days and 7 days after the treatment, and the TP levels was significantly higher than that of the control group. The increase in TBIL 3 days after the treatment in the experimental group was less than that of the control group ($P < 0.05$), and the differences in other indicators were not significant. **Conclusion** Compared with MCT/LCT, SMOF used for cancer patients after the surgery, including in elderly cancer patients, can reduce the inflammatory responses, protect patients' liver function and improve patients' nutritional status safely.

Key words: multi-oil fat emulsion injection; cancer; non-specific inflammation; liver and kidney function; nutritional status

癌症是全球主要死亡原因之一，根据国际癌症研究中心报告，2020 年全球新增癌症患者约为 1930 万例，因癌症死亡人数近 1000 万例，是全球健康负担的主要构成部分之一^[1]。癌症患者常常伴有营养不良，且术后容易产生炎症反应，严重时可致死亡，因此术后给予肠外营养为主的营养支持治疗非常重要^[2]。多种油脂肪乳（SMOF）作为第四代脂肪乳剂，主要成分包含大豆油、椰子油、橄榄油、鱼油以及维生素 E。其在配方上降低了大豆油比例，同时添加了鱼油，符合世界卫生组织对 ω -6/ ω -3 比值为 2.5 : 1 的推荐比例要求^[3]。研究表明，SMOF 能显著改善围术期、肿瘤、老年等存在肝功能不全的患者氧化应激及过

度炎症反应，调节免疫功能，从而改善患者的肝脏功能、减少感染并发症、缩短住院时间等^[4-5]。本研究通过分析患者应用 SMOF 和中长链脂肪乳（MCT/LCT）治疗前后的非特异性炎症、肝肾功能及营养状态指标的变化，分析 SMOF 在癌症患者中应用的特点，指导临床应用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集本院自 2020 年 1 月 1 日至 2023 年 5 月 31 日使用 SMOF（试验组）和 MCT/LCT（对照组）的患者病例，纳入标准：① 年龄 18 ~ 85 岁；② 患者术后 NRS2002 ≥ 3 分，且至少连续 7 日应用肠外营养支持治疗；③ 无严重肝肾功能损害或感

染性疾病；④无脂代谢异常，无脂肪乳过敏；⑤近期未使用免疫调节剂。排除标准：①年龄 < 18 岁或 > 85 岁；②非住院患者使用 2 种及以上脂肪乳剂；③转移到另一家医院治疗共病；④临床资料不全且营养治疗期间相关评价指标数据缺失。本研究已通过医院伦理委员会研究批准同意并申请通过免除知情同意书 [伦理批件号:第 2023 (22) 号]。

1.2 肠外营养方法

术后第一日开始给予两组患者等氮、等热量以葡萄糖和脂肪乳为主要能源的肠外营养支持治疗。试验组应用多种油脂肪乳注射液 (C6 ~ 24)，对照组应用 20% 的中 / 长链脂肪乳注射液 (C6 ~ 24)，两组脂肪乳的来源均为同一厂家。肠外营养配置如下：非蛋白热量 104.6 kJ / (kg · d)，氮量 0.20 g / (kg · d)，氨基酸 1.0 g / (kg · d)，非蛋白热氮比 120 : 1，胰岛素与葡萄糖按 1 : 4 ~ 6 的比例，并给予适量维生素及微量元素。肠外营养液由我院静脉用药调配中心统一配置，静脉营养支持至少 7 d，其余处理两组相同。

1.3 观察指标

查阅并收集患者住院病历，收集病史、检查结果等资料。①一般资料：患者姓名、性别、年龄、临床诊断、合并疾病、联用抗感染药物；②收集患者营养治疗期间非特异性炎症指标 [C-反应蛋白 (CRP)、白细胞 (WBC)、中性粒细胞计数 (Neu)、淋巴细胞百分比 (L%)]，肝肾功能指标 [谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、肌酐 (CR)]，营养指标 [总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)]。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行分析，各组计量资料近似正态分布 (正态性检验)，以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组间进行独立样本 *t* 检验；计数资料用 [例 (%)] 表示，统计分析采用卡方检验或者 Fisher 确切概率法。对符合正态分布且满足方差齐性的重复测量疗效指标进行分析，若满足 Mauchly 球形假设检验则采用两因素方差分析，若不符合球形假设检验，则行 Greenhouse-Geisser 法校正。

2 结果

2.1 一般资料比较

共收集病例 481 例，根据纳排标准共纳入 126 例患者，其中试验组 47 例，对照组 79 例。试验组和对照组基线资料的各项指标比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$ ，见表 1)。

2.2 两组患者营养治疗期间各项指标比较 (见表 2)

表 1 两组患者一般资料比较

Tab 1 Information of patients

项目	对照组 ($n = 79$)	试验组 ($n = 47$)	<i>P</i>
年龄 / 岁	71.03 ± 12.43	68.21 ± 12.34	0.220
性别 (男 / 女)	48/31	29/18	0.916
体质量指数 / (kg · m ⁻²)	20.18 ± 3.38	19.30 ± 3.80	0.175
合并疾病 / [n (%)]			
高血压	20 (25.32)	11 (23.40)	0.810
糖尿病	9 (11.39)	3 (6.38)	0.533*
心血管疾病	2 (2.53)	2 (4.26)	0.629*
联用抗感染药物 / [n (%)]			
青霉素类	8 (10.13)	5 (10.64)	0.927
碳青霉烯类	5 (6.33)	4 (8.51)	0.726*
头孢菌素类	57 (72.15)	37 (78.72)	0.412

注：*表示采用 Fisher 确切概率法。

Note: * Means Fisher's exact probability method.

2.2.1 非特异性炎症 两组患者治疗期间 CRP、WBC 时间效应差异有统计学意义 ($F = 13.847$; $F = 37.815$; P 均 < 0.05); CRP、WBC 的组间效应差异有统计学意义 ($F = 4.181$; $F = 9.827$; P 均 < 0.05)，说明两组患者治疗期间 CRP、WBC 水平随时间而改变，并且试验组和对照组的 CRP、WBC 水平存在差异。试验组营养治疗后 7 d 的 CRP 水平低于对照组 ($P < 0.05$)，试验组治疗后 3 d 和治疗后 7 d 的 WBC 水平低于对照组 ($P < 0.05$)，其他指标差异无统计学意义。

2.2.2 肝肾功能及营养状态指标 TBIL、TP、ALB 时间效应差异有统计学意义 ($F = 6.186$; $F = 26.965$; $F = 18.017$; P 均 < 0.05); TBIL、TP 组间效应差异有统计学意义 ($F = 8.545$; $F = 5.479$; P 均 < 0.05)，说明两组患者治疗期间 TBIL、TP、ALB 水平随时间而改变，试验组和对照组的 TBIL、TP 水平存在差异。试验组营养治疗后 3 d 和治疗后 7 d TBIL 上升的幅度低于对照组 ($P < 0.05$)，TP 水平高于对照组 ($P < 0.05$)，其他指标差异无统计学意义。

2.3 老年癌症组患者应用 SMOF 和 MCT/LCT 对比

2.3.1 一般资料比较 老年患者作为一类高风险人群，在患癌症的同时，自身可能还具有肝肾功能老化、营养不良、容易发生并发症以及同时患有的一种或多种慢性疾病等特征，因此这类人群在临床上非常值得关注。为进一步探索 SMOF 在老年癌症患者中的优势，筛选本研究中 ≥ 65 岁的癌症患者，并将各项指标再次进行比较。其中对照组老年患者 62 例，试验组老年患者 30 例，两组基线资料的各项指标比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$ ，见表 3)。

表 2 两组患者肠外营养治疗期间各项指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Indicators during parenteral nutrition treatment in both groups ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d	P_1 值	P_2 值	P_3 值
CRP/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	31.32 ± 32.66	30.31 ± 28.61	22.62 ± 10.26 ^{ab}	0.876	0.076	< 0.001
	实验组	30.54 ± 12.76	22.50 ± 11.01 ^a	14.12 ± 6.74 ^{ab}			
WBC/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	12.35 ± 5.77	11.39 ± 3.67	8.32 ± 4.12 ^{ab}	0.649	0.003	0.003
	实验组	11.89 ± 4.91	9.14 ± 4.61 ^a	6.29 ± 2.45 ^{ab}			
Neu/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	8.21 ± 10.03	7.42 ± 3.40	7.13 ± 5.16	0.895	0.536	0.345
	实验组	8.01 ± 4.14	6.95 ± 4.99	6.29 ± 4.21			
L/%	对照组	25.38 ± 10.81	26.31 ± 12.47	27.26 ± 11.18	0.358	0.364	0.924
	实验组	23.67 ± 8.69	24.51 ± 6.81	27.09 ± 5.56			
ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	29.89 ± 31.25	25.86 ± 21.79	27.59 ± 22.35	0.525	0.695	0.966
	实验组	26.56 ± 22.58	24.45 ± 14.69	27.74 ± 13.83			
AST/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	33.99 ± 48.82	33.80 ± 29.94	25.74 ± 12.80 ^b	0.504	0.838	0.106
	实验组	29.15 ± 9.78	34.96 ± 31.60	29.99 ± 16.24			
TBIL/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	19.95 ± 8.82	24.71 ± 7.71 ^a	29.88 ± 25.68 ^{ab}	0.783	0.001	0.041
	实验组	19.51 ± 8.48	19.84 ± 8.28	21.95 ± 7.53			
CR/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	78.75 ± 65.78	65.68 ± 37.02 ^a	66.54 ± 45.89 ^b	0.811	0.347	0.377
	实验组	81.76 ± 71.61	75.74 ± 81.71	77.23 ± 89.18			
TP/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	55.89 ± 7.01	57.73 ± 6.86	60.87 ± 7.45 ^{ab}	0.616	0.005	0.013
	实验组	56.81 ± 13.39	61.78 ± 9.59 ^a	64.20 ± 6.76 ^{ab}			
ALB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	31.92 ± 5.51	32.61 ± 5.76	35.46 ± 6.20 ^a	0.334	0.586	0.054
	实验组	30.89 ± 6.09	32.03 ± 5.69	33.36 ± 5.16 ^a			

注: ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$; 与治疗前 3 d 比较, ^b $P < 0.05$; P_1 、 P_2 、 P_3 分别表示治疗前、治疗后 3 d 及治疗后 7 d 两组指标比较。

Note: ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$; compared with 3 d after the treatment, ^b $P < 0.05$; P_1 , P_2 , and P_3 indicate indicators in both groups before the treatment, and 3 d and 7 d after the treatment.

表 3 老年癌症患者一般资料

Tab 3 General information of elderly cancer patients

项目	对照组 ($n = 62$)	试验组 ($n = 30$)	P
年龄 / 岁	76.16 ± 7.31	75.47 ± 7.18	0.668
性别 (男 / 女)	37/25	18/12	0.976
体质量指数 / ($\text{kg} \cdot \text{m}^2$)	19.94 ± 3.41	19.64 ± 3.69	0.705
合并疾病 [n (%)]			
高血压	15 (24.19)	10 (33.33)	0.356
糖尿病	8 (12.90)	2 (6.67)	0.489 [*]
心血管疾病	2 (3.23)	2 (6.67)	0.594 [*]
联用抗感染药物 [n (%)]			
青霉素类	8 (12.90)	4 (13.33)	1.000 [*]
碳青霉烯类	5 (8.06)	4 (13.33)	0.466 [*]
头孢菌素类	43 (69.35)	25 (83.33)	0.152

注: ^{*}表示采用 Fisher 确切概率法。

Note: ^{*} Means Fisher's exact probability method.

2.3.2 老年癌症患者营养治疗期间各项指标比较

① 非特异性炎症: 两组患者治疗期间 CRP、WBC 时间效应差异有统计学意义 ($F = 6.943$; $F = 36.629$; P 均 < 0.05); CRP、WBC 组间效应差异有统计学意义 ($F = 3.156$; $F = 12.170$; P 均 < 0.05), 说明两组患者治疗期间 CRP、WBC 水平随时间而改变, 并且试验组和对照组

的 CRP、WBC 水平存在差异。试验组营养治疗后 3 d 和治疗后 7 d 的 CRP、WBC 水平低于对照组 ($P < 0.05$), 其他指标差异无统计学意义。

② 肝肾功能及营养状态指标: TBIL、TP、ALB 时间效应差异有统计学意义 ($F = 3.893$; $F = 15.270$; $F = 9.893$; P 均 < 0.05); TBIL、TP 组间效应差异有统计学意义 ($F = 5.593$; $F = 8.552$; P 均 < 0.05), 说明两组患者治疗期间 TBIL、TP、ALB 随时间而改变, 试验组和对照组的 TBIL、TP 水平存在差异。试验组营养治疗后 3 d 和治疗后 7 d TBIL 上升的幅度小于对照组, TP 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其他指标差异无统计学意义 (见表 4)。

3 讨论

SMOF 是一种含有 4 种油脂的均衡治疗型脂肪乳剂, 主要包括 30% 大豆油 (提供必需脂肪酸)、30% 椰子油 (作为快速能量来源)、25% 橄榄油 (提供单不饱和脂肪酸)、15% 鱼油 (具有减轻炎症和免疫调节等作用) 以及 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 E (抑制脂质过氧化)^[3]。其中鱼油富含丰富的 ω -3 多不饱和脂肪酸, 主要包括 α -亚麻酸 (ALA)、二十二碳六烯酸 (DHA) 和二十碳五烯

表 4 老年癌症患者营养治疗期间各项指标比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab 4 Various indicators during nutritional treatment in elderly cancer patients ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d	P_1 值	P_2 值	P_3 值
CRP/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	31.89±33.60	31.30±29.75	22.44±11.08 ^{ab}	0.696	0.041	0.010
	试验组	29.35±12.67	19.73±5.88 ^a	16.55±6.80 ^a			
WBC/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	12.35±5.46	11.62±3.70	8.05±3.20 ^{ab}	0.702	< 0.001	< 0.001
	试验组	11.91±4.31	8.52±3.46 ^a	5.76±1.62 ^{ab}			
Neu/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	8.46±11.03	7.41±3.42	7.45±5.46	0.844	0.261	0.151
	试验组	8.05±4.03	6.50±3.96	5.84±3.79			
L/%	对照组	24.18±11.18	25.84±12.87	27.91±11.17 ^a	0.768	0.421	0.672
	试验组	24.87±8.64	23.82±6.54	26.98±6.10			
ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	30.63±33.14	26.29±23.38	27.04±23.03	0.534	0.535	0.756
	试验组	26.34±25.55	23.39±14.58	28.50±15.92			
AST/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	35.84±54.60	33.82±30.21	24.89±12.20 ^b	0.465	0.588	0.214
	试验组	28.45±9.88	30.37±24.40	28.54±14.93			
TBIL/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	20.24±9.43	24.42±7.80 ^a	31.20±28.00 ^{ab}	0.738	0.025	0.073
	试验组	19.55±8.73	20.26±9.03	21.71±8.05			
CR/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	83.33±72.86	67.79±39.91 ^a	68.27±46.71	0.490	0.139	0.193
	试验组	95.18±84.47	89.38±98.76	89.45±108.38			
TP/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	55.41±6.10	56.84±7.20	59.58±7.12 ^{ab}	0.350	0.001	0.004
	试验组	57.49±15.11	63.26±10.78 ^a	64.42±7.59 ^a			
ALB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	对照组	31.12±4.66	31.67±5.40	34.14±5.49 ^{ab}	0.406	0.991	0.235
	试验组	30.25±4.59	31.65±5.79	32.72±4.75 ^a			

注：与治疗前比较，^a $P < 0.05$ ；与治疗 3 d 比较，^b $P < 0.05$ ； P_1 、 P_2 、 P_3 分别表示治疗前、治疗后 3 d 及治疗后 7 d 两组指标比较。

Note: Compared with before the treatment, ^a $P < 0.05$; compared with 3 d after the treatment, ^b $P < 0.05$; P_1 , P_2 , and P_3 indicate indicators in both groups before the treatment, and 3 d and 7 d after the treatment.

酸 (EPA), ALA 是人体必需脂肪酸, DHA 具有稳定细胞膜功能、平衡细胞因子和脂蛋白等作用, EPA 是体内前列腺素、白三烯的前体^[6]。

在非特异性炎症方面, 在不限年龄组和老年组中, 营养治疗前患者的 CRP、WBC 均处于较高水平, 治疗期间两组的 CRP、WBC 均有一定程度的下降, 说明肠外营养对促进患者机体恢复有积极作用。营养治疗期间试验组 CRP、WBC 等炎症指标下降的幅度明显大于对照组, 这表明与 MCT/LCT 相比, SMOF 在减轻炎症方面表现更好, 这可能与 SMOF 中添加了鱼油脂肪乳有关。一般脂肪乳中 ω -6 脂肪酸在代谢过程中会产生炎症因子, 过多容易加重炎症反应, 而 ω -3 脂肪酸在代谢过程中会产生抑制炎症反应的作用, 鱼油脂肪乳通过调整 ω -6 : ω -3 的比值, 降低 ω -6 增加 ω -3, 能更好地降低机体的炎症反应。同时鱼油脂肪乳中富含 EPA 和 DHA, 不仅可以和花生四烯酸 (AA) 竞争性结合, 增加免疫细胞膜磷脂 EPA 和 DHA 的含量, 还可以通过减少环氧化酶-2 (COX-2) 表达, 抑制磷脂酶 PLA2 的活性, 减少与 AA 有关的花生酸, 从而抑制炎症反应和改善细胞免疫功能^[7]。

在肝肾功能方面, 在不限年龄组和老年组中, 试验组营养治疗期间 TBIL 值上升的幅度小于对照组, 且试验组治疗前后 TBIL 水平虽有小幅度上升但维持在正常水平, 对照组则显著上升。这表示两种脂肪乳对患者的肝脏均有影响, 抑制患者胆汁酸分泌及转运, 产生胆汁淤积, 但 SMOF 的影响较小^[8]。SMOF 中的鱼油富含 ω -3 脂肪酸, 能够保护肝脏, 丰富的 ALA、DHA 和 EPA 可以降低亚油酸代谢产物, 从而减轻炎症介质和肝炎性损伤^[9]。并且 SMOF 中包含丰富的 α -生育酚、橄榄油、维生素 E 等抗氧化剂, 可以减轻肝细胞氧化应激, 保护肝脏功能^[10-11]。

患者短期内的营养状态, 在不限年龄组和老年组中, 试验组 TP 值上升的幅度大于对照组, 这可能与 SMOF 是一种含有四种油脂的均衡治疗型脂肪乳剂有关, 而富含大豆油的脂肪乳对机体可产生免疫抑制作用, 增加感染的风险, 影响机体对营养成分的吸收, 而输注 SMOF 对免疫功能的负面影响明显低于含大豆油的脂肪乳, 因此患者能更好地吸收营养成分^[12]。也有研究认为在相似的能量和蛋白质供应下, SMOF 和 MCT/LCT 改善患者营养状况水平相似^[11]。由于本研究观察

患者肠外营养的治疗时间不足,后期还需要大规模的临床试验进一步验证 SMOF 对患者营养状态的影响。

SMOF 中富含 ω -3 多不饱和脂肪酸以及少量植物甾醇,与其他脂肪乳相比肝毒性更小,临床安全性更高^[13]。目前研究表明 SMOF 应用于患者具有较高的安全性^[14-15],作者通过查阅国家药品不良反应监测系统发现,在 2020 年 1 月 1 日至 2023 年 5 月 31 日期间,本院使用 MCT/LCT 发生不良反应的有 4 例,使用 SMOF 并未出现不良反应。

通过对比两组患者,我们发现将 SMOF 应用于癌症患者术后的营养支持治疗,有利于减轻患者的炎症反应及胆汁淤积,改善肝脏氧化应激作用,从而保护患者肝脏功能,且 SMOF 在改善患者营养状态方面有积极作用。对于老年癌症患者这类高风险人群,患者自身具有多种慢性疾病、脏器功能逐渐老化、营养不良等特征,SMOF 能够减轻老年患者的炎症反应,保护患者肝脏功能,维持患者营养状态,因此 SMOF 在用于此类患者时更具优势。

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] 徐梦琪,秦侃.老年共病多重用药抗胆碱能负担与营养不良发生的影响因素分析[J].*中南药学*, 2022, 20 (4): 934-938.
- [3] 赵越,鞠晓宇,马银玲,等.多种油脂肪乳的临床研究进展与评价[J].*中国医院用药评价与分析*, 2022, 22 (7): 894-896.
- [4] Fukui M, Kang KS, Okada K, et al. EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114 (1): 192-203.
- [5] Giordano C, Plastina P, Barone I, et al. *n*-3 polyunsaturated fatty acid amides: new avenues in the prevention and treatment of breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (7): 2279.
- [6] 杨敏,魏冰,孟橘,等. ω -3 多不饱和脂肪酸的来源及生理功能研究进展[J].*中国油脂*, 2019, 44 (10): 110-115.
- [7] 张志凯,徐克成,牛立志,等.多种油脂肪乳对胰腺癌患者免疫功能与炎症介质的影响[J].*广东医学*, 2016, 37 (14): 2177-2179.
- [8] Park HW, Lee NM, Kim JH, et al. Parenteral fish oil-containing lipid emulsions may reverse parenteral nutrition-associated cholestasis in neonates: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Nutr*, 2015, 145 (2): 277-283.
- [9] 段玉会,张霞,王岩,等.多种油脂肪乳在早产儿肠外营养中应用及对营养状态影响[J].*临床军医杂志*, 2023, 51 (4): 414-416.
- [10] Chen SS, Xiao YT, Liu Y, et al. Fish oil-based lipid emulsion alleviates parenteral nutrition-associated liver diseases and intestinal injury in piglets [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2021, 46 (3): 709-720.
- [11] 朱文艺,樊荣,李利,等.多种油脂肪乳对 ICU 患者肝功、免疫功能及炎症的影响[J].*第三军医大学学报*, 2020, 42 (3): 273-277.
- [12] 马天龙. SMOF 新型脂肪乳肠外营养对腹部术后患者影响的 Meta 分析[D].兰州:兰州大学, 2017.
- [13] Pichler J, Simchowit V, Macdonald S, et al. Comparison of liver function with two new/mixed intravenous lipid emulsions in children with intestinal failure [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2014, 68 (10): 1161-1167.
- [14] 中华医学会肠外肠内营养学分会.鱼油脂肪乳剂临床应用中国专家共识(2022 版)[J].*中华消化外科杂志*, 2022, 21 (10): 1313-1325.
- [15] Navaratnarajah N, Girard G, Sant'anna G, et al. The impact of a lipid injectable emulsion (SMOF) on conjugated bilirubin levels in children receiving prolonged parenteral nutrition: a large single center experience [J]. *Clin Nutr ESPEN*, 2022, 49: 289-294.

(收稿日期: 2023-07-18; 修回日期: 2023-10-10)

不同营养状态对结直肠癌患者奥沙利铂化疗致周围神经毒性 (OIPN) 的影响

卞芸, 丁永娟*, 谢芬, 吕娟, 陈杨, 徐振宇 (江南大学附属医院, 江苏 无锡 214000)

摘要: **目的** 探讨营养状态对结直肠癌患者发生奥沙利铂致周围神经毒性 (OIPN) 的影响。**方法** 选取 2022 年 7 月至 2023 年 5 月无锡市江南大学附属医院收治的 219 例结直肠癌患者, 收集患者资料, 运用 SPSS 26.0 对影响因素进行统计分析。**结果** 219 例结直肠癌患者中有 144 例发生了 OIPN, 作为 OIPN 组; 75 例没有发生 OIPN, 作为非 OIPN 组。Spearman 分析显示两组患者并发症、营养风险筛查 2002 (NRS2002) 评分、白蛋白、血红蛋白等指标差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Logistic 回归分析显示白蛋白与并发症是 OIPN 发生的独立危险因素, 在此基础上构建 Nomogram 预测模型, 为临床评估和预测 OIPN 发生提供新的方法和思路。**结论** 白蛋白水平低下与发生并发症是 OIPN 的独立危险因素, 其中白蛋白水平与患者的营养状况密切相关, 该预测模型对预测结直肠癌患者 OIPN 发生具有较好的临床应用价值。

关键词: 奥沙利铂; 奥沙利铂致周围神经毒性; 营养风险筛查 2002; 营养状态

中图分类号: R735.34 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0030-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.005

Effect of different nutritional status on oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity (OIPN) in colorectal cancer patients

BIAN Yun, DING Yong-juan*, XIE Fen, LYU Juan, CHEN Yang, XU Zhen-yun (Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi Jiangsu 214000)

Abstract: Objective To determine the effect of nutritional status on oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity (OIPN) in patients with colorectal cancer. **Methods** Totally 219 patients with colorectal cancer patients admitted to the Affiliated Hospital of Jiangnan University in Wuxi from July 2022 to May 2023 were selected. Patient data were collected, and the influencing factors were analyzed by SPSS 26.0. **Results** Peripheral neurotoxicity occurred in 144 of the 219 patients (the OIPN group), and the 75 patients did not have peripheral neurotoxicity (the non-OIPN group). Spearman analysis showed that comorbidity, NRS2002, albumin, and hemoglobin were significant ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that albumin and comorbidity were the independent risk factors for the occurrence of OIPN in colorectal cancer patients, on the basis of which the Nomogram prediction model was constructed to offer new ideas for clinical assessment and prediction of OIPN. **Conclusion** Low albumin level and occurrence of comorbidities are independent risk factors for OIPN in colorectal cancer patients treated with oxaliplatin. The albumin level is closely related to the nutritional status of patients. This prediction model has good clinical application value for predicting the occurrence of OIPN in patients with colorectal cancer.

Key words: oxaliplatin; oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity; NRS2002; nutritional status

基金项目: 无锡市卫生健康委课题项目 (No.T202215)。

作者简介: 卞芸, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: bianyun86@163.com * 通信作者: 丁永娟, 女, 主任药师, 主要从事医院药事管理研究, email: 791544517@qq.com

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 属于消化道恶性肿瘤, 近年来其发病率和死亡率逐年上升, 依据 2018 年中国癌症统计报告, 我国结直肠癌发病率和死亡率在全部恶性肿瘤中分别位居第 3 位和第 5 位, 其中新发病例 37.6 万例, 死亡病例 19.1 万例^[1]。

奥沙利铂是第三代铂类抗肿瘤药物^[2-3], 是治疗结直肠癌等消化系统肿瘤的一线用药, 其奥沙利铂所致周围神经毒性 (oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity, OIPN) 的主要表现有恶心呕吐、腹泻、骨髓抑制、手足综合征^[4]、可逆性后部白质脑病综合征 (PRES) 等^[5]。OIPN 对患者化疗效果和生存质量产生了不良后果^[6], 国内外尚没有指南推荐能够有效预防 OIPN 的药物, 国内对 OIPN 研究集中在中医药领域^[7], 以探讨通过中医药方法改善患者的不适症状为主^[8-11]。

肿瘤患者的营养状况对患者生存质量及后期治疗很重要, 营养状况不佳的不利影响会贯穿整个治疗过程^[12-14], 如患者的免疫功能下降, 感染率增高等。肿瘤患者营养状态的改变可以发生在肿瘤诊疗过程中的任意节点, 围化疗期营养不良的发生与疾病的进展、预后以及化疗相关不良反应密切相关。关注肿瘤患者化疗过程中的营养状况, 及时发现诊断营养不良, 并予以规范纠正, 将有助于提高患者对化疗药物的耐受性, 达到改善其生活质量的目的。

本研究从患者营养状况角度探寻影响 OIPN 发生的影响因素, 构建预测模型用于预测化疗前不同营养状态下患者 OIPN 的发生情况。旨在从患者的营养状态视角去探寻结直肠癌患者 OIPN 发生的原因, 为临床诊断预测该类问题提供新的研究思路。

1 资料

1.1 一般资料

选取 2022 年 7 月至 2023 年 5 月无锡市江南大学附属医院收治的 219 例结直肠癌患者。其中 65.75% (144 例) 发生了 OIPN, 作为 OIPN 组; 34.25% (75 例) 没有发生 OIPN, 作为非 OIPN 组。本研究已通过江南大学附属医院伦理委员会批准 (伦理批件号: LS2022080), 患者及家属自愿参加签署知情同意书。

1.2 纳入标准

① 经病理学和细胞学诊断为结直肠癌且采用含奥沙利铂方案化疗者; ② 年龄 18 ~ 80 周岁, 性别不限, 自愿参加本研究并签署知情同意书的患者;

③ 患者 ECOG 评分 0 ~ 2 分, 预计生存期 3 个月以上; ④ 患者近期末使用会出现神经毒性的药物; ⑤ 神志清楚, 对答能力正常, 既往无精神病史。

2 方法

2.1 治疗方案

化疗方案为 FOLFOX 方案, 给予奥沙利铂 + 亚叶酸钙 + 5-氟尿嘧啶治疗, 联合 (或不联合) 靶向制剂 (如贝伐单抗、信迪利单抗等), 观察患者化疗后 OIPN 的发生情况。

2.2 实验室指标采集

抽取清晨空腹静脉血 2 mL, 采用血细胞分析仪测量白蛋白水平、外周血淋巴细胞、血红蛋白等。测身高、体重, 计算患者体质量指数 (BMI)。

2.3 营养评估标准

营养评估标准: 当营养风险筛查 2002 (NRS2002) 评分 ≥ 3 分判定为有营养风险, 当 NRS2002 评分 < 3 分判定为无营养风险; 按全球领导人发起的营养不良 (GLIM) 评定 (诊断) 标准进行营养状况诊断^[15], GLIM 标准包含 3 个表型标准和 2 个病因标准, 任意 1 个表型标准 + 1 个病因标准阳性可诊断患者为营养不良。

2.4 神经毒性分级和神经评分

化疗后进行常规体格检查, 血常规、生化等检查并进行神经毒性分级和神经评分。OIPN 的评价: I 级为深肌腱反射消失或感觉异常, 对躯体功能没影响, 无症状或仅检查可发现; II 级为有针刺感或其他感觉异常, 有轻微症状影响躯体功能但对日常生活无影响; III 级为感觉改变异常, 轻度影响到日常生活, 行走需要手杖、轮椅等辅助工具; IV 级为残疾, 威胁到生命。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件分析, 符合正态分布的计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示; 组间比较采用两独立样本 t 检验表示; 计数资料采用 $[n (\%)]$ 表示; 组间差异采用卡方检验表示; 对数据进行 Spearman 分析和多因素 Logistic 回归分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般资料

共纳入 219 例结直肠癌患者, 其中男性 149 例, 女性 70 例; 年龄 31 ~ 77 岁 $[(62.27 \pm 9.30)$ 岁]; OIPN 组中有 126 例患者出现肿瘤转移, 非 OIPN 组中有 66 例出现肿瘤转移; OIPN 组中 104 例患者有并发症发生, 非 OIPN 组中 42 例患者有并发症发生; 两组在性别、年龄、肿瘤转移、

BMI 方面比较差异无统计学意义，而两组在并发症发生方面比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，OIPN 组并发症的发生率 (72.22%) 高于非 OIPN 组 (56.00%)，见表 1。

表 1 结直肠癌患者一般资料

Tab 1 General data of patients with colorectal cancer

项目	项目	OIPN 组 ($n = 144$)	非 OIPN 组 ($n = 75$)	t/χ^2 值	P 值
性别 [n (%)]	男	97 (67.36)	52 (69.33)	0.778	0.768
	女	47 (32.64)	23 (30.67)		
年龄 / 岁	< 50	45.50 ± 6.67	44.10 ± 3.90	2.086	0.092
	50 ~ 70	60.97 ± 5.78	61.22 ± 5.25		
	≥ 70	72.60 ± 2.43	73.07 ± 2.30		
肿瘤转移 [n (%)]	有转移	126 (87.50)	66 (88.00)	0.072	0.915
	无转移	18 (12.50)	9 (12.00)		
并发症 [n (%)]	有并发症	104 (72.22)	42 (56.00)	4.234	0.016
	无并发症	40 (27.78)	33 (44.00)		
BMI / ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	BMI < 18.5	17.56 ± 0.81	16.79 ± 0.76	- 0.549	0.711
	18.5 ≤ BMI ≤ 24	21.19 ± 1.47	21.49 ± 1.62		
	BMI > 24	25.47 ± 1.19	25.88 ± 2.09		

3.2 OIPN 发生基本情况

本研究中患者的 OIPN 症状主要表现为手脚麻木、四肢末端刺痛、咽喉不适、舌头麻木、精细动作障碍、尿失禁等症状；患者出现 OIPN 持续时间为 0 ~ 10 min 的有 100 例，占比最多 (69%)，频次为每日发作的有 112 例，占比最多 (78%)，严重程度分级为 II 级的患者 85 例，占比最多 (59%)，分别见表 2 ~ 4。

表 2 OIPN 发生持续时间

Tab 2 Duration of OIPN

持续时间	n (%)
0 ~ 10 min	100 (69)
10 ~ 30 min	17 (12)
31 ~ 60 min	6 (4)
1 ~ 2 h	4 (3)
> 2 h	7 (5)
≥ 半天	10 (7)

表 3 OIPN 发生频次

Tab 3 Frequency of peripheral neurotoxicity

频次	n (%)
一次	29 (20)
每日	112 (78)
整个化疗周期	3 (2)

3.3 OIPN 发生患者营养指标情况

NRS2002 ≥ 3 分在 OIPN 组的发生率 (90.97%) 要高于其在非 OIPN 组的发生率 (77.33%) ($P = 0.005$)，白蛋白异常 (低) 在 OIPN 组为 (36.25 ± 2.66) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)，血红蛋白异常 (低) 在 OIPN 组为

表 4 OIPN 严重程度分级

Tab 4 Classification of severity of OIPN

分级	n (%)
I 级	28 (19)
II 级	85 (59)
III 级	30 (21)
IV 级	1 (1)

(105.14 ± 12.27) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，组间比较差异具有统计学意义 ($P = 0.022$)，见表 5。

3.4 单因素分析

单因素分析显示两组的并发症 ($P = 0.025$)、NRS2002 评分 ($P = 0.011$)、白蛋白 ($P = 0.000$)、血红蛋白 ($P = 0.019$) 差异有统计学意义；在性别、年龄、肿瘤转移、体质量指数、GLIM 诊断结果、外周血淋巴细胞计数方面差异无统计学意义，诊断结果见表 6。

3.5 多因素 Logistic 回归分析

将并发症、NRS2002 评分、白蛋白、血红蛋白进行多因素的 Logistic 回归分析，分析显示白蛋白 ($P < 0.001$) 与并发症 ($P = 0.036$) 是 OIPN 发生的独立危险因素，见表 7。在多元 Logistic 回归分析的基础上完成 ROC 曲线，白蛋白 AUC 值为 0.72，并发症 AUC 值为 0.58，见图 1。

3.6 基于 Nomogram 预测模型的构建与评估

将 OIPN 发生的相关影响因素纳入列线图模型，预测基于患者营养状态指标的 OIPN 发生相关因素的 C-index 为 0.604，认为本预测模型具有一定的预测作用，见图 2。

表 5 结直肠癌患者营养状况对比

Tab 5 Nutritional status in patients with colorectal cancer

项目		OIPN 组 (n = 144)	非 OIPN 组 (n = 75)	t/χ^2 值	P 值
NRS2002 评分 / 分 [n (%)]	≥ 3	131 (90.97)	58 (77.33)	0.187	0.005
	< 3	13 (9.03)	17 (22.67)		
GLIM 诊断结果 [n (%)]	营养不良	17 (11.81)	6 (8.00)	0.639	0.386
	营养良好	127 (88.19)	69 (92.00)		
白蛋白 / (g · L ⁻¹)	异常 (低)	36.25 ± 2.66	35.22 ± 3.93	- 8.994	0.000
	正常	42.19 ± 1.70	41.90 ± 1.26		
外周血淋巴细胞计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	异常	0.90 ± 0.19	0.89 ± 0.07	- 2.141	0.094
	正常	1.63 ± 0.45	1.59 ± 0.37		
血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	异常 (低)	105.14 ± 12.27	103.32 ± 17.19	- 2.763	0.022
	正常	134.23 ± 8.87	133.83 ± 10.67		

表 6 OIPN 发生相关情况单因素分析

Tab 6 Univariate analysis of the incidence of peripheral neurotoxicity

项目		OIPN 组 (n = 144)	非 OIPN 组 (n = 75)	P 值
性别 [n (%)]	男	97 (67.36)	52 (69.33)	
	女	47 (32.64)	23 (30.67)	
年龄 / 岁	< 50	45.50 ± 6.67	44.10 ± 3.90	0.086
	50 ~ 70	60.97 ± 5.78	61.22 ± 5.25	
	≥ 70	72.60 ± 2.43	73.07 ± 2.30	
肿瘤转移 [n (%)]	有转移	126 (87.50)	66 (88.00)	0.690
	无转移	18 (12.50)	9 (12.00)	
并发症 [n (%)]	有并发症	104 (72.22)	42 (56.00)	0.025
	无并发症	40 (27.78)	33 (44.00)	
体质量指数 / (kg · m ⁻²)	BMI < 18.5	17.56 ± 0.81	16.79 ± 0.76	0.800
	18.5 ≤ BMI ≤ 24	21.19 ± 1.47	21.49 ± 1.62	
	BMI > 24	25.47 ± 1.19	25.88 ± 2.09	
NRS2002 评分 / 分 [n (%)]	≥ 3	131 (90.97)	58 (77.33)	0.011
	< 3	13 (9.03)	17 (22.67)	
GLIM 诊断结果 [n (%)]	营养不良	17 (11.81)	6 (8.00)	0.467
	营养良好	127 (88.19)	69 (92.00)	
白蛋白 / (g · L ⁻¹)	异常 (低)	36.25 ± 2.66	35.22 ± 3.93	< 0.001
	正常	42.19 ± 1.70	41.90 ± 1.26	
外周血淋巴细胞计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	异常	0.90 ± 0.19	0.89 ± 0.07	0.110
	正常	1.63 ± 0.45	1.59 ± 0.37	
血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	异常 (低)	105.14 ± 12.27	103.32 ± 17.19	0.019
	正常	134.23 ± 8.87	133.83 ± 10.67	

表 7 OIPN 发生的多因素 Logistic 回归分析

Tab 7 Multivariate Logistic regression analysis of peripheral neurotoxicity

项目	Exp (B)	95%CI	P 值
白蛋白	11.409	5.474 ~ 23.780	< 0.001
血红蛋白	0.739	0.349 ~ 1.564	0.429
并发症	1.867	1.041 ~ 3.349	0.036
NRS2002 评分	0.654	0.472 ~ 3.302	0.654

3.7 基于营养指标的预测模型决策曲线分析

通过基于患者临床营养指标及营养状态评估结果构建决策曲线预测模型来评估临床受益, 预测模型的预测值在 0 ~ 0.6 区间时, 可提供附加

临床受益, 见图 3。

4 结论

结直肠癌是消化道恶性肿瘤, 一般通过根治性手术切除病灶来达到有效治疗, 手术对消化系统的影响较大, 术后消化系统受损重建, 营养吸收效率下降, 而恶性肿瘤本身是消耗性疾病, 加重患者的营养不良。化疗是治疗结直肠癌的另一个重要手段, 虽然化疗可以有效控制疾病进展但也会产生相应的不良反应^[15], 从而加重患者的营养不良状况。患者不良的营养状态与其不佳的预后, 化疗后不良反应的产生都是互为因果的。

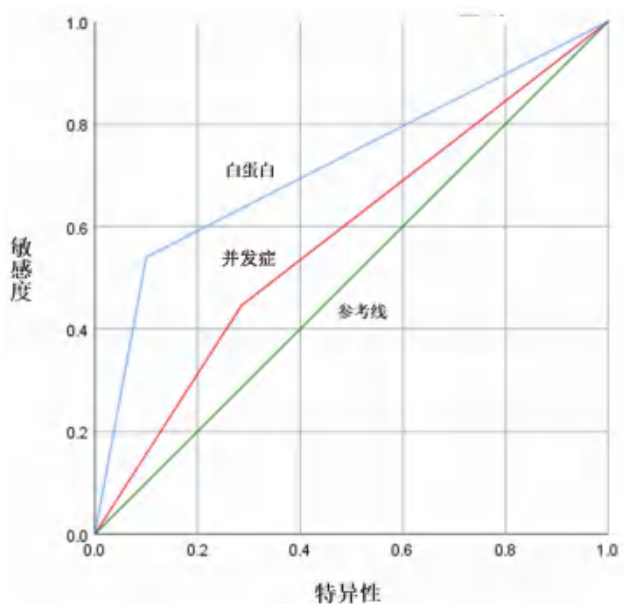


图 1 ROC 曲线图
Fig 1 ROC curve diagram

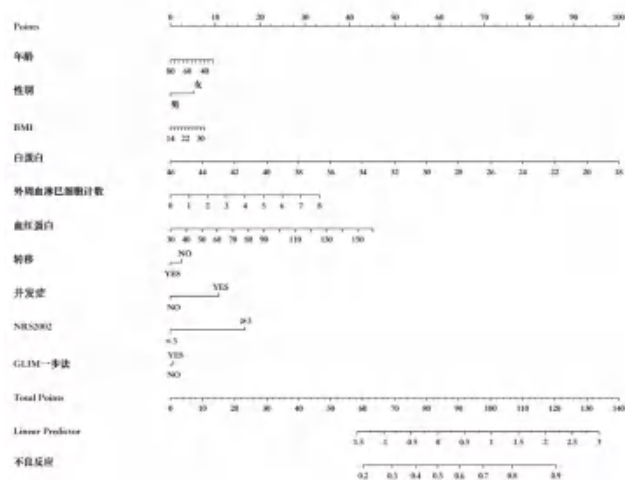


图 2 OIPN 发生预测模型列线图
Fig 2 Prediction model of OIPN

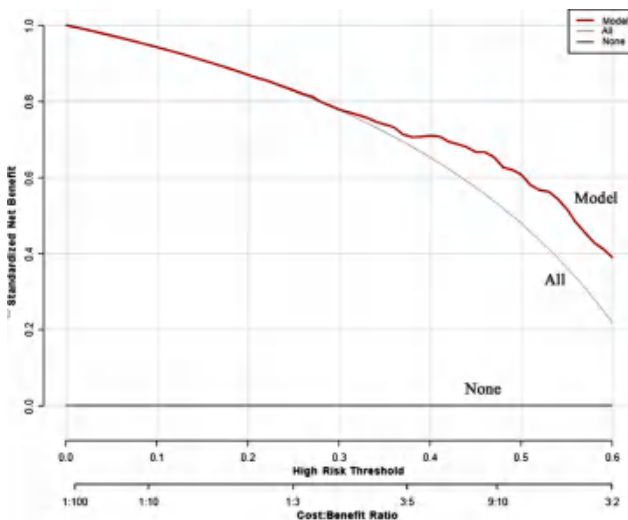


图 3 预测模型的决策曲线分析
Fig 3 Decision curve analysis for the prediction model

根据《国家卫健委中国结直肠癌诊疗规范（2023 版）》提示的肠癌患者常规推荐的一线治疗方案中，靶向生物制剂联合 FOLFOX 方案一般是结直肠癌肝和 / 或肺转移术前治疗部分、复发或转移性结直肠癌全身系统治疗部分，有明确阐述。在实际治疗过程中，靶向生物制剂联合化疗在临床是很普遍的，本研究收治的 219 例结直肠癌患者的治疗方案中，单纯的化疗方案有 187 例，加用了靶向制剂（如贝伐单抗、信迪利单抗等）的有 32 例。

本研究发现，白蛋白和并发症为结直肠癌患者 OIPN 的独立危险因素，结合患者自身疾病状态、营养状态标志物及评估结果等开发预测结直肠癌患者 OIPN 发生情况列线图，结果显示该 Nomogram 模型得分高的患者发生 OIPN 的风险高，且决策曲线分析显示，基于营养状态指标的模型预测结直肠癌 OIPN 发生的值在 0 ~ 0.6 时，可提供附加临床受益。由于本研究中纳入的患者营养状态指标及营养状态评估和筛查结果在临床诊疗过程中简单易得，因此该模型具有一定的普及性。

白蛋白在人体体液中占比大，它通过维持渗透压和装运物质来维持体内内环境稳定并保护组织器官，还可增强人体的免疫力，起到一定的抗肿瘤的作用。目前在临床患者营养状况的判定过程中，除了 NRS2002 营养风险筛查以及营养状态评估以外，临床的一些生化指标也具有参考意义。本研究选取的生化指标是目前临床仍然用以辅助判断患者营养状况的一个参考，其中包含白蛋白水平，正常范围为 $(40 \sim 55) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当人体白蛋白低于正常值时，人体免疫力下降，药物不良反应表现更显著^[16]。表 5 中白蛋白异常（低）在 OIPN 组的均值为 $(36.25 \pm 2.66) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，组间比较差异有统计学意义。表 6 单因素分析显示白蛋白差异有统计学意义。表 7 中多因素的 Logistic 回归分析，分析显示白蛋白是结直肠癌患者 OIPN 发生的独立危险因素。需要指出的是，实际肿瘤科入院化疗的大部分患者白蛋白水平不会低于 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ （低蛋白血症）。故研究者在构建预测模型时，将该因素纳入，具有很强的临床意义。本研究中的并发症为此次医师在诊疗中诊断出除了结直肠癌以外的疾病或者既往疾病，主要包括糖尿病、高血压、动脉粥样硬化等。并发症在两组多因素 Logistic 回归分析中对比差异有统计学意义，也是结直肠癌患者 OIPN 发生的独

立危险因素，具有并发症患者的 OIPN 发生率要高于无并发症的患者。另外，没有并发症的患者营养状况优于有或存在多种并发症的患者身体营养状况，所以侧面反映出营养不良的患者更容易发生 OIPN。

本研究提示 GLIM 诊断结果不是结直肠癌患者 OIPN 发生的独立危险因素。由于 BMI 在临床诊疗过程中较为易得，研究者在进行 NRS2002 营养风险筛查与 GLIM 诊断时，基于 BMI 的判断权重较大，表型因素依靠 BMI 获得，有偏倚存在。研究者对筛查和诊断的结果对结直肠癌患者发生 OIPN 的影响性的结论在以后的研究中应予以进一步验证。

本研究认为患者的营养状态对结直肠癌患者发生 OIPN 是有明确影响的，低白蛋白水平和具有并发症的结直肠癌患者在进行奥沙利铂治疗时更容易发生 OIPN，即营养不良患者的 OIPN 发生风险更高。本研究在研究方法上尚有不完善的地方，如单人进行营养风险筛查以及营养状态评估容易造成研究结果的偏倚，可以采用双人筛查和评估的流程，这样可以最大程度的确保患者的营养状态的准确性，这在以后的研究中应予以完善改进。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范 (2020 年版) [J]. 中国实用外科杂志, 2020, 40 (6): 601-625.
- [2] 韩仁强, 武鸣, 缪伟刚, 等. 2016 年江苏省恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2020, 34 (4): 291-297.
- [3] 马骏, 霍介格. 化疗所致周围神经病变的临床研究现状 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27 (13): 2415-2420.
- [4] 司徒敏贤. 奥沙利铂治肺癌致周围神经炎 2 例分析 [J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10 (31): 7754.
- [5] 赵梁桦, 宾三梅, 伍建平, 等. 结直肠癌患者应用奥沙利铂联合卡培他滨化疗的不良反应及护理 [J]. 中国实用医药, 2017, 12 (6): 160-161.
- [6] 于佳鑫, 李小平, 蒺凤林, 等. 奥沙利铂引起可逆性后部白质脑病综合征药品不良反应的文献分析 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (4): 578-582.
- [7] 许炜茹, 于明薇, 富琦. 黄芪桂枝五物汤加减治疗奥沙利铂所致周围神经病变的回顾性研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39 (1): 24-30.
- [8] 王华中, 吴玉华, 欧阳灿. 温经活血通络汤泡洗合用维生素 B₁₂ 穴位注射预防奥沙利铂周围神经毒性 32 例总结 [J]. 湖南中医杂志, 2017, 33 (10): 67-68.
- [9] 李彬先, 侯柏春. 血液流变学检测在恶性肿瘤诊断治疗与预后判断中的价值 [J]. 中国血液流变学杂志, 2002, 12 (4): 342-343.
- [10] 张毅鹏. 加味阳和汤防治奥沙利铂周围神经毒性的临床观察 [J]. 中国现代医生, 2018, 56 (15): 124-126.
- [11] 孙永侠, 钱和生. 甲钴胺联合红外线照射对奥沙利铂相关周围神经毒性的治疗效果 [J]. 安徽医学, 2022, 43 (9): 1054-1057.
- [12] 姜超, 田君, 陈彻, 等. 参麦注射液减轻奥沙利铂相关周围神经毒性反应的疗效 [J]. 江苏医药, 2019, 45 (6): 565-568.
- [13] Bozzetti F, Mariani L, Lo Vullo S, et al. The nutritional risk in oncology: a study of 1453 cancer outpatients [J]. Support Care Cancer, 2012, 20 (8): 1919-1928.
- [14] 宋春花, 王昆华, 郭增清, 等. 中国常见恶性肿瘤患者营养状况调查 [J]. 中国科学 (生命科学), 2020, 50 (12): 1437-1452.
- [15] 杨剑, 蒋朱明, 于康, 等. GLIM 营养不良评定 (诊断) 标准共识 (2018) 的探讨和分析 [J]. 中华临床营养杂志, 2019, 27 (1): 1-5.
- [16] 于恺英, 杨韵, 石汉平. 全球领导人营养不良倡议 (GLIM) 标准及其推广应用 [J]. 营养学报, 2020, 42 (3): 209-214.

(收稿日期: 2023-07-18; 修回日期: 2023-10-08)

研究论文

基于 GC-TOF-MS 和 UHPLC-QE-MS 的苏合香化学成分分析

牟菲^{1,2}, 张倩², 蔺瑞¹, 赵美娜¹, 陶星茹¹, 赵瑾怡¹, 汤海峰², 王婧雯^{1*} (1. 空军军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032; 2. 空军军医大学药理学系, 西安 710032)

摘要: **目的** 基于 GC-TOF-MS 和 UHPLC-QE-MS 分析中药苏合香的化学成分。**方法** 挥发性成分分析采用 Agilent DB-5MS 毛细管色谱柱 (30 m×250 μm×0.25 μm); 程序升温, 进样口温度 280 °C; 柱流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 1 μL; 分流比 15:1; 通过标准谱库检索并结合文献对主要色谱峰进行鉴定。可溶性成分分析采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相为 5.0 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-5.0 mmol·L⁻¹ 乙酸和乙腈; 梯度洗脱; NCE 模式下碰撞能量; 电喷雾离子源正负离子模式下对色谱流出物进行质谱检测, 利用对照品、二级质谱信息及文献对各主要色谱峰进行归属。**结果** 苏合香提取物中共鉴定出 25 个挥发性成分和 32 个可溶性成分。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于苏合香的成分分析。

关键词: 苏合香; 化学成分; GC-TOF-MS; UHPLC-QE-MS

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0036-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.006

Chemical constituents in the extract of styrax by GC-TOF-MS and UHPLC-QE-MS

MU Fei^{1,2}, ZHANG Qian², LIN Rui¹, ZHAO Mei-na¹, TAO Xing-ru¹, ZHAO Jin-yi¹, TANG Hai-feng², WANG Jing-wen^{1*} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032; 2. Department of Pharmacy, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract: Objective To determine the chemical components in traditional Chinese medicine styrax with GC-TOF-MS and UHPLC-QE-MS. **Methods** Agilent DB-5MS capillary chromatography column (30 m×250 μm×0.25 μm) was used for the volatile components. Programmed temperature rise was used, with the sample inlet temperature at 280 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the injection volume was 1 μL, and the split ratio was 15:1. The standard spectrum library was retrieved and the main chromatographic peaks were identified based on literatures. Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used for the soluble components. The mobile phase consisted of 5.0 mmol·L⁻¹ ammonium acetate-5.0 mmol·L⁻¹ acetic acid and acetonitrile, with gradient elution. Collision energy was used in NCE mode. The chromatographic effluents were detected by mass spectrometry in both positive and negative ion mode of the electrospray ion source. The main chromatographic peaks were assigned with the reference substance, secondary mass spectrometry information and related literatures. **Results** Totally 25 volatile components and 32 soluble components were identified in the extract of styrax. **Conclusion** This method is accurate, stable, and repeatable, and can be used for the determination of components in styrax.

Key words: styrax; chemical component; GC-TOF-MS; UHPLC-QE-MS

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81903837); 医院助推面上项目资助 (No.XJZT19Z08)。

作者简介: 牟菲, 女, 博士研究生, 主要从事心脑血管中药研究, email: mufei123456@126.com ***通信作者:** 王婧雯, 女, 副主任医师, 主要从事中药与临床药学相关研究, email: wangjingwen8021@163.com

苏合香 (styrax; storax; Suhexiang) 是从金缕梅科植物苏合香树 (*Liquidambar orientalis* Mill.) 的树干渗出并精制而成的一种香树脂, 具有“温通心脉”之功效, 相关方剂治疗冠心病临床疗效确切、应用广泛^[1-4]。苏合香作为树脂和油状液体混合物, 化学成分十分复杂, 目前仅靠单一指标性成分鉴定很难全面反映苏合香的内在质量差异。因此, 全面分析苏合香化学成分对于苏合香药效物质的筛选及其二次开发具有重要意义。

中药多维度数据的分析和利用成为新的掣肘问题, 质谱联用技术以其高分辨率、高分离性和高灵敏度等优势著称, 使用该技术, 无需参照标准物质, 即可精确地表征中药中含有的化合物的结构, 包括精确质量数、元素组成和质谱碎片信息等, 现已被广泛应用于中药化学成分鉴定^[5-7]。因此, 本研究首次采用 GC-TOF-MS 结合 UHPLC-QE-MS 的分析方法对苏合香化学成分进行初步定性分析, 以期对苏合香防治疾病的药效物质筛选提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 7890B 气相色谱 -LECO PEGASUS HT 质谱仪联用系统 (Agilent); Vanquish UHPLC-Q Exactive HFX 质谱联用仪系统 (Thermo); 涡旋仪 (江苏其林贝尔公司); 超纯水机 (德国默克密理博 Milli-Q); 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

肉桂酸肉桂酯、4-羟基肉桂酸对照品 (上海易恩化学技术有限公司), 肉桂酸苄酯、肉桂醛对照品 (北京百灵威科技有限公司), 肉桂酸对照品 (中国食品药品检定研究院), 上述对照品批号分别为 R020240、R006198、JK508307、JK188151、110786, 含量均大于 98%, 均于 4℃ 冷藏备用。

色谱纯甲醇和乙腈 (德国 CNW Technologies 公司)、色谱纯乙酸铵 (美国 Sigma-Aldrich 公司)、乙酸 (美国 Fisher Chemical 公司)、超纯水 (电阻率为 18.25 MΩ) 由超纯水机系统制备; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 GC-TOF-MS 法测定苏合香挥发性成分

2.1.1 供试品溶液制备 精密称取苏合香提取物 1 g 置 5 mL EP 管中, 并加入 3 mL 预冷甲醇冰水浴超声 10 min, 静置后将供试品溶液 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液置进样瓶中待测。

2.1.2 检测条件 Agilent 7890B 气相色谱 -LECO

PEGASUS HT 质谱仪联用系统, 毛细管柱为 Agilent DB-5MS (30 m×250 μm×0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, USA), GC-TOF-MS 具体参数设置见表 1。

表 1 GC-TOF-MS 上机检测参数设定
Tab 1 Detection parameter of GC-TOF-MS

项目	参数
进样量 /μL	1
分流模式 Split	15 : 1
隔垫吹扫流速 / (mL·min ⁻¹)	3
载气	氦气
色谱柱	DB-5MS (30 m×250 μm×0.25 μm)
柱流速 / (mL·min ⁻¹)	1
柱箱升温程序	40℃ 保持 5 min, 以 10℃·min ⁻¹ 升至 110℃, 以 5℃·min ⁻¹ 升至 190℃, 以 8℃·min ⁻¹ 升至 240℃
前进样口温度 /℃	280
传输线温度 /℃	280
离子源温度 /℃	230
电离电压 /eV	- 70
质量范围 (m/z)	35 ~ 500
扫描速率 / (spectra·s ⁻¹)	12.5
溶剂延迟 /min	6.25

2.1.3 数据分析 使用 LECO 公司的 Chroma TOF 工作站软件 (Version 4.3x) 和 NIST 数据库 (<https://www.nist.gov/index.html>) 对质谱数据进行了峰提取、基线校正、解卷积、峰积分、峰对齐、质谱匹配等分析确定苏合香中的化学成分, 并通过面积归一化法计算各化学成分在苏合香中的相对百分含量。

2.1.4 成分识别 采用 GC-TOF-MS 质谱联用仪进行分离分析, 得到苏合香成分质谱总离子流图, 如图 1 所示。以面积归一化法测定各成分相对百分含量, 经 Chroma TOF 软件和 NIST 库对质谱数据进行检索对比, 并结合标准质谱图鉴定化学成分, 按照目标物与标准物的相似度达 80%, 初步鉴定出苏合香提取物中 25 个挥发性成分, 占苏合香提取物色谱峰总面积的 97.7%, 主要成分有肉桂酸肉桂酯 (29.46%)、肉桂醇 (11.17%)、肉桂酸苄酯 (8.83%)、苯甲酸肉桂酯 (6.69%)、β-石竹烯 (2.47%)、肉桂醛 (2.02%) 和苯乙烯 (0.77%) 等, 具体成分及其相对含量结果如表 2 所示。

2.2 UHPLC-QE-MS 法测定苏合香可溶性成分

2.2.1 供试品溶液制备 精密称取苏合香提取物 1 g, 加入 3 mL 甲醇, 过 0.45 μm 滤膜, 样品稀释至 50 mg·mL⁻¹ 上机检测; 每个对照品称取 10 mg, 用甲醇定容到 1 mL, 得到 10 mg·mL⁻¹ 对照品溶液, 过 0.45 μm 滤膜后取等体积混合,

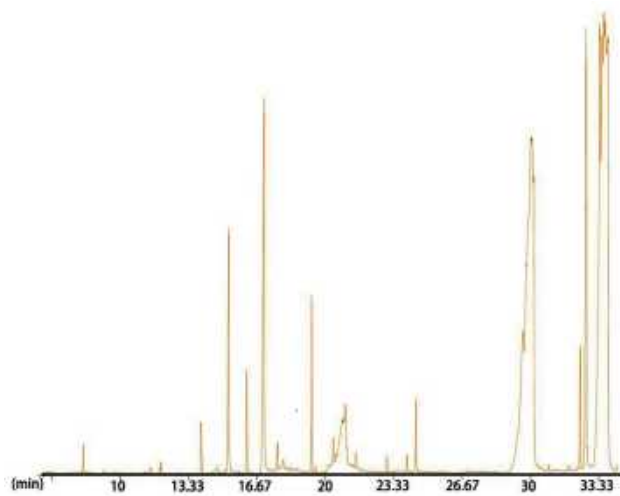


图 1 苏合香 GC-TOF-MS 总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of styrax based on GC-TOF-MS

混标稀释 1000 倍上机检测。

2.2.2 检测条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 质谱仪为 Thermo Q Exactive HFX, 一级、二级质谱数据采集为 Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, USA); UH-PLC-QE-MS 具体参数设置见表 3。

2.2.3 数据分析 使用 ProteoWizard 软件, 将原始数据转成 mzXML 格式后, 然后进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理, 将收集到的苏合香的化合物名称、分子式、加合离子、*m/z* 值、一级和二级质谱碎片等信息, 导入自建二级质谱数据库匹配进行物质注释, 算法打分的 Cutoff 值设为 0.3。MS² score 为二级质谱匹配定性打分值, 取值范围为 0 ~ 1, 越接近于 1, 代表匹配结果可信

表 2 苏合香的挥发性成分及其相对含量

Tab 2 Volatile components of styrax and their relative mass fractions

No.	<i>t_R</i> /min	名称	分子式	CAS	相对含量 /%
1*	33.51	肉桂酸肉桂酯 (cinnamyl cinnamate)	C ₁₈ H ₁₆ O ₂	122-69-0	29.46
2	16.92	肉桂醇 (cinnamyl alcohol)	C ₉ H ₁₀ O	104-54-1	11.17
3	33.72	未知物 (unknown)	—	—	9.32
4*	32.73	肉桂酸苄酯 (benzyl cinnamate)	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	103-41-3	8.83
5	33.37	3-苯丙酸苯酯 (3-phenylpropyl benzenepropanoate)	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	60045-27-4	7.55
6	32.41	苯甲酸肉桂酯 (Z-cinnamyl benzoate)	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	5320-75-2	6.69
7	15.23	3-苯丙醇 (3-phenylpropanol)	C ₉ H ₁₂ O	122-97-4	6.25
8	13.94	4-乙基苯酚 (phenol, 4-ethyl-)	C ₈ H ₁₀ O	123-07-9	3.71
9	33.58	二氢吲哚 [indoline, 2-(hydroxydiphenylmethyl)-]	—	—	3.18
10	19.32	β-石竹烯 (caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	87-44-5	2.47
11*	16.15	肉桂醛 (cinnamaldehyde)	C ₉ H ₈ O	104-55-2	2.02
12	24.38	萘酚 [1-naphthalenol, 1, 2, 3, 4, 4a, 7, 8, 8a-octahydro-1, 6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-]	—	—	1.35
13	17.90	氢化肉桂酸 (hydrocinnamic acid)	C ₉ H ₁₀ O ₂	501-52-0	0.97
14	8.18	苯乙烯 (styrene)	C ₈ H ₈	100-42-5	0.77
15	20.37	肉桂酸乙酯 (ethyl cinnamate)	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	103-36-6	0.74
16	17.66	3-苯丙酸乙酯 (ethyl 3-phenylpropanoate)	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	2021-28-5	0.70
17	20.18	2'-羟基苯乙酮 (2'-hydroxyacetophenone)	C ₈ H ₈ O ₂	118-93-4	0.43
18	33.76	肉桂酸苯乙酯 (phenethyl cinnamate)	C ₁₇ H ₁₆ O ₂	103-53-7	0.41
19	23.95	表蓝桉醇 (epiglobulol)	C ₁₅ H ₂₆ O	88728-58-9	0.33
20	11.99	琥珀酸二甲酯 (dimethyl succinate)	C ₆ H ₁₀ O ₄	106-65-0	0.29
21	11.46	苯甲醇 (benzyl alcohol)	C ₇ H ₈ O	100-51-6	0.24
22	21.05	衣兰油烯 (muurolene)	C ₁₅ H ₂₄	10208-80-7	0.23
23	20.11	葎草烯 (humulene)	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6	0.21
24	22.99	氧化石竹烯 (caryophyllene oxide)	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6	0.20
25	30.90	蒎烯 (pinene)	C ₁₀ H ₁₆	2437-95-8	0.20

注 (Note): * 经对照品比对 (* Compared with chemical reference substance)。

度越高。对于有对照品的化合物, 将此化合物与对照品的色谱保留时间 *t_R* 和一级、二级质谱数据进一步比对确认。对于无对照品的化合物, 随后将得到的色谱图用 TOPPView 软件打开, 根据 *t_R*

分析二级质谱数据, 与 METLIN (<https://metlin.scripps.edu>) 和 HMDB 数据库中的二级碎片信息比对推断性地鉴定化合物。

2.2.4 成分识别 为苏合香在正离子和负离子

表 3 UHPLC-QE-MS 上机检测参数设定
Tab 3 Detection parameter of UHPLC-QE-MS

项目	参数
进样量 / μL	2
样品盘温度 / $^{\circ}\text{C}$	4
色谱柱	HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)
流动相	A. 水相 (含 5.0 mmol \cdot L $^{-1}$ 乙酸铵和 5.0 mmol \cdot L $^{-1}$ 乙酸), B. 乙腈
洗脱梯度	0 ~ 3 min, 20%B; 3 ~ 8 min, 20% ~ 50%B; 8 ~ 10 min, 50% ~ 95%B; 10 ~ 15 min, 95% ~ 20%B
鞘层气体流量 /Arb	50
辅助气体流量 /Arb	15
毛细管温度 / $^{\circ}\text{C}$	320
全 MS 分辨率	60 000
MS/MS 分辨率	15 000
NCE 模式下碰撞能量	10/30/60 in NCE mode
喷雾电压	3.8 kV (positive), -3.4 kV (negative)

模式下的 UHPLC-QE-MS 总离子流图见图 2。结合一级、二级质谱信息、对照品信息, 以及与 METLIN 和 HMDB 数据库中的二级碎片信息比对推断, 初步鉴定出苏合香中的 32 个化学成分, 即正离子模式下 19 个, 负离子模式下 13 个, 具体识别出的苏合香主要化学成分信息见表 4 和表 5。

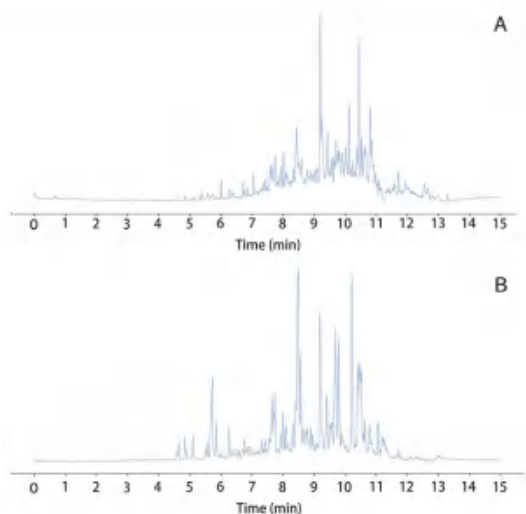


图 2 苏合香 UHPLC-QE-MS 的总离子流图
Fig 2 Total ion chromatogram of styrax based on UHPLC-QE-MS.
A. 正离子模式 (positive ion mode); B. 负离子模式 (negative ion mode)

2.2.5 质谱解析举例 根据二级离子质谱裂解碎片与数据库或对照品对比, 结合相关文献分析。识别出的化合物详细的 MS/MS 数据见表 4 和表 5。本试验以肉桂酸肉桂酯、肉桂酸苄酯、苯甲酸为例来阐明裂解途径。

肉桂酸肉桂酯的裂解途径见图 3, 在正离子模式下得到准分子离子 m/z 265.1223 $[\text{M} + \text{H}]^+$,

它在很小的碰撞能量下易发生酯键断裂, 得到碎片离子 m/z 131.0489; 继而失去 CO 分子, 得到 m/z 103.0541 碎片离子; m/z 103.0541 碎片离子发生断裂, 脱掉侧链 CH 生成丰度较高的碎片离子 m/z 91.0540; 经过正离子裂解途径分析, 可确证该物质为肉桂酸肉桂酯。

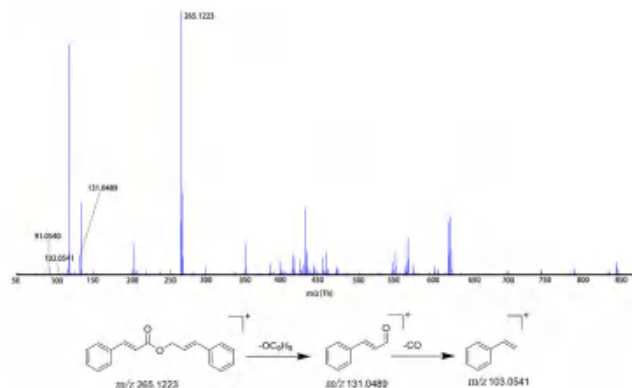


图 3 正离子下肉桂酸肉桂酯二级质谱图及裂解途径
Fig 3 MS² spectrum and fragmentation pathways of cinnamyl cinnamate in positive ion mode

肉桂酸苄酯的裂解途径见图 4, 在正离子模式下得到准分子离子 m/z 239.1067 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 与肉桂酸肉桂酯相似, 它可以在极低能量下发生酯键断裂, 得到碎片离子 m/z 131.0487; 再次失去 CO 分子, 得到碎片离子 m/z 103.0541; m/z 103.0541 碎片离子发生断裂后继续脱掉 CH 产生碎片离子 m/z 91.0540; 经过离子裂解途径分析, 可确证该物质为肉桂酸苄酯。由以上可总结出肉桂酸酯类的裂解规律, 如图 5 所示。

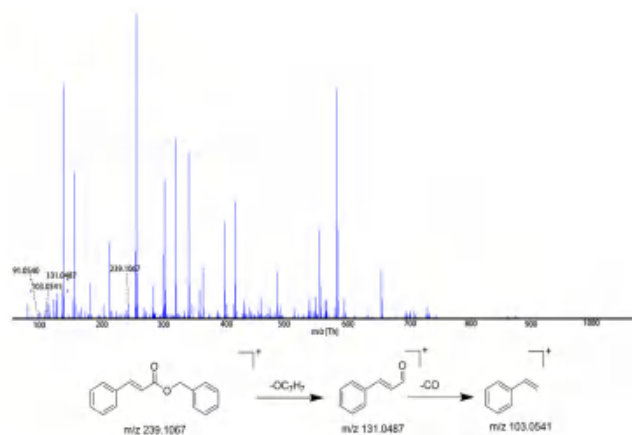


图 4 正离子下肉桂酸苄酯二级质谱图及裂解途径
Fig 4 MS² spectrum and fragmentation pathways of benzyl cinnamate in positive ion mode

苯甲酸在正离子模式下得到准分子离子 m/z 123.0441 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 与精确分子质量理论值相比, 二级匹配的打分 MS² score 为 0.9097, 二级碎片离子为 m/z 105.0337 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 在负离子

表 4 正离子模式下苏合香 UHPLC-QE-MS 检测化学物质成分表征

Tab 4 Identification of chemical components in styrax by UHPLC-QE-MS in positive ion mode

No.	t_R /min	名称	MS ² .score	m/z	分子式	CAS	HMDB	MS/MS
1	5.1422	苯甲酸 (benzoic acid)	0.9097	123.0441	C ₇ H ₆ O ₂	65-85-0	HMDB0001870	123.0441, 105.0337
2	5.7861	苯乙烯 (styrene)	0.9138	105.0696	C ₈ H ₈	100-42-5	HMDB0034240	87.0637, 79.0548
3	6.5059	苯甲醛 (benzaldehyde)	0.6075	107.0490	C ₇ H ₆ O	100-52-7	HMDB0006115	91.0547, 89.0602, 79.0547
4	6.7278	苯乙酸肉桂醇酯 (cinnamyl phenylacetate)	0.5019	253.1216	C ₁₇ H ₁₆ O ₂	7492-65-1	HMDB0037707	119.0491, 93.0699, 63.0229
5*	6.7815	肉桂醛 (cinnamaldehyde)	0.6837	133.0644	C ₉ H ₈ O	104-55-2	HMDB0003441	115.0538, 107.0490, 91.0539
6	7.8023	氧化石竹烯 (caryophyllene alpha-oxide)	0.8675	221.1896	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6	HMDB0036789	179.1436, 163.1487, 137.1330
7*	8.2823	肉桂酸苄酯 (benzyl cinnamate)	0.9093	239.1067	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	103-41-3	HMDB0040286	131.0487, 103.0541, 91.0540
8	8.3410	肉桂酸乙酯 (ethyl cinnamate)	0.9974	177.0904	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	4192-77-2	HMDB0033834	131.0488, 103.0540, 91.0540
9	8.7742	对-甲苯 (o-ethyltoluene)	0.8566	121.1009	C ₉ H ₁₂	—	HMDB0059819	105.0700, 93, 0700, 77.0387
10	9.2815	二氢萘蒾烯 (3, 4-dihydro-cadalene)	0.3486	201.1633	C ₁₅ H ₂₀	21391-99-1	HMDB0036453	175.1487, 147.1174, 95.0861
11*	9.4364	肉桂酸 (cinnamic acid)	0.9967	149.0592	C ₉ H ₈ O ₂	621-82-9	HMDB0000567	103.0541, 79.0540, 57.0347
12	9.8523	环氧蒾烯 (α -pinene-oxide)	0.6368	153.1269	C ₁₀ H ₁₆ O	1686-14-2	HMDB0003667	137.0959, 119.0851, 95.0852, 81.0696
13*	10.2563	肉桂酸肉桂酯 (cinnamyl cinnamate)	0.7133	265.1223	C ₁₈ H ₁₆ O ₂	122-69-0	HMDB0033832	131.0489, 103.0541, 91.0540
14	10.3517	橙花叔醇 (nerolidol)	0.7346	223.2055	C ₁₅ H ₂₆ O	7212-44-4	HMDB0035662	189.1635, 148.0951, 91.0540
15	10.8809	γ -松油烯 (γ -terpinene)	0.8339	137.1321	C ₁₀ H ₁₆	99-85-4	HMDB0005806	137.1321, 109.1010, 93.0696
16	10.9159	邻二甲苯 (o-xylene)	0.9686	107.0853	C ₈ H ₁₀	—	HMDB0059851	91.0540, 81.0696
17	11.6829	γ -杜松烯 (γ -cadinene)	0.9398	205.1948	C ₁₅ H ₂₄	483-74-9	HMDB0038207	161.1320, 121.1009, 95.0852
18	12.2378	苯乙醛 (phenylacetaldehyde)	0.8690	121.0646	C ₈ H ₈ O	122-78-1	HMDB0006236	121.0646, 103.0538, 71.0602
19	12.3481	α -杜松烯 (α -cadinene)	0.9388	205.1949	C ₁₅ H ₂₄	24406-05-1	HMDB0038205	155.1286, 121.1009, 119.0851

注 (Note): * 经与对照品比对 (* Compared with chemical reference substance)。

表 5 负离子模式下苏合香 UHPLC-QE-MS 检测化学物质成分表征

Tab 5 Identification of chemical components in styrax by UHPLC-QE-MS in negative ion mode

No.	t_R /min	名称	MS ² .score	m/z	分子式	CAS	HMDB	MS/MS
1	4.0031	香草酸 (vanillic acid)	0.9841	167.0349	C ₈ H ₈ O ₄	121-34-6	HMDB0000484	151.0031, 107.0133, 80.9977
2	4.3076	原儿茶醛 (3, 4-dihydroxybenzaldehyde)	0.5661	137.0245	C ₇ H ₆ O ₃	139-85-5	HMDB0059965	119.0133, 107.0133, 79.0187
3	4.5688	香兰素 (vanillin)	0.5153	151.0402	C ₈ H ₈ O ₃	121-33-5	HMDB0012308	135.0082, 103.0184, 79.0184
4	5.1480	3-羟基苯乙酸 (3-hydroxyphenylacetic acid)	0.9440	151.0402	C ₈ H ₈ O ₃	621-37-4	HMDB0000440	133.0290, 107.0446, 91.0184
5	5.4817	邻香豆酸 (2-hydroxycinnamic acid)	0.9976	163.0400	C ₉ H ₈ O ₃	583-17-5	HMDB0002641	119.0503, 101.0397, 93.0346
6	5.5897	氢化肉桂酸 (hydrocinnamic acid)	0.8090	149.0609	C ₉ H ₁₀ O ₂	501-52-0	HMDB0000764	131.0502, 121.0294, 89.0244
7	5.6847	4-甲氧基肉桂酸 (4-methoxycinnamic acid)	0.9441	177.0560	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	830-09-1	HMDB0002040	103.0553, 89.0397
8*	5.7167	反式肉桂酸 (trans-cinnamic acid)	0.9981	147.0452	C ₉ H ₈ O ₂	140-10-3	HMDB0000930	103.0553, 77.0398, 61.0884
9*	7.8823	4-羟基肉桂酸 (4-hydroxycinnamic acid)	0.9997	163.0399	C ₉ H ₈ O ₃	7400-08-0	HMDB0002035	119.0504, 91.0554
10	8.3497	间香豆酸 (m-coumaric acid)	1.0000	163.0399	C ₉ H ₈ O ₃	588-30-7	HMDB0001713	137.0245, 121.0294, 93.0349, 73.0394
11	10.0348	苯甲酸 (benzoic acid)	0.9811	121.0285	C ₇ H ₆ O ₂	65-85-0	HMDB0001870	121.0285, 77.0389
12	10.2196	山楂酸 (maslinic acid)	0.8268	471.3392	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	4373-41-5	HMDB0002392	453.3374, 399.2541, 303.2330
13	14.9916	顺式-己二烯二酸 (cis, cis-muconic acid)	1.0000	141.0170	C ₆ H ₆ O ₄	1119-72-8	HMDB0006331	79.0189, 53.0397

注 (Note): * 经与对照品比对 (* Compared with chemical reference substance)。

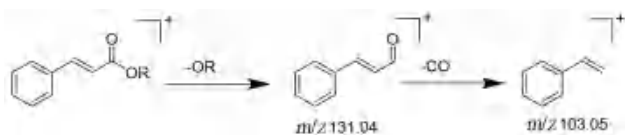


图 5 肉桂酸酯类成分的裂解途径
Fig 5 Fragmentation pathways of cinnamates

模式下得到准分子离子 m/z 121.0285 $[M-H]^-$ ，与精确分子质量理论值相比，二级匹配的打分 MS^2 score 为 0.9811，二级碎片离子 m/z 77.0389 $[M-H-COO]^-$ ，经过正负离子裂解途径分析，可确证该物质为苯甲酸（见图 6）。

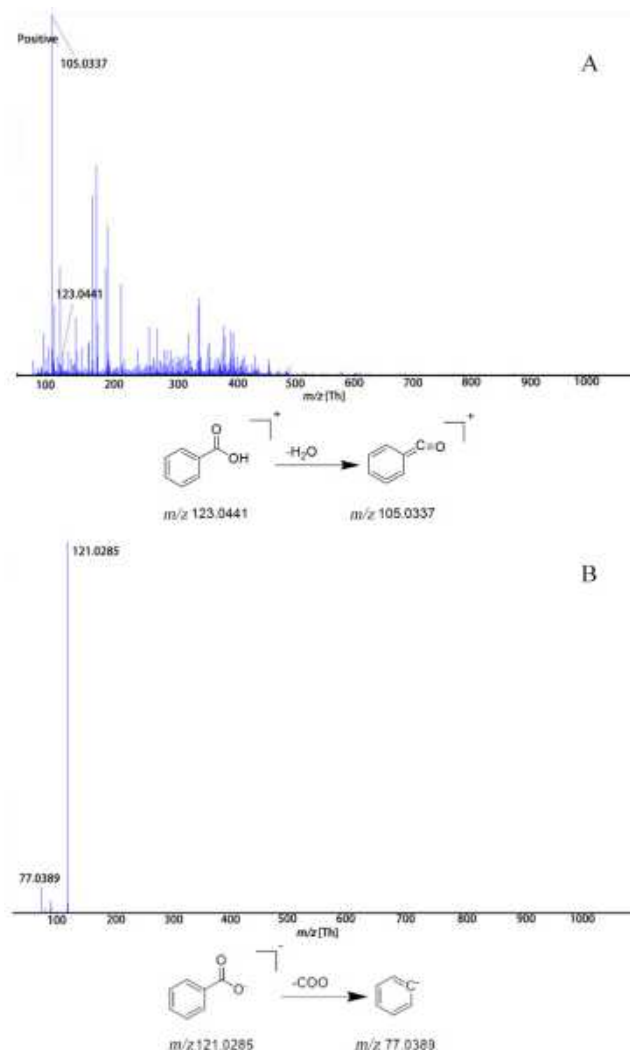


图 6 正离子 (A) 及负离子模式 (B) 下苯甲酸二级质谱图及裂解途径

Fig 6 MS^2 spectrum and fragmentation pathways of benzoic acid in positive ion (A) and negative ion (B) mode

3 讨论

苏合香是一种由树脂和油状液体混合而成的复杂物质，仅依靠单一指标性成分进行鉴别，很难全面反映苏合香的内在质量差异。因此，建立一种同时测定多指标成分的方法十分必要。刘莉等^[8]建

立了同时检测苏合香中肉桂酸肉桂酯、肉桂酸苄酯、苯甲酸苄酯、苯甲酸的 GC 方法。苏德民等^[9]通过 GC-MS 技术分离鉴定出苏合香中的 73 个成分，占总提取物色谱峰总面积 87%。孙胜南等^[10]应用 GC-MS 技术发现肉桂酸肉桂酯、肉桂酸 3- 苯基丙酯、肉桂酸、肉桂醇、肉桂酸苄酯和 β - 石竹烯是苏合香中含量较高的几种成分。此外，也有学者应用 HPLC 法检测出苏合香中肉桂酸乙酯、肉桂酸苄酯、肉桂酸肉桂酯、苯甲酸苄酯、甲酸、肉桂酸、脱氢松香酸、松香酸等成分^[11-12]。目前对苏合香化学成分分析多为单一方法和个别指标的定性检测，尚未见苏合香多技术联用检测方法的报道，因此，全面分析苏合香化学成分轮廓对于其药效物质基础筛选及二次开发具有重要意义。

3.1 提取溶剂的选择

以甲醇和正己烷作为苏合香提取溶剂进行适宜性考察。结果表明，当使用甲醇作为萃取溶剂时，苏合香提取液不会出现乳化现象，并且检测到的色谱峰个数也更多。因此，本研究最终采用甲醇作为苏合香的提取溶剂，这一发现可为后续苏合香成分分析提供指导和借鉴。

3.2 GC-TOF-MS 识别分析

当应用 GC-TOF-MS 识别苏合香的化学成分时，恒温方式很难实现良好的分离，并且会降低质谱检测的分辨率。共鉴定出苏合香提取物中 25 个挥发性成分，占苏合香提取物色谱峰总面积的 97.7%，其中含量较高的化学成分有肉桂酸肉桂酯 (29.46%)、肉桂醇 (11.17%)、肉桂酸苄酯 (8.83%)、苯甲酸肉桂酯 (6.69%)、石竹烯 (2.47%)、肉桂醛 (2.02%)、苯乙烯 (0.77%) 等，识别色谱峰总面积占比优于目前文献报道^[9]。

3.3 UHPLC-QE-MS 识别分析

当应用 UHPLC-QE-MS 识别苏合香的化学成分时，我们对流动相比例设置进行了考察，发现当水相中添加 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸时，苏合香的各成分质谱响应较好，分辨率最佳。由于苏合香中多含树芳香烃类和萜类成分，且部分成分极性十分接近，因此本研究最终采用了方法学所述的梯度洗脱方式。在正离子和负离子模式下，均鉴定出了系列肉桂酸及其衍生物，且这些衍生物在不同文献中均有报道^[10-11, 13]。UHPLC-QE-MS 识别分析出的代表性成分有肉桂酸、肉桂醛、肉桂酸肉桂酯、肉桂酸苄酯、苯乙酸肉桂醇酯、苯乙烯、苯甲酸等。此外，我们以正负离子模式下肉桂酸肉桂酯、肉

桂酸苄酯和苯甲酸举例分析了裂解规律,为苏合香化学成分识别确认提供试验基础。

3.4 未来展望

苏合香质量标准现收载于 2020 年版《中国药典》一部,主要是针对苏合香性状、化学鉴别、薄层鉴别、酸值、皂化值、肉桂酸测定等的研究^[14]。针对药典以苏合香中的肉桂酸作为质量鉴定成分,文献中多采用碱水解的方式测定水解后的总肉桂酸的含量,这种测定转化后的成分而不是选择测定原形成分,无法体现苏合香的成分类型,质控指标单一且专属性不强,可能会出现企业为达到《中国药典》的标准而掺伪掺假的情况^[15]。本试验通过对苏合香提取物溶解性以及对其物质基础的了解,采用 GC-TOF-MS 联合 UHPLC-QE-MS 技术对苏合香进行化学成分轮廓研究,发现肉桂酸肉桂酯、肉桂酸苄酯、肉桂醇、肉桂酸、肉桂醛、苯甲酸、苯乙烯等成分可能是苏合香的代表性化学成分。因此,建议综合考虑苏合香标准中含量测定的指标以及前处理方法,增加测定方法的专属性。

参考文献

- [1] Wang L, Guan XQ, He RJ, et al. Discovery and characterization of pentacyclic triterpenoid acids in styrax as potent and reversible pancreatic lipase inhibitors [J]. *J Funct Foods*, 2020, 74: 104159.
- [2] Zhou M, Li DN, Li L, et al. Post-stroke treatment of storax improves long-term outcomes of stroke in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114467.
- [3] Xu Z, Lu DN, Yuan JM, et al. Storax attenuates cardiac fibrosis following acute myocardial infarction in rats via suppression of AT1R-Ankrd1-P53 signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (21): 13161.
- [4] 刘萍,于绍帅,何新荣.中药苏合香研究进展[J].*中国药物应用与监测*, 2010, 7 (5): 315-317.
- [5] 张瑶,葛飞,申冰清,等.基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的桃核承气汤化学成分快速鉴定[J].*中南药学*, 2023, 21 (1): 28-36.
- [6] 张尚霞,王宇红,龙红萍,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 法的郁金水提物的化学成分研究[J].*中南药学*, 2021, 19 (5): 820-826.
- [7] 高添,杨凌鉴,盛鑫康,等.基于 HPLC-Q-TOF/MS 和 GC/MS 的香丹注射液化学成分分析[J].*中成药*, 2019, 41 (2): 345-352.
- [8] 刘莉,黄晓婧,王欣,等.GC 法同时测定苏合香中的 4 种成分[J].*华西药学杂志*, 2019, 34 (5): 498-501.
- [9] 苏德民,姚发业,石竹.超临界 CO₂ 萃取分析苏合香的化学成分[J].*华西药学杂志*, 2005, 20 (5): 409-411.
- [10] 孙胜南,高海燕,陈志雄,等.源于同属植物的苏合香浸膏和芸香浸膏的成分分析及应用评价[J].*轻工科技*, 2023, 39 (1): 48-52.
- [11] 黄晓婧,李婷婷,肖春霞,等.基于 HPLC 波长切换法测定 7 种成分和化学计量学的苏合香质量评价研究[J].*中国中药杂志*, 2019, 44 (14): 3070-3077.
- [12] 艾则孜·莫合买提,陈冬云,王伟萍,等.高效液相色谱双波长检测法测定苏合香丸中苯甲酸与肉桂酸的含量[J].*中国药师*, 2014, 17 (4): 692-694.
- [13] Xu Z, Lu DN, Yuan JM, et al. Storax, a promising botanical medicine for treating cardio-cerebrovascular diseases: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 785598.
- [14] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020.
- [15] 郭晓晗,李明华,程显隆,等.从苏合香的质量问题看进口药材的标准和监管[J].*中国食品药品监管*, 2022, 2 (3): 79-82.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-02)

不同晶型丹皮酚的药动学及抗痛经作用研究

周洪亮¹, 王海丹², 王泽琨³, 马丽娟^{1*} (1.南京中医药大学附属医院 药学部, 南京 210029; 2.南京中医药大学附属医院 基础药理实验室, 南京 210029; 3.南京中医药大学 第一临床医学院, 南京 210046)

摘要: **目的** 研究丹皮酚多晶型(晶型 I~III)的药动学特征及抗痛经作用差异。**方法** 大鼠单次灌胃给予丹皮酚的 3 种晶型各 $138 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 用超高效液相色谱法测定血浆中丹皮酚的质量浓度, 分析不同晶型丹皮酚的药动学差异; 采用雌激素与缩宫素建立大鼠原发性痛经模型, 多次灌胃给予丹皮酚 3 种晶型各 $138 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 通过行为学检测各组大鼠扭体潜伏期、扭体次数, ELISA 试剂盒检测子宫组织中前列腺素 E_2 、一氧化氮、肿瘤坏死因子 α ; HE 染色检测子宫组织病理变化。**结果** 采用非房室模型拟合计算丹皮酚晶型 I~III 的主要药动学参数, C_{\max} 分别为 (0.98 ± 0.23) 、 (1.34 ± 0.24) 、 $(1.88 \pm 0.38) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, t_{\max} 分别为 (120.00 ± 0.00) 、 (36.00 ± 13.42) 、 $(15.00 \pm 0.00) \text{ min}$, $AUC_{0 \sim 7\text{h}}$ 分别为 (144.62 ± 24.46) 、 (97.64 ± 24.14) 、 $(104.32 \pm 20.25) \text{ min} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ 分别为 (31.80 ± 5.19) 、 (27.57 ± 4.24) 、 $(28.34 \pm 4.74) \text{ min}$, $MRT_{0 \sim 7\text{h}}$ 分别为 (126.74 ± 6.86) 、 (60.49 ± 5.27) 、 $(50.82 \pm 3.17) \text{ min}$ 。丹皮酚对原发性痛经模型大鼠具有治疗作用, 不同晶型药效学结果存在一定差异, I 晶型在减少大鼠扭体次数、改善子宫炎症因子水平及病变等方面更具优势。**结论** 丹皮酚晶型 I 溶解、吸收速度慢于其他晶型, 能较好地维持血药浓度, 其抗痛经作用亦优于其他晶型, 具有良好的开发和应用前景。

关键词: 丹皮酚; 多晶型; 药动学; 药效差异

中图分类号: R283, R286 **文献标识码:** A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0043-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.007

Pharmacokinetics and anti-dysmenorrheal effect of paeonol polymorphs

ZHOU Hong-liang¹, WANG Hai-dan², WANG Ze-kun³, MA Li-juan^{1*} (1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029; 2. Department of Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029; 3. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046)

Abstract: Objective To determine the pharmacokinetic characteristics and difference in anti-dysmenorrhea effect of paeonol polymorphic forms (crystal forms I ~ III). **Methods** SD rats were orally administered with 3 crystal forms of paeonol at a dose of $138 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The plasma concentrations of paeonol were determined with ultra-high-performance liquid chromatography. Estrogen and oxytocin were used to establish a rat model of primary dysmenorrhea (PD). The rats were orally administered with 3 crystal forms of paeonol at a dose of $138 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ repeatedly. Writhing latency and times of PD rats in each group were tested by behavioral assessment. ELISA kits were used to measure the levels of prostaglandin E_2 , nitric oxide, and tumor necrosis factor α in the uterine tissues, and HE staining was performed to evaluate histopathological changes in the uterine tissues. **Results** The main pharmacokinetic parameters of paeonol form I, II, and III which were calculated by the non-compartment model as follows: C_{\max} was (0.98 ± 0.23) , (1.34 ± 0.24) , and $(1.88 \pm 0.38) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; t_{\max} was (120.00 ± 0.00) , (36.00 ± 13.42) , and $(15.00 \pm 0.00) \text{ min}$; $AUC_{0 \sim 7\text{h}}$ was (144.62 ± 24.46) , (97.64 ± 24.14) , and $(104.32 \pm 20.25) \text{ min} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ was (31.80 ± 5.19) , (27.57 ± 4.24) , and $(28.34 \pm 4.74) \text{ min}$; and $MRT_{0 \sim 7\text{h}}$ was (126.74 ± 6.86) , (60.49 ± 5.27) , and $(50.82 \pm 3.17) \text{ min}$. Paeonol had positive effect on PD rats, while different crystal forms resulted in different pharmacodynamic

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82003834)。

作者简介: 周洪亮, 男, 主管中药师, 主要从事中药制剂开发及作用机制研究, email: zhouh0112@126.com *通信作者: 马丽娟, 女, 副主任中药师, 主要从事中药炮制与质量控制研究, email: 39453403@qq.com

expressions. Crystal form I had advantages in reducing the writhing times in the rats, improving the level of inflammatory factors and pathological changes in the uterus. **Conclusion** The dissolution and absorption rate of paeonal form I are slower than those of other forms, which could better maintain the blood drug concentrations. Moreover, the anti-dysmenorrheal effect of form I is also superior to other forms, indicating its promising potential in development and application.

Key words: paeonol; polycrystalline; pharmacokinetics; drug efficacy difference

丹皮酚 (paeonol) 是一种天然的酚类化合物, 易溶于甲醇或乙醇, 溶于热水, 不溶于冷水^[1], 是毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.、芍药科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. 的主要活性物质。前期研究发现丹皮酚存在多晶型现象^[2], 多晶型是固体化合物普遍存在的一种现象, 晶型差异不仅影响药物的稳定性, 而且影响其溶解吸收过程, 从而影响疗效。丹皮酚固体制剂已在临床应用多年, 由于其多晶型现象的存在, 比较不同晶型之间的药物代谢动力学特点及药效差异对丹皮酚优势晶型的选择、药物质量水平的提高及临床疗效一致性的保证具有重要意义。

本实验在发现并表征丹皮酚 6 种晶型 (I ~ VI) 的基础上, 选取了体外溶出具有代表性的晶型 (I ~ III) 进行药动学研究^[2], 并在前期发现的丹皮酚抗痛经作用^[3]的基础上比较不同晶型的药效差异, 以期寻找其优势晶型奠定基础。

1 材料

1.1 试药

丹皮酚晶型 I、II、III (自制^[3], 不同晶型 XRPD 数据见表 1), 丹皮酚 (批号: 220503)、香豆素 (批号: 220425) (纯度均 $\geq 98\%$, 南京聚康医药化工有限公司), 羧甲基纤维素钠 (批号: 20190520, 国药集团化学试剂有限公司), 苯甲酸雌二醇注射液 (2 mL/4 mg, 批号: 20220201)、缩宫素注射液 (1 mL/10 单位, 批号: 20220201) (合肥新科信动物药业有限公司), 大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、大鼠前列腺素 E₂ (PGE₂) ELISA 试剂盒、组织一氧化氮 (NO) 定量检测试剂盒 (上海哈灵生物科技有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

表 1 丹皮酚不同晶型 XRPD 数据

晶型	2 θ /°
晶型 I	11.8, 13.8, 16.5, 21.1, 23.7, 24.5, 25.8, 27.7, 29.5, 31.8
晶型 II	12.0, 16.7, 25.1, 26.4, 26.8
晶型 III	11.8, 13.4, 16.7, 21.1, 23.7, 25.7

1.2 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠, 体重 180 ~ 220 g [上

海必凯科翼生物科技有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2018-0006]。

1.3 仪器

Agilent 1290 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司), Sartorius BP-211D 十万分之一电子分析天平 (赛多利斯公司), 高速冷冻离心机 (贝克曼库尔特有限公司), 多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); Eppendorf 离心机、微量移液器 (Eppendorf 公司); Pannoramic 1000 全景切片扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH)。

2 方法与结果

2.1 药动学研究

2.1.1 溶液的制备

① 对照品储备液: 精密称取丹皮酚对照品适量, 置 25 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 混匀, 得到质量浓度为 $471.34 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丹皮酚对照品储备液, 备用。

② 内标溶液: 精密称取香豆素适量, 置 10 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 混匀, 得到 $113.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标储备液。精密吸取内标储备液 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 混匀, 得到 $2.268 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液, 备用。

2.1.2 血浆样品的处理 精密量取待测血浆样品 100.0 μL , 置 1.5 mL EP 管中, 加入香豆素内标溶液 ($2.268 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 100.0 μL 及含 0.1% 甲酸的乙腈 200.0 μL , 涡旋 1 min 后 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 °C 离心 10 min, 上清液在室温下用氮气吹干, 100 μL 流动相复溶, 振荡 2 min, 离心, 取上清液备用。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse Plus C18 (4.6 mm \times 50 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈 -0.05% 甲酸水溶液 (50 : 50); 流速: $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 30 °C; 检测波长: 273 nm; 进样量: 10 μL 。

2.1.4 专属性实验 取空白血浆 (A)、空白血浆 + 丹皮酚 + 香豆素 (B) 及给药 1 h 的血浆样品 + 香豆素 (C), 照“2.1.2”项下方法处理后, 进样测定, 得各样品色谱图见图 1。结果表明, 香豆素 (内标) 及丹皮酚的保留时间分别为 2.8 min 和 4.5 min, 且峰形好, 血浆中的内源性物质与丹皮酚及香豆素分离度良好。

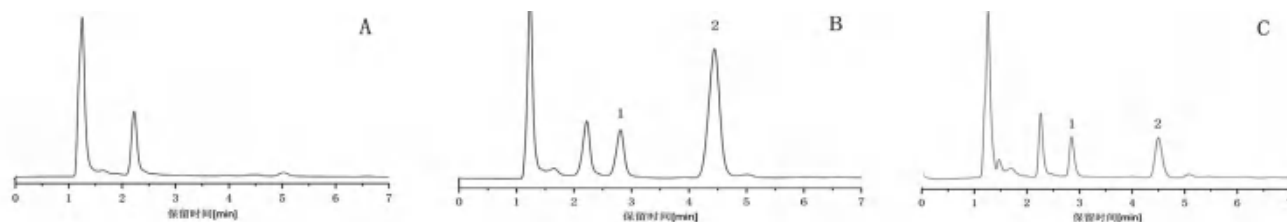


图 1 丹皮酚高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of paeonol

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆+丹皮酚+香豆素 (blank plasma + paeonol + coumarin); C. 口服丹皮酚 1 h 的血浆样品+香豆素 (blood sample at 1 h after an oral administration of paeonol + coumarin); 1. 香豆素 (coumarin); 2. 丹皮酚 (paeonol)

2.1.5 标准曲线的绘制及定量限 取空白血浆 100.0 μL , 置于 EP 管中, 加入香豆素 ($2.268 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 100.0 μL , 再分别加入 0.024、0.118、0.236、0.589、1.178、2.357、3.535 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丹皮酚对照品溶液 100 μL 及含 0.1% 甲酸的乙腈 100 μL , 涡旋 1 min 后 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 10 min, 取上清液, 室温下氮气吹干, 用 100 μL 流动相复溶, 进样测定。以丹皮酚质量浓度 (Y) 对丹皮酚峰面积与香豆素峰面积的比值 (X) 进行线性回归, 标准曲线方程为 $Y = 0.3851X - 0.0553$ ($r = 0.9991$), 丹皮酚在 $0.024 \sim 3.535 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系, 定量限为 $0.024 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.6 精密度、准确度考察 取空白血浆 100.0 μL , 分别加入不同质量浓度的丹皮酚对照品溶液至终浓度分别为 0.118、0.589、2.357 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每种浓度平行制备对照品血浆 5 份。照“2.1.2”项下方法处理后, 进样测定, 记录峰面积。每个浓度同日内测定 5 次, 考察日内精密度; 连续测定 3 d, 考察日间精密度。以测得值与真实值的比值计算回收率, 考察准确度。结果不同质量浓度的丹皮酚血浆样品的日内精密度 $RSD < 3.0\%$, 日间精密度 $RSD < 4.0\%$, 日内、日间回收率在 $81.2\% \sim 100.0\%$, 表明本法精密度、准确度均符合相关要求。

2.1.7 提取回收率 分别配制质量浓度为 0.118、0.589、2.357 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含药血浆各 5 份, 按照“2.1.2”项下方法处理后测定, 得峰面积 A; 取空白血浆, 按“2.1.2”项下方法沉淀蛋白后, 取上清液分别加入 0.118、0.589、2.357 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丹皮酚对照品溶液, 氮气吹干溶剂, 复溶后同法测定, 得峰面积 B。提取回收率 (%) = $A/B \times 100\%$, 结果丹皮酚的提取回收率均在 $88.2\% \sim 96.6\%$, $RSD < 5.0\%$ 。

2.1.8 稳定性 取空白血浆 100.0 μL , 分别加入不同质量浓度的丹皮酚对照品溶液, 使终质量浓度分别为 0.118、0.589、2.357 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每种浓度平行制备对照品血浆 5 份, 照“2.1.2”项下方法处理后, 分别在室温放置 36 h、 $-20 \sim 20^\circ\text{C}$ 反复冻

融 3 次和 -20°C 放置 30 d, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 考察稳定性。结果不同质量浓度的丹皮酚血浆样品经不同条件处理后的回收率在 $82.4\% \sim 101.0\%$, 均符合要求。

2.1.9 药动学研究 15 只 SD 雌性大鼠随机分成 3 组 (每组 5 只), 分别为晶型 I 组、晶型 II 组、晶型 III 组。给药前禁食 12 h, 自由饮水。每只大鼠分别单次灌胃给予同一粒径的 (通过三号筛, 不通过四号筛) 不同晶型丹皮酚粉末 $138 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以 0.2% CMC-Na 混悬^[4]), 分别于给药后 0、15、30、60、90、120、150、180、240、300、360、420 min 眼眶静脉丛取血 0.4 mL 置于肝素润洗过的 EP 管中, 以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 100 μL , 置于 2 mL EP 管中, 照“2.1.2”项下方法处理, 进样分析。计算不同时间点各晶型丹皮酚血药浓度, 绘制血药浓度-时间曲线, 使用 Phoenix WinNonLin 8.3.5 软件进行非房室模型拟合计算主要药动学参数, 采用 GraphPad Prism 9.4.1 软件对获得的组间数据进行单因素方差分析。根据血药浓度-时间曲线可知, 晶型 I 吸收较其他晶型慢, 该结果与各晶型体外溶出行为具有一致性, 晶型 II、III 药动学参数中的 t_{max} 、 $AUC_{0 \sim 7\text{h}}$ 、 $MRT_{0 \sim 7\text{h}}$ 与晶型 I 相比差异显著。其中, 达峰时间最长相差 115 min, 曲线下面积最大相差 32.5%, 平均滞留时间最大相差 75.9 min。主要药动学参数统计结果见表 2。

2.2 药效学研究

2.2.1 原发性痛经模型大鼠的制备及给药方案 SD 雌性大鼠 25 只, 随机分成 5 组 (每组 5 只), 分别为正常组, 模型组, 丹皮酚晶型 I 组、晶型 II 组、晶型 III 组。模型组和各给药组大鼠皮下注射苯甲酸雌二醇, 每日 1 次, 连续 10 d (第 1 日和第 10 日为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 第 2 ~ 9 日为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[5], 于第 3 ~ 10 日分别灌胃给予同一粒径的 (过三号筛, 不过四号筛) 不同晶型丹皮酚粉末 $138 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以 0.2% CMC-Na 混悬)。

2.2.2 行为学测试 最后一次 (第 10 日) 丹皮酚干预后 1 h, 每只大鼠腹腔注射缩宫素注射液 1

表 2 不同晶型丹皮酚在大鼠体内药动学参数 (n = 5)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of paeonol polymorphs (n = 5)

晶型	$t_{1/2}/\text{min}$	$t_{\text{max}}/\text{min}$	$C_{\text{max}}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$AUC_{0\sim 7\text{h}}/(\text{min} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$AUC_{0\sim \infty}/(\text{min} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$MRT_{0\sim 7\text{h}}/\text{min}$
晶型 I	31.8 ± 5.19	120.00 ± 0.00	0.98 ± 0.23	144.62 ± 24.46	146.67 ± 24.74	126.74 ± 6.86
晶型 II	27.57 ± 4.24	36.00 ± 13.42***	1.34 ± 0.24	97.64 ± 24.14*	99.76 ± 23.24*	60.49 ± 5.27***
晶型 III	28.34 ± 4.74	15.00 ± 0.00***##	1.88 ± 0.38***#	104.32 ± 20.25*	106.63 ± 21.62*	50.82 ± 3.17***#

注: 与晶型 I 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与晶型 II 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the crystal form I group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; compared with the crystal form II group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

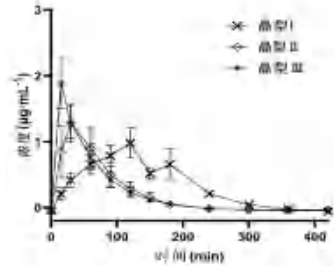


图 2 不同晶型丹皮酚在大鼠体内平均血药浓度 - 时间曲线图 (n = 5)

Fig 2 Plasma concentration-time curves in rats of paeonol different crystal forms (n = 5)

$\text{U} \cdot \text{kg}^{-1}[5]$ 。以扭体潜伏期和 20 min 内扭体次数为行为观察指标, 测定不同晶型丹皮酚对痛经模型大鼠的镇痛作用。大鼠扭体主要表现为腹部向内凹陷、躯干和后肢伸展、臀部和一侧的肢体内旋, 有时还有抱头舔腹的行为 [6-8]。

模型组大鼠均出现了明显的扭体反应, 表明原发性痛经模型建立成功。与模型组比较, 丹皮酚晶型 I、II、III 组均能显著降低扭体反应次数 ($P < 0.001$, 分别减少 80.2%、57.6%、52.5%), 晶型 III 与晶型 I 相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 丹皮酚对大鼠扭体潜伏期的影响虽然没有显著差异, 但仍具有一定的延长作用。综合比较, 丹皮酚晶型 I 对扭体反应的抑制作用优于晶型 II、III, 见图 3。

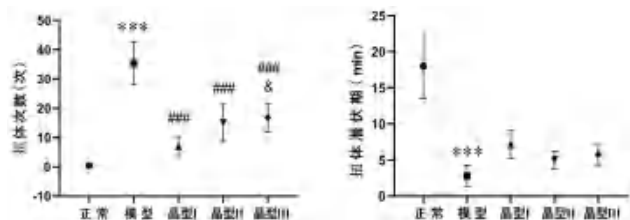


图 3 不同晶型丹皮酚对原发性痛经模型大鼠扭体次数和扭体潜伏期的影响 (n = 5)

Fig 3 Effect of paeonol polymorphs on writhing latency and writhing times of PD rats (n = 5)

注: 与正常组比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, ### $P < 0.001$; 与晶型 I 组比较, & $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, *** $P < 0.001$; compared with the model group, ### $P < 0.001$; compared with the crystal form I group, & $P < 0.05$.

2.2.3 大鼠子宫中炎症因子含量的测定 扭体试

验完成后, 大鼠腹腔注射戊巴比妥 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉, 剖腹, 取出子宫后剪取 200 mg 组织在冰浴下制成 10% 的子宫组织匀浆, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 10 min, 取上清液, 用于 PGE_2 、NO 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的测定。

结果与正常组比较, 模型组子宫中 PGE_2 、 $\text{TNF-}\alpha$ 含量明显升高, NO 含量则显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 丹皮酚不同晶型均能促使原发性痛经模型大鼠子宫组织中 PGE_2 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、NO 水平趋于正常化, 而 3 种晶型中晶型 I 改善最明显, 见表 3。

表 3 不同晶型丹皮酚对原发性痛经模型大鼠子宫组织中 PGE_2 、NO 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的影响 (n = 5)

Tab 3 Effect of paeonol polymorphs on PGE_2 , NO and $\text{TNF-}\alpha$ in the uterus of PD rats (n = 5)

组别	$\text{PGE}_2/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\text{NO}/(\mu\text{mol} \cdot \text{gprot}^{-1})$	$\text{TNF-}\alpha/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$
正常组	135.12 ± 3.60	11.01 ± 1.13	59.79 ± 8.33
模型组	175.27 ± 18.94**	6.39 ± 1.15***	177.77 ± 6.36***
晶型 I 组	140.83 ± 11.63#	10.80 ± 1.51###	78.77 ± 3.08###
晶型 II 组	145.57 ± 6.42	9.56 ± 0.80##	104.02 ± 12.41###&
晶型 III 组	144.54 ± 5.61	8.47 ± 0.40#&	108.82 ± 8.71###&&

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

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

2.2.4 组织病理学检测 分离大鼠子宫组织并浸泡于 4% 多聚甲醛固定液中进行固定, 乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切成 $5 \mu\text{m}$ 的切片后进行 HE 染色, 评价子宫组织病理学变化。结果正常组大鼠子宫组织形态正常, 组织平滑形态清晰, 上皮细胞单层柱状, 排列整齐, 腔壁结构各层完整、清晰。模型组大鼠子宫组织肌层结构紊乱模糊不清, 固有层水肿, 上皮细胞变性呈空泡样改变或坏死、脱落 (红色箭头), 炎症细胞浸润 (蓝色箭头)。不同晶型丹皮酚给药后大鼠子宫病变均不同程度改善并趋于正常化, 晶型 I 组改善最明显。各组子宫内膜相对平整, 空泡样改变大幅改善, 固有层水肿消失, 肌层纹理清晰, 见图 4。

3 讨论



图 4 不同晶型丹皮酚对原发性痛经大鼠子宫组织病理变化的影响

Fig 4 Effect of paconol polymorphs on the histopathological changes in the uterus of PD rats

A. 正常组 (normal group); B. 模型组 (model group); C. 晶型 I 组 (crystal form I group); D. 晶型 II 组 (crystal form II group); E. 晶型 III 组 (crystal form III group)

临床应用丹皮酚已有 50 多年的历史^[9], 主要上市剂型有丹皮酚片、丹皮酚注射液等, 它们对多种疼痛具有确切的治疗作用。多晶型现象是指一种化合物分子由于排列方式不同而形成的两种或者两种以上的晶型状态^[10]。药物的不同晶型可影响药物的吸收和生物利用度, 从而导致疗效的差异^[11]。本课题组前期共制备并表征了丹皮酚 6 种晶型, 体外溶出研究过程中发现, 所制备的各晶型中, 晶型 III 在各介质中溶出均较快, 晶型 II 次之, 晶型 I 溶出最慢^[2], 因此选取了上述 3 种晶型进行药动学及药效学对比研究。

本实验通过对大鼠口服不同晶型丹皮酚药动学及药效学进行比较, 探讨晶型对于药物吸收及临床疗效的影响, 因前期研究过程中发现丹皮酚抗痛经作用明显^[3], 因此药效学比较选择了大鼠痛经模型作为研究对象。难溶性药物的晶型及粒径均可能对药物的吸收产生较大影响, 本研究使用的丹皮酚为同一粒径的不同晶型样品, 这样可以更好地反映晶型这单一因素对吸收、疗效的影响。

药动学研究对比了乙腈沉淀与乙酸乙酯萃取对样品处理效果的影响, 结果采用乙酸乙酯萃取的血浆样品, 丹皮酚的提取回收率仅 50%~60%, 且容易出现乳化现象, 而乙腈沉淀法处理的血浆样品低浓度下回收率 > 80%, 中、高浓度回收率 > 90%, 且日内、日间精密度, 稳定性均符合要求。

运用 Phoenix WinNonLin 软件对 3 种晶型丹皮酚在大鼠体内的相关药动学参数进行分析, 结果表明, 各晶型丹皮酚代谢均较快, 大鼠口服半衰期仅 30 min 左右, 无显著性差异。然而, 根据丹皮酚血药浓度-时间曲线可见, 晶型 III 的吸收速度更快, 达峰浓度更高, 晶型 I 则吸收缓慢, 但是其平台期相对较长, 180 min 还存在一吸收峰, 该现象可能与丹皮酚的肠吸收有关。不同晶型丹皮酚抗痛经作用效果存在差异, 其中晶型 I 在抑制痛经模型大鼠甩尾及子宫组织中炎症因子等方面优于其他晶型, 分析可能与该晶型的溶解、释放速度有关, 体内研究中晶型 III 的达峰时间仅 15 min, 而晶型 I 则达到了 2 h, 达峰时间显著延长, 而丹皮酚的吸收、消除速度均较快, 因此慢溶出

的晶型能够维持较长时间的血药浓度, 从而达到更好的治疗效果, 这也提示丹皮酚制剂的开发应着重于缓控释制剂的研究, 而非提高溶解度。

本研究阐明了晶型对丹皮酚药动学及药效学的影响。丹皮酚吸收、消除速度极快^[12-13], 溶出、释放较慢的晶型 I 可以较好地维持血药浓度, 因而抗痛经作用优于其他晶型, 具有更高的开发价值。本研究可为丹皮酚优势晶型的选择及固体药物制剂的开发提供参考。

参考文献

- [1] 吴桂莹, 亓玉玲, 郝宝燕, 等. 丹皮酚衍生物及其药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50 (4): 1001-1006.
- [2] 周洪亮, 高紫薇, 田明鑫, 等. 丹皮酚多晶型的制备、表征及其体外溶出行为研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37 (2): 68-71, 76.
- [3] Peng Y, Zheng X, Fan ZY, et al. Paeonol alleviates primary dysmenorrhea in mice via activating CB2R in the uterus [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153151.
- [4] 马丽焱, 缪剑华, 许旭东, 等. 丹皮酚在清醒大鼠体内的药动学和绝对生物利用度 [J]. 时珍国医国药, 2009 (2): 413-414.
- [5] Chen Y, Cao Y, Xie Y, et al. Traditional Chinese medicine for the treatment of primary dysmenorrhea: how do Yuanhu painkillers effectively treat dysmenorrhea? [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20: 1095-1104.
- [6] 杨海燕, 王健, 李振国, 等. 艾附暖宫软胶囊对大鼠实验性痛经模型的作用 [J]. 中成药, 2019, 41 (1): 208-210.
- [7] 嵇波, 张露芬, 朱江, 等. 痛经模型建立和评价方法的思考 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24 (6): 711-714.
- [8] 聊晓玉, 方静, 方媛, 等. 黄精对原发性痛经大鼠药效作用初步研究 [J]. 中南药学, 2022, 20 (5): 1023-1027.
- [9] Zhang L, Li DC, Liu LF. Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 413-421.
- [10] Vippagunta SR, Brittain HG, Grant DJ. Crystalline solids [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 48 (1): 3-26.
- [11] 吕杨, 杜冠华. 晶型药物 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 6-97.
- [12] 横山俊夫, 张明发. 丹皮酚的吸收、分布、代谢及排泄 [J]. 陕西中医学院学报, 1978 (1): 89.
- [13] Tsai TH, Chou CJ, Chen CF. Pharmacokinetics of paeonol after intravenous administration in rats [J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83 (9): 1307-1309.

(收稿日期: 2023-08-08; 修回日期: 2023-10-24)

Nrf2 调控的氧化应激在 Adropin 抑制低氧肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用研究

陈昌贵, 易春峰, 王栋, 余志华, 贺立群* (武汉市第一医院心血管内科, 武汉 430022)

摘要: 目的 观察 Adropin 对低氧诱导的 SD 大鼠肺动脉平滑肌细胞 (PASMCs) 增殖及氧化应激的影响, 并探讨其可能机制。方法 以 1% 的 O₂ 作为诱导剂, 建立 PASMCs 增殖及氧化应激的细胞模型, 通过活性氧 (ROS) 激活剂 H₂O₂, 抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 及不同浓度 Adropin (100、300、1000 nmol · L⁻¹) 干预 24 h 后, 检测细胞增殖及 ROS, 筛选 Adropin 抑制增殖及氧化应激的最适浓度。选择 1000 nmol · L⁻¹ Adropin 和 / 或核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 抑制剂 ML385 在低氧条件下孵育 PASMCs 24 h, 并设置 Nrf2 激活剂富马酸二甲酯 (DMF) 作为阳性对照组, 通过 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖; DCFH-DA 探针联合荧光酶标仪测定细胞内 ROS 的水平; 试剂盒检测细胞内超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA) 的水平; 流式细胞仪检测细胞周期; Western blot 检测 Nrf2、细胞周期蛋白 (Cyclin) D1、Cyclin E 的表达。结果 与对照组相比较, H₂O₂ 及低氧均能够诱导 PASMCs 增殖及 ROS 生成, 而不同浓度的 Adropin (100、300、1000 nmol · L⁻¹) 和 NAC 均可抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖及 ROS 产生, 且 Adropin 抑制增殖及 ROS 产生具有浓度依赖性。与低氧组相比较, DMF 或 Adropin (1000 nmol · L⁻¹) 干预后, PASMCs 增殖及细胞内 ROS 水平下降, SOD、GPx、CAT 活性增加, MDA 水平下降, Nrf2 表达上调 ($P < 0.05$), 而 ML385 能够逆转 Adropin 的上述作用 ($P < 0.05$); DMF 或 Adropin 能够通过抑制 Cyclin D1 与 Cyclin E 的表达, 阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期, 从而抑制 PASMCs 增殖 ($P < 0.05$), 而 ML385 能够逆转 Adropin 上述作用 ($P < 0.05$)。结论 Adropin 可通过抑制氧化应激抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖, 其机制可能与激活 Nrf2 有关。

关键词: Adropin; 低氧; 肺动脉平滑肌细胞; 增殖; 氧化应激; 核因子 E2 相关因子 2

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0048-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.008

Role of Nrf2 regulated oxidative stress in inhibition of hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by Adropin

CHEN Chang-gui, YI Chun-feng, WANG Dong, YU Zhi-hua, HE Li-qun* (Department of Cardiology, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022)

Abstract: Objective To determine the effect of Adropin on hypoxia-induced proliferation and oxidative stress in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) of SD rats, and its possible mechanisms. **Methods** The 1%O₂ was used to induce the proliferation and oxidative stress of PASMCs, and then the reactive oxygen species (ROS) activator H₂O₂, antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and different concentrations of Adropin (100, 300, and 1000 nmol · L⁻¹) were used for PASMCs for 24 h. The cell proliferation and levels of ROS were measured to determine the optimal concentration of Adropin for inhibiting the proliferation and oxidative stress. To explore the molecular mechanisms of how Adropin suppressed the proliferation and oxidative stress of PASMCs, 1000 nmol · L⁻¹ Adropin and/or Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor ML385 were

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (No.2019CFB405)。

作者简介: 陈昌贵, 男, 主治医师, 主要从事肺血管重构研究, email: chenchanggui2008@aliyun.com * 通信作者: 贺立群, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事血管重构相关疾病的基础与临床研究, email: liqunhe0902@163.com

used to treat PASMCs for 24 h under hypoxic conditions. Nrf2 activator dimethyl fumarate (DMF) was used for the positive control group. The cell proliferation was analyzed by the CCK-8 kit; the intracellular ROS level was measured by DCFH-DA with fluorescence microplate reader. Intracellular superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) were determined with the kits. Cell cycle was detected by flow cytometry; the expressions of Nrf2, Cyclin D1 and Cyclin E were measured by Western blot. **Results** H₂O₂ and hypoxia-induced the proliferation and ROS production in PASMCs, while different concentrations of Adropin (100, 300, and 1000 nmol · L⁻¹) decreased the proliferation and ROS production in hypoxia-exposed PASMCs in a concentration-dependent manner. In addition, the effects of antioxidant NAC on the inhibition of proliferation and ROS production were comparable with those of 1000 nmol · L⁻¹ Adropin. Specifically, Adropin and DMF pretreatment downregulated the level of ROS and MDA, and upregulated the expression of antioxidant-related factors (SOD, GPx and CAT) via Nrf2 activation ($P < 0.05$). Adropin and DMF blocked the proliferation of hypoxia-exposed PASMCs by arresting the cell cycle progression in G₀/G₁ ($P < 0.05$). In accordance with these findings, DMF and Adropin induced inhibition of the cell cycle was associated with the inhibition of Cyclin D1 and Cyclin E ($P < 0.05$). Moreover, ML385 reversed the beneficial effects of Adropin on hypoxia-stimulated PASMCs ($P < 0.05$). **Conclusion** Adropin suppresses the proliferation of hypoxia-induced PASMCs via inhibition of the oxidative stress, whose mechanism may be related to the activation of Nrf2.

Key words: Adropin; hypoxia; pulmonary artery smooth muscle cell; proliferation; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

持续性低氧可导致肺血管重构, 进而引起肺动脉血管阻力增加, 过高的肺动脉阻力会导致肺动脉高压 (PH) 形成, 长期过高的肺动脉压力会诱发患者出现难以控制的右心衰竭而死亡^[1]。低氧肺动脉高压 (HPH) 是常见的 PH 类型。低氧导致的肺血管重构是 HPH 形成的基础, 其病理改变主要表现为肺小动脉中膜及内膜增厚、细胞外基质沉积、管腔变窄甚至闭塞。氧化应激、炎症、内皮细胞功能障碍、肺动脉平滑肌细胞 (PASMCs) 过度增殖等促进低氧肺血管重构发生^[2-3]。氧化应激能够通过促 PASMCs 过度增殖, 导致肺血管重构发生, 在 HPH 的发生发展中起至关重要的作用, 通过抗氧化剂抑制氧化应激能够抑制 PASMCs 的增殖, 从而抑制 HPH 形成^[4-5]。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是一种参与氧化应激的关键转录因子, 其在细胞核内与抗氧化响应元件结合促进下游抗氧化酶或蛋白的表达, 发挥抗氧化作用^[6]。Adropin 是一种分泌蛋白, 其由量动态平衡相关基因 (Enho) 编码, 在人类、大鼠和小鼠中具有相同的氨基酸序列^[7]。Adropin 与细胞增殖、内皮细胞功能、氧化应激、炎症、能量代谢等密切相关^[8-10]。研究发现 Adropin 可抑制主动脉平滑肌细胞 (ASMCs) 增殖及血管重构^[8, 11]。另有研究表明 Adropin 可激活 Nrf2, 抑制氧化应

激, 从而抑制非酒精性脂肪肝炎 (NASH)^[12]。而 Adropin 对低氧条件下 PASMCs 增殖及氧化应激的影响未见相关报道, 因此本研究观察 Adropin 对低氧诱导的 PASMCs 增殖及氧化应激的影响, 并探讨其可能的分子机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 170 ~ 190 g [北京维通利华动物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2016-0006]。

1.2 仪器

Dml Led 倒置荧光显微镜 (Leica 公司); 3131 和 311 细胞培养箱 (Thermo 公司); Synergy HT 多功能酶标仪 (Bio-tek 公司); FACSCalibur 型流式细胞仪 (BD 公司); Tanon-5200 全自动化学发光分析仪 (上海天能公司)。

1.3 试剂

PBS (批号: P2272)、H₂O₂ (批号: 323381)、抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸 (NAC, 批号: A0737)、I 型胶原酶 (批号: SCR103) (Sigma 公司); Nrf2 激活剂富马酸二甲酯 (DMF, 批号: S2586)、Nrf2 抑制剂 ML385 (批号: S8790) (Selleck 公司); 重组 Adropin (菲尼克斯医药公司); CCK-8 细胞增殖检测试剂盒 (批号: CK04, Dojindo); 活性氧

(ROS, 批号: S0033S)、超氧化物歧化酶 (SOD, 批号: S0101S)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx, 批号: S0058)、过氧化氢酶 (CAT, 批号: S0051)、丙二醛 (MDA, 批号: S0131S) 等检测试剂盒以及细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒 (批号: P0028)(碧云天生物科技有限公司); DMEM/F12 培养基 (批号: SH30023)、胰蛋白酶 (Trypsin, 批号: SH30042)、胎牛血清 (批号: SH30070) (Hyclone 公司); 细胞周期蛋白 (Cyclin) D1 (批号: 55506)、Cyclin E (批号: 20808)、Nrf2 (批号: 12721)、Lamin B1 (批号: 13435)、GADPH (批号: 5174) 等抗体 (Cell Signaling Technology)。

2 方法

2.1 SD 大鼠 PSMCs 原代培养

参考本研究课题组之前报道的方法^[13], 采用 0.2% I 型胶原酶体外消化分离 SD 大鼠的 PSMCs。用含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基培养 PSMCs, 当细胞传至第 3~4 代性状稳定后用于本研究。显微镜观察细胞为长梭形, 显“峰-谷”状生长。通过免疫细胞化学法检测 SM- α -actin 鉴定 PSMCs 纯度^[13] (本研究细胞纯度 > 95%)。

2.2 实验分组

筛选 Adropin 抑制低氧诱导的 PSMCs 增殖及氧化应激最适浓度相关实验分为 7 组: 对照组 (PBS)、H₂O₂ 干预组 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂)、低氧组 (PBS + 低氧)、NAC 干预组 (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAC + 低氧)、Adropin 干预组 [不同浓度的 Adropin (100、300、1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 低氧]。

Adropin 抑制 PSMCs 增殖及氧化应激机制相关实验分为 5 组: 对照组 (PBS)、低氧组 (PBS + 低氧)、DMF 干预组 (75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMF + 低氧)、Adropin 干预组 (1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Adropin + 低氧)、Adropin + ML385 干预组 (1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Adropin + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ML385 + 低氧)。各组细胞在给予低氧刺激前用不含胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养 24 h 使细胞同步化。低氧模拟条件为 1%O₂、5%CO₂ 和 94%N₂。常氧模拟条件为含 5% CO₂ 的空气。

2.3 CCK-8 检测细胞增殖

PSMCs 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 细胞经不同干预处理后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液后 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 3 h, 并设定空白组为对照 (100 μL DMEM/F12 培养基 + 10 μL CCK-8 溶液), 测定 450 nm 波长处吸光度 (OD 值), 实验组细胞的相对增殖率 (%) = $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) /$

$(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%]$, 每组重复 6 次。

2.4 细胞内 ROS 的检测

通过二乙酰二氯氢化荧光素 (DCFH-DA) 探针联合荧光酶标仪测定细胞内 ROS 水平。细胞接种于 24 孔板, 各组细胞经不同干预措施处理后, 吸出培养基, 加入 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无血清培养基稀释的 DCFH-DA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 之后将培养基吸出, PBS 洗涤 3 次后, 置于荧光酶标仪 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm) 下检测 ROS 水平, 每组重复 6 次。

2.5 试剂盒检测 SOD、GPx、CAT、MDA 的水平

细胞接种于 6 孔板, 各组细胞经不同干预措施处理后, 细胞裂解液或样品制备液充分裂解细胞后测定 SOD、GPx、CAT、MDA 的相对水平, 通过 BCA 法测定细胞总蛋白浓度标准化实验结果, 每组重复 6 次。

2.6 流式细胞仪检测细胞周期

用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基将 PSMCs 制作成细胞悬液, 以 1.5×10^5 /孔接种于 6 孔板, 不同干预处理后, 胰酶消化收集细胞, 70% 乙醇固定后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。离心后加入预冷的 PBS 重悬细胞, 再次离心后弃上清液, 加入碘化丙啶染色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 后冰浴避光保存, 24 h 内通过流式细胞仪检测细胞周期, 每组重复 3 次。

2.7 Western blot 检测 Nrf2、Cyclin D1 和 Cyclin E 表达

PSMCs 以 1.5×10^5 /孔接种于 60 mm 培养皿, 各组细胞经不同干预处理后, 使用细胞裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白; 使用细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒提取细胞核蛋白与细胞质蛋白, 通过 BCA 法测定蛋白浓度。将各组细胞蛋白稀释成相同浓度, 取等量蛋白加样 (约 15 μg), 通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至硝化纤维素膜中, 采用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 洗膜后加入一抗 (Nrf2、Cyclin D1 和 Cyclin E 的稀释倍数为 1:1000, Lamin B1 与 GAPDH 稀释倍数 1:2000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜后加入二抗室温下孵育 1 h, 采用 ECL 法检测蛋白的相对表达, 通过 Tanon GIS 软件处理数据, 每组重复 3 次。

2.8 统计学处理

本研究数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验; $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Adropin 对低氧诱导的 PSMCs 增殖及 ROS 产生的影响

ROS 激活剂 H_2O_2 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和低氧刺激 PSMCs 24 h 后, 其增殖增强 ($P < 0.05$), 抗氧化剂 NAC ($10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及不同浓度的 Adropin (100 、 300 、 $1000 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预 24 h 后均能够显著抑制 PSMCs 增殖 ($P < 0.05$), 且

随着 Adropin 浓度升高, 其抑制细胞增殖作用增强 (见图 1A)。 H_2O_2 和低氧刺激 PSMCs 24 h 后, 细胞内 ROS 产生增加, 抗氧化剂 NAC 及不同浓度的 Adropin 干预 24 h 后可抑制细胞内 ROS 产生 ($P < 0.05$), 且随着 Adropin 浓度升高其抑制 ROS 产生作用增强 (见图 1B), 说明 Adropin 抑制低氧诱导的 PSMCs 增殖与抑制 ROS 产生有关。

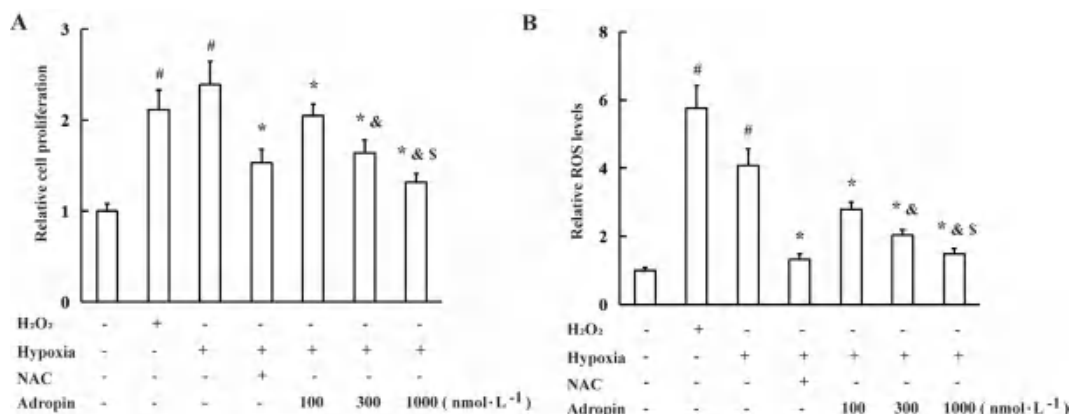


图 1 Adropin 对低氧诱导的 PSMCs 增殖及 ROS 产生的影响 ($n = 6$)

Fig 1 Effect of Adropin on the proliferation and ROS production in hypoxia-induced PSMCs ($n = 6$)

注: 与对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与低氧组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 $100 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Adropin 相比较, [&] $P < 0.05$; 与 $300 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Adropin 相比较, [§] $P < 0.05$ 。

Note: vs Control group, [#] $P < 0.05$; vs Hypoxia group, ^{*} $P < 0.05$; vs $100 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Adropin group, [&] $P < 0.05$; vs $300 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Adropin group, [§] $P < 0.05$.

3.2 Adropin 对氧化应激的影响

低氧孵育 PSMCs 24 h 后, 细胞核与细胞质 Nrf2 的表达均下调 ($P < 0.05$), Nrf2 激活剂 DMF ($75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及 Adropin 干预均能促进细胞核及细胞质中 Nrf2 的表达 ($P < 0.05$), Nrf2 抑制剂 ML385 能够逆转 Adropin 上调细胞核及细胞质中 Nrf2 表达的作用 ($P < 0.05$) (见图 2)。低氧孵育 PSMCs 24 h 后, 细胞内 SOD、GPx 和 CAT 的活性下降, MDA 和 ROS 水平升高 ($P < 0.05$); DMF 及 Adropin 干预后, 细胞内 SOD、GPx、CAT 活性升高, MDA 和 ROS 水平下降 ($P < 0.05$); 而 ML385 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够逆转 Adropin 抑制氧化应激的作用 ($P < 0.05$) (见图 3)。

3.3 Adropin 对细胞周期的影响

低氧孵育 PSMCs 24 h, G_0/G_1 期的 PSMCs 减少, S 期 + G_2/M 期的比例增多 ($P < 0.05$); DMF 及 Adropin 干预后 G_0/G_1 期细胞比例增加, S 期 + G_2/M 期细胞比例减少 ($P < 0.05$); 而 ML385 能够逆转 Adropin 阻滞细胞周期的作用 ($P < 0.05$) (见图 4)。

3.4 Adropin 对 Cyclin D1 和 Cyclin E 表达的影响

低氧刺激 PSMCs 24 h 后, Cyclin D1 和 Cyclin E 的表达上调 ($P < 0.05$); DMF 及 Adropin 干预后, Cyclin D1 和 Cyclin E 的表达下调 ($P < 0.05$); 而 ML385 能够逆转 Adropin 抑制 Cyclin D1 和 Cyclin E 表达的作用 ($P < 0.05$) (见图 5)。

3.5 Adropin 对 PSMCs 增殖的影响

DMF 及 Adropin 干预后能够抑制低氧诱导的 PSMCs 增殖, 而 ML385 能够逆转 Adropin 抑制 PSMCs 增殖的作用 (见图 6)。

4 讨论

本研究发现 H_2O_2 及低氧均能够诱导 PSMCs 增殖及 ROS 生成, 不同浓度的 Adropin (100 、 300 、 $1000 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及抗氧化剂 NAC 均可抑制低氧诱导 PSMCs 的增殖及 ROS 产生, 且 Adropin 抑制 PSMCs 增殖及 ROS 产生的作用具有浓度依赖性。本研究还发现, Adropin 和 Nrf2 激活剂 DMF 干预均可通过激活 Nrf2 上调 PSMCs 内 SOD、GPx 和 CAT 的活性, 降低 MDA 与 ROS 水平, 而 Nrf2 抑制剂 ML385 能够逆转 Adropin 上述作用。进一步研究表明, DMF 和 Adropin 能够通过抑制 Cyclin D1 与 Cyclin E 的表达, 阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期, 从

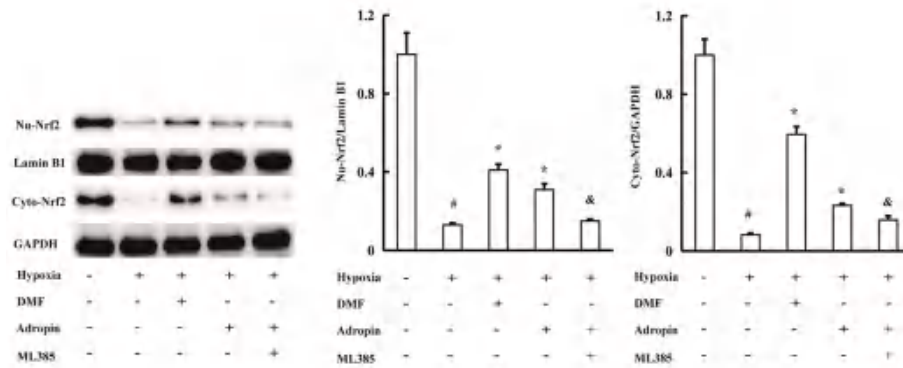


图 2 Adropin 对低氧诱导的 PASCs 中 Nrf2 表达的影响 (n = 3)

Fig 2 Effect of Adropin on the expression of Nrf2 in hypoxia-induced PASCs (n = 3)

注: 与对照组比较, #P < 0.05; 与低氧组比较, *P < 0.05; 与 Adropin 组相比较, &P < 0.05。

Note: vs Control group, #P < 0.05; vs Hypoxia group, *P < 0.05; vs Adropin group, &P < 0.05.

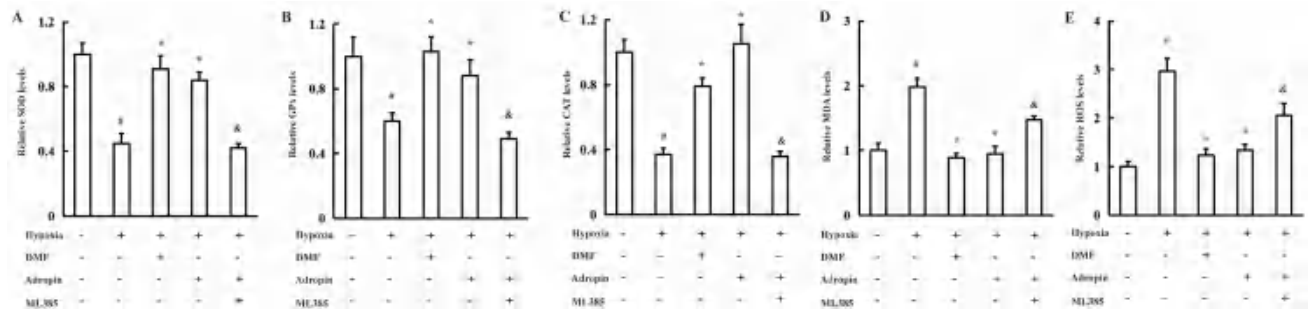


图 3 Adropin 对低氧诱导的 PASCs 中氧化应激的影响 (n = 6)

Fig 3 Effect of Adropin on the oxidative stress in hypoxia-induced PASCs (n = 6)

注: 与对照组比较, #P < 0.05; 与低氧组比较, *P < 0.05; 与 Adropin 组相比较, &P < 0.05。

Note: vs Control group, #P < 0.05; vs Hypoxia group, *P < 0.05; vs Adropin group, &P < 0.05.

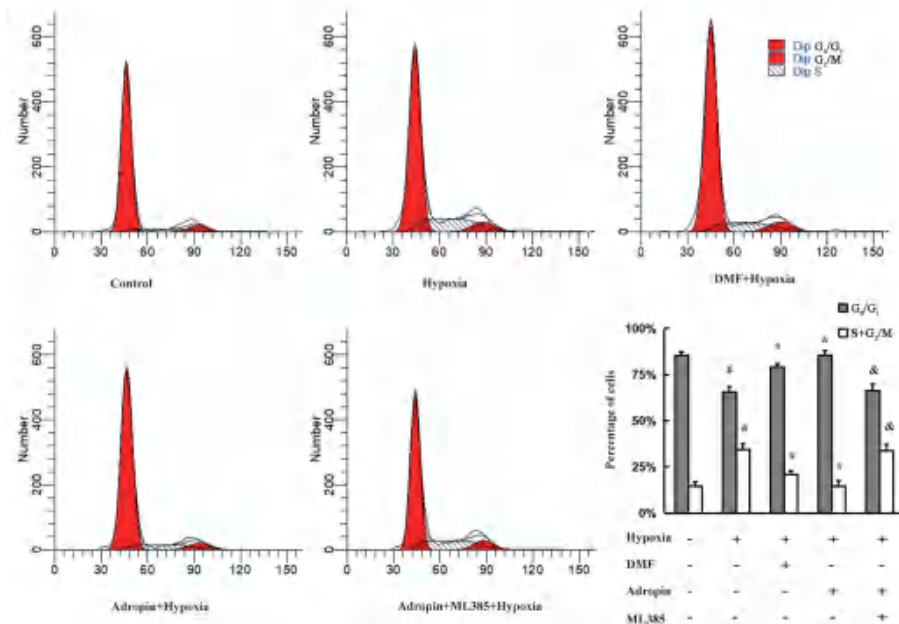


图 4 Adropin 对低氧诱导的 PASCs 中细胞周期的影响 (n = 3)

Fig 4 Effect of Adropin on the cell cycle progression in hypoxia-induced PASCs (n = 3)

注: 与对照组比较, #P < 0.05; 与低氧组比较, *P < 0.05; 与 Adropin 组相比较, &P < 0.05。

Note: vs Control group, #P < 0.05; vs Hypoxia group, *P < 0.05; vs Adropin group, &P < 0.05.

而抑制 PASCs 增殖, 而 ML385 能够逆转 Adropin 上述作用。这说明 Adropin 通过抑制氧化应激, 阻

滞细胞周期, 从而抑制低氧诱导的 PASCs 增殖, 其机制可能与激活 Nrf2 有关。

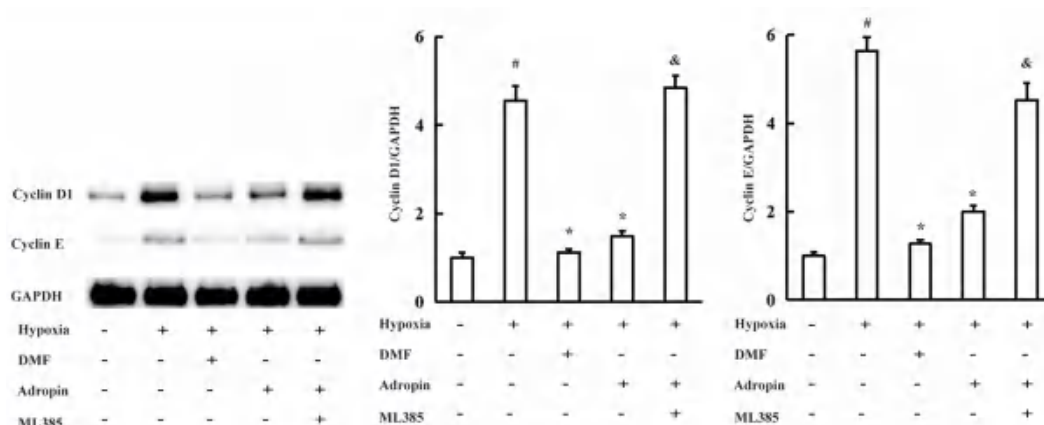


图 5 Adropin 对低氧诱导的 PASMCs 中 Cyclin D1 和 Cyclin E 表达的影响 (n = 3)

Fig 5 Effect of Adropin on the expression of Cyclin D1 and Cyclin E in hypoxia-induced PASMCs (n = 3)

注: 与对照组比较, [#]P < 0.05; 与低氧组比较, ^{*}P < 0.05; 与 Adropin 组相比较, [&]P < 0.05。

Note: vs Control group, [#]P < 0.05; vs Hypoxia group, ^{*}P < 0.05; vs Adropin group, [&]P < 0.05.

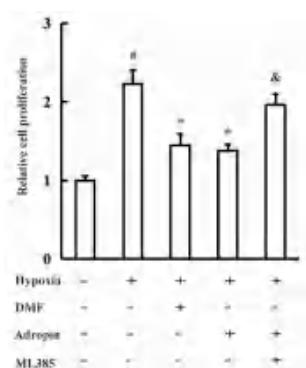


图 6 Adropin 对低氧诱导的 PASMCs 增殖的影响 (n = 6)

Fig 6 Effect of Adropin on the proliferation in hypoxia-induced PASMCs (n = 6)

注: 与对照组比较, [#]P < 0.05; 与低氧组比较, ^{*}P < 0.05; 与 Adropin 组相比较, [&]P < 0.05。

Note: vs Control group, [#]P < 0.05; vs Hypoxia group, ^{*}P < 0.05; vs Adropin group, [&]P < 0.05.

持续低氧可诱导 PASMCs 异常增殖, 导致肺血管重构及 HPH 形成。体外研究发现, 不同浓度的低氧 (1% ~ 10%) 刺激 PASMCs 后, 其增殖率与氧浓度成负相关^[14], 因此本研究采用 1%O₂ 诱导 PASMCs 增殖, 建立细胞模型。细胞实验中发现 Adropin 可通过抑制 ERK1/2 活化抑制人 ASMCs 的增殖和迁移。动物实验发现, 向 Apoe^{-/-} 小鼠腹腔注射 Adropin 可抑制主动脉粥样硬化的发展, 并减少斑块内单核细胞/巨噬细胞浸润和平滑肌细胞数量, 抑制血管重构^[8]。研究发现 Adropin 与冠心病患者冠状动脉内新生内膜面积成负相关, 体外培养大鼠 ASMCs 发现, Adropin 能够抑制血管紧张素 II (Ang II) 诱导的 ASMCs 增殖^[11]。本研究发现不同浓度的 Adropin (100、300、1000 nmol · L⁻¹) 可抑制低氧诱导的

PASMCs 增殖, 且具有浓度依赖性。

细胞增殖与细胞能否顺利通过细胞周期的各个阶段密切相关。G₁ 期能否进入 S 期是决定细胞增殖的关键。一旦 G₁ 期细胞进入 S 期, 细胞周期可正常进行, 且不再受有丝分裂原调控。本研究表明, 低氧能够诱导 PASMCs 有丝分裂增强, 减少 G₀/G₁ 期细胞比例, 同时增加 S + G₂/M 期的细胞比例, 而 Adropin 干预后能够逆转低氧诱导 PASMCs 有丝分裂的作用, 增加 G₀/G₁ 期细胞比例, 同时减少 S + G₂/M 期的细胞比例。研究发现, Adropin 能够通过阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期, 抑制 Ang II 诱导的 RASMCs 增殖^[11]。Cyclin 是细胞周期调控系统的关键蛋白。Cyclin E 和 Cyclin D1 与细胞周期蛋白依赖蛋白 (CDK) 2 和 CDK4/6 结合形成复合物促进 G₁ 期细胞进入 S 期, 进而促进有丝分裂^[15-16]。本研究发现 Adropin 可抑制 Cyclin D1 和 Cyclin E 的表达。因此推测, Adropin 通过抑制 Cyclin D1 和 Cyclin E 的表达, 抑制细胞周期进程, 从而抑制低氧 PASMCs 增殖。

大量研究表明, 氧化应激在 PAH 的发生发展中起着至关重要的作用。无论是 PAH 患者, 还是野百合碱或低氧诱导的 PH 动物模型, 均发现氧化应激明显增加^[17]。ROS 是参与氧化应激的主要分子之一, 包括超氧阴离子 (O₂⁻)、羟基 (OH⁻)、H₂O₂ 和次氯酸 (HOCl)^[18]。低氧能够通过下调抗氧化相关酶活性 (SOD、GPx 和 SOD 等) 和上调 NADPH 氧化酶 (NOXs) 活性, 导致 PASMCs 产生过量的 ROS, 从而诱导氧化应激^[19]。ROS 是重要的细胞内信号分子, 低水平 ROS 对维持细胞正常生理功能极为重要, 病理条

件下可使 ROS 的生成增强, 诱导细胞增殖、凋亡抵抗。氧化应激能够通过促进炎症反应, 损伤内皮细胞, 促进 PASMCs 异常增殖, 导致低氧肺血管重构发生, 从而诱导 HPH 发生发展, 通过抗氧化剂降低 ROS 水平后可抑制 PASMCs 增殖以及 HPH 形成^[19-20]。此外, ROS 可通过活化细胞内信号通路如 ERK1/2 和 P38, 促进 PASMCs 增殖^[21-22]。SOD 可将超氧化自由基分解为 H₂O₂, GPx 可以催化 GSH 与 H₂O₂ 或其他有机过氧化物的反应, 生成氧化型谷胱甘肽和 H₂O, CAT 是 H₂O₂ 酶, 能够催化 H₂O₂ 产生 H₂O 与 O₂^[18]。SOD 缺乏时, PASMCs 增殖增强, 恢复 SOD 活性能够减轻肺动脉重塑^[23-24]。氧化应激时能导致细胞脂质过氧化, 而 MDA 是脂质过氧化的产物, 其与氧化应激相关, PAH 患者血清中 MDA 水平升高^[25]。低氧能够诱导 PASMCs 内 SOD、GPx 和 CAT 活性下降, ROS 和 MDA 水平升高, 促进氧化应激, 而通过药物抑制氧化应激能够抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖^[24, 26]。本研究发现 ROS 激活剂 H₂O₂ 及低氧均能够促进 PASMCs 的增殖及 ROS 生成, 不同浓度的 Adropin 及抗氧化剂 NAC 均可抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖及 ROS 产生, 且 Adropin 抑制 PASMCs 增殖及 ROS 产生的作用具有浓度依赖性。进一步研究发现 Adropin 能够增强 SOD、GPx 和 CAT 活性, 降低 MDA 水平。有研究表明 Adropin 可减轻棕榈酸诱导肝细胞和库普弗细胞内 ROS 产生, 从而抑制 NASH^[10]。在糖尿病肾病小鼠模型研究中发现 Adropin 可抑制肾脏的氧化应激, 改善肾功能^[27]。在 NASH 小鼠模型中研究发现, 敲除 Adropin 显著加剧了肝脏脂肪变性及氧化应激, 而腹腔注射外源性 Adropin 可减轻肝细胞的氧化应激, 抑制 NASH 的进展^[12]。

Nrf2 是参与氧化应激的关键转录因子。Keap1 是 Nrf2 的抑制剂, 在 Nrf2 活性的调节中起着关键作用。在细胞质内 Nrf2 与 Keap1 蛋白结合, 活性受到抑制, 并被降解。当 Nrf2 与 Keap1 解离后会进入细胞核, 与抗氧化响应元件结合促进 SOD、GPx 和 CAT 等抗氧化蛋白的表达^[6]。缺氧诱导 PASMC 内 ROS 产生, 而 ROS 能够抑制 Keap1 与 Nrf2 在细胞质内解离, 从而抑制 Nrf2 的激活^[26, 28]。使用 siRNA 敲除 Nrf 能显著促进 PASMCs 内 ROS 的产生, 诱导 PASMCs 增殖^[29]。在低氧诱导的 PASMCs 氧化应激模型中发现, Nrf2 特异性抑制 ML385 能够抑制 SOD、

GPx 和 CAT 活性, 促进 MDA 及 ROS 产生^[26]。在 NASH 模型研究中发现, Adropin 可通过激活 Nrf2, 抑制氧化应激^[12]。本研究发现 Adropin 或 Nrf2 激活剂 DMF 干预能够通过激活 Nrf2, 增强 SOD、GPx 和 CAT 活性, 抑制氧化应激, 并抑制 Cyclin D1 与 Cyclin E 的表达, 进而阻滞细胞周期, 抑制低氧条件下 PASMCs 的增殖, 而 Nrf2 抑制剂 ML385 能够逆转 Adropin 上述作用。这说明 Adropin 可通过抑制氧化应激, 抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖, 其机制可能与激活 Nrf2 有关。

综上, 本研究首次发现 Adropin 可通过抑制氧化应激抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖, 其机制可能与激活 Nrf2 有关。Adropin 可能是治疗和预防低氧肺血管重构新的药物。本研究单从细胞水平探讨 Adropin 对低氧肺血管重构的影响, 下一步将在动物实验中验证 Adropin 对低氧诱导的 HPH 大鼠肺血管重构的影响, 在动物水平探讨 Adropin 对低氧肺血管重构及氧化应激的影响。

参考文献

- [1] Spiekerkoetter E, Kawut SM, de Jesus Perez VA. New and emerging therapies for pulmonary arterial hypertension [J]. *Annu Rev Med*, 2018, 70: 45-59.
- [2] Chai TC, Qiu C, Xian ZH, et al. A narrative review of research advances in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10 (4): 230.
- [3] Evans CE, Cober ND, Dai ZY, et al. Endothelial cells in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2021, 58 (3): 2003957.
- [4] Pena E, Brito J, El Alam S, et al. Oxidative stress, kinase activation, and inflammatory pathways involved in effects on smooth muscle cells during pulmonary artery hypertension under hypobaric hypoxia exposure [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (17): 6421.
- [5] Li Q, Qiu YL, Mao M, et al. Antioxidant mechanism of rutin on hypoxia-induced pulmonary arterial cell proliferation [J]. *Molecules*, 2014, 19 (11): 19036-19049.
- [6] Tossetta G, Fantone S, Montanari E, et al. Role of NRF2 in ovarian cancer [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11 (4): 663.
- [7] Ali II, D' Souza C, Singh J, et al. Adropin's role in energy homeostasis and metabolic disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (15): 8318.
- [8] Sato K, Yamashita T, Shirai R, et al. Adropin contributes to anti-atherosclerosis by suppressing monocyte-endothelial cell adhesion and smooth muscle cell proliferation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (5): 1293.
- [9] Yang C, Mars K, Hawkins K, et al. Adropin reduces paracellular permeability of rat brain endothelial cells exposed to ischemia-like conditions [J]. *Peptides*, 2016, 81:

- 29-37.
- [10] Chen X, Sun XY, Shen TR, et al. Lower adropin expression is associated with oxidative stress and severity of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 191-198.
- [11] Wang L, Zhao LP, Chen YQ, et al. Adropin inhibits the phenotypic modulation and proliferation of vascular smooth muscle cells during neointimal hyperplasia by activating the AMPK/ACC signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (6): 560.
- [12] Chen X, Xue HL, Fang WJ, et al. Adropin protects against liver injury in nonalcoholic steatohepatitis via the Nrf2 mediated antioxidant capacity [J]. *Redox Biol*, 2019, 21: 101068.
- [13] 陈昌贵, 易春峰, 李立为, 等. 异丹叶大黄素对血小板源性生长因子-BB 诱导的肺动脉平滑肌细增殖的影响研究 [J]. *中国药师*, 2021, 24 (6): 1040-1045, 1056.
- [14] 沈慧, 张丽娜, 姚德山, 等. 低氧处理增强体外培养小鼠肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移能力 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35 (1): 39-45.
- [15] Wang J, Li XM, Bai Z, et al. Curcumol induces cell cycle arrest in colon cancer cells via reactive oxygen species and Akt/GSK3 β /cyclin D1 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210: 1-9.
- [16] Xiang Y, Yang YS, Lin C, et al. MiR-23a-3p promoted G₁/S cell cycle transition by targeting protocadherin17 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Physiol Biochem*, 2020, 76 (1): 123-134.
- [17] Wu DC, Dasgupta A, Read AD, et al. Oxygen sensing, mitochondrial biology and experimental therapeutics for pulmonary hypertension and cancer [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 170: 150-178.
- [18] He L, He T, Farrar S, et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44 (2): 532-553.
- [19] 何丽囡, 兰钰茹, 贺光明, 等. 白藜芦醇通过调控 HIF-1 α /NOX4/ROS 通路抑制低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞氧化应激与增殖 [J]. *生理学报*, 2020, 72 (5): 551-558.
- [20] Guo DQ, Gu JZ, Jiang H, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to the development of pulmonary arterial hypertension [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 179-187.
- [21] Li TZM, Li SQ, Feng YL, et al. Combination of dichloroacetate and atorvastatin regulates excessive proliferation and oxidative stress in pulmonary arterial hypertension development via p38 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6973636.
- [22] Wang XD, Li F, Ma DB, et al. Periostin mediates cigarette smoke extract-induced proliferation and migration in pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 514-520.
- [23] Archer SL, Marsboom G, Kim GH, et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target [J]. *Circulation*, 2010, 121 (24): 2661-2671.
- [24] Wang R, Pan JJ, Han JZ, et al. Melatonin attenuates dasatinib-aggravated hypoxic pulmonary hypertension via inhibiting pulmonary vascular remodeling [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 790921.
- [25] Smukowska-Gorynia A, Rzymiski P, Marcinkowska J, et al. Prognostic value of oxidative stress markers in patients with pulmonary arterial or chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3795320.
- [26] He Y, Zhong JH, Wei XD, et al. Pachymic acid ameliorates pulmonary hypertension by regulating Nrf2-Keap1-ARE pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42 (1): 56-67.
- [27] Yu MC, Wang D, Zhong D, et al. Adropin carried by reactive oxygen species-responsive nanocapsules ameliorates renal lipid toxicity in diabetic mice [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14 (33): 37330-37344.
- [28] Jin AP, Li B, Li W, et al. PHLPP2 downregulation protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury through reinforcing Nrf2/ARE antioxidant signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 314: 108848.
- [29] Liang LY, Wang MM, Liu M, et al. Chronic toxicity of methamphetamine: oxidative remodeling of pulmonary arteries [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 62: 104668.

(收稿日期: 2023-07-02; 修回日期: 2023-11-06)

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的 胃康灵胶囊化学成分分析

刘润花, 谭征, 杨畅, 杨子烨, 关晶*, 张建民* (首都儿科研究所附属儿童医院制剂室, 北京 100020)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱 (UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) 法准确、快速定性鉴别胃康灵胶囊中的化学成分。**方法** 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 色谱柱 (1.7 μm , 2.1 mm \times 150 mm), 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.3 mL \cdot min $^{-1}$, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 2 μL , 电喷雾电离源 (ESI) 在正、负离子两种模式下采集数据, 扫描方式为全扫描/数据依赖二级扫描 (Full MS/dd-MS 2)。**结果** 在胃康灵胶囊水提液中鉴定出 142 个化学成分, 包括三萜类 58 个、生物碱类 32 个、单萜类 17 个、黄酮类 12 个、多酚类 10 个、有机酸类 6 个、菲类 3 个、香豆素类 1 个、木脂素类 1 个、苯并吡喃类 1 个和氮苷类 1 个。**结论** UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术能够快速有效地对胃康灵胶囊中化学成分进行鉴定, 为进一步明确其药效物质提供参考。

关键词: 胃康灵胶囊; 化学成分分析; 超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0056-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.009

Chemical components of Weikangling capsules by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

LIU Run-hua, TAN Zheng, YANG Chang, YANG Zi-ye, GUAN Jing*, ZHANG Jian-min* (*Department of Pharmacy, Children's Hospital Affiliated to Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020*)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the chemical components of Weikangling capsules based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** A Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 column (1.7 μm , 2.1 mm \times 150 mm) was used for the gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase, with a flow rate of 0.3 mL \cdot min $^{-1}$, column temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$, and injection volume of 2 μL . The data were collected in both positive and negative ion modes by electrospray ionization source. The scanning mode was full scan/data dependent secondary scan (Full MS/dd-MS 2). **Results** Totally 142 chemical compounds, including 58 triterpenoids, 32 alkaloids, 17 monoterpenoids, 12 flavonoids, 10 polyphenols, 6 organic acids, 3 phenanthrenes, 1 coumarin, 1 lignan, 1 chromene and 1 nitrogen glycoside were identified in the water extraction of Weikangling capsules. **Conclusion** UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS can quickly and effectively identify the chemical compounds in Weikangling capsules to clarify the effective substances of Weikangling capsules.

Key words: Weikangling capsule; chemical component analysis; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

胃康灵胶囊是由张仲景的中医名著《伤寒论》中所载的“芍药甘草汤”演变而来, 由白芍、甘草、白及、茯苓、三七、延胡索、海螵蛸、颠茄浸膏 8 味药组成的中药复方制剂, 辅料为碳酸氢钠。处方按君、臣、佐的中医传统理论进行的组方, 白芍和甘草为君药, 白及、茯苓和三七为臣药, 延

基金项目: 十三五重大新药创制科技重大专项 (No.2018ZX09721003-009-005)。

作者简介: 刘润花, 女, 硕士研究生, 主要从事中药分析及质量控制检验, email: lrh6793@163.com *通信作者: 张建民, 男, 主任药师, 主要从事药品及制剂研发, email: zjm051525@126.com; 关晶, 女, 主任药师, 主要从事药品及制剂研发, email: guanjing1119@126.com

胡索、海螵蛸和颠茄浸膏为佐药，8 味药合用可用于肝胃不和、瘀血阻络所致的胃脘疼痛、连及两胁、嗝气、泛酸；急、慢性胃炎，胃、十二指肠溃疡，胃出血见上述证候者。胃康灵胶囊治疗慢性胃肠道疾病已有近 40 年历史。研究表明胃康灵胶囊具有抗应激性溃疡的作用，可用于修复胃溃疡^[1-2]。胃康灵胶囊联合雷贝拉唑可降低机体促炎因子水平，调节胃肠激素改善溃疡患者的临床症状^[3-4]。此外，胃康灵胶囊、法莫替丁联合多潘立酮可用于治疗慢性胃炎，临床治疗效果显著，安全性较高，有助于改善患者的生活质量^[5]。

胃康灵胶囊现收载于《中国药典》2020 年版第一部中，是治疗慢性胃炎的代表性中药复方制剂，临床使用广泛。其研究主要集中在质量标准，如特征性化学成分含量测定^[6-7]、微量元素含量测定^[8]、指纹图谱建立^[9]、薄层色谱研究^[10]、单味药的质量标准提高等，此外还包括药效学实验、临床疗效观察和工艺研究^[11-12]。胃康灵胶囊含有多味中药，化学成分多且复杂，但有关其成分的综合分析鲜有报道，在一定程度上限制了其质量控制及药效物质基础的深入研究。LC-MS 联用技术具备 UPLC 的高分离效能和质谱的高选择性、高灵敏度特点，可以快速分析中药及中药复方中的化学成分。目前鲜有学者采用 LC-MS 技术对胃康灵胶囊的化学成分进行分析。基于此，本研究采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对胃康灵胶囊中的成分进行快速鉴定分析，以期为进一步明确其药效物质基础，提高其质量控制水平提供参考。

1 材料

1.1 仪器

CPA225D 电子天平（德国 SARTORIUS 公司）；HH-S4A 电热恒温水浴锅（中国北京科伟永兴仪器有限公司）；超纯水仪（型号：Milli-Q Advantage A10 超纯水系统）；UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 质谱仪 [美国 Thermo Scientific 公司，配有电喷雾离子源（ESI）及 Xcalibur 3.0 数据处理系统]；Waters HSS T3 UPLC C18 色谱柱（1.7 μm，2.1 mm×150 mm）（Milford, MA, USA）。

1.2 试药

胃康灵胶囊（黑龙江葵花药业股份有限公司，批号：202206041，每粒装 0.4 g）；水为超纯水；甲醇、乙腈和甲酸（质谱纯，美国赛默飞世尔科技有限公司）。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

倾出胃康灵胶囊内容物，精密称取 2.50 g 于

100 mL 具塞锥形瓶中，按照 1:10 的料液比精密加入水 50.0 mL，摇匀，水浴加热回流 2 h，取出静置放冷，取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

2.2 色谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱：Waters UPLC C18（1.7 μm，2.1 mm×150 mm）。流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）和乙腈（B），梯度洗脱（0~2 min，5%B；2~17 min，5%~98%B；17~20 min，98%B）；20~23 min，98%~5%B；23~25 min，5%B）。流速 0.3 mL·min⁻¹；柱温 40℃；进样量 2 μL。

2.2.2 质谱条件 离子源：ESI；在正、负离子模式下进行扫描，扫描方式为 Full scan/ddMS²，扫描范围为 *m/z* 100~1500 Da；毛细管温度为 350℃；负离子模式下的喷雾电压为 3800 V，正离子模式下的喷雾电压为 3200 V；鞘气为 35 arb；辅助气为 15 arb；MS² 采用低、中、高三种碰撞能，正离子模式为 30 eV、40 eV、50 eV，负离子模式为 30 eV、50 eV、70 eV。一级质谱分辨率 Full scan 70 000 FWHM，二级质谱分辨率：MS/MS 17 500 FWHM。

3 结果与分析

3.1 胃康灵胶囊化学成分分析

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术，采集得到胃康灵胶囊化学成分的质荷比及保留时间等质谱信息。使用 Xcalibur 3.0 软件进行数据处理，分析正负离子模式下的一级质谱准分子离子以及二级质谱特征碎片离子，结合相关文献及化合物裂解规律，结果共鉴定出 142 个化学成分，包括三萜类 58 个、生物碱类 32 个、单萜类 17 个、黄酮类 12 个、多酚类 10 个、有机酸类 6 个、菲类 3 个、香豆素类 1 个、木脂素类 1 个、苯并吡喃类 1 个和氮苷类 1 个（质谱偏差范围 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$ ）。ESI⁻ 和 ESI⁺ 模式下胃康灵胶囊水提液的基峰离子流图见图 1 和图 2，鉴定结果见表 1。

3.2 胃康灵胶囊中各类化学成分的质谱裂解规律

3.2.1 三萜类化合物 三萜类成分是一类基本母核由 30 个碳原子所组成的萜类化合物，以游离苷元形式或以与糖结合成苷或酯的形式存在于植物体内，其质谱裂解主要为糖苷键的断裂和苷元的开裂。从胃康灵胶囊水提液正负离子模式的质谱图中共鉴定得到 58 个三萜类化合物，主要来源于甘草、三七和茯苓。以化合物 **94** 为例，其保留时间为 10.48 min，可观察到准分子离子峰 *m/z* 823.4106 [M + H]⁺，推断其分子式为 C₄₂H₆₂O₁₆。二级质谱图中母离子依次脱去两个葡萄糖醛酸分子得到 *m/z* 647.3755 [M-C₆H₉O₆ + H]⁺

表 1 胃康灵胶囊化学成分信息

Tab 1 Information of chemical compounds of Weikangling capsule

No.	t_R/min	分子式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	加合离子	碎片离子	鉴定结果	来源	分类
1	1.26	C ₈ H ₁₃ NOH	142.1228	142.1226	[M+H] ⁺	136.0620, 126.0553	β -托品醇	颠茄	生物碱
2	1.48	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	421.1355	421.1341	[M+HCOO] ⁻	375.1303, 345.1190, 195.0657, 139.0751	去苯甲酰基芍药苷或异 枸橼体	白芍	单萜类
3	1.50	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.1041	268.1040	[M+H] ⁺	158.0925, 144.1020, 136.0619, 116.0709	腺苷	茯苓	氮苷类
4	1.50	C ₆ H ₈ O ₇	191.0189	191.0186	[M-H] ⁻	173.0085, 111.0076	柠檬酸	白芍/白及	有机酸类
5	1.59	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	421.1354	421.1341	[M+HCOO] ⁻	375.1297, 345.1187, 195.0656, 139.0751	去苯甲酰基芍药苷或异 枸橼体	白芍	单萜类
6	1.75	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.0674	331.0660	[M-H] ⁻	287.0387, 200.0559, 147.0289, 117.0181	葡萄糖没食子酸	白芍	多酚类
7	1.87	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	421.1354	421.1341	[M+HCOO] ⁻	375.1299, 345.1187, 195.0656, 139.0753	去苯甲酰基芍药苷或异 枸橼体	白芍	单萜类
8	1.95	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	493.1199	493.1188	[M-H] ⁻	331.0656, 169.0133, 125.0233	没食子酰蔗糖	白芍	多酚类
9	1.96	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	331.1034	331.1024	[M+HCOO] ⁻	285.0981, 169.0133, 123.0438	天麻苷	白及	多酚类
10	2.08	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	405.1407	405.1391	[M+HCOO] ⁻	359.1355, 197.0813, 179.0706	牡丹酮-1-O- β -D-葡萄 糖苷或异构体	白芍	黄酮类
11	4.96	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	343.1400	343.1387	[M-H] ⁻	181.0864, 151.0754	牡丹皮苷 F	白芍	单萜类
12	5.01	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0973	205.0972	[M+H] ⁺	188.0708, 167.0130, 148.1122, 122.5474	L-色氨酸	茯苓	有机酸类
13	5.33	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.0547	165.0546	[M-H] ⁻	165.0547, 121.0646, 147.0453	丹皮酚	白芍/茯苓	多酚类
14	5.51	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	495.1514	495.1497	[M-H] ⁻	495.1514, 465.1392, 345.1782, 333.0988, 195.0663, 165.0053, 137.0233	氧化芍药苷	白芍	单萜类
15	5.67	C ₁₇ H ₂₁ NO ₅	320.1496	320.1492	[M+H] ⁺	154.0860, 138.0913	樟柳碱	颠茄	生物碱
16	5.69	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	306.1703	306.1700	[M+H] ⁺	262.1433, 230.9465, 165.0517, 156.9908, 140.1075, 121.1015	山莨菪碱	颠茄	生物碱
17	5.82	C ₁₁ H ₁₂ O ₆	239.0559	239.0550	[M-H] ⁻	197.8073, 174.9553, 149.0599	红果酸	白及	有机酸类
18	5.91	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304.1547	304.1543	[M+H] ⁺	257.0809, 199.9877, 169.9775, 122.5474	东莨菪碱	颠茄	生物碱
19	5.95	C ₁₇ H ₂₃ NO ₅	322.1655	322.1649	[M+H] ⁺	275.1657, 257.0809, 169.9775, 122.5474	二氢樟柳碱	颠茄	生物碱
20	6.04	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	306.1701	306.1700	[M+H] ⁺	289.1848, 217.0973, 169.9774, 122.5474	去氧樟柳碱	延胡索	生物碱
21	6.32	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.1547	328.1543	[M+H] ⁺	297.0815, 287.1993, 267.0866, 169.9775	叔胺碱	颠茄	生物碱
22	6.41	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₆	687.2119	687.2131	[M+HCOO] ⁻	641.1730, 612.1572, 619.2238, 593.1876	6'-邻- β -D-吡喃葡萄糖 基-弗洛林	白芍	有机酸类
23	6.42	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	306.1699	306.1700	[M+H] ⁺	266.1177199.9876, 169.9774, 122.5474	天仙子胺 N-氧化物	延胡索	生物碱
24	6.43	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1025	355.1024	[M+H] ⁺	341.0891, 322.5279, 266.1177, 199.9876	东莨菪苷	延胡索	生物碱
25	6.54	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	319.1170	319.1176	[M+H] ⁺	301.0884, 273.0876, 151.0751	芍药内苷 C	白芍	单萜类
26	6.54	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.1609	525.1603	[M+HCOO] ⁻	479.1554, 357.1189, 121.0277	芍药内酯苷	白芍	单萜类
27	6.70	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	290.1749	290.1751	[M+H] ⁺	257.0807, 199.9876, 169.9772, 143.0395	阿托品	颠茄	生物碱
28	6.71	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.1608	525.1603	[M+HCOO] ⁻	479.1554, 449.1450, 357.1189, 327.1082, 121.0276	芍药苷	白芍	单萜类
29	6.75	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.1385	314.1387	[M+H] ⁺	301.0887, 280.5754179.0702, 151.0753,	异三尖杉酮碱	延胡索	生物碱
30	6.76	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.1607	525.1603	[M+HCOO] ⁻	479.1553, 449.1449, 357.1189, 121.0276	牡丹皮苷 I	白芍	单萜类
31	6.78	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	503.1520	503.1524	[M+Na] ⁺	412.0449, 280.5752, 179.0701, 151.0753	白芍苷 R ₁	白芍	单萜类
32	6.86	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.1542	328.1543	[M+H] ⁺	314.1749, 297.0815, 258.0737, 221.1397, 151.0753	鹅掌楸啡碱 ^[2]	延胡索	生物碱
33	6.99	C ₈ H ₁₃ O ₅	189.0759	189.0763	[M-H] ⁻	129.0544	α -异丙基苹果酸	白及	有机酸类
34	7.03	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0448	197.0444	[M-H] ⁻	169.0134, 125.0232, 124.0155	没食子酸乙酯	白芍	多酚类
35	7.05	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	573.1570	573.1579	[M+Na] ⁺	419.1331, 257.0803	芹糖异甘草苷	甘草	三萜类
36	7.09	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1188	417.1180	[M-H] ⁻	417.1188, 255.0658, 161.0445, 147.2453, 135.8935, 119.0484	甘草苷	甘草	黄酮类
37	7.16	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1189	417.1180	[M-H] ⁻	417.1188, 255.0661, 135.0073	异甘草苷	甘草	黄酮类
38	7.28	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.1667	631.1657	[M-H] ⁻	613.21227, 509.2236, 491.1553, 399.0931	没食子酰芍药苷异构体	白芍	单萜类
39	7.33	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.0495	193.0495	[M+H] ⁺	178.0578, 151.0753, 122.5473, 107.0494	东莨菪内酯	颠茄	生物碱
40	7.35	C ₄₀ H ₅₆ O ₂₂	887.3187	887.3179	[M-H] ⁻	933.3240, 887.3187, 631.1668	2-O-葡萄糖基白及苷	白及	单萜类
41	7.49	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342.1697	342.1700	[M+H] ⁺	327.1466, 310.1434, 178.0861, 165.0906	四氢非洲防己碱	延胡索	生物碱
42	7.50	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	338.1382	338.1387	[M+H] ⁺	323.1143, 294.0754	非洲防己碱	延胡索	生物碱
43	7.55	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.1848	356.1856	[M+H] ⁺	341.1618, 324.1584, 192.1014, 165.0907	延胡索乙素	延胡索	生物碱

续表 1

No.	t_R/min	分子式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	加合离子	碎片离子	鉴定结果	来源	分类
44	7.57	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.1671	631.1657	[M-H] ⁻	613.2142, 509.2243, 491.1563, 399.093 2	没食子酰芍药苷	白芍	单萜类
45	7.73	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.1855	356.1856	[M+H] ⁺	341.1395, 293.0809, 196.0969, 177.0847	海罂粟碱	延胡索	生物碱
46	7.78	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.1139	433.1129	[M-H] ⁻	271.0611, 171.0653, 151.0390, 127.0752	柚皮素 -7-O- 葡萄糖苷	白芍	黄酮类
47	7.88	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	977.5321	977.5345	[M-H+HCOO] ⁻	931.5218, 799.4902, 475.3791,	三七皂苷 R ₁ ^[13]	三七	三萜类
48	7.95	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.1535	352.1543	[M+H] ⁺	337.1301, 336.1215, 321.0991, 308.1276,	13- 甲基脱氢紫堇达明碱	颠茄	生物碱
49	7.95	C ₃₀ H ₃₂ O _{14S}	647.1428	647.1429	[M-H] ⁻	525.1598, 457.1714, 259.8156	苯甲酰芍药苷亚硫酸酯	白芍	单萜类
50	7.97	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.1753	551.1759	[M+H] ⁺	481.1675, 419.1313, 257.0803, 239.0696, 137.0231	芹糖甘草苷	甘草	黄酮类
51	7.98	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	457.1722	457.1704	[M-H] ⁻	457.1722, 285.127.0753	手参苷	白及	多酚类
52	8.09	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.1848	356.1856	[M+H] ⁺	341.1623, 325.1430, 243.0438, 197.0806,	异紫堇碱同分异构体	延胡索	生物碱
53	8.11	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.5410	945.5417	[M-H] ⁻	783.4920, 621.4382, 459.3847, 375.2890	人参皂苷 Rd	三七	三萜类
54	8.11	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	509.1659	509.1654	[M-H] ⁻	479.1556, 457.1714, 187.0966	牡丹皮苷 D	白芍	单萜类
55	8.14	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.4903	845.4893	[M+HCOO] ⁻	799.4878, 637.4317, 475.3784, 391.2857	人参皂苷 Rg ₁	三七	三萜类
56	8.16	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370.1641	370.1649	[M+H] ⁺	356.1852, 320.0914, 206.0808, 188.0702,	隐品碱	颠茄	生物碱
57	8.17	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.1848	356.1856	[M+H] ⁺	341.1623, 320.0913, 243.0439, 192.1013,	异紫堇碱	颠茄	生物碱
58	8.21	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	561.1610	561.1603	[M-H] ⁻	267.0662, 252.0426	黄甘草苷	甘草	三萜类
59	8.23	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1191	417.1180	[M-H] ⁻	255.0661, 135.0076	新甘草苷	甘草	三萜类
60	8.24	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	324.1230	324.1230	[M+H] ⁺	320.0917, 257.0806, 208.0393, 167.0127	四氢黄连碱	颠茄	生物碱
61	8.42	C ₃₄ H ₄₅ O ₁₇	771.2714	771.2706	[M+HCOO] ⁻	725.2658, 457.1712, 439.1606, 295.1176, 285.0968, 259.0970, 189.0759	militarine	白及	有机酸类
62	8.48	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	340.1540	340.1543	[M+H] ⁺	310.0998, 262.1071, 192.0615, 176.0703, 165.0545, 149.0596	氢化小檗碱	颠茄	生物碱
63	8.53	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	370.2004	370.2013	[M+H] ⁺	355.1778, 340.1532, 192.1015, 179.1063	延胡索甲素	延胡索	生物碱
64	8.58	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	272.1645	272.1645	[M+H] ⁺	199.9876, 169.9774, 139.0179, 122.5474	阿扑阿托品	颠茄	生物碱
65	8.59	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	354.1698	354.1700	[M+H] ⁺	340.1541, 287.0912, 208.0393, 169.9772	去氢海罂粟碱	延胡索	生物碱
66	8.63	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.1386	314.1387	[M+H] ⁺	287.0913, 255.0652, 236.1676, 208.0394	三尖杉酮碱	延胡索	生物碱
67	8.73	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₂	999.4442	999.4431	[M-H] ⁻	837.3920, 485.3299, 351.0569, 193.0347, 113.0232	24-hydroxyl-licorice A ₃	甘草	三萜类
68	8.74	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	336.1222	336.1230	[M] ⁺	321.0987, 306.0750, 292.0962,	小檗碱	延胡索	生物碱
69	8.82	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0660	255.0652	[M-H] ⁻	174.9551, 153.0183, 135.0076, 119.0490, 91.0170	甘草素	甘草	黄酮类
70	9.01	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₉	895.3971	895.3958	[M-H] ⁻	351.0568, 193.0346, 113.0232	22-acetoxyl-licorice G ₂	甘草	三萜类
71	9.10	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	983.4489	983.4482	[M-H] ⁻	351.0565, 193.0348, 113.0232	甘草皂苷 A ₃	甘草	三萜类
72	9.13	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₈	855.4006	855.4009	[M+H] ⁺	679.3694, 503.3368, 467.6909	二羟基甘草酸	甘草	三萜类
73	9.16	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	308.2220	308.2220	[M+H] ⁺	295.1441, 256.0968, 225.0294, 208.0393	佛石松碱	颠茄	生物碱
74	9.20	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₈	767.2769	767.2757	[M-H] ⁻	813.2825, 563.2137, 499.1823, 255.8221, 174.9552	6"-acetylmilitaline	白及	多酚类
75	9.27	C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O ₈	625.2541	625.2544	[M+H] ⁺	479.1221, 213.0908, 169.9771, 122.5472	tribulusamide A	甘草	黄酮类
76	9.32	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	352.1180	352.1179	[M+H] ⁺	285.0756, 213.0909, 169.9772,	氧海罂粟碱	颠茄	生物碱
77	9.41	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	879.4014	879.4009	[M-H] ⁻	351.0567, 193.0345, 113.0232	22-acetoxyl-glycyrrhizin	甘草	三萜类
78	9.48	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	629.1873	629.1888	[M+HCOO] ⁻	583.1819, 553.1713, 535.1615, 431.1343	苯甲酰芍药苷异构体	白芍	单萜类
79	9.51	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1107.5947	1107.5946	[M-H] ⁻	945.5418, 783.4879, 621.43340, 459.3810	人参皂苷 Rb ₁	三七	三萜类
80	9.59	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.3911	837.3903	[M-H] ⁻	351.0570, 193.0349, 113.0232	甘草皂苷 G ₂ 同分异构体	甘草	三萜类
81	9.62	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	629.1874	629.1888	[M+HCOO] ⁻	583.1827, 553.1723, 535.1274, 431.1347	苯甲酰芍药苷	白芍	单萜类
82	9.65	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.1534	352.1543	[M+H] ⁺	336.1220, 322.1067, 320.1273, 308.1272, 294.1115	脱氢紫堇碱	颠茄	生物碱
83	9.82	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	815.4808	815.4787	[M+HCOO] ⁻	769.4743, 637.4342, 475.3798, 391.2861, 101.0232	三七皂苷 R ₂ 或其同分异构体	三七	三萜类
84	9.84	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769.4742	769.4733	[M-H] ⁻	815.4804, 769.4760, 637.4338, 475.3806	三七皂苷 R ₂ 或其同分异构体	三七	三萜类

续表 1

No.	t_R /min	分子式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	加合离子	碎片离子	鉴定结果	来源	分类
85	9.89	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077.5852	1077.5840	[M-H] ⁻	945.5437, 783.4902, 621.4365, 459.3856	人参皂苷 Rb ₃	三七	三萜类
86	10.04	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.4882	783.4889	[M-H] ⁻	829.4959, 783.4882, 637.4353, 475.3790, 391.2856	人参皂苷 Rg ₂	三七	三萜类
87	10.09	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.3910	837.3903	[M-H] ⁻	351.0567, 193.0345, 113.0232	甘草皂苷 G ₂	甘草	三萜类
88	10.10	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	839.4054	839.4060	[M+H] ⁺	663, 3737, 487.3415, 469.3310, 459.6933	羟基甘草酸	甘草	三萜类
89	10.13	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	683.4376	683.4388	[M+HCOO] ⁻	588.5145, 475.3793, 408.5598, 113.0220, 101.0242	人参皂苷 Rh ₁	三七	三萜类
90	10.18	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₆	819.3807	819.3798	[M-H] ⁻	351.0566, 193.0348, 113.0232	甘草皂苷 E ₂	甘草	三萜类
91	10.24	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	808.4212	808.4240	[M-H] ⁻	351.0572, 193.0346	甘草皂苷 B ₂	甘草	三萜类
92	10.30	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0661	255.0652	[M-H] ⁻	174.9552, 134.8995, 119.0487	异甘草素	甘草	黄酮类
93	10.39	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.5423	945.5417	[M-H] ⁻	991.5483, 783.4920, 621.4367, 459.3839, 375.2910	人参皂苷 Re	三七	三萜类
94	10.48	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823.4106	823.4410	[M+H] ⁺	647.3755, 471.3465, 453.3361, 425.3415, 303.1953, 262.1569	甘草酸 ^[14]	甘草	三萜类
95	10.50	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823.4091	823.4111	[M+H] ⁺	647.3781, 453.3351	乌拉尔甘草皂苷甲	甘草	三萜类
96	10.58	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₇	863.4071	863.4060	[M-H] ⁻	351.0575, 193.0346, 113.0233	甘草皂苷 C ₂	甘草	三萜类
97	10.61	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	243.1022	243.1016	[M-H] ⁻	227.0709	山药素 III	白及	多酚类
98	10.66	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.0663	267.0652	[M-H] ⁻	252.0426, 223.0395, 195.0443	刺芒柄花素	甘草	黄酮类
99	10.81	C ₂₃ H ₂₀ O ₅	375.1240	375.1227	[M-H] ⁻	345.2285, 304.9143, 257.8193	bleformin B	白及	菲类
100	10.85	C ₃₀ H ₂₆ O ₆	481.1659	481.1646	[M-H] ⁻	465.0181, 329.2336, 257.8192, 174.9552	赤霉素 C	白及	多酚类
101	10.99	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.3967	821.3954	[M-H] ⁻	351.0566, 193.0342, 113.0231	乌拉尔甘草皂苷 B	甘草	三萜类
102	11.03	C ₃₀ H ₂₂ O ₆	477.1343	477.1333	[M-H] ⁻	462.1302, 430.0854, 349.1145, 257.8190	白及联菲 C	白及	菲类
103	11.03	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	955.4908	955.4897	[M-H] ⁻	793.4402, 731.4387, 631.3746, 569.3580, 455.3564	人参皂苷 Ro	三七	三萜类
104	11.08	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	367.1187	367.1176	[M-H] ⁻	352.0953, 309.0408	甘草香豆素	甘草	香豆素类
105	11.10	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.3974	821.3954	[M-H] ⁻	351.0568, 193.0344, 113.0232	甘草皂苷 H ₂	甘草	三萜类
106	11.16	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.3972	821.3954	[M-H] ⁻	803.3587, 351.0569, 193.0346, 113.0232	甘草皂苷 K ₂ ^[14]	甘草	三萜类
107	11.23	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	823.4125	823.4111	[M-H] ⁻	351.0569, 193.0346, 113.0232	甘草皂苷 J ₂ ^[14]	甘草	三萜类
108	11.29	C ₂₃ H ₂₀ O ₄	361.1427	361.1434	[M+H] ⁺	361.1436, 267.1009	1-(<i>p</i> -hydroxybenzyl)-4,7-dimethoxyphenanthrene-2-ol	颠茄	菲类
109	11.54	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.1535	352.1543	[M+H] ⁺	336.1222, 322.1064, 321.0987, 308.1268, 294.1111	脱氢紫堇碱同分异构体	颠茄	生物碱
110	11.68	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	339.1229	339.1227	[M+H] ⁺	283.0594	甘草宁 C	甘草	黄酮类
111	11.74	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	489.3580	489.3575	[M+H] ⁺	471.3473, 451.6964, 439.3576, 399.3490	daedalean acid B	茯苓	三萜类
112	11.76	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.4868	811.4862	[M+HCOO] ⁻	765.4800, 619.2903, 593.1307	人参皂苷 RG ₆	三七	三萜类
113	11.91	C ₂₈ H ₂₆ O ₄	425.1763	425.1747	[M-H] ⁻	331.2493, 225.0611, 174.9553, 116.9273	shancigusin B	白及	多酚类
114	11.98	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	811.4865	811.4862	[M+HCOO] ⁻	765.4781, 619.2900	人参皂苷 F ₄	三七	三萜类
115	12.03	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	499.3070	499.3054	[M-H] ⁻	409.2364, 355.1555, 241.0869, 174.9553	茯苓酸 E	茯苓	三萜类
116	12.13	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	483.3120	483.3105	[M-H] ⁻	409.2366, 309.2075, 257.8192, 174.9553	茯苓酸 B 异构体	茯苓	三萜类
117	12.16	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	665.4279	665.4259	[M+HCOO] ⁻	645.3651, 621.3357, 619.2903, 339, 1240, 269.1314, 174.9553	人参皂苷 Rk ₃	三七	三萜类
118	12.29	C ₃₁ H ₄₆ O ₆	513.3226	513.3211	[M-H] ⁻	485.3279, 311.2232, 269.1315, 174.9553	茯苓酸 F	茯苓	三萜类
119	12.36	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	665.4278	665.4259	[M+HCOO] ⁻	645.3651, 621.3357, 619.2903, 353.1033, 269.1314, 174.9553	人参皂苷 Rh ₄	三七	三萜类
120	12.48	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	339.1594	339.1591	[M+H] ⁺	271.0961, 297.1476, 121.0284	甘草查尔酮 A	甘草	黄酮类
121	12.48	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	337.1447	337.1434	[M-H] ⁻	332.1199	4- <i>O</i> -甲基光甘草定	甘草	黄酮类
122	12.56	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	497.3276	497.3262	[M-H] ⁻	269.1315, 174.9553, 146.9649	茯苓酸 A 异构体	茯苓	三萜类
123	12.60	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4968	829.4967	[M+HCOO] ⁻	783.4900, 621.4370, 457.3837	人参皂苷 F ₂	三七	三萜类
124	12.65	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	365.1028	365.1020	[M-H] ⁻	307.0246, 295.0245	甘草酚	甘草	三萜类
125	12.76	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4968	829.4967	[M+HCOO] ⁻	783.4900, 621.4370, 457.3857	人参皂苷 Rg ₃	三七	三萜类
126	12.84	C ₃₁ H ₄₈ O ₅	499.3436	499.3418	[M-H] ⁻	485.3279, 269.1315, 174.9553, 146.9649	茯苓酸 H	茯苓	三萜类
127	12.87	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	415.2118	415.2115	[M+H] ⁺	399.3489, 250.1188, 167.0130, 139.0180	木兰脂素	颠茄	木脂素类

续表 1

No.	t_R /min	分子式	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	加合离子	碎片离子	鉴定结果	来源	分类
128	13.50	$C_{33}H_{52}O_5$	527.3742	527.3731	[M-H] ⁻	509.3623, 467.3163, 355.2639	茯苓酸	茯苓	三萜类
129	14.06	$C_{31}H_{46}O_4$	481.3329	481.3312	[M-H] ⁻	174, 9553, 146.9649, 134.8936, 116.9273	茯苓酸 C 异构体	茯苓	三萜类
130	14.20	$C_{30}H_{46}O_5$	485.3265	485.3262	[M-H] ⁻	441.3514, 353.2479	茯苓酸 G	茯苓	三萜类
131	14.22	$C_{30}H_{44}O_5$	483.3119	483.3105	[M-H] ⁻	409.2752, 377.2733, 297.1532, 174.9553	茯苓酸 B	茯苓	三萜类
132	14.37	$C_{31}H_{48}O_4$	483.3488	483.3469	[M-H] ⁻	437.2674, 430.0091, 419.2446, 407.2809	去氢土莫酸	茯苓	三萜类
133	14.49	$C_{42}H_{70}O_{12}$	811.4858	811.4862	[M+HCOO] ⁻	765.4800, 603.4257, 265.1481, 233.1545	人参皂苷 Rk ₁	三七	三萜类
134	14.52	$C_{42}H_{70}O_{12}$	811.4866	811.4862	[M+HCOO] ⁻	765.4787, 603.4143, 265.1482, 233.1546	人参皂苷 Rg ₅	三七	三萜类
135	14.72	$C_{31}H_{46}O_5$	497.3276	497.3262	[M-H] ⁻	471.3481, 265.1481, 221.1544, 174.9553, 146.9650	茯苓酸 A	茯苓	三萜类
136	14.81	$C_{30}H_{46}O_5$	485.3278	485.3262	[M-H] ⁻	377.2733, 197.1532, 265.1481, 174.9553	3-oxo-6, 16 α -dihydroxytra-metenolic acid ^[15]	茯苓	三萜类
137	14.98	$C_{33}H_{50}O_5$	525.3593	525.3575	[M-H] ⁻	446.3129, 377.2734, 311.1692, 297.1533	去氢茯苓酸	茯苓	三萜类
138	15.12	$C_{31}H_{46}O_4$	481.3329	481.3312	[M-H] ⁻	297.2438, 387.1789, 174.9553, 146.9650, 116.9274	茯苓酸	茯苓	三萜类
139	15.26	$C_{30}H_{46}O_4$	469.3322	469.3312	[M-H] ⁻	425.342 8, 355.2647	甘草次酸	甘草	三萜类
140	15.48	$C_{16}H_{22}O_4$	279.1592	279.1591	[M+H] ⁺	205.0861, 181.0245, 149.0234, 111.0206	methyl leptol B	颠茄	苯并吡啶类
141	15.80	$C_{30}H_{44}O_5$	483.3121	483.3105	[M-H] ⁻	465.2988, 439.3221, 389.0076, 325.9554	6, 16 α -dihydroxydehydrotrametenonic acid	茯苓	三萜类
142	15.97	$C_{30}H_{44}O_4$	467.3163	467.3156	[M-H] ⁻	423.3277, 408.2188, 353.2476	16-deoxyporicolic acid B	茯苓	三萜类

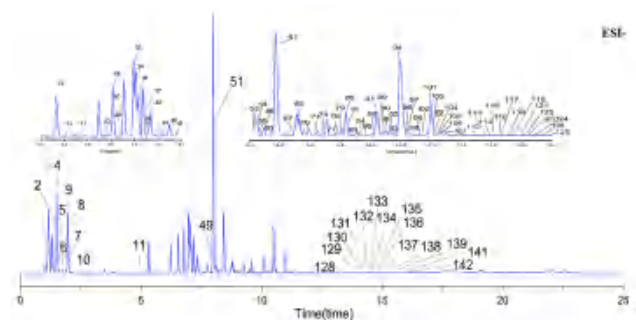


图 1 ESI⁻模式下胃康灵胶囊的基峰离子流图

Fig 1 Base peak ion flow diagram of Weikangling capsules under negative ion by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

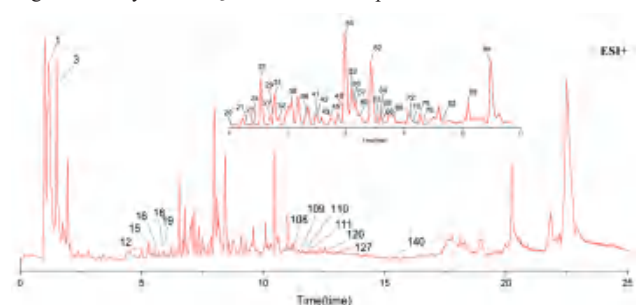


图 2 ESI⁺模式下胃康灵胶囊的基峰离子流图

Fig 2 Base peak ion flow diagram of Weikangling capsules under positive ion by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

和 m/z 471.3465 [M-2C₆H₉O₆ + H]⁺ 两个特征碎片离子。 m/z 471.3465 为甘草酸苷元，丢失一分子 H₂O 得到 m/z 453.3361 的碎片离子，再失去两个 CH₂ 自由基得到 m/z 425.3415 的离子。同时，苷元分子内 CO 键含有 γ H 可通过麦氏重排得到 m/z

303.1953 的碎片离子，苷元也可经过 RDA 裂解生成 m/z 262.1569 的碎片离子。结合负离子模式下的准分子离子以及特征碎片离子信息，比对相关文献^[16-17]可确定该化合物为三萜类化合物甘草酸，图 3 为其可能的裂解规律。

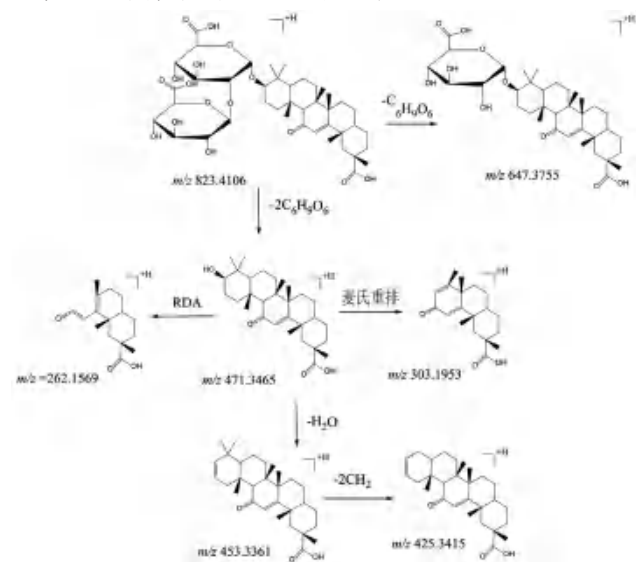


图 3 甘草酸可能的裂解规律

Fig 3 Proposed fragmentation pathways of glycyrrhizic acid

3.2.2 生物碱类化合物 生物碱多具有较复杂的氮杂环结构，根据结构分为有机胺类、异喹啉衍生物、莨菪烷（颠茄烷类）衍生物等。从胃康灵胶囊水提液正负离子模式的质谱图中共鉴定出 32 个生物碱类化合物，主要来源于延胡索和颠茄浸膏。

以化合物 **62** 为例，其保留时间为 8.48 min，可观察到准分子离子峰 m/z 340.1540 $[M + H]^+$ ，推断其分子式为 $C_{20}H_{21}NO_4$ ；二级质谱图中母离子丢失中性分子 CO 得到 m/z 310.0998 的离子碎片。母离子的 B 环断裂得到 m/z 165.0545 和 m/z 176.0703 的离子碎片。B 环和 C 环发生 RDA 裂解得到 m/z 192.0615 和 m/z 149.0596 的离子碎片。 m/z 192.0615 碎片 A 环的两个甲氧基发生断裂失去两个中性分子 CH_2 得到 m/z 164.0667 的离子碎片。此外，母离子的 A 环失去一个 OCH_2 和一个 CH_2 ，D 环侧链失去中性分子 $O-CH_2$ 得到 m/z 263.1071 的离子碎片，D 环进一步裂解失去 $C_{10}H_5NO_2$ 的侧链分子得到 m/z 107.0494 的二级碎片。结合负离子模式下的准分子离子以及特征碎片离子信息，比对相关文献^[18-19]可确定该化合物为异喹啉型生物碱氢化小檗碱，图 4 为其可能的裂解规律。

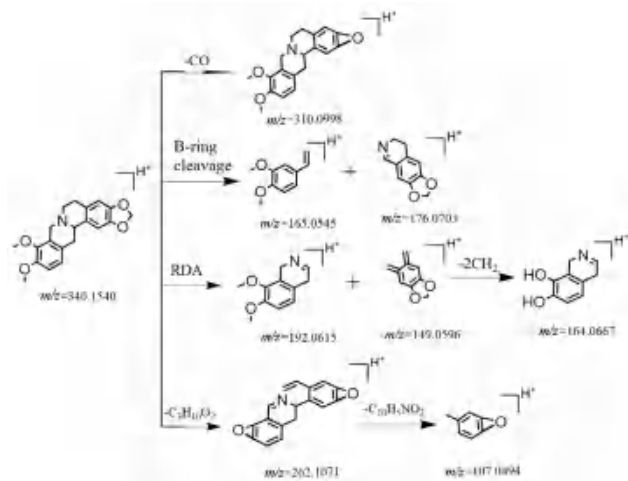


图 4 氢化小檗碱可能的裂解规律
Fig 4 Proposed fragmentation pathways of canadine

莨菪烷类生物碱是由莨菪烷衍生的氨基醇与不同有机酸缩合成酯类生物碱，其质谱裂解主要分为三个部分：莨菪醇、莨菪酸及含氮杂环的开裂。以化合物 **16** 为例，其保留时间为 5.69 min，可观察到准分子离子峰 m/z 306.1703 $[M + H]^+$ ，推断其分子式为 $C_{17}H_{23}NO_4$ 。二级质谱图中母离子酯键开裂失去莨菪酸得到 m/z 156.9908 $[M-C_9H_9O]^+$ 及 m/z 156.9908 $[M-C_9H_9O]^+$ 的多环碎片离子。含氮杂环脱去 $-CH_2CHOH$ 的自由基得到 m/z 262.1443 的离子碎片，再脱去一分子 H_2O 和一分子 CH_2 自由基得到 m/z 230.9465 的离子碎片。 m/z 262.1443 的离子丢失含氮杂环得到 m/z 165.0517 $[M-CH_2CHOH-C_6H_{11}N]^+$ 的碎片离子。此外，从二级质谱图上还能观察到 m/z 121.1015 $[M-C_{19}H_{26}O_{11}]^+$ 和 m/z 103.1434 $[M-C_{19}H_{26}O_{11}-H_2O]^+$ 的碎片离子。结合正离子模式

下的准分子离子以及特征碎片离子信息，比对相关文献^[18, 20]可确定该化合物为莨菪烷类生物碱山莨菪碱，图 5 为其可能的裂解规律。

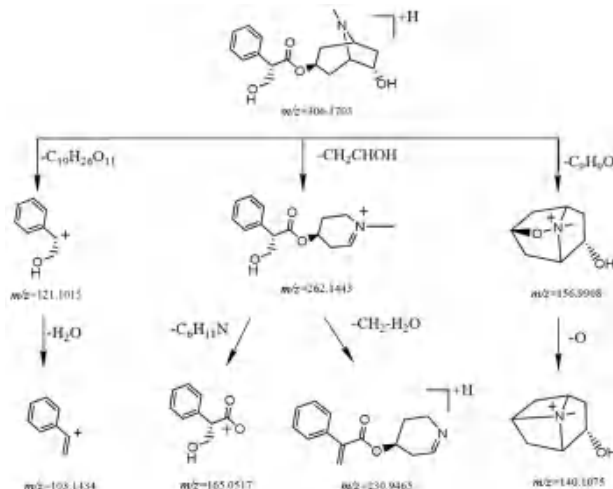


图 5 山莨菪碱可能的裂解规律
Fig 5 Proposed fragmentation pathways of anisodamine

3.2.3 黄酮类化合物 黄酮类化合物泛指两个苯环通过中央三个碳原子互相连接而成的 C6-C3-C6 基本骨架的化合物，在其 A 环和 B 环上常有甲基或者甲氧基等官能团，并且常与糖结合成苷。黄酮类化合物的主要裂解方式以糖苷键断裂、RDA 裂解、 CO_2 、 CO 等中性离子丢失为主。鉴定出 12 个黄酮类化合物，主要来源于甘草和白芍。以化合物 **36** 为例，其保留时间为 7.09 min，可观察到准分子离子峰 m/z 417.1188 $[M-H]^-$ ，推断其分子式为 $C_{21}H_{22}O_9$ ；二级质谱图中母离子从胃康灵胶囊水提液正负离子模式的质谱图中共糖苷键断裂得到 m/z 225.0658 苷元离子碎片，苷元发生 RDA 裂解生成 m/z 135.8935 和 m/z 119.0484 的离子碎片。苷元丢失 B 环得到 m/z 161.0445 的离子碎片。C 环开环失去中性碎片 $C_6H_4O_2$ 得到 m/z 161.0445 的离子碎片。结合正离子模式下的准分子离子以及特征碎片离子信息，比对相关文献^[14, 21]可确定该化合物为黄酮类化合物甘草苷，图 6 为其可能的裂解规律。

3.2.4 多酚及酯类化合物 从胃康灵胶囊水提液正负离子模式的质谱图中共鉴定出 10 个多酚类化合物，主要为白芍和白芍中所含化学成分。以化合物 **61** 为例，其保留时间为 8.42 min，一级质谱图上可观察到 m/z 771.2714 $[M + HCOO]^-$ 的准分子离子峰，二级质谱图上观察到 m/z 725.2658 $[M-H]^{-1}$ 的离子碎片，推断其分子式为 $C_{34}H_{45}O_{17}$ ；二级质谱图中母离子脱酯键依次得到 m/z 457.1712 $[M-C_{13}H_{16}O_6-H]^-$ 、 m/z 439.1606 $[M-C_{13}H_{16}O_6-H_2O-H]^-$ 、 m/z 285.0968 $[M-C_{13}H_{16}O_6-H_2O-C_8H_{10}O_3-H]^-$ 、 m/z 189.0757 $[M-2C_{13}H_{16}O_6-H]^-$ 、

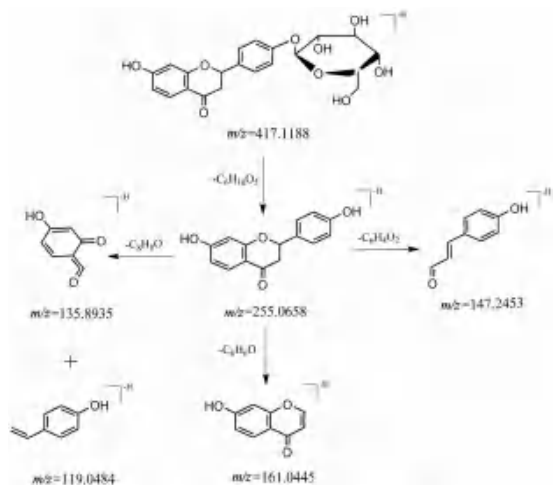


图 6 甘草苷可能的裂解规律

Fig 6 Proposed fragmentation pathways of liquiritin

m/z 171.0649 $[M-2C_{13}H_{16}O_6-H_2O-H]^-$ 的离子碎片。母离子糖苷键断裂、有机酸酯键断裂得到 m/z 295.1176 $[M-C_{19}H_{26}O_{11}-H]^-$ 的离子碎片，再脱去一分子 H_2O 和两分子的 H 得到 m/z 259.0970，紧接着失去中性分子 C_7H_6O 得到 m/z 153.0543 的碎片离子。结合正离子模式下的准分子离子以及特征碎片离子信息，比对相关文献^[22-23]可确定该化合物为多酚及酯类化合物 *militarine*，图 7 为其可能的裂解规律。

4 讨论

参照胃康灵胶囊的制备工艺确定供试品溶液的提取方法^[24]。胃康灵胶囊中白及、三七和海螵蛸为原粉入药，甘草、白芍、茯苓和延胡索为水煎液浓缩干燥后入药，颠茄以浸膏的形式入药。

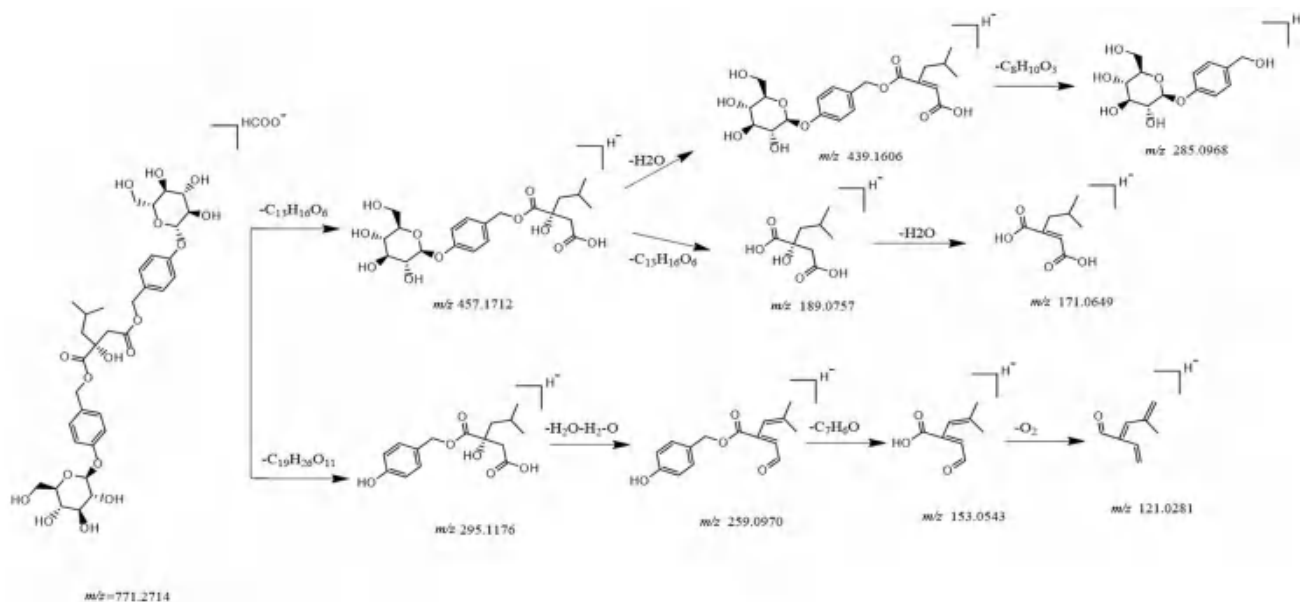


图 7 *Militarine* 可能的裂解规律

Fig 7 Proposed fragmentation pathways of *militarine*

其次，中药制剂大多数以口服的形式给药，故本试验以水为溶剂通过加热回流对胃康灵胶囊中的化学成分进行提取。通过分析裂解碎片信息，结合相关文献，共鉴定出胃康灵胶囊中 142 个化学成分，同时对各类化学成分进行归属，其中有 24 个来源于白芍，33 个来源于甘草，13 个来源于白及，20 个来源于茯苓，19 个来源于三七，14 个来源于延胡索，21 个来源于颠茄。

白芍含有挥发油类、单萜类及黄酮类等化合物，其中，白芍单萜类化合物芍药苷和芍药内酯苷均具有较好的镇痛作用，芍药苷可通过抑制炎症因子释放缓解疼痛^[25]。甘草含有三萜皂苷类、黄酮类、甘草多糖类等^[16]。现代药理研究证实，芍药甘草汤具有解除肠道平滑肌痉挛、调节胃肠蠕动节律、保护胃黏膜等多种药理作用^[26]。

白及含有大量淀粉、葡萄糖和蒽醌类等化合物，此外还含有联苕类、二氢菲类和联菲类化合物，其中，1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苕基]-2-异丁基苹果酸酯 (*militarine*) 含量较高，为白及的主要活性成分，具有抗炎、舒张血管的作用^[27]。茯苓含有三萜类、多糖类、甾体类等化合物，具促进水液代谢、调节胃肠功能等药理作用^[28]。三七主要含有三萜皂苷、黄酮类等活性成分^[29]，其中三萜皂苷类如人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Rb_1 、三七皂苷 R_1 为其主要活性成分。

延胡索主要化学成分为生物碱，如小檗碱、延胡索乙素、延胡索甲素等，具有活血、行气、止痛的功效^[30]。海螵蛸含有碳酸钙和壳角质，具有中和胃酸、止痛的作用。颠茄浸膏含有山莨菪碱、氢化小檗碱等生物碱，具有消解平滑肌痉挛

与止痛的作用^[31]。

本文采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术建立了一种高效、快速的定性分析方法,对胃康灵胶囊中的化学成分进行了鉴别分析。在鉴定得到的化合物中 militarin、芍药苷、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re、甘草苷、甘草次酸、甘草酸和阿托品已被研究者选作指标性成分进行含量测定研究,用于控制胃康灵胶囊的质量^[6-7]。本文鉴定得到的化学成分可为进一步明确胃康灵胶囊的药效物质基础及选择合理的质控指标提供参考依据。

参考文献

- [1] 傅聪. 胃康灵胶囊主要药效学试验[J]. 中国社区医师(医学专业), 2011, 13(35): 9.
- [2] 陈衍斌, 何娟, 卢新义, 等. 延寿参胶囊中生物碱类化学成分的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法研究[J]. 陕西中医, 2018, 39(1): 131-134.
- [3] 夏艳, 赵倩义, 王春芳. 胃康灵胶囊联合雷贝拉唑治疗胃溃疡的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(1): 122-125.
- [4] 洪卫国. 胃康灵胶囊与奥美拉唑对浅表性和萎缩性胃炎患者的临床疗效评价[J]. 抗感染药学, 2017, 14(4): 868-870.
- [5] Liu F, Nong XJ, Qu WH, et al. Weikangling capsules combined with omeprazole ameliorates ethanol-induced chronic gastritis by regulating gut microbiota and EGF-EGFR-ERK pathway[J]. Life Sci, 2023, 315: 121368.
- [6] 孟妮, 李魏林. 胃康灵胶囊中芍药苷及 7 种三萜皂苷类成分的含量测定与聚类分析[J]. 中国药师, 2020, 23(6): 1234-1238.
- [7] 陈立娜, 马坤芳. RP-HPLC 法测定胃康灵胶囊中甘草酸的含量[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2006, 26(12): 1295-1297.
- [8] 于昆, 包丽丽, 薛大方, 等. 胃康灵胶囊中 15 种元素含量分析[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 577-579.
- [9] 李晓波, 王梦月, 刘峰, 等同时测定胃康灵胶囊指纹图谱及多指标成分含量的方法: CN202011616763.0[P]. 2021-05-11.
- [10] 曾赣惠, 苏长安. 胃康灵胶囊的薄层色谱鉴别[J]. 江西医药, 2011, 46(11): 1044-1045.
- [11] 梁岩岭. 观察胃康灵胶囊联合奥美拉唑肠溶胶囊治疗慢性浅表性胃炎的临床疗效[J]. 养生保健指南, 2020, (31): 80-81.
- [12] 傅聪. 胃康灵胶囊主要药效学试验[J]. 中国社区医师(医学专业), 2011, 13(35): 9.
- [13] 严晟, 李漓, 黄晨存, 等. 基于 HPLC-Q-Orbitrap-MSn 的血三七化学成分分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(6): 1042-1048.
- [14] 张倩芸, 董文敏, 王新宏, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法分析甘草干姜汤配伍前后化学成分变化[J]. 中成药, 2023, 45(1): 311-316.
- [15] Zou YT, Long F, Wu CY, et al. A dereplication strategy for identifying triterpene acid analogues in *Poria cocos* by comparing predicted and acquired UPLC-ESI-QTOF-MS/MS data[J]. Phytochem Anal, 2019, 30(3): 292-310.
- [16] 肖先, 李春燕, 刘晓龙, 等. 甘草的主要化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2023, 40(3): 280-285.
- [17] 李洋, 孙捷, 段伟萍, 等. HPLC-QTOF-MS/MS 结合 NMR 分析甘草酸单铵盐原料及其高温强降解杂质[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10): 1748-1756.
- [18] 王宇卿, 庄果, 王晓瑜, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MSE 技术分析颠茄草化学成分[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(6): 1063-1068.
- [19] 余坤, 左姿, 卿志星, 等. 基于异喹啉生物碱质谱裂解规律推断博落回茎中的生物碱[J]. 中国现代中药, 2016, 18(3): 296-302.
- [20] 谢亚雄, 朱雁, 刘芳. 消旋山莨菪碱的电子轰击质谱研究[J]. 质谱学报, 2004, 25(z1): 111-112.
- [21] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [22] Li LL, Hao B, Zhang YL, et al. Metabolite profiling and distribution of militarin in rats using UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Molecules, 2020, 25(5): 1082.
- [23] Sun HY, Zheng L, Gong ZP, et al. A validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of militarin and its three metabolites in rat plasma: application to a pharmacokinetic study[J]. eCAM, 2019, 2019(6): 2371784-2371792.
- [24] 杨文龙. 一种胃康灵胶囊的制备方法: CN200710110611.1 [P]. 2007-10-17.
- [25] 王冰, 孙义. 芍药苷镇痛机制的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2019, 19(72): 239-240.
- [26] 崔晨, 耿琦, 蒋健. 蒋健以芍药甘草汤为主古方新用治疗脾胃病[J]. 世界中医药, 2017, 12(11): 2727-2730.
- [27] 夏涛, 王昌权, 陈浩, 等. 白及有效成分 Militarin 在肝微粒体中的体外代谢途径及其酶促动力学特征[J]. 中国药房, 2019, 30(10): 1316-1320.
- [28] 左军, 祁天立, 胡晓阳. 茯苓化学成分及现代药理研究进展[J]. 中医药学报, 2023, 51(1): 110-114.
- [29] 石礼平, 张国壮, 刘丛盛, 等. 三七化学成分和药理作用研究概况及质量标志物的预测[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(8): 2059-2067.
- [30] 陈斯. 延胡索化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2021, 38(7): 78-82.
- [31] 赵明, 刘平霞, 胡丽晖, 等. 酶解法与乙醇渗漉法制备颠茄流浸膏的比较研究[J]. 光明中医, 2023, 38(14): 2722-2726.

(收稿日期: 2023-08-17; 修回日期: 2023-10-19)

鬼臼毒素脂质体的制备及其质量评价

张朗朗¹, 戴粤湘¹, 张涵², 郭波红^{1*}, 索绪斌^{1*} (1. 广东药科大学 药学院, 广州 510006; 2. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 优化鬼臼毒素脂质体 (POD-Lps) 处方工艺并进行质量评价。方法 采用乙醇注入法制备 POD-Lps, 建立 HPLC 法测定脂质体中鬼臼毒素的含量及包封率。以包封率为指标, 通过 Box-Behnken 响应面分析法对处方和工艺进行优化。观察其微观形态, 测定其粒径、Zeta 电位, 并考察体外释放过程。结果 POD-Lps 最优处方为: 胆固醇和磷脂质量比为 1 : 14.49, 药物和磷脂质量比为 1 : 32.36, 磷酸盐缓冲液 pH 值 5.82, 水浴温度 55 °C。所得的 POD-Lps 包封率为 (87.43 ± 1.8) %, 平均粒径为 (139.12 ± 9.81) nm, 多分散系数 (PDI) 为 (0.21 ± 0.04), Zeta 电位为 (- 26.37 ± 0.36) mV。体外释放研究表明, POD-Lps 具有明显的缓释效果。POD-Lps 的稳定性较好, 4 °C 条件下放置 1 个月后, 各项指标均没有明显变化。结论 乙醇注入法简单、稳定, 可用于 POD-Lps 的制备。

关键词: 鬼臼毒素; 脂质体; 乙醇注入法; Box-Behnken 响应面法; 包封率

中图分类号: R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0065-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.0010

Preparation optimization and quality evaluation of podophyllotoxin liposomes

ZHANG Lang-lang¹, DAI Yue-xiang¹, ZHANG Han², GUO Bo-hong^{1*}, SUO Xu-bin^{1*} (1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

Abstract: Objective To optimize podophyllotoxin liposomes (POD-Lps) and evaluate its quality. **Methods** POD-Lps were prepared by ethanol injection method. HPLC method was used to determine the content and encapsulation efficiency of POD-Lps. The formulation and process of POD-Lps were optimized by Box-Behnken response surface method. The micromorphology of liposomes was observed by transmission electron microscopy. The particle size, Zeta potential, and in vitro release were determined. **Results** The optimum technological parameters of POD-Lps were as follows: the ratio of cholesterol to phosphorus was 1 : 14.49, the ratio of drug to lipid was 1 : 32.36, the pH value of phosphate buffer was 5.82, and the temperature of dissolved lipid solution was 55 °C. The encapsulation efficiency of POD-Lps was (87.43 ± 1.8)%, the particle size was (139.12 ± 9.81) nm, the polydispersity index was (0.21 ± 0.04), and the Zeta potential was (- 26.37 ± 0.36) mV. The in vitro release study showed that POD-Lps had an obvious sustained release effect. POD-Lps had good stability. No obvious change was found in each index of POD-Lps after storing at 4 °C for 30 days. **Conclusion** The ethanol injection method for POD-Lps is rapid, simple and reliable.

Key words: podophyllotoxin; liposome; ethanol injection method; Box-Behnken response surface method; encapsulation efficiency

鬼臼毒素 (POD, 结构式见图 1) 是从鬼臼属 抗肿瘤活性^[1-2], 抗肿瘤机制与阻断细胞的有丝分
植物中分离出来的芳基四萜型木脂素, 其具有 裂及抑制有丝分裂器中微管的组装有关^[3]。研究

作者简介: 张朗朗, 男, 硕士研究生, 主要从事药物制剂新技术与新型给药系统研究, email: 1274134173@qq.com *通信作者: 郭波红, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物制剂新技术与新型给药系统研究, email: bohong-g@163.com; 索绪斌, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物制剂新技术与新型给药系统研究, email: 542029801@qq.com

表明, POD 可用于治疗非小细胞肺癌、淋巴瘤、白血病、前列腺癌等疾病^[4-6]。但因 POD 难溶于水, 生物利用度低且毒副作用较大, 选择性较差, 容易对健康组织产生影响, 并且可能会导致一些严重不良反应, 尤其是剧烈的胃肠道反应等, 限制了其在抗肿瘤方面的应用。为克服这些缺陷, 可将 POD 制备成纳米制剂^[7-9]。脂质体可改善药物的生物利用度, 减小对正常细胞的毒性, 延长循环时间, 并增强药物在肿瘤部位的靶向性以及抗肿瘤细胞增殖和迁移的抑制作用^[10]。脂质体能使药物集中于病灶部位并对病变细胞发挥治疗作用, 还能提高药物的生物利用度以及降低药物的毒副作用。因此, 本试验尝试制备鬼臼毒素脂质体 (POD-Lps), 并对其质量评价, 为该药物的后续研究提供一定的依据。

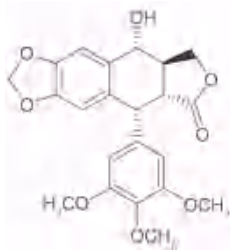


图 1 鬼臼毒素结构式
Fig 1 Structure of podophyllotoxin

1 仪器与试药

1.1 仪器

SCL-10AVP 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); KQ5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热水浴锅、SHZ-D (III) 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); JEM1230 透射电镜 (日本电子株式会社); TLEx-10 脂质体挤出器 (苏州艾特森制药设备有限公司); ME-204 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司, $d = 0.01 \text{ mg}$); Winner802 纳米粒度仪 (济南微纳颗粒仪器股份有限公司); POWEREACH Zeta 电位仪 (上海中晨数字技术设备有限公司)。

1.2 试药

POD 原料药 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: S24887-5g, 纯度 $\geq 98\%$); 胆固醇 (上海蓝季科技发展有限公司); 卵磷脂 (上海金伴药业有限公司); Sephadex G-50 (Pharmacia 公司, $100 \sim 300 \mu\text{m}$); 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 POD-Lps 的制备

采用乙醇注入法制备 POD-Lps: 精密称取 4.0

mg 鬼臼毒素、8.0 mg 胆固醇和 120 mg 卵磷脂于小烧杯中, 加适量无水乙醇 (约 2 mL) 并超声 10 min 至溶解完全后, 将混合液缓慢匀速地注入水浴恒温 55°C 磁力搅拌的 10 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 5.8) 中, 再减压抽去无水乙醇后, 经通有氮气的微孔滤膜 ($0.45 \mu\text{m}$) 挤出器挤出过滤 2 次, 然后再更换 $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜继续挤出 2 次, 得乳白色的 POD-Lps, 于 4°C 中保存备用。

2.2 脂质体中鬼臼毒素的测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Platisil-ODS ($200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为甲醇-水 = (70 : 30); 检测波长 292 nm ; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为室温; 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

2.2.2 POD 甲醇溶液的配制 精密称取 POD 原料药 5.0 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声溶解完全后稀释并定容至刻度, 摇匀, 得 POD 储备液。精密量取 2.0 mL 储备液于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 POD 甲醇溶液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密量取 0.5 mL POD-Lps 样品于 10 mL 量瓶中, 加少量甲醇破乳后, 缓冲液稀释并定容至刻度, 摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2.4 空白脂质体溶液的配制 按“2.1”项下方法制备不含药物的空白脂质体。按“2.2.3”项下方法制备空白脂质体溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 分别取 POD 甲醇溶液、供试品溶液以及空白脂质体溶液 $20 \mu\text{L}$, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 分别记录 HPLC 色谱图 (见图 2)。结果在该色谱条件下, 空白脂质体对 POD 的测定没有干扰, 专属性较好。

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下 POD 储备液适量并依次稀释, 制成 4.0、10、20、40、60、80、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度线性溶液, 进样分析, 测定峰面积, 以质量浓度 (x) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归, 得线性回归方程 $y = 2.036 \times 10^7 x + 1.263 \times 10^4$, $r = 0.9993$ ($n = 7$)。结果表明, POD 质量浓度在 $4 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积的线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取 POD 甲醇溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果峰面积 RSD 值为 0.58%, 说明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一批 POD-Lps, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后, 进样分析, 记录峰面积。计算的 RSD 值为 0.70%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

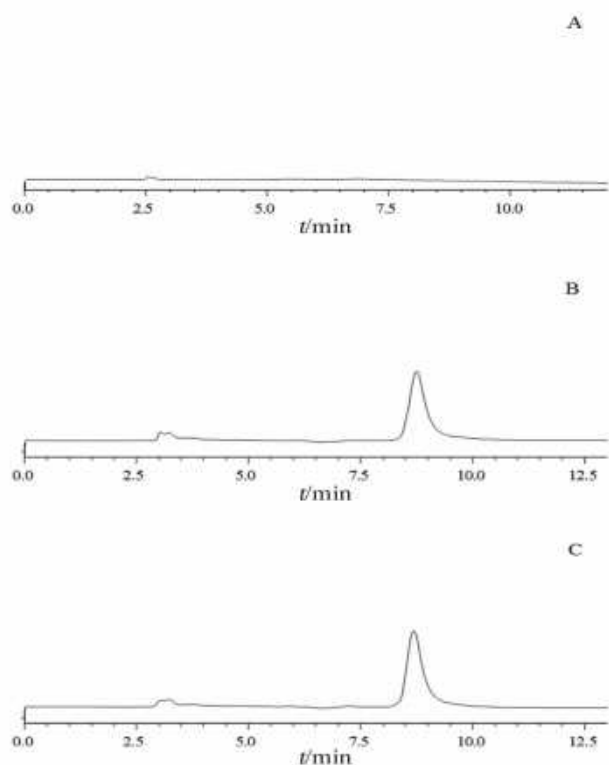


图2 POD-Lps的HPLC色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of POD-Lps

A. 空白脂质体 (blank liposome); B. POD-Lps (POD-Lps); C. POD 甲醇溶液 (POD methanol solution)

2.3.5 重复性试验 取同一批 POD-Lps, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积并计算样品浓度。结果样品的平均质量浓度为 $39.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, *RSD* 为 1.2%, 表明本方法重复性良好。

2.3.6 加样回收试验 精密量取“2.2.2”项下 POD 储备液 1.0、2.0、3.0 mL 各 3 份, 分别加入含 0.5 mL 空白脂质体溶液的 10 mL 量瓶中, 配制成低、中、高 (20 、 40 、 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的溶液, 进样测定并计算。结果低、中、高浓度平均回收率分别为 99.9%、98.4%、100.1%, *RSD* 分别为 0.38%、0.76%、1.1%, 表明该方法准确度较好。

2.4 Sephadex G-50 凝胶柱色谱法分离 POD-Lps 和游离 POD

2.4.1 脂质体分离洗脱曲线

① 葡聚糖凝胶的处理: 精密称取 3.0 g Sephadex G-50, 用煮沸的蒸馏水溶胀并放置过夜, 使用前用洗脱液充分溶胀 6 h, 超声脱气后装柱, 柱内径约 1.5 cm, 柱高 15 cm。

② 洗脱曲线: 用磷酸盐缓冲液 (pH 5.8) 以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速冲洗平衡柱子 1 h。然后对葡聚糖凝胶柱进行空白脂质体预饱和, 即精密移取空白脂质体溶液 0.5 mL 上柱, 用洗脱液洗脱, 收集乳浊液并重复 3 次。取“2.2.2”项下 POD 甲醇

溶液作为游离 POD 溶液, 分别精密吸取 POD-Lps 0.5 mL 和游离 POD 溶液 0.2 mL 上柱, 以磷酸盐缓冲液 (pH 5.8) 洗脱, 收集流份, 每管收集 1 mL, 测定峰面积。以收集的管数为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制 POD-Lps 的洗脱曲线, 结果见图 3。由洗脱曲线可知, POD-Lps 在 4 ~ 10 mL 被洗脱出来, 而游离 POD 则在 14 ~ 21 mL 被洗脱出来, 表明脂质体和游离药物能够被很好地分离。

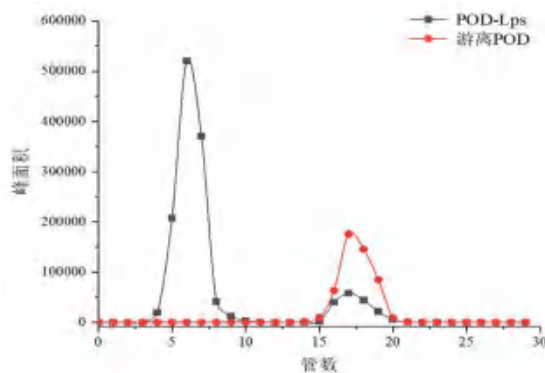


图3 POD-Lps的洗脱曲线

Fig 3 Elution curve of POD-Lps

2.4.2 POD-Lps 包封率的测定 精密吸取 0.5 mL POD-Lps 溶液于 10 mL 量瓶中, 加少量甲醇破乳后, 用缓冲液稀释并定容至刻度, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样分析, 计算脂质体中 POD 的总浓度 C_b ; 精密吸取 POD-Lps 溶液 0.5 mL 上柱, 收集洗脱液, 加少量甲醇破乳后, 用缓冲液稀释并定容至 10 mL, 摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 取续滤液进样, 计算包于脂质体中的 POD 浓度 C_a , 包封率 (*EE*) 根据以下公式计算: $EE (\%) = C_a / C_b \times 100\%$ 。

2.5 POD-Lps 处方单因素考察

2.5.1 磷脂和胆固醇的质量比的考察 固定其他因素不变, 精密称量 4.0 mg POD 和 120 mg 的卵磷脂, 控制胆磷比分别为 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25, 按“2.1”项下方法制备脂质体, 测定包封率和粒径, 结果其对应包封率分别为 27.84%、64.93%、83.47%、75.69%、58.76%, 粒径分别为 198.37、211.23、157.31、206.45、179.68 nm。综合考虑, 选用 1 : 15 的胆磷比进行后续处方优化。

2.5.2 药物和磷脂的质量比的考察 精密称取胆固醇 8.0 mg 和卵磷脂 120 mg, 固定其他因素不变, 改变药物和磷脂的质量比分别为 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 30、1 : 40, 测定包封率和粒径, 结果其对应包封率分别为 20.51%、45.86%、63.83%、87.57%、69.38%, 粒径分别为 237.46、211.69、197.52、142.71、131.23 nm。综合考虑,

选择 1 : 30 的质量比进行后续试验。

2.5.3 水相介质 pH 值考察 控制处方中其他因素不变, 改变缓冲液的 pH 值, 调节水相介质的 pH 值分别为 4.0、5.0、5.8、7.0、7.6, 考察 pH 值对包封率和粒径的影响, 结果其对应包封率分别为 29.43%、50.59%、85.76%、55.78%、37.35%, 粒径测定结果相差不大。故选择 pH 值 5.8 的磷酸盐缓冲液作为水相介质。

2.5.4 水浴温度考察 控制处方中的其他因素不变, 改变脂质体制备时的水浴温度 (分别为 35 °C、45 °C、50 °C、55 °C), 并测定包封率和粒径。结果显示随着水浴温度的提高, 包封率先下降后逐渐增大, 55 °C 时达到 85.25%; 粒径逐渐减小, 55 °C 时粒径减小至 159.78 nm。故采用水浴温度 55 °C。

2.5.5 水相和油相的体积比考察 固定处方中其他因素不变, 改变类脂溶液和缓冲液的体积比, 分别为 1 : 2、1 : 5、1 : 8、1 : 10, 测定包封率和粒径, 结果其对应包封率分别为 81.24%、88.36%、79.69%、83.04%; 粒径先减小后增大, 1 : 5 时粒径达到最小, 为 141.25 nm。故选用水相和油相体积比 1 : 5 的比例。

2.6 Box-Behnken 响应面分析法

2.6.1 试验设计 根据单因素考察结果, 选择对 POD-Lps 包封率影响较显著的 3 个因素作为考察对象, 即胆磷比 (A)、药脂比 (B)、缓冲液 pH 值 (C), 以包封率为指标进行试验, Box-Behnken 试验设计见表 1。

表 1 响应面因素水平表

Tab 1 Factor and level of central response surface method

水平	因素		
	胆磷比 (A)	药脂比 (B)	pH (C)
- 1	1 : 10	1 : 20	5.0
0	1 : 15	1 : 30	5.8
+ 1	1 : 20	1 : 40	7.0

2.6.2 响应面数据分析结果 采用 Design-ExpertV 10.0.4 软件进行处理, 结果见表 2。以 EE 对 A、B、C 进行二次项式回归方程拟合。得到拟合方程: $EE (%) = 84.43 - 0.80A + 3.72B - 11.98C + 0.09AB + 2.09AC - 1.03BC - 5.71A^2 - 8.27B^2 - 34.57C^2$ 。结果表明, 建立的模型 P 值小于 0.01, 失拟项水平不显著 ($P > 0.05$)。胆磷比 (A)、药脂比 (B) 以及 pH (C) 对包封率的影响显著 ($P < 0.05$), 各因素之间交互不显著 (AB、BC、AC 的 $P > 0.05$)。以包封率为评价指标的各因素交互作用响应图见图 4。

模型与实际情况拟合程度良好, 对上述所建立的数学模型进行综合分析, 保证包封率与拟合度均最高的前提下, 最终确定了各因素的最佳取值: $A = 1 : 14.49$, $B = 1 : 32.36$, $C = 5.82$ 。

表 2 Box-Behnken 响应面结果

Tab 2 Results of Box-Behnken response surface analysis

试验号	A	B	C	EE/%
1	1 : 15	1 : 20	5.0	46.82
2	1 : 15	1 : 30	5.8	87.54
3	1 : 10	1 : 20	5.8	69.44
4	1 : 10	1 : 30	7.0	28.06
5	1 : 15	1 : 30	5.8	81.98
6	1 : 20	1 : 30	7.0	31.86
7	1 : 15	1 : 40	5.0	55.89
8	1 : 15	1 : 20	7.0	29.28
9	1 : 15	1 : 30	5.8	83.36
10	1 : 10	1 : 30	5.0	60.32
11	1 : 15	1 : 30	5.8	85.25
12	1 : 20	1 : 30	5.0	56.35
13	1 : 15	1 : 30	5.8	89.08
14	1 : 10	1 : 40	5.8	77.45
15	1 : 20	1 : 20	5.8	65.29
16	1 : 20	1 : 40	5.8	73.67
17	1 : 15	1 : 40	7.0	34.37

2.6.3 最优处方验证试验 按优化后处方, 采用乙醇注入法以 POD 与磷脂质量比 1 : 32.36、胆固醇与磷脂质量比 1 : 14.49、缓冲液 pH 值 5.82 的条件制备 3 批 POD-Lps。测得包封率分别为 87.73%、85.49%、89.08%, 接近模型预测值 (85.92%), 说明制备工艺可行且重复性良好。

2.7 POD-Lps 的质量评价

2.7.1 POD-Lps 包封率 取 3 批 POD-Lps, 按“2.4.2”项下方法测定包封率, 结果其包封率为 $(87.43 \pm 1.8) %$ 。

2.7.2 POD-Lps 形态电镜观察 取适量最优制备条件制得的 POD-Lps, 蒸馏水稀释 10 倍后, 将其滴于碳膜生物铜网表面, 用滤纸吸掉多余混悬液, 用 1% 磷钨酸负染 30 s 后晾干, 干燥后在透射扫描电子显微镜 (TEM) 下观察并拍摄, 结果如图 5 所示, POD-Lps 呈球形或类球形, 结构完整。

2.7.3 粒径和 Zeta 电位 取 POD-Lps, 稀释 10 倍后取适量于样品池中, 通过激光纳米粒度仪和 Zeta 电位仪对脂质体的粒径和 Zeta 电位进行测定, 平行测定 3 次, 见图 6。结果显示, POD-Lps 平均粒径为 $(139.12 \pm 9.81) \text{ nm}$, 多分散系数 (PDI) 为 (0.21 ± 0.04) , Zeta 电位为 $(-26.37 \pm 0.36) \text{ mV}$ 。表明 POD-Lps 粒径分布均匀, 且表面带负电。

2.7.4 体外释放试验 采用透析袋法测定体外释放度。取 1 mg POD 置于 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 作为 POD 溶液。分别取 1 mL

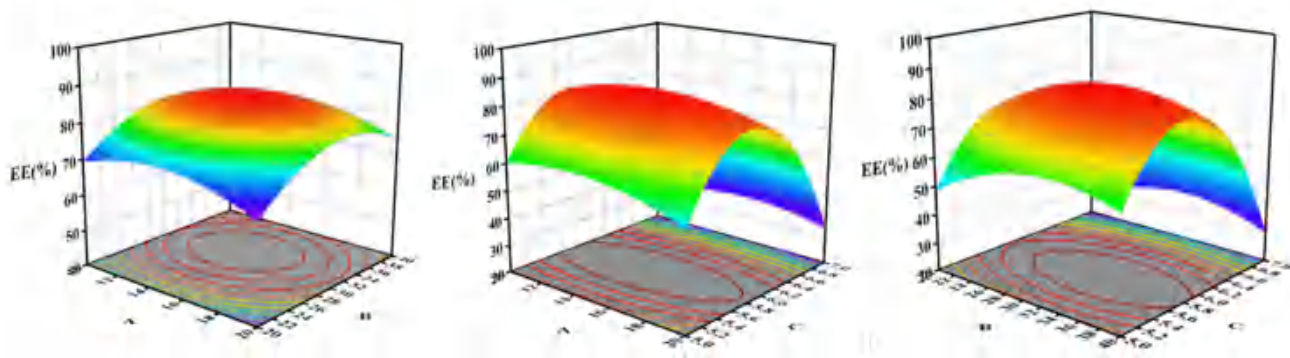


图 4 POD-Lps 制备工艺各因素相互作用的响应面图
Fig 4 Response surface of each factor for POD-Lps preparation



图 5 POD-Lps 电镜图
Fig 5 Transmission electron micrograph of POD-Lps

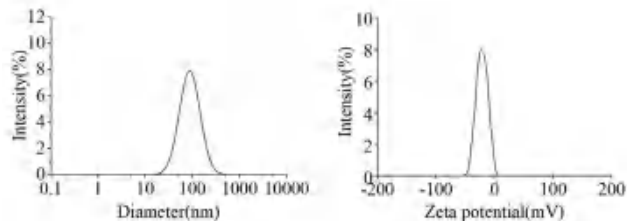


图 6 POD-Lps 的粒径分布和 Zeta 电位
Fig 6 Particle size and Zeta potential of POD-Lps

POD-Lps 和 1 mL POD 溶液置预处理后的透析袋 (MW = 8000 ~ 14 000) 中, 夹紧两端, 置于装有 100 mL 的含 0.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS) PBS 缓冲液 (pH 7.4) 的烧杯中, 然后于 (37±2) °C 水浴恒温振荡器中进行释放, 转速为 100 r · min⁻¹, 分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12、24、36 h 取出 1 mL 释放介质, 同时补充 1 mL 新鲜释放介质。测定 POD 质量浓度并计算累计释放率 (Q, %)。以 Q 对时间 t 绘制曲线并进行方程拟合, 结果见表 3, 体外释放曲线见图 7。结果表明游离 POD 溶液 Q_{12h} 达到 96% 以上, POD-Lps 释放缓慢, Q_{12h} 为 60.73%; Q_{36h} 接近 80%。拟合方程结果显示 POD-Lps 符合一级动力学模型 (R² = 0.979)。

2.7.5 脂质体稳定性考察 取 2 批 POD-Lps, 分别在 25 °C 以及 4 °C 条件下放置, 再分别在 0、15、30 d 取样, 观察外观性状, 并测定包封率、粒径以及电位等参数, 考察脂质体稳定性, 结果

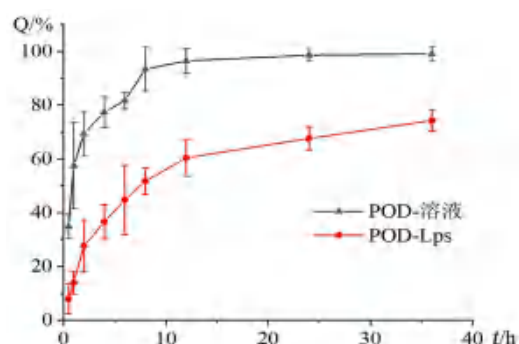


图 7 POD 和 POD-Lps 的体外释放曲线
Fig 7 In vitro release behaviors of POD and POD-Lps

表 3 拟合方程

Tab 3 Regression equation

拟合方程	POD-溶液	POD-Lps
零级	$Q = 1.282t + 65.39$ $R^2 = 0.501$	$Q = 1.653t + 25.57$ $R^2 = 0.736$
一级	$\ln(1 - Q) = -92.06t - 0.82$ $R^2 = 0.878$	$\ln(1 - Q) = -70.22t - 0.18$ $R^2 = 0.979$
Higuchi	$Q = 10.34t^{1/2} + 50.25$ $R^2 = 0.669$	$Q = 12.43t^{1/2} + 8.54$ $R^2 = 0.892$

见表 4。POD-Lps 在 25 °C 条件下放置 30 d 后, 可见样品有少量沉淀聚集, 包封率明显下降, 粒径及电位变化较大, PDI 也明显升高。4 °C 条件下放置一个月的样品, 包封率未有明显下降, 粒径、Zeta 电位以及 PDI 变化较小, 观察外观没有沉淀聚集, 说明 4 °C 下的 POD-Lps 稳定性较好。

3 讨论

3.1 脂质体制备方法的考察

根据相关文献, POD-Lps 的制备方法主要是薄膜水化超声分散法^[11], 暂无其他方法的报道。采用薄膜水化超声分散法制备 POD-Lps 时发现, 旋转蒸发后成膜性较差且水化后所得脂质体的粒径较大, 通过探头超声后, 包封率显著降低。乙醇注入法是将磷脂溶解到有机溶剂中, 并进一步将脂质分散到水相中。乙醇溶液在水相中立即被

表 4 POD-Lps 稳定性考察结果
Tab 4 Storage stability of POD-Lps

因素	包封率/%	粒径/nm	电位/mV	PDI	
(25±1)℃	0 d	83.28±0.35	145.73±0.42	-27.71±0.68	0.22±0.06
	15 d	77.36±0.28	205.35±0.94	-24.48±0.91	0.38±0.33
	30 d	68.77±0.31	249.43±1.07	-21.84±0.79	0.40±0.79
(4±1)℃	0 d	86.69±0.65	141.28±2.38	-25.62±0.98	0.21±0.07
	15 d	82.78±0.37	147.31±0.87	-26.33±0.77	0.23±0.10
	30 d	81.06±0.54	155.45±1.43	-25.87±1.46	0.24±0.08

稀释,引起脂质分子析出并形成双层平面片段,进而转变为脂质体系统,可以直接得到粒径较小且均匀的脂质体^[12]。该方法条件温和,试验过程中所用无水乙醇的量较少,可以减压挥发除去,避免了制剂中有机溶剂的残留。

分离脂质体和游离药物选择了葡聚糖凝胶柱色谱法。超滤法成本较高;微柱离心法操作较为麻烦且离心转速、时间以及温度都难以确定;透析法耗时长且操作难度较高^[13]。本试验初期曾尝试采用离心法分离脂质体,但分离效果不佳,因此采用葡聚糖凝胶柱色谱法。葡聚糖凝胶 G50 有良好的亲水性、大网架结构以及无特异性吸附的特点,利用其分子筛原理可将脂质体和游离鬼臼毒素完全分离。在本试验中,通过用空白脂质体来预饱和凝胶,减少其对脂质体的吸附^[14]。

3.2 脂质体包封率影响因素的考察

本试验中,药脂比以及缓冲液 pH 值对脂质体包封率的影响最为显著,随着药物浓度的升高,包封率先升高后下降。本试验通过摸索,发现磷酸盐缓冲液 pH 值在 5.8 时,可以得到包封率较高的 POD-Lps。当 pH 值在 5.0 以下或 6.0 以上时,POD-Lps 的包封率会显著降低,这可能是因为 POD 的结构中含有内酯环,在弱碱性和强酸性环境中不稳定,易发生开环水解^[15],且磷脂最稳定的 pH 条件为 6.5 左右,太高或太低都容易使其水解。

综上所述,本试验成功以乙醇注入法将 POD 制备成脂质体,采用的处方与工艺简单可行、包封率较高、稳定性较好,可为后续 POD-Lps 的进一步研究提供参考。

参考文献

[1] Gordaliza M, Garcia PA, Miguel Del Corral JM, et al. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives [J]. *Toxicol*, 2004, 44 (4): 441-459.
[2] Ardalani H, Avan A, Ghayour-Mobarhan M. Podophyllo-

toxin: a novel potential natural anticancer agent [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2017, 7 (4): 285-294.

[3] Gordaliza M, Castro MA, Del CJ, et al. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds [J]. *Curr Pharm Des*, 2000, 6 (18): 1811-1839.
[4] 成伟华, 陈虹, 邹忠梅. 鬼臼毒素的结构修饰及抗肿瘤活性研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2017, 48 (5): 644-650.
[5] Motyka S, Jaferník K, Ekiert H, et al. Podophyllotoxin and its derivatives: potential anticancer agents of natural origin in cancer chemotherapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114145.
[6] Fan HY, Zhu ZL, Xian HC, et al. Insight into the molecular mechanism of podophyllotoxin derivatives as anticancer drugs [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 709075.
[7] 王耿焕, 沈和平, 金成胜, 等. 鬼臼毒素纳米靶向制剂的制备与理化性质评价 [J]. *医药导报*, 2018, 37 (10): 1237-1240.
[8] 邓亚利, 蔡鑫剑, 姚淑娴. 羧基化碳纳米管负载鬼臼毒素的制备及透皮性能研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52 (12): 1049-1055.
[9] 王云, 柯青, 唐之俭, 等. 鬼臼毒素固体脂质纳米粒对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖和迁移的影响 [J]. *药物流行病学杂志*, 2023, 32 (6): 648-654.
[10] Bardania H, Tarvirdipour S, Dorkoosh F. Liposome-targeted delivery for highly potent drugs [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 45 (8): 1478-1489.
[11] Ling LB, Yao C, Du YW, et al. Assembled liposomes of dual podophyllotoxin phospholipid: preparation, characterization and in vivo anticancer activity [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2017, 12 (6): 657-672.
[12] Shaker S, Gardouh AR, Ghorab MM. Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method [J]. *Res Pharm Sci*, 2017, 12 (5): 346-352.
[13] 罗肖, 徐小超, 高男男, 等. 不同方法测定齐墩果酸脂质体的包封率 [J]. *中国药理学杂志* (网络版), 2017, 15 (1): 13-20.
[14] 吕凤娇, 刘瑞花, 杨云芳, 等. 葡聚糖凝胶柱层析法测定黄芩苷脂质体载药性能的研究 [J]. *离子交换与吸附*, 2019, 35 (3): 280-287.
[15] 于燕燕, 赵继会, 冯年平, 等. 鬼臼毒素水溶液稳定性研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2011, 27 (1): 80-82.

(收稿日期: 2023-08-30; 修回日期: 2023-09-26)

平衡透析结合 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中游离 SN-38 浓度及其药代动力学应用

罗珍华¹, 宋成慧¹, 李小川^{2, 3}, 张枢², 张维维², 李玉杰², 段小群³, 徐笑天^{1*} (1. 桂林医学院 药学院, 广西 桂林 541199; 2. 苏州旭辉检测有限公司, 江苏 苏州 215316; 3. 桂林医学院 生物医药产业学院, 广西 桂林 541199)

摘要: **目的** 建立大鼠血浆中游离 SN-38 浓度的 LC-MS/MS 检测方法。**方法** 采用平衡透析法模拟 SN-38 在人体内与血浆蛋白结合的过程, 在透析完成后分离出游离 SN-38, 以 [²H₅] SN-38 为内标, 用蛋白沉淀法预处理透析液侧 (F 侧) 样品, 取上清液进行 LC-MS/MS 分析; 总 SN-38 及透析后血浆侧 (T 侧) SN-38 样品的预处理方法与游离 SN-38 相同; 分别考察两种方法的专属性、线性关系、精密度、准确度、提取回收率、基质效应、稳定性。**结果** F 侧 SN-38 在 0.04 ~ 80 ng · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好 ($r > 0.99$); 提取回收率为 98.6% ~ 101.6%, 基质效应为 96.2% ~ 97.2%; 日内、日间 RSD 均 < 15%, 且分别在不同条件下稳定性良好。大鼠血浆样品中的总 SN-38 在 0.5 ~ 1000 ng · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好 ($r > 0.99$); 提取回收率为 97.3% ~ 99.5%, 基质效应为 100.5% ~ 101.2%; 日内、日间 RSD 均 < 15%, 且分别在不同条件下稳定性良好。**结论** 该方法简单易行、准确、灵敏、专属性好, 适用于大鼠血浆中游离 SN-38 浓度的测定。

关键词: SN-38; 游离浓度; 平衡透析法; LC-MS/MS

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0071-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.011

Determination of free SN-38 concentration in rat plasma by equilibrium dialysis combined with LC-MS/MS and its pharmacokinetic application

LUO Zhen-hua¹, SONG Cheng-hui¹, LI Xiao-chuan^{2, 3}, ZHANG Shu², ZHANG Wei-wei², LI Yu-jie², DUAN Xiao-qun³, XU Xiao-tian^{1*} (1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541199; 2. Xuhui Analysis Co., Ltd., Suzhou Jiangsu 215316; 3. School of Biomedical Industry, Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541199)

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method to determine free SN-38 concentration. **Methods** Equilibrium dialysis was used to simulate the process of SN-38 binding with plasma protein, and the free SN-38 was isolated after the dialysis. The concentration of free SN-38 in dialysate side (F side) was determined by protein precipitation with [²H₅]SN-38 as the internal standard and the supernatant was used for LC-MS/MS analysis. The total SN-38 and the SN-38 in the plasma (T side) after the dialysis were prepared by the same method as free SN-38. The specificity, linearity, precision, accuracy, extraction recovery, matrix effect and stability of both methods were determined respectively. **Results** SN-38 on the F side was well separated with good linear relationship ($r > 0.99$) at 0.04 ~ 80 ng · mL⁻¹. The extraction recovery was 98.6% ~ 101.6%, and the matrix effect was 96.2% ~ 97.2%. Both inter-day and intra-day RSDs were lower than 15%, showing good stability in different conditions. The total SN-38 in the rat plasma samples was well separated by this method, with good linearity at 0.5 ~ 1000 ng · mL⁻¹ ($r > 0.99$). The extraction

基金项目: 广西科技重大专项 (No. 桂科 AA22096026)。

作者简介: 罗珍华, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药代动力学研究, email: 2857606415@qq.com * 通信作者: 徐笑天, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学工作, email: 1012356712@qq.com

recovery were 97.3% ~ 99.5%, and the matrix effect was 100.5% ~ 101.2%. RSDs of both inter-day and intra-day were lower than 15%, and also had good stability in different conditions. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive and specific, which is suitable for the determination of free SN-38 concentration in rat plasma.

Key words: SN-38; free concentration; equilibrium dialysis; LC-MS/MS

7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38)是一种高效的选择性拓扑异构酶 I 抑制剂^[1],由伊立替康在体内经过羧酸酯酶转化的代谢产物,其活性较伊立替康强 100 ~ 1000 倍,是结直肠癌的一线化疗药物^[2]。然而,SN-38 的疏水性和不稳定性限制了其临床应用^[3]。研究表明 SN-38 在大鼠体内的生物利用度较低^[4],这与其在体内跟血浆蛋白的结合有关。

药物的血浆蛋白结合率是药代动力学的重要参数,是药物临床评价的必要指标。常用的测定方法有平衡透析法、凝胶过滤法和离心超滤法等^[5-6]。在前期试验过程中发现采用离心超滤法预处理,对 SN-38 吸附性较强,凝胶过滤法操作较为烦琐,且对于样本量较大时不适用,而平衡透析法的主要优点是可测定处于平衡状态下的游离型药物的浓度,可以最大限度反映药物在体内的情况,操作方便快捷,抗吸附能力较强,温度易于控制,设备成本低廉,实验原理简单。研究表明 SN-38 与血浆中的蛋白结合率在 90% 以上^[7-8],实际上能真正发挥药理作用的是不与血浆蛋白结合的游离药物。目前,国内多项研究采用 LC-MS/MS 法测定 SN-38 的血药浓度^[9-10],这些研究多是测定血浆中 SN-38 的总浓度,并不能准确反映发挥药理作用部分的游离 SN-38 浓度。本实验以 [²H₅]SN-38 为内标,优化了实验条件,采用平衡透析法分离出游离 SN-38,建立平衡透析结合 LC-MS/MS 的检测方法,用蛋白沉淀法预处理透析液侧(F侧)、透析后血浆侧(T侧)和血浆样品检测其 SN-38 的浓度;根据公式计算得到大鼠体内游离 SN-38 的浓度。该方法灵敏度高、简单快速,可为开展临床研究提供方法学的支持。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津);API 4000、QTRAP 6500 型质谱(AB SCIEX. PTE. LTD., 其中 API 4000 型质谱用于总 SN-38 浓度及 T 侧 SN-38 浓度的测定, QTRAP 6500 型质谱用于 F 侧 SN-38 浓度测定);96 孔平衡透析装置(HTD 96

b-Complete Unit)、平衡透析膜(HTD 96 b-Adhesive Sealing Film)(HTDialysis);高速冷冻离心机(5810R, Eppendorf);精密电子天平(Secura 225D-1CN, Sartorius)。

1.2 试剂

盐酸伊立替康对照品(批号:100767-202004, 纯度:86.6%, 中国食品药品检定研究院);SN-38 对照品(批号:C020GWS22001, 纯度:95.3%, 四川协力制药股份有限公司);[²H₅]SN-38 内标对照品(批号:1J165-X1, 纯度:97.74%, ISOREAG);磷酸盐(PBS)片剂(批号:1227H0310, Solarbio);乙腈(批号:205906)、甲酸(批号:C13594075)(Thermo Fisher);纯水为实验室自制超纯水。

1.3 生物基质

1.3.1 大鼠空白血浆 采用腹主动脉采血的方式采集大鼠血液,血液置于肝素钠管中轻轻摇 8 次,3500 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上层血浆于 -80 °C 冰箱冷冻备用。用于血浆样品及 T 侧样品的标准曲线和质控样品的配制。

1.3.2 空白生物基质 采用 96 孔平衡透析装置,将 50 μL 空白大鼠血浆样品加入到每个透析孔的给药端,在透析孔对应的接收端中加入 100 μL 0.01 mol · L⁻¹ PBS 缓冲液,将透析板置于医用冷藏箱中,在 4 °C 下孵育 24 h。经过平衡透析后得到的 PBS 缓冲液与空白大鼠血浆混合后的生物基质作为空白生物基质(2:1),用于配制 F 侧样品的标准曲线和质控样品。

2 方法与结果

2.1 标准溶液配制

精密称取适量 SN-38 对照品 10 mg,置棕色瓶中,经质量校正后以二甲基亚砷溶解^[11]至 1 mg · mL⁻¹,得 SN-38 储备液。取适量 SN-38 储备液用 50% 乙腈配制系列浓度 I (分别为 10、100、200、1000、2000、4000、10 000、20 000 ng · mL⁻¹) 和系列浓度 II (分别 0.8、4、8、20、80、200、800、1600 ng · mL⁻¹) 溶液。精密称取适量 [²H₅]SN-38 对照品 10 mg,置棕色瓶中,以二甲基亚砷溶解至 1 mg · mL⁻¹,得 [²H₅]SN-38 内标储备液。取一定量

的 [$^2\text{H}_5$]SN-38 内标储备液, 经质量校正后以 0.1% 甲酸乙腈为溶剂, 分别将 [$^2\text{H}_5$]SN-38 内标储备液稀释至浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 A 和 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 B。以上所有溶液于 -20°C 储存, 临用前用 50% 乙腈稀释到所需浓度。

2.2 PBS 缓冲液配制

取 PBS 片剂 1 片, 溶于 100 mL 纯水中, 得到浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 7.2 ~ 7.4 的 PBS 缓冲液, 4°C 储存备用。

2.3 分析条件

2.3.1 血浆样品及 T 侧样品的分析条件

① 色谱条件: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) -0.5% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱 ($0 \sim 0.6 \text{ min}$, 20%B; $1.6 \sim 2.20 \text{ min}$, 95%B; $2.21 \sim 3 \text{ min}$, 20%B; 3 min 停止); 流速 $0.60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $2.00 \mu\text{L}$; 柱温 40°C 。

② 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 离子源温度 550°C , 离子喷雾电压 5500 V, 辅助加热气压力 55 psi, 雾化气压力 55 psi, 气帘气压力 20 psi, 碰撞气 12 psi, 去簇电压 90 V, 碰撞电压 39 V; 检测方式为多反应监测 (MRM) 正离子模式; 用于定量分析的离子对分别为: m/z 393.1 \rightarrow 349.1 (SN-38)、 m/z 398.3 \rightarrow 354.3 ($^2\text{H}_5$ SN-38)。

2.3.2 F 侧样品的分析条件

① 色谱条件: 色谱柱及流动相同“2.3.1”项下; 梯度洗脱 ($0 \sim 0.8 \text{ min}$, 10%B, $1.6 \sim 2.20 \text{ min}$, 90%B; $2.21 \sim 3 \text{ min}$, 10%B; 3 min 停止); 流速 $0.50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $2.00 \mu\text{L}$; 柱温 40°C 。

② 质谱条件: 采用 ESI, 离子源温度 550°C , 离子喷雾电压 5500 V, 辅助加热气压力 55 psi, 雾化气压力 55 psi, 气帘气压力 40 psi, 碰撞气 9 psi, 去簇电压 158 V, 碰撞电压 35 V。检测方式及定量分析的离子对同“2.3.1”项下。

2.4 平衡透析方法^[12-13]

实验前先将透析膜用重蒸馏水淋洗两遍, 装好透析装置, 将 $100 \mu\text{L}$ 血浆样品加入到每个透析孔的给药端, 在透析孔对应的接收端中加入 $200 \mu\text{L}$ $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液。将透析板置于 4°C 下平衡 24 h 完成透析平衡。

2.5 样品预处理

2.5.1 血浆样品及 T 侧样品处理

取血浆样品 $60 \mu\text{L}$, 分别加入 $540 \mu\text{L}$ 内标溶液 A, 涡旋约 1 min, $15\ 400 \text{ g}$, 4°C , 离心 10 min, 取上清液进行 LC-MS/MS 分析。

2.5.2 F 侧样品处理 透析完成后, 防止透析液侧 SN-38 被吸附, 取 F 侧溶液 $40 \mu\text{L}$ 分别加入 $20 \mu\text{L}$ 按照“1.3.2”项下制备的大鼠空白血浆配制成 F 侧样品, 涡旋混匀后加入 $180 \mu\text{L}$ 内标溶液 B, 涡旋约 1 min, $15\ 400 \text{ g}$ 4°C 离心 10 min, 取上清液进行 LC-MS/MS 分析。

2.6 方法学验证

2.6.1 血浆样品专属性 精密吸取大鼠空白血浆 $95 \mu\text{L}$, 分别加入 SN-38 储备液及内标储备液 [$^2\text{H}_5$] SN-38; 按照“2.5.1”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析。结果表明, 大鼠空白血浆中的内源性物质不干扰 SN-38 的测定, [$^2\text{H}_5$]SN-38 与 SN-38 之间也互不干扰 (见图 1), 说明该方法的专属性好。

2.6.2 F 侧样品专属性 精密吸取空白生物基质 $95 \mu\text{L}$, 分别加入 SN-38 储备液及内标储备液 [$^2\text{H}_5$] SN-38; 按照“2.5.2”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析。结果表明, 空白生物基质中的内源性物质不干扰 SN-38 的测定, [$^2\text{H}_5$]SN-38 与 SN-38 之间也互不干扰 (见图 2), 说明该方法的专属性好。

2.6.3 线性关系考察 取大鼠空白血浆 $95 \mu\text{L}$, 分别加入 SN-38 系列浓度 I 溶液各 $5 \mu\text{L}$, 得到含 SN-38 质量浓度分别为 0.5、5、10、50、100、200、500、1000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆标准样品。按照“2.5.1”项下方法对样品进行处理。取上清液进行 LC-MS/MS 分析, 以对照品峰面积与内标峰面积之比为纵坐标 (Y), 以待测物浓度与内标 (内标浓度归一化) 之比为横坐标 (X), 线性拟合成标准曲线, 权重系数为 $1/\chi^2$, 得到血浆样品中 SN-38 的回归方程为 $y = 0.0107x + 0.000\ 924$ ($r = 0.9990$), 这说明血浆样品中 SN-38 在 $0.5 \sim 1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好, 定量下限为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

取“1.3.2”项下空白生物基质 $95 \mu\text{L}$, 分别加入 SN-38 系列浓度 II 溶液各 $5 \mu\text{L}$, 得到含 SN-38 质量浓度分别为 0.04、0.2、0.4、1、4、10、40、80 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 F 侧标准样品。按照“2.5.2”项下方法对样品进行处理。取上清液进行 LC-MS/MS 分析, 以对照品峰面积与内标峰面积之比为纵坐标 (Y), 以待测物浓度与内标 (内标浓度归一化) 之比为横坐标 (X), 线性拟合成标准曲线, 权重系数为 $1/\chi^2$, 得到 F 侧样品中 SN-38 的回归方程为 $y = 0.294x - 0.00128$ ($r = 0.9969$), 说明 F 侧样品中 SN-38 在 $0.04 \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性

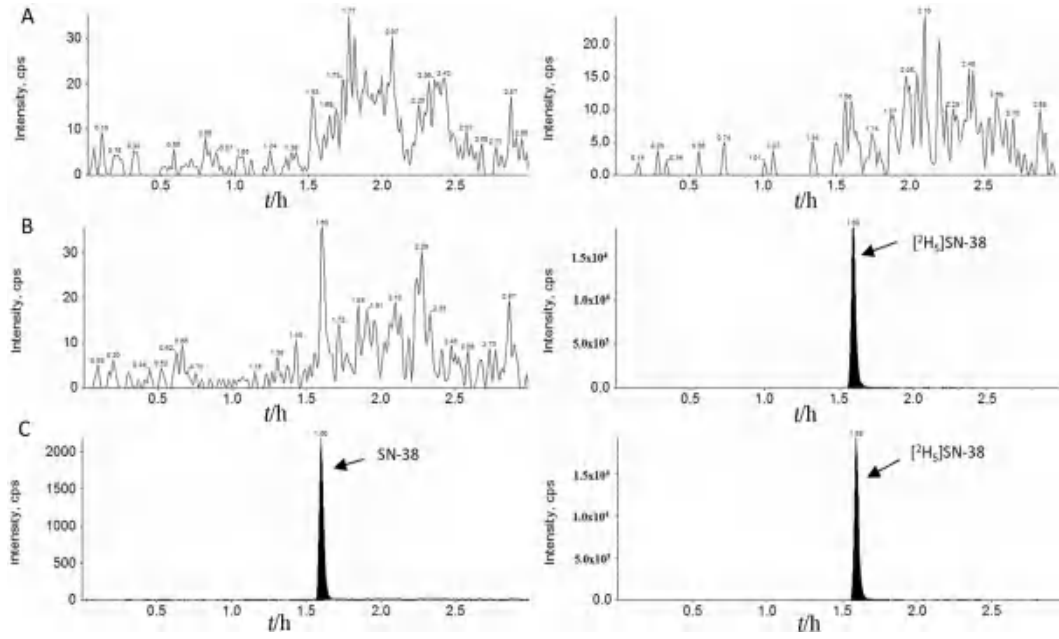


图 1 血浆样品专属性

Fig 1 Specificity of plasma samples

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆 + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$ (blank plasma + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$); C. SN-38 血浆样品 + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$ (plasma sample containing SN-38 + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$)

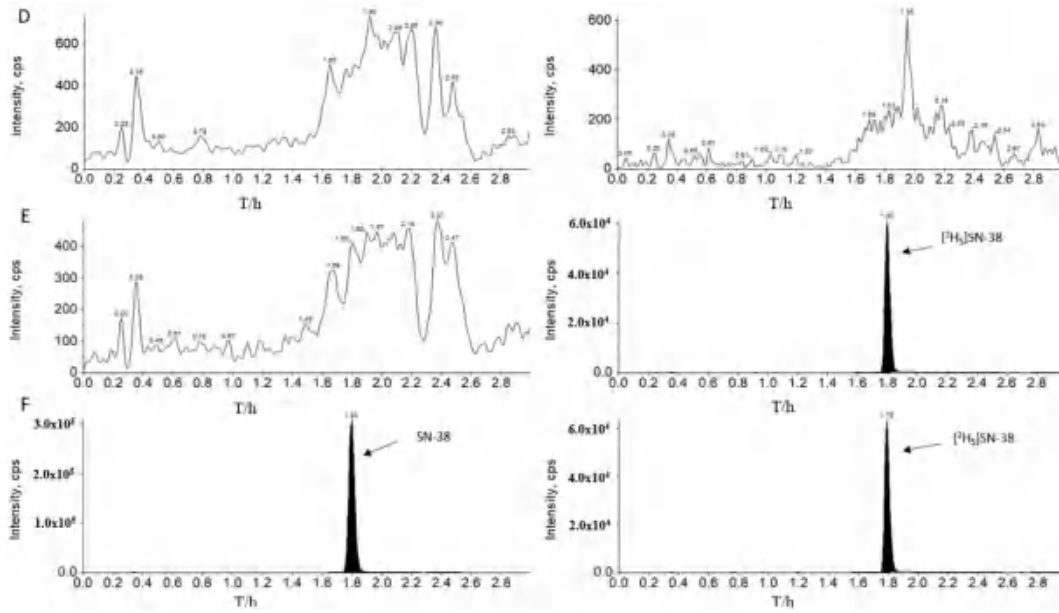


图 2 F 侧样品专属性

Fig 2 Specificity of samples on the F side

D. 空白生物基质 (blank biological matrix); E. 空白生物基质 + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$ (blank biological matrix + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$); F. SN-38 血浆样品 + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$ (SN-38 + $[^2\text{H}_5]\text{SN-38}$)

关系良好, 定量下限为 $0.04 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6.4 精密度与准确度 按照“2.1”项下方法配制制备 SN-38 质量浓度为 1、20、400、800 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆质控样品。按照“2.5.1”项下方法对样品进行处理, 每个浓度重复 6 次, 与标准曲线同批测定, 连续测定 3 d。计算血浆 SN-38 的精密度 (RSD) 与准确度 (RE), 结果见表 1。

按照“2.1”项下配制 F 侧样品标准曲线的方法, 同法制备 SN-38 质量浓度为 0.12、0.8、8、64 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 F 侧质控样品。按照“2.5.2”项下方法处理, 每个浓度重复 6 次, 与标准曲线同批测定, 连续测定 3 d。计算 F 侧 SN-38 的精密度 (RSD) 与准确度 (RE), 结果见表 1。

表 1 SN-38 在 T 侧和 F 侧样品中的日内及日间精密度和准确度 (Mean ± SD, n = 6)

Tab 1 Intra-day and inter-day precision and accuracy of SN-38 in the plasma of T side and F side (Mean ± SD, n = 6)

加标浓度 / (ng · mL ⁻¹)	日内			日间			
	实测浓度 / (ng · mL ⁻¹)	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	实测浓度 / (ng · mL ⁻¹)	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	
T 侧	1	0.91 ± 0.09	9.5	90.8	0.94 ± 0.10	10.6	96.3
	20	20.3 ± 0.37	1.8	101.4	20.0 ± 0.7	3.5	100.3
	400	394 ± 8.45	2.1	98.3	394 ± 10.62	2.7	98.5
	800	777 ± 14.4	1.8	96.3	763 ± 20.53	2.7	95.4
F 侧	0.12	0.12 ± 0.01	4.3	96.8	0.12 ± 0.01	6.9	99.7
	0.8	0.77 ± 0.03	3.6	96.5	0.79 ± 0.02	3.0	98.4
	8	7.99 ± 0.07	0.92	99.9	8.02 ± 0.13	1.6	100.1
	64	64.42 ± 0.46	0.71	100.8	63.16 ± 0.74	1.2	100.3

2.6.5 提取回收率 取大鼠空白血浆样品配制 20、400、800 ng · mL⁻¹ 的血浆样品, 用得到的峰面积与用空白血浆样品离心后的上清液作为生物基质, 按照“2.1”项下方法配制血浆样品标准曲线, 并按照“2.5.1”项下方法对样品进行处理的未提取浓度样品的峰面积进行比较。每个浓度 6 份样本分析, 考察血浆样品的提取回收率。大鼠空白血浆中 SN-38 的提取回收率在 97.3% ~ 99.5%, 表明该方法回收率稳定, 结果见表 2。

取空白生物基质配制 0.8、8、64 ng · mL⁻¹ 的样品, 用得到的峰面积与用空白血浆样品离心后的上清液作为生物基质, 按照“2.1”项下方法配制 F 侧样品标准曲线, 并按照“2.5.2”项下对样品进行处理的未提取浓度样品的峰面积进行比较。每个浓度 6 份样本分析, 考察 F 侧样品的提取回收率。空白生物基质中 SN-38 的提取回收率在 98.6% ~ 101.6%, 表明该方法回收率稳定, 结果见表 2。

2.6.6 基质效应 以大鼠空白血浆配制 20、400、800 ng · mL⁻¹ 的提取后血浆样品, 与以溶剂配制的同浓度样品进行峰面积比较。每个浓度 6 份样本, 考察血浆样品的基质效应, 结果见表 2。

取透析后空白生物基质配制 0.8、8、64 ng · mL⁻¹ 的提取后基质样品, 与以溶剂配制的同浓度的样品进行峰面积比较。每个浓度 6 份样本, 考察 F 侧样品的基质效应, 结果见表 2。

2.6.7 稳定性 配制质量浓度分别为 20、800 ng · mL⁻¹ 的血浆质控样品, 每个浓度 6 份样本, 分别考察血浆样品在室温放置 24 h、-20 °C 冷冻 7 d、反复冻融 3 次, 按照“2.5.1”项下方法对样品进行处理。配制质量浓度分别为 0.8、64 ng · mL⁻¹ 的 F 侧质控样品, 每个浓度 6 份样本, 分别在室温放置 24 h、-20 °C 冷冻 7 d、反复冻融 3 次后, 按照“2.5.2”项下方法对样品进行处理。血浆样品或 F

表 2 SN-38 在 T 侧和 F 侧样品中的提取回收率和基质效应 (Mean ± SD, n = 6)

Tab 2 Matrix effect and extraction recovery of SN-38 and [³H] SN-38 in T side and F side (Mean ± SD, n = 6)

成分	加标浓度 / (ng · mL ⁻¹)	基质效应 / %	提取回收率 / %
T 侧 SN-38	20	100.5 ± 8.38	97.3 ± 9.83
	400	101.2 ± 2.33	99.5 ± 1.68
	800	101.1 ± 1.47	99.3 ± 2.53
F 侧 SN-38	0.8	96.7 ± 4.95	98.6 ± 4.31
	8	97.2 ± 2.70	101.6 ± 1.56
	64	96.2 ± 2.47	100.6 ± 5.11

侧样品中各两个质量浓度的质控样品在上述条件下的 RSD 均 < 10%, 样品稳定性良好。结果分别见表 3 和表 4。

表 3 不同条件下 T 侧 SN-38 稳定性结果

Tab 3 Stability of SN-38 in the plasma of T side at different conditions

加标浓度 / (ng · mL ⁻¹)	室温 4 h		医用低温箱冻存 7 d (-20 °C)		反复冻融 3 次	
	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%
	20	97.4	9.5	94.8	4.8	97.3
800	95.0	3.2	97.7	2.9	98.0	1.5

表 4 不同条件下 F 侧 SN-38 稳定性结果

Tab 4 Stability of SN-38 in the plasma of F side at different conditions

加标浓度 / (ng · mL ⁻¹)	室温 4 h		医用低温箱冻存 7 d (-20 °C)		反复冻融 3 次	
	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%
	0.8	108.0	4.6	99.4	4.4	104.1
64	101.2	0.79	105.1	1.0	5.52	0.69

2.6.8 透析平衡时间的考察 取含 800 ng · mL⁻¹ SN-38 的血浆样品, 平衡时间分别为 12、24、36 h, 将透析板置于 4 °C 下, 测定透析后 T 侧及 F 侧药物浓度。T 侧按照“2.5.1”项下方法、F 侧按照“2.5.2”项下方法对样品进行处理。由表 5 可知, 当平衡时间为 24、36 h 时, 测得的血浆蛋白结合率比较接近, 且差异无统计学意义 (P > 0.05)。

因此确定平衡时间为 24 h，平衡温度为 4 °C。

表 5 不同透析平衡时间的浓度的测定结果 (Mean ± SD, n = 3)

平衡时间/h	T 侧 / (ng · mL ⁻¹)	F 侧 / (ng · mL ⁻¹)	血浆蛋白结合率/%
12	531.0 ± 2.45	95.2 ± 0.45	82.1
24	476.3 ± 6.60	33.9 ± 1.03	92.9
36	465.0 ± 10.20	32.1 ± 1.02	93.1

2.7 方法学应用

SD 大鼠，雌雄各半，220 ~ 250 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司]，实验禁食不禁水 12 h。取大鼠 3 只，按照单剂量 (5 mg · kg⁻¹) 尾静脉注射盐酸伊立替康注射液。于给药前 0 h 和给药后 0.08、3、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24 h 从颌下静脉取血约 0.5 mL 置肝素钠抗凝试管中，3500 r · min⁻¹ 离心 10 min 分离血浆，于 - 80 °C 冰箱中保存待测。

取血浆 60 μL 按“2.5.1”项下方法处理样品，再按“2.3.1”项下方法测定总 SN-38 浓度。剩余血浆取 100 μL 经 96 孔平衡透析装置透析后，取 T 侧样品 60 μL 按“2.5.1”项下方法处理样品，再按“2.3.1”项下分析方法测定 T 侧 SN-38 浓度；取 F 侧样品 40 μL 按“2.5.2”项下方法处理，再按“2.3.2”项下方法测定 F 侧 SN-38 浓度。以随行标准曲线得到各时间点的血药浓度，按照计算公式计算： $C_f = C_t \times (C_f / C_T)$ ；其中 C_t 是 SN-38 总浓度； C_f 是 SN-38 游离浓度； C_T 是透析 24 h 后 T 侧 SN-38 浓度； C_F 是透析 24 h 后 F 侧 SN-38 浓度，结果见表 6 及图 3。

表 6 大鼠血浆中总 SN-38 及游离 SN-38 的平均血药浓度 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

时间/h	总 SN-38 / (ng · mL ⁻¹)	T 侧 / (ng · mL ⁻¹)	F 侧 / (ng · mL ⁻¹)	游离 SN-38 / (ng · mL ⁻¹)
0	0	0	0	0
0.083	534.33 ± 75.05	503.33 ± 83.68	47.3 ± 3.4	50.30 ± 1.81
0.25	226.67 ± 21.94	200.67 ± 6.35	17.5 ± 1.25	19.73 ± 1.85
0.5	149.33 ± 24.50	132.00 ± 17.06	12.03 ± 1.53	13.62 ± 2.23
1	114.87 ± 16.31	100.70 ± 8.92	9.24 ± 2.16	10.54 ± 2.77
2	76.27 ± 11.71	69.37 ± 9.10	6.11 ± 1.05	6.76 ± 1.30
4	31.37 ± 6.42	28.10 ± 7.77	2.36 ± 0.6	2.64 ± 0.47
8	4.51 ± 1.43	3.97 ± 1.38	0.4 ± 0.15	0.45 ± 0.15
12	1.62 ± 0.49	1.28 ± 0.34	0.16 ± 0.05	0.20 ± 0.08
24	0	0	0	0

3 讨论

药物在吸收入血后以游离态和结合态两种形式存在，其中血浆蛋白结合率表示吸收进入人体后的药物与血浆蛋白结合形成的结合型药物，占

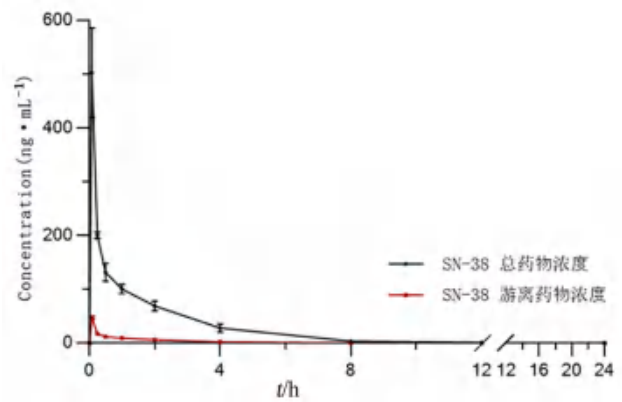


图 3 大鼠血浆中总 SN-38 和游离 SN-38 浓度的平均药物浓度 - 时间曲线 (n = 3)

Fig 3 Mean drug time concentration curve of total and free SN-38 concentrations in the rat plasma (n = 3)

全部药物总量的比例^[14]。游离药物假说认为只有游离态的药物才能透过生物膜扩散到靶部位发挥药效^[15]；另外游离药物的比例还会显著影响药物分布、代谢和排泄的过程^[16]，血浆蛋白结合率与药物的诸多药理性质均有关。因此，近些年来游离药物浓度的血药浓度测定越来越受到国内外研究者的关注和重视^[17-18]。

目前，由于方法技术的限制，游离药物浓度的测定在临床前药代动力学研究中的应用并不广泛^[19]。本文采用的平衡透析法^[20]，具有操作简单、分析成本低、待测物在透析装置上吸附少等特点^[21]。与已报道的文献研究相比^[9, 22]，本文所建立的分析方法定量下限低，线性范围宽，提取回收率高，因此测定游离 SN-38 浓度更有优势。难溶性药物通过注射方式给药一直是药剂学研究中的难点，然而白蛋白作为难溶性药物的新型载体，使得越来越多的难溶性药物应用到临床中，本文所建立的分析方法已应用到体内研究，随着后期的深入研究，该方法将应用到更多的白蛋白类制剂检测中。在实验过程中发现，采用平衡透析法时，一般可选择 37 °C 或 4 °C 作为平衡温度。由于 SN-38 在 37 °C 下平衡透析时不稳定，故选择 4 °C 为平衡温度^[23]；另外分别考察了平衡透析时间 12、24、36 h，结果发现 SN-38 在透析 12 h 后透析不完全，药物浓度并未达到分布平衡，而透析 24 h 后透析完全。故选择 4 °C 下透析 24 h 作为最终平衡透析条件。

SN-38 是一种高强度的蛋白结合药物，且恒定的血浆蛋白结合率会使发挥药效的游离型药物浓度相对稳定，当游离型药物浓度因为组织分布而下降时，结合型药物会与血浆蛋白解离并补充到

组织中,使其与游离型药物保持动态平衡,从而保证药效能持续发挥作用^[24-25]。本实验采用 LC-MS/MS 法及平衡透析结合 LC-MS/MS 法分别测定大鼠血浆中总 SN-38 和 T 侧、F 侧 SN-38 的浓度,根据计算可知 SN-38 的血浆蛋白结合率大于 90%,该结果与其他文献报道的结果吻合^[7];同时绘制了 SN-38 总药物浓度和游离药物浓度的药物浓度-时间曲线,比仅测定总 SN-38 血药浓度具有更重要的意义。该方法为药物游离浓度的测定提供了一种可能性,后期可协助临床进行个体化给药,为提高疗效和减少药物不良反应提供可靠的参考^[26]。

参考文献

- [1] Song LJ, Zeng AQ, Hu MX, et al. Biodegradable polymeric micelle-mediated delivery of a pH-activatable prodrug of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) to enhance anti-angiogenesis and anti-tumor activity [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14 (2): 267-280.
- [2] Si JX, Zhao XB, Gao S, et al. Advances in delivery of Irinotecan (CPT-11) active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin [J]. *Int J Pharm*, 2019, 568: 118499.
- [3] Fang YP, Chuang CH, Wu YJ, et al. SN38-loaded < 100 nm targeted liposomes for improving poor solubility and minimizing burst release and toxicity: in vitro and in vivo study [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 2789-2802.
- [4] 杨付英, 张文萍, 王欣瑜, 等. 静脉注射盐酸伊立替康纳米粒后代物 7-乙基-10-羟基喜树碱的药动学和组织分布研究 [J]. *药学报*, 2014, 49 (7): 1029-1033.
- [5] Bertucci C, Domenici E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance [J]. *Curr Med Chem*, 2002, 9 (15): 1463-1481.
- [6] 周大炜, 李乐道, 李发美. 药物-蛋白结合作用的分析方法研究 [J]. *色谱*, 2004, 22 (2): 116-120.
- [7] Combes O, Barré J, Duché JC, et al. In vitro binding and partitioning of irinotecan (CPT-11) and its metabolite, SN-38, in human blood [J]. *Invest New Drugs*, 2000, 18 (1): 1-5.
- [8] Goldwirt L, Lemaitre F, Zahr N, et al. A new UPLC-MS/MS method for the determination of irinotecan and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in mice: application to plasma and brain pharmacokinetics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 66: 325-333.
- [9] 范先煜, 汪硕闻, 汪雯心, 等. LC-MS/MS 法同时测定人血浆中伊立替康与其主要代谢产物及在治疗药物监测中的应用 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (6): 914-919.
- [10] 李凯, 曹晓绵, 刘珺, 等. SN-38 脂质体的药动学及组织分布学特征 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33 (4): 280-284, 297.
- [11] Cao Y, Cheng QY, Lu HY, et al. Determination of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin in microdialysates from rat brain with LC-MS/MS [J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2013, 42: 98-102.
- [12] 徐楠, 高惠静, 冉鑫, 等. 平衡透析法结合 HPLC 测定去氢骆驼蓬碱衍生物 (DH-004) 在大鼠血浆的蛋白结合率 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37 (22): 3144-3147.
- [13] Seyfinejad B, Ozkan SA, Jouyban A. Recent advances in the determination of unbound concentration and plasma protein binding of drugs: analytical methods [J]. *Talanta*, 2021, 225: 122052.
- [14] 关瑾, 丁爽, 刘芷含, 等. 药物-血浆蛋白结合率测定方法的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2014, 23 (10): 1149-1153.
- [15] Smith SA, Waters NJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drugs binding to Alpha-1-acid glycoprotein [J]. *Pharm Res*, 2018, 36 (2): 30.
- [16] 李金恒, 许劲秋. 游离药物测定在治疗药物监测中的意义 [J]. *中国药理学通报*, 1999, 15 (1): 14-17.
- [17] Hann E, Malagu K, Stott A, et al. The importance of plasma protein and tissue binding in a drug discovery program to successfully deliver a preclinical candidate [J]. *Prog Med Chem*, 2022, 61: 163-214.
- [18] Di L. An update on the importance of plasma protein binding in drug discovery and development [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, 16 (12): 1453-1465.
- [19] 董维冲. 血浆中游离药物分析方法的理论与临床应用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [20] Zamek-Gliszczyński MJ, Ruterbories KJ, Ajamie RT, et al. Validation of 96-well equilibrium dialysis with non-radio-labeled drug for definitive measurement of protein binding and application to clinical development of highly-bound drugs [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100 (6): 2498-2507.
- [21] 马智宇. 新剂型药物血浆中游离药物浓度研究方法概述 [J]. *上海医药*, 2019, 40 (7): 74-77.
- [22] 银晓晶. 7-乙基-10-羟基喜树碱与小鼠血浆蛋白结合率的测定 [J]. *当代化工*, 2022, 51 (2): 366-369.
- [23] 林朝展, 蔡昭喜, 桂浩凌, 等. 高效液相色谱法测定毛冬青酸在大鼠体内的血药浓度 [J]. *广州中医药大学学报*, 2010, 27 (5): 503-506.
- [24] Riccardi K, Cawley S, Yates PD, et al. Plasma protein binding of challenging compounds [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104 (8): 2627-2636.
- [25] Stove V, Coene L, Carlier M, et al. Measuring unbound versus total vancomycin concentrations in serum and plasma: methodological issues and relevance [J]. *Ther Drug Monit*, 2015, 37 (2): 180-187.
- [26] Calvo R, Lukas JC, Rodriguez M, et al. The role of unbound drug in pharmacokinetics/pharmacodynamics and in therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12 (8): 977-987.

(收稿日期: 2023-07-04; 修回日期: 2023-09-12)

基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的柳叶鼠李化学成分分析

孟祎¹, 赵伊君¹, 薛志鹏¹, 王宁¹, 白吉庆^{1, 2*}, 王小平^{1, 2} (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中药原料质量监测技术服务中心, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 目的 建立 HPLC-Q-TOF-MS 方法快速分析柳叶鼠李的化学成分。方法 采用 BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min⁻¹。扫描方式采用正、负离子 Full-ddMS² 模式。通过在线 mzCloud 及 Chemspider 数据库和自建标准库 mzVault 进行分析, 结合相关文献检索以及质谱裂解规律分析柳叶鼠李中的化学成分。结果 共鉴定出 138 个化合物, 主要是黄酮类和有机酸类。结论 对柳叶鼠李中的化学成分进行了快速的分析, 可为柳叶鼠李的质量控制和药效物质基础研究提供参考。

关键词: 柳叶鼠李; HPLC-Q-TOF-MS; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0078-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.012

Analysis of chemical constituents in *Rhamnus erythroxylum* Pallas by HPLC-Q-TOF-MS

MENG Yi¹, ZHAO Yi-jun¹, XUE Zhi-peng¹, WANG Ning¹, BAI Ji-qing^{1, 2*}, WANG Xiao-ping^{1, 2} (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Traditional Chinese Medicine Raw Material Quality Monitoring Technical Service Center, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To rapidly analyze chemical constituents in *Rhamnus erythroxylum* Pallas by HPLC-Q-TOF-MS. **Methods** Chromatographic separation was conducted on BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with the mobile phase of 0.1% formic acid water-acetonitrile in gradient elution at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The scanning was performed in the positive-and negative-ion Full-ddMS² mode. With mzCloud and Chemspider search and fragmentation pathway, the chemical components in *Rhamnus erythroxylum* Pallas were analyzed. **Results** Totally 138 compounds were identified, mainly flavonoids and phenolic acids. **Conclusion** The chemical constituents in *Rhamnus erythroxylum* Pallas are identified out rapidly, which provides reference for the quality control and pharmacodynamics of *Rhamnus erythroxylum* Pallas.

Key words: *Rhamnus erythroxylum* Pallas; HPLC-Q-TOF-MS; chemical composition

柳叶鼠李 (*Rhamnus erythroxylum* Pallas) 是鼠李科鼠李属灌木树种, 稀乔木, 高可达 2 m, 别名黑疙瘩、黑格铃、红木鼠李^[1], 在《中华本草》《全国中草药汇编》上均有记载, 具有清热除烦、消食化积之功效, 但目前尚未有相关的临床研究报道, 主要分布在内蒙古、青海、甘肃、陕西、河北、山西等省区, 在海拔 1200 ~ 2600 m 山坡阴湿处或山谷灌丛中生长^[2]。目前, 国内对柳叶鼠李的研究主要集中在季节变化^[3]和生物活性^[4]方面, 为了深入对

其研究, 本研究首先对其进行全面的化学成分析。HPLC-Q-TOF-MS 分析技术是现在中药成分研究领域中的应用广泛的定性测定方法, 可以尽可能地检测出中药所含的化学成分^[5], 具有高速、高灵敏度以及高选择性等特点^[6]。本试验运用 HPLC-Q-TOF-MS 技术对柳叶鼠李的化学成分进行鉴定分析, 为柳叶鼠李的质量控制以及药效物质基础的研究提供依据。

1 材料

Vauquish Flex 型超高效液相色谱系统、Q

基金项目: 2019 年医疗服务与保障能力提升补助资金项目“中医药事业传承与发展部分第四次全国中药资源普查项目”(财社[2019]39号)。

作者简介: 孟祎, 女, 硕士, 主要从事中药资源开发与利用研究, email: 3552699758@qq.com *通信作者: 白吉庆, 男, 教授, 主要从事中药资源开发与利用研究, email: baijiqing323@126.com

Exactive Orbitrap 型质谱仪、Direct-Q3 UV 超纯水一体机 (美国 Millipore 公司), 十万分之一电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度: 0.01 mg), KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 无水乙醇 (天津市天力化学试剂有限公司), 乙腈、甲酸均为分析纯。

鼠李素 (批号: PS220817-07)、异鼠李素 (批号: PS010460)、柚皮素 (批号: PS0240-0025MG)、山柰酚 (批号: PS011676)、芹菜素 (批号: PS010177)、槲皮苷 (批号: PS010791) (纯度均 $\geq 98\%$, 成都普思生物科技股份有限公司); 秦皮素 (纯度 $\geq 98.0\%$, 批号: 111731-200501)、芦丁 (纯度 $\geq 90.5\%$, 批号: 100080-200707)、秦皮乙素 (纯度 $\geq 98.0\%$, 批号: 110741-200506)、槲皮素 (纯度 $\geq 96.5\%$, 批号: 100081-200907)、木犀草素 (纯度 $\geq 98.0\%$, 批号: 111520-202107) (中国食品药品检定研究院)。

柳叶鼠李采于陕西省富县蒋家村, 经陕西中医药大学王薇教授鉴定为鼠李科植物柳叶鼠李 *Rhamnus erythroxylum* Pallas 的叶 (标本存放于陕西中医药大学中药资源普查样本储藏室, 标本号: 20210812LY)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的配制

精密称取柳叶鼠李粉末 2 g, 加入 60% 乙醇 50 mL 置玻璃瓶中, 超声提取 40 min (功率 80 W, 频率 45 kHz), 冷却后, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用, 即为供试品溶液。

2.2 混合对照品溶液的配制

精密称取适量各对照品, 用 60% 乙醇溶解并定容, 用 0.22 μm 微孔膜过滤, 得混合对照品溶液 (鼠李素、异鼠李素、柚皮素、秦皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素、槲皮苷、芦丁、秦皮乙素、槲皮素质量浓度分别为 0.09、0.22、0.17、0.15、0.09、0.13、0.38、0.09、1.05、0.16、0.11 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3 色谱-质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 BEH C_{18} 柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0 ~ 1.5 min, 5%B; 1.5 ~ 15 min, 5% ~ 75%B; 15 ~ 20 min, 75% ~ 95%B; 20 ~ 26 min, 95%B; 26 ~ 26.1 min, 95% ~ 5%B; 26.1 ~ 30 min, 5%B, 体积流量 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 5 μL 。

2.3.2 质谱条件 喷雾电压 3.5 kV, 鞘气流量 45 arb, 辅助气流量 10 arb, 辅助加热器温度 450 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管温度 275 $^{\circ}\text{C}$, 扫描方式采用正、负离子

Full-ddMS² 模式。

2.4 结果

如图 1 所示, 通过 HPLC-Q-TOF-MS 检测, 通过质谱裂解碎片分析并结合文献报道数据^[7-36]对照, 在柳叶鼠李 60% 乙醇提取液中鉴定了 138 种化合物, 结果如表 1 所示。

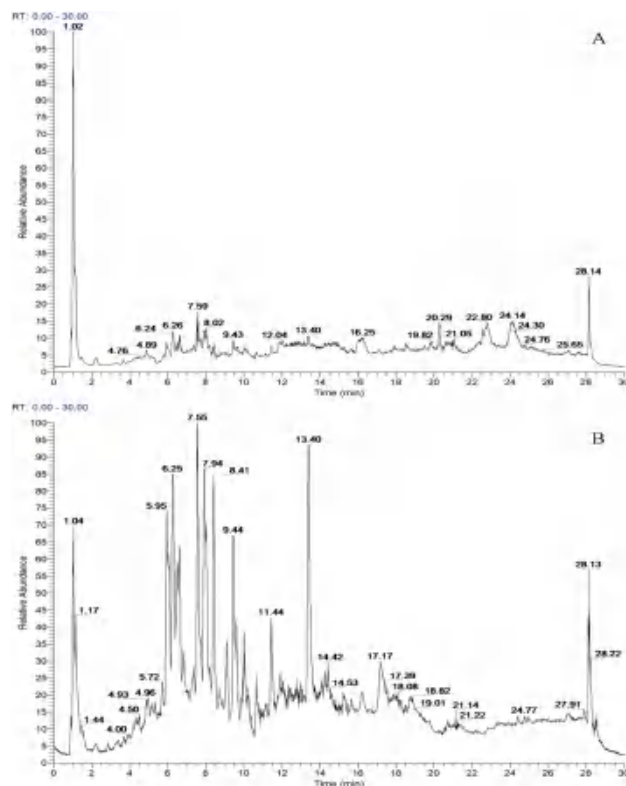


图 1 柳叶鼠李的 HPLC-Q-TOF-MS 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of HPLC-Q-TOF-MS by positive mode (A) and negative mode (B) for *Rhamnus erythroxylum* Pallas

2.4.1 黄酮类化合物的分析鉴定 黄酮类化合物是植物次生代谢产物, 以游离态或与糖结合为苷的形式存在^[7], 由于普遍具有相同的基本骨架, 因此通常表现出相似的质谱裂解途径^[8], 黄酮及其苷类在裂解过程中容易发生糖苷键断裂、C 环的逆狄尔斯-阿尔德 (RDA) 裂解以及一氧化碳 (CO)、二氧化碳 (CO_2)、水 (H_2O) 等一些中性分子的丢失, 本研究共鉴定或推断出黄酮类化合物 60 个。

化合物 59 的裂解过程如图 2 所示, 化合物脱去了 1 分子鼠李糖产生的离子碎片峰 m/z 465.1018 $[\text{M}+\text{H}-\text{Rha}]^+$, 再失去 1 分子葡萄糖而得到的碎片离子峰 m/z 303.0497 $[\text{M}+\text{H}-\text{Rha}-\text{Glc}]^+$, 也可以 m/z 303.0497 碎片离子通过准分子离子 m/z 610.3118 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 失去多糖直接生成, 根据参考文献^[9-10], 并与图 2 对比, 鉴定该化合物为芦丁。例如化合物 77, 在 $t_{\text{R}} = 6.613$ min 处检测到化学式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, 分子离子峰 m/z

表 1 柳叶鼠李中化学成分解析结果

Tab 1 Chemical constituents identified from the extracts of *Rhamnus erythroxylum* Pallas

No.	名称	分子式	误差	相对分子质量	质荷比	离子模式	碎片离子
1	L-艾杜糖醇	C ₆ H ₁₄ O ₆	- 2.38	182.0786	181.0712	[M-H] ⁻	71.0128, 181.0718, 59.0128, 101.0235
2	L-蔗糖酸	C ₄ H ₈ O ₅	- 4.44	136.0362	135.0289	[M-H] ⁻	75.0076, 135.0293, 59.0127, 89.0233
3	D-葡萄糖醛酸	C ₆ H ₁₀ O ₇	- 1.44	194.0424	193.0349	[M-H] ⁻	59.0128, 103.0028, 85.0285, 73.0284
4	阿拉伯酸	C ₅ H ₁₀ O ₆	- 3.55	166.0472	165.0399	[M-H] ⁻	75.0076, 165.0400, 87.0076, 105.0185
5	甜菜碱 ^[30]	C ₅ H ₁₁ NO ₂	- 0.40	117.0789	118.0862	[M+H] ⁺	118.0866, 59.0738, 58.0660
6	N-乙酰-L-缬氨酸	C ₇ H ₁₃ NO ₃	- 2.31	159.0892	160.0965	[M+H] ⁺	114.0917, 160.0969
7	奎尼酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	- 2.25	192.0630	191.0559	[M-H] ⁻	85.0289, 191.0199, 87.0078
8	蔗糖 ^[28]	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	- 1.29	341.1089	341.1094	[M-H] ⁻	59.0128, 89.0234, 341.1098, 179.0559
9	D-核糖	C ₅ H ₁₀ O ₅	- 2.88	150.0524	195.0505	[M+FA-H] ⁻	89.0234, 149.0450, 59.0128
10	腺嘌呤 ^[23, 28]	C ₅ H ₅ N ₅	- 1.39	135.0543	136.0616	[M+H] ⁺	136.0618, 119.0355
11	DL-苹果酸 ^[13]	C ₄ H ₆ O ₅	- 4.31	134.0204	133.0131	[M-H] ⁻	115.0028, 71.0128, 133.0135, 72.9920
12	DL-高脯氨酸	C ₆ H ₁₁ NO ₂	- 2.11	129.0787	130.0860	[M+H] ⁺	84.0814, 130.0865
13	烟酰胺 ^[28]	C ₆ H ₆ N ₂ O	- 4.59	122.0475	262.1280	[2M+NH ₄] ⁺	124.0396, 80.0502
14	烟酸 ^[5]	C ₆ H ₅ NO ₂	0.20	123.0321	124.0393	[M+H] ⁺	124.0396, 80.0502
15	吡哆醇	C ₈ H ₁₁ NO ₃	- 1.61	169.0736	170.0808	[M+H] ⁺	152.0707, 134.0603, 170.0960
16	柠檬酸 ^[14]	C ₆ H ₈ O ₇	- 2.93	192.0264	191.0192	[M-H] ⁻	111.0080, 87.0077, 191.0199, 129.0187
17	白屈菜酸	C ₇ H ₄ O ₆	- 0.40	184.0007	182.9931	[M-H] ⁻	67.0178, 139.0030, 72.1860, 182.9932
18	次黄嘌呤 ^[29]	C ₅ H ₄ N ₄ O	- 0.53	136.0384	137.0457	[M+H] ⁺	137.0459, 138.0559, 110.0354, 119.0357
19	丁二酸 ^[29]	C ₄ H ₆ O ₄	- 4.40	118.0256	117.0183	[M-H] ⁻	73.0285, 116.9278, 99.9249, 99.0078
20	N-甲基酪胺	C ₉ H ₁₃ NO	- 0.38	151.0997	152.1069	[M+H] ⁺	121.0652
21	4-羟基苯乙烯	C ₈ H ₈ O	1.44	120.0577	121.0650	[M+H] ⁺	121.0653, 103.0547, 95.0498, 105.0454
22	对二甲氨基乙基苯酚	C ₁₀ H ₁₃ NO	- 0.31	165.1153	166.1226	[M+H] ⁺	121.0652, 166.1227
23	L-苯丙氨酸 ^[26]	C ₉ H ₁₁ NO ₂	- 0.72	165.0789	166.0861	[M+H] ⁺	120.0812, 103.0547, 107.0496, 166.0860
24	D-泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	- 0.83	219.1105	220.1178	[M+H] ⁺	90.0556, 220.1176, 202.1074, 184.0971
25	表没食子儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	- 1.17	306.0736	307.0809	[M+H] ⁺	139.0390, 163.0390
26	4, 8-二羟基喹啉-2-甲酸	C ₁₀ H ₇ NO ₄	- 0.82	205.0373	206.0446	[M+H] ⁺	178.0500, 206.0448
27	邻苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	- 4.45	110.0361	109.0288	[M-H] ⁻	109.0288, 67.0290, 82.0286
28	龙胆酸	C ₇ H ₆ O ₄	- 2.87	154.0262	153.0189	[M-H] ⁻	109.0287, 153.019
29	秦皮乙素 [*]	C ₉ H ₆ O ₄	- 0.92	178.0265	179.0337	[M+H] ⁺	179.0341, 133.0286, 89.0393
30	(E)-3-吡啶丙烯酸	C ₁₁ H ₉ NO ₂	- 0.99	187.0631	188.0704	[M+H] ⁺	146.0600, 118.0655, 144.0809, 188.0709
31	3-醛基水杨酸	C ₈ H ₆ O ₄	- 1.56	166.0264	165.0191	[M-H] ⁻	165.0190, 121.0288, 77.0387, 93.0337
32	原花青素 B ₁ ^[8]	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	- 0.71	578.1420	579.1493	[M+H] ⁺	127.0393, 139.0390, 163.0390
33	没食子儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	- 1.67	306.0734	307.0807	[M+H] ⁺	139.0390, 84.0814, 243.1698, 215.1390
34	3, 4-二羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₃	- 5.00	138.0310	137.0237	[M-H] ⁻	137.0237, 108.0209
35	氯黄酮	C ₁₀ H ₇ NO ₃	- 0.51	189.0425	190.0498	[M+H] ⁺	162.0550, 190.0501
36	表儿茶素 ^[8]	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	- 1.83	290.0785	291.0858	[M+H] ⁺	139.0390, 123.0444, 147.0441
37	芦荟苦素	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	- 1.22	394.1259	395.1332	[M+H] ⁺	395.1329, 233.0805, 275.0909
38	3, 5-二羟基甲苯	C ₇ H ₈ O ₂	0.69	124.0525	125.0598	[M+H] ⁺	125.0600, 107.0496, 110.0366, 79.0549
39	儿茶素 ^[8]	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	- 1.72	290.0785	291.0858	[M+H] ⁺	139.0390, 123.0444, 147.0441
40	花旗松素 ^[27]	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	- 1.44	304.0579	305.0651	[M+H] ⁺	259.0598, 149.0233, 231.0651, 153.0183
41	间苯三酚	C ₆ H ₆ O ₃	0.43	126.0318	127.0390	[M+H] ⁺	127.0393, 81.0341
42	5, 7-二羟基原酮	C ₉ H ₆ O ₄	- 1.28	178.0269	177.0191	[M-H] ⁻	177.0192, 133.0288, 105.0338
43	原花青素 B ₂ ^[8]	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	- 0.82	578.1420	579.1492	[M+H] ⁺	127.0393, 139.0389, 163.0390, 409.0913
44	咖啡酸 ^[13]	C ₉ H ₈ O ₄	- 1.83	180.0419	179.0347	[M-H] ⁻	135.0445, 179.0349, 90.9972
45	二氢杨梅素	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	3.30	320.0543	319.0470	[M-H] ⁻	193.0146, 125.0238, 175.0038
46	maesopsin	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	- 1.05	288.0631	271.0598	[M+H-H ₂ O] ⁺	243.0650, 215.0701, 149.0234, 271.0599
47	原花青素 C ₁	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	4.87	866.2100	865.2028	[M-H] ⁻	125.0237, 161.0241, 287.0570

续表 1

No.	名称	分子式	误差	相对分子质量	质荷比	离子模式	碎片离子
48	秦皮素 [*]	C ₁₀ H ₈ O ₅	- 0.67	208.0370	209.0443	[M+H] ⁺	209.0444, 163.0391, 153.0547
49	杨梅素 -3-O- 半乳糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	3.21	480.0919	479.0847	[M-H] ⁻	479.0843, 271.0259, 317.0295
50	丁香树脂醇双葡萄糖苷	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	1.39	742.2684	760.3014	[M+NH ₄] ⁺	205.0860, 173.0599
51	射干苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	- 2.01	462.1153	463.1226	[M+H] ⁺	301.0703
52	原儿茶酸 ^[5, 17]	C ₇ H ₆ O ₄	- 2.67	154.0262	153.0189	[M-H] ⁻	109.0287, 153.0189, 135.0083, 65.0385
53	粗叶悬钩子苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	- 1.50	756.2102	757.2175	[M+H] ⁺	303.0497
54	桑黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	- 2.33	302.0420	303.0492	[M+H] ⁺	303.0497, 153.0183, 165.0183
55	N- 乙酰-L- 苯丙氨酸	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	- 2.24	207.0891	206.0818	[M-H] ⁻	164.0714, 206.0827, 147.0445, 58.0287
56	绣线菊苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	- 1.38	464.0948	465.1021	[M+H] ⁺	303.0497
57	7- 羟基-4- 甲基香豆素 -3- 乙酸	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	- 1.42	234.0525	217.0492	[M+H-H ₂ O] ⁺	189.0548, 217.0493
58	对羟基苯乙酸	C ₈ H ₈ O ₃	- 5.61	152.0465	151.0392	[M-H] ⁻	107.0494, 151.0395
59	芦丁 ^[8]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	- 1.65	610.1524	611.1597	[M+H] ⁺	303.0497, 129.0550, 229.0492, 153.0183
60	辛二酸	C ₈ H ₁₄ O ₄	1.72	174.0895	393.1774	[2M+FA-H] ⁻	111.0808, 173.0818, 83.0492, 129.0913
61	杨梅素 ^[14]	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	- 1.67	318.0370	319.0443	[M+H] ⁺	319.0445, 153.0182
62	东莨菪内酯	C ₁₀ H ₈ O ₄	- 1.38	192.0420	193.0493	[M+H] ⁺	193.0498, 133.0286, 178.0262, 105.0704
63	山柰酚 ^[8]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	- 2.53	286.0470	287.0543	[M+H] ⁺	287.0545, 153.0182, 121.0287
64	三叶豆苷 ^[33]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	- 1.61	448.0998	449.1071	[M+H] ⁺	287.0546
65	甘草苷 ^[22]	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	- 1.95	418.1256	419.1328	[M+H] ⁺	257.0806
66	异槲皮苷 ^[36]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	- 1.54	464.0948	465.1021	[M+H] ⁺	303.0498
67	高车前苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	- 1.55	462.1155	463.1228	[M+H] ⁺	301.0703, 217.0494
68	山柰酚-3- 葡萄糖鼠李糖苷 ^[21]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	- 1.81	594.1574	595.1647	[M+H] ⁺	287.0545
69	异嗪皮啶	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	- 1.84	222.0524	223.0597	[M+H] ⁺	223.0598, 190.0263, 162.0311
70	泽兰黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	- 1.73	316.0578	317.0650	[M+H] ⁺	317.0652, 302.0418, 153.0182
71	假荆芥属苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	- 1.07	478.1106	479.1179	[M+H] ⁺	317.0652, 318.0685, 302.0420, 153.0183
72	香蒲新苷 ^[37]	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	- 1.05	770.2261	771.2335	[M+H] ⁺	317.0652
73	D- 色氨酸 ^[29, 31]	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	- 1.89	204.0895	203.0822	[M-H] ⁻	116.0498, 203.0830, 74.0237
74	N- 乙酰-DL- 色氨酸	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	1.13	246.1007	245.0934	[M-H] ⁻	245.0936, 74.0236, 203.0829, 116.0346
75	槲皮素-3, 7- 二-O- 鼠李糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	- 0.99	594.1579	595.1652	[M+H] ⁺	287.0545
76	槲皮苷 ^[8]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	- 4.33	448.0986	449.1059	[M+H] ⁺	303.0496, 287.0545
77	槲皮素 ^[8]	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	- 4.55	302.0413	303.0486	[M+H] ⁺	303.0496, 153.0183, 229.0491, 165.0183
78	番石榴苷	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	- 3.41	434.0834	435.0907	[M+H] ⁺	303.0496, 73.0291
79	芦荟树脂 A	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₁	- 0.39	540.1630	541.1702	[M+H] ⁺	147.0440, 541.1679, 395.1330, 119.0495
80	白蜡树精	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	- 0.94	222.0526	223.0599	[M+H] ⁺	223.0598, 190.0263, 162.0311, 208.0366
81	山柰酚-3-O- 阿拉伯糖苷	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	- 1.13	418.0895	419.0968	[M+H] ⁺	287.0546
82	紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₀ O	- 0.52	192.1513	193.1586	[M+H] ⁺	135.0442, 194.1179, 105.0703, 133.0651, 135.1170, 109.1015, 58.0656
83	壬二酸 ^[24]	C ₉ H ₁₆ O ₄	- 1.80	188.1045	187.0972	[M-H] ⁻	125.0965, 187.0978, 97.0651
84	鼠李素 ^[21]	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	- 2.40	316.0575	317.0648	[M+H] ⁺	317.0653, 274.0469, 167.0339
85	异鼠李素-3-O- 葡萄糖苷 ^[36]	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	- 1.58	478.1104	479.1177	[M+H] ⁺	317.0652
86	xanthorhamnin	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	- 1.48	770.2258	771.2331	[M+H] ⁺	317.0652, 85.0290
87	对羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	- 4.88	138.0308	137.0235	[M-H] ⁻	93.0336, 137.0239
88	鼠李素-3- 芸香糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	- 0.88	624.1685	625.1758	[M+H] ⁺	317.0651
89	羟基芫花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	- 4.02	300.0622	301.0695	[M+H] ⁺	301.0702
90	香叶木素-7-O-β-D- 葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	- 3.33	462.1147	463.1220	[M+H] ⁺	301.0703
91	地奥司明	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	- 3.31	608.1721	609.1794	[M+H] ⁺	301.0703
92	catharticin	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉	- 3.13	754.2297	755.2370	[M+H] ⁺	301.0703
93	大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	- 3.88	270.0518	271.0591	[M+H] ⁺	271.0599, 229.0494
94	大黄素-8-β-D- 吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.10	432.1061	431.0989	[M-H] ⁻	269.0464, 431.0994, 225.0558
95	泻鼠李皮苷 A	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	1.98	416.1116	415.1043	[M-H] ⁻	269.0464, 415.1046
96	棕矢车菊素 ^[35]	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	- 3.95	330.0727	331.0799	[M+H] ⁺	331.0808, 316.0573, 167.0339
97	棉花皮素 3- 甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₈	- 1.03	332.0529	333.0602	[M+H] ⁺	333.0600, 318.0365, 219.0287, 153.0184
98	圣草酚	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	- 1.12	288.0631	289.0703	[M+H] ⁺	153.0183, 289.0703, 163.0391
99	松属素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	2.03	256.0741	255.0668	[M-H] ⁻	255.0669, 213.0559

续表 1

No.	名称	分子式	误差	相对分子质量	质荷比	离子模式	碎片离子
100	癸二酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	- 2.25	202.1201	201.1128	[M-H] ⁻	201.1135, 139.1121, 183.1028
101	2, 4, 6-三羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₅	- 4.22	170.0208	169.0136	[M-H] ⁻	151.0031, 169.0139, 125.0236, 107.0130
102	草质素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	- 1.52	302.0422	303.0495	[M+H] ⁺	303.0496, 153.0182, 229.0493
103	木蝴蝶苷 A	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	2.59	432.1068	431.0995	[M-H] ⁻	269.0464, 431.0994, 225.0559
104	咖啡酸乙酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	- 0.72	208.0734	207.0661	[M-H] ⁻	207.0666, 135.0446, 161.0239
105	柚皮素 ^{[17]*}	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	3.33	272.0694	271.0621	[M-H] ⁻	271.0619, 151.0032, 119.0495, 107.0130
106	12-oxo phytodienoic acid	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	- 2.30	292.2032	275.2001	[M+H-H ₂ O] ⁺	275.2000, 293.2101, 81.0705, 107.0859
107	木犀草素 ^{[8]*}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	- 2.21	286.0471	287.0544	[M+H] ⁺	287.0544, 153.0180
108	金雀异黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	- 1.40	270.0525	271.0597	[M+H] ⁺	271.0598, 229.0494
109	异鼠李素 ^{[32]*}	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	- 1.73	316.0578	317.0650	[M+H] ⁺	317.0651, 153.0181
110	丁香亭	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	2.63	346.0698	345.0625	[M-H] ⁻	345.0624, 315.0156, 287.0200, 203.0357
111	反式-2-十二碳烯二酸	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	0.17	228.1362	227.1289	[M-H] ⁻	183.13901, 227.12898, 165.1281
112	芹苷元-7-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.46	432.1063	431.0990	[M-H] ⁻	431.0992, 269.0463, 225.0559
113	4, 5, 7-三羟基-9, 10-二氧代-9, 10-二氢蒽-2-羧酸	C ₁₅ H ₈ O ₇	2.40	300.0277	299.0205	[M-H] ⁻	299.0204, 271.0257
114	1-(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-八氢-2, 3, 8, 8-四甲基-2-萘基)乙酮	C ₁₆ H ₂₆ O	- 1.23	234.1981	235.2053	[M+H] ⁺	235.2054, 95.0862, 81.0705, 217.1949
115	15-十六碳炔酸	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	- 1.23	252.2086	253.2159	[M+H] ⁺	69.0706, 81.0705, 95.0861, 55.0550, 67.0550, 83.0861, 97.1016, 253.2162
116	十二烷二酸	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	0.99	230.1520	229.1448	[M-H] ⁻	229.1447, 211.1345, 167.1438
117	桉柳黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	- 1.73	316.0578	317.0650	[M+H] ⁺	317.0652, 243.0649, 167.0339
118	N, N'-二环己脒	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O	- 0.63	224.1887	225.1960	[M+H] ⁺	225.19595, 100.11253, 61.04036, 83.08612, 143.11798
119	2', 3, 4, 4'-四羟基查耳酮	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	- 1.81	272.0680	273.0753	[M+H] ⁺	273.0752, 255.0648, 227.0699, 213.0544
120	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	- 1.99	300.0628	301.0701	[M+H] ⁺	301.0703, 258.0519
121	鸢尾甲黄素 A	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	- 2.01	330.0733	331.0806	[M+H] ⁺	331.0809, 316.0574, 167.034
122	二苯甲酮	C ₁₃ H ₁₀ O	- 0.99	182.0730	183.0803	[M+H] ⁺	105.0339, 183.0807
123	(+/-) 12 (13) -DiHOME	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	3.01	314.2467	313.2394	[M-H] ⁻	313.2396, 183.1387, 129.0915
124	芹菜素 ^{[20]*}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	1.87	270.0533	269.0461	[M-H] ⁻	269.0465, 225.0558
125	十六碳二酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	2.20	286.2150	285.2078	[M-H] ⁻	285.20782, 223.2068
126	(+/-) 13-HODE	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	1.88	296.2357	295.2284	[M-H] ⁻	295.2285, 277.2179, 195.1393
127	甘草次酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	- 0.70	470.3393	471.3466	[M+H] ⁺	471.3469, 119.0861, 107.0860, 135.1171
128	α-亚麻酸 ^[25]	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	- 1.15	278.2243	279.2315	[M+H] ⁺	67.0550, 81.0706, 95.0862, 279.2315
129	蓖麻油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	1.58	298.2513	297.2440	[M-H] ⁻	183.1392, 297.1538
130	黄豆黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	- 2.27	284.0678	285.0751	[M+H] ⁺	285.0753, 211.0754, 242.0573
131	1-油酰-SN-甘油-3-磷酸胆碱	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	- 1.77	521.3472	522.3545	[M+H] ⁺	104.1074, 184.0736, 86.0971, 522.3548
132	1-棕榈酸单甘油酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	- 2.16	330.2763	313.2730	[M+H-H ₂ O] ⁺	313.2736, 57.0707, 71.0862
133	亚油醇乙醇胺	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	- 1.24	323.2820	324.2893	[M+H] ⁺	62.0608, 324.2900
134	1-stearoyl-lysophosphatidylcholine	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	- 0.41	523.3636	524.3709	[M+H] ⁺	104.1075, 184.0736
135	熊果酸 ^[34]	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	2.25	456.3614	455.3541	[M-H] ⁻	455.3543, 376.3514
136	皮诺敛酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	- 1.36	278.2242	279.2315	[M+H] ⁺	67.0550, 81.0706, 95.0861, 279.2315
137	16-羟基棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	2.27	272.2358	271.2285	[M-H] ⁻	271.22873, 226.2258
138	脱镁叶绿酸盐 A	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	- 1.20	592.2679	593.2752	[M+H] ⁺	593.2748, 533.2542

注: * 为与对照品比对的化合物。

Note: *Compound for comparison with control.

303.0486 [M+H]⁺。主要进行两种方式的裂解, 裂解方式 1 为 C 环的 RDA 裂解, 产生特征碎片离子 m/z 153.0183 [M+H-C₈H₆O₃]⁺, 裂解方式 2 为丢失 C₇H₆O₃ 形成离子碎片 m/z 165.0183 [M+H-C₇H₆O₃]⁺, 与文献报道裂解方式一致^[8, 11], 故推测其为槲皮素, 质谱图和裂解过程如图 3。化合物 105 在负离子模式下,

其准分子离子峰 m/z 271.0619 [M-H]⁻, 根据元素组成综合分析预测可能的分子式为 C₁₅H₁₂O₅。母离子通过 RDA 裂解反应, 产生 m/z 151.0032 碎片离子和 119.0495 的碎片离子, 结合以上信息以及文献研究^[12]和质谱裂解规律可知, 此化合物为柚皮素, 可能的裂解途径见图 4。

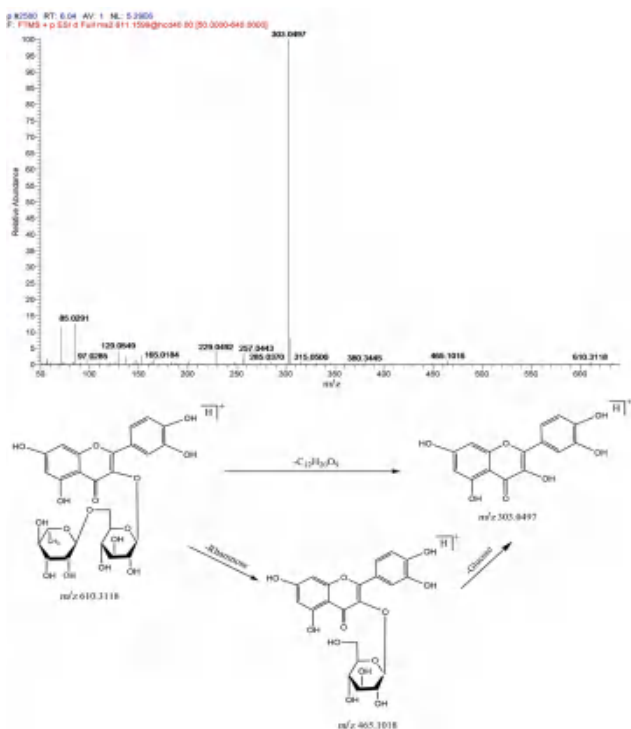


图 2 芦丁质谱图 (A) 及裂解规律 (B)

Fig 2 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of rutin

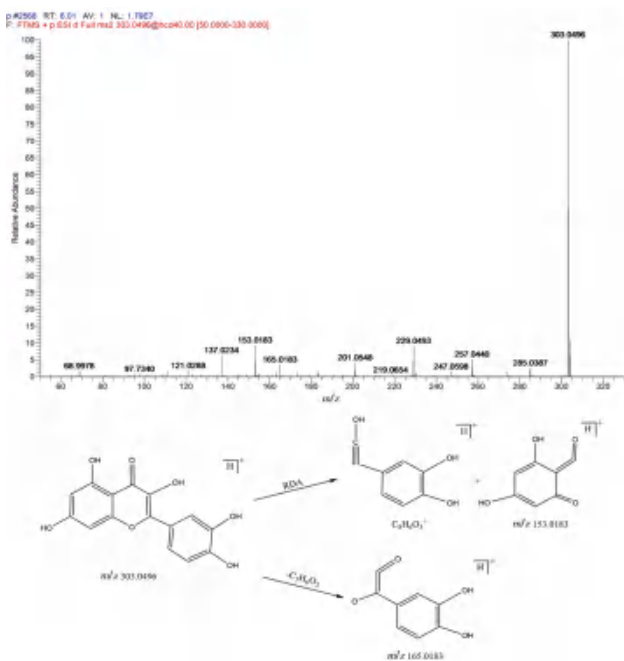


图 3 槲皮素质谱图 (A) 及裂解规律 (B)

Fig 3 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of quercetin

2.4.2 有机酸类化合物的分析鉴定 根据液质分析结果并参考相关文献, 该类化合物在负离子模式下有较高的响应, 大多具有很强的分子离子峰, 由于结构中包含羧基和酚羟基, 因此质谱裂解的过程中容易丢失 H_2O 和 $-COOH$, 且易在羧基处断裂形成碎片离子^[13-14]。

化合物 **2** 在负离子模式下保留时间是 1.011 min,

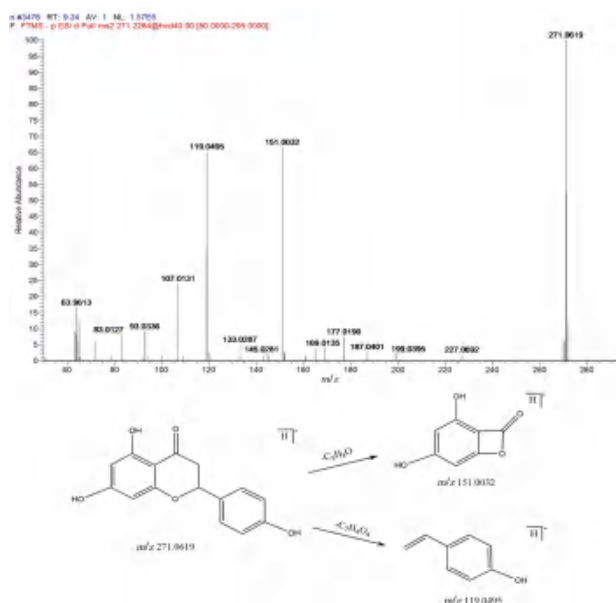


图 4 柚皮素质谱图 (A) 及裂解规律 (B)

Fig 4 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of naringenin

准分子离子峰是 m/z 135.0293 $[M-H]^-$ ($C_4H_8O_5$), 误差为 4.44, 主要的特征碎片离子为 m/z 59.0127 $[M-H-C_2H_4O_3]^-$, m/z 75.0076 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$, m/z 89.0233 $[M-H-HCOOH]^-$, 结合质谱裂解规律, 再结合参考文献^[15], 推测出化合物 **2** 为 L- 蔗糖酸 ($C_4H_8O_5$), 质谱图见图 5。化合物 **52** 的保留时间为 5.825 min, 准分子离子峰为 m/z 153.0189 $[M-H]^-$ ($C_7H_6O_4$), 特征碎片离子峰有 m/z 109.0287, 是由准分子离子峰失去 1 分子 CO_2 产生的, 通过质谱裂解规律和文献报道^[16], 确定该化合物为原儿茶酸, 可能的裂解规律如图 6 所示。化合物 **44** 的准分子离子峰为 m/z 179.0350 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_9H_8O_4$ 。其二级碎片离子有 m/z 135.0445 $[M-H-CO_2]^-$, 结合质谱裂解规律和文献报道^[17-18], 推测其为咖啡酸, 其可能的质谱裂解途径和质谱图如图 7。

2.4.3 氨基酸类化合物的分析鉴定 氨基酸为含有氨基和羧基的一类有机化合物, 一般会丢失 18、28、46, 分别对应母离子丢失 H_2O 、 CO 、 $COOH_2$ 的特征碎片, 有些氨基酸会丢失 17 即 NH_3 。化合物 **23**, 正离子给出准分子离子峰 m/z 166.0860 $[M+H]^+$, 保留时间是 2.113 min, 在 TOF-MS/MS 中, 分子离子分别丢失 1 分子 $HCOOH$ 和 NH_3 形成 m/z 120.0812 $[M+H-HCOOH]^+$ 的碎片离子和 m/z 103.0547 $[M+H-HCOOH-NH_3]^+$ 的基峰离子, 根据参考文献^[19], 并推测其可能裂解途径, 见图 8。

3 讨论

目前关于柳叶鼠李叶化学成分研究的报道比较少, 化学成分相关研究还有很大空间。《中华本草》

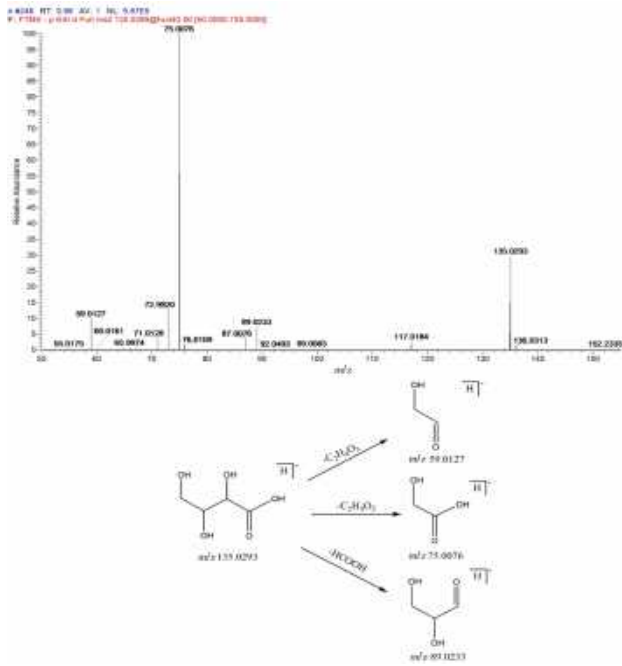


图 5 L- 苏糖酸质谱图 (A) 及裂解规律 (B)
Fig 5 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of L-threonic acid

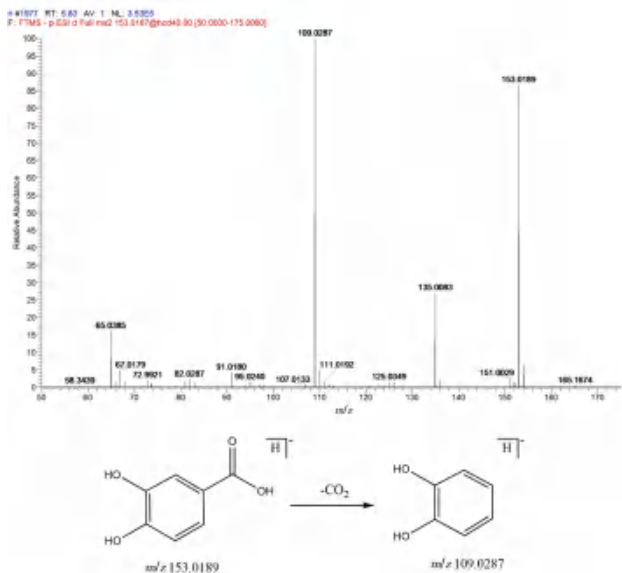


图 6 原儿茶酸质谱图 (A) 及裂解规律 (B)
Fig 6 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of protocatechuic acid

《全国中草药汇编》等均有记载柳叶鼠李具有治疗消化不良的作用，但具体起到治疗疾病作用的成分是什么，并没有相关的文献记载，因此本研究首先采用 HPLC-Q-TOF-MS 技术对柳叶鼠李化学成分进行全面分析，共鉴定出 138 个化合物，但是具体起到治疗作用的成分以及作用机制，仍需要通过药效实验来验证。

HPLC-Q-TOF-MS 技术作为鉴定中药中复杂化合物的有效方法，克服了传统中草药提取分离

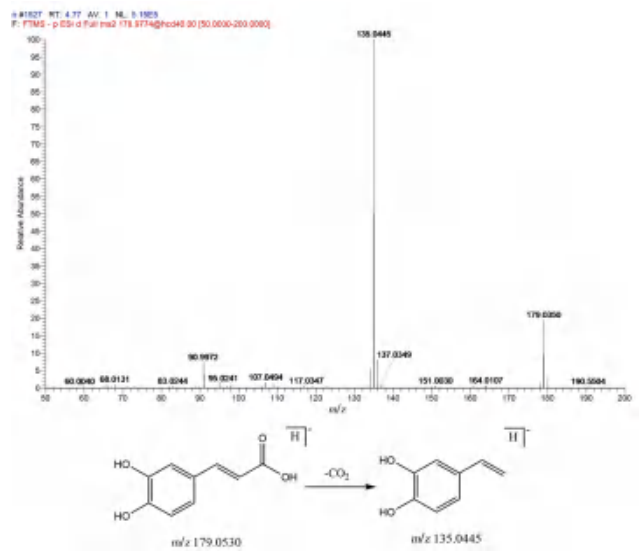


图 7 咖啡酸质谱图 (A) 及裂解规律 (B)
Fig 7 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of caffeic acid

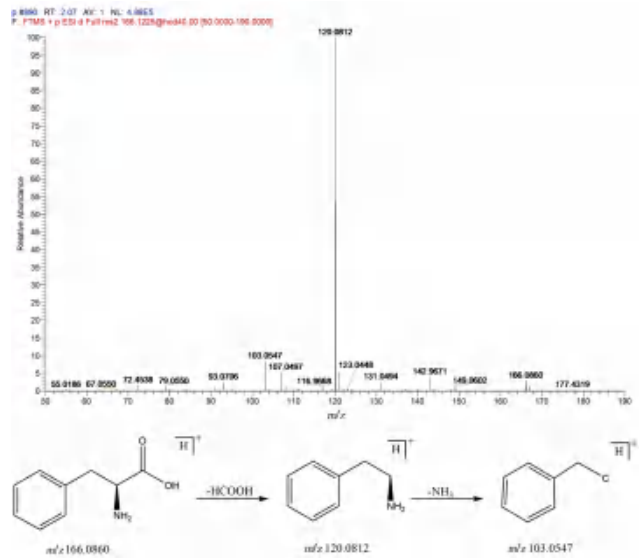


图 8 L- 苯丙氨酸质谱图 (A) 及裂解规律 (B)
Fig 8 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of L-phenylalanine

方法耗时长、效率低的缺点，能够在较短时间内完成化学成分分析工作，避免了提取分离的烦琐过程。本研究首次对柳叶鼠李叶中的化学成分进行全面定性分析，为进一步阐明叶鼠李叶的药用物质基础和质量控制提供了方法依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 48 卷. 北京: 科学出版社, 1982: 69.
- [2] 陈西仓. 甘肃鼠李属植物研究 [J]. 甘肃林业科技, 2010, 35 (4): 5-7.
- [3] 赵翔宇. 柳叶鼠李叶化学成分及其季节变化研究 [D]. 太原: 山西师范大学, 2020.
- [4] 鲍文瑶. 紫外诱导对柳叶鼠李叶次生代谢和氧化—抗氧化系统的影响 [D]. 太原: 山西师范大学, 2021.

- [5] 唐明, 高霞, 耿婷, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的七味通痹口服液化学成分分析[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2226-2236.
- [6] 刘佳铭, 苗水, 李雯婷, 等. 高分辨质谱技术在农药残留检测中的应用[J]. 分析试验室, 2020, 39(1): 116-124.
- [7] 曹伟国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241-2247.
- [8] 马永彝, 王春龙, 王凤霞, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法快速分析石楠叶中化学成分[J]. 中草药, 2022, 53(20): 6401-6411.
- [9] 李自红, 魏悦, 范毅, 等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析试验室, 2015, 34(2): 186-189.
- [10] 郭敏娜, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的柴胡化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2044-2052.
- [11] 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.
- [12] 王晓丽, 彭梅梅, 陈琪, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的经典名方黄连汤化学成分鉴定及网络药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5): 1249-1263.
- [13] 贾晓华, 王维, 高梦园, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析藜芦中化学成分[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(1): 104-111.
- [14] 肖岩, 马博稷, 李冰涛, 等. 青钱柳醇提取物中化学成分的 UHPLC-Q-TOF/MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16): 196-204.
- [15] 秦伟瀚, 刘飞, 刘翔, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析亚香棒虫草化学成分[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(2): 159-165.
- [16] 陈艳熙, 于猛, 戴晓月, 等. 狗脊药材的化学成分表征及原儿茶酸含量测定[J]. 中草药, 2023, 54(7): 2254-2261.
- [17] 肖观林, 陈伟韬, 钟惠娴, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析白虎汤中的化学成分[J]. 中药材, 2022, (11): 2656-2663.
- [18] 肖观林, 钟惠娴, 黄华靖, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定小儿清咽颗粒化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(12): 1627-1636.
- [19] 陈宏昌, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析刺五加叶的化学成分[J]. 中药材, 2016, 39(7): 1536-1540.
- [20] 陈会朋, 王银, 余惠旻, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析加味左金丸化学成分及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2023, 54(14): 4442-4454.
- [21] 汤书婉, 李新亮, 马莉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和 LC-Q-TOF/MS 的加味黄芪桂枝五物汤化学成分研究[J]. 中草药, 2023, 54(3): 711-721.
- [22] 刘杨, 杨玉佩, 沈冰冰. HPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析防己茯苓汤的化学成分[J]. 中南药学, 2021, 19(8): 1563-1569.
- [23] 罗益远, 崔明超, 王翰华, 等. UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析浙贝母不同部位化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(15): 1984-1991.
- [24] 刘瑾, 徐东川, 隋在云. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的桑白皮大鼠体内入血成分研究[J]. 中药材, 2022, 45(4): 877-881.
- [25] 刘江静, 孙国东, 庄岩, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的火麻仁化学成分分析[J]. 中药材, 2022, 45(6): 1377-1382.
- [26] 朱赟斐, 谭善忠, 王洪兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的益气健脾颗粒化学成分分析[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3601-3613.
- [27] 李容, 杨淑婷, 潘洁, 等. UHPLC-ESI-Q-TOF-MS 快速分析荳蔻中化学成分[J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(10): 23-30.
- [28] 王静, 姚长良, 张建青, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的人参配方颗粒化学成分及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2022, 53(11): 3286-3294.
- [29] 刘海波, 冉俊枫, 任艳, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的爬沙虫不同部位化学成分分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 127-137.
- [30] 李偲, 张东旭, 刘羽康, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法的耳聋胶囊化学成分辨识及归属[J]. 中成药, 2022, 44(1): 132-141.
- [31] 张松保, 孔令婕, 谷巍, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的蒲公英化学成分分析及其抗癌机制的网络药理学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(2): 305-314.
- [32] 蒋鹏娜, 李竹英, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的平喘颗粒化学成分分析[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(5): 42-53.
- [33] 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.
- [34] 陈方超, 高守红, 王志鹏, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定藤梨根的化学成分[J]. 中国药房, 2020, 31(14): 1725-1731.
- [35] 魏佩, 陈思, 高紫珊, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的马蹄地上茎化学成分分析[J]. 中国果菜, 2023, 43(11): 38-44.
- [36] 肖观林, 江洁怡, 李素梅, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的布渣叶化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 138-148.
- [37] 肖观林, 江洁怡, 胥爱丽, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的布芍调脂胶囊化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 190-199.

(收稿日期: 2023-07-18; 修回日期: 2023-08-24)

川枳壳黄酮类成分及其对成骨细胞增殖作用的研究

向丹^{1,2}, 李玉玫¹, 王靖雯³, 徐伟^{2,4}, 何洁月¹, 杨云芝^{2,4*} (1. 南充市中医医院骨伤科, 四川 南充 637000; 2. 筋骨病中医药防治南充市重点实验室, 四川 南充 637000; 3. 南充市食品药品检验所, 四川 南充 637000; 4. 南充市中医医院中药制剂中心, 四川 南充 637000)

摘要:目的 研究川枳壳黄酮类化学成分及其对成骨细胞增殖的影响。方法 采用聚酰胺树脂、葡聚糖凝胶、硅胶柱色谱等方法进行成分分离, 通过质谱和核磁共振波谱分析与鉴定结构, 采用体外细胞实验对所得化合物进行成骨细胞增殖活性检测。结果 从川枳壳中分离得到 12 个黄酮类及其苷类成分, 分别鉴定为柚皮苷(1)、新橙皮苷(2)、柚皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷(3)、narirutin(4)、sarotanoside(5)、圣草酚-7-O-β-D-葡萄糖苷(6)、柚皮素(7)、芫花素(8)、圣草酚(9)、angophorol(10)、南酸枣苷(11)、tetrahydroprotogenkwanone(12)。其中化合物 1~4、6~9、12 具有促进成骨细胞增殖作用, 且化合物 12 的细胞增殖率达 196.3%, 优于阳性药雌二醇。结论 化合物 5、8、10、11、12 为首次从枳壳中分离得到, 化合物 5、10、12 为首次从柑橘属中分离得到, 化合物 1~4、6~9、12 对成骨细胞具有明显的增殖作用。

关键词: 川枳壳; 化学成分; 黄酮; 成骨细胞

中图分类号: R932, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0086-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.013

Flavonoids from Sichuan Aurantii Fructus and their effects on the proliferation of osteoblasts

XIANG Dan^{1,2}, LI Yu-mei¹, WANG Jing-wen³, XU Wei^{2,4}, HE Jie-yue¹, YANG Yun-zhi^{2,4*} (1. Department of Orthopedics and Traumatology, Nanchong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanchong Sichuan 637000; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Skeletal Muscle Diseases in Nanchong, Nanchong Sichuan 637000; 3. Nanchong Institute for Food and Drug Control, Nanchong Sichuan 637000; 4. Traditional Chinese Medicine Preparation Center, Nanchong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanchong Sichuan 637000)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of flavonoids from Sichuan Aurantii Fructus and their effects on the proliferation of osteoblasts. **Methods** Polyamide resin, dextran gel, silica gel column chromatography and other methods were used to separate the components. The structures were analyzed and identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The obtained compounds were tested for osteoblast proliferation activity by in vitro cell experiments. **Results** Twelve flavonoids and their glycosides were isolated from Sichuan Aurantii Fructus, and were identified as naringin (1), neohesperidin (2), naringenin-7-O-β-D-glucopyranoside (3), narirutin (4), sarotanoside (5), eriodictyol-7-O-β-D-glucopyranoside (6), naringenin (7), genkwanin (8), eriodictyol (9), angophorol (10), choerospondin (11), and tetrahydroprotogenkwanone (12). Compounds 1~4, 6~9 and 12 promoted osteoblast proliferation, and the cell proliferation rate of compound 12 reached 196.3%, which was superior to that of estradiol. **Conclusion** Compounds 5, 8, 10, 11, and 12 have been isolated from Aurantii Fructus for the first time, while 5, 10, and 12 from Citrus for the first time. Compounds 1~4, 6~9 and 12 obviously promote the proliferation of osteoblasts.

Key words: Sichuan Aurantii Fructus; chemical constituent; flavone; osteoblast

基金项目: 南充市科技计划项目 (No. 22ZXKTYJ0012; No. 22YYJCYJ0062); 四川省科技计划项目 (No. 2021YFS0270)。

作者简介: 向丹, 男, 副主任中医师, 主要从事中西医结合上肢骨科及骨质疏松研究, email: xd-0226@163.com *通信作者: 杨云芝, 女, 主任中药师, 主要从事中药成分分析与质量控制研究, email: 449215268@qq.com

中药枳壳为芸香科 (Rutaceae) 柑橘属 (*Citrus*) 植物酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 及其栽培变种臭橙、香橙、枳橙的干燥未成熟果实, 产地主要分布于江西、四川、湖南等地, 按照产地的不同分别称为江枳壳、川枳壳和湘枳壳, 其中江枳壳为地道药材, 川枳壳为主流品种^[1-2]。枳壳中化学成分类型主要包括黄酮类、挥发油类、生物碱类、苯丙素类等, 其中黄酮类成分是枳壳的主要活性成分, 也作为枳壳质量标准的重要标志物, 其总含量可达 15.44%^[3-4]。目前已从中药枳壳中分离得到 62 个黄酮类成分, 但多篇文献显示不同产地枳壳在黄酮类成分种类与含量上差异显著^[5]。

骨损伤或骨折是骨伤科最常见的疾病, 损伤初期有明显的肿痛表现, 中医认为此肿痛病机为气滞血瘀, 常用枳壳行气散瘀止痛之功效。本研究团队前期对我院筋骨病常用中药进行抗骨质疏松活性筛选时发现川枳壳乙醇提取物对成骨细胞具有增殖作用。中药枳壳药理作用众多, 包括抗肿瘤、抗炎、抗抑郁、降血脂、胃肠功能调节、免疫调节等^[6-7], 但未见关于抗骨质疏松方面的研究。故本研究通过大孔树脂、聚酰胺树脂富集川枳壳煎煮液中的黄酮类成分, 并采用小孔树脂、硅胶柱色谱等分离手段对川枳壳黄酮类成分进行系统分离, 共分离鉴定出 12 个黄酮类化合物, 分别为柚皮苷 (1)、新橙皮苷 (2)、柚皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷 (3)、narirutin (4)、sarotanoside (5)、圣草酚-7-O-β-D-葡萄糖苷 (6)、柚皮素 (7)、芫花素 (8)、圣草酚 (9)、angophorol (10)、南酸枣苷 (11)、tetrahydroprotogenkwanone (12) (结构见图 1), 通过体外细胞实验对 12 个黄酮类成分进行活性筛选, 确定各化合物对成骨细胞增殖的影响。

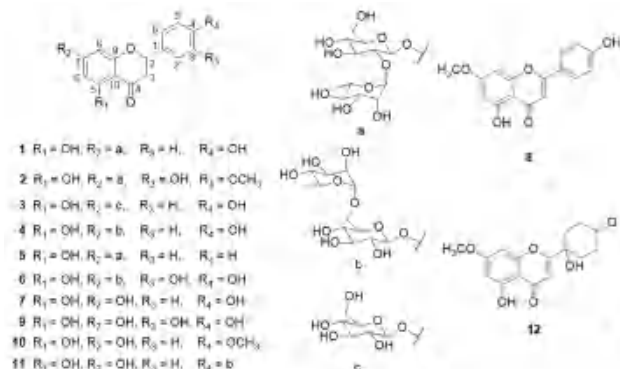


图 1 化合物 1 ~ 12 的结构式

Fig 1 Structural formula of compounds 1 ~ 12

1 材料

1.1 仪器

Bruker Avance III-400 核磁共振仪、Bruker Daltonics MS 质谱仪 (德国布鲁克公司); Multiskan FC 酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); 二氧化碳培养箱 (无锡沃信仪器有限公司); CKX31 倒置相差显微镜 [奥林巴斯 (中国) 有限公司]; FA2004 分析天平 (上海力辰科技仪器有限公司); TD5A 医用离心机 (常州市金坛高科仪器厂); G-100S 型超声波清洗器 (深圳市哥能清洗设备有限公司); ZF-2 型三用紫外仪 (上海市安亭电子仪器厂); RE-1102 型旋转蒸发仪 (上海嘉鹏科技有限公司); SYG-4 型数显恒温水浴锅 (常州朗越仪器厂); LCK2000 煎药机 (天津三延精密机械有限公司); LDZX-30KBS 压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂)。

1.2 试药

硅胶 (100 ~ 200 目) 和硅胶 GF254 薄层板 (青岛海洋化工厂); AB-8 大孔树脂 (河北沧州宝恩化工有限公司); 葡聚糖凝胶 LH-20 (湖南汇百待生物科技有限公司); MCI CHP-20 (75 ~ 150 μm) (日本三菱公司); 石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇等均为分析纯; CCK-8 细胞增殖测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

川枳壳 (成都吉安康药业有限公司, 批号: 210209-11, 采自四川省南充市营山县清水乡银鸽村) 经南充市中医医院张德明中药师鉴定为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实。

1.3 细胞

小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14 又称 MC3T3-E1 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。

2 提取分离

川枳壳中药饮片 5 kg, 制成粗粉后用 8 倍量水煎煮 2 次, 每次 2 h, 减压浓缩至浸膏 (1782.6 g), 浸膏用适量水分散, 加至含 AB-8 大孔树脂的水溶液中, 吸附过夜, 装柱, 分别用 4 倍柱体积的 20%、75%、95% 乙醇水洗脱; 75% 乙醇水洗脱部位浓缩成浸膏, 水分散, 加入适量聚酰胺树脂吸附 2 h, 装柱, 分别用 4 倍柱体积的 35%、70%、95% 乙醇水洗脱, 收集 70% 乙醇水洗脱液, 减压浓缩至浸膏 (801.4 g)。

70% 乙醇水洗脱部位用硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-乙醇为溶剂系统进行梯度洗脱 (1:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、0:1), 以薄层色谱为检测方式, 紫外 254 nm 显色或 10% 硫酸乙

醇烤板显色,对相似流份进行合并,得 8 个组分 Fr. A ~ Fr. H。组分 Fr. F 溶液析出淡黄色颗粒物,经丙酮反复洗涤得化合物 **1** (646.8 mg),经 MCI 柱色谱 30% 甲醇水洗脱得化合物 **2** (358.5 mg); Fr. E 经 MCI 柱色谱 32% 甲醇水洗脱、硅胶柱色谱得化合物 **3** (185.6 mg)、化合物 **4** (62.1 mg)、化合物 **5** (35.8 mg); Fr. D 经 MCI 柱色谱 39% 甲醇水洗脱、硅胶柱色谱二氯甲烷-甲醇 30:1 洗脱、葡聚糖凝胶 LH-20 甲醇-水 (1:1) 过筛得化合物 **6** (91.8 mg)、化合物 **11** (29.5 mg); Fr. C 经硅胶柱色谱二氯甲烷-甲醇 (30:1) 得 Fr. C1 ~ Fr. C5, Fr. C1 经硅胶柱色谱二氯甲烷-甲醇 (60:1) 洗脱得化合物 **7** (185.2 mg)、化合物 **10** (68.3 mg), Fr. C3 经葡聚糖凝胶 LH-20 色谱柱,二氯甲烷-甲醇 (1:1) 过筛得化合物 **8** (64.3 mg), Fr. C4 在石油醚-乙酸乙酯 (3:1) 中重结晶得化合物 **9** (59.6 mg),经反复葡聚糖凝胶 LH-20 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 过筛得化合物 **12** (16.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色粉末 (甲醇); $C_{27}H_{32}O_{14}$; ESI-MS m/z : 581.2 $[M + H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H : 12.06 (1H, s, 5-OH), 7.21 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 6.72 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 6.15 (2H, m, H-6, 8), 5.62 (1H, dd, $J = 13.2, 2.8$ Hz, H-2), 4.82 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-1''), 4.67 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-1'''), 3.15 ~ 3.70 (10 H, m, H-2'' ~ 6'', H-2''' ~ 5'''), 3.28 (1H, m, H-3 β), 2.76 (1H, dd, $J = 16.2, 2.8$ Hz, H-3 α), 1.14 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-6'''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C : 79.4 (C-2), 42.5 (C-3), 198.7 (C-4), 163.5 (C-5), 97.6 (C-6), 165.8 (C-7), 96.4 (C-8), 161.1 (C-9), 104.2 (C-10), 129.1 (C-1'), 128.1 (C-2', 6'), 118.1 (C-3', 5'), 158.3 (C-4'), 101.4 (C-1''), 73.2 (C-2''), 77.8 (C-3''), 70.5 (C-4''), 76.6 (C-5''), 65.7 (C-6''), 100.4 (C-1'''), 70.2 (C-2'''), 71.8 (C-3'''), 72.5 (C-4'''), 67.6 (C-5'''), 18.3 (C-6''')。以上数据与文献报道^[8]的柚皮苷数据一致,故确定化合物 **1** 为柚皮苷。

化合物 **2**: 白色粉末 (甲醇); $C_{28}H_{34}O_{15}$; ESI-MS m/z : 611.2 $[M + H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ_H : 12.02 (1H, s, 5-OH), 9.53 (1H, s, 3'-OH), 7.06 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.98 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-2'), 6.88

(1H, dd, $J = 8.4, 2.8$ Hz, H-6'), 6.13 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-8), 6.11 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6), 5.62 (1H, dd, $J = 12.4, 1.8$ Hz, H-2), 5.25 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-1''), 4.76 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-1'''), 3.85 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.22 (1H, m, H-3 β), 2.62 (1H, dd, $J = 17.1, 1.8$ Hz, H-3 α), 1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6'''); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ_C : 78.4 (C-2), 41.9 (C-3), 197.8 (C-4), 163.2 (C-5), 97.1 (C-6), 164.9 (C-7), 96.1 (C-8), 162.3 (C-9), 103.6 (C-10), 131.1 (C-1'), 115.1 (C-2'), 147.1 (C-3'), 148.2 (C-4'), 113.0 (C-5'), 117.6 (C-6'), 100.8 (C-1''), 73.3 (C-2''), 76.9 (C-3''), 70.2 (C-4''), 75.7 (C-5''), 66.2 (C-6''), 100.1 (C-1'''), 70.8 (C-2'''), 71.3 (C-3'''), 72.6 (C-4'''), 68.1 (C-5'''), 18.5 (C-6'''), 56.8 (4'-OCH₃)。以上数据与文献报道的新橙皮苷^[9]数据一致,故确定化合物 **2** 为新橙皮苷。

化合物 **3**: 淡黄色针晶 (甲醇); $C_{21}H_{22}O_{10}$; ESI-MS m/z : 435.1 $[M + H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H : 12.09 (1H, s, 5-OH), 7.32 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.23 (2H, m, H-6, 8), 5.54 (1H, dd, $J = 12.7, 2.8$ Hz, H-2), 4.84 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 3.25 (1H, m, H-3 β), 2.78 (1H, m, H-3 α); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C : 79.1 (C-2), 42.1 (C-3), 197.2 (C-4), 163.6 (C-5), 96.8 (C-6), 166.5 (C-7), 95.5 (C-8), 162.3 (C-9), 103.6 (C-10), 131.6 (C-1'), 128.1 (C-2', 6'), 117.4 (C-3', 5'), 157.9 (C-4'), 102.8 (C-1''), 73.4 (C-2''), 77.6 (C-3''), 69.8 (C-4''), 76.4 (C-5''), 61.6 (C-6'')。以上数据与文献报道^[10-11]的柚皮素-7-O- β -D-葡萄糖苷数据一致,故确定化合物 **3** 为柚皮素-7-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **4**: 淡黄色粉末; $C_{27}H_{32}O_{14}$; ESI-MS m/z : 581.2 $[M + H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H : 12.03 (1H, s, 5-OH), 7.25 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.68 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.12 (2H, m, H-6, 8), 5.59 (1H, dd, $J = 12.9, 2.6$ Hz, H-2), 4.76 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-1''), 4.58 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-1'''), 3.26 (1H, m, H-3 β), 2.68 (1H, dd, $J = 16.8, 2.6$ Hz, H-3 α), 1.16 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6'''); ^{13}C -NMR (100 MHz,

CD₃OD) δ_c : 78.3 (C-2), 42.1 (C-3), 196.7 (C-4), 162.9 (C-5), 96.4 (C-6), 164.5 (C-7), 95.1 (C-8), 162.3 (C-9), 103.5 (C-10), 129.1 (C-1'), 128.4 (C-2', 6'), 116.6 (C-3', 5'), 156.9 (C-4'), 99.8 (C-1''), 76.4 (C-2''), 77.3 (C-3''), 69.8 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.5 (C-6''), 98.4 (C-1'''), 70.3 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.9 (C-4'''), 68.6 (C-5'''), 17.8 (C-6'''). 以上数据与文献报道^[8, 12]的 narirutin 数据一致, 故确定化合物 4 为 narirutin。

化合物 5: 淡黄色粉末; C₂₇H₃₂O₁₃; ESI-MS m/z : 565.2 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H : 12.25 (1H, s, 5-OH), 7.5 ~ 7.8 (5H, m, H-2' ~ H-5'), 6.62 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.45 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.74 (1H, dd, $J = 12.3, 2.9$ Hz, H-2), 5.26 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-1''), 5.18 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-1'''), 3.54 (1H, m, H-3 β), 2.75 (1H, m, H-3 α), 1.28 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-6'''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_c : 77.3 (C-2), 42.9 (C-3), 196.8 (C-4), 162.6 (C-5), 96.8 (C-6), 164.8 (C-7), 95.7 (C-8), 162.8 (C-9), 103.9 (C-10), 139.4 (C-1'), 126.1 (C-2', 6'), 128.1 (C-3', 5'), 126.7 (C-4'), 98.4 (C-1''), 78.4 (C-2''), 76.1 (C-3''), 69.6 (C-4''), 76.8 (C-5''), 61.7 (C-6''), 100.5 (C-1'''), 70.6 (C-2'''), 70.8 (C-3'''), 71.3 (C-4'''), 68.1 (C-5'''), 18.0 (C-6'''). 以上数据与文献报道^[13]的 sarotanoside 数据一致, 故确定化合物 5 为 sarotanoside。

化合物 6: 黄色粉末 (甲醇), C₂₁H₂₂O₁₁; ESI-MS m/z : 451.1 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H : 12.21 (1H, s, 5-OH), 7.06 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.98 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 5.92 (1H, s, H-6), 5.95 (1H, s, H-8), 5.24 (1H, dd, $J = 12.7, 2.5$ Hz, H-2), 4.76 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1''), 3.15 (1H, m, H-3 β), 2.64 (1H, m, H-3 α); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_c : 79.1 (C-2), 42.6 (C-3), 196.7 (C-4), 162.5 (C-5), 95.8 (C-6), 166.7 (C-7), 96.7 (C-8), 165.5 (C-9), 103.2 (C-10), 129.7 (C-1'), 115.4 (C-2'), 145.8 (C-3'), 145.6 (C-4'), 114.8 (C-5'), 120.4 (C-6'), 102.8 (C-1''), 73.6 (C-2''), 77.4 (C-3''), 70.1 (C-4''), 76.4 (C-5''), 61.4 (C-6''). 以上数据与文献报道^[14]的圣草

酚-7-*O*- β -D-葡萄糖苷数据一致, 故确定化合物 6 为圣草酚-7-*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 7: 淡黄色粉末 (甲醇), C₁₅H₁₂O₅; ESI-MS m/z : 273.1 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H : 12.12 (1H, s, 5-OH), 10.35 (1H, s, 7-OH), 9.16 (1H, s, 4'-OH), 7.35 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.74 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 5.92 (2H, m, H-6, 8), 5.53 (1H, dd, $J = 12.6, 2.7$ Hz, H-2), 3.25 (1H, dd, $J = 12.6, 16.8$ Hz, H-3 α), 2.73 (1H, dd, $J = 16.8, 2.7$ Hz, H-3 β); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_c : 78.9 (C-2), 42.1 (C-3), 196.9 (C-4), 163.4 (C-5), 95.4 (C-6), 167.2 (C-7), 95.8 (C-8), 164.1 (C-9), 102.3 (C-10), 131.6 (C-1'), 128.4 (C-2', 6'), 115.7 (C-3', 5'), 158.4 (C-4'). 以上数据与文献报道^[8]的柚皮素数据一致, 故确定化合物 7 为柚皮素。

化合物 8: 黄色粉末 (甲醇), C₁₆H₁₂O₅; ESI-MS m/z : 285.1 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H : 12.26 (1H, s, 5-OH), 10.16 (1H, s, 4'-OH), 7.85 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.71 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-8), 6.68 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6), 6.41 (1H, s, H-3), 3.83 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_c : 163.9 (C-2), 103.1 (C-3), 186.4 (C-4), 157.6 (C-5), 98.7 (C-6), 166.3 (C-7), 92.7 (C-8), 161.3 (C-9), 105.8 (C-10), 123.1 (C-1'), 128.6 (C-2', 6'), 116.4 (C-3', 5'), 159.8 (C-4'), 56.8 (7-OCH₃). 以上数据与文献报道^[15]的芫花素数据一致, 故确定化合物 8 为芫花素。

化合物 9: 黄色粉末 (甲醇), C₁₅H₁₂O₆; ESI-MS m/z : 289.1 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H : 7.16 (1H, s, H-2'), 6.91 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6'), 6.72 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 5.79 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.77 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.15 (1H, dd, $J = 12.6, 3.2$ Hz, H-2), 3.12 (1H, dd, $J = 12.6, 16.9$ Hz, H-3 α), 2.71 (1H, dd, $J = 16.9, 3.2$ Hz, H-3 β); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_c : 79.2 (C-2), 43.0 (C-3), 196.3 (C-4), 163.5 (C-5), 95.8 (C-6), 166.9 (C-7), 95.4 (C-8), 162.7 (C-9), 102.3 (C-10), 129.6 (C-1'), 113.9 (C-2'), 145.6 (C-3'), 145.9 (C-4'), 115.8 (C-5'), 118.2 (C-6'). 以上数据与文献报道的圣草酚^[15]

数据一致, 故确定化合物 **9** 为圣草酚。

化合物 **10**: 淡黄色粉末 (甲醇), $C_{16}H_{14}O_5$; ESI-MS m/z : 287.1 $[M + H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H : 12.38 (1H, s, 5-OH), 11.23 (1H, s, 7-OH), 7.35 (2H, dd, $J = 8.4, 2.3$ Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, H-3', 5'), 6.12 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.14 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.24 (1H, dd, $J = 13.1, 2.8$ Hz, H-2), 3.04 (1H, dd, $J = 17.0, 13.1$ Hz, H-3 β), 2.62 (1H, dd, $J = 17.0, 2.8$ Hz, H-3 α), 3.81 (3H, s, 4'-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C : 79.6 (C-2), 43.3 (C-3), 196.8 (C-4), 164.2 (C-5), 96.4 (C-6), 166.6 (C-7), 95.9 (C-8), 163.4 (C-9), 103.1 (C-10), 131.2 (C-1'), 128.4 (C-2', 6'), 114.8 (C-3', 5'), 159.6 (C-4'), 55.9 (4'-OCH₃)。以上数据与文献报道^[16]的 angophorol 数据一致, 故确定化合物 **10** 为 angophorol。

化合物 **11**: 无色针晶 (甲醇), $C_{21}H_{22}O_{10}$; ESI-MS m/z : 435.1 $[M + H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H : 7.48 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.12 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.05 (2H, s, H-6, 8), 5.42 (1H, dd, $J = 13.9, 2.9$ Hz, H-2), 4.92 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-1''), 4.67 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-1'''), 3.15 (1H, dd, $J = 16.5, 13.9$ Hz, H-3 β), 2.78 (1H, dd, $J = 16.5, 2.9$ Hz, H-3 α); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C : 78.2 (C-2), 43.5 (C-3), 187.4 (C-4), 163.8 (C-5), 92.9 (C-6), 164.6 (C-7), 94.3 (C-8), 162.1 (C-9), 105.3 (C-10), 129.8 (C-1'), 128.2 (C-2', 6'), 117.2 (C-3', 5'), 156.9 (C-4'), 101.1 (C-1''), 73.1 (C-2''), 77.2 (C-3''), 70.3 (C-4''), 76.9 (C-5''), 60.8 (C-6'')。以上数据与文献报道^[17]的南酸枣苷数据一致, 故确定化合物 **11** 为南酸枣苷。

化合物 **12**: 淡黄色粉末 (甲醇), $C_{16}H_{16}O_6$; ESI-MS m/z : 305.1 $[M + H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 7.16 (1H, s, H-3), 6.75 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.58 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 3.81 (3H, s, 7-OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 178.2 (C-2), 103.8 (C-3), 186.7 (C-4), 162.8 (C-5), 99.8 (C-6), 167.8 (C-7), 92.1 (C-8), 159.2 (C-9), 102.6 (C-10), 71.8 (C-1'), 37.8 (C-2', 6'), 35.9 (C-3', 5'), 209.6 (C-4'), 56.0 (7-OCH₃)。以上数据与文献

报道^[18-19]的 tetrahydroprotogenkwanone 数据一致, 故确定化合物 **12** 为 tetrahydroprotogenkwanone。

4 抗骨质疏松活性筛选

小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 经复苏后加至 α -MEM 培养基 (10% 胎牛血清) 中, 在 37 °C, 5%CO₂ 环境下培养直至细胞铺满 80% 的培养瓶底, 中途更换培养基 1 ~ 2 次。使用胰蛋白酶消化细胞, 用于后续实验。实验分为空白对照组、阳性对照组、各化合物组, 每组平行 6 份。收集处于对数生长期的 MC3T3-E1 细胞, 调整细胞密度, 以 5×10^3 个细胞 / 孔接种于 96 孔板内, 每孔 200 μ L, 转移至培养箱中培养过夜至细胞贴壁。空白对照组加入等量培养基, 阳性对照组加入雌二醇使浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹, 各化合物组加入对应化合物使浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹, 转移至培养箱中培养 48 h 后加入 10 μ L CCK-8 试剂, 在室温下孵育 1 h, 用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD) 值并计算细胞增殖率。增殖率 (%) = 待测组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 \times 100%。采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 与空白对照组相比, 雌二醇及化合物 **1** ~ **4**、**6** ~ **9**、**12** 对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 具有明显的促进增殖的作用 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

表 1 川枳壳中各黄酮类化合物对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($n = 6, x \pm s$)

Tab 1 Effect of flavonoids in *Citrus Aurantium* from Sichuan on the proliferation of MC3T3-E1 cells ($n = 6, x \pm s$)

组别	增殖率 / %	组别	增殖率 / %
空白对照组	100.0 \pm 3.3	雌二醇	178.5 \pm 5.0*
化合物 1	147.0 \pm 7.5*	化合物 2	136.5 \pm 9.2*
化合物 3	126.2 \pm 9.7*	化合物 4	154.3 \pm 3.1*
化合物 5	99.3 \pm 7.1	化合物 6	125.5 \pm 9.2*
化合物 7	134.7 \pm 5.6*	化合物 8	126.2 \pm 4.2*
化合物 9	137.5 \pm 4.5*	化合物 10	103.9 \pm 5.3
化合物 11	95.4 \pm 4.5	化合物 12	196.3 \pm 6.2*#

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与雌二醇组比较, # $P < 0.01$ 。

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

5 讨论

骨质疏松是一种全身性骨代谢疾病, 以骨量降低, 骨组织微管结构破坏为特征, 造成骨强度降低, 骨脆性增加, 易引起骨折。我国骨质疏松发病率约为 7%, 其中绝经后的女性患病率高达 50%, 人们普遍认为更年期雌激素丢失是导致骨质疏松症的首要原因^[20-21], 临床上广泛使用雌激素治疗绝经后骨质疏松症, 但雌激素会增加绝经后妇女中风、血栓、腿部痉挛和血管运动症状的发生率^[22]。近年来, 国

内外研究者们发现植物来源黄酮类成分具有抗骨质疏松活性,且不良反应少,价格低廉,作用机制广泛,是理想的天然抗骨质疏松药物,研究较多的有骨碎补总黄酮、淫羊藿总黄酮、大豆异黄酮等^[23]。

本研究以中药川枳壳为原料,共分离鉴定出 12 个黄酮类成分,包括 10 个二氢黄酮及其苷类、1 个黄酮类和 1 个类黄酮类成分。其中化合物 **5**、**8**、**10**、**11**、**12** 为首次从该种植物中分离得到,化合物 **5**、**10**、**12** 为首次从该属植物中分离得到。考察了分离所得化合物对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖作用,结果显示从川枳壳中分离所得的 10 个二氢黄酮及其苷类成分中有 7 个成分(化合物 **1**~**4**、**6**、**7**、**9**)对 MC3T3-E1 细胞具有明显增殖作用,证实川枳壳确有潜在的抗骨质疏松作用,且物质基础与其主要成分二氢黄酮及其苷类密不可分。此研究结果与文献报道的柚皮苷(**1**)^[24]、新橙皮苷(**2**)^[25]、柚皮素(**7**)^[26]具有抗骨质疏松作用的研究结果相一致。另外,化合物 **12** 为类黄酮成分表现出较强的 MC3T3-E1 细胞增殖作用,优于阳性药雌二醇,可作为抗骨质疏松的潜在药物进行深入研究。

参考文献

[1] 曾晓艳,陈婷,谭伟民,等.枳壳的生物学特性及化学成分研究进展[J].中南药学,2017,15(7):869-872.
 [2] 冯玮.明末赣、陕两地道地枳壳之兴替与江西“枳种”入川[J].农业考古,2021(6):212-216.
 [3] 龚斌,李琴,胡小红,等.枳壳化学成分及药理作用研究进展[J].南方林业科学,2019,47(3):40-45.
 [4] 刘飞,邹建国,彭海龙,等.响应面法优化枳壳中总黄酮超声辅助提取工艺[J].中成药,2012,34(5):948-952.
 [5] 高萌.中药枳壳“道地性”研究[D].南昌:江西中医药大学,2021.
 [6] 龚斌,李琴,胡小红,等.枳壳化学成分及药理作用研究进展[J].南方林业科学,2019,47(3):40-45.
 [7] 李陈雪,杨玉赫,冷德生,等.枳壳化学成分及药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(2):158-161.
 [8] 许有瑞,张可锋,谢亲建,等.沙田柚幼果化学成分研究[J].中药材,2015,38(9):1879-1881.
 [9] 刘倩,左月明,严欢,等.代代花中黄酮类化学成分研究[J].中药材,2019,42(11):2565-2569.
 [10] 张杰,李鸿钰,徐丽丽,等.甘草根和根茎的化学成分研究[J].中国药业,2017,26(12):15-19.
 [11] 丁邑强,熊英,周斌,等.枳壳中黄酮类成分的分离与

鉴定[J].中国中药杂志,2015,40(12):2352-2356.
 [12] 王天星.代代花中有效成分的分离纯化、鉴定及其活性研究[D].广州:华南理工大学,2018.
 [13] Ripperger H. 4"-O-acetylsarotanoside, a novel flavanone glycoside from *Nierembergia hippomanica* [J]. Phytochemistry, 1981, 20(7): 1757-1758.
 [14] Usman A, Mohammed HR, Abdullahi OA, et al. Cytotoxic activities of fractionated ethanol extract of the root bark of *terminalia catappa* and isolation of eriodictyol-7-O-β-D-glucopyranoside from the ethyl acetate soluble fraction [J]. J Chem Res, 2020, 11(2): 44-51.
 [15] 黄正,屠鹏飞,李军,等.大花益母草的化学成分研究[J].中草药,2017,48(9):1724-1729.
 [16] 苏志维,邱声祥.鸦胆子果实的化学成分研究[J].热带亚热带植物学报,2013,21(5):466-470.
 [17] 王天星,姜建国.代代花化学成分的分离鉴定和抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2018,34(7):76-80.
 [18] Wada H, Fujita H, Murakami T, et al. Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. LXXIII. New flavonoids with modified B-Ring from the genus *Pseudopteris* (Thelypteridaceae) [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(12): 4757-4762.
 [19] Ötvös SB, Vágvölgyi M, Girst G, et al. Synthesis of nontoxic protoflavone derivatives through selective continuous-flow hydrogenation of the flavonoid B-ring [J]. Chempluschem, 2018, 83(2): 72-76.
 [20] 李方福,董碧蓉.骨质疏松症的规范性治疗策略[J].现代临床医学,2015,41(6):451-455.
 [21] Almeida M, Laurent MR, Dubois V, et al. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2017, 97(1): 135-187.
 [22] Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, et al. New horizons in treatment of osteoporosis [J]. Daru, 2017, 25(1): 1-16.
 [23] 屈杭帅,郑敬民.植物黄酮抗骨质疏松作用的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(10):1529-1533.
 [24] Zhu Z, Xie WJ, Li YY, et al. Effect of naringin treatment on postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats: a meta-analysis and systematic review [J]. Evid-Based Compl Alt, 2021, 2021: 1-8.
 [25] Tan Z, Cheng JW, Liu Q, et al. Neohesperidin suppresses osteoclast differentiation, bone resorption and ovariectomized-induced osteoporosis in mice [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 439: 369-378.
 [26] Gera S, Sampathi S, Maddukuri S, et al. Therapeutic potential of naringenin nanosuspension: in vitro and in vivo anti-osteoporotic studies [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(7): 1449-1458.

(收稿日期:2023-07-13;修回日期:2023-08-30)

葛根芩连汤联合益生菌对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群及相关炎症因子的影响

李子伊^{1, 2, 3}, 李淋雨^{1, 2, 3}, 张紫园^{2, 3, 5}, 邱宇², 赵飞², 戴敏¹, 常艳^{2, 4*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133; 3. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 4. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203; 5. 江西中医药大学, 南昌 330004)

摘要: **目的** 探讨葛根芩连汤联合益生菌对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群及相关炎症因子的影响。**方法** 将 45 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 7 组, 即正常组, 模型组, 美沙拉嗪组 ($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 益生菌组 ($0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及益生菌联合葛根芩连汤低、中、高剂量组 (2.54 、 5.08 、 $10.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。除正常组外, 其余各组通过自由饮用 3% 葡聚糖硫酸钠溶液连续 7 d, 再饮水 7 d 进行造模, 整个实验共重复 4 个循环。在造模第 35 日依据疾病活动指数评分将造模失败的小鼠进行剔除, 其余小鼠按分组进行给药, 均给药 21 d。造模及给药期间每周两次记录小鼠体重、DAI 评分; 实验结束后记录结肠长度, 采用 HE 染色观察结肠组织病理学变化并进行组织病理学评分; 采用 ELISA 法检测血清中 IL-6、TNF- α 、IL-10 的表达; 通过肠道粪便 16S rRNA 测序对小鼠肠道菌群多样性进行分析。**结果** 与模型组相比, 各给药组小鼠体重升高、DAI 评分降低, 且结肠长度恢复, 病理评分降低, 联合给药中、高剂量组恢复效果较显著 ($P < 0.05$), 且结果呈剂量依赖性; 联合给药各组促炎因子 IL-6、TNF- α 的表达水平显著下调, 而抑炎因子 IL-10 的表达水平显著上调 ($P < 0.01$), 结果呈剂量依赖性; 肠道菌群 alpha 多样性及 beta 多样性结果表明各给药组间群落物种组成及物种丰富度已经发生了变化, 模型组表现为物种丰度降低, 而益生菌组及联合给药中剂量组可显著恢复物种丰富度 ($P < 0.01$); 基于门水平小鼠肠道内优势菌群为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*), 且联合给药组可显著上调 F/B 的水平; 属水平物种相对丰度分析得出联合给药组可显著回调有益菌属如 *Muribaculaceae*、毛螺菌属 NK4A136 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、另枝菌属 (*Alistipes*)、罗氏菌属 (*Roseburia*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 等的丰度并显著下调条件致病菌属如拟杆菌属 (*Bacteroides*)、大肠埃希菌属 (*Colidextribacter*)、梭状芽孢杆菌属 UGG-014 (*Clostridia_UCG-014*) 的丰度 ($P < 0.05$), 调节肠道菌群恢复稳态。**结论** 葛根芩连汤联合益生菌在改善溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群失衡、恢复结肠长度、修复结肠病理损伤、抑制促炎症因子表达等均具有积极作用。

关键词: 葛根芩连汤; 益生菌; 溃疡性结肠炎; 炎症因子; 肠道菌群

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0092-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.014

Effect of Gegen Qinlian decoction combined with probiotics on intestinal microbiota and related inflammatory factors in mice with ulcerative colitis

LI Zi-yi^{1, 2, 3}, LI Lin-yu^{1, 2, 3}, ZHANG Zi-yuan^{2, 3, 5}, QIU Yu², ZHAO Fei², DAI Min¹, CHANG Yan^{2, 4*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. InnoStar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226133; 3. Nantong Haimen Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 4. Shanghai InnoStar Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203; 5. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: Objective To determine the effect of Gegen Qinlian decoction (GQD) combined with

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设 (No. BM2021002)。

作者简介: 李子伊, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: liziyi1111@126.com *通信作者: 常艳, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事药理及毒理学研究, email: ychang@innostar.cn

probiotics on the gut microbiota and related inflammatory factors in mice with ulcerative colitis.

Methods Totally 45 male C57BL/6 mice were randomly divided into 7 groups: a Normal group, a Model group, a Mes group ($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a Probiotics group ($0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a GQD L + Probiotics group, a GQD M + Probiotics group, a GQD H + Probiotics group ($2.54, 5.08, \text{ and } 10.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Except for the Normal group, all other groups were subjected to 7 continuous days of free drinking of 3% dextran sodium sulfate solution (DSS), followed by 7 days of drinking water before the modeling. The entire experiment was repeated 4 cycles. On the 35th day of modeling, mice with failed modeling were excluded based on the disease activity index (DAI), and the remaining mice were administered in groups for 21 days. The weight and DAI of mice during the modeling and administration period were recorded twice a week. After the experiment, the length of the colon was recorded, the pathological changes of the colon tissue were observed with HE staining, and colon mucosa damage index (CMDI) was scored. The expression of IL-6, TNF- α , and IL-10 in the serum was detected with ELISA. The diversity of intestinal microbiota in the mice through 16S rRNA sequencing of intestinal feces was analyzed. **Results** Compared with the Model group, in each treatment group, the body weight of mice were increased, the DAI were decreased, and the colon lengths were recovered. The recovery effect of the GQD M + Probiotics group, and GQD H + Probiotics group was significant ($P < 0.05$), in a dose dependent manner. The expression level of pro-inflammatory factors IL-6 and TNF- α was significantly downregulated ($P < 0.01$), with the expression level of IL-10 was significantly increased ($P < 0.01$) in the combination therapy groups, indicating a dose-dependent effect. Alpha diversity and beta diversity of the gut microbiota showed that the species composition and species richness had changed among the different treatment groups. A decrease in species abundance in the Model group was found, while the Probiotics group and the GQD M + Probiotics group significantly restored species richness ($P < 0.01$). Based on the phylum level, the dominant gut microbiota in the mice included *Firmicutes* and *Bacteroidota*, and the level of F/B was significantly upregulated in the combined administration group. Based on the species relative abundance at the genus level, beneficial bacteria such as *Muribaceae*, *Lachnospiraceae NK4A136_group*, *Alistipes*, *Roseburia*, and *Lactobacillus* were significantly reversed in the combined administration group. The conditional pathogenic bacteria such as *Bacteroides*, *Colidextribacter* and *Clostridia_UCG-014* were significantly decreased. The intestinal flora were regulated and restored to steady state in the combined administration group significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Combination of Gegen Qinlian decoction and probiotics has a positive effect on improving the intestinal microbiota imbalance, restoring the colon length, repairing pathological damage to the colon, and inhibiting the expression of pro-inflammatory factors in mice with ulcerative colitis.

Key words: Gegen Qinlian decoction; probiotics; ulcerative colitis; inflammatory factor; intestinal microbiota

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种造成结肠损伤的非特异性慢性炎症性疾病, 在我国的发病率逐年升高, 受到广泛的关注。目前, 普遍认为其发病机制涉及遗传^[1]、肠道屏障受损^[2]、免疫系统失调^[3]、肠内微生物等因素^[4]。现代临床用药主要为氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂^[5]、生物制剂^[6]等, 但这些药物均存在不同程度的不良反应, 导致患者依从性较差^[7]。UC 在中医上属“泄泻”的范畴, 此外还有“腹痛”“肠病”“久痢”等说法, 总体病机可概括为脾虚湿盛, 肠腑湿热蕴结^[8-11]。主治协热下利的经典名方葛根芩连汤 (Gegen Qinlian decoction,

GQD) 越来越多地应用于肠道疾病的临床治疗中。该方由葛根、黄芩、黄连与炙甘草 4 味中药相互配伍组成, 既清热化湿, 又补气益脾^[12]。现代药理研究表明, GQD 具有抗炎和抑菌作用, 其多种活性成分如黄芩苷、甘草黄酮、小檗碱等, 能显著减轻炎症和氧化应激^[13-16]。该方对 UC 的治疗作用主要体现在控制疾病活动度、减轻相关炎症因子的表达、调节肠道菌群失衡等方面^[17-19]。研究发现, 肠道菌群的变化也是 UC 的疾病表现之一, 表现为菌群多样性及丰富度及有益菌水平降低, 条件致病菌水平增加, 进而导致肠道炎症反应加剧^[20-23]。因此在用药的基础上合理地补充肠

道有益菌, 调节肠道菌群的平衡, 也逐渐成为治疗 UC 的新思路。

临床研究表明, GQD 结合益生菌进一步控制 UC 患者的临床症状, 在促进肠道黏膜愈合、逆转炎症反应、调节肠道菌群失衡等方面有一定的优势^[24-26]。本文应用 GQD 联合益生菌对 UC 小鼠模型相关炎症因子的表达以及肠道菌群的变化进行研究, 揭示联合用药对肠道的保护作用, 以期为后续的疾病治疗及药物研究提供参考。

1 材料

1.1 动物

45 只 6~8 周龄 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 (20±2) g [浙江维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2020-0002]。所有动物均在光暗循环的 SPF 级动物房中饲养, 温度 20~25℃, 湿度 40%~70%, 自由摄食饮水。本研究经益诺思生物技术南通有限公司动物护理和使用委员会 (IACUC) 批准, 批准号为 IACUC-2023-m-135a。

1.2 试药

葛根、黄芩、炙甘草 (广东汇群中药饮片股份有限公司), 黄连 (康美药业股份有限公司), 以上中药饮片由安徽中医药大学方清影主任鉴定为正品, 符合 2022 年版《中国药典》规定。美沙拉嗪肠溶片 (德国 Losan Pharmma GmbH); 益生菌 (上海信谊制药总厂); 葡聚糖硫酸钠 (美国 MP Biomedicals); 苏木精-伊红 (HE) 染色剂 (武汉塞维尔生物科技有限公司); 便隐血试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司); 白细胞介素 (IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); MagPure Soil DNA LQ 试剂盒 (广州美基生物科技有限公司); Qubit dsDNA Assay 试剂盒 (美国 Life Technologies); Tks Gflex DNA 聚合酶 (日本 Takara)。

1.3 仪器

高速冷冻离心机、分光光度计 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; 超纯水仪 (美国默克公司); 正置白光拍照显微镜 (日本尼康公司); 电子天平 (上海天美天平仪器有限公司, 精度: 0.0001 g); 酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司]; PCR 仪 (美国伯乐公司); 电泳仪、凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司); 生物分析仪 (美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 模型建立、分组与给药

适应期结束后, 除正常组外, 余小鼠均采用反复周期性自由饮用 3% 的葡聚糖硫酸钠 (DSS)

溶液的方法进行造模^[27]。即将 3 g DSS 以 100 mL 水溶解完全, 得到 3% DSS 溶液使小鼠自由饮用连续 7 d, 每隔 3 日更换新的溶液, 再换成正常饮用水饮用 7 d, 此为一个循环^[28], 依次进行 4 个循环共 56 d, 见图 1。从给予 DSS 的前 1 日开始以及造模期间每周 2 次测量小鼠体重、观察粪便情况、参照粪便隐血试剂盒说明书检测隐血情况并进行疾病活动指数 (DAI) 评分^[29]。



图 1 造模及治疗周期

Fig 1 Modeling and treatment cycle

造模第 35 日根据 DAI 评分, 剔除掉造模失败小鼠, 即评分低于 1 分的小鼠。整个实验共分为 7 组, 正常组 (Normal)、模型组 (Model)、美沙拉嗪组 (Mes) 各 5 只, 益生菌组 (Probiotics)、益生菌联合 GQD 低剂量组 (GQD L + Probiotics)、益生菌联合 GQD 中剂量组 (GQD M + Probiotics)、益生菌联合 GQD 高剂量组 (GQD H + Probiotics) 各 6 只, 于实验第 36 日灌胃给药。GQD 依据原方及相关文献研究的煎煮方式^[30], 以 5:3:3:2 的比例进行煎煮。所有药材均加入 8 倍量双蒸水浸泡, 葛根先浸泡 30 min, 先武火煮沸后转小火继续煎煮 20 min, 再加入已浸泡 30 min 的剩余诸药, 煮沸后继续煎煮 30 min, 三层纱布过滤后再加水复煎, 合并两次所得滤液, 浓缩成 2.54、5.08、10.16 g·kg⁻¹ 的低、中、高剂量的药液灌胃; 益生菌用双蒸水配制成 0.3 g·kg⁻¹ 药液灌胃, 联合给药组于中药方剂给药 1 h 后灌胃益生菌; 美沙拉嗪肠溶片用双蒸水配制成 0.6 g·kg⁻¹ 药液灌胃。正常组及模型组灌胃等量生理盐水, 各给药组均给药 21 d。

2.2 结肠长度测量及 HE 染色

动物采血结束后立即沿肠系膜纵轴剪开肠腔, 迅速剖取盲肠至肛门段的肠组织, 用冰生理盐水冲洗污物, 记录长度, 收集肠道中的粪便置 -80℃ 冰箱中备测, 将肠组织置于 10% 中性福尔马林中固定, 进行常规 HE 染色。将固定的结肠组织脱水、包埋、切 4 μm 厚片, 随后依次放入二甲苯 I、二甲苯 II、无水乙醇 I、无水乙醇 II、75% 酒精中脱蜡水化, 经苏木素染液染 3~5 min、分化、返蓝、流水冲洗, 进行梯度酒精脱水后放入伊红染液中染色 5 min, 采用中性树胶封片, 用显微镜观察并采集图像分析。依据结果进行结肠黏膜损伤指数 (CMDI) 评分^[31]。

2.3 ELISA 法检测血清中炎症因子 IL-6、IL-10、TNF- α 的表达情况

动物安乐死后，立刻心脏采血，静置 1 h 后 4℃、3000 g 离心 5 min，收集血清。采用 ELISA 试剂盒说明书的方法配制标准曲线、加样、加入生物素抗原工作液、孵育、洗板、加入亲和素工作液、洗板、加入显色液及中止液最后采用酶标仪读取各样本 OD 值，检测各组血清炎症因子的表达情况。

2.4 肠道菌群 16S rRNA 测序

末次给药结束后收集小鼠粪便样品，对样本的基因组 DNA 进行提取。利用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度，将提取的 DNA 置于 -20℃ 备测。以提取的基因组 DNA 为模板，选择 16S rRNA 基因的 V3-V4 区作为扩增和测序的目的区间，正向引物为 343F: TACGGRAGGCAGCAG，反向引物为 798R: AGGGTATCTAATCCT，进行 PCR 扩增，取纯化过的扩增产物进行 Qubit 定量，调整浓度进行测序。采用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台，进行样本 2×250 bp 双端测序与分析，经过引物剪切、质量过滤、降噪、拼接、去嵌合体等质控分析后。使用 QIIME2 软件、R 软件、q2-feature-classifier 软件等对测序结果进行 alpha 多样性、beta 多样性、菌群结构组成等分析。

2.5 统计学分析

数据均采用 SPSS 26.0 软件进行分析，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间数据比较采用单因素方差分析 ANOVA，组间两两比较采用 LSD 值进行检验， $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 联合用药对 UC 模型小鼠体重、DAI 评分及结肠长度的影响

随着给药天数的增加，与 Model 组相比，Mes 组、Probiotics 组和 3 个剂量的联合给药组体重均呈恢复趋势，Mes 组及 GQD H + Probiotics 组体重恢复趋势最为显著；给药结束后，与 Normal

组相比，Model 组 DAI 评分升高，结肠长度缩短 ($P < 0.01$)；与 Model 组相比，各给药组 DAI 评分均降低；同时 Mes 组及联合给药各组均恢复了结肠长度 ($P < 0.01$)。Probiotics 组有促进结肠长度恢复趋势，见图 2。

3.2 联合用药恢复 UC 模型小鼠组织病理学损伤

各组结肠 HE 染色结果显示，Normal 组小鼠肠组织各层结构清晰，黏膜层上皮细胞形态正常，固有层肠腺数量丰富且排列紧密，肌层肌细胞排列规则、形态正常，未出现明显的炎性变化。与 Normal 组相比，Model 组小鼠肠组织可见大面积糜烂，黏膜层结构消失，固有层肠腺坏死、结构消失并伴大量炎症细胞浸润（黑色箭头所示），肌层结构较为松散，CMDI 评分升高。与 Model 组相比，Mes 组及联合给药各组固有层肠腺结构恢复较好，仅有小面积炎性细胞浸润，偶见上皮细胞坏死脱落，肌层结构规则，GQD M + Probiotics 组和 GQD H + Probiotics 组的恢复效果较为显著，CMDI 评分降低；而 Probiotics 组肠腺结构有所恢复但仍存在中度炎性细胞浸润的情况，CMDI 评分高于联合给药组，见图 3。

3.3 联合用药降低 UC 模型小鼠促炎因子的表达、升高抑炎因子的表达

与 Normal 组相比，Model 组小鼠促炎因子 IL-6、TNF- α 的表达升高，而抑炎因子 IL-10 表达水平下降。经治疗后，与 Model 组相比，各给药组均显著下调促炎因子 IL-6、TNF- α 的表达，上调抑炎因子 IL-10 的表达。GQD M + Probiotics 组对抑炎因子 IL-10 的上调作用较其他联合给药组明显，此外，各联合给药组对其他炎症因子的表达情况均呈剂量依赖性，且与 Probiotics 组相比，GQD M + Probiotics 组及 GQD H + Probiotics 组对炎症因子的调节程度更为显著，说明联合用药相较于单独补充益生菌更能显著调整炎症因子的表达情况，对免疫反应进行干预，见表 1。

表 1 各组 IL-6、IL-10、TNF- α 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$, ng · mL⁻¹)
Tab 1 Expression of IL-6, IL-10, and TNF- α in each group ($\bar{x} \pm s$, ng · mL⁻¹)

组别	IL-6	IL-10	TNF- α
Normal 组	47.77 ± 1.80	365.76 ± 4.60	365.36 ± 4.56
Model 组	99.34 ± 3.12**	256.37 ± 10.04**	469.06 ± 10.61**
Mes 组	52.61 ± 6.81 ^{##}	358.70 ± 9.21 ^{##}	430.05 ± 15.71 [#]
Probiotics 组	63.14 ± 5.00 ^{##}	352.23 ± 5.39 ^{##}	388.89 ± 9.55 ^{##}
GQD L + Probiotics 组	54.95 ± 3.08 ^{##}	375.75 ± 8.54 ^{##}	366.47 ± 9.86 ^{##}
GQD M + Probiotics 组	49.34 ± 1.50 ^{##} Δ	407.07 ± 12.14 ^{##} Δ Δ	358.35 ± 9.53 ^{##}
GQD H + Probiotics 组	45.71 ± 1.43 ^{##} Δ Δ	395.80 ± 22.98 ^{##} Δ	340.55 ± 15.81 ^{##} Δ

注：与 Normal 组相比，** $P < 0.01$ ；与 Model 组相比，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与 Probiotics 组相比， Δ $P < 0.05$ ， Δ Δ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Normal group, ** $P < 0.01$; compared with the Model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Probiotics group, Δ $P < 0.05$, Δ Δ $P < 0.01$.

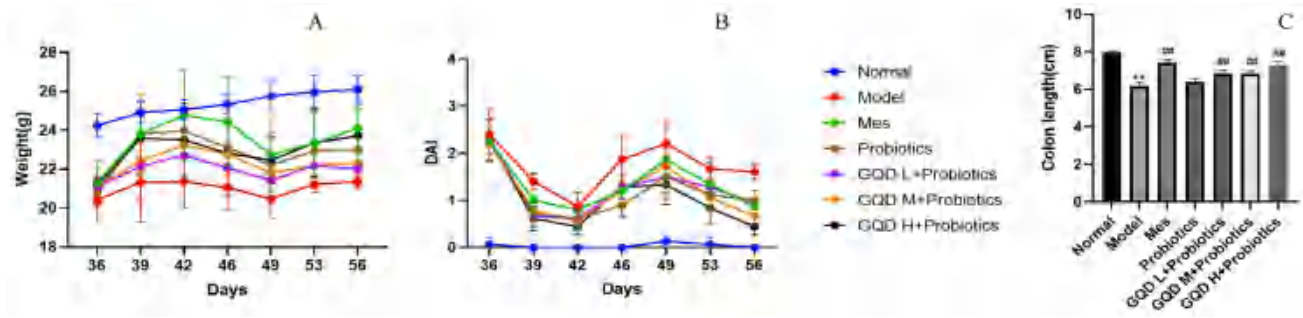


图 2 给药期间小鼠体重 (A)、DAI 评分变化 (B) 及治疗后各组结肠长度 (C) 的比较
 Fig 2 Changes in body weight (A) and DAI score (B) during the administration and colon length (C) in each group

注: 与 Normal 组相比, $**P < 0.01$; 与 Model 组相比, $###P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the Normal group, $**P < 0.01$; compared with the Model group, $###P < 0.01$.

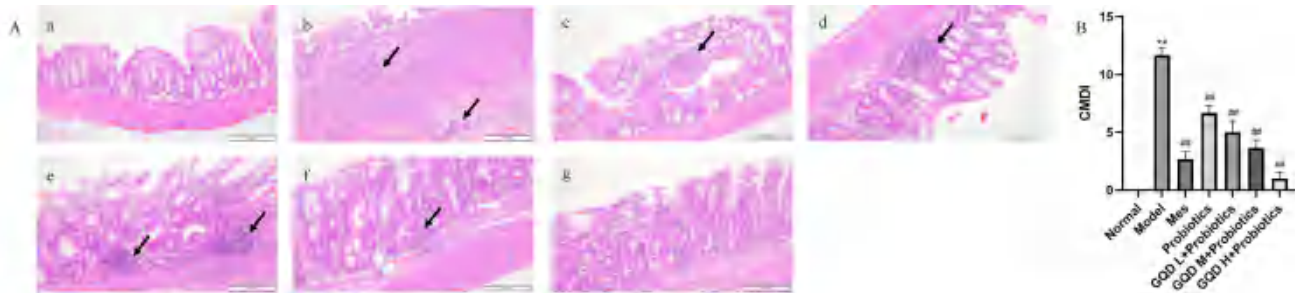


图 3 各组结肠 HE 染色 ($\times 200$) (A) 及结肠病理评分 (B)
 Fig 3 Colon HE staining ($\times 200$) (A) and CMDI scoring (B) in each groups

a. 正常组 (Normal); b. 模型组 (Model); c. 美沙拉嗪组 (Mes); d. 益生菌组 (Probiotics); e. 益生菌联合 GQD 低剂量组 (GQD L + Probiotics); f. 益生菌联合 GQD 中剂量组 (GQD M + Probiotics); g. 益生菌联合 GQD 高剂量组 (GQD H + Probiotics)
 注: 与 Normal 组相比, $**P < 0.01$; 与 Model 组相比, $###P < 0.01$ 。

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

3.4 联合用药调节 UC 模型小鼠肠道菌群的平衡

3.4.1 小鼠肠道菌群 alpha 多样性分析 alpha 多样性结果基于 Simpson 指数和 Chao1 指数进行分析, 两者分别侧重于群落多样性和群落丰富度。经 Simpson 指数稀释曲线分析得出, 随着测序深度的增加, 曲线逐渐趋于水平, 说明测序深度已经基本覆盖到样品中绝大部分微生物信息, 且 Simpson 指数越高, 表明群落多样性越高, 由此可见, Probiotics 组的群落多样性较高。Chao1 指数分析图反映了群落丰富度在组间的差异性, Chao1 指数越大, 表明群落的丰富度越高。与 Normal 组相比, Model 组的群落丰富度降低, 而与 Model 组相比, Probiotics 组、Mes 组和 GQD M + Probiotics 组的群落丰富度明显升高, 见图 4。

3.4.2 小鼠肠道菌群 beta 多样性分析 采用主成分分析 (PCoA) 考察小鼠肠道菌群 beta 多样性的差异, 即群落组成越相似, 反映在图中的距离越接近。采用 unweighted unifrac 距离算法进行分析, 结果显示, Normal 组和各给药组分布于完全不同的象限, 说明菌群物种组成出现了显著变

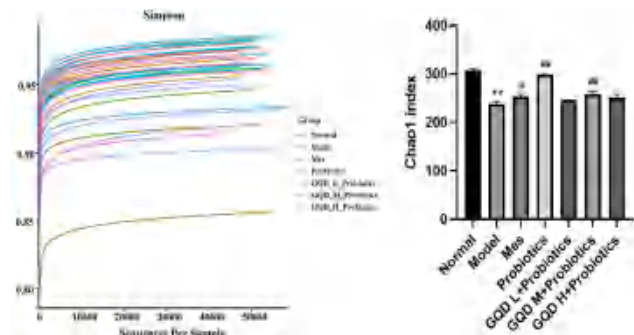


图 4 各组小鼠肠道菌群 Simpson 指数稀释曲线图 (A) 及 Chao1 指数分析图 (B)

Fig 4 Simpson index dilution curve (A) and Chao1 index analysis (B) of the intestinal microbiota in each group

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

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

化; Probiotics 组与 Model 组重叠度较大说明菌群物种组成有相似性; 而其他给药组与 Model 组处于完全不同象限, 说明群落物种组成已经发生了明显变化; GQD M + Probiotics 组及 GQD H + Probiotics 组的群落结构分布较为接近且有部分重叠, 说明群落物种组成有一定的相似性, 见图 5。

3.4.3 门水平肠道菌群组成分析 基于门水平的肠道菌群 Heatmap 图分析, 各组小鼠肠道差异菌群主要由拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、脱硫杆菌门 (*Desulfobacterota*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*)、弯曲杆菌门 (*Campilobacterota*)、脱铁杆菌门 (*Deferribacterota*) 等组成, 见图 6。与 UC 最具有相关性的两个菌门为 *Firmicutes* 和 *Bacteroidota*, 两者的比值 (F/B) 变化被认为与 UC 疾病活动度相关^[32], 与 Normal 组比较, Model 组的 *Firmicutes* 的相对丰度降低, 而 *Bacteroidota* 的相对丰度升高, Model 组 F/B 下降, 表明处于疾病活动期, 肠道菌群失衡; 与 Model 组相比, GQD M + Probiotics 组及 GQD H + Probiotics 组的 *Firmicutes* 的相对丰度升高, 而 *Bacteroidota* 的相对丰度降低, F/B 显著升高, 表明联合给药后促进了肠道菌群恢复稳态, 以上差异均有统计学意义。

3.4.4 属水平肠道菌群组成分析 基于属水平的肠道菌群 Bar 图分析发现, 各组菌群所包括的菌属主要为 *Muribaculaceae*、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、毛螺菌属 *NK4A136* (*Lachnospiraceae_NK4A136*

group)、另枝菌属 (*Alistipes*)、普雷沃氏菌属 *UCG-001* (*Prevotellaceae_UCG-001*)、梭状芽孢杆菌属 *UGG-014* (*Clostridia_UCG-014*)、*Clostridia_vadinBB60_group*、*Muribaculum*、拟普雷沃氏菌属 (*Alloprevotella*)、罗氏菌属 (*Roseburia*)、大肠埃希菌属 (*Colidextribacter*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、*Lachnoclostridium*、沙门氏菌属 (*Parasutterella*)、颤螺菌属 (*Oscillibacter*) 等, 见图 7。根据群落相对丰度表达量分析, 与 Normal 组相比, Model 组下调了 *Muribaculaceae*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Alistipes*、*Roseburia*、*Lactobacillus* 等有益菌属丰度, 上调了 *Bacteroides*、*Colidextribacter*、*Clostridia_UCG-014* 等条件致病菌属丰度, 说明肠道菌群组成结构发生变化。经给药治疗后, 与 Model 组相比, GQD M + Probiotics 组回调了 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Alistipes*、*Roseburia*、*Lactobacillus* 等有益菌属的丰度, 而下调条件致病菌属 *Bacteroides*、*Colidextribacter*、*Clostridia_UCG-014* 等, 促进肠道菌群结构恢复。GQD H + Probiotics 组主要上调 *Muribaculaceae*, 两组均促使肠道菌群恢复稳态, 见表 2。

表 2 各组属水平肠道菌群的相对丰度 ($\bar{x} \pm s$, %)
 Tab 2 Relative abundance of gut microbiota at the genus level in each group ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	<i>Muribaculaceae</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	<i>Alistipes</i>	<i>Roseburia</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Colidextribacter</i>	<i>Clostridia_UCG-014</i>
Normal	53.35±0.85	16.14±2.32	6.63±0.28	0.85±0.06	0.84±0.03	2.45±0.26	0.63±0.01	1.03±0.06
Model 组	37.79±0.20**	9.53±1.76*	1.98±0.30**	0.18±0.03**	0.65±0.02*	27.24±3.93**	1.37±0.05**	1.59±0.09**
Mes 组	34.83±1.90	12.69±2.82	3.02±0.33	0.04±0.03	0.35±0.03###	24.52±2.39	1.20±0.05###	0.40±0.06###
Probiotics 组	35.82±2.22	9.96±0.71	9.42±1.69###	0.51±0.01	0.92±0.08###	12.48±0.26###	1.28±0.03	0.93±0.20###
GQD L + Probiotics 组	41.58±0.81	3.48±0.68#	8.60±0.55###	0.03±0.00	0.61±0.05	10.87±0.19###	0.75±0.01###△△	1.52±0.16
GQD M + Probiotics 组	26.74±0.59	34.52±2.32###△△	13.01±1.40###△	1.90±0.33###△△	0.84±0.07#	6.89±0.07###	0.49±0.05###△△	0.61±0.19###
GQD H + Probiotics 组	48.00±1.28###△△	9.28±1.56	9.62±1.30###	0.50±0.09	0.81±0.06#	10.36±0.53###	0.54±0.03###△△	1.09±0.06#

注: 与 Normal 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Model 组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$; 与 Probiotics 组相比, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the Model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$; compared with the Probiotics group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$.

4 讨论

UC 作为一种免疫介导的消化系统疾病, 该病的发生和发展对患者的身心将都造成一定影响, 病情严重者最终会进展成结肠直肠癌。在临床和动物模型研究中, 促炎细胞因子的分泌增加以及肠道菌群的紊乱都会对 UC 的发生发展造成一定的影响。本研究通过 GQD 与益生菌联合, 从炎症因子表达及肠道菌群的平衡两个方面对 UC 进行干预。实验研究结果显示 GQD 联合益生菌可显著恢复模型小鼠体重, 降低 DAI 评分, 减轻结肠病理损伤, 减少炎症细胞对肠黏膜的浸润, 恢复结肠长度, 调节炎症因子表达, 调节肠道菌群平衡等, 治疗效果优于单用益生菌及西药, 联

合用药对于 UC 的治疗更具优势性, 同时为后续疾病研究及临床用药提供了思路和参考。

UC 患者肠道菌群的失衡与炎症因子的表达是相互影响的, 两者联系密切, 共同促使 UC 的病程发展。研究显示, 多数 UC 患者存在肠道内环境紊乱现象, 进而引发的一系列反应表现为: 肠道有害菌增加, 侵袭肠道黏膜, 肠道屏障完整性丧失, 细菌抗原易位性增加, 破坏肠道黏膜正常功能, 刺激肠黏膜发生炎症反应, 使促炎因子的表达增加, 引发肠道炎症, 而此时肠道加强免疫反应抵御有害菌侵袭又会加剧肠道菌群的紊乱, 给肠道环境造成严重负担^[33]。

在 UC 的发展过程中有众多炎症因子参与,

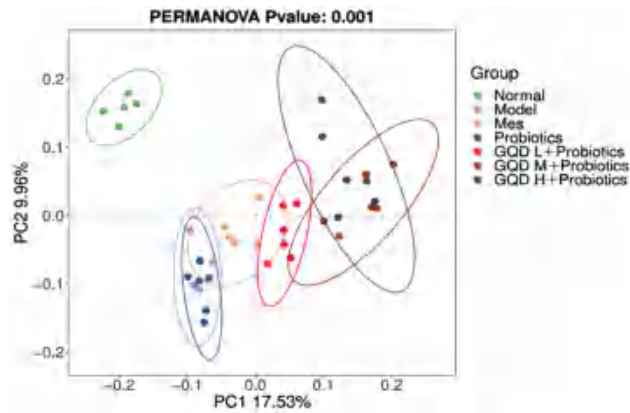


图 5 各组小鼠肠道菌群主成分分析
Fig 5 Principal component analysis of the intestinal microbiota in each group

其相互作用，介导细胞间的平衡而影响炎症的发展^[34-36]。IL-6 能介导炎症反应的发生，可作为 UC 疾病活动度的决定性影响因素并具有多重免疫调节功能^[37]。TNF- α 可作用于肠黏膜上皮细胞启动炎症反应^[38]。IL-10 可减弱炎症反应，并抑制由 T 细胞参与的有关免疫应答^[39]。在本研究中，Model 组小鼠血清促炎因子 IL-6 和 TNF- α 的表达升高而抑炎因子 IL-10 表达降低。在肠黏膜病理表现上也出现了大量的炎性细胞浸润且肠黏膜结构完整性丧失。而联合给药后可显著回调促炎因子的过度表达，提高抑炎因子的表达，同时显著修复肠黏膜病变，表现为炎性细胞浸润面积降低，恢复肠黏膜结构完整性。结果表明联合用

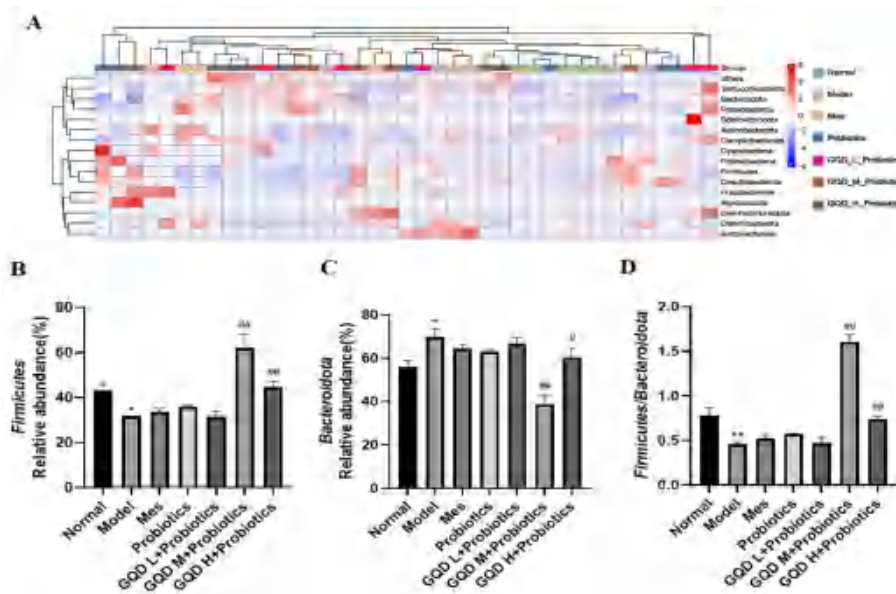


图 6 各组小鼠肠道菌群基于门水平分析 Heatmap 图 (A)、肠道中 Firmicutes 相对丰度 (B)、Bacteroidota 相对丰度 (C) 及两者比值 (F/B) 分析图 (D)

Fig 6 Heatmap of gut microbiota based on phylum level (A), analysis of Firmicutes relative abundance (B) and Bacteroidota relative abundance (C), and F/B ratio in the intestines of mice in each group (D)

注：与 Normal 组相比，** $P < 0.01$ ；与 Model 组相比，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Normal group, ** $P < 0.01$ ；compared with the Model group, # $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

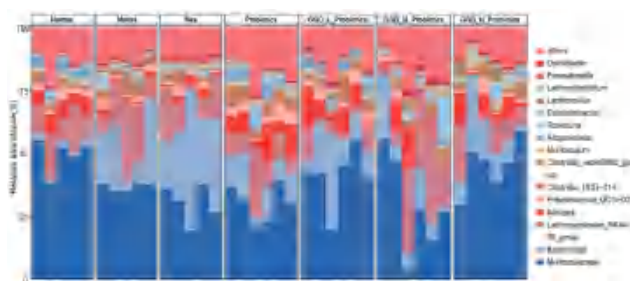


图 7 各组小鼠属水平肠道群落组成 Bar 图
Fig 7 Bar plot of the genus level of intestinal community composition in each group

药可通过改善肠黏膜病变以及炎症因子的表达保护肠道屏障，药理作用呈剂量相关。

从肠道菌群的变化来看，有研究表明，UC 患

者与正常人相比肠道菌群丰度降低且 Firmicutes 相对表达量降低而 Bacteroidota 相对表达量升高即表现为 F/B 比值降低，表明疾病处于活动期^[40]。在本研究中，各组小鼠肠道差异菌门主要由 Bacteroidota、Firmicutes、Proteobacteria、Desulfobacterota、Actinobacteriota 等组成，Model 组结果显示 F/B 比值降低而联合给药组 F/B 比值显著提高，调整了肠道菌群失衡的情况。通过肠道菌群 alpha 和 beta 多样性分析得出 Model 组小鼠肠道菌群结构发生显著变化，群落多样性降低，而联合给药组显著回调物种丰富度。从属水平肠道菌群组成来看，在联合给药后，Muribaculaceae、Lactobacillus、Lachnospiraceae_NK4A136_group、Alistipes、

Roseburia 丰度显著增多, 而条件致病菌 *Bacteroides*、*Clostridia_UCG-014*、*Colidextribacter* 的丰度显著降低。有研究表明, TNF- α 抑制剂治疗后能显著上调肠道菌群丰富度, 增加 *Firmicutes*、*Lactobacillus* 和 *Roseburia* 的相对表达量, 这些优势菌种能产生短链脂肪酸, 影响结肠运动, 减轻结肠炎症^[41]。此外, 也有研究证实, IL-6 对于条件致病菌 *Colidextribacter* 的表达成正相关, 与 *Lactobacillus* 的表达成负相关^[42]。在本研究中, 联合用药在下调 TNF- α 和 IL-6 的同时促进了上述优势菌群相对表达量的增加, 下调了条件致病菌的表达水平, 揭示了肠道菌群与炎症因子之间的相关性。

综上, GQD 与益生菌联用可有效缓解 DSS 诱导的 UC 模型小鼠炎症反应及肠道菌群失调状态, 从而修复肠道损伤, 恢复肠道正常功能。本文只在炎症及肠道菌群层面进行研究, 后续将继续对联合用药所触发的炎症通路及相关蛋白的表达情况进行扩展研究, 更好地解释联合用药的药理机制, 为疾病与药物治疗提供依据。

参考文献

- Imhann F, Vich VA, Bonder MJ, et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2018, 67 (1): 108-119.
- Wang XJ, Huang SW, Zhang ML, et al. Gegen Qinlian decoction activates AhR/IL-22 to repair intestinal barrier by modulating gut microbiota-related tryptophan metabolism in ulcerative colitis mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302 (Pt B): 115919.
- Zhao YX, Luan HF, Jiang H, et al. Gegen Qinlian decoction relieved DSS-induced ulcerative colitis in mice by modulating Th17/Treg cell homeostasis via suppressing IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153519.
- Wu MN, Li PZ, An YY, et al. Phloretin ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by regulating the gut microbiota [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104489.
- 张睿. ADSCs 移植治疗 DSS 诱导的炎症性肠病模型及人参皂苷 Rg1 的协同作用 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- Feuerstein JD, Isaacs KL, Schneider Y, et al. AGA clinical practice guidelines on the management of moderate to severe ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158 (5): 1450-1461.
- Rubin DT, Ananthkrishnan AN, Siegel CA, et al. ACG clinical guideline: ulcerative colitis in adults [J]. *Am J Gastroenterol*, 2019, 114 (3): 384-413.
- 尹通. 肠腑理气活血汤治疗慢性肠炎经验 [J]. *中医临床研究*, 2021, 13 (2): 56-58.
- 胡正聪, 侯慧芳. 附子理中丸加味治疗脾阳虚型慢性肠炎 56 例 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19 (70): 16-22.
- 薛文轩. 周仲瑛辨治慢性结肠炎数据挖掘及基础方网络药理学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- 马文校, 刘亿托, 罗艳贞, 等. 理中汤加味治疗慢性肠炎脾胃虚弱证临床观察 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2021, 31 (15): 67-68.
- 杨柳, 王秀娟, 金铭, 等. 加味葛根芩连汤对轻中度湿热蕴结型溃疡性结肠炎的疗效及部分机制研究 [J]. *中国处方药*, 2021, 19 (10): 140-142.
- 刘文, 王钰乐, 卿勇军, 等. 葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎谱效关系研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33 (9): 4093-4097.
- 王婷婷, 安毅, 梁琨, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的葛根芩连汤的化学成分分析 [J]. *中草药*, 2020, 51 (6): 1498-1507.
- 李彤, 李宇, 张彩娟, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 的葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎血清药效物质基础研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (4): 1073-1084.
- 王新雨, 晋臻, 凌霄, 等. 葛根芩连汤中 14 种主要成分在大鼠体内的药动学特征研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (23): 4724-4734.
- 郑佳荟, 李欢, 赵重博, 等. 黄芩汤、葛根芩连汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2023, 46 (2): 53-62.
- Wang YF, Zhang JC, Xu L, et al. Modified Gegen Qinlian decoction regulates Treg/Th17 balance to ameliorate DSS-induced acute experimental colitis in mice by altering the gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 756978.
- Li Y, Li ZX, Xie CY, et al. Gegen Qinlian decoction enhances immunity and protects intestinal barrier function in colorectal cancer patients via gut microbiota [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26 (48): 7633-7651.
- Liu JL, Gao YY, Zhou J, et al. Changes in serum inflammatory cytokine levels and intestinal flora in a self-healing dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis murine model [J]. *Life Sci*, 2020, 263: 118587.
- 马岩, 王中江, 杨靖瑜, 等. 动物双歧杆菌乳亚种 XLTG11 对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的缓解作用 [J]. *食品科学*, 2022 (17): 164-173.
- Dai ZF, Ma XY, Yang RL, et al. Intestinal flora alterations in patients with ulcerative colitis and their association with inflammation [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22 (5): 1322.
- Kahouli I, Malhotra M, Westfall S, et al. Design and validation of an orally administered active *L. fermentum*-*L. acidophilus* probiotic formulation using colorectal cancer Apc^{Min/+} mouse model [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101 (5): 1999-2019.
- 龚文亮. 葛根芩连汤联合益生菌治疗溃疡性结肠炎的疗效及睡眠状态的影响 [J]. *世界睡眠医学杂志*, 2019, 6 (7): 906-907.
- 农远志. 葛根芩连汤联合益生菌治疗溃疡性结肠炎 40 例临床观察 [J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26 (18): 106-107.
- 周玮. 葛根芩连汤联合益生菌治疗溃疡性结肠炎的疗效及睡眠状态分析 [J]. *世界睡眠医学杂志*, 2021, 8 (3): 420-421.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 1990, 98 (3): 694-702.
- 王璇, 李擎虎. 溃结宁膏对慢性非特异性溃疡性结肠炎大鼠血清中炎症因子及结肠组织 GFAP、BDNF 的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42 (1): 44-48.

- [29] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120 (1): 51-58.
- [30] 郑晨曦, 郭兴华, 吴天鹤, 等. 葛根芩连汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群及炎性因子的影响 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (8): 1675-1682.
- [31] 陈阳. 基于肠道菌群的葛根芩连汤干预急性肠炎模型大鼠的作用机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [32] Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease [J]. Microorganisms, 2020, 8 (11): 1715.
- [33] Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14 (5): 329-342.
- [34] Xiong L, Dea JW, Fu Z, et al. Ahr-Foxp3-ROR γ t axis controls gut homing of CD4⁺ T cells by regulating GPR15 [J]. Sci Immunol, 2020, 5 (48): eaaz7277.
- [35] 黄文娟, 卢学嘉, 房其军, 等. 葛根芩连汤对湿热型溃疡性结肠炎大鼠结肠病理损伤及 Th17/Treg 的影响 [J]. 中成药, 2021, 43 (12): 3497-3501.
- [36] 齐云菲, 牛明了, 张龙江. 参苓白术散对溃疡性结肠炎大鼠 Th17/Treg 免疫平衡的影响 [J]. 中国民间疗法, 2022, 30 (6): 88-92.
- [37] 杨美琪. 血清 IL-6、IL-10、IL-17、TNF- α 和 C 反应蛋白与炎症性肠病疾病活动度和预后的相关性 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.
- [38] 马静, 陈达凡, 宛新建. Th17 细胞在炎症性肠病发病中的作用 [J]. 胃肠病学, 2017, 22 (10): 630-633.
- [39] 宋亚芳, 裴丽霞, 赵婷婷, 等. 溃疡性结肠炎免疫因素发病机制的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32 (4): 432-436.
- [40] Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease [J]. BMC Microbiol, 2011, 11: 7.
- [41] Wu N, Mah C, Koentgen S, et al. Inflammatory bowel disease and the gut microbiota [J]. Proc Nutr Soc, 2021, 80 (4): 1-11.
- [42] Zhang J, Chen SL, Li LB. Correlation between intestinal flora and serum inflammatory factors in patients with Crohn's disease [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21 (21): 4913-4917.

(收稿日期: 2023-08-21; 修回日期: 2023-10-16)

金星散水提液诱导 ECA-109 细胞凋亡和氧化应激的作用及机制研究

李博¹, 雷琨¹, 刘家邑³, 刘军锋^{1*}, 张珍^{2*} (1. 陕西省中医医院, 西安 710003; 2. 陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712046; 3. 北京中医药大学临床医学院, 北京 100029)

摘要: **目的** 研究金星散 (JXS) 水提液抗人食管癌 ECA-109 细胞的作用及机制。**方法** 体外培养 ECA-109 细胞, 用 JXS 水提液刺激, 采用 CCK-8 法检测 JXS 水提液对 ECA-109 细胞活性的影响; Hoechst 染色和流式细胞术检测 JXS 水提液对 ECA-109 细胞凋亡和周期的影响; ROS/Superoxide 染色揭示 JXS 水提液对 ECA-109 细胞 ROS 和 Superoxide 水平的影响; Western blot 分析 JXS 水提液对 ECA-109 细胞抗氧化及凋亡相关蛋白表达的影响。**结果** JXS 水提液能抑制 ECA-109 细胞活性 ($3.9 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); Hoechst 染色观察到 JXS 水提液在不同时间 (6、12、24、48 h), 以不同浓度 ($31.25、62.5、125、250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激 ECA-109 细胞后, 细胞核均发生不同程度的固缩、变形和碎裂, 流式细胞术结果表明 JXS 水提液可诱导 ECA-109 细胞凋亡并将其周期阻滞在 G₂/M 期; ROS/Superoxide 结果显示 JXS 水提液刺激可引起 ROS 和 Superoxide 显著升高; Western blot 分析证明 JXS 水提液可降低 Caspase-3 表达, 升高 Cleaved-Caspase-3 水平, 并明显下调 Nrf2 蛋白的表达。**结论** JXS 水提液能诱导 ECA-109 细胞凋亡和氧化应激。

关键词: 金星散; 食管癌; 凋亡; 氧化应激; Caspase-3

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0100-07

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.015

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目 (No.2016ZDJC-18)。

作者简介: 李博, 男, 主管药师, 主要从事中药基础物质及循证医学研究, email: sxzy1b@qq.com * **通信作者:** 刘军锋, 男, 主任药师, 主要从事中药炮制及中药药剂研究, email: sxzyyljif@126.com; 张珍, 女, 讲师, 主要从事中药药理作用机制研究, email: zhzh626@outlook.com

Aqueous extract of Jinxing powder induces the apoptosis and oxidative stress in ECA-109 cells

LI Bo¹, LEI Kun¹, LIU Jia-yi³, LIU Jun-feng^{1*}, ZHANG Zhen^{2*} (*Shaanxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003; 2. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang Shaanxi 712046; 3. College of Clinical Medical, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029*)

Abstract: Objective To determine the effect of Jinxing powder aqueous extract on human esophageal cancer ECA-109 cells and related mechanism. **Methods** ECA-109 cells were cultured in vitro and stimulated by Jinxing powder aqueous extract. CCK-8 assay was used to detect the effect of Jinxing powder aqueous extract on ECA-109 cell viability. Hoechst staining and flow cytometry were used to check the effect of Jinxing powder aqueous extract on ECA-109 cell apoptosis and cell cycle. The ROS/Superoxide assay was used to uncover the effect of Jinxing powder aqueous extract on ECA-109 cell ROS and Superoxide level. Western blot was utilized to examine the impact of Jinxing powder aqueous extract on the oxidative resistance and expression of apoptosis-related proteins in ECA-109 cells. **Results** Jinxing powder aqueous extract inhibited the viability of ECA-109 cells at 3.9 ~ 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Hoechst staining revealed that the nucleus underwent various degrees of contractions, deformation, and fragmentation after ECA-109 cells were stimulated with Jinxing powder aqueous extract for different time (6, 12, 24, and 48 h) and concentrations (31.25, 62.5, 125, and 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Jinxing powder aqueous extract induced the apoptosis of ECA-109 cells and arrested their cell cycles at G₂/M phase, as confirmed by flow cytometry. The ROS and Superoxide levels were significantly increased, as indicated by ROS/Superoxide assay. Caspase-3 was downregulated and Cleaved-Caspase-3 was upregulated by Jinxing powder aqueous extract, while Nrf2 expression was noticeably decreased, as demonstrated by Western blot analysis. **Conclusion** Jinxing powder aqueous extract can induce ECA-109 cell apoptosis and oxidative stress.

Key words: Jinxing powder; esophageal cancer; apoptosis, oxidative stress; Caspase-3

食管癌 (esophageal cancer, EC) 是消化系统常见的恶性肿瘤, 主要类型为食管鳞状细胞癌和食管腺癌。据统计, 2020 年全世界有超过 54 万人死于食管癌。食管癌发病隐匿, 大多数患者发现时已处于中晚期, 然而治疗效果相对有限, 5 年生存率仅 20%^[1-2]。因此, 亟需寻找有效治疗食管癌的药物。

金星散方源于著名中医肿瘤专家贾堃的效验方, 由郁金 20 g、白矾 20 g、火硝 20 g、重楼 20 g、蟾酥 3 g、红礞砂 6 g、鸡子壳 30 g、料姜石 30 g、天南星 30 g 组成, 可攻坚破积、利气止痛、养血健胃、强心滋补、扶正祛邪, 增强机体抗病能力, 使肿瘤细胞退变、体积缩小以至消失^[3-5]。但其是否具有抗食管癌的作用, 并不清楚。本研究应用人食管癌 ECA-109 细胞, 探究金星散水提液抗人食管癌的作用及其机制。

1 材料

1.1 细胞

人食管癌 ECA-109 细胞 (广州吉妮欧生物科技有限公司)。

1.2 试剂

CCK-8 检测试剂盒 (货号: BS350A, 兰杰柯科技有限公司); Hoechst 33342 染料 (货号: C1028)、流式细胞术凋亡检测试剂盒 (货号: C1062M) (碧云天生物公司); 流式细胞术周期试剂盒 (货号: WLA010a, 万类生物科技有限公司); ROS/Superoxide 检测试剂盒 (货号: ENZ-51010, 美国 Enzo Life Sciences 公司); Caspase-3 (货号: 9662, 美国 Cell Signaling Technology 公司); Nrf2 (货号: ab137550, Abcam 公司); 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗 (HRP 标记, 武汉三鹰生物技术有限公司); 金星散全部药材由陕西省中医医院药房提供。

1.3 仪器

SW CJ-2FD 型超净工作台 (江苏苏净集团有限公司); IX73 倒置荧光显微镜 (日本奥林巴斯); 311 型细胞培养箱、Thermo Multiskan GO 多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Western blot 曝光仪器 Chemi Doc XRS + (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

ECA-109 细胞置于含 10% 血清的 1640 培养基中 (含双抗), 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内常规培养。

2.2 金星散水提液 (简称 JXS 水提液) 的制备

金星散根据贾堃原方配比由陕西省中医医院药房提供, 经张红研究员鉴定符合要求。煎药前先预泡 10 min, 加水煎煮 2 次, 每次武火烧开, 文火微沸 40 min, 合并煎液、滤过、浓缩、冷冻干燥, 获得干药粉末 50.92 g (1 g 粉末相当于 4.1 g 药材)。称取 10 g 干药粉末到 41 mL 纯化水中, 热溶解后离心取上清液, 0.45 μm 水性膜过滤, 即得 1 g · mL⁻¹ JXS 水提液。

2.3 CCK-8 测定 ECA-109 细胞活性

取对数生长期 ECA-109 细胞, 2 × 10⁴/孔 (含 1% 血清的 1640 培养基) 接种于 96 孔板内, 24 h 后换液加药, 以不同剂量 (0.49 ~ 1000 μg · mL⁻¹) 或在不同时间 (6 ~ 48 h) 刺激结束时, 加 10 μL/孔 CCK-8 检测液, 显色后应用多功能酶标仪在 450 nm 处测定 OD, 并进行统计分析^[6]。

2.4 Hoechst 染色

种细胞条件同“2.3”项下, 换液加药, 以不同剂量 (31.25 ~ 250 μg · mL⁻¹) 或在不同时间 (6 ~ 48 h) 刺激结束后, 每孔加入 Hoechst 33342 染色液 (×1000) 10 μL, 避光 37 °C 10 min, 荧光显微镜下观察并拍照^[7]。

2.5 流式细胞术对 ECA-109 细胞凋亡和周期的检测

取对数生长期 ECA-109 细胞, 2 × 10⁶/孔 (含 1% 血清的 1640 培养基) 接种于 6 孔板内, 24 h 后换液加药, 不同浓度 JXS 水提液刺激 48 h 后, 每两孔施以相同刺激 (保证细胞数量), 收集细胞上清液到离心管中, 消化贴壁细胞后同样收集细胞混悬液, 合并细胞上清液并离心, 弃上清液, 按照凋亡检测试剂盒说明书规定, 加入 FITC 和 PI 染料并混匀, 室温避光, 反应 20 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况^[8]。

种细胞条件同上, 不同浓度 JXS 水提液刺激 24 h 后, 收集悬浮和贴壁细胞, 按照周期检测试

剂盒说明书规定, 预冷 PBS 洗 1 次, 70% 乙醇固定, 4 °C 过夜, 染色前预冷 PBS 洗去固定液, 加入 100 μL RNase A, 37 °C 30 min, 再加入 500 μL PI 染色液并充分混匀, 4 °C 避光放置 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期变化^[9]。

2.6 ROS/Superoxide 染色

种细胞条件同“2.3”项下, 加药刺激结束后, 按照试剂盒说明书操作, 加入 ROS 和 Superoxide 检测试剂孵育 30 min, Hank's 液 200 μL 每孔洗 2 次, 最终每孔加 100 μL Hank's 液, 在荧光显微镜下观察并拍照 (绿色染色代表 ROS, 橙色或红色染色代表 Superoxide)。采用荧光酶标仪检测 ROS (490/525 nm) 和 Superoxide (550/620 nm) 水平, 统计并分析^[10]。

2.7 Western blot 分析

取对数生长期 ECA-109 细胞, 2 × 10⁵/孔 (含 1% 血清的 1640 培养基) 接种于 12 孔板内, 换液加药, 细胞刺激结束后采用强 RIPA (含蛋白酶和磷酸酶抑制) 提取蛋白, 高速离心 10 min, 取上清液, 蛋白定量并调平。经 10% SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭, 一抗 4 °C 过夜, 二抗室温孵育 1 h, ECL 发光试剂显影, 凝胶成像系统拍照。采用 Image J 软件对条带进行定量分析^[11-13]。

3 结果

3.1 JXS 水提液抑制 ECA-109 细胞活性

CCK-8 检测结果显示, 不同浓度 JXS 水提液刺激 ECA-109 细胞 48 h 后, 从 3.9 μg · mL⁻¹ 开始均表现出抑制 ECA-109 细胞的活性, 31.25 ~ 1000 μg · mL⁻¹ 抑制率分别为 43.52%、56.14%、75.05%、75.46%、74.86% 和 74.71% (见图 1A) ($P < 0.01$), 125 μg · mL⁻¹ 抑制率为 75.05%, 是最有效的浓度, 因此, 选择 125 μg · mL⁻¹ 分析其时间依赖性; JXS 水提液 125 μg · mL⁻¹ 刺激 ECA-109 细胞不同时间, 结果显示从 12 h 开始表现出抑制细胞的活性 ($P < 0.05$), 24 h 和 48 h 抑制率分别为 30.61%、70.21% (见图 1B) ($P < 0.01$), 表明 JXS 水提液显著抑制 ECA-109 细胞活性且呈剂量和时间依赖性。

3.2 JXS 水提液诱导 ECA-109 细胞凋亡

显微镜下观察 250 μg · mL⁻¹ JXS 水提液刺激 ECA-109 细胞不同时间后的形态学变化, 与对照组相比较, JXS 水提液刺激后的细胞体积缩小并变圆, 细胞间连接消失, 与周围的细胞脱离, 随着时间的延长该特征细胞逐渐增加, 到 48 h 基本全部发生变化 (见图 2A)。Hoechst 染色结果显示, JXS 水提液 250 μg · mL⁻¹ 刺激 ECA-109 细

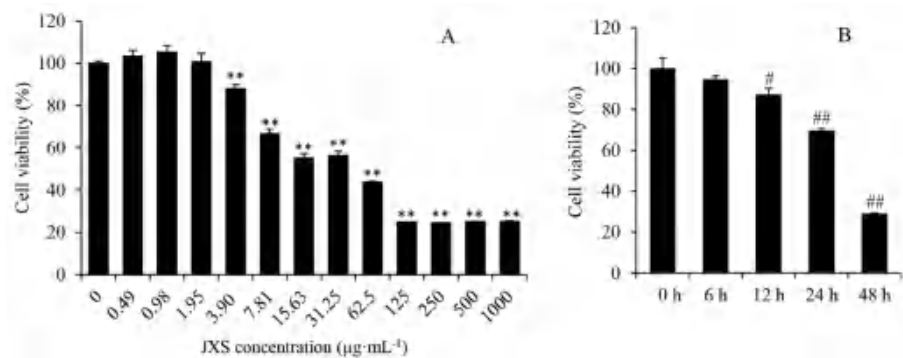


图 1 JXS 水提液对 ECA-109 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig 1 Effect of JXS aqueous extract on the ECA-109 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注 (Note): 与 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $**P < 0.01$; 与 0 h 组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ (Compared with the $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, $**P < 0.01$; compared with the 0 h group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$)。

胞不同时间 (6、12、24、48 h), 细胞核发生固缩、变形和碎裂, 核的形状出现月牙状或碎裂成若干块, 与对照组细胞核的均匀蓝色相比发白发亮, 随着时间的延长, 细胞核的这种变化不断加剧, 初步证明 JXS 水提液诱导 ECA-109 细胞凋亡呈时间依赖性 (见图 2B)。给予 JXS 水提液不同浓度 24 h 刺激 ECA-109 细胞后, 发现从 31.25

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 开始少量细胞核出现凋亡形态, $62.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大量增加, 125 和 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞核基本出现凋亡特征, 且数量急剧减少 (见图 2C), 推测细胞进入凋亡后期细胞核碎裂, 并发生自溶, 因此细胞核大量减少, 表明 JXS 水提液诱导 ECA-109 细胞凋亡呈剂量依赖性。

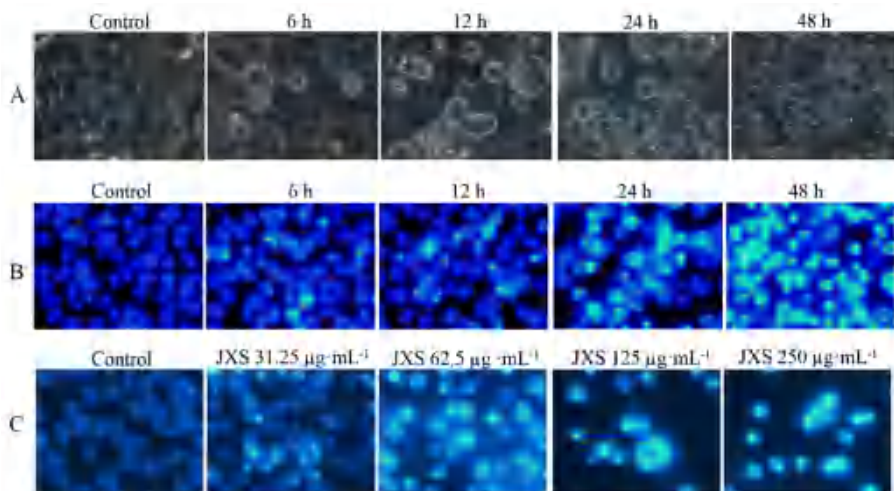


图 2 JXS 水提液对 ECA-109 细胞形态 (A) 和细胞核 Hoechst 染色 (B 和 C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, \times 400$)

Fig 2 Effect of JXS aqueous extract on the ECA-109 cell morphology (A) and nucleus Hoechst staining (B and C) ($\bar{x} \pm s, \times 400$)

流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测结果显示 JXS 水提液刺激 ECA-109 细胞 24 h 后, 不同浓度 JXS 水提液引起细胞膜内磷脂酰丝氨酸蛋白外翻染色阳性而细胞核碘化丙啶染色阴性的细胞数分别为 27.8%、30.9%、40.7%、47.5% (见图 3A), 说明 JXS 水提液随着浓度的增加, 诱导 ECA-109 细胞凋亡的数量也随之增多, 进一步证明 JXS 水提液诱导 ECA-109 细胞凋亡。Western blot 分析凋亡通路的关键蛋白, 发现 JXS 水提液刺激 ECA-109 细胞 24 h, 随着 JXS 水提液浓度的增加, Caspase-3

的表达降低 ($P < 0.01$), Cleaved-Caspase-3 蛋白水平升高 (见图 3B ~ 3D) ($P < 0.05, P < 0.01$), 说明 JXS 水提液启动 Caspase-3 介导的凋亡信号通路诱导 ECA-109 细胞凋亡。

3.3 JXS 水提液阻滞 ECA-109 细胞周期在 G_2/M 期
流式细胞术检测结果发现, 低浓度 JXS 水提液 $31.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 刺激 ECA-109 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期细胞数量大幅度减少 ($P < 0.01$), S 期细胞基本不变, G_2/M 期细胞显著增加 (见图 4A ~ 4C) ($P < 0.01$), 证明 JXS 水提液将 ECA-109 细胞周

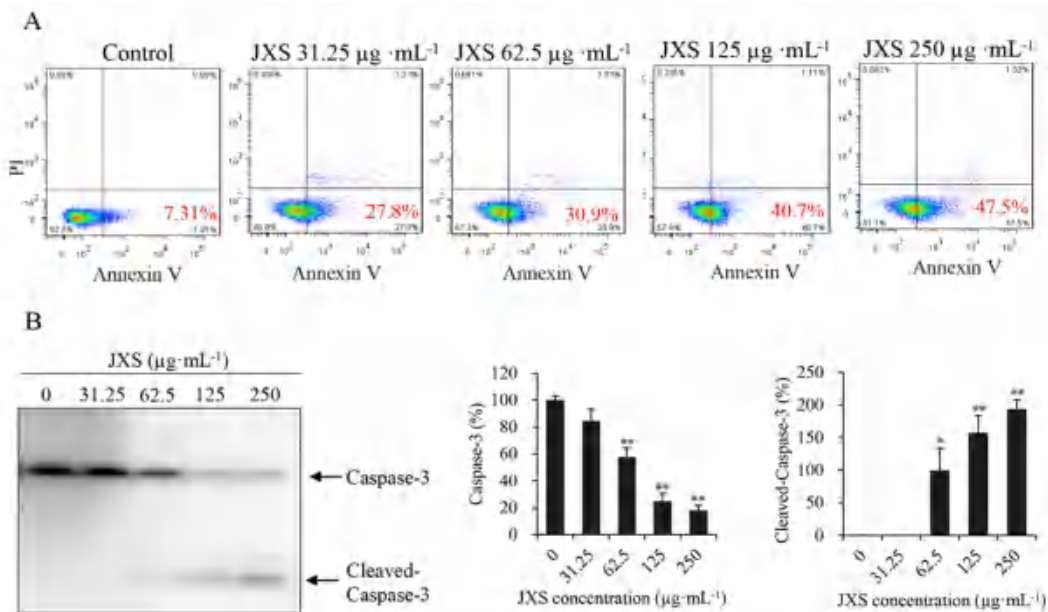


图 3 JXS 水提液对 ECA-109 细胞凋亡 (A) 及相关蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 3 Effect of JXS aqueous extract on the ECA-109 cell apoptosis (A) and related protein expression (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注 (Note): 与 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$ (Compared with the $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, $^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$).

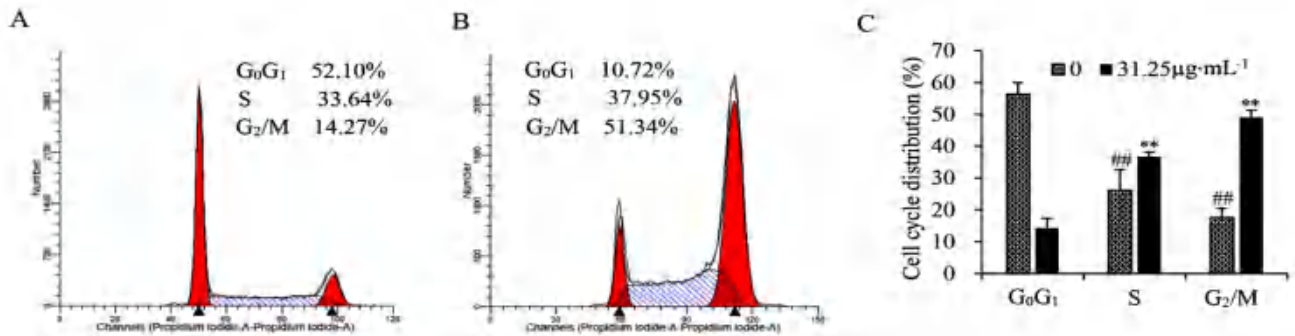


图 4 JXS 水提液对 ECA-109 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 4 Effect of JXS aqueous extract on the ECA-109 cell cycle ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注 (Note): 与 G_0 期比较, $^{##}P < 0.01$; 与 G_1 期比较, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the G_0 phase, $^{##}P < 0.01$; compared with the G_1 phase, $^{**}P < 0.01$).

期阻滞在 G_2/M 期。

3.4 JXS 水提液诱导 ECA-109 细胞 ROS/Superoxide 水平升高

ROS/Superoxide 染色结果见图 5, 由图 5 可知, JXS 水提液刺激 ECA-109 细胞 3 h 时 ROS 水平在 125 和 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 少量升高 ($P < 0.01$), 6 h 时在 62.5、125 和 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 均显著升高 ($P < 0.01$), 绿色 ROS 阳性染色也得出一致的结果; Superoxide 检测发现, JXS 水提液刺激 ECA-109 细胞 3 h 时, Superoxide 水平基本无差异, 6 h 时在 62.5、125 和 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 均显著升高 ($P < 0.01$)。提示 ROS 水平从 3 h 时触发, 到 6 h 时大量升高, Superoxide 水平在 6 h 显著升高。综上表明, JXS 水提液刺激 ECA-109 细胞 6 h 后诱发氧化应激。

3.5 JXS 水提液降低 Nrf2 蛋白的表达

Western blot 蛋白分析结果显示, 不同浓度 JXS 水提液刺激 ECA-109 6 h 后 Nrf2 的表达逐渐降低 (见图 6, $P < 0.05, P < 0.01$), 而 Nrf2 是细胞抗氧化系统的关键蛋白, 降低 Nrf2 水平会削弱细胞的抗氧化能力, 提示 JXS 水提液可能是通过降低 Nrf2 蛋白的表达诱导氧化应激。

4 讨论

本研究初步揭示了金星散抗食管癌的作用及机制, 发现 JXS 水提液可诱导 ECA-109 细胞凋亡, 且呈时间和剂量依赖性, 并将细胞周期阻滞在 G_2/M 期; JXS 水提液诱导 ECA-109 细胞氧化应激继而下调 Nrf2 蛋白的表达。其抗食管癌 ECA-109 细胞的作用, 与下调 Nrf2 诱导氧化应激有关。

细胞凋亡通常不会引发宿主炎症或免疫反应,

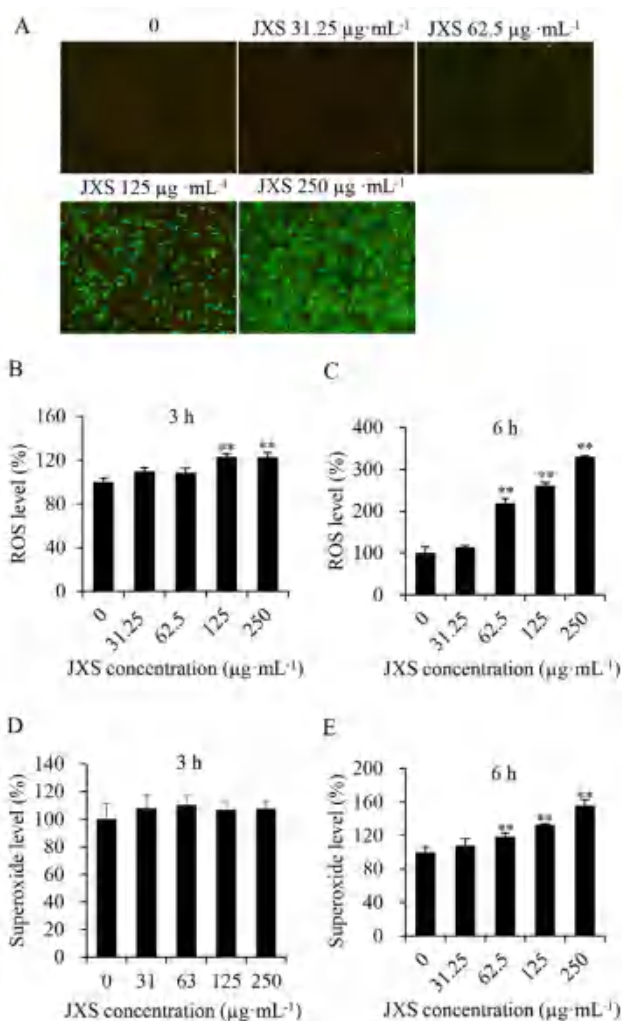


图 5 JXS 水提液对 ECA-109 细胞 ROS/Superoxide 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$, $\times 100$)

Fig 5 Effect of JXS aqueous extract on the ROS/Superoxide level in ECA-109 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$, $\times 100$)

注 (Note): 与 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $^*P < 0.01$ (Compared with the $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, $^*P < 0.01$).

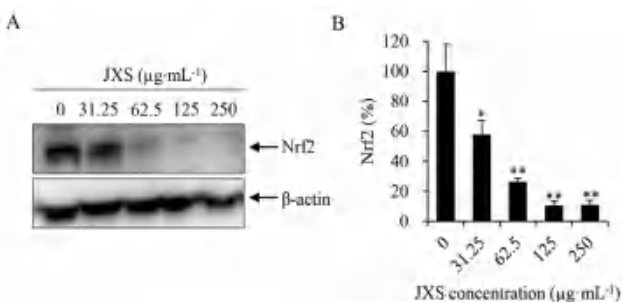


图 6 JXS 水提液对 ECA-109 细胞 Nrf2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig 6 Effect of JXS aqueous extract on the Nrf2 protein expression in ECA-109 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

注 (Note): 与 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$).

因此, 选择性诱导肿瘤细胞凋亡是潜在的治疗方法^[10, 14-16]。Caspase 家族蛋白在凋亡信号通路中

起到关键的作用, 起始 Caspases 蛋白 (Caspase-8、Caspase-9 及 Caspase-10) 触发凋亡程序, 效应 Caspases (Caspase-3、Caspase-6 及 Caspase-7) 引起凋亡发生^[17-18]。Caspase-3 活化是细胞凋亡的重要标志之一, Caspase-3 被切割活化后成为 Cleaved-Caspase-3, 两者此消彼长^[19-20]。本研究发现 JXS 水提液引起 Caspase-3 水平下降, Cleaved-Caspase-3 水平升高; Hoechst 染色表明 JXS 水提液刺激后细胞核发生皱缩和碎裂, 体现出凋亡的细胞核典型特征, 流式细胞术进一步验证了 JXS 水提液抗人食管癌 ECA-109 细胞的作用。然而, 金星散在体内是否具有抗食管癌或其他肿瘤的作用, 需要进一步的研究来揭示。

细胞周期是指细胞从第一次分裂结束产生新细胞到第二次分裂结束所经历的全过程^[21]。肿瘤发生时, 肿瘤细胞周期失调并无限增殖, 阻滞细胞周期是抗肿瘤治疗的有效手段之一^[22]。本研究发现, 只有低质量浓度 $31.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ JXS 水提液将 ECA-109 细胞阻滞在 G₂/M 期, $62.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ G₂/M 期阻滞作用较低, 而 125 和 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与对照细胞的周期状态基本一致 (数据未显示)。可见, JXS 水提液在低浓度时可一定程度地阻滞 ECA-109 细胞的周期, 当浓度增大时 JXS 水提液较大程度地抑制或者直接阻遏了细胞的增殖。

Nrf2 作为调控抗氧化应激的一种关键转录因子, 在诱导机体的抗氧化应答中起着重要作用^[23]。正常情况下, 氧化应激发生时, Keap1 发生构象变化而失活, 解离的 Nrf2 聚集在细胞核中, 激活下游的抗氧化酶, 发挥抗氧化作用^[24-27]。在肿瘤细胞中, Nrf2 通过促进细胞代谢的重新编程加速肿瘤细胞增殖, 有助于肿瘤的恶性表现, 减少 Nrf2 激活将有助于肿瘤的治疗^[28]。研究发现 JXS 水提液在加药刺激 6 h 后引起 ECA-109 细胞 ROS/Superoxide 水平显著升高, Nrf2 的表达水平显著降低, 提示 JXS 水提液通过下调 Nrf2, 降低 ECA-109 细胞的抗氧化能力, 这可能是其触发氧化应激诱导 ECA-109 细胞凋亡的原因。

综上, 金星散具有抗人食管癌细胞的作用, 推测其机制与下调 Nrf2 诱导氧化应激有关。

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] 杨雄涛, 王鑫. 食管癌综合治疗新进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2023, 50 (2): 98-103.
- [3] 贾堃. 癌瘤中医治疗研究 [J]. 实用中医内科杂志, 1987 (3): 100-101.
- [4] 黄永明. 扶正固本法对骨肉瘤化疗免疫功能影响的临床及实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [5] 何仁荣. 恶性骨肿瘤的证候调查及益气活血化痰法干预荷瘤小鼠的实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2007.
- [6] 李艺文, 唐志书, 张珍, 等. 异鼠李素抗 UUO 大鼠肾脏纤维化作用及机制 [J]. 中成药, 2021, 43 (11): 3172-3177.
- [7] Zhang Z, Fang X, Yang XW, et al. Hydrogen sulfide donor NaHS alters antibody structure and function via sulfhydration [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 491-501.
- [8] 耿锰行, 孙玉信. 姜黄素调控 miR-551b-3p 对食管癌 EC9706 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43 (2): 456-461.
- [9] 刘冲, 熊飞, 张倬, 等. 虫草素抑制食管癌细胞 Eca-109 增殖、迁移和侵袭的作用及机制研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30 (24): 4432-4437.
- [10] Borchers A, Pieler T. Programming pluripotent precursor cells derived from xenopus embryos to generate specific tissues and organs [J]. Genes (Basel), 2010, 1 (3): 413-26.
- [11] Jiang R, Sui Y, Hong JR, et al. The combined administration of vitamin C and copper induces a systemic oxidative stress and kidney injury [J]. Biomolecules, 2023, 13 (1): 143.
- [12] Sui Y, Jiang R, Niimi M, et al. Development of dietary thiol antioxidant via reductive modification of whey protein and its application in the treatment of ischemic kidney injury [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12 (1): 193.
- [13] Yang XW, Mao ZM, Huang YR, et al. Reductively modified albumin attenuates DSS-induced mouse colitis through rebalancing systemic redox state [J]. Redox Biol, 2021, 41: 1-14.
- [14] Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18 (5): 1106-1121.
- [15] Carneiro BA, Ei-deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17 (7): 395-417.
- [16] Peng F, Liao MR, Qin R, et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 286.
- [17] Green DR. Caspase activation and inhibition [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2022, 14 (8): 1-15.
- [18] Xu TT, Ma QS, Li YN, et al. A small molecule inhibitor of the UBE2F-CRL5 axis induces apoptosis and radiosensitization in lung cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 354.
- [19] Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis [J]. J Cell Biol, 2022, 221 (6): 1-13.
- [20] Shi YG. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis [J]. Mol Cell, 2002, 9 (3): 459-470.
- [21] Sun Y, Liu Y, Ma XL, et al. The influence of cell cycle regulation on chemotherapy [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (13): 6923.
- [22] Li SY, Wang LL, Wang YY, et al. The synthetic lethality of targeting cell cycle checkpoints and PARPs in cancer treatment [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15 (1): 147.
- [23] He F, Antonucci L, Karin M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer [J]. Carcinogenesis, 2020, 41 (4): 405-416.
- [24] Baird L, Yamamoto M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway [J]. Mol Cell Biol, 2020, 40 (13): 1-56.
- [25] Kopacz A, Kloska D, Forman HJ, et al. Beyond repression of Nrf2: an update on Keap1 [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 157: 63-74.
- [26] Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: towards specific regulation [J]. Life Sci, 2022, 291: 1-13.
- [27] Zuo CC, Cao H, Song Y, et al. Nrf2: an all-rounder in depression [J]. Redox Biol, 2022, 58: 1-13.
- [28] Adinolfi S, Patinen T, Deen AJ, et al. The KEAP1-NRF2 pathway: targets for therapy and role in cancer [J]. Redox Biol, 2023, 63: 1-10.

(收稿日期: 2023-09-14; 修回日期: 2023-11-06)

脂多糖对气道上皮细胞损伤后炎症因子的影响

支文冰¹, 姜盛楠¹, 孙婷婷¹, 王春柳¹, 宗时宇¹, 陈静², 李晔¹, 刘洋^{1*}, 张红^{1*} (1. 陕西省中医药研究院 (陕西省中医医院), 西安 710061; 2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712446)

摘要: **目的** 探讨脂多糖 (LPS) 对气道上皮细胞 (BEAS-2B) 损伤后炎症细胞因子分泌的调控作用。 **方法** 采用 LPS 诱导 BEAS-2B 发生炎症损伤, 于刺激后 3、6、12 和 24 h 收集细胞上清液, ELISA 法测定细胞上清液中 IL-8、IL-6、IL-17、IL-1 β 、胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP)、IL-13、IL-33 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 水平, 硝酸还原法检测细胞上清液中 NO 水平。 **结果** 与正常组相比, LPS 可促进 BEAS-2B 细胞中 IL-8、IL-6、IL-17 和 MCP-1 分泌, 且诱导 3、6、12 和 24 h 时均能使 IL-8、IL-6、IL-17 和 MCP-1 因子水平显著增加, 但不同因子分泌达峰时间不一致; 此外, LPS 对 BEAS-2B 细胞 IL-1 β 、TSLP、IL-13、IL-33 和 NO 分泌无显著刺激作用。 **结论** LPS 刺激的 BEAS-2B 细胞损伤模型适用于 IL-8、IL-6、IL-17 和 MCP-1 因子调节相关的机制研究。

关键词: 脂多糖; 哮喘; 气道上皮细胞; 炎症因子

中图分类号: R562

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0107-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.016

Changes in inflammatory factors in a model of lipopolysaccharide-induced airway epithelial cell injury

ZHI Wen-bing¹, JIANG Sheng-nan¹, SUN Ting-ting¹, WANG Chun-liu¹, ZONG Shi-yu¹, CHEN Jing², LI Ye¹, LIU Yang^{1*}, ZHANG Hong^{1*} (1. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine (Shaanxi Traditional Chinese Medicine Hospital), Xi'an 710061; 2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712446)

Abstract: Objective To determine the regulatory effect of lipopolysaccharide (LPS) on the secretion of inflammatory cytokines after epithelial cell (BEAS-2B) injury in the airway. **Methods** LPS was used to induce inflammatory injury in BEAS-2B. Cell supernatants were collected at 3 h, 6 h, 12 h and 24 h after the stimulation, and the levels of IL-8, IL-6, IL-17, IL-1 β , TSLP, IL-13, IL-33 and MCP-1 in the cell supernatants were measured by ELISA, and NO levels in cell supernatants were detected via nitrate reduction. **Results** LPS promoted the secretion of IL-8, IL-6, IL-17 and MCP-1 in BEAS-2B cells, and all the induction time (3, 6, 12, and 24 h) greatly increased the levels of IL-8, IL-6, IL-17 and MCP-1 factors, but the peak secretion time of different factors was not consistent. In addition, LPS did not significantly stimulate the secretion of IL-1 β , TSLP, IL-13, IL-33 and NO in BEAS-2B cells. **Conclusion** The LPS-stimulated BEAS-2B cell injury model is suitable in the mechanism study on the regulation of IL-8, IL-6, IL-17 and MCP-1 factors.

Key words: lipopolysaccharide; asthma; airway epithelial cell; inflammatory factor

基金项目: 陕西省重点研发计划 (No.2021ZDLSF04-06; No.2022ZDXM-SF-06); 陕西省自然科学基金基础研究计划 (No. 2023-JC-QN-0820); 陕西省“秦药”研发重点实验室 (No.2021-QYPT-001); 秦创园中医药创新研发转化项目 (No. 2022-QCYZH-006); 陕西省中医医院苗圃培优计划 (No.2021-13)。

作者简介: 支文冰, 女, 助理研究员, 主要从事中药免疫-炎症调控活性成分研究, zhiwenbing@163.com *通信作者: 张红, 女, 研究员, 主要从事陕产特色药材及制剂转化研究, zhanghong919919@163.com; 刘洋, 女, 副研究员, 主要从事陕产大宗药材的开发与利用研究, liuyang311111@163.com

支气管哮喘简称哮喘,是由多种免疫细胞和细胞组分参与的以气道慢性炎症为特征异质性疾病,临床表现咳嗽、呼吸短促、胸闷和呼吸困难等^[1]。2022年《全球哮喘防治倡议》GINA提出世界哮喘日的主题为“消除差距,实现哮喘的同质管理”,流行病学调研发现全球哮喘病患者已达3亿人,其中我国的哮喘病患者约有4570万^[2]。哮喘历经气道上皮损伤、黏液高分泌、气道炎症浸润和气道平滑肌增生等病理进程,但哮喘作为一种多因素诱导的复杂性疾病,其发病机制目前尚未阐明^[3]。

气道上皮细胞作为呼吸道的第一屏障,可视为哮喘病理改变的起点。过敏原和PM_{2.5}等环境因子作用于气道上皮,气道上皮细胞在外界因子刺激下均可发生炎性病变,释放多种炎性因子,包括白细胞介素(IL)-13(IL-13)、IL-33和胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)等,大量的炎性因子累积加速了气道上皮细胞凋亡,打破了气道上皮屏障的完整性^[4-5]。通过文献检索发现,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为气道上皮细胞损伤的刺激剂,可诱导气道上皮细胞发生炎症、自噬和凋亡等,进而构建多种体外细胞模型,模拟哮喘发病过程中的上皮损伤,揭示上皮损伤机制及药物作用机制^[6-7]。但LPS作用于气道后,细胞因子的种类和水平如何变化,目前尚未有系统研究。此外,在文献检索过程中我们发现,LPS诱导的气道上皮细胞模型评估相对匮乏,且诱导时间不固定。因此,综合时间效应和LPS刺激后的多种因子效应,本课题进行了系统研究,以期揭示上皮细胞受损后细胞因子水平的改变及哮喘机制研究提供更多的数据支撑。

1 材料

1.1 细胞

人气道上皮细胞(BEAS-2B, ACTT中国细胞资源库)。

1.2 试剂与仪器

LPS(纯度≥98%,货号551064, Sigma生物试剂公司); IL-1β、IL-8、IL-6、TSLP、IL-13、IL-33、IL-17和单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)ELISA试剂盒(伊莱瑞特生物试剂有限公司);一氧化氮(NO)检测试剂盒(普利莱生物试剂有限公司)。

2 方法与结果

将细胞以1×10⁵个/孔接种于24孔板中,细胞贴壁后将孔板分为8组,每组设置3个复孔,分为不同时间的空白组和LPS刺激组;吸弃24

孔板培养上清液,空白组加入500 μL无血清培养基,LPS组加入500 μL LPS刺激剂(终质量浓度为10 μg·mL⁻¹),于刺激后3、6、12和24 h分别收集细胞上清液。严格按照实验操作说明书,进行样品和标准品孵育、漂洗;生物化抗体孵育、漂洗;HRP酶孵育,漂洗和显色处理,于450 nm处采用全波长酶标仪检测每个孔的OD值,根据标准曲线计算样本的浓度。采用硝酸还原酶法测定细胞上清中NO的水平,按照试剂盒说明书配制标准品溶液,加入样品、标准品,而实验各孔加入Griess试剂,室温避光孵育5 min,于540 nm处测定OD值,建立标准曲线,根据标准曲线计算样本的浓度。

结果如图1所示,与空白组比较,LPS刺激气道上皮细胞中炎症因子IL-1β、TSLP、IL-13、IL-33和NO水平无显著差异;且LPS作用气道上皮细胞后3、6、12和24 h,细胞上清液中IL-1β、TSLP、IL-13、IL-33和NO的分泌始终与空白组相似,均维持在较低的水平。与空白组比较,LPS作用气道上皮细胞后3、6、12和24 h,气道上皮细胞中炎症因子IL-8、IL-6、IL-17和MCP-1分泌均显著增加($P < 0.01$);且LPS刺激6 h,气道上皮细胞分泌的IL-8和MCP-1水平最高。此外,随着LPS刺激时间的增加,气道上皮细胞分泌的IL-6和IL-17水平也随之增加,24 h的刺激时间下,IL-6和IL-17的分泌增加最明显。

3 讨论

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,患者可发生间断的小气道阻塞,气道上皮细胞是气道炎症反应的起点,是肺部炎症-免疫调节的第一道防线^[8]。屋尘螨、PM_{2.5}、卵清蛋白、花粉和真菌均能引起气道的炎症反应,其中LPS作为一种内毒素,常作为免疫细胞和非免疫细胞炎性病变的诱导剂,可引起气道上皮细胞损伤,诱发炎症级联反应^[9-10]。本实验采用LPS作用于人气道上皮细胞,发现LPS可促进BEAS-2B细胞中IL-8、IL-6、IL-17和MCP-1分泌,且刺激时间3、6、24 h均能使其水平显著增加;但对于IL-1β、TSLP、IL-13、IL-33和NO水平无刺激作用。

在气道上皮细胞中,LPS作为革兰氏阴性菌细胞壁中的一种成分,能够诱导宿主免疫应答并产生多种细胞因子,可通过激活细胞表面的Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4),核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB),丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)等信号通路,促进多种炎性因子

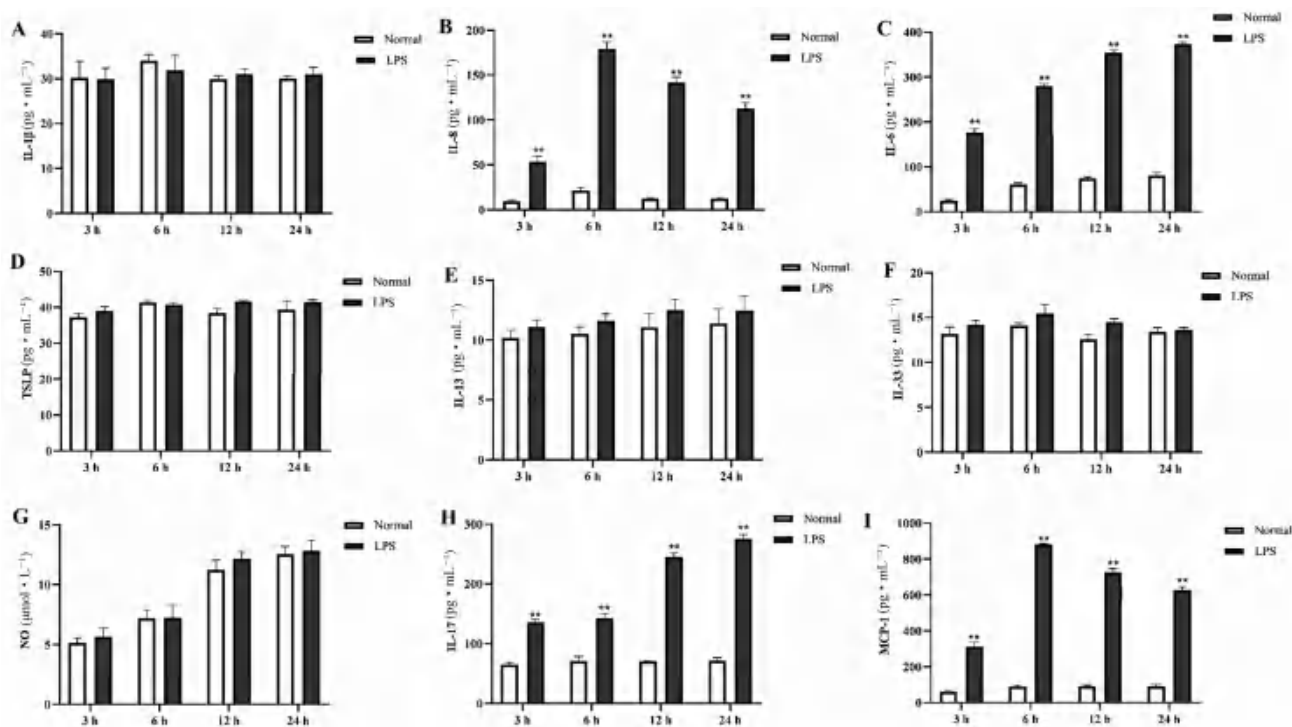


图 1 LPS 对气道上皮细胞 IL-1 β 、TSLP、IL-13、IL-33、NO、IL-8、IL-6、IL-17 和 MCP-1 分泌的影响

Fig 1 Effect of LPS on secretion of IL-1 β , TSLP, IL-13, IL-33, NO, IL-8, IL-6, IL-17 and MCP-1 by airway epithelial cells

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

的释放^[10-11]。IL-6 和 IL-8 是常见的趋化因子，具有趋化中性粒细胞、级联扩大炎症反应的作用；在哮喘患者中，中性粒细胞型哮喘占比较大，由于产生过量的细胞外支架中性粒细胞胞外诱捕网，临床较难医治^[12]。既往研究发现，C57BL/6 哮喘小鼠 BALF 中炎症介质 IL-6 和 IL-8 分泌水平升高，且气道上皮细胞可能通过旁分泌方式释放 IL-6 和 IL-8^[13]。小白菊内酯通过调节 NF- κ B 信号通路抑制气道上皮细胞中 IL-8 的分泌^[14]。本研究发现，LPS 可显著刺激 BEAS-2B 细胞中 IL-6 和 IL-8 的分泌，但 LPS 刺激达峰时间不一致；因此，在哮喘机制的研究中，可以通过 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞损伤模型探究与 IL-6 和 IL-8 相关的发病机制。

MCP-1 是趋化因子亚家族成员之一，其水平在哮喘患者外周血中升高，且与哮喘合并呼吸道感染相关^[15-16]。孟鲁司特联合复合可托或酮替芬可减轻急性发病期哮喘患者血清中 MCP-1 水平，进而发挥抗哮喘作用^[17-18]。本研究发现，LPS 显著增加了气道上皮细胞 MCP-1 的分泌，且在刺激 6 h 后达峰，提示 LPS 刺激气道上皮细胞损伤早期可释放大量 MCP-1 类趋化因子，促进血液中粒细胞及单核细胞向气道内转移，加速气道炎症反应。IL-17 与中性粒细胞性哮喘紧密相关，可

促进杯状细胞增殖、分泌黏液和气道平滑肌增生，于多个环节加速哮喘病变^[19]。以往 IL-17 与哮喘的关系研究多集中在患者血清水平、大鼠血清水平、中性粒细胞及平滑肌细胞水平，鲜少涉及气道上皮细胞，本研究发现 LPS 刺激气道上皮细胞后，IL-17 的水平不断增加，在哮喘发病进程中，气道上皮细胞也是 IL-17 分泌的重要途径。

IL-13 主要由 Th2 型细胞产生，可诱导单核细胞分化、B 细胞增殖及合成 IgE 类抗体，从而促进炎症-免疫应答^[20]。本研究发现 LPS 刺激 BEAS-2B 细胞 3、6 和 24 h，细胞上清液中 IL-13 的分泌维持在较低的水平，无显著性改变，该结果提示 BEAS-2B 细胞鲜少分泌 IL-13，但研究发现 IL-13 可诱导气道上皮细胞凋亡和黏液高分泌^[21-22]。TSLP 通过激活树突状细胞功能加快抗原传递，进而破坏 Th1 细胞和 Th2 细胞的分化平衡，调节因子 IL-5 和 IL-10 的水平。研究发现哮喘气道炎症的严重程度与 TSLP 的表达水平成正相关^[23]。本研究发现 LPS 不能刺激 BEAS-2B 分泌大量的 TSLP。高水平 NO 为气道炎症生物标志物，对于老年哮喘患者有辅助诊断价值^[24]。本研究发现，LPS 诱导的气道上皮细胞炎症损伤并不能使 NO 水平升高，针对呼出气 NO 较高的哮喘患者，在药物筛选和发病机制研究时，LPS 刺激的 BEAS-2B

损伤模型可能不能作为细胞研究模型。

IL-1 β 和IL-33同属IL-1亚族,均属于促炎性细胞因子^[25];IL-1 β 主要在炎性损伤中由单核细胞和巨噬细胞产生,少部分可通过上皮细胞分泌^[26];IL-33是一种“双功能细胞因子”,主要由屏障组织的上皮细胞或内皮细胞及免疫细胞分泌,可有效驱动Th2细胞产生IL-4、IL-5和IL-13,刺激巨噬细胞的M2极化,加速粒细胞和肥大细胞募集,诱发过敏性哮喘^[27]。研究发现,哮喘患者和哮喘小鼠血清中IL-33和IL-1 β 水平显著升高^[28],但本研究发现LPS作用于气道上皮细胞BEAS-2B不同的时间均不能引起细胞上清液中IL-33和IL-1 β 水平增加,该研究结果说明针对LPS刺激的气道上皮细胞损伤模型可能不适用于IL-33和IL-1 β 分泌相关的哮喘机制研究。综上所述,LPS诱导的BEAS-2B细胞损伤模型,适用于IL-8、IL-6、IL-17和MCP-1分泌相关的调控机制研究,但对于IL-1 β 、TSLP、IL-13、IL-33和NO调节的反应性较差。

参考文献

- [1] 李怡,雷佳慧,曲紫玥,等.过敏性哮喘的研究进展[J].中国临床医生杂志,2022,50(12):1395-1398.
- [2] Reddel HK, Bacharier LB, Bateman ED, et al. Global initiative for asthma strategy 2021: executive summary and rationale for key changes[J]. Eur Respir J, 2021, 59(1): 2102730.
- [3] Ghosh S, Rihan M, Ahmed S, et al. Immunomodulatory potential of apolipoproteins and their mimetic peptides in asthma: current perspective[J]. Respir Med, 2022, 204: 107007.
- [4] Porsbjerg CM, Sverrild A, Lloyd CM, et al. Anti-alarmins in asthma: targeting the airway epithelium with next-generation biologics[J]. Eur Respir J, 2020, 56(5): 2000260.
- [5] Calvén J, Ax E, Rådinger M. The airway epithelium—a central player in asthma pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 8907.
- [6] 孙智娜,何秀琴,拉毛卓玛.miR-543靶向HDAC3调控LPS诱导的气道上皮细胞损伤[J].中国免疫学杂志,2022,38(2):165-170.
- [7] Bao C, Liu C, Liu Q, et al. Liproxstatin-1 alleviates LPS/IL-13-induced bronchial epithelial cell injury and neutrophilic asthma in mice by inhibiting ferroptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 109: 108770.
- [8] 李怡,雷佳慧,曲紫玥,等.过敏性哮喘的研究进展[J].中国临床医生杂志,2022,50(12):1395-1398.
- [9] Qian GJ, Jiang W, Zou BK, et al. LPS inactivation by a host lipase allows lung epithelial cell sensitization for allergic asthma[J]. J Exp Med, 2018, 215(9): 2397-2412.
- [10] Liu S, Li JJ, Hu LY. MiR-216a-5p alleviates LPS-induced inflammation in the human bronchial epithelial cell by inhibition of TGF- β 1 signaling via down-regulating TGFBR2[J]. Allergol Immunopath (Madr), 2021, 49(5): 64-71.
- [11] Sun JY, Huang NW, Ma W, et al. Protective effects of metformin on lipopolysaccharide-induced airway epithelial cell injury via NF- κ B signaling inhibition[J]. Mol Med Rep, 2019; 19(3): 1817-1823.
- [12] Tan YY, Zhou HQ, Lin YJ, et al. FGF2 is overexpressed in asthma and promotes airway inflammation through the FGFR/MAPK/NF- κ B pathway in airway epithelial cells[J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 7.
- [13] 王强,董年.大气颗粒物急性暴露对C57BL/6小鼠肺脏病理改变和气道上皮细胞IL-6和IL-8表达的影响[J].中国病理生理杂志,2021,37(1):128-133.
- [14] 王军,张乐,郭丽萍,等.小白菊内酯通过NF- κ B信号通路对LPS诱导的气道上皮细胞IL-8分泌水平影响的研究[J].临床和实验医学杂志,2019,18(17):1823-1827.
- [15] 张燕霞,刘燕,吕国锋,等.儿童支气管哮喘合并肺炎支原体感染外周血MCP-1和CYSLTS与Ficolin-3水平[J].中华医院感染学杂志,2021,31(21):3346-3349.
- [16] 陈国金,黄雅玲,高健,等.急性发作期哮喘患儿血清MMP-9、MCP-1和TGF- β 1水平变化及其临床意义[J].山东医药,2024,60(22):23-26.
- [17] 屈锐.孟鲁司特联合复合托对哮喘患儿血清TGF- β 1、MCP-1及SDF-1水平的影响[J].临床医学研究与实践,2017,2(31):90-91.
- [18] 王昕华,韩曙光,吕蕾,等.孟鲁司特联合酮替芬对哮喘患者血清TGF- β 1、MCP-1、SDF-1水平的影响[J].疑难病杂志,2016,15(3):260-263.
- [19] Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic[J]. Expert Rev Respir Med, 2019, 13(11): 1057-1068.
- [20] Conde E, Bertrand R, Balbino B, et al. Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2574.
- [21] 魏冲. Lyn激酶通过抑制IL-13诱导内质网应激减轻气道上皮细胞黏液高分泌[D].泸州:西南医科大学,2017.
- [22] 张丽群,张明香,刘莎,等.IL-13对气道上皮细胞凋亡的影响及其机制研究[J].免疫学杂志,2015,31(8):668-672.
- [23] Parnes JR, Molfino NA, Colice G, et al. Targeting TSLP in asthma[J]. J Asthma Allergy, 2022, 15: 749-765.
- [24] 李雪玉,许林.气道一氧化氮测定在慢性气道炎症疾病中的应用进展[J].中国医药科学,2023,13(2):67-70.
- [25] Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, et al. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity[J]. Immunity, 2019, 50(4): 778-795.
- [26] Mahmutovic PI, Menzel M, Ramu S, et al. IL-1 β mediates lung neutrophilia and IL-33 expression in a mouse model of viral-induced asthma exacerbation[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 16.
- [27] 艾洁,陈火英,刘洪波.调控IL-33的药物研究进展[J].中国免疫学杂志,2022,38(13):1645-1651.
- [28] Kato A. Group 2 innate lymphoid cells in airway diseases[J]. Chest, 2019, 156(1): 141-149.

(收稿日期:2023-05-06;修回日期:2023-06-07)

基于片段生长技术的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的设计

赵东升^{1, 2}, 程斌², 廖伟科^{1, 2*} (1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 2. 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550004)

摘要: **目的** 基于片段生长技术开发小分子 PD-L1 抑制剂。**方法** 根据已知的苯甲酰苯胺活性片段结构, 使用 FDA 碎片库进行片段生长, 然后使用分子对接和分子动力学对其进行进一步筛选, 最终通过体外实验获得活性化合物。**结果** 获得一系列包含苯甲酰苯胺片段的分子库, 其中有 8 个打分较高的分子, 分子动力学模拟表明 776191 具有最高的结合能, 体外抑制实验证明 776191 具有一定的抑制 PD-1/PD-L1 结合活性。**结论** 776191 是一种具有新型结构的 PD-1/PD-L1 抑制剂, 这一研究丰富了 PD-1/PD-L1 抑制剂的多样性, 为其开发提供了新的设计思路。

关键词: 药物设计; PD-1/PD-L1; 小分子抑制剂; 分子动力学模拟; 片段生长技术

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0111-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.017

De novo design of PD-1/PD-L1 small molecule inhibitors based on fragment growth technology

ZHAO Dong-sheng^{1, 2}, CHENG Cheng², LIAO Wei-ke^{1, 2*} (1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; 2. Guizhou Medical University Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang 550004)

Abstract: Objective To develop a variety of small molecule PD-L1 inhibitors based on fragment growth. **Methods** Based on the known structure of benzoyl aniline active fragment, the fragment growth was obtained via the FDA fragment library, and further screened with molecular docking and molecular dynamics. Finally, active compounds were obtained through the in vitro experiment. **Results** A series of molecular libraries containing benzoyl aniline fragment were obtained, including 8 highly rated molecules. Molecular dynamics simulations showed that molecule 776191 had the highest binding energy, and in vitro inhibition experiment showed that molecule 776191 had certain inhibition against PD-1/PD-L1 binding. **Conclusion** Molecule 776191 is a PD-1/PD-L1 inhibitor with a novel structure, which enriches the diversity of PD-1/PD-L1 inhibitors and provides new design ideas.

Key words: drug design; PD-1/PD-L1; small molecule inhibitor; molecular dynamics simulation; fragment growth technology

肿瘤细胞在遗传性以及表观遗传性方面与正常细胞差异显著, 能够被免疫系统有效识别并清除, 但肿瘤细胞会运用不同的方式来避开免疫系统的监视。当免疫检查点分子过度表达或功能过强时, 免疫功能将会受到抑制^[1], 从而发生“免疫逃逸”的现象, 加速肿瘤生长^[2]。阻断免疫检查点分子的信号传导成为治疗肿瘤的常用方法, 其中程序性细胞死亡受体 1 (PD-1) / 程序性细胞死亡 - 配体 1 (PD-L1) 通路是免疫检查点中最具

临床价值的靶标之一^[3]。PD-1 又叫 CD279, 是一种由 272 个氨基酸组成的跨膜蛋白^[4]。PD-L1 又叫 CD274, 是一种由 290 个氨基酸组成的跨膜蛋白^[5]。PD-1 和 PD-L1 的结合可以抑制 T 细胞的活性, 减少自身免疫反应, 防止免疫系统过度反应。在某些情况下, 肿瘤细胞会利用这种机制来逃避免疫监视, 发生免疫逃逸从而促进肿瘤的生长和扩散^[6]。随着小分子与 PD-1/PD-L1 晶体复合物的解析, 研究者们对于 PD-1/PD-L1 小分子

作者简介: 赵东升, 男, 在读硕士研究生, 主要从事计算机辅助药物设计方面的研究, email: 13514574986@163.com *通信作者: 廖伟科, 男, 博士, 副教授, 主要从事抗肿瘤药物研究, email: liaoweike2009@126.com

抑制剂的开发也迎来蓬勃的发展阶段,但是目前报道的小分子抑制剂均为联苯母核结构,且现有化合物临床试验最高阶段仍处于 I 期临床。因此,开发出结构多样性且安全有效的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂具有十分重要的意义。

药物的从头设计是一种不仅可以提出新型化学结构,并且能够满足所需靶点结构特征的方法,这一方法随着计算机辅助药物设计的发展也逐渐受到众多药物化学家们的青睐^[7]。相比虚拟筛选,药物的从头设计可以在分子片段生成的方式上寻找到特定性质的全新结构分子,在保留原有片段的基础上实现分子结构多样性^[8]。此前有报道几种包含苯甲酰苯胺骨架的新型小分子,如图 1 所示,这类分子不仅具有新颖的骨架结构,也表现出良好的体内外抑瘤活性^[9-11]。为了保持新型的苯甲酰苯胺 linker,本研究采用片段生长的从头设计方法,以苯甲酰苯胺作为初始片段,将 FDA 化合物库拆分为碎片,并在初始片段各位点迭代生长,进一步将这一包含苯甲酰苯胺的数据库作为对接筛选的对象,以期获取潜在的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂。

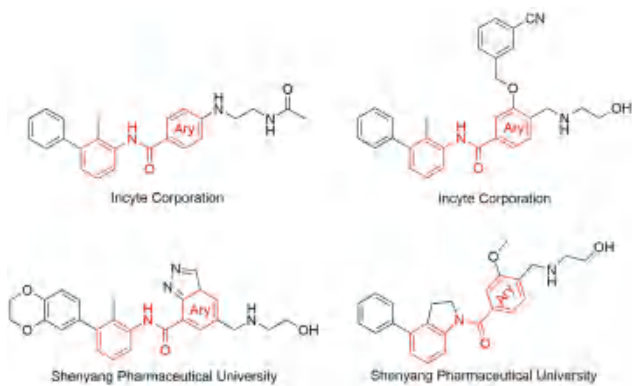


图 1 4 种苯甲酰苯胺骨架化合物

Fig 1 Four benzanilide skeleton compound

1 材料与方法

1.1 平台与软件

本研究所有计算内容均在北京并行超级计算中心平台完成。

MolAIcal 软件用于片段库的准备和片段生长^[12]; AutoDock Vina 软件用于分子对接; AutoDock Tools 软件用来重置蛋白力场及原子类型; Pymol 软件用来进行可视化结果分析^[13]; Amber16 软件用来执行分子动力学模拟; Open Babel 软件用来作为格式间转换。

1.2 数据库准备

从 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 蛋白数据库获取 PD-L1 蛋白 (PDB ID: 6r3k), 使用 AutoDock Tools 程序对其添加极性氢并合并

非极性氢,删除 A、B 两条链并删除水和溶剂分子,保存为 pdbqt 格式作为片段生长和分子对接的蛋白受体。从 FDA 官网获取 FDA 分子库,使用 Open Babel 软件将其转换为 smi 格式并打碎为片段,建立 FDA 碎片库。

1.3 片段生长

使用 AutoDock Vina 将苯甲酰胺片段对接进入 PD-L1 蛋白中,确定其初始构象,将其各含氢键的原子定义为生长位点,以 FDA 碎片库作为生长来源,生长范围设定为 $30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$,允许产生的新分子被迭代并且迭代次数为 10。在迭代过程中,合成可行性较低的分子和相对分子量低于 300、高于 1000 的分子即舍弃。产生的新分子根据打分进行排序。

1.4 分子对接筛选

将片段生长建立的分子库作为筛选的来源,PD-L1 二聚体作为受体蛋白,每个小分子生成 10 个构象,exhaustiveness 设置为 8,结合位点坐标为 $x = -7.118$, $y = 59.347$, $z = -19.516$ 。使用 AutoDock Vina 提交作业,保留打分靠前的分子。

1.5 分子动力学模拟

将分子对接的结果作为分子动力学模拟的初始构象。然后对所有备选分子施加氢原子并进行去质子化。将小分子用 Amber 软件中的 antechamber 程序施加 bcc 电荷和 gaff2 力场,并使用 parmchk 程序检查该小分子是否还需要辅助力场参数。创建一个距离蛋白质 10 \AA 的溶剂立方体盒 (cubic box),盒内填充 tip3p 水模型,向配体-受体-溶剂体系中添加 4 个钠离子以保持电中性。通过周期性边界条件 (PBC) 消除边界效应。使各种组分的能量最优化,其中蛋白质、配体和抗衡离子的限制电位受到 419 kJ/mol\AA^2 的力常数约束,水分子能级分布通过系统最小化调整以稳定其状态,同时进一步最小化系统能量,蛋白和配体均成为另一组 419 kJ/mol\AA^2 的力常数所约束。蛋白的骨架设有 83.8 kJ/mol\AA^2 的力常数限制,并且只允许侧链在进行能量最小化时放松。释放整个系统受到的限制并最大程度地降低其能量。体系能量优化之后,在 200 ps 的等温和等压条件下,从 10 K 加热到 300 K ,并在 400 ps 的平衡状态模拟过程中进行 NPT 系综:等温等压系综模拟。最后约束与氢原子相连的化学键并进行动力学模拟,模拟积分步长设定为 2 fs 。

1.6 MM/GBSA 结合自由能计算

结合自由能和每个残基的分解自由能用

Amber16 中镶嵌的 MM/GBSA.py 脚本计算。在 MM/GBSA 方法中, 配体与蛋白质受体结合形成络合物的自由能可以用以下公式表示^[14-15]:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{complex}} - \Delta G_{\text{receptor}} - \Delta G_{\text{ligand}} = \Delta E_{\text{internal}} + \Delta E_{\text{VDW}} + \Delta E_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{GB}} + \Delta G_{\text{SA}}$$

其中, ΔE_{VDW} 表示范德华相互作用, $\Delta E_{\text{internal}}$ 表示内能, ΔE_{elec} 表示静电作用, ΔG_{GB} 和 ΔG_{SA} 表示溶剂化自由能和非极性溶剂自由能。

1.7 PD-1/PD-L1 阻断实验

通过均相时间分辨荧光 (HTRF) 实验进一步测定受试化合物的 IC_{50} 值。使用 PD-1/PD-L1 试剂盒 (Cisbio 公司), 根据说明书操作: 将抑制剂在二甲基亚砜 (DMSO) 中稀释, 然后用缓冲液连续稀释到特定的浓度梯度 ($2.4 \sim 120\ 000\ \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 在 12 孔板上各加 $2\ \mu\text{L}$ 缓冲液, 再加入 $4\ \mu\text{L}$ Tag1-Pd-L1 溶液、 $4\ \mu\text{L}$ Tag2-Pd-1。在室温下孵育 15 min 后, 加入 $10\ \mu\text{L}$ 的 anti-Tag1-Eu³⁺ 和 anti-Tag2-XL665。将板密封并在室温下孵育 2 h, 用 Envision 读取测试孔的信号值^[16]。

2 结果与讨论

2.1 片段生长

本研究的工作流程如图 2 所示, 以苯甲酰胺的初始片段经过迭代后获取了 3891 个分子, 依据各分子与结合口袋的相互作用以及合成可行性保

留排名前 1000 的分子进一步作为虚拟筛选的数据库来源; 经过 AutoDock Vina 对接打分后, 保留打分最高的前 8 个分子 (结构如图 3 所示, 打分如表 1 所示), 参照结合模式最终选取 3 个分子进行分子动力学模拟并计算其 MM/GBSA 结合自由能, 最终购买一个分子进行体外活性验证。

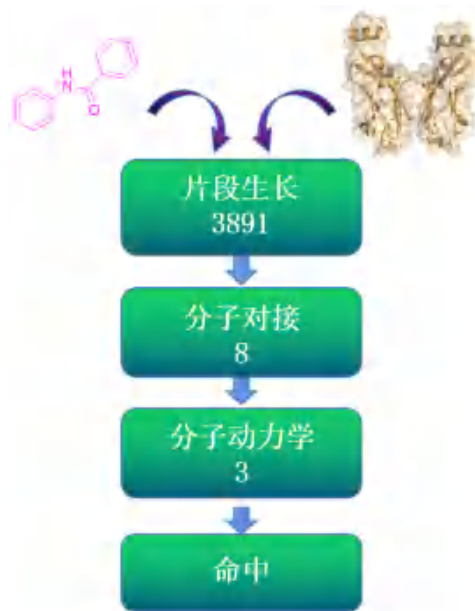


图 2 抑制剂的发现流程

Fig 2 Discovery process of inhibitors

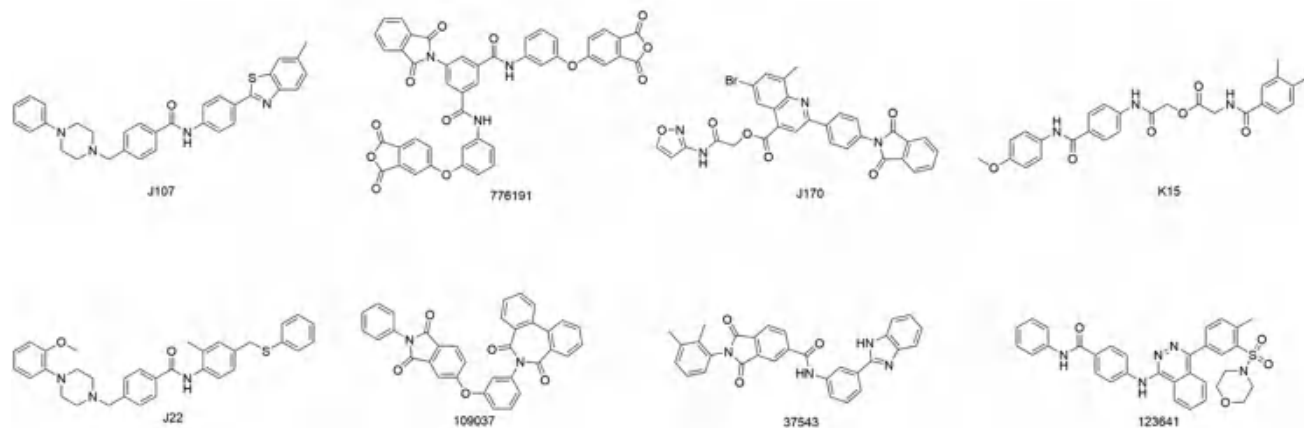


图 3 8 个候选化合物结构

Fig 3 Structure of 8 candidate compounds

表 1 8 个化合物对接打分 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Tab 1 Docking scoring of 8 compounds ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

序号	名称	对接打分	序号	名称	对接打分
1	J107	-49.324	5	J22	-48.906
2	776191	-50.996	6	109037	-49.324
3	J170	-47.652	7	37543	-48.488
4	K15	-46.816	8	123641	-46.816

2.2 结合模式分析

8 个候选分子的结合模式如图 4 所示。其中 776191、J170、123641 这 3 个具有更突出的结合模式。776191 分子表现出最高的打分结果为 $-50.996\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 并且与 PD-L1 形成非常丰富的氢键作用。可以看出, 该分子与 PD-L1 二聚体蛋白 C 链上的 66 位谷氨酰胺, 121 位丙氨酸, D 链上 125 位的精氨酸, 123 位的苏氨酸, 19 位的

苯丙氨酸, 121 位的丙氨酸, 115 位的甲硫氨酸共形成九根氢键相互作用, 这些氢键将 776191 分子绑定在 PD-L1 二聚体蛋白构成的结合口袋里, 展示了良好的结合作用。J170 分子不仅与 PD-L1 蛋白 C 链的 56 位酪氨酸形成 π - π 堆积作用, 还与 C 链的 115 位甲硫氨酸, 121 位丙氨酸, 123 位酪氨酸, D 链的 20 位酪氨酸, 54 位异亮氨酸, 56 位酪氨酸, 121 位丙氨酸, 123 位酪氨酸形成疏水作用力, 这些范德华作用驱动 J170 更倾向进入到蛋白的疏水空腔。123641 分子与 PD-L1 蛋白也拥有良好的疏水作用, 并且还与 C 链的 56 位酪氨酸, 122 位天冬氨酸, D 链的 123 位酪氨酸, 125 位精氨酸形成氢键作用, 此外 123641 还与 C 链的 56 位酪氨酸形成 π - π 堆积作用。

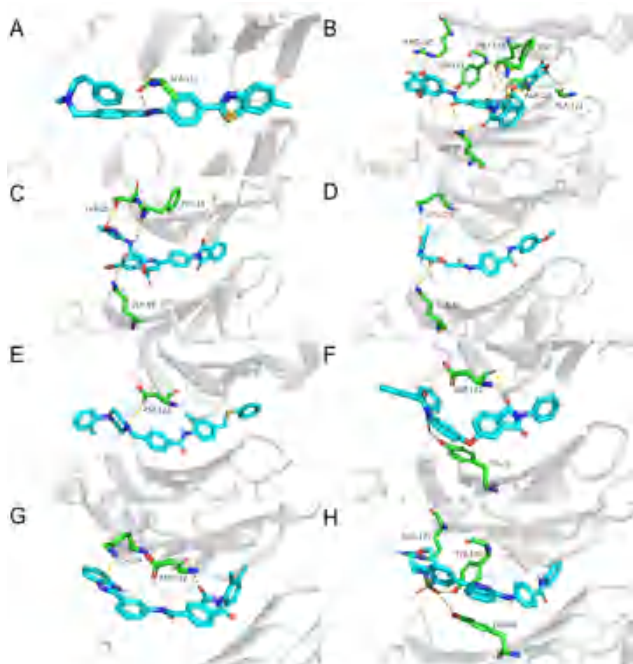


图 4 8 个分子的结合模式

Fig 4 Binding mode of 8 molecules

注: 由 A 至 H 分别表示 J107、776191、J170、K15、J22、109037、37543、123641; 绿色代表 PD-L1 蛋白; 蓝色代表小分子; 黄色虚线代表氢键。

Note: From A to H, they represent J107, 776191, J170, K15, J22, 109037, 37543, 123641, respectively. Green represents PD-L1 protein, blue represents small molecules, and yellow dashed lines represent hydrogen bonds.

2.3 结合自由能计算

为了更精确地了解 776191、J170、123641 这 3 个分子的能量表现, 本研究对其进行了 MM/GBSA 的自由能计算, 能量越低说明小分子与蛋白的复合物体系结合越强, 结果如表 2 所示。可见 776191 表现出最低的结合自由能为 $-271.831 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 其中范德华作用占据主导作用力为 $-362.720 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 此外还具有 $-123.165 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 静电作用提供的能量。在 J170 和 123641 两个分子上同样也是范德华占据主导作用, 静电作用力为次要作用, 而极性溶剂化作用则大大地阻碍了复合物的结合。这一结果证明 3 个分子均是在疏水作用驱动下与 PD-L1 蛋白发生紧密结合。

2.4 分子动力学轨迹分析

由于 776191 具有较高的结合自由能, 将其作为研究对象进行动力学轨迹分析。如图 5 所示, 绿色代表 776191 分子, 红色代表受体蛋白 PD-L1, 黑色代表 776191-PD-L1 复合物体系。可以看出, 在为期 100 ns 时长的生理环境模拟过程中, 776191 小分子表现出一定的波动, 但波动幅度维持在 3 \AA 左右, 相对于 PD-L1 受体蛋白可以看出, 小分子的加入并未引起蛋白本身发生较大的波动。鉴于 776191 分子本身的结构特征, 其包含较多的可旋转键, 不可避免地在运动过程中某些时刻发生键角的扭转。因此可以认为 776191 分子在模拟的运动过程中维持着一定的平稳性。

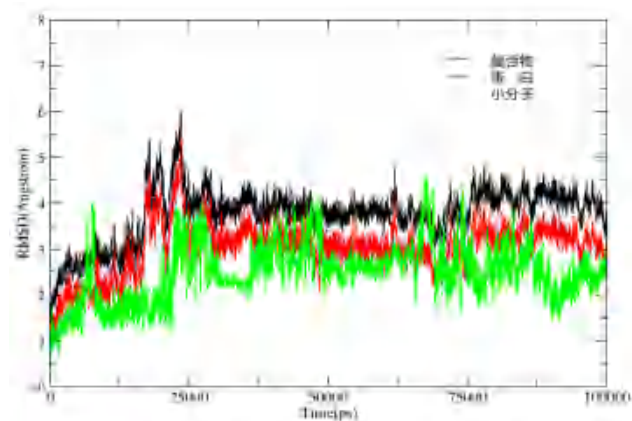


图 5 776191 的 100 ns 动力学轨迹

Fig 5 100 ns dynamic trajectory of 776191

表 2 3 个化合物的结合自由能 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Tab 2 Binding free energy of 3 compounds ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

化合物	能量类型				
	ΔE_{vdw}	ΔE_{elec}	ΔG_{sol}	ΔG_{gas}	ΔG_{bind}
776191	-362.720 ± 1.332	-123.165 ± 3.265	215.216 ± 2.183	-487.047 ± 3.494	-271.831 ± 1.899
J170	-282.930 ± 1.219	-125.665 ± 1.693	154.846 ± 1.653	-409.271 ± 2.228	-254.426 ± 1.474
123641	-294.488 ± 1.357	-67.287 ± 2.085	107.978 ± 1.455	-341.529 ± 2.657	-233.551 ± 2.522

2.5 PD-1/PD-L1 阻断实验

经过上述实验最终确定了 776191 分子是最具有潜力的 PD-L1 小分子抑制剂, 进一步通过 HTRF 实验测定其体外 PD-1/PD-L1 抑制活性, 如图 6 所示, 776191 表现出中等的抑制活性, IC_{50} 为 $92 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

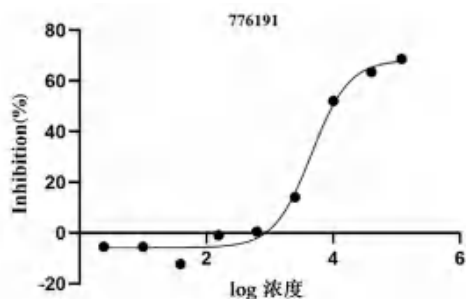


图 6 HTRF 法测定化合物 776191 的 IC_{50}

Fig 6 IC_{50} determination of compound 776191 based HTRF assay

3 讨论

PD-L1 小分子抑制剂结构多样性的缺乏始终是阻碍其临床发展的一大挑战。本项研究通过确立一个新颖的苯甲酰苯胺片段, 使用从头设计的思路和片段生长的方法最终确证 776191 分子是一个具有一定 PD-L1 抑制活性的小分子抑制剂。

776191 具有新颖的骨架结构, 然而其 IC_{50} 为 $92 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的表现并没有非常出色, 这可能是由于以下原因引起: ① 776191 分子具有较多的氢键受体和可旋转键, 这可能造成极性溶剂对其结合能表现出 $214.702 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的抑制作用; ② 776191 的溶解性存在一定的不足, 这可能是影响其活性表现的直接原因。鉴于上述两种原因, 对 776191 在结构上进一步精简优化将可能获得活性更加良好的分子, 本研究为改造安全有效的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂奠定了理论基础。

参考文献

[1] Qian W, Li J, Li SC, et al. Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (1): 1-9.

[2] Papaioannou NE, Beniata OV, Vitsos P, et al. Harnessing the immune system to improve cancer therapy [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4 (14): 261.

[3] 王思渊, 鲁辉, 杨纯. PD-1/PD-L1 类单抗药物在肿瘤治疗中的应用进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36

(1): 105-111, 118.

[4] 邵亦成, 蒋敬庭. PD-1/PD-L1 抑制剂治疗乳腺癌: 现状、问题与对策 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30 (2): 99-107.

[5] 代鹏飞, 徐慧琴. 靶向免疫检查点 PD-1/PD-L1 小分子 PET 探针的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58 (2): 337-341.

[6] 沈丽萍, 刘苓霜. 程序性死亡蛋白 1/ 程序性死亡蛋白配体 1 抑制剂在表皮生长因子受体突变晚期肺癌中的应用进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2023, 30 (1): 54-60.

[7] Congreve M, Chessari G, Tisi D, et al. Recent developments in fragment-based drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2020, 20: 2673-2682.

[8] Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW. A review of protein-small molecule docking methods [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2002, 16, 151-166.

[9] Qin MZ, Cao Q, Wu X, et al. Discovery of the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction inhibitors bearing an indoline scaffold [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 186: 111856.

[10] Wu LX, Yu ZY, Zhang FL, et al. *N*-phenyl-pyridine-2-carboxamide derivatives and their use as PD-1/PD-L1 protein/protein interaction modulators [P]. WO-2017106634-A1.

[11] Tian NN, Wu HX, Zhang HW, et al. Discovery of [1, 2, 4]triazolo[4, 3-a]pyridines as potent smoothed inhibitors targeting the hedgehog pathway with improved antitumor activity in vivo [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28 (16): 115584.

[12] Bai QF, Tan SY, Xu TY, et al. MolAICal: a soft tool for 3D drug design of protein targets by artificial intelligence and classical algorithm [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22: bbaa161.

[13] Chen L, Wang L, Gu Q, et al. An in silico protocol for identifying mTOR inhibitors from natural products [J]. *Mol Divers*, 2014, 18 (4): 841-852.

[14] Nguyen H, Roe DR, Simmerling C. Improved generalized born solvent model parameters for protein simulations [J]. *J Chem Theory Comput*, 2013, 9: 2020-2034.

[15] Rastell Gi, Rio AD, Degliesposti G, et al. Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM/GBSA [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31: 797-810.

[16] Wang Y, Huang K, Gao YL, et al. Discovery of quinazoline derivatives as novel small-molecule inhibitors targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 (PD-1/PD-L1) interaction [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 229: 113998.

(收稿日期: 2023-07-23; 修回日期: 2023-08-26)

白藜芦醇纳米结构脂质载体的制备与体外释放研究

崔欣冉, 张程皓, 唐景玲* (哈尔滨医科大学药学院, 哈尔滨 150086)

摘要: **目的** 制备白藜芦醇纳米结构脂质载体 (Res-NLCs), 并对其理化性质和体外释放特性的考察。**方法** 采用乳化蒸发-高压均质法制备 Res-NLCs, 通过正交试验得出最优处方, 并对最优处方制得的 Res-NLCs 进行理化性质考察; 通过 HPLC 建立白藜芦醇体外释放方法学, 采用动态透析法对 Res-NLCs 的体外释药特性进行考察。**结果** Res-NLCs 的最优处方为: 双硬脂酸甘油酯用量为 0.0356 g, 大豆磷脂用量为 0.3918 g, Tween-80 的质量浓度为 4.25%, 辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯用量为 0.0475 g。经透射电镜观察 Res-NLCs 呈规则圆球状, 分散均匀。测得 Res-NLCs 的平均粒径为 (81.87 ± 0.14) nm, 多分散系数为 (0.099 ± 0.02) , Zeta 电位为 (-8.09 ± 0.75) mV, 包封率为 $(98.43 \pm 0.07)\%$, 载药量为 $(11.04 \pm 0.14)\%$ 。体外释放结果显示, 白藜芦醇溶液在 8 h 释放 97.31%, 而 Res-NLCs 则缓慢持续释放, 并在 48 h 后达到释放平台, 累计释放的白藜芦醇为 80.69%。**结论** 通过乳化蒸发-高压均质法制备的 Res-NLCs 粒径小, 分散均匀, 具有较高的包封率及载药量, 并可显著延长白藜芦醇释放的时间, 具有良好的缓释效果。

关键词: 白藜芦醇; 纳米结构脂质载体; 体外释放

中图分类号: R283.6, R943 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0116-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.018

Preparation and in vitro release of resveratrol nanostructured lipid carriers

CUI Xin-ran, ZHANG Cheng-hao, TANG Jing-ling* (School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150086)

Abstract: Objective To prepare resveratrol nanostructured lipid carriers (Res-NLCs) and comprehensively assess their physical and chemical attributes, as well as in vitro release characteristics. **Methods** Res-NLCs were formulated with the emulsification evaporation-high-pressure homogenization method. An orthogonal experimental design was used to optimize the formulation. The physical and chemical properties of Res-NLCs were meticulously analyzed. An HPLC method was established to quantify the in vitro resveratrol release, while forward dynamic membrane dialysis was used to evaluate drug release kinetics. **Results** The optimal Res-NLC formulation consisted of 0.0356 g glycerol stearate, 0.3918 g soybean phospholipid, a 4.25% mass concentration of Tween-80, and 0.0475 g polyethylene glycol caproate. Transmission electron microscopy revealed that Res-NLCs were spherical and well-dispersed. Res-NLC particles had an average size of (81.87 ± 0.14) nm, a polydispersity coefficient of (0.099 ± 0.02) , and a Zeta potential of (-8.09 ± 0.75) mV. These Res-NLCs exhibited high encapsulation efficiency $(98.43 \pm 0.07)\%$ and drug loading $(11.04 \pm 0.14)\%$. In vitro release studies indicated that the resveratrol solution released 97.31% at 8 hours, while Res-NLCs released sustainably. Subsequently, Res-NLCs reached a release plateau after 48 h, with a cumulative release of 80.69%. **Conclusion** Res-NLCs prepared via emulsification evaporation-high-pressure homogenization, exhibit small and uniformly distributed particles, high encapsulation efficiency, and substantial drug loading capacity. Extension of the release duration of resveratrol, demonstrate an effective sustained release profile.

Key words: resveratrol; nanostructured lipid carrier; in vitro release

基金项目: 哈尔滨医科大学药学院杰出青年人才基金 (No.2019-JQ-03)。

作者简介: 崔欣冉, 女, 硕士研究生, 主要从事白藜芦醇相关制剂抗肺纤维化研究, email: 2633275668@qq.com *通信作者: 唐景玲, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事新型纳米药物递送系统的研究, email: yaoji636@126.com

白藜芦醇 (Res) 是一种天然多酚化合物^[1], 主要分布在药用植物和食物中, 包括虎杖、决明、花生以及葡萄等。它是植物体在逆境或遇到病原侵袭时分泌的一种天然植保素, 具有毒副作用小的特点, 同时又具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗肺纤维化^[2] 以及心血管保护等多种药理效应, 潜在的应用前景备受关注。然而, Res 难溶于水、稳定性较差且代谢迅速, 亟须寻找适宜的载体对其进行改善。

纳米结构脂质载体 (NLCs) 目前已经作为通用载体出现, 它是由固体脂质纳米粒 (SLNs) 发展而来的一种新型药物递送平台^[3-4], 通过在固体脂质中引入一定比例的液体脂质并将两者混合制备而成。液体脂质的加入能够破坏 SLNs 有序的晶体结构, 使 NLCs 增加更多空间, 并可有效防止药物的泄漏, 从而增强载药能力^[5]。相较于其他载体 (胶束、纳米乳、脂质体), NLCs 不仅具备高生物相容性、高稳定性以及高生物利用度等优势, 还能通过调控不同比例的固液脂质比形成稳定的固体骨架结构从而实现更好的药物控释^[6-8]。因此本研究将 Res 制备成纳米结构脂质载体, 旨在提高 Res 溶解度, 增加其稳定性, 提高生物利用度, 并对白藜芦醇纳米结构脂质载体 (Res-NLCs) 的体外释放进行评价, 以期 Res 的新剂型研究提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

BSA124S-CW 电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司); 1260 Infinity 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); NanoZS90 光散射粒径分析仪 (英国 Malven 公司); SZCL-4 数显智能恒温磁力搅拌器 (上海卓康生物科技有限公司); Nano 微射流均质机 (上海诺泽流体科技有限公司); 5430R 低温超速离心机 (德国 Eppendorf 公司); HZQ-C 空气浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。

1.2 试药

白藜芦醇 (含量 > 99%, 批号: B1807119, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 大豆磷脂 (LEC) (批号: SY-SO-200801, 上海艾伟拓医药科技有限公司); 吐温 80 (Tween-80) (批号: SY-SO-200801, 天津市富宇精细化工有限公司); 双硬脂酸甘油酯 (GD) (批号: H14M10Z82904, 嘉法狮上海贸易有限公司); 辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯 (Lab) (批号: F2102301, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 无水乙醇 (天津市天力化学试剂有限公司); 甲醇 (山东禹王实业有限公司);

乙腈 (天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 Res-NLCs 的制备

本实验选择毒性低, 具有良好乳化能力的 GD 和 LEC 作为固体脂质; 并对 Res 在不同液体脂质中的饱和溶解度进行测定, 选择溶解度最高的 Lab 作为液体脂质, 同时以 Tween-80 作为乳化剂, 通过乳化蒸发-高压均质法制备 Res-NLCs。称取处方量的 Res、LEC 置于 EP 管中加入 3 mL 无水乙醇超声溶解后待用, 将 GD、Lab 加热至 75 °C 溶解, 然后将脂质与药物乙醇溶液混合均一使成油相; 称取适量 Tween-80 置于烧杯中, 加入 20 mL 纯化水搅拌均匀使成水相; 将油、水两相同时加热到 75 °C 后, 使油相缓缓滴进保持搅拌的水相中后继续搅拌, 直至有机试剂挥干得初乳; 使用均质机, 对初乳均质 3 次循环 (6000 psi), 完成后冷冻固化得 Res-NLCs。

2.2 超滤离心法测定 Res-NLCs 的包封率和载药量

2.2.1 超滤离心法药物回收率 取 400 μL Res 溶液于超滤离心管内管中, 13 500 r · min⁻¹ 低温离心 30 min, 将外管中溶液采用流动相分别稀释至 16、20、24 μg · mL⁻¹, 进样分析, 计算 Res 的回收率。3 种不同浓度的 Res 回收率均在 98.48% ~ 101.68%, RSD 值均在 0.13% ~ 0.29%, 符合方法学要求。

2.2.2 Res-NLCs 的包封率及载药量的测定 采用超滤法^[9], 取定量 Res-NLCs 溶液, 置于截留分子量为 100 kD 的超滤离心管内管, 并将内外管进行组装, 放入低温超速离心机离心 30 min (13 500 r · min⁻¹, 4 °C), 取外管中分离下来的游离药物溶液进行稀释, 采用 HPLC 分析, 测得游离 Res 含量 (W_1); 同时取 Res-NLCs 溶液, 加入乙腈稀释同等倍数, 超声 15 min 进行破乳, 通过 HPLC 分析, 即得 Res 总含量 (W_2)。

按照下式计算 Res-NLCs 包封率 (EE) 及载药量 (DL): 包封率 (%) = $[(W_2 - W_1) / W_2] \times 100\%$; 载药量 (%) = $(W_3 / W_4) \times 100\%$ 。其中, W_1 代表 NLCs 未包封的药物含量, W_2 代表 Res 的总含量, W_3 代表 NLCs 中包封 Res 的总含量, W_4 代表 Res-NLCs 的总重量。

2.3 正交试验优化 Res-NLCs 的处方

基于前期单因素筛查所得结果, 选择固液脂质比 (A)、Tween-80 质量浓度 (B)、均质压力 (C)、均质次数 (D) 4 个因素, 每个因素设置 3 个水平, 以包封率作为优化指标, 设计正交试验, 优化 Res-NLCs 的处方。设计表见表 1。

表 1 正交设计因素水平

Tab 1 Factor and level of orthogonal experiment

水平	A. 固液脂质比 / (w/w)	B. Tween-80 质量浓度 / (w/V, %)	C. 均质压力 / psi	D. 均质次数
1	5 : 5	2.75	4000	20
2	7 : 3	3.50	6000	30
3	9 : 1	4.25	8000	40

每个因素对指标 (EE) 的影响程度见表 2, 由极差 (R_j) 可知因素影响大小次序为: $C > A > B > D$, 由均值大小可判断最佳处方为 $A_3B_3C_2D_2$ 。方差分析结果 (见表 3) 显示, 在以 D (均质次数) 为误差项的前提下, 因素 A (固液脂质比)、B (Tween-80 质量浓度)、C (均质压力) 对包封率具有显著性影响 ($P < 0.05$)。优化后得到的最优处方为: GD 用量为 0.0356 g, LEC 用量为 0.3918 g, Tween-80 的质量浓度为 4.25%, Lab 用量为 0.0475 g; 最佳制备工艺为: 均质压力 6000 psi, 均质次数 30 次。按照最优处方平行制备 3 批 Res-NLCs, 测得包封率和载药量的平均值分别为 $(98.43 \pm 0.07) \%$ 和 $(11.04 \pm 0.14) \%$ 。

表 2 正交试验结果

Tab 2 Orthogonal experiment

No.	A	B	C	D	EE/%
1	1	1	1	1	92.82
2	1	2	2	2	94.84
3	1	3	3	3	91.93
4	2	1	2	3	93.57
5	2	2	3	1	88.24
6	2	3	1	2	92.02
7	3	1	3	2	91.81
8	3	2	1	3	91.91
9	3	3	2	1	97.36
K_1	93.197	92.733	92.250	92.807	
K_2	91.277	91.663	95.257	92.890	
K_3	93.693	93.770	90.660	92.470	
R_j	2.416	2.107	4.597	0.420	

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	P
A. 固液脂质比	9.733	2	32.906	< 0.05
B. Tween-80 质量浓度	6.658	2	22.418	< 0.05
C. 均质压力	32.697	2	110.091	< 0.05
D. 均质次数 (误差)	0.297	2	1.000	

2.4 Res-NLCs 的外观形态

将适量新鲜制备的 Res-NLCs 用纯化水稀释至适当浓度后, 取一滴置于覆有支撑膜的铜网上, 静置待其自然干燥, 然后用透射电子显微镜观察样品形貌。Res-NLCs 的外观图如图 1 所示, 制剂澄清透明, 具有淡蓝色乳光。Res-NLCs 的透射电镜结果如图 2 所示, Res-NLCs 呈规则圆球状, 大小均一, 无粘连, 粒径较小且分散性良好。



图 1 Res-NLCs 的外观图

Fig 1 Appearance of Res-NLCs

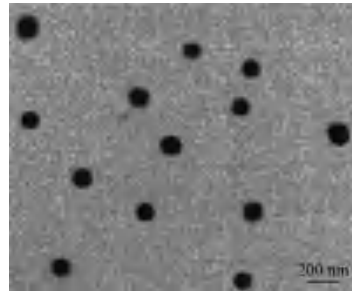


图 2 Res-NLCs 的透射电镜图

Fig 2 Transmission electron microscopy of Res-NLCs

2.5 Res-NLCs 粒径及 Zeta 电位的测定

采用光散射粒径分析仪测定 Res-NLCs 的粒径及 Zeta 电位, 精密吸取 10 μL 新制备的最优处方的 Res-NLCs, 用纯化水稀释至 1 mL, 混合均匀后, 放入仪器测定粒径及多分散系数 (PDI)。结果如图 3 A 所示, Res-NLCs 的粒径为 $(81.87 \pm 0.14) \text{ nm}$, PDI 为 (0.099 ± 0.02) 。另取适量 Res-NLCs 放入样品池, 测定其 Zeta 电位。结果如图 3B 所示, Res-NLCs 的 Zeta 电位为 $(-8.09 \pm 0.75) \text{ mV}$ 。

2.6 Res-NLCs 的稳定性考察

按照最优处方平行制备 3 份 Res-NLCs, 放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏柜, 避光储存, 并分别于 0、1、7、21、30 d 测定其包封率和粒径以考察 Res-NLCs 的稳定性。结果如图 4 所示, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, Res-NLCs 的包封率在第 21 日有所下降, 30 d 内降至 88.52%, 粒径略有上升, 表明 Res-NLCs 在此条件下避光储存 21 d 基本稳定。

2.7 Res-NLCs 的体外释药行为研究

2.7.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水 (含 0.05% 磷酸) (68 : 32); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 305 nm; 进样量: 10 μL ; 流速: 1.0 mL \cdot min $^{-1}$ 。

2.7.2 溶液的配制

- ① 空白溶液: 配制 pH 为 7.4 的含 0.3% (w/V) Tween-80 的 PBS 溶液, 作为释放介质。
- ② 对照品溶液: 精密称取 Res 对照品 10 mg, 用释放介质溶解并定容至 50 mL, 即得 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Res 的药物母液。
- ③ 供试品溶液: 移取 1 mL Res-NLCs, 用释

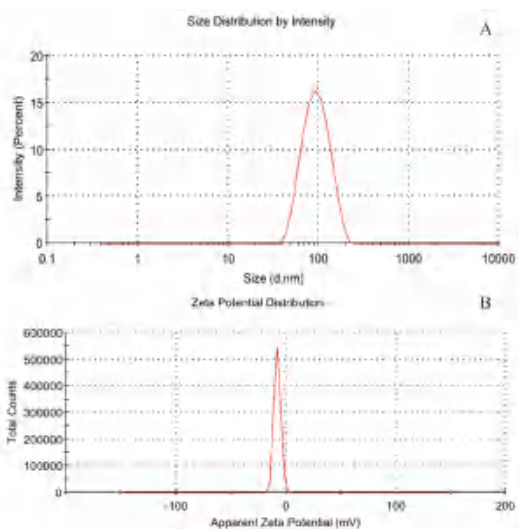


图 3 Res-NLCs 的粒径 (A) 和 Zeta 电位 (B)
Fig 3 Particle size (A) and Zeta potential (B) of Res-NLCs

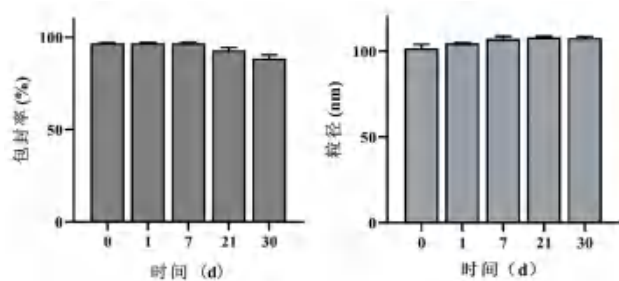


图 4 不同储存时间对 Res-NLCs 包封率和粒径的影响
Fig 4 Effect of different storage time on the EE and DL of Res-NLCs

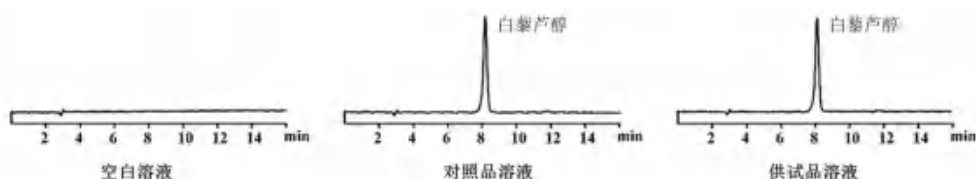


图 5 白藜芦醇色谱图
Fig 5 Chromatogram of resveratrol

2.7.7 稳定性考察 将供试品溶液放置于室温，于 24 h 内每隔 2 h 进样一次，计算出各时间点药物浓度的 *RSD*。结果得出 *RSD* 为 0.46%，表明 Res 供试品溶液放置 24 h 内稳定性良好。

2.8 Res-NLCs 中 Res 的体外释药行为研究

采用正向动态膜透析法^[10]考察 Res-NLCs 的体外释药行为，使用 0.3% (w/V) Tween-80 的 PBS (pH 7.4) 作为释放介质。将 1 mL Res-NLCs 和 1 mL Res 溶液 (溶剂为 PEG 400) 分别放入透析袋 (截留分子量: 8 ~ 14 kD)，将透析袋两端固定好后放入烧杯中，加入 200 mL 释放介质，并保证将透析袋浸没于液面下，使烧杯保持在恒温振荡器内 (37 °C、100 r · min⁻¹)，分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24、36 和 48 h 吸取 1 mL 释放液，并补加同体积的等温释放介质，以

放介质定容至 10 mL，即得。

2.7.3 专属性试验 取“2.7.2”项下的空白溶液、对照品溶液、供试品溶液，稀释至一定浓度后，过滤，进样，考察 NLCs 成分以及释放介质是否干扰药物含量测定。结果如图 5 所示，Res 峰形良好且未见杂峰，表明释放介质对 Res 的含量测定无干扰，该方法专属性符合要求。

2.7.4 线性关系考察 取“2.7.2”项下的对照品溶液，用释放介质稀释成 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 μg · mL⁻¹ 系列对照溶液，进样测定并记录峰面积 (*A*)。绘制标准曲线，得回归方程为： $A = 57.778C - 3.7319$ ， $r = 0.9998$ 。结果表明 Res 在 0.1 ~ 20.0 μg · mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。

2.7.5 精密度考察 分别配制低 (0.5 μg · mL⁻¹)、中 (5.0 μg · mL⁻¹) 和高 (15.0 μg · mL⁻¹) 质量浓度的 Res 溶液，于 1 d 内连续 5 次进样分析，得日内精密度；5 d 内同法进样，得日间精密度。结果 *RSD* 值均在 0.30% ~ 1.7%，表明方法的精密度符合要求。

2.7.6 回收试验考察 取适量 Res 对照品溶液加入释放介质中，分别配制成质量浓度为低 (7.5 μg · mL⁻¹)、中 (12.0 μg · mL⁻¹) 和高 (15.0 μg · mL⁻¹) 的 Res 溶液，进样测定，计算回收率。3 种不同浓度的 Res 回收率在 98.88% ~ 101.82%，*RSD* 值均在 0.26% ~ 0.72%，表明该方法准确度良好。

保证释放介质体积一致。样品经微孔滤膜过滤后，按“2.7.1”项下色谱条件进行含量测定 ($n = 3$)，代入以下公式，得 Res 释放含量，绘制释放曲线 (见图 6)。

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

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

其中 C_n 为 Res 在 t 时刻测得的浓度， C_i 为 Res 在 t 时刻之前测定的浓度， V_0 为接收池中加入的溶液体积， V 为取样体积， Q_0 为起始时 Res 总量。Res-NLCs 和 Res 溶液在 48 h 内的释放曲线如图 6 所示，Res 溶液释放相对快速，8 h 内累计释放 97.31%；Res-NLCs 在 48 h 内持续释放，累计释放 80.69%；Res-NLCs 与 Res 溶液相比明显释放缓慢，

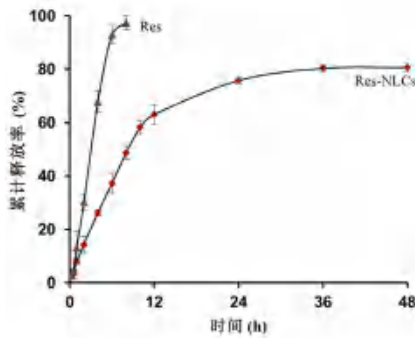


图 6 Res-NLCs 及 Res 溶液中 Res 的释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig 6 In vitro release curve of Res in Res-NLCs and resveratrol solution ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

延长了释放时间。

同时, 还引入 4 种释放模型对 Res-NLCs 的释放曲线进行模型拟合。结果如表 4 所示, 释放数据拟合到 Makoid-Banakar 模型时 $R^2 = 0.9924$, 表明 Res 从 NLCs 中的释放最适合 Makoid-Banakar 释放模型, 并且相关系数 r 为 0.87, 在 0.45 ~ 0.89, 说明 Res 的释放机制属于溶蚀与扩散相结合。

表 4 Res-NLCs 释放曲线的数学模型拟合
 Tab 4 Model fitting of release curves of Res-NLCs

拟合模型	方程	R^2	n
零级动力学	$F = k_d t$	0.7243	/
一级动力学	$F = 100[1 - e^{-k_d t}]$	0.9445	/
Higuchi	$F = k_H t^{0.5}$	0.9056	/
Makoid-Banakar	$F = k_{MB} t^p e^{-k t}$	0.9924	0.87

3 讨论

本试验采用乳化蒸发-高压均质法制备 Res-NLCs^[11], 粒径较小且分布均匀, 同时液体脂质的加入使其具有较高的包封率及载药量。在 Res-NLCs 的制备过程中发现, 随着固体脂质比例的增加, 包封率逐渐增大, 这可能和固体脂质与药物具有较好的相容性有关; 较小剂量液体脂质的加入可以破坏其内部的晶格结构, 增加其包封率, 但过多液体脂质的加入, 可能会降低药物与脂质之间的相容度, 反而导致包封率下降。

在体外释放试验中, 由于 Res 水溶性较差, 因此需要加入适宜的表面活性剂来改善溶解性。预试验分别考察了 Res 在含 0.1% ~ 1.0% (w/V) Tween-80 的 PBS 溶液中的饱和和溶解度, 最终选择符合漏槽条件的含 0.3% (w/V) Tween-80 的 PBS (pH 7.4) 溶液作为释放介质, 当然, 这种介质并不能完全代替体内的释放条件, 体内会存在各种代谢酶且具备更复杂的机体机能, 可能最终会导致 Res-NLCs 中药物的完全释放。释放曲线的研究结果表明, Res-NLCs 前期释放相对快速可能归

因于有部分 Res 吸附在 NLCs 表面, 导致快速渗透; 而 NLCs 中包裹的 Res 可能以无定形状态存在于有缺陷的晶格空间或固、液脂质层中, 导致释放相对困难, 扩散缓慢^[12], 因此 Res-NLCs 可以显著延长释放的时间, 展现出良好的缓释效果, 有望改善 Res 在体内代谢快, 吸收差的缺点。本试验制备的 Res-NLCs 达到预期提高 Res 生物利用度的目的, 后期将继续对 Res-NLCs 体内药代动力学、体内外药效学继续进行研究, 以从多方面深入探讨 Res-NLCs 的剂型优势。

参考文献

- [1] Meng TT, Xiao DF, Muhammed A, et al. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol [J]. *Molecules*, 2021, 26 (1): 229.
- [2] Wang L, Zhu T, Feng DQ, et al. Polyphenols from Chinese herbal medicine: molecular mechanisms and therapeutic targets in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50 (4): 1063-1094.
- [3] Chahinez H, David A, Kamalinder K. Impact of liquid lipid on development and stability of trimyristin nanostructured lipid carriers for oral delivery of resveratrol [J]. *J Mol Liq*, 2020, 316: 113734.
- [4] Astley C, Houacine C, Zaabalawi A, et al. Nanostructured lipid carriers deliver resveratrol, restoring attenuated dilation in small coronary arteries, via the AMPK pathway [J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (12): 1852.
- [5] 马梦超, 乔文梅, 王鹤樵, 等. 纳米结构脂质载体肺部给药研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41 (20): 2146-2149.
- [6] Fan W, Zhang LY, Li YW, et al. Recent progress of cross-linking strategies for polymeric micelles with enhanced drug delivery in cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26 (13): 2356-2376.
- [7] Isoglu IA, Ozsoy Y, Isoglu SD. Advances in micelle-based drug delivery: cross-linked systems [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17 (13): 1469-1489.
- [8] Li HP, Wang KK, Yang X, et al. Dual-function nanostructured lipid carriers to deliver IR780 for breast cancer treatment: anti-metastatic and photothermal anti-tumor therapy [J]. *Acta Biomater*, 2017, 53: 399-413.
- [9] 毛艳婷, 马姝丽, 白朝辉, 等. 木犀草素纳米结构脂质载体及其冻干粉制备和体外释药研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40 (23): 2423-2429.
- [10] 田思宇, 韩新宇, 任金妹, 等. 共载紫杉醇与胡椒碱的固体脂质纳米粒的体外药物释放 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (3): 557-560.
- [11] 付淑凤. 白藜芦醇纳米结构脂质载体的制备与体外抗肿瘤细胞活性研究 [J]. *解放军药学学报*, 2018, 34 (3): 205-209.
- [12] 郝海军, 屈战果, 范明松. 隐丹参酮纳米结构脂质载体的制备及药动学研究 [J]. *中成药*, 2020, 42 (4): 831-835.

(收稿日期: 2023-05-06; 修回日期: 2023-07-08)

培养基添加剂对双特异性抗体产量和糖基化的影响

朱国梁^{1, 2}, 罗顺^{2, 3*}, 张晓莹³ (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏南通 226133; 3.澳斯康生物(南通)股份有限公司, 江苏南通 226100)

摘要: **目的** 研究培养基添加剂(锰离子、锌离子和丁酸钠)对表达双特异性抗体的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞生长、抗体产量及关键质量属性的影响。**方法** 利用 JMP 13.0 软件响应曲面设计-中心复合设计, 研究培养基添加剂对细胞生长、抗体产量及 Man5 糖型含量的影响。**结果** 在细胞培养过程中添加 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锰、 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸锌和 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸钠, 可使峰值活细胞密度提高 11.8%, 抗体产量提高 14.5%, Man5 糖型含量降低 28.9%。**结论** 锰离子、锌离子和丁酸钠在提高双特异性抗体产量和降低 Man5 糖型含量方面发挥了关键作用。

关键词: 锰离子; 锌离子; 丁酸钠; 双特异性抗体; 糖基化

中图分类号: R979.1, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0121-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.019

Effect of culture medium additives on the production and glycosylation of bispecific antibodies

ZHU Guo-liang^{1, 2}, LUO Shun^{2, 3*}, ZHANG Xiao-ying³ (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Drug Research Institute of Yangtze Delta, Nantong Jiangsu 226133; 3. Thousand Oaks Biopharmaceuticals Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226100)

Abstract: Objective To determine the effect of culture medium additives (manganese ion, zinc ion, and sodium butyrate) on the growth, antibody production and critical quality attributes of Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing bispecific antibodies. **Methods** Response surface design and center composite design were performed using JMP 13.0 software, to determine the effect of medium additives on growth, antibody production and Man5 levels. **Results** Additions of $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ manganese chloride, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ zinc sulfate and $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium butyrate in the media increased the peak viable cell density by 11.8%, increased the antibody production by 14.5%, but decreased the Man5 level by 28.9%. **Conclusion** Manganese ion, zinc ion and sodium butyrate play key roles in improving the bispecific antibody production and reducing the Man5 content.

Key words: manganese ion; zinc ion; sodium butyrate; bispecific antibody; glycosylation

近年来治疗性抗体药物迅速发展, 广泛应用于癌症、自身免疫性疾病、传染病等的治疗。大多数抗体药物是一类以 γ 型免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 形式存在的治疗性糖蛋白, 通常在哺乳动物表达系统中表达。中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞具有生长稳定、适合大规模培养、对人类病毒敏感以及对人类细胞的类似翻译后修饰的特性, 是生产重组抗体的常用宿主细胞^[1-2]。

提高 CHO 细胞培养性能, 对降低抗体药物的生产成本至关重要, 优化细胞株和工艺开发是提高抗体产量和质量的重点^[3], 可采用基因工程^[4-5]、优化培养基、改进补料策略^[6]、使用添加剂等。抗体药物的翻译后修饰对其质量和功能具有重要影响, 糖基化是一种常见且复杂的修饰方式, 被广泛认为是抗体药物关键质量属性 (critical quality attributes, CQA) 之一, 与药效学特性、免疫原性、稳定性等具有密切联系^[7]。

作者简介: 朱国梁, 男, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究, email: glzhu.hm@simm.ac.cn *通信作者: 罗顺, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事分子生物学研究, email: shun.luo@tobiopharm.com

许多培养基添加剂可有效地提高 CHO 细胞培养中抗体的产量和质量,如短链脂肪酸丁酸钠 (NaBu) 可有效促进 CHO 细胞培养过程中抗体的生物合成^[8-9];金属阳离子对 CHO 细胞的生长、抗体的表达及糖基化具有重要的影响,如添加 0.25 ~ 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锰 (MnCl_2) 可以有效降低 Man5 水平,并维持 G0F、G1F 和 G2F 等主要糖型的含量^[10];锌离子可增加 mRNA 稳定性并发挥抗凋亡和抗氧化作用,添加超过 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的锌离子可以有效提高 CHO 细胞培养过程中的抗体表达^[11-12]。本实验旨在探究 NaBu、 MnCl_2 和硫酸锌 (ZnSO_4) 组合使用对 CHO 细胞的生长、抗体表达和糖基化的影响,以期提高抗体的产量和质量。

1 材料

1.1 细胞株

本实验采用可稳定表达 CD40/PD-L1 的 IgG1 型双特异性抗体的 CHO 细胞株,细胞株来源于澳斯康生物 (南通) 股份有限公司。

1.2 试剂

Dynamis 培养基、抗结团剂 (Anti-Clumping Agent, ACA) (美国 Gibco 公司); Cell Boost 5、Cell Boost 7a、Cell Boost 7b 补料 (美国 Hyclone 公司); L-谷氨酰胺 (美国 Sigma 公司); MnCl_2 (批

号: C12791111, 中国 Macklin 公司); ZnSO_4 (批号: JSB0483107)、NaBu 溶液 (批号: 20007038BLM) (中国甘肃健顺生物科技有限公司); 肽 *N*-糖苷酶 F (美国 New England Biolabs 公司); Glycoworks RapiFluor 糖分析试剂盒 (美国 Waters 公司)。所有溶液均按照说明书使用纯化水配制,纯化水由澳斯康生物 (南通) 股份有限公司制备。

1.3 仪器

无菌细胞培养管 (美国 TPP 公司); 摇瓶 (美国 Corning 公司); Vanquish UPLC 系统 (美国 Thermo Fisher 公司); 二氧化碳摇床 (瑞士 Kuhner 公司); Vi-Cell XR 细胞活力分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); Bioprofile 400 生化分析仪 (美国 Nova Biomedical 公司); E2695 HPLC 系统 (美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 方案设计

利用 JMP 13.0 软件进行响应曲面设计 - 中心复合设计实验,锰离子 (X_1)、锌离子 (X_2)、丁酸钠 (X_3) 作为 X 因子,收获时细胞活率 (Y_1)、抗体产量 (Y_2)、细胞特异性生产力 (Y_3)、Man5 糖型含量 (Y_4) 作为响应值,实验次数为 16; 每组实验重复 3 次。实验方案和结果如表 1 所示。

表 1 响应面设计实验方案和结果

Tab 1 Experimental scheme and results of response surface design

No.	$X_1/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$X_2/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$X_3/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$Y_1/\%$	$Y_2/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$Y_3/(\text{pg} \cdot \text{d}^{-1})$	$Y_4/\%$
1	650	120	750	71.85	4.26	17.89	4.84
2	1200	30	250	82.40	5.20	21.21	3.86
3	650	75	1250	69.10	3.50	15.61	4.83
4	100	75	750	73.15	3.44	14.95	6.19
5	1200	30	1250	71.75	3.48	15.34	4.45
6	100	30	1250	69.60	3.09	13.71	5.79
7	100	30	250	79.85	4.71	19.33	5.07
8	1200	75	750	73.15	4.08	18.24	4.61
9	1200	120	1250	64.30	3.32	15.14	3.96
10	1200	120	250	76.40	4.68	20.68	4.08
11	100	120	250	74.55	4.42	20.07	6.26
12	650	75	250	78.05	4.65	20.58	4.44
13	100	120	1250	64.65	3.41	15.37	6.47
14	650	75	750	72.25	3.86	17.38	4.67
15	650	75	750	72.75	3.80	17.10	4.80
16	650	30	750	75.25	4.02	18.31	4.53

2.2 细胞培养

取适量处于对数生长期的细胞于 50 mL TPP 管中,在 200 g 离心力条件下离心 5 min 后去上清液,用含 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺、2.5% Cell Boost 5 和 0.5% ACA 的 Dynamis 培养基将细胞重悬,使细胞密度为 $(0.5 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,工作体积为

25 mL,并将其放置于二氧化碳摇床中进行悬浮培养。摇床条件为: 37 °C、湿度 80%、5% CO_2 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,振幅 50 mm。培养至 Day3 (接种时为 Day0) 时隔日测样并将葡萄糖浓度补充至 7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,分别于 Day 3、Day 5、Day 7、Day 9、Day 11 流加 4% Cell Boost 7a 和 0.4% Cell Boost 7b; MnCl_2

和 ZnSO₄ 于 Day3 时按照实验设计方案加入细胞液中；培养至 Day5 时，加入 NaBu，并将培养温度从 37℃ 降至 33℃；培养至 Day14 时，将细胞液离心后，取上清液放至 -80℃ 冰箱保存待用。

2.3 检测和抗体纯化

细胞密度和细胞活率利用 Vi-Cell XR 细胞活力分析仪分析；葡萄糖浓度、乳酸浓度、NH₄⁺ 浓度等利用 Bioprofile 400 生化分析仪分析；上清液中抗体产量使用 Protein A-HPLC 亲和色谱法测定；抗体的纯化采用 1 mL HiTrap Protein A HP (GE Healthcare) 亲和层析柱；抗体糖基化检测采用 Vanquish UPLC 串联荧光检测器，色谱柱为 ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide Column (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)。

2.4 数据分析

采用 JMP 13.0 软件对模型进行拟合分析，运行特质和重点分别为标准最小二乘法 and 效应筛选，通过均方根误差 (RMSE)、决定系数 (Rsq) 和 P 值评估模型的预测性能、拟合程度以及统计学意义，RMSE 越小表示模型的预测结果越接近实测值，Rsq 越接近 1 表示模型拟合程度越好，P < 0.05 表示差异具有统计学意义；显著性差异分析利用 SPSS 26.0 软件单因素分析 ANOVA 检验计算；作图采用 Origin2021 软件。

3 结果

3.1 响应面 - 中心复合设计实验

3.1.1 培养基添加剂对收获时细胞活率的影响

三种培养基添加剂对收获时细胞活率的影响结果见图 1 和表 2。收获时细胞活率的预测值 - 实测值的拟合结果差异具有统计学意义 (P < 0.05)。根据拟合参数估计值对各个项进行分析，其中锌离子和丁酸钠对收获时细胞活率的影响差异具有统计意义 (P < 0.05)，其余各项、交互项和二次项作用差异不具统计学意义 (P > 0.05)。从图 2 中可以看出锌离子和丁酸钠与收获时细胞活率都成负相关，丁酸钠浓度从 250 μmol·L⁻¹ 提高到 1250 μmol·L⁻¹ 时，细胞活率降低 10% ~ 15%；锌离子浓度从 30 μmol·L⁻¹ 提高到 120 μmol·L⁻¹ 时，细胞活率降低 7% 左右。

3.1.2 培养基添加剂对抗体产量的影响 三种培养基添加剂对抗体产量的影响结果见图 3 和表 3。抗体产量的预测值 - 实测值的拟合结果差异具有统计学意义 (P < 0.05)。根据拟合参数估计值对各个项进行分析，锰离子和丁酸钠对抗体产量的影响差异具有统计学意义 (P < 0.05)，其余因子和因子之间不存在交互作用和二次项 (P > 0.05)。如图

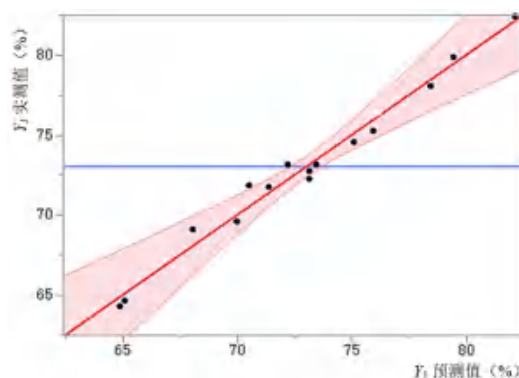


图 1 收获时细胞活率预测值 - 实测值关系图

Fig 1 Predicted value-measured value of cell viability at harvest

注 (Note): RMSE = 1.0653; Rsq = 0.98; P = 0.0002。

表 2 收获时细胞活率参数估计值

Tab 2 Estimates of fitting parameters for cell viability at harvest

项	标准误差	P
X ₁ (100, 1200)	0.336 868	0.1153
X ₂ (30, 120)	0.336 868	0.0002*
X ₃ (250, 1250)	0.336 868	< 0.0001*
X ₁ X ₂	0.376 629	0.3291
X ₁ X ₃	0.376 629	0.4213
X ₂ X ₃	0.376 629	0.7276
X ₁ X ₁	0.656 080	0.6459
X ₂ X ₂	0.656 080	0.9037
X ₃ X ₃	0.656 080	0.8749

4 显示，丁酸钠浓度从 250 μmol·L⁻¹ 增加到 1250 μmol·L⁻¹ 时，抗体产量下降大约 33%；将锰离子浓度从 100 nmol·L⁻¹ 提高到 1200 nmol·L⁻¹ 时，抗体产量呈先上升后略微下降的趋势，当浓度为 1100 nmol·L⁻¹ 时，抗体产量达到最高。

3.1.3 培养基添加剂对细胞特异性生产力的影响

三种培养基添加剂对细胞特异性生产力的影响结果如图 5 和表 4 所示。细胞特异性生产力的预测值 - 实测值的拟合结果差异具有统计学意义 (P < 0.05)。通过拟合参数估计值对各个项进行分析可知，锰离子和丁酸钠对细胞特异性生产力的影响差异具有统计学意义 (P < 0.05)，锌离子及其他各交互项、二次项之间与细胞特异性生产力差异不具有统计学意义 (P > 0.05)。由图 6 可知，锰离子对细胞特异生产力影响呈曲线反应，当锰离子浓度为 900 nmol·L⁻¹ 左右时达到最大，细胞特异性生产力提高约 14%；丁酸钠在 250 ~ 1250 μmol·L⁻¹ 内与细胞特异生产力成负相关，当丁酸钠浓度为 1250 μmol·L⁻¹ 时，细胞特异性生产力降低了 25%；锌离子浓度在 30 ~ 120 μmol·L⁻¹ 时对细胞特异生产力的影响不明显。

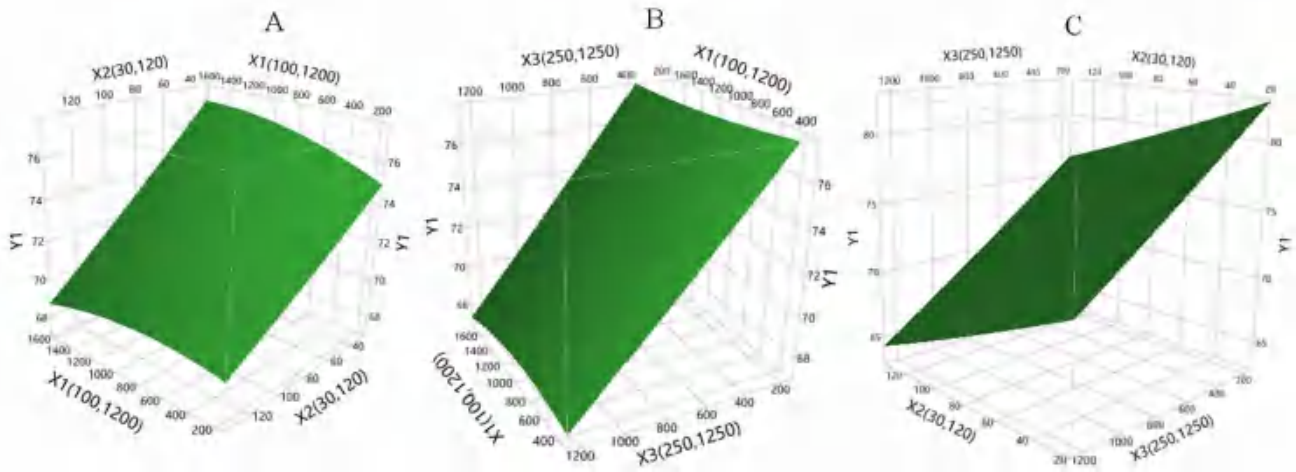


图 2 收获时细胞活率响应曲面图

Fig 2 Response surface plot of cell viability at harvest

注 (Note): A. $X_3 = 750$; B. $X_2 = 75$; C. $X_1 = 650$.

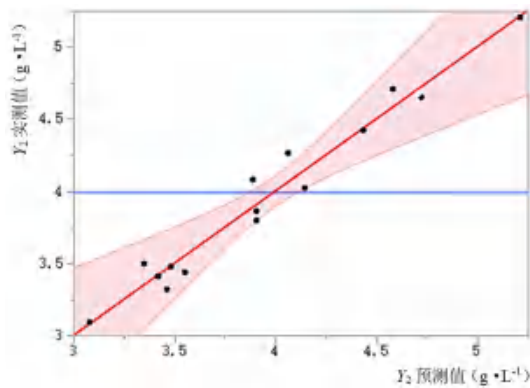


图 3 抗体产量的预测值 - 实测值关系图

Fig 3 Predicted value-measured value of antibody production

注 (Note): $RMSE = 0.1753$; $Rsqr = 0.97$; $P = 0.0009$.

表 3 抗体产量参数估计值

Tab 3 Estimates of fitting parameters for antibody production

项	标准误差	P
$X_1 (100, 1200)$	0.055 443	0.0228*
$X_2 (30, 120)$	0.055 443	0.4835
$X_3 (250, 1250)$	0.055 443	< 0.0001*
$X_1 X_2$	0.061 987	0.1967
$X_1 X_3$	0.061 987	0.3933
$X_2 X_3$	0.061 987	0.0977
$X_1 X_1$	0.107 980	0.1353
$X_2 X_2$	0.107 980	0.1168
$X_3 X_3$	0.107 980	0.2748

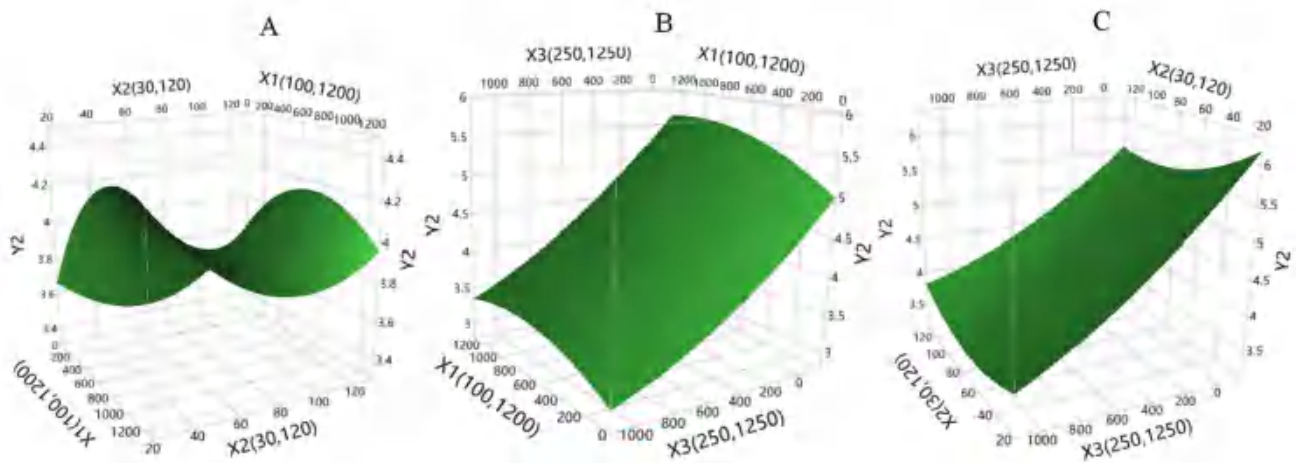


图 4 抗体产量响应曲面图

Fig 4 Response surface plot of antibody production

注 (Note): A. $X_3 = 750$; B. $X_2 = 75$; C. $X_1 = 650$.

3.1.4 培养基添加剂对 Man5 糖型含量的影响 三种培养基添加剂对 Man5 糖型含量的影响如图 7 和表 5 所示。Man5 糖型含量的预测值 - 实测值的拟合结果表明该模型差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

通过拟合参数估计值对各个项进行分析表明除了锰离子和丁酸钠对 Man5 糖型含量不存在交互作用外, 其他单因子, 双因子交互作用以及二次项都对 Man5 糖型含量影响均差异具有统计学意义

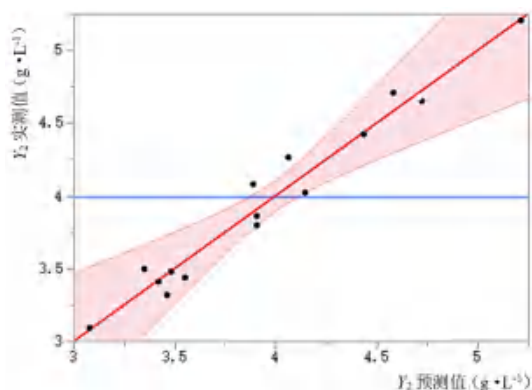


图 5 细胞特异性生产力的预测值 - 实测值关系图
 Fig 5 Predicted value-measured value of cell specific productivity
 注 (Note): $RMSE = 0.675$; $Rs_q = 0.97$; $P = 0.0008$ 。

表 4 细胞特异性生产力参数估计值

项	标准误差	P
$X_1 (100, 1200)$	0.213 455	0.0152*
$X_2 (30, 120)$	0.213 455	0.5795
$X_3 (250, 1250)$	0.213 455	< 0.0001*
$X_1 X_2$	0.238 650	0.1522
$X_1 X_3$	0.238 650	0.5888
$X_2 X_3$	0.238 650	0.5369
$X_1 X_1$	0.415 7230	0.0653
$X_2 X_2$	0.415 7230	0.2203
$X_3 X_3$	0.415 7230	0.2239

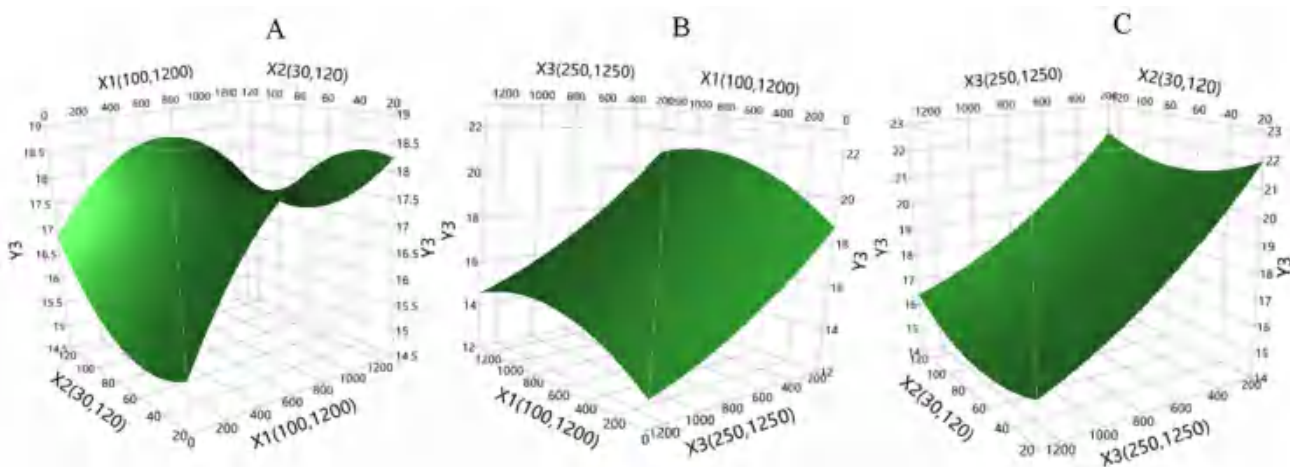


图 6 细胞特异生产力响应曲面图
 Fig 6 Response surface plot of cell specific productivity
 注 (Note): A. $X_3 = 750$; B. $X_2 = 75$; C. $X_1 = 650$ 。

($P < 0.05$)。从图 8 可知, 锰离子浓度低于 $900 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 锌离子浓度低于 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和丁酸钠浓度低于 $800 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与 Man5 糖型含量成负相关。但是大于这些浓度时, 与 Man5 糖型含量成正相关。

3.2 设计空间

丁酸钠的添加量越大活率下降越为明显, 会降低抗体的产量, 为了尽可能地提高抗体产量, 因此选择设置丁酸钠的浓度为最小量 $250 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 目标抗体产量大于 $5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, Man5 糖型含量低于 5%。通过使用 JMP 软件等高线刻画器功能对实验模型进行刻画, 锌离子和锰离子的浓度设计空间如图 9 所示, 图中空白部分即为可满足条件的添加量, 当锰离子、锌离子和丁酸钠浓度分别为 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $250 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抗体产量达到最大化, 此时即为最佳添加量, 在此条件下收获时细胞活率的预测值为 81.8%, 抗体产量的预测值为 $5.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞特异性生产力的预

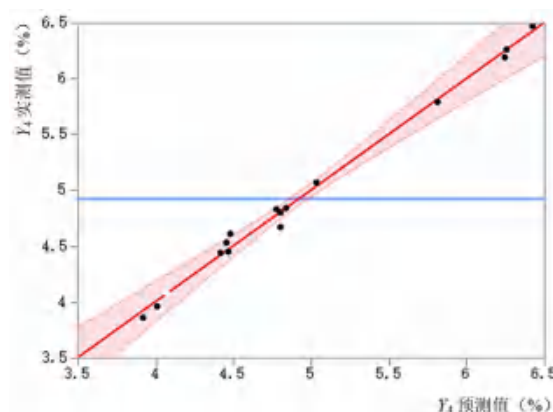


图 7 Man5 含量预测值 - 实测值关系图
 Fig 7 Predicted value-measured value of Man5 percent
 注 (Note): $RMSE = 0.0973$; $Rs_q = 0.99$; $P < 0.0001$ 。

测值为 $21.68 \text{ pg} \cdot \text{d}^{-1}$, Man5 糖型含量的预测值为 3.79%。

3.3 模型验证

根据上述设计空间参数, 对最优添加条件进行验证, 设置实验组 (Test) 和对照组 (Control),

表 5 Man5 含量参数估计值

项	标准误差	P
X_1 (100, 1200)	0.030 763	< 0.0001*
X_2 (30, 120)	0.030 763	0.0008*
X_3 (250, 1250)	0.030 763	0.0011*
X_1X_2	0.034 394	0.0002*
X_1X_3	0.034 394	0.1456
X_2X_3	0.034 394	0.0044*
X_1X_1	0.059 913	< 0.0001*
X_2X_2	0.059 913	0.0400*
X_3X_3	0.059 913	0.0137*

对照组不含锰离子、锌离子和丁酸钠，每组实验重复 3 次。根据图 10 可知，培养后期实验组中细胞密度和活率都显著高于对照组，活细胞峰值密度达到了 $25.23 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，比对照组提高了 11.8%；在培养过程中乳酸的积累低于对照组，如图 11，这更有利于细胞的生长和抗体的表达，最终抗体的产量达到 $5.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，比对照组提高了 14.5%。抗体糖基化变化如图 12 所示，与对照组相比，Man5 和 G0F 含量有所减少，其中 Man5 含量减少了 28.9%，其余糖型含量均有所提升。实

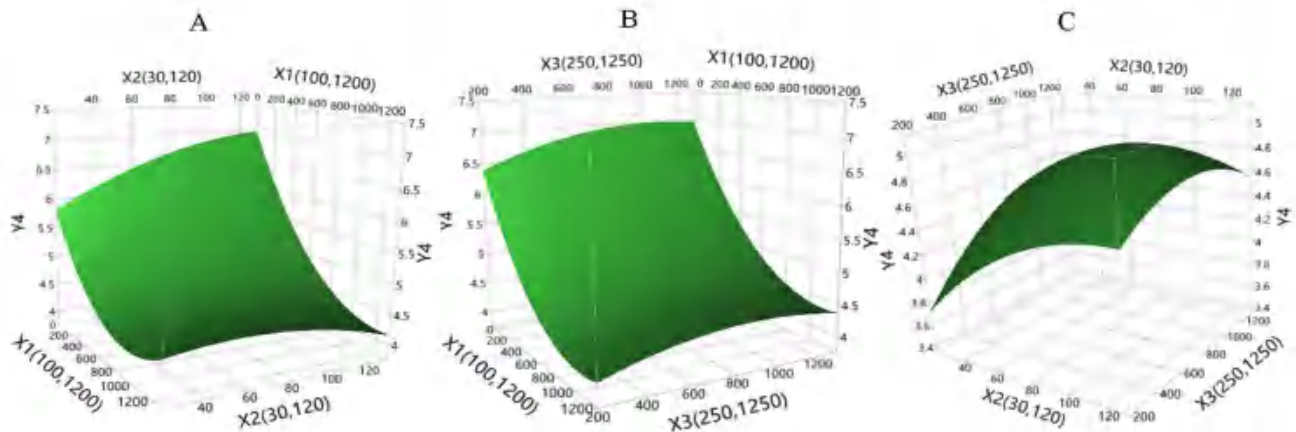


图 8 Man5 含量响应面图

Fig 8 Response surface plot of Man5 percent

注 (Note): A. $X_3 = 750$; B. $X_2 = 75$; C. $X_1 = 650$ 。

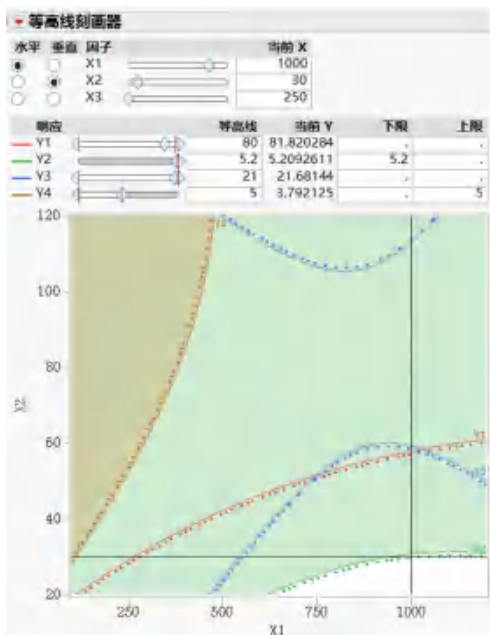


图 9 设计空间模型

Fig 9 Design space model

验组中的收获时细胞活率、抗体产量、细胞特异生产力和 Man5 糖型含量均与预测结果接近，表明模型真实有效。

4 讨论

在动物细胞培养过程中，培养基添加剂在抗体的表达和质量等方面起着不可或缺的作用，通过使用小分子添加剂来提高抗体的产量和质量，可大幅降低抗体药物的生产成本，本实验用表达双特异性抗体的 CHO 细胞作为研究对象，探究锰离子、锌离子和丁酸钠组合使用对细胞生长、抗体表达和 Man5 糖型含量的影响，通过响应面实验并建立回归模型，结果预测值与实际值相近，进一步验证了模型的有效性。

在流加培养的早期，细胞会迅速增殖，这种指数生长期通常会伴随着葡萄糖大量消耗、酵解并会导致乳酸积累^[13]，这种乳酸的积累会对细胞生长和生产力产生不利影响^[14]，本实验中，在添加 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 锌离子、 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸钠的条件下，锰离子浓度从 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，不仅减少了乳酸的积累，细胞活率和细胞密度均有所提升，抗体表达量提高了 10.6%，比对照组提高了 14.5%，在保持相同培养周期的情况下，成功实现了抗体产量的提高，这一成果对于提高生物制药生产效率具有显

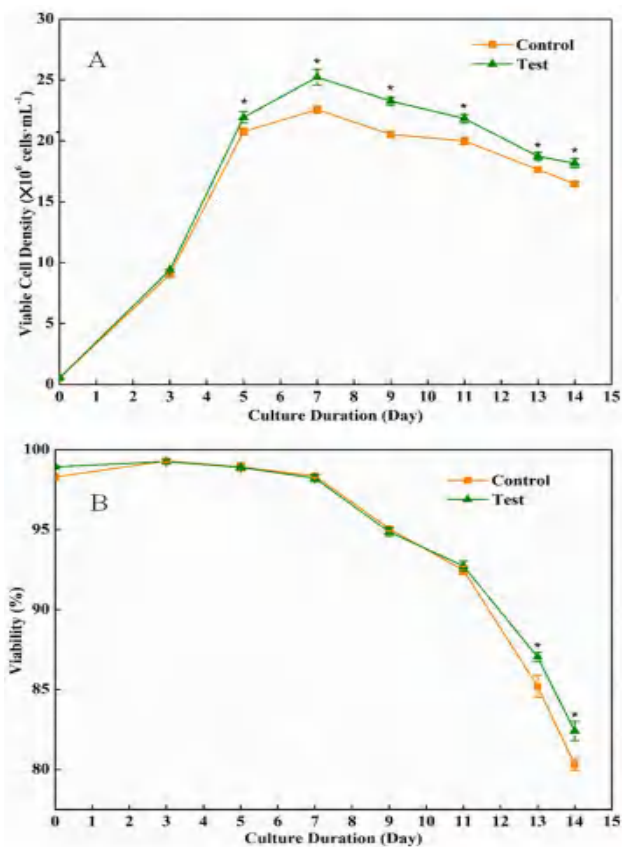


图 10 细胞活力曲线
Fig 10 Cell viability curve
A. 活细胞密度 (viable cell density); B. 细胞活率 (viability)
注: 与对照组比较, **P* < 0.05。
Note: Compared with the control group, **P* < 0.05.

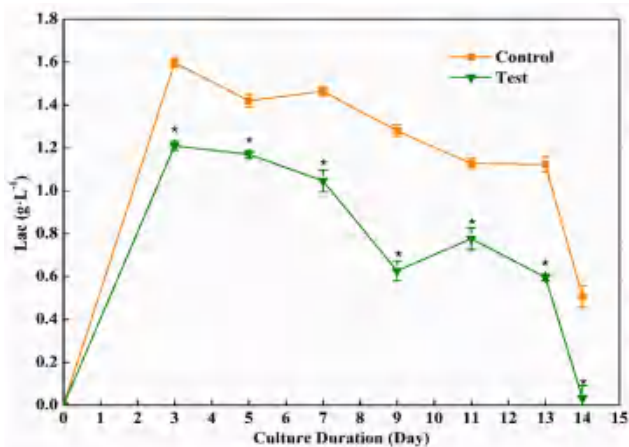


图 11 乳酸含量变化曲线
Fig 11 Lactic acid content change curve
注: 与对照组比较, **P* < 0.05。
Note: Compared with the control group, **P* < 0.05.

著的意义,并在降低生产成本方面发挥着重要作用,这一研究成果不仅对于提升 CHO 细胞生产抗体的能力具有重要启示,同时也为其他生物制药相关的研究和应用提供了有价值的参考。锌离子和丁酸钠的加入均抑制了细胞的生长,也降低

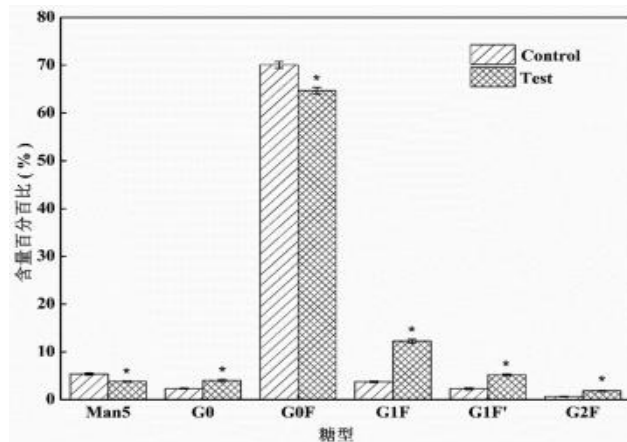


图 12 抗体糖基化修饰
Fig 12 Antibody glycosylation modification
注: 与对照组比较, **P* < 0.05。
Note: Compared with the control group, **P* < 0.05.

了细胞的活率,进而影响了抗体的表达,这与文献研究结果一致^[15-16],然而并没有发现锌离子和丁酸钠对细胞特异性生产力有明显的提升,这可能与细胞株对这两种物质较为敏感和外源蛋白的特性有关,也可能是培养工艺、培养参数等对实验产生了不同的结果。

当糖蛋白通过内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 时,高甘露寡糖的还原端被 α -甘露糖苷酶 - I 在内的多种酶剪切而形成 Man5,ER 修饰过程是糖蛋白正确折叠 (包括正确的二硫键形成) 的一种特殊而复杂的机制,聚糖结构在这过程被各种折叠蛋白和糖苷酶作为识别序列,并通过 ER 相关机制导致糖蛋白的再折叠或降解^[17],而锰离子是参与 *N*-链接聚糖合成的几种糖基转移酶的重要辅助因子,它的含量会影响各糖苷酶的活性从而影响细胞内糖基化通量^[18]。在本研究中,添加 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 锰离子,Man5 糖型含量有较为明显地降低,这与 Pacis 等^[10]的研究结果一致。也有研究表明,在 CHO 细胞培养过程中补充过量的锰离子时会表现出不同的糖链构象,如在 CHO-K1 细胞株培养过程中添加 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 锰盐时,G1F 糖型含量增加,G0 和 G0F 糖型减少^[19],本研究中也观察到了 G1F 糖型含量的增加和 G0F 糖型含量的减少,但提高了 G0 糖型含量,同时 G1F' 和 G2F 糖型含量也有所提升,这可能是锌离子和丁酸钠共同影响了糖基化的结果,后续将继续研究这些物质对其他糖型的影响。

为优化培养性能,降低生产成本,商业培养基中添加微量金属离子、丁酸钠等培养基添加剂是必要的,这些添加剂的使用会影响细胞的生长状态、抗体产量及糖基化。在生物药行业,焦点

聚集在如何最大限度地减少原料的可变性,从而提高治疗性蛋白的产量和保持各批次间产品质量的一致性。糖基化作为 CQA 之一,可以显著影响抗体的结构和功能,其评估贯穿于开发的早期阶段、产品表征和法规申报,因此研究培养基添加剂对抗体糖基化的影响具有重大意义。此外,培养时间、铵离子浓度、渗透压等都会对抗体产量和糖基化造成影响。在 CHO 细胞培养的早期阶段,细胞处于对营养物质的吸收和代谢的快速增长期,此时抗体产量可能较低,随着培养时间的增加,细胞数量增多,细胞代谢逐渐稳定,抗体的产量也会逐渐增加。然而,过长的培养时间可能会导致铵根离子堆积、渗透压升高和细胞死亡,并且可能影响糖基化酶的活性和细胞内的糖基化途径,从而降低抗体产量和改变糖基化结果,进一步深入研究这些因素的影响将极大地推动生物制药产业的进一步创新和发展。

5 结论

本研究运用 JMP 软件响应曲面设计-中心复合设计考察锰离子、锌离子和丁酸钠组合使用对 CHO 细胞的生长、抗体产量和 Man5 糖型含量的影响,结果表明,三种因子对 CHO 细胞的生长、抗体产量和 Man5 糖型含量的调控发挥着重要作用,控制三者间的添加浓度可有效提高抗体产量和优化抗体糖型。

参考文献

- [1] Raab N, Zeh N, Schlossbauer P, et al. A blueprint from nature: miRNome comparison of plasma cells and CHO cells to optimize therapeutic antibody production [J]. *New Biotechnol*, 2022, 66: 79-88.
- [2] Yang YX, Li ZM, Li Q, et al. Increase recombinant antibody yields through optimizing vector design and production process in CHO cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106 (13-16): 4963-4975.
- [3] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22 (11): 1393-1398.
- [4] Choi SS, Rhee WJ, Kim EJ, et al. Enhancement of recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells through anti-apoptosis engineering using 30Kc6 gene [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95 (3): 459-467.
- [5] Chen KQ, Liu Q, Xie LZ, et al. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72 (1): 55-61.
- [6] Sun YT, Zhao L, Ye ZY, et al. Development of a fed-batch cultivation for antibody-producing cells based on combined feeding strategy of glucose and galactose [J]. *Biochem Eng J*, 2013, 81: 126-135.
- [7] Wada R, Matsui M, Kawasaki N. Influence of *N*-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms [J]. *MABS*, 2019, 11 (2): 350-372.
- [8] McMurray-Beaulieu V, Hisiger S, Durand C, et al. Na-butyrate sustains energetic states of metabolism and t-PA productivity of CHO cells [J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, 108 (2): 160-167.
- [9] Sung YH, Song YJ, Lim SW, et al. Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells [J]. *J Biotechnol*, 2004, 112 (3): 323-335.
- [10] Pacis E, Yu M, Autsen J, et al. Effects of cell culture conditions on antibody *N*-linked glycosylation-what affects high Mannose 5 glycoform [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108 (10): 2348-2358.
- [11] Kim BG, Park HW. High zinc ion supplementation of more than 30 μ M can increase monoclonal antibody production in recombinant Chinese hamster ovary DG44 cell culture [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100 (5): 2163-2170.
- [12] 张鑫涛,唐红萍,赵亮,等.金属离子对 CHO 细胞抗体表达及抗体电荷分布的影响 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32 (8): 233-241.
- [13] Coulet M, Kepp O, Kroemer G, et al. Metabolic profiling of CHO cells during the production of biotherapeutics [J]. *Cells*, 2022, 11 (12): 19-29.
- [14] Li JC, Wong CL, Vijayasankaran N, et al. Feeding lactate for CHO cell culture processes: impact on culture metabolism and performance [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109 (5): 1173-1186.
- [15] Roca BC, Miguez AA, Keenan J, et al. Zinc supplementation increases protein titer of recombinant CHO cells [J]. *Cytotechnology*, 2019, 71 (5): 915-924.
- [16] Rahimi-Zarchi M, Shojaosadati SA, Amiri MM, et al. All-trans retinoic acid in combination with sodium butyrate enhances specific monoclonal antibody productivity in recombinant CHO cell line [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2018, 41 (7): 961-971.
- [17] Ferris SP, KodaliVK, Kaufman RJ. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7 (3): 331-341.
- [18] Hutter S, Villiger TK, Bruhlmann D, et al. Glycosylation flux analysis reveals dynamic changes of intracellular glycosylation flux distribution in Chinese hamster ovary fed-batch cultures [J]. *Metab Eng*, 2017, 43: 9-20.
- [19] St Amand MM, Radhakrishnan D, Robinson AS, et al. Identification of manipulated variables for a glycosylation control strategy [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111 (10): 1957-1970.

(收稿日期: 2023-07-06; 修回日期: 2023-08-18)

槐米药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究及量值传递分析

任晶^{1, 2}, 刘俊潼¹, 鄢必新², 白冰², 展月², 张庆贺^{1*}, 陈长宝^{1*} (1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117; 2. 吉林修正药业新药开发有限公司, 长春 130103)

摘要: 目的 建立槐米药材、饮片、标准汤剂及配方颗粒的 HPLC 特征图谱, 对其相关性进行评价并考察量值传递规律。方法 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 257 nm, 柱温为 30 °C, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。以特征图谱为对照, 比较 15 批槐米药材-饮片-标准汤剂-配方颗粒特征图谱及相关性, 分析其量值传递规律。结果 15 批槐米药材、饮片、标准汤剂及配方颗粒 HPLC 特征图谱共确定了 7 个共有峰, 并指出芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、槲皮素、异鼠李素 6 种成分, 经过相似度比较, 槐米药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒特征图谱相似度均大于 0.90, 主要化学成分组成基本相同, 相关性较好。对生产过程中各环节样品测定指标成分含量及转移率, 未出现离散的数据, 有较好的传递性。结论 建立的槐米药材、饮片、标准汤剂及配方颗粒的 HPLC 特征图谱, 能较全面地反映槐米药材、饮片、标准汤剂及配方颗粒的多成分整体面貌, 为槐米配方颗粒生产过程的质量控制提供了科学依据。
关键词: 槐米药材; 饮片; 标准汤剂; 配方颗粒; HPLC; 特征图谱; 相关性
中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)01-0129-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.020

Correlation and value transfer of HPLC characteristic chromatogram of raw herbs, decoction pieces, standard decoction and formula granules of Flos Sophora Immaturus

REN Jing^{1, 2}, LIU Jun-tong¹, YAN Bi-xin², BAI Bing², ZHAN Yue², ZHANG Qing-he^{1*}, CHEN Chang-bao^{1*} (1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117; 2. Xiuzheng Pharmaceutical New Drug Development Co., Ltd., Changchun 130103)

Abstract: Objective To establish the HPLC characteristic chromatogram of raw herbs, decoction pieces, standard decoction, and formula granules of Flos Sophora Immaturus and determine their correlation and quantity transfer. **Methods** Agilent ZORBAX SB-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 257 nm and the column temperature was 30 °C. In contrast with the reference characteristic chromatogram, the characteristic chromatogram and correlation of 15 batches of Flos Sophora Immaturus raw herbs-decoction pieces-standard decoction-formula granules were compared, and the quantity value transfer laws were analyzed. **Results** Totally 7 common peaks were confirmed in the HPLC characteristic chromatogram of 15 batches of raw herbs, decoction pieces, standard decoction, and formula granules of Flos Sophora Immaturus showed 7 characteristic narcissoside, quercetin, isorhamnetin could be identified. The similarity of characteristic chromatogram of raw herbs, decoction pieces, standard decoction, and formula granules of Flos Sophora Immaturus was all greater than 0.90.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (No. 20220204083YY); 长春中医药大学杏林学者工程 (No.QNKXJ2-2021-ZR16)。

作者简介: 任晶, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析研究, email: 544515354@qq.com ***通信作者:** 张庆贺, 女, 讲师, 主要从事中药健康产品研发与开发, email: zhangqh@ccucm.edu.cn; 陈长宝, 男, 教授, 主要从事中药资源研究与开发, email: ccb2021@126.com

The main chemical compositions were basically the same, with good correlation. The content and transfer rate of index components were determined and no dispersion was found, suggesting good transferability. **Conclusion** The HPLC characteristic chromatogram of raw herbs, decoction pieces, standard decoction, formula granules of Flos Sophora Immaturus is established, reflecting the overall appearance of multiple components.

Key words: Flos Sophora Immaturus raw herb; decoction piece; standard decoction; formula granule; HPLC; characteristic chromatogram; correlation

槐米为豆科植物槐 (*Sophora japonica* L.) 的干燥花蕾, 其性微寒, 味苦, 具有凉血止血、清肝泻火的功效, 可用于便血、痔血、血痢、崩漏、衄血、肝热目赤、头痛眩晕等症状的治疗^[1]。槐米含有黄酮、皂苷、甾醇等成分, 主要活性成分为芦丁、槲皮素等黄酮类化合物^[2], 其有效成分具有抗癌防癌、镇痛、抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化等多种活性, 能够改善心肌循环、清热解毒、降血脂、软化血管。我国是中药槐米的原产地, 在全国多地均有种植, 资源丰富^[3]。槐米配方颗粒是以槐米药材为原料, 经水提、浓缩、干燥、制粒而成, 经中医临床配方后, 供患者即冲即服的颗粒^[4-5]。配方颗粒与药材之间的药效存在着较强的关联性, 目前对槐米的质量评价大多还着重于芦丁的含量测定, 如果仅用某成分的含量限度作为质量控制指标, 较难全面地说明配方颗粒的整体质量。目前有槐米药材的指纹图谱研究相关报道, 但尚无对槐米及其制剂产品之间的相关性研究, 更缺乏槐米药材-饮片-标准汤剂-配方颗粒特征图谱之间的相关性研究。为保证槐米配方颗粒安全、有效、质量可控, 本研究建立了槐米药材-饮片-标准汤剂-配方颗粒的 HPLC 特征图谱, 对其相关性进行评价, 并考察量值传递规律, 不仅能全面控制配方颗粒的质量, 而且能反映配方颗粒制备工艺的稳定性, 为槐米配方颗粒制备全过程的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

戴安 U3000 高效液相色谱仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; MS105DU 型电子天平、TOLEDO XPR2 型百万分之一分析天平 (梅特勒-托利多公司); SB25-12DT 型超声波清洗器 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 材料

水仙苷 (批号: 111997-201501, 纯度: 93.1%)、芦丁 (批号: 100080-202012, 纯度: 91.6%)、山柰酚-3-O-芸香糖苷 (批号: 112007-201602, 纯度: 90.8%)、异鼠李素 (批号: 110860-202012, 纯度: 99.1%)、异槲皮苷 (批号: 111809-202205, 纯

度: 96.3%)、槲皮素 (批号: 100081-201610, 纯度: 99.1%) (中国食品药品检定研究院); 乙腈为色谱纯 (默克股份有限公司); 乙醇、甲醇、磷酸 (分析纯, 北京化工厂); 其他试剂均为分析纯。在全国范围内共收集样品 15 批, 经长春中医药大学陈长宝教授鉴定为豆科植物槐 (*Sophora japonica* L.) 的干燥花蕾, 由修正药业配方颗粒工艺研究室制成同批号饮片、标准汤剂、配方颗粒, 批号及药材具体来源见表 1。

表 1 样品信息

Tab 1 Sample information

产地	编号			
	药材	饮片	标准汤剂	配方颗粒
河北省安国市祁州镇	A1	B1	C1	D1
河北省安国市祁州镇	A2	B2	C2	D2
河北省安国市祁州镇	A3	B3	C3	D3
陕西省渭南市富平县	A4	B4	C4	D4
陕西省渭南市富平县	A5	B5	C5	D5
陕西省渭南市富平县	A6	B6	C6	D6
重庆市巫山县双龙镇	A7	B7	C7	D7
重庆市万州区甘宁镇甘宁乡	A8	B8	C8	D8
重庆市巫山县福田镇	A9	B9	C9	D9
河南省驻马店市泌阳县	A10	B10	C10	D10
河南省驻马店市泌阳县	A11	B11	C11	D11
山西省稷山县稷峰镇	A12	B12	C12	D12
山西省稷山县清河镇	A13	B13	C13	D13
山西省晋中市灵石县	A14	B14	C14	D14
山西省晋中市灵石县	A15	B15	C15	D15

2 方法与结果

2.1 槐米药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的 HPLC 特征图谱

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 (A)-0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 17%~20%A; 15~25 min, 20%~25%A; 25~35 min, 25%~35%A; 35~50 min, 35%~45%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 检测波长 257 nm; 进样量 5 μL。

2.1.2 参照物溶液制备 取槐米对照药材 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 25 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减

失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 作为对照药材参照物溶液。另取芦丁、水仙苷对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 作为对照品参照物溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》, 制备槐米的标准汤剂(每克标准汤剂相当于 3.0 g 饮片), 编号 C1 ~ C15, 具体方法如下: 取槐米饮片 100 g, 精密称定, 加 10 倍量水浸泡 30 min, 武火煮沸, 文火保持微沸 30 min, 趁热滤过; 药渣加 8 倍水煎煮, 武火煮沸, 文火保持微沸 30

min, 趁热滤过, 合并两次煎液, 减压浓缩, 冷冻干燥得标准汤剂粉末。

称取槐米药材、饮片粉末(均过四号筛)约 0.1 g, 标准汤剂、配方颗粒粉末(研细)约 0.03 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 25 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 测定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 5 μ L, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录 50 min 色谱图, 见图 1 ~ 2。

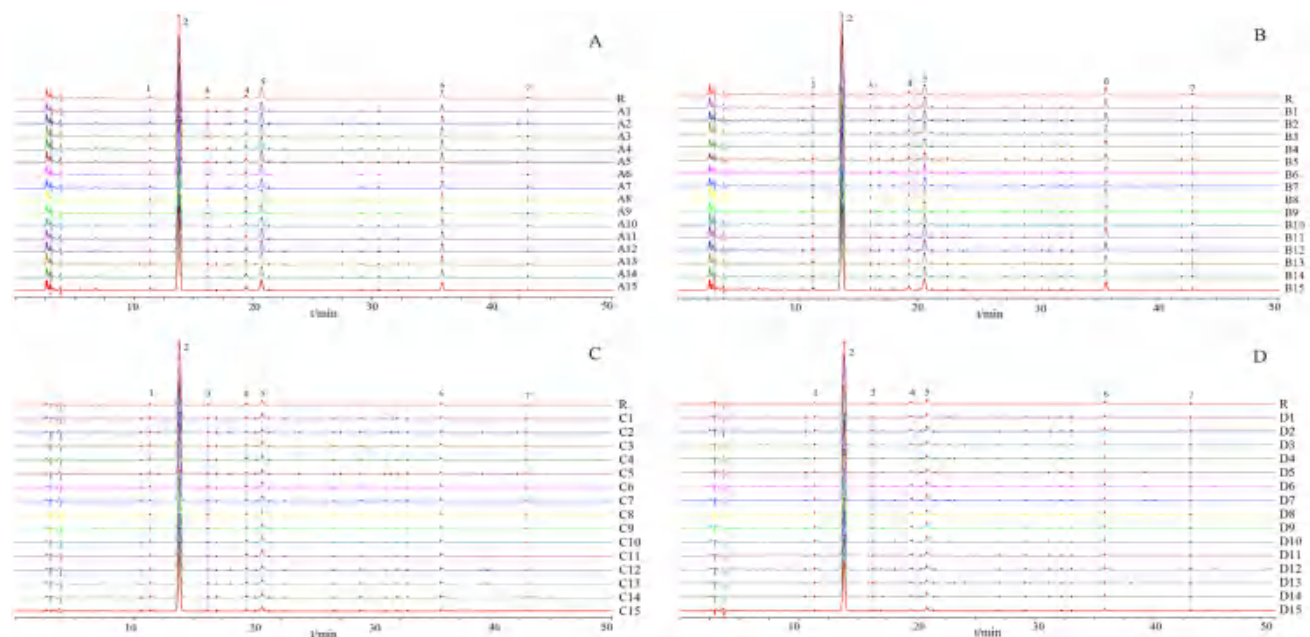


图 1 对照特征图谱(R)及槐米药材(A)、饮片(B)、标准汤剂(C)、配方颗粒(D)HPLC特征图谱

Fig 1 Reference characteristic chromatogram (R), and HPLC characteristic chromatogram of raw herbs (A), pieces (B), standard decoction (C), and formula granules (D) of 15 batches of FSI

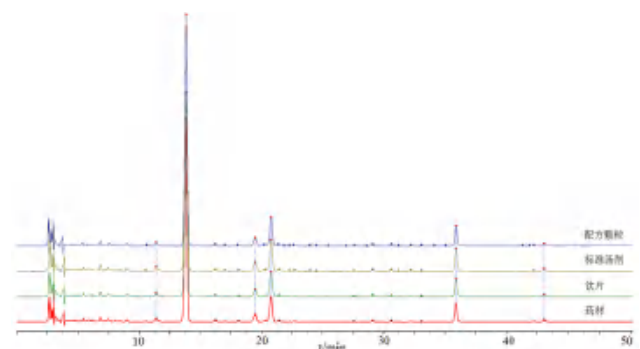


图 2 槐米药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒 HPLC 对照特征图谱

Fig 2 HPLC characteristic chromatogram of SFI raw herbs, decoction pieces, standard decoction, and formula granules

2.2 方法学考察

2.2.1 专属性试验 分别取空白溶液、对照品溶液及供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 结果如图 3 所示, 供试品溶液色谱在与各

对照品溶液色谱相应的保留时间处具有相同的色谱峰, 指认了芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、槲皮素、异鼠李素 6 种成分, 且空白溶剂无干扰, 表明该方法专属性良好。

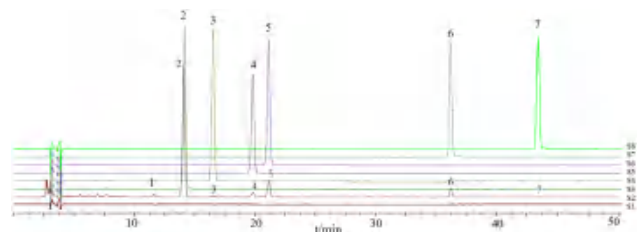


图 3 专属性试验 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of specific test

S1. 空白溶液 (blank solvent); S2. 配方颗粒供试品溶液 (formula granules sample); S3. 芦丁 (rutin); S4. 异槲皮苷 (isoquercitrin); S5. 山柰酚-3-O-芸香糖苷 (kaempferol 3-O-rutinoside); S6. 水仙苷 (narcissoside); S7. 槲皮素 (quercetin); S8. 异鼠李素 (isorhamnetin)

2.2.2 精密度试验 取同一供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件重复进样 6 次,分别对特征峰的相对保留时间及相对峰面积进行计算,结果显示各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 *RSD* 范围分别为 0.05%~0.11% 和 0.15%~2.5%,表明仪器精密度良好。

2.2.3 重现性试验 取供试品,按“2.1.3”项下方法分别制备 6 份供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,分别对特征峰的相对保留时间及相对峰面积进行考察,结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 *RSD* 范围分别为 0.04%~0.15% 和 0.12%~2.8%,表明本方法重现性良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 进样测定。结果显示各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 *RSD* 范围分别为 0.02%~0.12% 和 0.17%~2.1%,表明供试品溶液在 24 h 内较稳定。

2.3 共有峰的标定

将槐米配方颗粒的 HPLC 特征图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2012 版)对色谱图进行匹配,经比较分析后确定 7 个共有峰,同法采集药材、饮片、标准汤剂的特征图谱,发现药材、饮片、标准汤剂均有 7 个共有峰,与对照特征图谱相似度均达到了 0.90 以上^[6-7],见表 3。选择峰 5(水仙苷)为参照峰,因为芦丁峰面积较大,超过总峰面积的 50%,不适宜作为参照峰来计算其他峰的相对峰面积比,5 号峰峰面积适中,所以选择 5 号峰作为参照峰。

表 3 15 批槐米药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒特征图谱的相似度
Tab 3 Similarity of the characteristic chromatograms of 15 batches of SFI raw herbs, decoction pieces, standard decoction, and formula granules

编号	药材	饮片	标准汤剂	配方颗粒
1	0.996	0.983	0.962	0.953
2	0.996	0.998	0.998	0.949
3	0.987	0.972	0.931	0.993
4	0.982	0.956	0.943	0.931
5	0.957	0.963	0.937	0.955
6	0.964	0.975	0.958	0.971
7	0.965	0.961	0.964	0.953
8	0.962	0.986	0.993	0.978
9	0.943	0.957	0.997	0.946
10	0.947	0.943	0.949	0.959
11	1.000	0.987	0.991	0.973
12	0.975	0.971	0.975	0.986
13	0.957	0.951	0.973	0.975
14	0.932	0.932	0.956	0.939
15	0.935	0.945	0.969	0.974

2.4 相关性分析

从整体上看,槐米药材、饮片、标准汤剂及

配方颗粒 HPLC 特征图谱的 1~7 号峰是共有峰。结果显示,15 批次槐米药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒特征图谱相似度分别在 0.931~1.000,说明槐米药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒相似度极高,能够较好地保留药材的特征性成分,具有整体物质的一致性,其化学成分相关性较好^[8]。饮片经过现代化提取、浓缩等工艺制成配方颗粒后主要化学成分组成基本相同,制得的槐米配方颗粒与传统标准汤剂具有一定的等效性,表明槐米配方颗粒的制备工艺稳定、可行^[9]。

2.5 含量测定及量值传递分析

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-1%冰醋酸溶液(32:68);检测波长 257 nm;流速 1 mL·min⁻¹;柱温 30℃;进样量 10 μL。理论塔板数按芦丁峰计算应不低于 2000。

2.5.2 溶液的制备 取芦丁对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.05 mg 的溶液,即得。供试品溶液制备方法同“2.1.3”项下。

2.5.3 指标成分的含量及转移率的测定 精密吸取各供试品溶液 10 μL,按“2.5.1”项下方法对 15 批槐米药材、饮片、提取物膏粉、配方颗粒、标准汤剂进行含量测定^[10],按照以下公式计算芦丁转移率:槐米药材-饮片转移率(%)=槐米饮片中指标成分的含量/槐米药材中指标成分的含量×100%;槐米饮片-提取物膏粉转移率(%)=槐米提取物膏粉中指标成分的含量×出膏率/槐米饮片中指标成分的含量;槐米饮片-配方颗粒转移率(%)=槐米配方颗粒中指标成分的含量×出膏率/槐米饮片中指标成分的含量/干膏粉占比;槐米饮片-标准汤剂转移率(%)=槐米标准汤剂中指标成分的含量×出膏率/槐米饮片中指标成分的含量;出膏率(%)=干膏重/饮片质量×100%。结果见表 4。

2.5.4 量值传递分析 标准汤剂是配方颗粒中间体和成品标准的关键参照物,本研究得到的 15 批槐米饮片到标准汤剂转移率范围为 43.43%~59.00%,均值为 51.19%;出膏率范围为 28.57%~34.21%,均值为 32.07%;指标成分含量范围为 26.30%~35.34%,均值为 31.11%;对槐米配方颗粒生产过程中各关键环节样品进行含量测定,结果表明各环节转移率、出膏率及指标性成分含量均在标准汤剂范围内,量值传递较好^[11]。本研究中饮片-配方颗粒芦丁转移率略低于同批次饮片-标准汤剂转移率,可能由于标准汤剂制备为冷冻干燥,未添加辅料;配方颗粒在生产过程中为喷雾干燥,制备过程中增添少量辅料,生产过程中出现指标成分损失,造成转移率略低。

表 4 15 批样品含量及转移率测定结果

Tab 4 Determination of content and transfer rate of 15 batches of samples

No.	槐米原料			提取物膏粉		配方颗粒		标准汤剂		
	药材含量 /%	饮片含量 /%	转移率 /%	出膏率 /%	转移率 /%	含量 /%	转移率 /%	出膏率 /%	转移率 /%	含量 /%
1	20.2	19.9	98.51	27.26	45.13	26.52	44.43	28.57	48.16	33.54
2	19.3	19.1	98.96	32.13	46.48	26.21	45.74	32.99	47.90	27.73
3	18.7	18.2	97.33	28.43	49.91	23.97	43.91	29.45	53.16	32.85
4	20.5	19.1	93.17	30.98	42.17	26.22	41.76	31.54	43.43	26.30
5	20.5	20.1	98.05	32.32	52.76	30.54	50.65	32.76	53.80	33.01
6	20.3	20.8	102.46	31.20	42.12	25.60	41.03	31.90	44.29	28.88
7	20.2	19.1	94.55	32.71	52.19	30.20	51.71	33.61	54.68	31.08
8	20.1	19.9	99.00	28.50	49.43	29.03	48.62	29.84	51.89	34.61
9	21.7	21.0	96.77	32.25	47.27	28.59	45.38	33.57	49.52	30.98
10	18.6	18.9	101.61	31.39	51.15	27.58	48.64	31.77	52.27	31.10
11	21.5	20.9	97.21	32.36	53.19	31.62	50.43	34.21	57.21	34.95
12	18.9	18.1	95.77	31.02	49.31	26.40	48.61	33.46	55.22	29.88
13	20.1	19.9	99.00	33.08	44.07	25.28	42.35	32.87	44.29	26.81
14	19.8	19.2	96.97	30.41	54.24	29.76	51.66	32.05	59.00	35.34
15	19.2	18.1	94.27	32.13	49.19	25.59	47.13	32.43	53.05	29.61

3 讨论

本研究在对特征图谱方法建立过程中, 分别采用甲醇、70% 甲醇、乙醇不同提取溶剂及热回流、超声不同提取方法进行考察, 从提取的全面性、稳定性、操作便捷性等方面进行考察, 最终选择槐米提取溶剂为甲醇, 提取方法为超声提取法, 提取时间为 0.5 h。分别考察不同检测波长, 结果表明在 257 nm 时各成分色谱行为较好, 综合考虑其出峰数量、峰形、响应值等情况, 选定检测波长为 257 nm; 考察柱温为 25、30、35 °C 的色谱图, 结合色谱峰分离度、对称性及实际室内温, 选定柱温为 30 °C^[12]。分别考察了乙腈 -0.1 冰醋酸、乙腈 -0.05%、乙腈 -0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱, 并对上述洗脱条件进行调整, 结果表明以乙腈 -0.1% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱, 色谱峰分离效果较好, 峰形较好^[13]。

配方颗粒作为中药饮片改革的新趋势, 具有免煎煮、便于调配及携带、使用灵活、用药精准等优点。经制剂工艺加工而成的中药配方颗粒已失去了饮片所具有的外观辨别特征, 在显微结构下也不易鉴别, 并且以单一成分衡量质量标准很难反映配方颗粒的整体特征, 特征图谱能最大限度获取配方颗粒、标准汤剂、饮片及药材之间的化学信息, 高效地将中药配方颗粒的内在信息反馈在图谱中, 直观观察和评价内在质量^[14]。本研究中, 槐米药材 - 饮片 - 标准汤剂及配方颗粒的对照图谱的主要峰基本一致, 主要化学成分组成基本相同, 建立的 HPLC 特征图谱确定了 7 个共有峰, 并指认了 6 个色谱峰, 该分析方法简便、稳定、重现性好, 能较全面地反映槐米药材、饮片、标准汤剂及配方颗粒的内在质量^[15]。通过对芦丁含量及转移率的测定, 并以槐米标准汤剂为参照基准, 对槐米进行质量评价, 全面反映了槐米配方颗粒量

值传递情况, 从而实现配方颗粒质量专属性与整体性的综合管控, 提高了配方颗粒质量整体控制水平。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 370.
- [2] 胡明月, 梁艳, 王丽. 槐米化学成分与药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(12): 2141-2142.
- [3] 李秋红, 栾仲秋, 王继坤. 中药槐米的化学成分、炮制研究及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2017, 47(2): 112-116.
- [4] 何军, 朱旭江, 杨平荣, 等. 中药配方颗粒的现状与发展新思路[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4717-4725.
- [5] 陈苇, 李建华, 夏雨, 等. 中药配方颗粒外用研究进展[J]. 中国处方药, 2020, 18(8): 18-21.
- [6] 殷文俊, 何洁玉, 许鑫, 等. 基于特征图谱和量值传递关系评价荆芥配方颗粒的关键生产工艺[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1357-1362.
- [7] 毛小文, 祁梅, 顾志荣, 等. 红芪药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱相关性研究[J]. 中南药学, 2022, 20(2): 399-404.
- [8] 方雯雯, 成守玲, 陈培胜, 等. 白芷药材 - 饮片 - 提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究[J]. 中草药, 2016, 47(18): 3211-3214.
- [9] 孙源源, 施萍. 借助中药配方颗粒推进中药国际化的对策研究[J]. 中草药, 2013, 44(8): 929-934.
- [10] 陈璐, 耿柏林, 郭禄晶, 等. 不同产地槐米中芦丁的提取及含量测定比较[J]. 农业科技与信息, 2020, 37(8): 58-60.
- [11] 胡明月, 梁艳, 王丽. 槐米化学成分与药理作用研究进展[J]. 实用中医药志, 2021, 37(12): 2141-2143.
- [12] 刘金亮, 李隆云, 何光华, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学与抗氧化能力评价不同产地槐米的品质[J]. 中草药, 2018, 49(19): 4644-4652.
- [13] 李振志, 朱华, 谢锋, 等. 不同产地槐米中芦丁的含量测定[J]. 世界中医药, 2013, 8(8): 952-954.
- [14] 杨立伟, 王海南, 耿莲, 等. 基于标准汤剂的中药整体质量控制模式探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 1-5.
- [15] 刘小柔, 严启新, 王存芳. 槐米的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 118-119.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-08)

基于 QbD 理念的经典名方研究：真武汤的提取工艺优化研究

李明慧, 张钰明, 卢新颖, 李花花, 彭紫薇, 宋扬, 翟晓峰, 顾妍, 热西旦木·马木江, 白洁*, 杜守颖* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于质量源于设计 (QbD) 理念, 优化经典名方真武汤的提取工艺。**方法** 以芍药苷、6-姜辣素的含量和出膏率作为真武汤提取工艺的关键质量属性, 筛选潜在关键工艺参数, 在单因素试验结果的基础上采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化提取工艺, 建立真武汤提取工艺的设计空间, 并进行空间优化, 验证得到最佳提取工艺。**结果** 通过设计空间的优化, 得到真武汤的最佳提取工艺: 加水倍量 10 倍、提取时间 60 min、提取次数 1 次。**结论** 该研究基于质量源于设计理念, 开发得到的制剂中间体与基准样品的关键质量属性保持一致, 可为后续颗粒剂的制备工艺奠定基础。

关键词: 真武汤; 提取工艺; 响应面法; 基准样品; 设计空间

中图分类号: R283, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)01-0134-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.021

Classical prescription based on QbD concept: optimization of extraction for modified Zhenwu decoction

LI Ming-hui, ZHANG Yu-ming, LU Xin-ying, LI Hua-hua, PENG Zi-wei, SONG Yang, ZHAI Xiao-feng, GU Yan, Rexidanmu · Mamujiang, BAI Jie*, DU Shou-ying* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To optimize the extraction of Zhenwu decoction based on the concept of quality by design (QbD). **Methods** The content of paeoniflorin, 6-curcumin and the extraction amount of solid matter were used as critical quality attributes of the extraction technology. Potential critical process parameters were selected. Based on the results of single factor experiment, Box-Behnken design-response surface methodology was used to optimize the extraction technology, and the design space of Zhenwu decoction extraction was established to verify the best extraction technology. **Results** By optimizing the design space, the optimum extraction of Zhenwu decoction was as follows: 10 times of water, 60 min extraction and once. **Conclusion** Based on the concept of quality by design, the developed formulation intermediates are consistent with the critical quality attributes of the benchmark sample, and provide a basis for the preparation of subsequent granules.

Key words: Zhenwu decoction; extraction technology; response surface methodology; benchmark sample; design space

真武汤为第一批经典名方目录中的第八方, 此方首载于张仲景编著的《伤寒论》, 由茯苓、芍药、生姜、白术和附子 5 味药组成, 具有温阳利水的功效, 主治阳虚水泛证^[1]。现代临床多用于慢性肾炎、肾病综合征、尿毒症、糖尿病肾病、心律失常等阳虚水饮内停者。将其开发为颗粒剂,

可更好地满足临床顺应性的要求。

根据经典名方研究的相关文件, 颗粒剂的关键质量属性 (CQAs) 应与基准样品保持一致, 以确保其质量符合标准, CQAs 包括指纹图谱相似度、指标性成分含量以及出膏率。经典名方颗粒剂的工艺研究的重点并非追求 CQAs 的最高水平, 而是确

作者简介: 李明慧, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: july1912@163.com *通信作者: 白洁, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: baijie22811@163.com; 杜守颖, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: dushouying@263.net

保 CQAs 与基准样品的质量标准范围保持较高的一致性。质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念注重全面了解和把握整个制药过程, 注重对生产工艺的理解, 以及生产过程中的产品质量的监管和控制, 从而指导整体理论^[2-5]。

在 QbD 理念下优化经典名方真武汤的提取工艺, 能够有效地控制颗粒剂制备工艺过程, 从而获得与基准样品一致的重要特性。提取工艺对颗粒剂的最终质量有直接影响, 是整个制备工艺中质量传递的关键环节。中药提取的结果受到人为操作、环境条件、药材本身、使用的仪器设备以及提取过程中的条件等因素的影响。其中, 提取条件是关键因素。采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化提取工艺, 有效地控制提取条件, 才能确保 CQAs 与基准样品一致。

课题组前期成功制备了 15 批真武汤基准样品^[6], 并最终确定了以指纹图谱相似度、芍药苷和 6-姜辣素的含量以及出膏率作为 CQAs 并确定其范围。本研究以 QbD 理念为基础, 以指标性成分的含量和出膏率为衡量标准, 在单因素筛选的基础上, 利用响应面法进行提取工艺的优化, 构建一个提取工艺的设计空间, 以筛选出最佳的提取条件, 从而确保制剂中间体和基准样品在 CQAs 方面保持一致, 为后续颗粒剂的制备工艺奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

赛多利斯 BSA 224S 电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); JM-B10002 电子天平 (余姚市纪铭称重校验设备有限公司); HH-6 型电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥器 (上海一恒科技有限公司); DZF-6051 型真空干燥器 (北京利康达圣科技有限公司); DZTW 1000 mL 电子调温电热套、DZTW 250 mL 电子调温电热套 (北京中仪泓瑞科技发展有限公司); KQ5200DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SHB-III 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); Thermo Fisher U3000 高效液相色谱仪 [DAD 检测器, CM 7.2 色谱工作站, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

1.2 试药

芍药苷对照品 (批号: 110736-201842, 纯度: 97.48%)、6-姜辣素对照品 (批号: 111833-201705, 纯度: 96.8%) (中国食品药品检定研究院); 乙腈、甲醇、磷酸 (Fisher 公司, 色谱级); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 甲醇 (分析纯)。

茯苓饮片 (批号: 20200901, 产地: 安徽岳西); 白芍饮片 (批号: 20200801, 产地: 浙江磐安); 白术饮片 (批号: 20200801, 产地: 浙江磐安); 生姜饮片 (批号: GX1, 产地: 广西百色); 附子饮片 (批号: SCJ20200701, 产地: 四川江油)。

2 方法与结果

2.1 真武汤基准样品对应实物的制备^[6]

称取茯苓、白芍、生姜饮片各 41.4 g, 白术饮片 27.6 g、附子饮片 15 g 于陶瓷砂锅内, 加入 1600 mL 水, 武火 (1600 W) 煮至沸腾, 后用文火 (800 W) 继续煎煮约 70 min, 用一层 300 目尼龙筛网趁热 (约 80 °C) 过滤, 滤液放凉后加水调整体积至 600 mL。精密移取一定量的水煎液于 25 mL 西林瓶中, 于冰箱冷冻层预冻 12 h 后, 转移至 -80 °C 的真空冷冻干燥机中 (真空度为 4 ~ 5 Pa), 冷冻 3 d, 得基准样品对应实物。

2.2 CQAs 和关键工艺参数 (CPPs) 的确定

2.2.1 CPPs 的筛选及风险评估 采用鱼骨图作为风险辨识工具, 按照“仪、环、人、药、法”梳理挖掘质量风险相关工艺参数, 初步确定潜在的 CPPs (见图 1)。根据前期研究经验^[6], 选择提取次数、提取时间、提取加水倍量为真武汤提取工艺的关键考察因素。

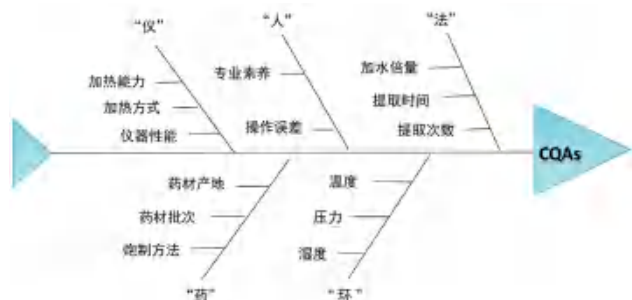


图 1 真武汤提取工艺参数风险辨识鱼骨图

Fig 1 Risk identification of the extraction parameters of Zhenwu decoction

2.2.2 CQAs 的确定 依据前期确定的基准样品标准^[6] 选取芍药苷、6-姜辣素含量以及出膏率为 CQAs。

2.3 指标性成分含量测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 芍药苷测定的色谱柱: Thermo Acclaim 120-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (14 : 86); 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 对照品与供试品进样体积: 10 μL。

6-姜辣素测定的色谱柱: Thermo Acclaim 120-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-水 (40 : 5 : 55); 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 对照品进样体积:

8 μL ; 供试品进样体积: 20 μL 。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷, 加甲醇将其定容至 10 mL 量瓶中, 最后配制成 213 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液。精密称取 6-姜辣素, 加纯甲醇定容至 10 mL 量瓶, 最后配制成 21.325 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6-姜辣素对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备

① 基准样品供试品溶液的制备: 精密称取 0.1 g 冻干粉于 10 mL 量瓶中, 加 10 mL 25% 甲醇溶液超声 30 min (250 W, 40 kHz), 放冷后, 用 25% 甲醇溶液补足并定容, 振匀后, 静置, 取上清液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

② 提取液供试品溶液的制备: 取 1 个处方量的饮片, 置于圆底烧瓶中, 加适量水, 回流 70 min, 300 目尼龙筛网趁热过滤, 补足体积, 精密移取 1 mL 提取液用水稀释相应倍数后离心, 过滤, 即得。

③ 阴性样品溶液: 逐个去除处方中缺味药饮片, 分别制备不含白芍和生姜的阴性样品, 制备阴性基准样品, 按照①项下方法制备阴性样品溶液。

2.3.4 线性关系考察 按“2.3.2”项下方法制备 998.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芍药苷对照品溶液和 230.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 6-姜辣素对照品溶液, 逐级稀释成系列浓度的对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 分别对芍药苷、6-姜辣素质量浓度进行线性回归, 得回归方程芍药苷: $A = 0.2104C - 0.9087$, $R^2 = 0.9999$, 线性范围为 19.97 ~ 998.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 6-姜辣素: $A = 0.0733C + 0.0059$, $R^2 = 0.9998$, 线性范围为 2.302 ~ 230.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.5 精密度考察 取供试品溶液 1 份, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算得芍药苷、6-姜辣素的峰面积的 *RSD* 值分别为 0.76%、1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取供试品溶液于 0、3、6、9、12、24 h 进样, 测定芍药苷、6-姜辣素的峰面积, 计算 *RSD*。由结果可知, 芍药苷和 6-姜辣素的峰面积的 *RSD* 值分别为 1.3%、0.37%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 按照供试品溶液的制备方法制备 6 个样品, 测得芍药苷、6-姜辣素的峰面积及 *RSD* 值分别为 2.3%、1.6%, 说明方法重复性良好。

2.3.8 加样回收试验 取基准样品 6 份, 每份 0.05 g, 分别精密加入 1.3052 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液 1 mL, 0.0483 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6-姜辣素对照品溶液 1 mL, 按“2.3.3”项下方法操作得到加样供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 计算得芍药苷、6-姜辣素的平均加样回收率分别

为 101.98%、97.78%, *RSD* 值分别为 3.0%、2.1%。

2.3.9 专属性试验 按照“2.3.3”项下方法分别制备阴性样品溶液和全方供试品溶液, 进样测定, 结果见图 2 与图 3。在此色谱条件下, 可准确测定全方中芍药苷和 6-姜辣素的含量而无干扰。

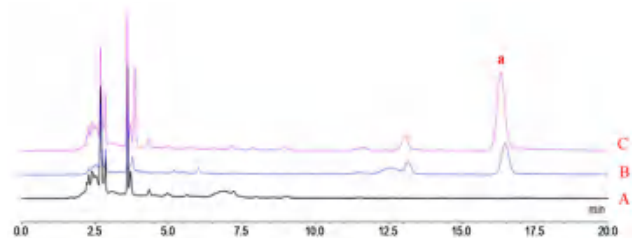


图 2 真武汤中白芍成分的 HPLC 图

Fig 2 HPLC of paeonia lactiflora in Zhenwu decoction

A. 白芍阴性样品 (negative sample without Paeonia lactiflora); B. 白芍样品 (Paeonia lactiflora sample); C. 全方样品 (whole sample); a. 芍药苷 (paeoniflorin)

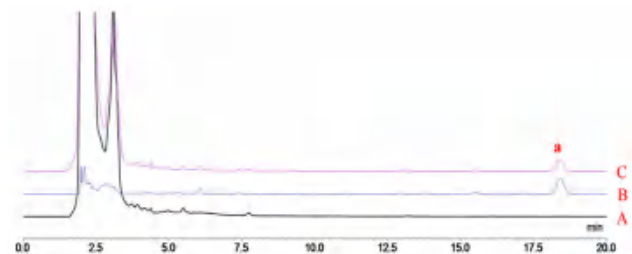


图 3 真武汤中生姜成分的 HPLC 图

Fig 3 HPLC of ginger components in Zhenwu decoction

A. 生姜阴性样品 (negative sample without ginger); B. 生姜样品 (ginger sample); C. 全方样品 (whole sample); a. 6-姜辣素 (6-gingerol)

2.4 出膏率测定

2.4.1 基准样品出膏率的测定 根据前期研究^[6]称取处方量饮片于陶瓷砂锅内, 加水 1600 mL, 煎煮约 70 min 后, 用一层 300 目尼龙筛网趁热 (约 80 $^{\circ}\text{C}$) 过滤, 滤液放凉后加水调整体积至 600 mL。分取一半的水煎液 (300 mL) 以 600 W 浓缩至合适程度时, 于水浴锅浓缩成稠膏状后, 置于真空干燥箱, 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 称重, 计算出膏率。

出膏率 (%) = 干膏质量 / 生药质量 $\times 100\%$ 。

2.4.2 提取液出膏率的测定 将提取液于水浴锅浓缩至稠膏状后, 置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中, 3 d 后取出, 称重, 折算, 按上述公式计算出膏率。

2.5 单因素试验

以芍药苷、6-姜辣素含量及出膏率为考察指标, 固定提取次数 1 次, 提取时间为 1.5 h, 加水倍量分别为 8、10、15 倍进行加水倍量单因素试验考察; 固定提取次数为 1 次, 提取加水倍量为 10 倍, 提取时间为 1、1.5、2 h 进行提取时间单因素试验考察; 固定提取加水倍量为 10 倍, 提取时间为 1.5 h,

进行提取 1、2、3 次单因素考察, 结果见图 4。

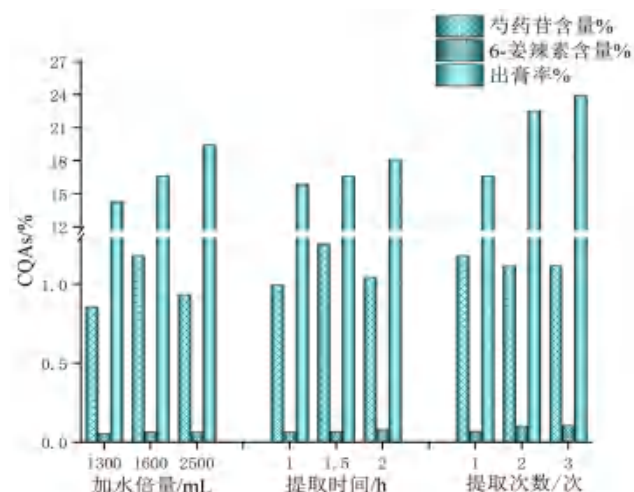


图 4 不同加水倍量、提取时间以及提取次数下芍药苷、6-姜辣素含量及出膏率柱状图

Fig 4 Histograms of paeoniflorin and 6-gingerol content and paste yield at different times of water addition, extraction time and number of extractions

由图 4 可知, 随着加水倍量的增加, 提取液中芍药苷的含量先增加后降低, 6-姜辣素含量与出膏率增加渐缓, 所以将响应面加水倍量的高水平设定为 15 倍。随着提取时间从 1 h 增加到 2 h, 芍药苷含量先增加后减少, 6-姜辣素含量与出膏率增加趋势逐渐变小, 所以将提取时间的高水平设定为 2 h。随着提取次数的增加, 芍药苷含量逐渐降低到基本不变, 6-姜辣素含量与出膏率增加趋势较缓, 最后基本不变。所以将提取次数高水平设定为 3 次。

2.6 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化真武汤提取工艺

2.6.1 因素水平设计

基于以上分析, 选取提取时间 A (X_1), 加水倍量 B (X_2), 提取次数 C (X_3) 三因素进行响应面试验设计。以两个指标成分含量 (Y_1 : 芍药苷含量; Y_2 : 6-姜辣素含量) 和出膏率 (Y_3) 为 CQAs, 采用 Design Expert 13.0 软件进行响应面设计和数据分析, 筛选出最佳提取工艺。最后, 选择三个试验点, 进行已建立模型的验证。

表 1 响应面设计因素水平

Tab 1 Factor and level of Box-Behnken design

水平	因素		
	X_1 加水倍数 / 倍	X_2 提取时间 / h	X_3 提取次数 / 次
-1	8	1	1
0	10	1.5	2
1	15	2	3

2.6.2 试验结果

17 组试验提取液中指标性成分含量和出膏率结果见表 2。

表 2 17 组试验提取液中指标性成分含量和出膏率结果

Tab 2 Content of index components and paste yield in 17 groups of test extracts

No.	A/倍	B/h	C/次	芍药苷含量 / %	6-姜辣素含量 / %	出膏率 / %
1	8	1	2	1.2722	0.0771	18.04
2	15	1	2	0.5806	0.0961	19.82
3	8	2	2	1.2817	0.0723	21.40
4	15	2	2	0.7700	0.1040	20.98
5	8	1.5	1	0.8566	0.0645	14.59
6	15	1.5	1	0.9356	0.0658	19.76
7	8	1.5	3	0.9456	0.0813	22.51
8	15	1.5	3	0.6140	0.0821	18.01
9	11.5	1	1	0.6334	0.0549	13.12
10	11.5	2	1	0.9807	0.0753	17.25
11	11.5	1	3	0.9829	0.0963	23.08
12	11.5	2	3	1.0214	0.1051	24.21
13	11.5	1.5	2	0.6778	0.0871	20.02
14	11.5	1.5	2	0.7733	0.0841	20.00
15	11.5	1.5	2	0.7731	0.0866	19.42
16	11.5	1.5	2	0.6672	0.0763	19.42
17	11.5	1.5	2	0.7485	0.0885	20.77

2.6.3 模型建立与评价

根据表 2 结果, 采用多项式及一项式回归模型对芍药苷含量、6-姜辣素含量、出膏率及对应的因素 (提取加水倍量、提取时间、提取次数) 分别进行拟合, 回归方程如下: Y_1 (芍药苷) = $0.73 - 0.063X_1 + 0.0965X_2 + 0.098X_3 + 0.045X_1X_2 - 0.10X_1X_3 - 0.077X_2X_3 + 0.091X_1^2 + 0.16X_2^2 + 0.019X_3^2 - 0.047X_1^2X_2 - 0.16X_1^2X_3 - 0.24X_1X_2^2$;

$$Y_2 \text{ (6-姜辣素)} = 0.082 + 0.006X_1 + 0.004X_2 + 0.013X_3;$$

$$Y_3 \text{ (出膏率)} = 19.93 + 0.1675X_1 + 1.32X_2 + 4.23X_3 - 0.55X_1X_2 - 2.42X_1X_3 - 0.75X_2X_3 - 0.2817X_1^2 + 0.4158X_2^2 - 0.9268X_3^2 - 0.1850X_1^2X_2 - 2.69X_1^2X_3 + 0.1725X_1X_2^2.$$

分别应用不同的回归类型对响应面试验结果进行方差分析, 结果见表 3 ~ 5, 芍药苷含量和出膏率的回归总模型的方差显著 ($P < 0.05$), 6-姜辣素的一项式回归总模型的方差显著 ($P < 0.05$); 所建三个模型均有统计学意义。 Y_1 (芍药苷含量) 和 Y_3 (出膏率) 二方程的 R^2 分别为 0.9849、0.9902, Y_2 (6-姜辣素含量) 的 $R^2 = 0.6102$, 因此三个回归方程均可用于后期的试验。

2.6.4 芍药苷含量的响应面分析

芍药苷含量的等高线和 3D 图如图 5 所示, 在图 5A 中, 当提取时间为 1.5 h 时, 提取次数的等高线密度超过了加水倍量, 说明提取次数对芍药苷含量的影响更大。在图 5B 中, 当提取次数固定为 2 次时, 提取时间的等高线密度高于加水倍量, 因此可以得出提取

表 3 芍药苷含量的方差分析

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.7010	12	0.0584	21.79	0.0045	significant
A- 加水倍数	0.0160	1	0.0160	5.95	0.0713	
B- 提取时间	0.0372	1	0.0372	13.88	0.0204	
C- 提取次数	0.0381	1	0.0381	14.20	0.0196	
AB	0.0081	1	0.0081	3.02	0.1573	
AC	0.0421	1	0.0421	15.72	0.0166	
BC	0.0238	1	0.0238	8.89	0.0407	
A ²	0.0347	1	0.0347	12.93	0.0228	
B ²	0.1043	1	0.1043	38.91	0.0034	
C ²	0.0016	1	0.0016	0.5804	0.4886	
ABC	0.0000	0				
A ² B	0.0044	1	0.0044	1.63	0.2709	
A ² C	0.0485	1	0.0485	18.09	0.0131	
AB ²	0.1130	1	0.1130	42.14	0.0029	
AC ²	0.0000	0				
B ² C	0.0000	0				
BC ²	0.0000	0				
A ³	0.0000	0				
B ³	0.0000	0				
C ³	0.0000	0				
纯误差	0.0107	4	0.0027			
总和	0.7118	16				

表 4 6-姜辣素含量的方差分析

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.0018	3	0.0006	6.78	0.0054	significant
A- 提取加水倍量	0.0003	1	0.0003	3.86	0.0713	
B- 提取时间	0.0001	1	0.0001	1.44	0.2510	
C- 提取次数	0.0014	1	0.0014	15.05	0.0019	
Residual	0.0012	13	0.0001			
失拟项	0.0011	9	0.0001	5.08	0.0663	
纯误差	0.0001	4	0.0000			
总和	0.0030	16				

时间对于芍药苷的含量影响较大。图 5C 描述了当提取加水倍量为 11.5 倍时，提取次数的等高线密度高于提取时间，因此可以得出提取次数对芍药苷含量的影响更大。在给定的变量范围内，芍药苷含量受到三个因素的影响程度，其中提取次数对其影响最大，其次是提取时间，而加水倍量对其影响较小，这一结论与方差分析的结果一致。

2.6.5 6-姜辣素含量的响应面分析 6-姜辣素含量的等高线和 3D 图分析见图 6，在给定的变量范围内，6-姜辣素含量受到三个因素的影响程度，其中提取次数对其影响最大，其次是提取加水倍量，而提取时间对其影响较小，与方差结果基本一致。在图 6A 中，当提取时间为 1 h 时，提取次数的等高线密度大于提取加水倍量，从而，提取

表 5 出膏率的方差分析

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	125.12	12	10.43	33.67	0.0020	significant
A- 加水倍数	0.1122	1	0.1122	0.3624	0.5796	
B- 提取时间	6.92	1	6.92	22.34	0.0091	
C- 提取次数	71.57	1	71.57	231.11	0.0001	
AB	1.21	1	1.21	3.91	0.1193	
AC	23.38	1	23.38	75.49	0.0010	
BC	2.25	1	2.25	7.27	0.0543	
A ²	0.3342	1	0.3342	1.08	0.3575	
B ²	0.7278	1	0.7278	2.35	0.2000	
C ²	3.62	1	3.62	11.68	0.0268	
ABC	0.0000	0				
A ² B	0.0684	1	0.0684	0.2210	0.6627	
A ² C	14.45	1	14.45	46.65	0.0024	
AB ²	0.0595	1	0.0595	0.1922	0.6837	
AC ²	0.0000	0				
B ² C	0.0000	0				
BC ²	0.0000	0				
A ³	0.0000	0				
B ³	0.0000	0				
C ³	0.0000	0				
纯误差	1.24	4	0.3097			
总和	126.36	16				

次数对 6-姜辣素的含量影响有很大的影响；在图 6B 中，当提取次数固定在 2 次时，提取加水倍量的等高线密度比提取时间要大，所以，提取加水倍量对于 6-姜辣素的含量影响较大。

2.6.6 出膏率的响应面分析 出膏率的响应面及等高线分析见图 7，在指定变量范围内，三个变量对出膏率的影响中，提取次数最大，其次是提取时间，提取加水倍量影响最小，与方差结果分析基本一致。如图 7A 所示，当提取时间固定为 1.5 h 时，提取次数等高线密度大于提取加水倍量，因此，提取次数对于出膏率的影响更大；在图 7B 中，当提取次数固定为 2 次时，提取时间的等高线密度高于提取加水倍量，因此可以得出提取时间对出膏率影响更大。在图 7C 中，当提取加水倍量固定为 11.5 倍时，提取次数等高线密度要比提取时间更高，所以，提取次数对出膏率影响更大。

2.7 设计空间的建立及验证

2.7.1 设计空间的建立 前期研究表明基准样品标准中芍药苷的含量在 0.5150% ~ 0.8811%，6-姜辣素的含量在 0.0198% ~ 0.0337%，研究设定优化目标为该标准范围再分别加上前期预试验浓缩干燥过程芍药苷和 6-姜辣素的损失率，因此最终设定优化目标为芍药苷含量为 0.7357% ~ 1.2587%；

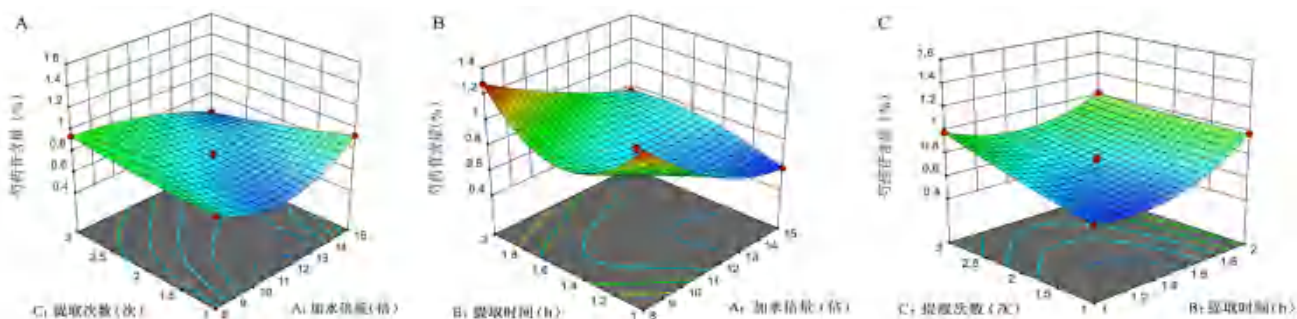


图 5 各因素交互作用对芍药苷含量影响的响应面及等高线图

Fig 5 Response surface and contour plot of the effect of factor interaction on the content of paeoniflorin

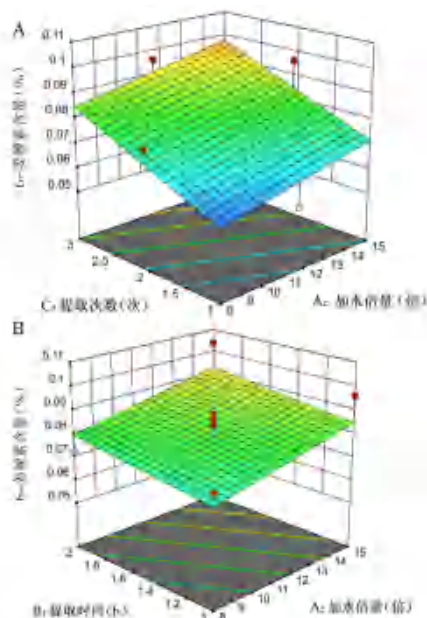


图 6 各因素交互作用对 6-姜辣素含量的影响的响应面及等高线图

Fig 6 Response surface and contour plot of the effect of factor interaction on the content of 6-gingerol

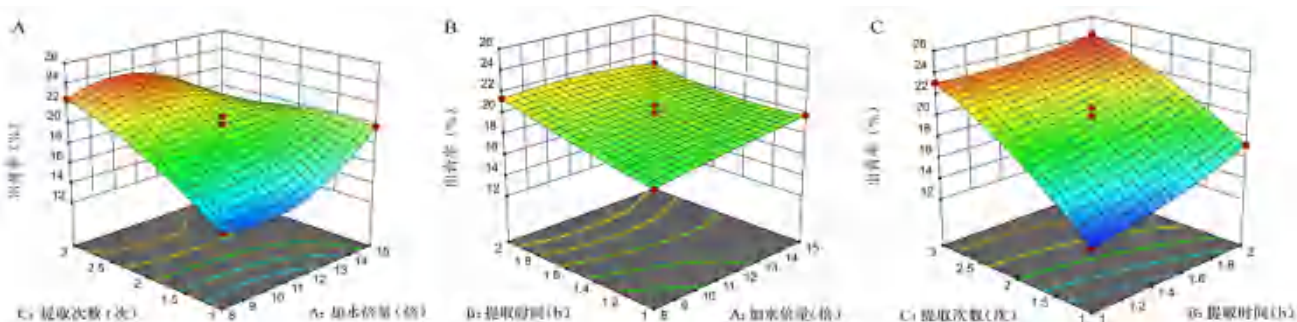


图 7 各因素交互作用对出膏率影响的响应面及等高线图

Fig 7 Response surface and contour plot of the effect of factor interaction on the paste yield

表 6 响应面设计空间试验点的选取

Tab 6 Selection of spatial test points for response surface design

验证批次	序号	加水倍数/倍	提取时间/min	提取次数/次
空间内	1	9	70	1
空间内	2	9.5	70	1
空间内	3	10	60	1

表 7 响应面试验验证结果

Tab 7 Verification test of response surface

验证批次	序号	芍药苷含量/%	6-姜辣素含量/%	出膏率/%
空间内	1	0.8461	0.0759	11.57
空间内	2	0.9293	0.0740	14.04
空间内	3	0.9659	0.0701	13.63
基准样品	4	0.5150 ~ 0.8811	0.0198 ~ 0.0337	10.00 ~ 14.85
优化范围	5	0.7357 ~ 1.2587	0.0396 ~ 0.0674	10.00 ~ 14.85

6-姜辣素含量为 0.0396% ~ 0.0674%；出膏率为 10.00% ~ 14.85%。在优化的工艺参数空间内搜集所有符合设定目标的参数，构建出设计空间并用 Overlay Plot 进行展示，结果如图 8 所示。黄色部分即为提取工艺的可优化控制空间。因此将真武汤的提取工艺范围定为：提取加水量 8 ~ 10.39 倍；提取时间 60 ~ 100 min；提取次数固定为 1 次。

2.7.2 验证试验 为验证响应面结果的可靠性，在设定的优化工艺参数空间内搜集符合目标的组别，选取设计空间内的三个点进行验证，根据实际情况对组别中的提取工艺参数调整如表 6 所示，按照调整后的提取参数进行验证试验，每组平行 3 份，验证结果见表 7。按照提取工艺进行提取后，其结果均能达到预测值，表明在优化工艺参数空间内验证的这几组均能达到提取工艺的预期目标。考虑到实际生产问题及便于操作，因此后期采用第三组的工艺参数进行提取：提取加水倍数 10 倍，提取时间 60 min，提取次数 1 次。

3 讨论

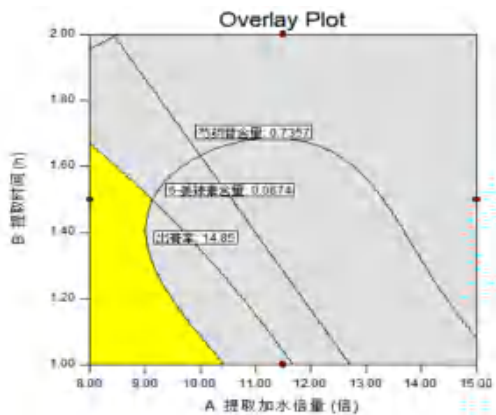


图 8 真武汤提取工艺的设计空间

Fig 8 Design space of Zhenwu decoction extraction process

按照《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》,绘制特征图谱并对指标性成分含量和浸出物进行检测应作为 CQAs 来检验基准样品和颗粒剂间的量值传递关系^[7],前期研究显示,基准样品指纹图谱相似度均在 0.9 以上,相似度良好^[6],因此不再以此作为评价指标,芍药苷为芍药的主要成分,6-姜辣素为生姜的主要成分,出膏率对提取液亦有显著影响,故选取芍药苷、6-姜辣素和出膏率作为评价标准。

在由传统砂锅煎煮向现代提取工艺转化过程中,改变工艺参数常导致指标性成分含量大幅改变。所以对制备工艺特别是提取工艺进行研究,是经典名方研制过程中至关重要的环节。在 QbD 理念下,认识原料、工艺与产品质量多维组合及相互作用,从而达到对产品 CQAs 的预测^[2],QbD 理念应用的一个关键是设计空间的构建^[8]。在单因素试验的基础上选择三因素三水平并使用响应面法,采用多元回归方程拟合各因素与效应值的函数,并以最佳工艺水平为目标,对工艺参数进行预测与优选^[9-13],将芍药苷与 6-姜辣素的含量及出膏率均设置在一定的范围之内,对设计空间进行筛选,可有效地对试验条件进行优化,并为后续真武汤颗粒剂的工业化生产提供了可控范围。

前期考察发现在提取-浓缩-干燥过程中,芍药苷和 6-姜辣素均具有较高的损失率,可能是高温影响芍药苷稳定性的原因^[14]。6-姜辣素在高温条件下会转化为醛类物质,并且还会受到合剂水溶液环境的影响^[15]。因此在考察提取时间时充分考虑了指标性成分损失率高的实际情况,选取 2 h 为高水平。并且添加到设计空间优化的目标条件中,以便使该制剂间体与基准样品质量属性接近。

4 结论

本研究基于 QbD 理念,通过失效模式及效应分析(FMEA)进行风险评估,结合经验筛选工艺参数,进一步采用 Box-Behnken 优化真武汤提取工艺,建立其设计空间,最终确定的提取工艺为:提取加水倍数 10 倍、提取时间 60 min、提取次数 1 次。验证试验证明,该工艺参数正在确立中的设计空间发生了变化,产品仍然可以实现预期目标,为后续颗粒剂的干燥、浓缩、成型工艺奠定基础。

参考文献

- [1] 钱超尘. 伤寒论文献通考[M]. 北京: 学苑出版社, 1993: 668-669.
- [2] 石国琳, 徐冰, 林兆洲, 等. 中药质量源于设计方法和应用: 工艺建模[J]. 世界中医药, 2018, 13(3): 543-549.
- [3] 徐冰, 史新元, 吴志生, 等. 论中药质量源于设计[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1015-1024.
- [4] 罗赣, 徐冰, 孙飞, 等. 中药质量源于设计方法和应用: 工艺放大[J]. 世界中医药, 2018, 13(3): 535-542.
- [5] 戴胜云, 徐冰, 史新元, 等. 中药质量源于设计方法和应用: 产品和工艺设计[J]. 世界中医药, 2018, 13(3): 550-555.
- [6] 张钰明, 杜守颖, 白洁, 等. 经典名方真武汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 820-829.
- [7] 国家药品监督管理局. 古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)[EB/OL]. (2019-03-22) [2022-02-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/XXgk/zhqyj/zhqyjyp/20190327150101694.htmL>.
- [8] 李文竹, 张禄权, 李白玲, 等. 基于质量源于设计理念的丹参浓缩膏石硫工艺优化研究[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2302-2311.
- [9] 孙萌, 刘雪纯, 赵玥瑛, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化经典名方散偏汤的提取工艺[J]. 中南药学, 2023, 21(2): 357-362.
- [10] 何瑶, 江华娟, 成颜芬, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化经典名方桃红四物汤煎煮工艺[J]. 中草药, 2021, 52(22): 6845-6855.
- [11] 李越, 吴中宝, 杨艳玲, 等. Box-Behnken 响应面法优选红景天苷乳剂凝胶处方工艺并研究其对烫伤的治疗作用[J]. 中国现代中药, 2020, 22(4): 609-614, 635.
- [12] 曾海蓉, 李婷娜, 冉倩, 等. 基于熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化桂枝芍药知母颗粒复方提取工艺[J]. 中草药, 2020, 51(1): 84-90.
- [13] 赵国栋, 洪璐, 王倪, 等. 基于 Box-Behnken 响应面设计法结合熵权法优选脑络欣通方提取工艺[J]. 中南药学, 2021, 19(9): 1848-1853.
- [14] 霍晓光, 胡欣彤, 陈丽霞, 等. 芍药苷稳定性研究[J]. 中国科技论文, 2017, 12(18): 2092-2097.
- [15] 薛盛剑, 郑敏霞. 超滤-纳滤联用用于干姜中指标性成分 6-姜辣素的浓缩[J]. 中国药师, 2019, 22(9): 1613-1617.

(收稿日期: 2023-07-02; 修回日期: 2023-08-20)

静脉注射吴茱萸碱 - 甘草酸纳米胶束后吴茱萸碱 在大鼠体内药代动力学研究

邓英光, 银雪艳, 郭秀彩, 张紫萍, 李峰 (广州市第十二人民医院, 广州 510620)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法 (HPLC) 测定大鼠血浆中的吴茱萸碱, 研究大鼠尾静脉注射吴茱萸碱 - 甘草酸纳米胶束后的药代动力学情况。**方法** 大鼠尾静脉注射吴茱萸碱 - 甘草酸纳米胶束和吴茱萸碱溶液后, 采用 HPLC 测定大鼠血浆中吴茱萸碱的含量, 绘制血药浓度 - 时间曲线, 以 DAS 2.0 软件分析处理药代动力学参数。**结果** 吴茱萸碱 - 甘草酸纳米胶束和吴茱萸碱溶液的 C_{\max} 分别为 (1.61 ± 0.19) 和 $(0.92 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0 \sim t}$ 分别为 (4.76 ± 1.41) 和 $(2.07 \pm 0.22) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$, CL 分别为 (0.67 ± 0.21) 和 $(1.38 \pm 0.14) \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, 吴茱萸碱 - 甘草酸纳米胶束的 C_{\max} 、 $AUC_{0 \sim t}$ 较吴茱萸碱溶液提高了 1.75、2.30 倍, CL 是吴茱萸碱溶液的 0.48 倍, C_{\max} 、 $AUC_{0 \sim t}$ 和 CL 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 将吴茱萸碱制备为吴茱萸碱 - 甘草酸纳米胶束能延长吴茱萸碱在体内的作用时间, 延缓吴茱萸碱在体内的代谢。

关键词: 吴茱萸碱; 甘草酸; 胶束; 药代动力学

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0141-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.022

In vivo pharmacokinetics of evodiamine in rats after intravenous injection of evodiamine-glycyrrhizic acid micelles

DENG Ying-guang, YIN Xue-yan, GUO Xiu-cai, ZHANG Zi-ping, LI Feng (*Guangzhou Twelfth People's Hospital, Guangzhou 510620*)

Abstract: Objective To establish an HPLC method to determine evodiamine in rat plasma and to study the intravenous pharmacokinetics of evodiamine-glycyrrhizic acid micelles in rats. **Methods** The rats were administered evodiamine-glycyrrhizic acid micelles and evodiamine solution, respectively. The content of evodiamine in the rat plasma was determined by HPLC, and the pharmacokinetic parameters were analyzed by DAS 2.0 software. **Results** The C_{\max} of evodiamine-glycyrrhizic acid micelles and evodiamine solution was (1.61 ± 0.19) and $(0.92 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $AUC_{0 \sim t}$ was (4.76 ± 1.41) and $(2.07 \pm 0.22) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$; CL was (0.67 ± 0.21) and $(1.38 \pm 0.14) \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. The C_{\max} and $AUC_{0 \sim t}$ were 1.75 and 2.30 times higher than those of evodiamine solution, while CL was 0.48 times higher than that of evodiamine solution. The difference in C_{\max} , $AUC_{0 \sim t}$ and CL was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The conversion of evodiamine into micelles with glycyrrhizic acid may prolong the duration and metabolic processes of evodiamine in vivo.

Key words: evodiamine; glycyrrhizic acid; micelle; pharmacokinetics

吴茱萸碱 (evodiamine, EVO) 是芸香科植物吴茱萸、石虎和疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实中的色胺吲哚类生物碱成分^[1-2], 具有抗炎、抗纤维化、抗脂毒性、抗肿瘤活性^[3], 但 EVO 存在水溶性差, 代谢过快, 靶向性差等缺点^[4-5], 使其临床应用受

到限制。甘草酸 (glycyrrhizic acid, GL) 所具有的两亲性结构特点使其对难溶性药物具有增溶作用, 大量研究表明以甘草酸作为载体的新型药物, 其药物溶解度和生物利用度均有明显的提高^[6], 甘草酸作为天然药物活性成分, 已被证实是安全无毒的生

基金项目: 广东省中医药局中医药科研项目 (No.20222154)。

作者简介: 邓英光, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学和生物药剂学研究, email: ygcoco@163.com

物材料,在一定条件下不会导致溶血^[7],符合国家静脉注射的标准,因此甘草酸可以满足作为有前景的药物递送载体的静脉药物开发的基本要求。前期我们以甘草酸作为载体对 EVO 进行包封,采用薄膜分散法制备出吴茱萸碱-甘草酸纳米胶束[(EVO-GL)-micelles],制备成胶束后 EVO 的溶解度明显增加^[8],可作为静脉注射药物。为进一步了解(EVO-GL)-micelles 在大鼠体内的药代动力学过程,尾静脉分别注射 EVO 和(EVO-GL)-micelles 后,采用 HPLC 测定大鼠血浆中 EVO 含量,评价胶束对 EVO 药代动力学的影响,以期 EVO 新型给药系统提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 岛津高效液相色谱仪(日本岛津有限公司); Quintix65-1CN 电子天平(德国赛多利斯公司); 5804R Eppendorf 冷冻离心机(美国艾本德公司); 减压真空干燥箱(上海高致精密仪器有限公司)。

1.2 试剂

EVO(纯度>98%,批号:C16244049, Aladdin), EVO 对照品(纯度>99%, Aladdin, 批号:A1629030), 甘草酸(纯度>98%, 北京百灵威科技有限公司,批号:LS40R62), 乙腈、甲醇(色谱级,德国 Merck 公司), 乙醇等其他试剂为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠, 200~220 g[南方医科大学南方医院实验动物中心,动物使用许可证,SYXK(粤)2015-0056;合格证号:44002100013124]。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

所用色谱柱为 Ecosil C18 反相液相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 柱温 40℃; 流动相为乙腈-水=60:40; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 225 nm; 检测器为二极管阵列紫外可见光检测器(SPD-M20A); 进样量 20 μL; 分析时间 7 min。

2.2 溶液的制备

精密称量 10 mg EVO 对照品,用甲醇溶解后转移至 50 mL 棕色量瓶,加入甲醇定容至 50 mL,即得到 200 μg·mL⁻¹的 EVO 对照品储备液。精密吸取适量 EVO 对照品储备液,使用适量的甲醇稀释制成质量浓度为 100、500、2000 ng·mL⁻¹作为 EVO 对照品溶液。

2.3 动物给药方案及样品采集处理

将 12 只雄性 SD 大鼠随机平均分成(EVO-GL)-micelles 组和 EVO 溶液组[用复合溶剂(5% DMSO, 10% 吐温 80, 85% 0.9% 氯化钠溶液)超声溶解^[9]。给药前称量大鼠体重,按 3 mg·kg⁻¹(以 EVO 计)的剂量分别尾静脉注射 EVO 溶液和(EVO-GL)-micelles。给药后分别于 0、0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 进行眼底取血,置于肝素化离心管,4℃、3500 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上层血浆到离心管,于-20℃保存备用。

2.4 样品的处理

取 100 μL 血浆样品,加入 300 μL 乙腈沉淀蛋白,涡旋混合 3 min, 12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,50℃真空干燥挥干有机溶剂,加入 100 μL 甲醇复溶,涡旋 3 min, 12 000 r·min⁻¹离心 15 min。取上清液 20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 记录 EVO 对照品、空白血浆样品、空白血浆+EVO 对照品溶液、静脉(EVO-GL)-micelles 给药后 30 min 血浆样品的 HPLC 图,结果如图 1 所示,血浆样品中的内源物质不干扰 EVO 的色谱峰,EVO 出峰时间短,保留时间为 4.7 min,峰形良好。

2.5.2 标准曲线以及定量下限 空白血浆中加入不同浓度的 EVO 溶液,即得到含 EVO 质量浓度分别为 25、50、100、250、500、1000、2000、4000 ng·mL⁻¹的标准血浆样品,按照“2.4”项下方法处理血浆样品。按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积。以药物质量浓度(μg·mL⁻¹, *c*)为横坐标,峰面积(*A*)为纵坐标进行回归拟合标准曲线,得到 EVO 的标准曲线方程: $A = 2.624 \times 10^5 c + 2.234 \times 10^4$ ($r = 0.998$)。结果显示血浆样品中的 EVO 在 25~4000 ng·mL⁻¹与峰面积线性关系良好。根据信噪比(*S/N*)=10 的原则,确定定量下限为 25 ng·mL⁻¹。

2.5.3 精密度 分别吸取 100 μL 空白血浆,制备低、中、高 3 个 EVO 质量浓度(100、500、2000 ng·mL⁻¹)的血浆样品,每个浓度准备 5 份,按照“2.4”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积。在同一天内每个浓度各测定 3 次,考察日内精密度;连续测定 3 d,考察日间精密度。结果日内精密度 *RSD* 为 4.5%~5.1%,日间精密度 *RSD* 为 5.3%~8.5%,达到生物样品分析要求。

2.5.4 提取回收率 分别吸取 100 μL 空白血浆,制备低、中、高 3 个 EVO 质量浓度(100、500、2000 ng·mL⁻¹)的血浆样品各 5 份,分别按照“2.4”方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定。通过

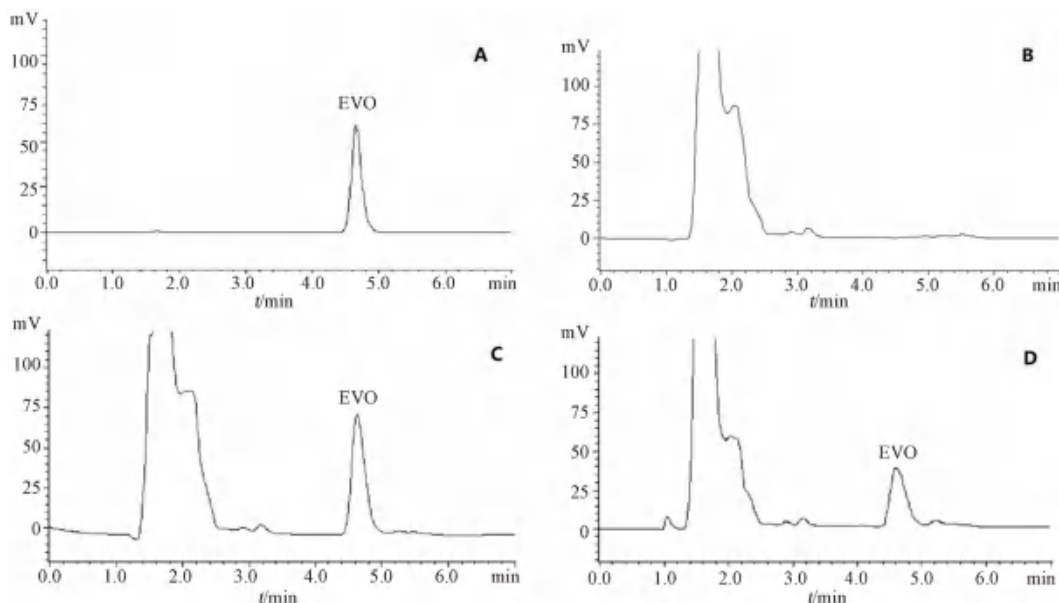


图 1 吴茱萸碱-甘草酸纳米胶束的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of (EVO-GL)-micelles

A. EVO 对照品 (EVO standard); B. 空白血浆 (blank plasma); C. 空白血浆+吴茱萸碱 (blank plasma + EVO); D. 尾静脉给药 (EVO-GL)-micelles 血浆样品 [plasma samples after tail vein administration of (EVO-GL)-micelles]

标准曲线计算 EVO 的浓度, 提取回收率 (%) = 提取后实测 EVO 浓度 / 理论浓度 × 100%。得出 3 个浓度 EVO 提取回收率为 95.3% ~ 98.4%, RSD 范围为 5.7% ~ 8.1%。达到生物样品分析要求。

2.5.5 药代动力学实验数据处理及结果 数据处理后, 得大鼠静脉注射后各时间点 EVO 的平均血药浓度, 大鼠尾静脉给药 EVO 和 (EVO-GL)-micelles 后吴茱萸碱的药物浓度-时间曲线见图 2。使 DAS 2.0 软件用对血药浓度和时间采用静脉给药模型拟合, 得到药代动力学参数见表 1。数据显示 EVO 组在体内符合二室模型, (EVO-GL)-micelles 组符合三室模型。(EVO-GL)-micelles 组的 C_{max} 明显高于 EVO 组 ($P < 0.05$)。(EVO-GL)-micelles 组的 $AUC_{0 \sim t}$ 是 EVO 组的 2.30 倍。(EVO-GL)-micelles 组清除率 (CL) 较 EVO 组明显降低 ($P < 0.05$)。

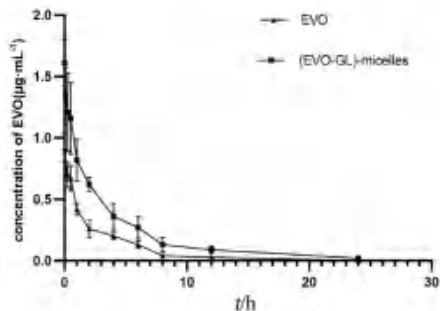


图 2 大鼠尾静脉给药 EVO 和 (EVO-GL)-micelles 后吴茱萸碱的药物浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 2 Plasma concentration-time profile of evodiamine after tail vein administration of EVO and (EVO-GL)-micelles in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 EVO 和 (EVO-GL)-micelles 的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 1 Pharmacokinetic parameters of EVO and (EVO-GL)-micelles ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	(EVO-GL)-micelles	EVO
$C_{max}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$1.61 \pm 0.19^*$	0.92 ± 0.11
$t_{1/2}/\text{h}$	3.66 ± 1.49	3.26 ± 0.59
$V_d/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	$1.91 \pm 0.20^*$	3.42 ± 0.48
$CL/(\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1})$	$0.67 \pm 0.21^*$	1.38 ± 0.14
$AUC_{0 \sim t}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h})$	$4.76 \pm 1.41^*$	2.07 ± 0.22
$AUC_{0 \sim \infty}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h})$	$4.88 \pm 1.47^*$	2.19 ± 0.22

注: 与 EVO 组相比, $^*P < 0.05$ 。

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

3 讨论

本实验建立了 HPLC 法测定大鼠血浆中 EVO 含量, 对 (EVO-GL)-micelles 和 EVO 进行了药代动力学评价, 结果显示, EVO 制备成 (EVO-GL)-micelles 纳米胶束后, (EVO-GL)-micelles 组的 $AUC_{0 \sim t}$ 是原药 EVO 的 2.30 倍, CL 是原药 EVO 的 0.48 倍, 说明制备成 (EVO-GL)-micelles 纳米胶束后, EVO 在体内的血浆清除率降低, 表明 (EVO-GL)-micelles 组相比 EVO 原药在大鼠体内具有更好的缓释性, 明显改善了 EVO 的药代动力学过程, 提高 EVO 在血液中的浓度和滞留时间。前期我们体外释药实验证明 (EVO-GL)-micelles 累计释放量明显高于 EVO 原药, 胶束中 EVO 释放缓慢, 可能是由于药物主要包载于胶束疏水性内核中, 以胶束的形式存在, 从而起到缓释作用^[8]。同时可能与制

备成甘草酸胶束后的靶向作用有关,甘草酸具有皂苷类两亲性物质结构特点,使其能够结合细胞膜上的胆固醇或磷脂,改变细胞膜上脂质的流动性,诱导细胞膜孔隙的形成,细胞膜通透性明显增加,胶束与细胞膜相互作用,释放大量的皂苷,从而在病变部位可达到高浓度的累积,甘草酸的直接跨膜递送机制可能影响了EVO的代谢,从而起到缓释的作用^[10-11]。DAS 2.0 拟合数据显示EVO组符合二室模型,(EVO-GL)-micelles组更符合三室模型,可能在组织分布上与EVO组存在差异,体内正常器官如肝脏中肝细胞膜上有甘草酸和甘草次酸的结合位点,有研究发现静脉注射甘草酸后,甘草酸快速被肝脏摄取及蓄积,由甘草酸修饰后的药物具有明显的肝靶向性^[7],可用于肝脏疾病的治疗,利用甘草酸的直接跨膜递送机制及显著的肝靶向性能力,用于构建作用于肝纤维化组织的靶向药物具有良好的应用前景,需要进一步研究。

参考文献

- [1] Li XJY, Ge JD, Zheng Q, et al. Evodiamine and rutaecarpine from tetradiumruticarpum in the treatment of liver diseases [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: e153180.
- [2] 倪晓婷, 李兆星, 陈晨, 等. 吴茱萸的化学成分与生物活性研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (3): 657-667.
- [3] 梁靖蓉, 麦凤怡, 李陈广, 等. 吴茱萸碱的药理学研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 28 (10): 1457-1461.
- [4] Zou LD, Chen FQ, Bao JL, et al. Preparation, characterization, and anticancer efficacy of evodiamine-loaded PLGA nanoparticles [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23 (3): 908.
- [5] Zhao J, Liu S, Hu XY, et al. Improved delivery of natural alkaloids into lung cancer through woody oil-based emulsivenano systems [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25 (1): 1426.
- [6] Selyutina OY, Polyakov NE. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier-from physicochemical properties to biomedical applications: a modern insight on the ancient drug [J]. *Int J Pharm*, 2019, 559: 271-279.
- [7] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50 (23): 5876-5886.
- [8] 邓英光, 吕雪丽, 祝瑶露, 等. 基于甘草酸为载体的吴茱萸碱胶束的构建及抗肝纤维化活性 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (13): 3136-3143.
- [9] Wang T, Kusudo T, Takeuchi T, et al. Evodiamine inhibits insulin-stimulated mTOR-S6K activation and IRS1 serine phosphorylation in adipocytes and improves glucose tolerance in obese/diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e82364.
- [10] 梁劲康, 吴志玲, 吴广辉, 等. 甘草次酸的抗肝癌作用机制及其作为肝靶向配体的研究进展 [J]. *中国药房*, 2017, 28 (22): 3150-3154.
- [11] Salvi M, Fiore C, Armanini D, et al. Glycyrrhetic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66 (12): 2375-2379.

(收稿日期: 2023-07-04; 修回日期: 2023-09-20)

综述

雷公藤对肾脏的毒性与保护作用及机制的研究进展

刘灵¹, 张慧民², 曹蓉¹, 罗欢³, 杨艳⁴, 邹攀⁵, 席洋², 龚慧², 江志超^{3*}, 颜苗^{2*} (1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 中南大学湘雅二医院, 长沙 410011; 3. 湖南省直中医医院, 湖南 株洲 410016; 4. 梧州市工人医院, 广西 梧州 543001; 5. 广西壮族自治区南溪山医院, 广西 桂林 541002)

摘要: 传统中药雷公藤药理作用强大, 广泛用于治疗糖尿病肾病、肾病综合征、肾小球肾炎等多种肾病。但同时雷公藤也会对肾脏造成损伤, 严重者会导致肾衰竭甚至死亡。雷公藤对肾脏的这种毒、效双向作用机制有待阐明。因此本文从毒与效两方面综述了雷公藤对肾脏的作用和机制, 以期为其减毒增效研究提供参考。

关键词: 雷公藤; 雷公藤甲素; 雷公藤红素; 肾毒性; 肾保护

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0145-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.023

Research progress in effect of *tripterygium wilfordii* on the kidney: mechanism of toxicity and efficacy

LIU Ling¹, ZHANG Hui-min², CAO Rong¹, LUO Huan³, YANG Yan⁴, ZOU Pan⁵, XI Yang², GONG Hui², JIANG Zhi-chao^{3*}, YAN Miao^{2*} (1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 3. TCM Hospital, Directly Affiliated to Hunan Province, Zhuzhou Hunan 410016; 4. Wuzhou Gongren Hospital, Wuzhou Guangxi 543001; 5. Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin Guangxi 541002)

Abstract: Traditional Chinese medicine, *tripterygium wilfordii*, possesses potent pharmacological effect and is widely used in the treatment of diabetic nephropathy, nephrotic syndrome, glomerulonephritis, and various renal diseases. However, despite its therapeutic benefits, *tripterygium wilfordii* is associated with renal toxicity, and in severe cases, it can lead to renal failure and even death. The dual toxic and therapeutic mechanisms of *tripterygium wilfordii* in the kidneys remain to be elucidated. Therefore, this article comprehensively reviewed the action and mechanisms of *tripterygium wilfordii* in the kidneys from both toxic and therapeutic perspectives, aiming to reduce the toxicity and enhance the efficacy.

Key words: *tripterygium wilfordii*; triptolide; tripterine; renal toxicity; renoprotection

雷公藤包含雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤多苷等多种化合物, 具有良好的抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等活性^[1-2], 可用于治疗一些炎症性疾病和自身免疫性疾病^[3]。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN)、肾病综合征 (nephrotic syndrome, NS) 等是进展为终末期肾

病 (end-stage renal disease, ESRD) 的常见原因, 现有治疗药物疗效有限^[4-5]。近年来报道显示雷公藤用于 DN、NS 模型有减轻蛋白尿、改善肾功能的作用^[6-8]。但雷公藤同时也会损伤肝脏、生殖系统、肾脏等^[9], 这使其临床应用受到限制。因此如何减毒增效是关键。根据病症毒理学思想,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81974532); 湖南省中医药管理局重点课题 (No.A2023032); 中国药学会医院药学专委会人才专项资助项目 (No.CPA-Z05-ZC-2021-003); 广西壮族自治区中医药局自筹经费科研课题 (No.GXZYC20230219)。

作者简介: 刘灵, 男, 主要从事中医药研究, email: 634458434@qq.com *通信作者: 江志超, 男, 主任医师, 主要从事中医学基础与临床研究, email: 912015107@qq.com; 颜苗, 男, 主任药师, 主要从事药理学与毒理学研究, email: yanmiao@csu.edu.cn

需基于机体的疾病状态考察中药毒性,以摸索治疗窗^[10],寻找调控毒、效作用的靶点蛋白,阐明雷公藤的毒、效“双向”调控机制,实现“辨证控毒”。因此本文同时阐述雷公藤对肾脏的保护与损伤作用及机制,旨在为开展雷公藤量-效/毒研究提供参考。

1 雷公藤对肾脏的保护

1.1 抑制肾脏纤维化

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中,上皮细胞发生形态变化,转变为间质细胞,同时释放细胞外基质,促进纤维化^[11]。糖尿病以及高糖条件会引起肾细胞损伤,可出现EMT,雷公藤可下调EMT的相关调节通路,起到抑制纤维化的作用。适当剂量范围的雷公藤甲素可抑制NLRP3炎症小体活化,改善足细胞EMT,也可以通过PTENK27-polyUb抑制肾上皮细胞EMT,通过miR-188-5p-PI3K-AKT通路抑制DN的EMT^[12-14]。TGF- β 1可通过Smad依赖途径和Smad非依赖途径(如激活p38和ERK 1/2),诱导纤维化^[15]。雷公藤甲素可抑制Smad2激活,阻止细胞外基质(ECM)合成,又可激活p38和ERK 1/2,促进ECM合成。在TGF- β 1诱导的肾细胞中,雷公藤甲素增强了TGF- β 1诱导的p38、ERK 1/2信号激活,而抑制了Smad2的激活,进一步抑制了ECM合成^[16]。转录辅因子Ski通过阻断Smad与CBP/P300结合,抑制TGF- β /Smad通路^[17]。雷公藤甲素可上调Ski蛋白表达,从而抑制TGF- β 1/Smad3通路,进而降低纤维化程度^[18]。大麻素受体2(cannabinoid receptor 2, CB2R)激动可减轻纤维化生成^[19],雷公藤红素可抑制Smad3磷酸化,上调CB2R,从而减轻肾纤维化^[20]。雷公藤多苷可抑制TLR4/NF- κ B通路,减轻糖尿病(DM)大鼠肾脏间质纤维化^[21]。其中雷公藤多苷使DM大鼠肾小管上皮细胞E-cadherin上调, α -SMA下调,抑制了EMT。由此可见,雷公藤可抑制肾脏纤维化,主要涉及EMT、AKT、CB2R、TGF- β 1/Smad信号通路以及TLR4/NF- κ B通路。

1.2 抑制肾小球硬化

研究表明,雷公藤多苷通过上调SAM7,下调p-SMAD2/3,减轻大鼠肾小球硬化^[22]。NF- κ B及p38 MAPK与肾小球损伤,肾小球硬化密切相关^[23],而雷公藤多苷可以下调DN模型大鼠肾脏中p38 MAPK, p-I κ B, NF- κ B(p65)的表达^[24],从而减轻肾小球硬化。

雷公藤甲素可通过调节PDK1/AKT/mTOR和miR-137/Notch1通路,抑制肾小球系膜细胞增

殖,减少肾小球系膜间质ECM沉积,减轻DN肾小球硬化^[25-26]。

因此,雷公藤可抑制肾小球硬化,可能涉及TGF/SMAD通路、PDK1/AKT/mTOR通路、miR-137/Notch1通路、p38 MAPK和NF- κ B信号通路。

1.3 抗氧化

细胞氧化应激时导致氧化自由基和活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量产生^[27]。急性肾损伤或者慢性肾病中,氧化应激引起细胞损伤和肾功能受损^[28-29]。研究发现雷公藤甲素或雷公藤红素上调DM、缺血-再灌注肾损伤或者急性肾损伤模型中肾脏抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(catalase, CAT),谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR),下调脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde, MDA),一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)和羰基化蛋白水平,起到保护肾脏的作用^[30-32]。研究表明,雷公藤甲素诱导产生ROS,激活肾细胞Nrf2通路,上调下游抗氧化酶表达,调节氧化还原平衡,减少细胞死亡^[33],雷公藤内酯三醇可通过恢复Nrf2通路抗氧化应激,减轻肾毒性^[34]。

足细胞构成肾小球滤过屏障,其结构和功能对维持肾功能至关重要^[35]。雷公藤可减轻蛋白尿,这与其保护足细胞相关^[36-37]。无论是在体内还是在体外的足细胞损伤模型[TGF- β 1和氨基核苷嘌呤霉素(PAN)诱导]中,GADD45B均介导足细胞损伤、凋亡。ROS通过激活ROS-GADD45B-p38 MAPK通路加重足细胞损伤^[38]。而雷公藤甲素可通过抑制p38 MAPK和ROS产生减轻PAN引起的足细胞损伤,从而保护肾脏^[39]。

1.4 抗炎

NF- κ B介导的炎症参与了肾脏病的发生和进展,如DN、IgA肾病、狼疮性肾炎^[40-42]。研究发现,雷公藤甲素或雷公藤红素下调了db/db或链脲佐菌素(STZ)诱导的DM模型肾脏NF- κ B表达,减轻了肾损伤^[43-44]。肾靶向的雷公藤甲素-葡萄糖胺共轭物(TPG)下调缺血-再灌注肾脏促炎细胞因子(TNF- α , IL-6, IL-1, TGF- β)和单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1),减轻了肾损伤^[45]。雷公藤红素抑制顺铂激活的NF- κ B途径^[46],减轻肾脏炎症,改善肾功能。p53可通过NF- κ B间接激活GADD45b,研究发现雷公藤甲素可抑制p53-NF- κ B-GADD45B信号转导,保护足细胞,维持肾小球屏障功能^[47]。

1.5 抗细胞凋亡

凋亡即细胞程序性死亡^[48],足细胞凋亡与肾

病发生发展有关,足细胞缺失是 DN 发生发展的重要机制,而凋亡是足细胞缺失的重要原因^[49-52]。雷公藤内酯三醇可能通过抑制 PAN 诱导的足细胞凋亡,恢复细胞存活来发挥其保护作用^[53]。雷公藤多苷组分 n2 对阿霉素诱导的 NS 大鼠模型有明显的抗凋亡效应,可上调抗凋亡蛋白 Bcl-2,下调促凋亡蛋白 Bax 和上游转录因子 p53,抑制凋亡的效应蛋白 caspase 8、caspase 9 和 caspase 3 裂解激活等^[54]。同时也有研究发现雷公藤甲素可下调凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的表达水平^[13]。

1.6 调节自噬

自噬是维持细胞代谢稳态的重要生理过程。自噬激活可清除致病蛋白或受损的线粒体,起到治病或减毒作用^[55-56],但雷公藤甲素又可引起线粒体自噬产生肝毒性^[57]。因此,自噬激活具有保护或损伤细胞的双重作用。在 DN 中,自噬受到抑制^[58],激活自噬,可降解胶原蛋白和 TGF- β 1,抑制肾纤维化进展^[59]。研究发现,雷公藤甲素可保护 IgA 肾病患者的足细胞自噬^[60],同时雷公藤甲素可下调 miR-141-3p/PTEN/AKT/mTOR 通路^[61],雷公藤多苷可上调 PI3K/AKT 通路,均激活自噬^[62],起到肾脏保护作用。研究者发现雷公藤多苷片可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 自噬信号通路对 DN 大鼠肾脏损伤起到保护作用^[63]。血红素加氧酶-1(HO-1)参与调节自噬^[64-65]。HO-1 是催化血红素分解的限速酶,可抗氧化、抗炎、保护细胞。雷公藤红素可上调 HO-1 激活自噬,从而发挥抗炎、抗凋亡、抑制胰岛素抵抗作用^[66]。因此雷公藤通过调控 HO-1、PI3K/AKT 通路和 PTEN/AKT/mTOR 通路,激活 DN 自噬,减轻肾损伤。

1.7 免疫调节

NS 是一种非常严重的肾病,接近 12% 的 ESRD 以及高达 20% 的儿童 ESRD 由 NS 引起。膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是最常见的成人 NS^[67]。研究报道雷公藤多苷联合他克莫司或泼尼松治疗 MN,其疗效不亚于免疫抑制剂^[68-70]。雷公藤甲素可促进 CD4⁺T 细胞分化为 FoxP3 + Treg 细胞,或上调 miR-125a-5p,使 Treg 的比例增大,减轻肾脏损伤^[71]。雷公藤多苷或雷公藤红素可调节 Th17/Treg 细胞平衡,减轻肾脏损伤或抑制自身免疫性炎症^[72-74]。雷公藤红素下调 Th17 细胞 STAT3,抑制 Th17 细胞产生,并上调 Treg 细胞 STAT5、FoxP3,促进 Treg 细胞增殖。雷公藤可抑制肾移植免疫排斥,研究发现雷公藤甲素抑制了皮肤移植受体小鼠供体特异性抗体(donor-specific antibody, DSA)的产生,减轻了肾移植损伤。同时,雷公藤甲素抑制 B 细胞分化

为 CD138 与 CD27 浆细胞,且降低浆细胞分泌的 IgG、IgA、IgM 水平^[75]。雷公藤可降低血浆炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-17)、趋化因子[MCP-1、IP10 和干扰素诱导的单激素(Mig)]水平,降低肾脏补体 C3、IgG 沉积,抑制肾脏巨噬细胞、白细胞和 T 细胞浸润,从而治疗肾小球肾炎、狼疮性肾炎^[76-78]。另外,雷公藤甲素类似物(5R)-5-羟基雷公藤内酯(LLDT-8)上调了肾细胞 Fc γ 受体 II B(Fc γ R II B)的表达,使 src 同源 2-含肌醇-5'-磷酸酶 1[Src Homology 2(SH2)-containing inositol 5'-phosphatase, SHIP1]磷酸化,从而抑制了 FcR 下游激酶 BTK 激活,抑制免疫^[77]。

综上所述,雷公藤可能对 NS、肾小球肾炎有效,同时也可抑制肾移植免疫排斥反应。其作用机制可能与调节 Th17/Treg 平衡、抑制免疫性炎症有关。

1.8 损伤修复

Wnt 信号在急性肾损伤和慢性肾病肾脏的再生和修复当中起到重要作用^[79]。雷公藤可通过降低 DM 大鼠肾脏中 Wnt-1 和 β -catenin 的表达,减轻肾损伤^[80]。一定浓度的雷公藤甲素可抑制高糖诱导激活的 Wnt3 α / β -catenin 通路,并进一步抑制足细胞 EMT^[81]。另有报道称雷公藤及其雷公藤甲素对 Wnt/ β -catenin 信号通路具有调控作用^[82-83],提示雷公藤可能通过作用于 Wnt/ β -catenin,减轻肾损伤。

1.9 抑制细胞增殖

IL-6 与 IL-6 受体结合,进而磷酸化 STAT3,可促进细胞增殖,而细胞因子信号传导抑制因子 3(SOCS3)与 JAK2 相互作用,可抑制 JAK2 对 STAT3 的磷酸化激活,从而抑制细胞增殖。雷公藤甲素通过上调 SOCS3,下调 IL-6 和 IL-6 受体抑制囊肿细胞增殖,延缓动物常染色体显性遗传性多囊肾病的进展^[84]。另外雷公藤甲素促进 Ca²⁺依赖的囊肿细胞周期阻滞,从而抑制 Pkd1^{-/-}胚胎囊肿生成^[85-86]。

雷公藤的肾脏保护机制见表 1。

2 雷公藤的肾毒性

2.1 氧化应激损伤

核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)通路是机体内的主要的抗氧化防御系统,下游抗氧化酶如谷胱甘肽 S 转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、SOD、CAT 可清除机体内过多的自由基和氧化物,保护肾脏^[88]。研究发现雷公藤甲素可明显抑制 Nrf2 介导的抗氧化反应,促进氧化应激,加重损伤^[89-91]。雷公藤甲素可激活 GSK-3 β /Fyn 依赖的泛素化途径,促进 Nrf2 降解,诱导氧化损伤和凋亡^[92]。Yang 等^[93]发现雷公藤甲

表 1 雷公藤的肾保护机制

Tab 1 Renoprotective mechanism of *Tripterygium wilfordii*

机制	药物干预	模型	作用机制	参考文献
抑制肾脏纤维化	雷公藤甲素 200 μg/(kg·d), 12 周和 雷公藤甲素 100 μg/(kg·d), 6 周	DN 小鼠、基因敲除小鼠、基因点突变小鼠	↓miR-188-5p-PI3K-AKT 通路 ↓MEX3C-PTENK27-polyUb, TWIST, SNAIL 和 YAP	[12]
	雷公藤甲素 5 μg·L ⁻¹ , 10 μg·L ⁻¹ , 24 h, 48 h, 72 h	小鼠永生化足细胞	↑Nephrin 和 ZO-1, ↓Collagen-1 和 FN	[13]
	雷公藤甲素 10 ng·mL ⁻¹ , 24 h	正常大鼠肾间质成纤维细胞	↓Smad2	[16]
	雷公藤甲素 10 μg·L ⁻¹ , 24 h (细胞)	大鼠肾系膜细胞, 肾小球肾炎模型	↑Ski, ↓SMAD3 和 TGF-β1/Smad3 通路	[18]
	雷公藤甲素 0.2 mg/(kg·d), 1、2、3 和 4 周 (动物)	大鼠	↓Smad3 磷酸化激活, ↑CB2R	[20]
	雷公藤红素 1 mg/(kg·d), 7 d 和 21 d	DM 大鼠模型	↓α-SMA 和 TLR4/NF-κB 通路, ↑E-cadherin	[21]
	雷公藤多苷 1, 3, 6 mg/(kg·d), 8 周	DM 大鼠模型	↓α-SMA 和 TLR4/NF-κB 通路, ↑E-cadherin	[21]
抑制肾小球硬化	雷公藤多苷 50 mg·kg ⁻¹ , 100 mg·kg ⁻¹ , 6 周	肾小球硬化模型	↑SAM7, ↓p-SMAD2/3	[87]
	雷公藤多苷 50 mg·kg ⁻¹ , 8 周	糖尿病肾病模型	↓p-p38 MAPK, p-IκB 和 NF-κB (p65)	[24]
	雷公藤甲素 100 μg/(kg·d), 12 周	糖尿病肾病模型	↓ECM 和 Notch1 通路激活	[25]
抗氧化	雷公藤红素 200、100、50 nmol·L ⁻¹ , 24 h	大鼠肾上皮细胞	↑GR, CAT 和 GSH, ↓蛋白质羰基化水平	[30]
	雷公藤甲素 25 μg/(kg·d), 50 μg/(kg·d), 12 周	db/db 小鼠	↓4-HNE	[32]
抗炎	雷公藤甲素 25 μg/(kg·d), 50 μg/(kg·d), 8 周或 12 周	db/db 小鼠	↓MCP-1	[32]
	雷公藤甲素 25 μg/(kg·d), 50 μg/(kg·d), 12 周	db/db 小鼠	↓NF-κB, TLR4, NOX4, TNF-α, IL-6, IL-1β 和 TGF-β	[43]
	雷公藤多苷 4.17 μmol/(kg·d), 静脉注射, 3 d	DM 大鼠	↓NF-κB P65 和 p38MAPK	[44]
	雷公藤甲素 40 ~ 160 nmol·L ⁻¹ , 24 h 或 45 h	人近端肾小管上皮细胞	↓TNF-α, IL-6, IL-1, TGF-β 和 MCP-1	[45]
	雷公藤红素 1、2 mg/(kg·d)(小鼠), 96 h	小鼠和肾小管上皮细胞	↓NF-κB, TNF-α 和 IL-6	[46]
	雷公藤红素 50 nmol·L ⁻¹ , 24 h (肾小管上皮细胞)	小鼠和肾小管上皮细胞	↓NF-κB, TNF-α 和 IL-6	[46]
	雷公藤甲素 20 ng·mL ⁻¹ , 24 h	斑痣细胞靶向损伤的体内斑马鱼模型	↓p53-NF-κB-GADD45B	[47]
抗细胞凋亡	雷公藤内酯三醇 50、100、200 μg·mL ⁻¹ , 24 h	小鼠足细胞	↑Bcl-2, Bcl-2/Bax, Flip, Nephrin 和 podocin, ↓caspase-3 和 IL4/stat6 激活	[53]
	雷公藤多苷组分 n2, 10 mg/(kg·d), 4 周	NS 大鼠	↑Bcl-2, ↓caspase-3, c-caspase8, c-caspase9, Bax, p53 和 TNF-R1	[54]
调节自噬	雷公藤甲素 200 μg/(kg·d), 8 周	糖尿病肾病大鼠	↓miR-141-3p/PTEN/AKT/mTOR 通路	[51]
	雷公藤多苷 0.31 ~ 10 μg·mL ⁻¹ , 24 h	足细胞	↑PI3K/AKT	[62]
	雷公藤甲素 10 ng·mL ⁻¹ , 24 h	IgA 肾病患者的足细胞	↑LC3 II/I 和 ↑p-AKT/AKT 通路, ↓p62 和 p-mTOR/mTOR 通路	[60]
免疫调节	雷公藤多苷 6、12、24 mg/(kg·d), 4 周	糖尿病肾病模型	调节 Th17/Treg 平衡	[73]
	雷公藤甲素 200、300 μg/(kg·d), 14 周	狼疮小鼠	↑Treg 和 miR-125a-5p, ↓Th17	[71]
	2-甲胺基乙酸雷公藤甲素酯柠檬酸盐 (雷公藤甲素前药) 1 mg/(kg·d), 4 d; 0.5 mg/(kg·d), 3 d	肾移植小鼠	↓DSA, IgG, IgA 和 IgM	[75]
	雷公藤片 20 mg/次, 3 次·d ⁻¹ , 14 周	患者	↓血清肌酐、血尿素氮、血总胆固醇、血白蛋白、24 h 尿蛋白、TNF-α 和 IL-6	[76]
	LLDT-8 0.125 mg·kg ⁻¹ , 每隔一日, 14 d	肾小球肾炎模型小鼠	↓C3, IgG, TNF-α, IL-6, IL-17 和 IFN-γ, ↑FcγR II B	[77]
	LLDT-8 0.125 mg/(kg·2d), 9 周	小鼠	↓IL-6, TNF-α, IL-17, MCP-1, IP10, RANTES 和 Mig	[78]

续表 1

机制	药物干预	模型	作用机制	参考文献
损伤修复	雷公藤片 8、16 mg · kg ⁻¹ , 8 周	DM 大鼠	↓Wnt3α/β-catenin 信号通路	[80]
	雷公藤甲素 3、10 μg · L ⁻¹ , 24、48、72 h	小鼠足细胞	↓Wnt3α/β-catenin 通路	[81]
抑制细胞增殖	雷公藤甲素 200 μg/(kg · d); 12 周 (大鼠)	多囊肾病大鼠, 人源性	↑SOCS3, ↓IL-6, IL-6 受体和 JAK2-	[84]
	雷公藤甲素 100、300 nmol · L ⁻¹ , 48 h (细胞)	WT9-12 PKD 细胞	STAT3 通路	
	雷公藤甲素 0.07 mg/(kg · d), 8 d	常染色体显性遗传性多 囊肾病小鼠	↑Ca ²⁺ 依赖性细胞周期阻滞	[85]
	雷公藤甲素 0.07 mg/(kg · d), 8 d	多囊肾病小鼠	↑Ca ²⁺ 信号传导	[86]

注 (Note): FSGS. 局灶性节段性肾小球硬化症 (focal segmental glomerular sclerosis); Mtor. 哺乳动物雷帕霉素靶向基因 (mammalian target of rapamycin); IP10. 干扰素诱导蛋白 10 (interferon-inducible protein 10); 4-HNE. 羟基壬烯酸 (4-hydroxynonenal); “↑”和“↓”表示前蛋白表达的上调和下调或信号通路的激活和抑制 (“↑” and “↓” mean upregulation and downregulation of proprotein expression or activation and repression of signaling pathways, respectively)。

素会引起严重的氧化应激, 使大鼠肾脏 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低, MDA 含量显著增加, 并导致肾脏结构和功能严重受损, 并且发现大鼠经雷公藤甲素处理会产生大量 ROS。

一定剂量的雷公藤多苷使肾脏谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、GST、GSH-Px、SOD、CAT 以及抗炎因子 IL-10 表达明显下降, 而促炎因子 TNF-α 水平明显上升, 引起动物肾脏损伤^[94-95], 这是由于雷公藤引起抗氧化酶表达下降, 打破了机体内氧化还原平衡, 体内 ROS 相对增多, 进一步促进炎症激活, 导致了肾脏损伤, ROS 在雷公藤甲素诱导的肾损伤中起着关键作用。

2.2 凋亡激活

细胞凋亡包括外源性途径 (即死亡受体途径) 和内源性途径 (由 Bcl-2 家族调控)。雷公藤甲素调节这两条途径诱导细胞凋亡。在肾小管上皮细胞中, 雷公藤甲素首先上调跨膜糖蛋白 Fas、Fas 的配体 FasL, 促进 FasL 结合 Fas 而激活外源性途径; 另一方面, 雷公藤甲素上调大鼠肾小管上皮细胞线粒体表面 Bcl-2 家族蛋白 Bax、Bid、Bad, 而对抗凋亡的 Bcl-2 表达无影响, 进而激活内源性途径。除此之外, 雷公藤甲素上调 c-caspase3 (cleaved-caspase3), 促进底物 PARP (DNA 剪切修复酶) 分解, 引起 DNA 损伤, 最终导致凋亡^[96]。雷公藤甲素可上调 Bax、Bid、Bad、Fas 和 FasL 的蛋白和 mRNA 的表达, 以及上调 Bax 与 Bcl-2 的比值, 引起肾小管细胞凋亡和肾脏损伤^[93]。

2.3 药物转运

肾脏的某些特殊转运体介导雷公藤肾毒性。在胶原诱导关节炎大鼠模型中, 雷公藤甲素加剧肾脏损伤, 这是由于有机阳离子转运蛋白 2 将过量雷公藤甲素转运至肾小管细胞所致, 药物转运外排蛋白无法及时将多余雷公甲素排出而加重毒性^[97]。雷公藤的肾毒性机制见表 2 及图 1。

3 总结与展望

临床上常用的雷公藤制剂 (雷公藤多苷片、雷公藤片与雷公藤双层片等) 时常引起急性肾衰竭等严重不良反应^[101], 如何减毒增效是雷公藤临床毒理研究的重点。目前虽有炮制减毒、配伍减毒、化学结构修饰、新剂型改良的减毒增效方法^[102], 但是许多方法仅适用于中草药, 且一些方法尚处于研究阶段, 并不能满足临床需要。另外, 基于“证”进行中药安全性评价^[10], 对雷公藤“证-量-效/毒”关系的深入研究或许能提供减毒新思路。一方面, 该研究方式旨在摸索治疗窗, 在中医“有故无殒”思想指导下, 使用合适剂量减轻或者规避毒性。另一方面, 旨在寻找调控毒/效转换的关键蛋白, 以揭示“量-效/毒”关系的潜在机制。由于雷公藤作用于细胞的整个分子信号网络, 故可借助多种组学技术、生信分析等, 找到雷公藤的作用通路和靶点以及毒性生物标志物, 揭示毒效机制, 并对肾损伤进行预警。

本文综述了雷公藤在肾脏方面的保护与毒性作用及机制, 其中雷公藤对氧化应激有激活与抑制的双向调控作用, 一定浓度的雷公藤甲素诱导产生 ROS, 激活了肾细胞 Nrf2, 下游抗氧化酶表达增多, 调节氧化还原平衡, 减少了细胞死亡^[33]。而另一方面, 雷公藤甲素又可以导致大量 ROS 产生导致氧化应激损伤, 产生肾毒性, 且雷公藤甲素激活 GSK-3β/Fyn 依赖的泛素化途径, 促进 Nrf2 降解, 诱导了氧化损伤和凋亡^[92]。雷公藤这种双向调控机制推测可能与雷公藤的剂量或干预时间有关。较低剂量、较短时间干预, 细胞处于应激状态, Nrf2/ARE 防御系统被激活而得以存活。而大剂量、长时间干预, 细胞抗氧化防御系统被破坏, 细胞由于无法清除过量的自由基和氧化物而死亡。无独有偶, 使用低剂量 dh404 (一种 Nrf2 诱导剂) 具有抗氧化、抗炎、抑制慢性肾病进展的作

表 2 雷公藤肾毒性机制

Tab 2 Renal toxic mechanism of *Tripterygium wilfordii*

机制	药物干预	模型	作用机制	文献
氧化应激损伤	雷公藤甲素 80、160、320 nmol · L ⁻¹ , 作用 48 h	大鼠肾细胞	↑Nrf2 泛素化降解	[92]
	雷公藤多苷 600、1200 mg/ (kg · d), 12 d	大鼠	↓GST 活性	[94]
	雷公藤甲素 1.2 mg · kg ⁻¹ 或雷公藤片 0.2、1.2 mg · kg ⁻¹ , 2 周	谷胱甘肽耗尽的小鼠	↑谷丙转氨酶, ↓羟基化代谢物水平	[98]
	雷公藤片提取物 60 mg · kg ⁻¹	携带肝癌细胞的小鼠	↑MDA, BUN 和 Ser; ↓GSH, GST, GSH-Px, SOD 和 CAT	[95]
凋亡激活	雷公藤甲素 10、20、40 nmol · L ⁻¹ , 48 h	人肾皮质近曲小管上皮细胞	↑caspase-3	[99]
	雷公藤甲素 10、30、50 ng · mL ⁻¹ , 24 h	足细胞	↑MAPK p38, p53 和 BAX	[100]
药物转运	雷公藤甲素	HK-293 和 HEK-1T 细胞	↑OCT2	[97]

注：“↑”和“↓”代表前蛋白表达的上调和下调或信号通路的激活和抑制。

Note: “↑” and “↓” mean upregulation and downregulation of proprotein expression or activation and repression of signaling pathways.

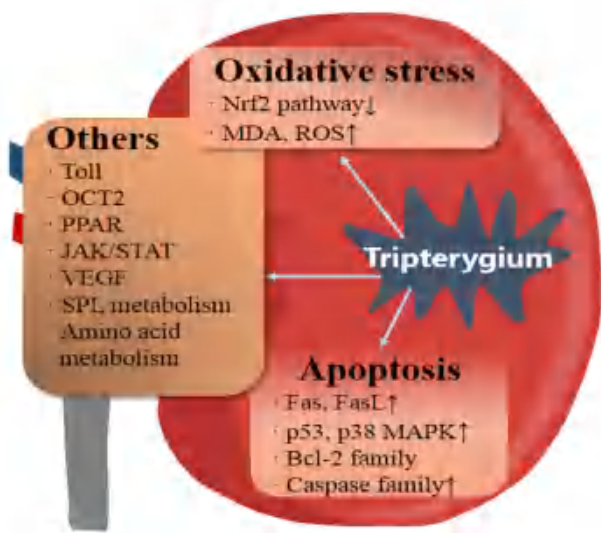


图 1 雷公藤肾毒性机制

Fig 1 Mechanism of renal toxicity of tripterygium

注 (Note): “↑”和“↓”代表前蛋白表达的上调和下调或信号通路的激活和抑制 (“↑”和“↓” mean the upregulation and downregulation of proprotein expression or activation and repression of signaling pathways); SPL. 鞘脂; JAK/STAT (sphingolipid): 激酶 Janus/ 信号转换器和转录激活因子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription); VEGF. 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor); TLRs. Toll 样受体 (Toll-like receptors); PPAR. 过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor)。

用; 但是高剂量反而会抑制 Nrf2 通路, 加重蛋白尿和肾功能不全、炎症^[103]。对氧化应激的双向调控可能是雷公藤在实际运用中实现“辨证控毒”的关键之处, 而雷公藤剂量的把握是其中的核心。

参考文献

[1] Chen SR, Dai Y, Zhao J, et al. A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook F [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 104.
 [2] Luo D, Zuo ZY, Zhao HY, et al. Immunoregulatory effects of *Tripterygium wilfordii* Hook F and its extracts in clinical practice [J]. *Front Med*, 2019, 13 (5): 556-563.

[3] Wang Z, Yu C, Zhou LN, et al. Effects of *Tripterygium wilfordii* induction therapy to IgA nephropathy patients with heavy proteinuria [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40 (11): 1833-1838.
 [4] Azushima K, Gurley SB, Coffman TM. Modelling diabetic nephropathy in mice [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14 (1): 48-56.
 [5] Passerini P, Malvica S, Tripodi F, et al. Membranous nephropathy (MN) recurrence after renal transplantation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1326.
 [6] Wang YN, Feng HY, Nie X, et al. Recent advances in clinical diagnosis and pharmacotherapy options of membranous nephropathy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 907108.
 [7] Wu W, Cheng R, Boucetta H, et al. Differences in multicomponent pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of tripterygium glycosides tablets in normal and adriamycin-induced nephrotic syndrome rat models and correlations with efficacy and hepatotoxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 910923
 [8] Zhan HF, Jin J, Liang SK, et al. Tripterygium glycoside protects diabetic kidney disease mouse serum-induced podocyte injury by upregulating autophagy and downregulating β -arrestin-1 [J]. *Histol Histopathol*, 2019, 34 (8): 943-952.
 [9] Xi C, Peng SJ, Wu ZP, et al. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 531-541.
 [10] 王伽伯, 崔鹤蓉, 柏兆方, 等. 精准医学下的中药安全性评价策略和方法: 病证毒理学 [J]. *药学学报*, 2016, 51 (11): 1681-1688.
 [11] Sun YB, Qu X, Caruana G, et al. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis [J]. *Differentiation*, 2016, 92 (3): 102-107.
 [12] Li YJ, Hu QS, Li CL, et al. PTEN-induced partial epithelial-mesenchymal transition drives diabetic kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (3): 1129-1151.
 [13] 吴薇, 刘不悔, 万毅刚, 等. 雷公藤甲素抑制 NLRP3 炎症小体活化改善高糖诱导的足细胞上皮-间充质转化 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44 (24): 5457-5464.
 [14] Xue M, Cheng Y, Han F, et al. Triptolide attenuates renal tubular epithelial-mesenchymal transition via the MiR-188-5p-mediated PI3K/AKT pathway in diabetic kidney disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14 (11): 1545-1557.
 [15] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the

- master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12 (6): 325-338.
- [16] Zhu B, Wang YJ, Zhu CF, et al. Triptolide inhibits extracellular matrix protein synthesis by suppressing the Smad2 but not the MAPK pathway in TGF- β 1-stimulated NRK-49F cells [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25 (10): 3180-3191.
- [17] Tecalco-Cruz AC, Ríos-López DG, Vázquez-Victorio G, et al. Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF- β /Smad signaling pathway in health and disease [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2018, 3: 15.
- [18] Cao YJ, Huang XZ, Fan YP, et al. Protective effect of triptolide against glomerular mesangial cell proliferation and glomerular fibrosis in rats involves the TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 814089.
- [19] Wang LL, Zhao, Li JY, et al. Pharmacological activation of cannabinoid 2 receptor attenuates inflammation, fibrogenesis, and promotes re-epithelialization during skin wound healing [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 786: 128-136.
- [20] Tang M, Cao X, Zhang K, et al. Celastrol alleviates renal fibrosis by upregulating cannabinoid receptor 2 expression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (6): 601.
- [21] Ma ZJ, Zhang XN, Li L, et al. Tripterygium glycosides tablet ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via the Toll-like receptor 4/nuclear factor Kappa B signaling pathway in high-fat diet fed and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 390428.
- [22] Wan YG, Che XY, Sun W, et al. Low-dose of multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. f., a natural regulator of TGF- β 1/Smad signaling activity improves adriamycin-induced glomerulosclerosis in vivo [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151 (3): 1079-1089.
- [23] Hu S, Han RH, Shi JS, et al. The long noncoding RNA LOC105374325 causes podocyte injury in individuals with focal segmental glomerulosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293 (52): 20227-20239.
- [24] Wu W, Yang JJ, Yang HM, et al. Multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. attenuates glomerulosclerosis in a rat model of diabetic nephropathy by exerting anti-inflammatory effects without affecting hyperglycemia [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40 (3): 721-730.
- [25] Han F, Wang SS, Chang YP, et al. Triptolide prevents extracellular matrix accumulation in experimental diabetic kidney disease by targeting microRNA-137/Notch1 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (3): 2225-2237.
- [26] Han F, Xue M, Chang YP, et al. Triptolide suppresses glomerular mesangial cell proliferation in diabetic nephropathy is associated with inhibition of PDK1/Akt/mTOR pathway [J]. *Int J Biolog Sci*, 2017, 13 (10): 1266-1275.
- [27] Rani V, Deep G, Singh RK, et al. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies [J]. *Life Sci*, 2016, 148: 183-193.
- [28] Dennis JM, Witting PK. Protective role for antioxidants in acute kidney disease [J]. *Nutrients*, 2017, 9 (7): 718
- [29] Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, et al. Oxidant mechanisms in renal injury and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25 (3): 119-146.
- [30] Boran T, Gunaydin A, Jannuzzi AT, et al. Celastrol pretreatment as a therapeutic option against cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2019, 8 (5): 723-730.
- [31] Dong XG, An ZM, Guo Y, et al. Effect of triptolide on expression of oxidative carbonyl protein in renal cortex of rats with diabetic nephropathy [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017, 37 (1): 25-29.
- [32] Gao Q, Shen WW, Qin WS, et al. Treatment of db/db diabetic mice with triptolide: a novel therapy for diabetic nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25 (11): 3539-3547.
- [33] Li J, Jin J, Li M, et al. Role of Nrf2 in protection against triptolide-induced toxicity in rat kidney cells [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 213 (2): 194-202.
- [34] Wang XW, Tian RM, Yang YQ, et al. Triptolide antagonizes triptolide-induced nephrocyte apoptosis via inhibiting oxidative stress in vitro and in vivo [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109232.
- [35] Nagata M. Podocyte injury and its consequences [J]. *Kidney Int*, 2016, 89 (6): 1221-1230.
- [36] Liang XH, Chen BH, Wang P, et al. Triptolide potentiates the cytoskeleton-stabilizing activity of cyclosporine A in glomerular podocytes via a GSK-3 β dependent mechanism [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12 (3): 800-812.
- [37] Yang QQ, Sun MJ, Chen Y, et al. Triptolide protects podocytes from TGF- β -induced injury by preventing miR-30 down-regulation [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9 (11): 5150-5159.
- [38] Chen Z, Wan X, Hou Q, et al. GADD45B mediates podocyte injury in zebrafish by activating the ROS-GADD45B-p38 pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7 (1): e2068.
- [39] Zheng CX, Chen ZH, Zeng CH, et al. Triptolide protects podocytes from puromycin aminonucleoside induced injury in vivo and in vitro [J]. *Kidney International*, 2008, 74 (5): 596-612.
- [40] Kolati SR, Kasala ER, Bodduluru LN, et al. BAY 11-7082 ameliorates diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammation via NF- κ B pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 39 (2): 690-699.
- [41] Bai LX, Li JC, Li HL, et al. Renoprotective effects of artemisinin and hydroxychloroquine combination therapy on IgA nephropathy via suppressing NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation by exosomes in rats [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 169: 113619.
- [42] Su BF, Ye H, You XH, et al. Icaritin alleviates murine lupus nephritis via inhibiting NF- κ B activation pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Life Sci*, 2018, 208: 26-32.
- [43] Kim JE, Lee MH, Nam DH, et al. Celastrol, an NF- κ B inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e62068.
- [44] Zhang M, Chen Y, Yang MJ, et al. Celastrol attenuates renal injury in diabetic rats via MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Phytother Res*, 2019, 33 (4): 1191-1198.
- [45] Fu Y, Lin Q, Gong T, et al. Renal-targeting triptolide-glucosamine conjugate exhibits lower toxicity and superior efficacy in attenuation of ischemia/reperfusion renal injury in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37 (11): 1467-1480.

- [46] Yu XW, Meng X, Xu M, et al. Celastrol ameliorates cisplatin nephrotoxicity by inhibiting NF- κ B and improving mitochondrial function [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 266-280.
- [47] Zhai XW, Wang L, Xu C, et al. Triptolide preserves glomerular barrier function via the inhibition of p53-mediated increase of GADD45B [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 671: 210-217.
- [48] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43 (6): 582-592.
- [49] Liu DW, Liu FX, Wang XT, et al. MiR-130a-5p prevents angiotensin II-induced podocyte apoptosis by modulating M-type phospholipase A2 receptor [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17 (21-22): 2484-2495.
- [50] Liu WT, Peng FF, Li HY, et al. Metadherin facilitates podocyte apoptosis in diabetic nephropathy [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7 (11): e2477.
- [51] Matoba K, Kawanami D, Nagai Y, et al. Rho-Kinase blockade attenuates podocyte apoptosis by inhibiting the notch signaling pathway in diabetic nephropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (8): 1795.
- [52] Zhang L, Ren ZL, Yang Q, et al. Csk regulates angiotensin II-induced podocyte apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2016, 21 (7): 846-855.
- [53] Yang YQ, Liang J, Han XD, et al. Dual-function of triptolide in podocytes injury: inhibiting of apoptosis and restoring of survival [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1932-1939.
- [54] Wang XW, Tian RM, Yang YQ, et al. Tripterygium glycoside fraction n2 ameliorates adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats by suppressing apoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112789.
- [55] Hu GZ, Gong XL, Wang L, et al. Triptolide promotes the clearance of α -synuclein by enhancing autophagy in neuronal cells [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54 (3): 2361-2372.
- [56] Zhou J, Xi C, Wang WW, et al. Autophagy plays an important role in triptolide-induced apoptosis in cardiomyocytes [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 236 (3): 168-183.
- [57] Hasnat M, Yuan Z, Naveed M, et al. Drp1-associated mitochondrial dysfunction and mitochondrial autophagy: a novel mechanism in triptolide-induced hepatotoxicity [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2019, 35 (3): 267-280.
- [58] Tagawa A, Yasuda M, Kume S, et al. Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2016, 65 (3): 755-767.
- [59] Ding Y, Choi ME. Autophagy in diabetic nephropathy [J]. *J Endocrinol*, 2015, 224 (1): R15-R30.
- [60] Liang SK, Jin J, Shen XG, et al. Triptolide protects podocytes via autophagy in immunoglobulin A nephropathy [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16 (3): 2275-2280.
- [61] Li XY, Wang SS, Han Z, et al. Triptolide restores autophagy to alleviate diabetic renal fibrosis through the miR-141-3p/PTEN/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2017, 9: 48-56.
- [62] Gong JG, Jin J, Zhao L, et al. Tripterygium glycoside protects against puromycin amino nucleoside-induced podocyte injury by upregulating autophagy [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42 (1): 115-122.
- [63] 何康婧, 高增平, 王晓雪, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 自噬信号通路研究雷公藤多苷片对糖尿病肾病大鼠肾脏损伤的保护作用 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (6): 905-909.
- [64] Dong CL, Zheng HN, Huang SS, et al. Heme oxygenase-1 enhances autophagy in podocytes as a protective mechanism against high glucose-induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 337 (2): 146-159.
- [65] Ryter SW. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 678: 108186.
- [66] Zhan XJ, Yan CX, Chen YB, et al. Celastrol antagonizes high glucose-evoked podocyte injury, inflammation and insulin resistance by restoring the HO-1-mediated autophagy pathway [J]. *Mol Immunol*, 2018, 104: 61-68.
- [67] Kodner C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management [J]. *Am Fam Physician*, 2009, 80 (10): 1129-1134.
- [68] Shang SL, Cai GY, Duan SW, et al. Retrospective analysis of tacrolimus combined with *Tripterygium wilfordii* polyglycoside for treating idiopathic membranous nephropathy [J]. *BMC Nephrol*, 2018, 19 (1): 182.
- [69] Liu SS, Li XY, Li H, et al. Comparison of *tripterygium wilfordii* multiglycosides and tacrolimus in the treatment of idiopathic membranous nephropathy: a prospective cohort study [J]. *BMC Nephrol*, 2015, 16: 200.
- [70] Jin YX, Zhang JY, Wang YX, et al. *Tripterygium wilfordii* multiglycosides combined with prednisone in the treatment of idiopathic membranous nephropathy: a protocol for a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (5): e18970.
- [71] Zhao X, Tang XJ, Yan Q, et al. Triptolide ameliorates lupus via the induction of miR-125a-5p mediating Treg upregulation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 71: 14-21.
- [72] Astry B, Venkatesha SH, Laurence A, et al. Celastrol, a Chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ [J]. *Clin Immunol*, 2015, 157 (2): 228-238.
- [73] Guo H, Pan C, Chang B, et al. Triptolide improves diabetic nephropathy by regulating Th cell balance and macrophage infiltration in rat models of diabetic nephropathy [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124 (6): 389-398.
- [74] Zhang JB, Shan J, Chen XL, et al. Celastrol mediates Th17 and Treg cell generation via metabolic signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497 (3): 883-889.
- [75] Zhao DQ, Li SW, Liao T, et al. Triptolide inhibits donor-specific antibody production and attenuates mixed antibody-mediated renal allograft injury [J]. *Am J Transplant*, 2018, 18 (5): 1083-1095.
- [76] Pei WY, Yang CH, Zhang XL. Effects and mechanism of *Tripterygium wilfordii* on chronic glomerulo nephritis [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15 (1): 1-10.
- [77] Qi Q, Li H, Lin ZM, et al. (5R)-5-hydroxytriptolide ameliorates anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in NZW mice by regulating Fc γ receptor signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39 (1): 107-116.
- [78] Zhang LY, Li H, Wu YW, et al. (5R)-5-hydroxytriptolide ameliorates lupus nephritis in MRL/lpr mice by preventing

- infiltration of immune cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 312 (4): F769-F777.
- [79] Wang YP, Zhou CJ, Liu YH. Wnt signaling in kidney development and disease [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 153: 181-207.
- [80] Chang BC, Chen WD, Zhang Y, et al. *Tripterygium wilfordii* mitigates hyperglycemia-induced upregulated Wnt/ β -catenin expression and kidney injury in diabetic rats [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15 (4): 3874-3882.
- [81] Shi G, Wu W, Wan YG, et al. Low dose of triptolide ameliorates podocyte epithelial-mesenchymal transition induced by high dose of D-glucose via inhibiting Wnt3a/ β -catenin signaling pathway activation [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2018, 43 (1): 139-146.
- [82] Nardi I, Reno T, Yun X, et al. Triptolide inhibits Wnt signaling in NSCLC through upregulation of multiple Wnt inhibitory factors via epigenetic modifications to Histone H3 [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143 (10): 2470-2478.
- [83] Wang SR, Ma K, Zhou CQ, et al. LKB1 and YAP phosphorylation play important roles in Celastrol-induced β -catenin degradation in colorectal cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11: 432508520.
- [84] Jing Y, Wu M, Zhang D, et al. Triptolide delays disease progression in an adult rat model of polycystic kidney disease through the JAK2-STAT3 pathway [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315 (3): F479-F486.
- [85] Leuenroth SJ, Bencivenga N, Igarashi P, et al. Triptolide reduces cystogenesis in a model of ADPKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19 (9): 1659-1662.
- [86] Leuenroth SJ, Okuhara D, Shotwell JD, et al. Triptolide is a traditional Chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (11): 4389-4394.
- [87] 万毅刚, 孙伟, 窦晨辉, 等. 雷公藤多苷对阿霉素肾病模型鼠肾组织 TGF- β 1/Smad 信号通路的干预作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31 (4): 517-524.
- [88] Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29 (17): 1727-1745.
- [89] Wang Y, Guo SH, Shang XJ, et al. Triptolide induces Sertoli cell apoptosis in mice via ROS/JNK-dependent activation of the mitochondrial pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39 (2): 311-327
- [90] Zhou YY, Xia L, Yao WQ, et al. Arctiin antagonizes triptolide-induced hepatotoxicity via activation of Nrf2 pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 2508952.
- [91] Wang JM, Chen RX, Zhang LL, et al. In vivo protective effects of chlorogenic acid against triptolide-induced hepatotoxicity and its mechanism [J]. *Pharm Biol*, 2018, 56 (1): 626-631.
- [92] Pan J, Shen FH, Tian K, et al. Triptolide induces oxidative damage in NRK-52E cells through facilitating Nrf2 degradation by ubiquitination via the GSK-3 β /Fyn pathway [J]. *Toxicol in Vitro*, 2019, 58: 187-194.
- [93] Yang F, Zhuo L, Ananda S, et al. Role of reactive oxygen species in triptolide-induced apoptosis of renal tubular cells and renal injury in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011 Jun; 31 (3): 335-341.
- [94] Dan H, Peng RX, Ao Y, et al. Segment-specific proximal tubule injury in tripterygium glycosides intoxicated rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2008, 22 (6): 422-428.
- [95] Wang JM, Li JH, Cai H, et al. Leigongteng (Radix et Rhizoma *Tripterygii*) via compatibility with Jinqiancao (Herba *Lysimachiae*): its toxicity-reduced efficacy in H22-bearing mice [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 39 (4): 550-558.
- [96] Allard T, Wenner T, Greten HJ, et al. Mechanisms of herb-induced nephrotoxicity [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20 (22): 2812-2819.
- [97] Shen QQ, Wang JJ, Yuan ZQ, et al. Key role of organic cation transporter 2 for the nephrotoxicity effect of triptolide in rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77: 105959.
- [98] Li XX, Du FY, Liu HX, et al. Investigation of the active components in *Tripterygium wilfordii* leading to its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 238-243.
- [99] Shu B, Duan WG, Yao JC, et al. Caspase 3 is involved in the apoptosis induced by triptolide in HK-2 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23 (4): 598-602.
- [100] Sun M, Song H, Ye Y, et al. Differential toxicities of triptolide to immortalized podocytes and the podocytes in vivo [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2375-2386.
- [101] 陈文娟, 吴晶金. 雷公藤毒性及中药配伍减毒研究进展 [J]. *中成药*, 2023, 45 (2): 499-503.
- [102] 郑雁雪, 王圆圆, 王琳, 等. 中药配伍减毒增效的现代研究及思考 [J]. *中草药*, 2023, 54 (2): 386-395.
- [103] Vaziri ND, Liu S, Farzaneh SH, et al. Dose-dependent deleterious and salutary actions of the Nrf2 inducer dh404 in chronic kidney disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 86: 374-381.

(收稿日期: 2023-11-14; 修回日期: 2023-12-18)

肺动脉高压治疗药物新靶点的研究进展

李昱辰^{1,2}, 李欣玫², 吴凡², 李特^{1,2*} (1. 大理大学 药学院, 云南 大理 671000; 2. 云南省阜外心血管病医院 药剂科, 昆明 650102)

摘要: 肺动脉高压是一种复杂的心肺血管疾病, 由于极高的致死率、致残率, 一度被称为心血管领域的“恶性肿瘤”。目前, 已上市肺动脉高压靶向药物在我国的广泛应用极大地提高了患者的生存率, 然而, 现有药物仍存一定的局限性, 如疗效欠佳、不良反应严重等。近年来, 随着对肺动脉高压发病机制研究的不断深入, 越来越多的新靶点和新通路的发现为治疗肺动脉高压提供了更多的可能。TLR3 激动剂 Poly (I : C)、STAT3 信号通路的 Corosolic acid 等都已经进入临床试验阶段, 有望填补现有靶向药物治疗的不足。与此同时, 许多药物 (如布洛芬、左西孟旦等) 也有望成为肺动脉高压的靶点药物。本文主要总结了肺动脉高压新靶点治疗药物的研究现状, 以期为今后肺动脉高压的研究和靶向治疗提供理论依据。

关键词: 肺动脉高压; 靶向药物; 药物治疗

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0154-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.024

Research progress in new drug targets for the treatment of pulmonary hypertension

LI Yu-chen^{1,2}, LI Xin-mei², WU Fan², LI Te^{1,2*} (1. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. Department of Pharmacy, Yunnan Fuwai Cardiovascular Hospital, Kunming 650102)

Abstract: Pulmonary hypertension (PH) is a complex cardiovascular disease with high mortality and disability rates. The utilization of PH-targeted drugs in China has enhanced patient survival rate. However, these drugs still possess limitations, such as low efficacy and obvious side effects. Recent research on the cause of PH has led to the discovery of new targets and pathways, offering hope for more treatment options. Clinical trials are underway for TLR3 agonist Poly (I : C) and Corosolic acid, which target the STAT3 signaling pathway. These treatments may overcome the limitations of existing medications. Additionally, drugs used in other fields, such as ibuprofen and levosimendan, have shown potential as therapies for PH. This article reviewed current research on new target drugs to lay the groundwork for future research and development of therapeutic targets for PH.

Key words: pulmonary hypertension; targeted drug; drug therapy

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是以肺动脉 (主要是肺小动脉) 病变导致的肺血管阻力和肺动脉压升高为主要特征的恶性进行性疾病, 严重者可致右心衰竭 (RHF) 甚至死亡。最新数据表明, PH 的成人发病率和患病率分别为每百万人 0 ~ 6 例和 48 ~ 55 例^[1-2]。由于病情发展迅速, 具有高致死率、致残率, 一度被视为

心血管领域的“恶性肿瘤”^[3]。根据 2022 欧洲心脏病学会 / 欧洲呼吸病学会 (ESC/ERS) 肺动脉高压指南^[1], 其分为动脉型肺动脉高压 (PAH)、左心疾病相关肺动脉高压、肺部疾病和 / 或低氧相关肺动脉高压、肺动脉阻塞病相关肺动脉高压以及未明和 / 或多因素所致肺动脉高压五类。其中, 主要推荐 PAH 患者使用靶向药物^[1]。

基金项目: 云南省科技厅昆明医科大学联合专项 (No.202201AY070001-210)。

作者简介: 李昱辰, 女, 硕士, 主要从事临床药学工作, email: yuchen9835@163.com * **通信作者:** 李特, 男, 副主任药师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事医院药学、药物经济学研究, email: at1029@163.com

当前我国 PH 药物治疗包括常规治疗和特异性治疗。常规治疗涵盖抗凝、利尿、其他心血管药物以及贫血治疗；特异性治疗包括钙通道阻滞剂和靶向治疗^[1-2]。靶向药物主要包括作用于前列腺素途径、内皮素途径和一氧化氮（NO）途径的药物。在我国，已上市的靶向治疗药物包括前列腺素类似物、内皮素受体拮抗剂（ERA）、5 型磷酸二酯酶抑制剂（PDE5i）以及可溶性鸟苷酸环化酶（sGC）刺激剂等，显著改善了患者的症状和肺血流动力学，提高了患者的生存率^[4-5]。《2021 中国心血管健康与疾病报告》概要表明，自 2006 年靶向药物波生坦在我国上市，我国正式进入了靶向药物时代，特发性肺动脉高压（IPAH）患者的三年生存率从 38.9% 提升至 75.1%^[6-7]。因此，国内外指南均强调需早日启用靶向药物治疗。然而，当前靶向药物在满足患者治疗需求方面仍有待提

升，仍需不断探索新的治疗靶点^[3]。

本文对现有靶向药物的治疗情况进行了回顾，并对 PH 新的靶点治疗药物进行总结，以期后续 PH 靶向药物治疗的研究提供参考。

1 PH 靶向药物治疗现状

PH 的发病机制尚未完全明确，当前研究表明，血管内皮功能障碍、NO 合成受损以及一氧化氮-鸟苷酸环化酶-环鸟苷酸（NO-sGC-cGMP）途径刺激不足是其最主要的病理特征，血管内皮损伤可致细胞增殖、肺血管重构以及血管收缩，继而导致肺血管阻力（PVR）升高，最终导致 RHF 甚至死亡^[4, 8]。目前，靶向治疗旨在通过前列腺素途径、内皮素途径和 NO 途径来恢复血管活性介质的失衡，目前应用的靶向药物主要包括前列腺素类似物、前列腺素受体激动剂、ERA、PDE5i 以及 sGC 刺激剂等（见表 1）^[8-9]。

表 1 PAH 传统靶向治疗药物
Tab 1 Traditional target therapy drugs for PAH

通路	靶向分类	代表药物	作用机制	不良反应
前列腺素通路	前列腺素类似物	依前列醇、曲前列尼 尔等	扩张肺血管、抗细胞增殖、抗血栓和抗炎 ^[3]	低血压、头痛、面部潮红、恶心 ^[10]
	前列腺素受体激动剂	司来帕格	抑制肺动脉平滑肌细胞收缩、增殖 ^[11]	头痛、恶心、腹泻 ^[11]
内皮素途径	ERA	波生坦、安立生坦、 马昔腾坦	阻断内皮素与其受体 A 和 / 或 B 结合，抑制血管收缩，扩张肺动脉，降低肺血管阻力 ^[3]	肝损伤、外周水肿、贫血 ^[12]
NO 通路	PDE5i	西地那非、他达拉非	减少环鸟苷酸（cGMP）的降解，舒张血管 ^[3]	头痛、潮红、消化不良和鼻出血 ^[13]
	sGC 刺激剂	利奥西呱	抗纤维化、舒张血管、抗增殖和抗炎 ^[14]	头痛、头晕、外周水肿、胃肠道反应、出血和低血压 ^[14]

据 2022ESC/ERS 肺动脉高压指南^[1]，对于无心肺并发症的急性血管反应试验阴性的 IPAH、遗传性 PAH（HPAH）及药物和毒物相关的 PAH（DPAH），靶向药物联合治疗方案推荐见表 2；伴有心肺并发症的患者，初始治疗给予 PDE5i/ERA 单药治疗，随访过程中，若出现中 / 高危风险，则可根据个体差异加用 PH 靶向药物。

表 2 PAH 靶向治疗药物联合治疗方案
Tab 2 Combination therapy with PAH target drugs

阶段	联合方案	推荐 级别	证据 水平
初始联合 治疗	安立生坦+他达拉非	I	B
	马昔腾坦+他达拉非	I	B
	其他 PDE5i + ERA	II a	B
序贯联合 治疗	PDE5i + 马昔腾坦或口服 / 吸入前列腺素类 似物	I	B
	ERA 和 / 或 PDE5i + 司来帕格	I	B
	ERA 或 PDE5i 或利奥西呱 + 口服曲前列尼 尔	I	B

根据已有的临床证据，靶向药物的应用在改善 PH 患者的临床表现、血流动力学、心功能以

及运动能力等方面效果显著，明显提升了患者的生命质量^[10-14]。然而，当前治疗药物仅仅能延缓病情恶化，患者的长期预后仍不尽如人意^[15]。因此，深入了解 PH 发病机制对于寻找新的治疗靶点具有极其重要的意义。

2 PH 新靶点治疗药物

近年来，通过对 PH 病理生理机制研究的不断深入，许多新靶点的治疗药物逐步被发现，如 TLR3 激动剂 Poly (I : C)、STAT3 信号通路的 Corosolic acid 等（见表 3）^[16-29]。

3 老药新用

与此同时，许多已广泛应用的药物（如布洛芬、左西孟旦等），也从中发现了针对 PH 的新靶点^[30-43]（见表 4）。

上述药物为 PH 的治疗提供了更多的可能，其中，紫杉醇单药制剂由于靶向性差、生物利用度低等，尚未用于 PH 的治疗；而徐瑞等^[43-44]的研究表明紫杉醇的纳米晶-caspase-3 复合物及脂质体能够对 PH 产生积极影响。近年来，亦有对

表 3 PAH 新靶点治疗药物
Tab 3 New target therapy drugs for PAH

分类	通路/靶点	药物	作用机制	研究进展
TLR3 激动剂	p53/TLR3 通路	Poly (I : C)	通过白细胞介素 (IL) -10 诱导 TLR3; 增加 BMPR2 表达和下游信号传导; 抗细胞凋亡、抗增殖	动物实验表明 Poly (I : C) 通过直接结合 IRF3 与 BMPR2 启动子, 减少了 p53 敲除小鼠内皮细胞的异常增殖并降低其 PH 值 ^[16]
	STAT3 信号通路	Corosolic acid (CRA)	抑制平滑肌细胞增殖和迁移; 延缓肺血管重构和右室肥厚	体外研究表明, CRA 抑制了 IPAH 患者肺动脉平滑肌细胞 (PASMC) 的过度增殖和迁移; 体内实验表明, CRA 减弱了野百合碱 (MCT) 诱导的 PH 大鼠右室收缩压 (RVSP) 的增加, 改善了肺血管重构和右室肥厚 (RVH) ^[17]
激活素受体融合蛋白	ActRIIA/B	sotatercept	平衡抗增殖和促增殖信号通路, 逆转肺动脉壁及右心室重塑	在一项多中心、双盲、III 期试验中, sotatercept 治疗主要终点 6 min 步行距离 (6MWD) 延长; 次要终点肺血管阻力 (PVR)、WHO 功能分级 (WHO-FC) 和 N 末端脑利钠肽前体 (NT-proBNP) 水平等均有显著改善; 患者耐受性较高, 常见的不良反应是毛细血管扩张和出血 ^[18]
脂肪酸酶抑制剂	lncRNA 和 DEGs	C75	调节胶原含量、细胞增殖、细胞周期和抗炎	C75 可以部分参与 MCT 诱导的 PH 小鼠肺血管重构, 对缺氧诱导的 PH 小鼠的右心室功能亦有保护作用 ^[19]
β 3 肾上腺素能受体激动剂	eNOS-sGC-cGMP	CL316243	降低 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 阳性细胞增殖和肺血管重构; 降低氧化应激和 eNOS 谷胱甘肽酰化, 诱导 sGC α 1 表达上调	增强了缺氧小鼠肺部 NO 依赖信号, 降低了右室后负荷, 减少了右室 (RV) 纤维化, 改善了右室-肺动脉 (RV-PA) 耦合效率, 也增加了右心室射血分数 ^[20]
溶酶体自噬抑制剂	eNOS-NO 信号通路	ROC-325	提高 eNOS 活性, 促进 NO 的生成; 抑制自噬、下调缺氧诱导因子 (HIF) 水平	在 MCT 诱导的 PH 大鼠模型和 SuHx 低氧 PAH 大鼠模型中, ROC-325 抑制 RVSP 和肺血管重构的增加, 改善了 RVH、纤维化和右室衰竭引起的肺血管收缩; 抑制 PASMC 增殖和活力, 促进细胞凋亡 ^[21]
血栓素受体拮抗剂	TXA2/TP 信号通路	NTP42 : KVA4	减少蛋白激酶 C (PKC) 磷酸化和钠钙交换蛋白 1 (NCX-1) 降解水平, 拮抗 TP 信号	在 79 名健康男性志愿者中进行的一项随机、安慰剂对照的首个人类 I 期临床试验表明, 该药物在安全性、耐受性、药代动力学和药效学方面均显示出良好效果; 动物实验表明, NTP42 : KVA4 降低了 MCT 诱导的 PH 大鼠的 RVSP、Fulton 指数以及平均肺动脉压 (mPAP), 减轻了 RV 纤维化 ^[22]
	p38 MAPK 通路	Emetine	抑制 NF- κ B 信号通路, 抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6 等促炎细胞因子的表达, 发挥抗炎作用	减少 MCT 诱导的 PH 大鼠以及 Sugem 低氧 PH 大鼠模型的氧化应激; 由于存在心脏病等细胞性心脏并发症, 还需进一步研究联用 p38 MAPK 抑制剂是否合理 ^[23]
	AKT、ERK、STAT3 和 FoxO1 信号通路	Maresin-1	通过靶向糖蛋白激素受体 6 (LGR6) 受体激活后的 AKT、ERK、STAT3 和 FoxO1 信号通路的磷酸化, 产生抗增殖和促凋亡作用	降低 PH 小鼠的 RVSP, 改善 RVH 和右室功能障碍, 逆转肺血管重构的异常变化, 抑制 PASMC 的增殖并促进细胞凋亡 ^[24]
选择性 BTK 抑制剂	NF- κ B/ MAPK 通路	BGB-3111	抑制 NLRP3 炎症小体和 NF- κ B/ MAPK 信号转导, 从而抑制巨噬细胞 M1 极化和相关炎症因子的产生, 减轻 EndMT 和肺血管重构	体内实验表明, BGB-3111 降低了 MCT 诱导的 PH 大鼠 RVSP、RVH 和减弱了肺血管重构; 体外实验表明, 其抑制了巨噬细胞 M1 极化和炎症因子的产生 ^[25]
存活素抑制剂		YM155	抑制细胞增殖、血管生成, 促进细胞凋亡, 从而延缓肺血管重构, 降低 PAP	体内实验表明, YM155 抑制 MCT 诱导的 PH 大鼠 PASMC 增殖, 促进 PASMC 凋亡; 降低 RVH、mPAP, 逆转肺血管重构 ^[26]
酪氨酸羟化酶 1 抑制剂		Rodatristat ethyl	减少 5-羟色胺释放, 抑制平滑肌细胞增殖, 逆转肺血管重构	正在进行一项 II b 期、双盲、多中心试验, 评估该药物 300 mg 和 600 mg 每日两次的临床疗效、安全性、药代动力学和药效学数据 ^[27]
丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂	ROCK/mTOR 通路	H-1337	抑制肺肌球蛋白轻链 (MLC) 和 mTOR 磷酸化, 抗增殖, 减轻肺动脉压及肺血管重构	动物实验提示, H-1337 可抑制 Sugem 5416/ 低氧 PH 大鼠 PASMC 和心肌细胞的磷酸化, 降低 PAP 和 RVSP, 抑制 RVH 和过度纤维化 ^[28]
选择性 TRPC6 阻滞剂		BI-749327	抑制肺血管收缩和肺血管重构	体内实验显示, BI-749327 可降低低氧诱导的 PH 小鼠 RVSP 和 mPAP, 改善左心功能和纤维化; 体外实验显示, 该药物抑制 PASMC 增殖 ^[29]

联合用药改善 PH 展开研究, 其中, 研究主要集中在雷帕霉素与其他药物的联用, 如联用 STAT3

抑制剂 HO-3867, 可降低肺和心脏组织中 STAT3 和 mTOR 两种信号通路的蛋白磷酸化水平, 从而

表 4 其他药物对 PAH 的作用

Tab 4 Effect of other drugs on PAH

靶点 / 分类	药物	原适应症	降 PAH 作用机制	研究进展
apelin/APJ 通路	布洛芬	解热、镇痛、 抗炎	抑制炎症反应，减少平滑肌细胞的增殖和收缩；升高 cGMP 水平	在高氧诱导的实验性肺支气管发育不良 (BPD) 的新生大鼠模型中，布洛芬的脱靶效应 (通过抑制 cGMP 选择性 PDE 提高细胞内 cGMP 水平) 能够延缓血管重塑 ^[30]
钙离子增敏剂	左西孟旦	心力衰竭	抗增殖、抗炎、扩血管、抗凋亡、 抗氧化应激	一项初步临床随机试验表明，左西孟旦能够降低患者的 PVR 和 mPAP；在一项对 45 例 PH 和严重急性 RHF 患者的开放标签非随机试验中，左西孟旦改善了 WHO-FC、6MWD 以及 Nt-proBNP ^[31]
RyR2 稳定剂	丹曲林	脑卒中、多发 性脑血管硬 化	防止右心室扩张，修复心肌细胞钙 转运，延缓右心室衰竭进程	在 MCT 诱导的 PH 大鼠模型中，观察到腹腔注射该药可以延缓右心室衰竭进程，提高大鼠生存率 23%；丹曲林治疗可以改善 RVH，提高大鼠 80% 的生存率 ^[32]
选择性雌激素受体调节剂	奥美昔芬	乳腺癌、骨质 疏松症	抗炎、抗增殖、调节氧化应激；扩 血管；改善内皮和线粒体功能， 防止血管重构	体外实验表明，奥美昔芬可以抑制低氧诱导的心肌细胞 (H9C2) 和 PASMCs 的增殖；在 MCT 诱导的 PH 大鼠模型中，奥美昔芬减弱了雌性大鼠的右心室高压、肥大和纤维化，逆转了右心室重塑 ^[33]
NLRP3 通路	双硫仑	酒精成瘾	抑制 GSDMD 向 N-GSDMD 的转化 和 IL-1 β 、IL-18 的生成；抑制细 胞焦亡	在低氧诱导的 PH 小鼠模型中，双硫仑降低了 RVSP、mPAP 以及 RVH，延缓了疾病进展；在体外实验中，双硫仑抑制 PASMCs 细胞膜穿孔和裂解死亡
黄嘌呤氧化酶抑制剂	别嘌醇	痛风、肾结石	抑制氧化应激增加活性氧 (ROS) 形成与肺血管重建	在 MCT 诱导的 PH 大鼠模型中，疾病早期使用别嘌醇，可以通过减轻氧化应激和尿酸水平预防血管重构，而在病情加重后使用该治疗药物则疗效欠佳 ^[35]
血管升压素 2 受体拮抗剂	托伐普坦	低钠血症、常 染色体显性 多囊肾病及 心力衰竭	抑制血管升压素结合，增加电解质 水清除率	一项回顾性研究表明，对于 PH 诱发 RHF 的患者而言，经托伐普坦治疗后总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、NT-proBNP、血清尿酸 (UA)、mPAP 显著降低，呼吸困难和下肢水肿的症状也明显改善 ^[36]
非甾体盐皮质激素受体拮抗剂	非奈利酮	慢性肾病、心 肌梗死及心 力衰竭	抗炎、抗纤维化、抗增殖，减轻肺 血管重构和降低肺动脉	在 MCT 诱导的 PH 大鼠模型早期，非奈利酮可以降低大鼠的 PVR 和血管重构；持续的非奈利酮治疗可以减轻 MCT 和低氧诱导的大鼠肺部炎症细胞浸润和血管细胞增殖 ^[37]
钠 / 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂	达格列净	2 型糖尿病	延缓右心室重塑，改善右心室功能， 减轻间隙连接蛋白 43 (Cx43) 重 构，提高关键 RVCM-Ca ²⁺ 处理 蛋白的表达，提高 Ca ²⁺ 和动作电 位时程 (APD) 交替的阈值	日本一项随机、对照、开放标签试验对 78 名基线射血分数 (EF) 正常、2 型糖尿病、高血压和 / 或稳定缺血的患者进行了研究，表明达格列净可减轻运动诱发的 PH ^[38]
抗氧化剂	依达拉奉	急性脑梗死	增加线粒体脂肪酸氧化，减少脂质 积累，改善右心室功能	在 <i>BMP2</i> 基因突变的转基因小鼠模型体内，左卡尼汀通过增加右心室输出量和改善 RVEF 逆转 RHF；体外肺动脉带形对右心室施加的负荷 - 应激模型中，左卡尼汀通过增加脂肪酸氧化和减少脂质积累改善了 H9C2 细胞功能，逆转了右心室功能障碍 ^[39]
HMG-CoA 还原酶抑制剂	阿托伐他汀	高脂血症	抗炎，抗增殖，抑制金属基质蛋白 酶活性，改善肺血管重构及 RVH	依达拉奉能够降低低氧诱导的 PH 大鼠 PAP 和 RVH，并通过抑制 PASMCs 的过度增殖来抑制肺血管重构 ^[40]
脑啡肽酶抑制剂和血管紧张素 II 受体拮抗剂	沙库巴曲缬沙坦	高血压	上调 cGMP 水平及抑制利钠肽的降 解，舒张血管、抗心肌肥厚及纤 维化，延缓肺血管重构	阿托伐他汀钙抑制改善 MCT 诱导的 PH 大鼠 PASMC 的增殖，减少血管重构 ^[41]
	紫杉醇纳米晶 - 胱天蛋白酶 -3 (caspase-3) 复合物	乳腺癌、非小 细胞肺癌	上调肺血管中膜转录因子 FoxO1 的 表达，改善肺血管重构和右心室 肥厚	沙库巴曲缬沙坦可以降低 MCT 诱导的 PH 大鼠的 RVSP，减轻右心室重塑和肺血管重构 ^[42]

降低 PH，改善肺血管重构，减少 RVH；联合低剂量伊马替尼抑制 mTORC1、mTORC2 和血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)，提高了 PASMC 抗

增殖、抗迁移能力，降低了 RVSP、Fulton 指数和右心室 / 体重 (RV/BW)^[45-46]。此外，p53 激动剂 Nutlin3a 和 HIF-2 α 拮抗剂 PT2385 联合治疗可同

时抑制缺氧诱导的平滑肌细胞 (SMC) 增殖和肺动脉内皮细胞 (PAEC) 凋亡^[47]。因此, 今后可以加强对传统药物的新剂型的研究以及传统药物间联合应用的研究, 从而使 PH 患者获得更多收益。

4 小结与展望

PH 靶向药物的广泛应用, 虽显著提高了患者的生存率, 但也存在一定的局限性, 新靶向药物的研发仍然有重要意义。上述 PH 新靶点的潜在治疗药物, 多数通过对抗炎反应、线粒体氧化应激、细胞凋亡等维持肺血管结构和功能; 在动物实验阶段, 部分药物 (如 C75、CL316243、ROC-325、奥美昔芬、双硫仑等) 可改善低氧小鼠 / 大鼠模型的心肺功能, 这些药物或将填补现有靶向药物治疗的不足^[16-17, 19-21, 33-34]。随着研究的深入, 越来越多的致病靶点 [如整联蛋白连接激酶 (ILK)、TANK 结合激酶 1 (TBK1)、免疫细胞、氯离子通道蛋白 (CLIC)、代谢型谷氨酸受体 5 (mGluR5)、脯氨酰羟化酶 2 (PHD2) 等] 被发现, 未来可加强 PH 发病机制的研究, 从而发现更多靶点并开展药物研发工作^[48-53]。

老药新用也是一种思路。一些治疗心力衰竭、高脂血症的药物如左西孟旦、阿托伐他汀等, 在 PH 靶向治疗中疗效显著, 提示我们可关注已上市心血管药物在 PH 中的运用^[31, 41]。另有研究表明, PH 与 UA 有密切联系, 且 UA 水平越高, PH 的后续发展越快、严重程度越高和预后越差^[54]。而别嘌醇可以通过减轻氧化应激和 UA 水平来预防血管重构改善 PH^[35]。因此还应关注并发症治疗药物在 PH 的治疗潜力。

现如今, 新技术如基因组学、网络药理学在 PH 机制研究中发挥着越来越重要的作用。这些技术的应用将为治疗 PH 提供新的可能, 如通过基因组学研究寻找与 PH 相关的基因变异和突变, 以及通过网络药理学研究寻找新的药物作用靶点等^[55-56]。今后, 可考虑将上述新技术与传统方法相结合, 在 PH 的发病机制、生物标志物方面进行探索, 以期发现更多新的潜在治疗靶点及药物。

参考文献

- [1] Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, et al. 2022 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. *G Ital Cardiol (Rome)*, 2023, 24: 1e-116e.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会肺栓塞与肺血管病学组, 中国医师协会呼吸医师分会肺栓塞与肺血管病工作委员会, 全国肺栓塞与肺血管病防治协作组, 等. 中国肺动脉高压诊断与治疗指南 (2021 版) [J]. *中华医学杂志*, 2021, 101 (1): 11-51.
- [3] 王瑞, 武云. 肺动脉高压靶向药物治疗的研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28 (9): 1776-1783.

- [4] Otani N, Tomoe T, Kawabe A, et al. Recent advances in the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15 (10): 1277.
- [5] 罗勤, 柳志红. 肺动脉高压靶向药物治疗原则与进展 [J]. *中国循环杂志*, 2020, 35 (6): 611-614.
- [6] 罗勤, 柳志红, 奚群英, 等. 中国动脉型肺动脉高压患者生存现状调查 [J]. *中国循环杂志*, 2022, 37 (11): 1111-1115.
- [7] 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2022, 37 (6): 553-578.
- [8] 梁宇, 杜冠华. 抗肺动脉高压药物研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35 (7): 902-906.
- [9] Nair A. Pharmacologic therapy for pulmonary artery hypertension [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2020, 35 (6): 643-656.
- [10] 陈雨思, 李江. 前列环素类药物治疗肺动脉高压的研究进展 [J]. *医药导报*, 2022, 41 (2): 195-200.
- [11] 王志伟, 韩宇, 程江涛. 司来帕格在肺动脉高压治疗中的应用 [J]. *中国药房*, 2022, 33 (16): 2040-2043, 2048.
- [12] 方灵芝, 邱学佳, 段宝京, 等. 波生坦、安立生坦及马昔腾坦的药品遴选实践 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2022, 41 (11): 691-696.
- [13] 方灵芝, 邱学佳, 美丽叶. 肺动脉高压治疗药物 5 型磷酸二酯酶抑制剂的 Mini 卫生技术评估 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2022, 20 (5): 57-62.
- [14] Klinger JR, Chakinala MM, Langleben D, et al. Riociguat: clinical research and evolving role in therapy [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (7): 2645-2662.
- [15] 杨晓松. 肺动脉高压的药物治疗进展 [J]. *中国当代医药*, 2021, 28 (5): 37-41.
- [16] Bhagwani AR, Ali M, Piper B, et al. A p53-TLR3 axis ameliorates pulmonary hypertension by inducing BMPR2 via IRF3 [J]. *iScience*, 2023, 26 (2): 105935.
- [17] Kawade A, Yamamura A, Kondo R, et al. Corosolic acid ameliorates vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension via the downregulation of STAT3 signaling [J]. *J Pharmacol Sci*, 2023, 151 (2): 119-127.
- [18] Hoeper MM, Badesch DB, Ghofrani HA, et al. Phase 3 trial of Sotatercept for treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388 (16): 1478-1490.
- [19] Hou CL, Xie LJ, Wang TX, et al. Comparative transcription profiling of mRNA and lncRNA in pulmonary arterial hypertension after C75 treatment [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23 (1): 46.
- [20] Karimi GK, Zhang Y, Kienzle V, et al. β_3 adrenergic agonism: a novel pathway which improves right ventricular-pulmonary arterial hemodynamics in pulmonary arterial hypertension [J]. *Physiol Rep*, 2023, 11: e15549.
- [21] Bao CL, Liang SX, Han Y, et al. The novel lysosomal autophagy inhibitor (ROC-325) ameliorates experimental pulmonary hypertension [J]. *Hypertension*, 2023, 80 (1): 70-83.
- [22] Mulvaney EP, Renzo F, Adão R, et al. The thromboxane receptor antagonist NTP42 promotes beneficial adaptation and preserves cardiac function in experimental models of right heart overload [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 1063967.
- [23] Valipour M, Irannejad H, Emami S. Application of emetine in SARS-CoV-2 treatment: regulation of p38 MAPK signaling pathway for preventing emetine-induced cardiac complications [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21 (22): 2379-2386.

- [24] Li H, Li XY, Hao Y, et al. Maresin 1 intervention reverses experimental pulmonary arterial hypertension in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179: 5132-5147.
- [25] Yu M, Wu XC, Peng LY, et al. Inhibition of Bruton's Tyrosine Kinase alleviates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by modulating macrophage polarization [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6526036.
- [26] Ye BB, Peng XF, Su DY, et al. Effects of YM155 on the proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells in a rat model of high pulmonary blood flow-induced pulmonary arterial hypertension [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2022, 44 (5): 470-479.
- [27] Condon DF, Agarwal S, Chakraborty A, et al. Novel mechanisms targeted by drug trials in pulmonary arterial hypertension [J]. *Chest*, 2022, 161: 1060-1072.
- [28] Shoji H, Yoshida Y, Sanada TJ, et al. The isoquinoline-sulfonamide compound H-1337 attenuates SU5416/hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *Cells*, 2021, 11 (1): 66.
- [29] Jain PP, Lai N, Xiong M, et al. TRPC6, a therapeutic target for pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321 (6): L1161-L1182.
- [30] Chen XY, Han DS, Wang X, et al. Vascular and pulmonary effects of ibuprofen on neonatal lung development [J]. *Respir Res*, 2023, 24 (1): 39.
- [31] Masarone D, Kittleson M, Pollesello P, et al. Use of levosimendan in patients with pulmonary hypertension: what is the current evidence? [J]. *Drugs*, 2023, 83: 195-201.
- [32] Wang YX, Reyes-García J, Mise AD, et al. Role of ryanodine receptor 2 and FK506-binding protein 12.6 dissociation in pulmonary hypertension [J]. *J Gen Physiol*, 2023, 155 (3): e202213100.
- [33] Abdulkareem AO, Tiwari P, Lone ZR, et al. Ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator, protects against pulmonary hypertension [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 943: 175558.
- [34] Hu SL, Wang L, Xu YH, et al. Disulfiram attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension by inhibiting GSDMD cleavage and pyroptosis in HPASMCs [J]. *Respir Res*, 2022, 23 (1): 353.
- [35] Gokcen T, Inci K, Inci EE, et al. Allopurinol treatment reduced vascular remodeling and improved vascular functions in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2022, 77: 102166.
- [36] Che QL, Luo H, Li YP. The role of tolvaptan in pulmonary hypertension: a retrospective study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101 (47): e31587.
- [37] Tu L, Thuillet R, Perrot J, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism by finerenone attenuates established pulmonary hypertension in rats [J]. *Hypertension*, 2022, 79 (10): 2262-2273.
- [38] Wu JC, Liu T, Shi SB, et al. Dapagliflozin reduces the vulnerability of rats with pulmonary arterial hypertension-induced right heart failure to ventricular arrhythmia by restoring calcium handling [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21 (1): 197.
- [39] Agrawal V, Hemnes AR, Shelburne NJ, et al. L-Carnitine therapy improves right heart dysfunction through Cpt1-dependent fatty acid oxidation [J]. *Pulm Circ*, 2022, 12: e12107.
- [40] 金海峰, 王月飞, 郭林娜, 等. 依达拉奉通过抗炎、抗氧化对大鼠缺氧性肺动脉高压病理发展的抑制作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42 (21): 5324-5328.
- [41] 黄邦邦, 练桂丽, 杜阿胖, 等. 阿托伐他汀改善野百合碱诱导的慢性肺动脉高压大鼠肺动脉血管重塑与功能 [J]. *中华高血压杂志*, 2017, 25 (4): 350-357.
- [42] 李敏琦, 谭思远, 唐艺金, 等. 沙库巴曲缬沙坦治疗肺动脉高压大鼠的效果及其机制研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2023, 31 (2): 80-83, 88.
- [43] 徐瑞, 郁慧玲, 邱莉华, 等. 靶向紫杉醇纳米晶-胱天蛋白酶-3 复合物对肺动脉高压大鼠肺血管重构的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2022, 38 (7): 745-751.
- [44] 陈明, 张苗, 王思凝, 等. 紫杉醇脂质体对肺动脉高压大鼠肺血管重构的干预作用 [J]. *中国现代医生*, 2022, 60 (28): 88-91.
- [45] Peng HJ, Zhou L, Li HY, et al. The therapeutic effect and mechanism of rapamycin combined with HO-3867 on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 170: 106102.
- [46] Shi YN, Gu CX, Zhao TT, et al. Combination therapy with rapamycin and low dose imatinib in pulmonary hypertension [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 758763.
- [47] Zheng QY, Lu WJ, Yan H, et al. Established pulmonary hypertension in rats was reversed by a combination of a HIF-2 α antagonist and a p53 agonist [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179 (5): 1065-1081.
- [48] 杨宏飞, 张启杰, 邵良发. ILK 刺激 TLR2 信号通路活化在肺动脉高压中的作用机制 [J]. *临床肺科杂志*, 2022, 27 (6): 838-844.
- [49] 刘美洋, 孙佳伟, 崔志峰, 等. TANK 结合激酶 1 在肺动脉高压中的作用机制 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2022, 30 (7): 29-34.
- [50] 颜菲, 刘一平, 张榕. 细胞因子在肺动脉高压发病机制中作用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28 (13): 2555-2561.
- [51] Alzaydi MM, Abdul-Salam VB, Whitwell HJ, et al. Intracellular chloride channels regulate endothelial metabolic reprogramming in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 68 (1): 103-115.
- [52] Mprah R, Ma Y, Adzika GK, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 blockade attenuates pathological cardiac remodelling in pulmonary arterial hypertension [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2022, 49 (5): 558-566.
- [53] Liu B, Peng Y, Yi D, et al. Endothelial PHD2 deficiency induces nitrate stress via suppression of caveolin-1 in pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2022, 60 (6): 2102643.
- [54] Uk KT, Park KY, Kim HJ, et al. Association of hyperuricemia and pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis [J]. *Mod Rheumatol*, 2019, 29 (6): 1031-1041.
- [55] Bisserier M, Pradhan N, Hadri L. Current and emerging therapeutic approaches to pulmonary hypertension [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2020, 21: 163-179.
- [56] 余志杰, 陈兴, 左建丽, 等. 虎杖治疗肺动脉高压作用机制的网络药理学研究 [J]. *中国药业*, 2022, 31 (12): 53-59.

(收稿日期: 2023-07-26; 修回日期: 2023-10-20)

中药活性肽发现方法研究进展

王鸿杰, 王锐, 高雯* (中国药科大学 中药学院, 南京 211198)

摘要: 中药是天然药物和活性前体的丰富来源, 除小分子成分外, 近年来其中的活性肽/蛋白质也备受关注。快速发展的分离和纯化技术, 结合先进的筛选、鉴定策略, 使越来越多具有药用价值的生物活性肽被发现并报道。本文综述了近年来活性肽的发现流程和筛选新方法, 旨在为研究和发现中药活性肽提供参考。

关键词: 中药; 多肽; 分离纯化; 活性肽筛选

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0160-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.025

Advances in discovery of active peptides from traditional Chinese medicine

WANG Hong-jie, WANG Rui, GAO Wen* (School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: As a rich source of natural medicine and active precursor, traditional Chinese medicine has received increasing attention because of natural active peptides/proteins besides small molecular components. With the rapid development of separation and purification technologies and advanced screening and identification strategies, more biologically active peptides with medicinal value have been discovered and reported. This article reviewed the discovery and screening methods for active peptides in recent years, aiming to provide reference for the research and discovery of active peptides in traditional Chinese medicine.

Key words: traditional Chinese medicine; polypeptide; separation and purification; active peptide screening

如何从中药复杂体系中分离并发现活性先导化合物一直是中药研究的一大挑战。目前, 植物源中药小分子研究较为广泛, 且具有较为成熟的活性成分分离和筛选方法, 如亲和超滤法、生物色谱法、二维涡流色谱法、虚拟筛选法等^[1]。然而除小分子外, 植物源中药特别是种子类还含有各种活性肽/蛋白, 如核桃仁中发现了含有血管紧张素转换酶抑制作用、酪氨酸酶抑制作用以及二肽基肽酶IV抑制作用的多种活性肽^[2-4], 枸杞中含有抗肿瘤活性的枸杞环肽^[5], 太子参中含有减轻慢性阻塞性肺疾病的作用的太子参环肽^[6]等。同时, 动物源中药如水蛭、鳖甲、地龙、鹿茸等含有的多肽和蛋白质被认为是其发挥疗效的物质基础^[7]。如水蛭为破血消癥药, 从中发现的

水蛭素是迄今为止最强的天然凝血酶抑制剂^[8]; 鳖甲为补阴药, 从中发现了具有保肝活性的鳖甲七肽^[9]; 阿胶为补血药, 从中分离出具有刺激造血功能的十一肽^[10]。菌类中药如冬虫夏草活性肽, 具有提高免疫^[11]、抗氧化、抗炎^[12]等药理作用, 灵芝活性肽具有抗氧化^[13]、降压^[14]、抗肿瘤^[15]等药理作用。因此开发活性肽的发现及筛选方法也十分必要。

活性肽是通过酶解、发酵等方式从前体蛋白质水解产生的生物功能超越其营养价值的氨基酸序列片段, 其长度通常为 2~20 个氨基酸残基, 分子量通常小于 6 kDa。它们以非活性形式存在于前体蛋白中, 水解释放后具有抗菌、抗氧化、降压和免疫调节等广泛生物学活性, 并且具有毒

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (No.2021CXGC010507); 2022 年度江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师培养对象项目。

作者简介: 王鸿杰, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药活性成分发现与质量评价研究, email: whjymnl1997@163.com *通信作者:

高雯, 女, 副教授, 博士研究生导师, 主要从事中药活性成分发现与质量评价研究, email: gw_cpu@126.com

性低、易代谢、无耐药性的特点^[16]，用药前景良好。本文对中药活性肽纯化鉴定的流程以及活性

肽筛选新方法进行综述（见图 1），以期对中药活性肽的发现提供理论参考。

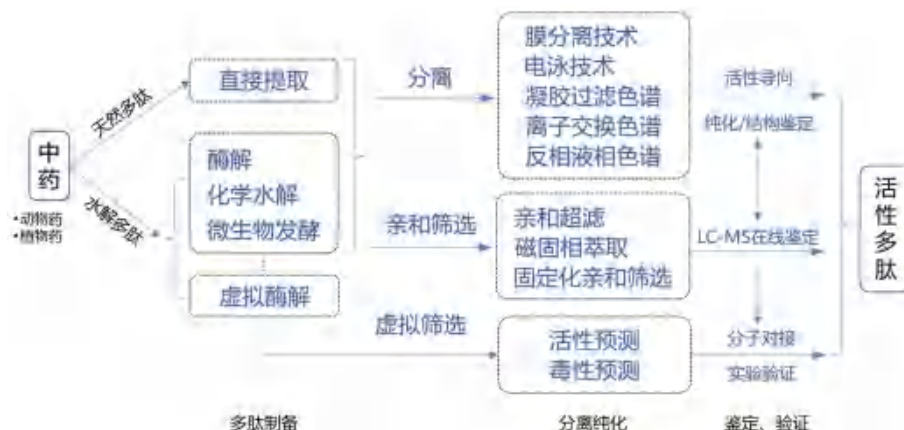


图 1 活性肽发现流程图

Fig 1 Flowchart of active peptide discovery

1 基于活性导向的多肽分离鉴定法

中药来源的活性肽包括天然提取活性肽和水解活性肽。天然提取活性肽即天然存在于中药中的多肽；水解活性肽即蛋白质被水解/酶解/发酵后暴露的具有活性的多肽片段^[17]。对于水解活性肽，其制备往往需要将提取到的蛋白质水解成肽段后，再开展分离纯化。由于多肽分子量远小于蛋白质，其分离材料的选择与分离蛋白略有不同，如超滤膜孔径（通常 < 10 kDa）、凝胶（通常选择分子量分离范围 1000 ~ 5000 Da）等。

1.1 多肽的制备

直接提取法可获得中药中的天然提取活性肽。此外，许多活性肽来自蛋白质的结构片段，因此第一步往往需要水解蛋白质暴露活性肽。目前，从蛋白质获得多肽的常用方法有酶解法、化学水解法、微生物发酵法等，其中，酶解法应用最为广泛。

1.1.1 酶解法 酶解法即采用一种或多种蛋白水解酶将蛋白质水解为小片段肽，具有条件温和、结果可控的优点^[18]。常见的蛋白酶有胰蛋白酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶等。酶对底物具有特异性，不同酶对蛋白质的酶切位点不一样^[19]，因此不同的酶酶解后获得的多肽分子量、活性可能会有所不同。例如，核桃的胃蛋白酶水解产物具有血管紧张素转换酶（angiotensin converting enzyme, ACE）抑制作用，碱性蛋白酶水解产物具有酪氨酸酶抑制作用^[2, 4]。此外，也可以采用多种酶组合进行酶切，这种方法有助于提高蛋白质水解度^[20]，可以获得更多、更短的多肽片段，有可能提高水解产物活性^[21]。值得注

意的是，不同的实验条件对酶解效果有较大的影响，因此需要优化水解温度、pH、酶底比、时间等条件，根据水解度、生物活性等指标确定最佳酶解条件^[22]。

1.1.2 化学水解法 化学水解法即酸碱水解法，通过强酸或强碱催化水解蛋白质肽键制备多肽，其水解位点没有特异性、反应可控性不强，条件极端，易致氨基酸变性，如酸水解会导致色氨酸完全破坏，碱水解会导致大部分氨基酸完全损失^[23]。同时化学水解法由于存在安全性、对环境不友好等问题，在活性肽研究过程中运用较少。

1.1.3 微生物发酵法 微生物发酵法是将微生物直接接种于蛋白质中，通过微生物发酵产生的蛋白酶或肽酶将蛋白质水解成多肽或游离氨基酸^[24]。发酵法利用微生物的生长特性，将酶的生产和水解过程合二为一，节省了酶的分离和纯化步骤，缩短了生产过程，降低了生产成本^[22]。不同微生物具有不同的蛋白质水解系统，不同培养物的蛋白质水解产物也不同。Jakubczyk 等^[25]发现大豆蛋白经植物乳杆菌发酵后，随着发酵进行，肽含量逐渐增加，发酵后分子量为 3.5 ~ 7 kDa 的部分具有 α -淀粉酶抑制活性， IC_{50} 值为 $(1.94 \pm 0.16) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 活性肽的纯化

活性肽的纯度对活性肽的理化性质、生物活性和结构鉴定等研究至关重要。因此，对活性肽进行分离纯化是不可缺少的一步^[20]。

1.2.1 膜分离技术 膜分离技术是利用膜两侧的压力差截留和分离不同质量的分子，一般作为多肽纯化的第一个步骤^[26]。根据膜孔径大小分为微

滤、超滤、纳滤和反渗透四类，其中超滤因其快速、简便而被广泛应用于多肽的纯化^[23]。选用合适的超滤膜可富集一定分子量范围的多肽。Luo 等^[27]应用超滤法初步分离了苦荞的蛋白水解液，基于实验发现分子量 < 3 kDa 的馏分清除自由基活性高于 3 ~ 10 kDa 和 > 10 kDa 的馏分。Xia 等^[28]对绿豆蛋白酶解液进行超滤分离，同样发现低分子量部分 (< 3 kDa) 具有较强的抗氧化活性，这说明酶解可有效地暴露蛋白质中具有活性的多肽片段，且活性肽存在于低分子量部分。然而，仅采用超滤技术不能分离分子量相近的多肽，实际研究中常与其他分离纯化技术相结合^[26]。

1.2.2 电泳技术 不同的多肽具有不同的电荷水平，在电场中向电荷极性相反的方向移动的速度不同，从而实现分离^[22]。一般来讲，电泳技术由于其上样量太少而较少用于多肽的纯化制备^[17]，多用于多肽分子量范围表征或色谱、质谱分析样品的制备。如 Kong 等^[3]用 Tricine-SDS-PAGE 对核桃蛋白及其水解产物进行了表征，发现随着水解程度的增加，高分子量条带的强度逐渐降低，低分子量条带的强度逐渐增大。

1.2.3 色谱技术 色谱技术是分离纯化活性肽的有效手段，其中凝胶过滤色谱、离子交换色谱和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 等均较为常用。

① 凝胶过滤色谱 (尺寸排阻色谱): 凝胶过滤色谱利用分子筛效应按分子量从大到小分离多肽，该方法一般以水为洗脱剂，条件温和，可有效保护多肽的生物活性。如 Zhao 等^[29]采用凝胶过滤分离纯化鹿茸多肽，共分离得到 4 个具有抗炎活性的组分。Yang 等^[30]采用凝胶过滤从紫苏子蛋白水解物中发现了具有抗氧化活性的组分。

② 离子交换色谱: 多肽作为两性电解质，可以采用离子交换色谱法进行分离^[31]。离子交换色谱分离具有较高的分辨率，但洗脱液会引入杂质离子，故其常与凝胶过滤色谱联用以除去引入的无机盐。另外，离子交换色谱不适合分离对 pH、金属离子敏感的生物分子^[17]。Kong 等^[3]采用 SP Sephadex C-25 葡聚糖凝胶柱分离核桃中 < 5 kDa 的水解多肽，获得具有二肽基肽酶 -IV (DPP-IV) 抑制活性的组分。Zhang 等^[32]将牡丹籽超滤液用 DEAE-52 阴离子交换柱 (3.0 cm × 40 cm) 纯化获得两个组分 (F1 和 F2)，其中 F2 具有更强的抗氧化活性。

③ RP-HPLC: 具有分离效率高、分离能力强、保留机制清晰、馏分活性显著等特点，尤其适用

于分离纯化 < 5 kDa 分子量的极性多肽^[22]，常作为多肽分离纯化的最后一步。研究者^[33]对酸枣水解产物进行 3 kDa 超滤后，进行 RP-HPLC 分离，共分离得到 7 个组分 F1 ~ F7，其中 F2 和 F4 组分具有最强的 ACE 抑制活性， IC_{50} 分别为 0.144 mmol · L⁻¹ 和 0.228 mmol · L⁻¹，经质谱鉴定两者氨基酸序列分别为 IER 和 IGK。

值得注意的是，上述几种多肽分离纯化技术各有优缺点，单一的分纯化技术并不能完全满足多肽高效分离纯化的要求。故多肽分离纯化的实际研究中，常常综合考虑多肽的多种性质，采用分离组合技术进行分离纯化，以达到更好的分离纯化效果^[26]。

1.3 活性肽的鉴定

为了明确活性肽的结构组成，阐明其构效关系及作用机制，以便开发出合理的活性肽产品，需要进一步鉴定多肽的结构^[26]。

1.3.1 活性肽一级结构鉴定 多肽一级结构鉴定方法包括 N 端测序法、质谱鉴定法等。N 端测序法是获得纯度较高的多肽后采用 Edman 降解进行测序，较为耗时、灵敏度较低且可鉴定的氨基酸残基数目有限^[31]。如 Wang 等^[2]采用 N 端测序法从核桃水解物中鉴定出两条 ACE 抑制肽 (VERGRRITSV 和 FVIEPNITPA)。随着质谱软电离技术及二级碎裂技术的发展，N 端测序法逐渐被质谱法取代，如电喷雾电离质谱、基质辅助激光解吸质谱等。液质联用 (LC-MS) 技术可识别混合物中的多肽，大大减少样品制备的工作量^[34]，同时，生物信息学工具为多肽进行更快、更准确的鉴定提供了可能^[35]。此外，基于质谱的从头测序 (De novo) 法在多肽的结构鉴定中显示出显著优势，该技术可以在不需要蛋白数据库的情况下完成未知多肽的测序^[36]。例如 Memarpoor-Yazdi 等^[37]借助 PEAKS Studio 软件完成了酸枣果实中两条抗氧化肽 VGQHTR、GWLK 的从头测序。此外，核磁法也可用于多肽一级测序，尤其适用于测定氨基酸数量少于 30 个的肽^[38]，如 Tian 等^[39]通过核磁分析从金铁锁中成功鉴定了 3 种新的抗真菌环肽 Tunicyclins B ~ Tunicyclins D。

1.3.2 活性肽二级结构鉴定 活性肽二级结构与其功能密切相关^[40]，因此评估活性肽二级结构具有重要的意义。多肽中有序的 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规卷曲构象都具有特征光谱，这些独特的光谱构成了二级结构分析的基础^[40]。目前常用傅里叶变换红外技术^[41]、磁共振波谱以及圆二色

性^[40]分析多肽的二级结构,如 Zhang 等^[42]使用傅里叶变换红外技术分析脱脂花生粉(DPF)与脱脂花生水解物(DPH)中多肽的二级结构,发现两者主要的二级结构为β型构象,DPF水解为

DPH后,α-螺旋由 20.93%减少到 16.24%,β-折叠由 43.54%增加到 52.02%。

表 1 总结了近年来国内外分离鉴定的活性肽及其研究方法。

表 1 中药活性肽研究进展
Tab 1 Research progress in active peptides of traditional Chinese medicine

来源	拉丁名	制备法	分离法	鉴定法	肽序列	活性	文献
蒺藜	<i>Fagonia bruguieri</i>	直接提取法	超滤→固相萃取→反相色谱	质谱法	未知(分子量低于 3 kDa)	抗菌肽	[43]
花生	<i>Arachis hypogaea</i>	酶解法(风味酶、碱性蛋白酶、复合酶)	超滤→凝胶过滤	质谱法	5 条肽段(5~7 个氨基酸残基)	鲜味肽	[42]
杏仁	<i>Prunus dulcis</i>	酶解法(中性蛋白酶)	蛋白沉淀→固相萃取	质谱法	2580 条肽段(2~39 个氨基酸残基)	多种生物活性肽	[44]
地龙	<i>Pheretima aspergillum</i>	酶解法(胰蛋白酶、Glu-C)	Pierce C18 Tips 脱盐	质谱法	11 条肽段(9~23 个氨基酸残基)	纤溶肽	[45]
核桃	<i>Juglans regia</i>	酶解法(胃蛋白酶)	超滤→凝胶过滤→反相色谱	N 端测序法	VERGRRITSV、FVIEPNITPA	降压肽	[2]
灵芝	<i>Ganoderma lucidum</i>	酶解法(胃蛋白酶、胰蛋白酶)	超滤→固相萃取	质谱法	VLTGCF	酪氨酸酶抑制肽	[46]
枸杞	<i>Lycium barbarum</i>	直接提取法	超滤→疏水层析→离子交换→凝胶过滤→反相色谱	质谱法	Cycle-(Trp-Glu-His-Thr)	抗肿瘤肽	[5]
核桃	<i>Juglans regia</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	超滤→凝胶过滤	质谱法	FPY	酪氨酸酶抑制肽	[4]
核桃	<i>Juglans regia</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	超滤→离子交换	质谱法	9 条肽段(7~12 个氨基酸残基)	二肽基肽酶 IV 抑制肽	[3]
酸枣	<i>Zizyphus jujuba</i>	酶解法(胰蛋白酶)	超滤→反相色谱	质谱法	IER、IGK	降压肽	[33]
灵芝	<i>Ganoderma lucidum</i>	酶解法(胃蛋白酶、胰蛋白酶)	超滤→固相萃取	质谱法	VDLPTCKGF	抗氧化肽	[13]
太子参	<i>Pseudostellaria heterophylla</i>	直接提取法	多步萃取	质谱法	12 条环肽(4~9 个氨基酸残基)	抗慢性阻塞性肺疾病肽	[6]
绿豆	<i>Phaseolus radiatu</i>	酶解法(中性蛋白酶)	超滤→凝胶过滤	质谱法	8 条肽段(2~5 个氨基酸残基)	抗氧化肽	[28]
蚕蛹	<i>Bombyx mori</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	两步凝胶过滤→反相色谱	质谱法	DHAV	免疫调节肽	[47]
苦荞	<i>Fagopyrum tataricum</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	超滤→离子交换→凝胶过滤→反相色谱	N 端测序法	GEVPW、YMENF、AFYRW	抗氧化肽	[27]
灵芝	<i>Ganoderma lucidum</i>	直接提取法	超滤→疏水层析→离子交换→凝胶过滤→反相色谱	质谱法	EGHGF	抗肿瘤肽	[15]
龙眼	<i>Dimocarpus longan</i>	酶解法(胃蛋白酶、胰蛋白酶)	超滤→反相色谱	质谱法	ETSGMKPTEL、ISSMGILVCL	降压肽	[48]
蚕蛹	<i>Bombyx mori</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	凝胶过滤→反相色谱	质谱法	PNPNTN	免疫调节肽	[49]
灵芝	<i>Ganoderma Lucidum</i>	直接提取法	超滤→凝胶过滤→反相色谱	质谱法	QLVP、QDVL、QLDL	降压肽	[50]
牡丹	<i>Paeonia suffruticosa</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	超滤→离子交换→凝胶过滤→反相色谱	质谱法	SMRKPPG	抗氧化肽	[32]
黑芝麻	<i>Sesamum indicum</i>	酶解法(碱性蛋白酶、胰蛋白酶)	超滤→反相色谱	质谱法	7 条肽段(8~12 个氨基酸残基)	抗氧化肽	[51]
海马	<i>Hippocampus abdominalis</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	超滤→凝胶过滤→反相色谱	质谱法	AGD	抗氧化肽	[52]
牡蛎	<i>Ostrea rivularis</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	超滤→凝胶过滤	质谱法	10 条肽段(7~11 个氨基酸残基)	抗氧化肽	[53]
紫苏	<i>Perilla frutescens</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	凝胶过滤→反相色谱	质谱法	YL、FY	抗氧化肽	[30]
阿胶	<i>Equus asinus</i>	酶解法(胃蛋白酶)	超滤→离子交换→反相色谱	质谱法	APGAPGAPGVPVGPAGK	刺激造血肽	[10]
鹿茸	<i>Cervus elaphus</i>	酶解法(胃蛋白酶、胰蛋白酶)	超滤→大孔吸附树脂→凝胶过滤→反相色谱	质谱法	VH、LAN、AL、IA	抗炎肽	[29]
蚂蟥	<i>Whitmania pigra</i>	直接提取法	凝胶过滤→离子交换→反相色谱	N 端测序法	GPAGVPVGPVGGVGRVGLPGDRG	抗凝肽	[54]
地龙	<i>Pheretima vulgaris</i>	酶解法(碱性蛋白酶)	离子交换→凝胶过滤	质谱法	4 条肽段(5~7 个氨基酸残基)	溶栓肽	[55]

2 活性肽筛选新方法

基于分离纯化方法发现活性肽的流程步骤复杂, 耗时较长, 价格昂贵, 制约了中药活性肽的发现效率, 因此亟须开发活性肽筛选的新方法。

2.1 亲和筛选及在线鉴定

亲和筛选是目前常用的中药活性成分筛选技术^[1], 其根据成分与生物靶标(酶、细胞等)或化学分子特异性结合的特点, 从中药复杂成分中“垂钓”潜在活性成分, 并结合 LC-MS 等高灵敏分析技术, 实现筛选和鉴定。如 Wang 等^[56]应用细胞亲和技术, 从中华蟾蜍毒液中筛选并鉴定了 76 种肿瘤细胞结合肽。

亲和超滤质谱联用技术, 是将亲和筛选与膜分离技术相结合, 分离出多肽-靶蛋白复合物, 分离后再进行鉴定。如 Ma 等^[57]应用生物亲和超滤结合 LC-Orbitrap-MS/MS 技术, 筛选并鉴定了纹鳃的 7 个新型 ACE 抑制肽, 其中 EYFR 和 LPGPGP 具有较好的活性。Hu 等^[58]通过引入变性酶组作为对照以减少假阳性, 从草鱼鳞明胶水解物中筛选并鉴定了 4 个新型酪氨酸酶抑制肽, 其中 DLGFLARGF 活性最强, IC_{50} 为 $3.09 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

固定化亲和筛选是将活性靶标(酶或金属离子等)固定在载体基质上, 将混合物中具有潜在活性的组分进行“固定”以与非活性组分分离的方法。如利用过渡金属离子和一些蛋白质/多肽之间会特异性配位形成螯合物的原理开展亲和层析(固定化金属亲和色谱 IMAC)筛选, 也可首先将靶标固定在磁性微球(Fe_3O_4 等)表面, 通过磁固相萃取开展亲和筛选。Lan 等^[59]利用固定了 ACE 的琼脂糖磁性微球, 从蛇鳝蛋白水解物中有效纯化了 ACE 抑制肽, 对 ACE 抑制的活性由 $(26.8 \pm 1.78) \%$ 提高到 $(83.6 \pm 1.35) \%$, 并通过 RP-HPLC 分离得到 $IC_{50} = (47.3 \pm 1.4) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GMKACF。Thewissen 等^[60]使用 Ni^{2+} -IMAC 纯化经胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶连续水解得到的醇溶蛋白, 纯化后的组分对 ACE 抑制活性明显提高, 其 IC_{50} 为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Sun 等^[61]采用 IMAC- Ni^{2+} 色谱柱纯化蛇鳝肌肉蛋白酶解物, 成功分离出 ACE 抑制肽 RYRP。为了克服 IMAC 表面的金属离子对蛋白/多肽等发生的非特异性吸附导致假阳性问题, Liu 等^[62-63]将聚乙二醇甲基醚(mPEG)修饰在以磁性微球(Fe_3O_4)为核心的 IMAC 上, 以减少非特异性吸附, 从酪蛋白水解物及珍珠贝肉蛋白水解物中筛选出 ACE 抑制肽, 并结合 RP-HPLC 从富集馏分

中分离出了 3 条新型 ACE 抑制肽(LLYQEPVLG-PVR, HLHT 和 GWA)。

金属有机框架(MOF)是一种以金属离子或金属离子簇与有机配体通过自组装形成的高度有序晶体多孔材料^[64], 是酶固定化的优良载体。Feng 等^[65]将 ACE 固定在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-90$ 上, 固定后的 ACE 比游离 ACE 有更好的温度、pH 耐受性及稳定性, 并成功从裙带菜中筛选出一种新型降压肽 KNFL ($IC_{50} = 225.87 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。此外, 多肽的金属螯合活性往往和抗氧化活性有相似性, Chen 等^[66]应用 MIL-53 (Cr) 结合 LC-MS 技术, 从米渣蛋白水解物中“垂钓”出抗氧化肽 GDNMP 和 LLLRW, 两者清除 DPPH 自由基活性的 IC_{50} 分别为 $(0.120 \pm 0.007) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(0.131 \pm 0.008) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 基于计算机辅助的虚拟筛选

随着生物信息学的发展, 基于计算机辅助的活性肽虚拟筛选也被广泛应用。一是基于已知的蛋白氨基酸序列, 通过酶切工具进行理论酶切, 使用计算机预测工具和生物活性肽数据库筛选出高活性、低毒性的未知活性肽, 并与相关靶标进行分子对接, 最后选取得分高的多肽进行后续活性实验验证^[67]。如石嘉怿等^[68]对稻米半胱氨酸蛋白酶抑制剂进行虚拟酶解及虚拟筛选, 发现了潜在的生物活性肽 TDW 和 AGR, 分子对接显示两者具有 ACE 和 DPP-IV 抑制活性。此外, 也可以首先基于肽组学完成水解肽的全面表征, 再使用计算机预测工具和分子对接进行虚拟筛选, 最后通过活性实验完成验证。如 Zhang 等^[69]运用肽组学对豌豆酶解产物成功表征 543 个肽段后, 通过 DPP-IV 抑制肽特征结构初筛与分子对接虚拟筛选, 从中筛选出 8 条肽段, 其中的 7 条肽段被证明具有较强的 DPP-IV 抑制活性。Yu 等^[70]表征阿胶水解物中 519 条活性肽后, 通过水溶性预测、毒性预测、分子对接以及分子动力学模拟筛选出 2 条潜在的免疫调节肽(VQLSGEEK 和 GFSGLDGAKG), 并通过体外细胞实验验证了其具有免疫增强活性和抗炎活性。相较于其他筛选方法, 虚拟筛选省去了大量的实验步骤, 但是需要根据已知结构的蛋白/多肽开展, 同时在虚拟筛选中, 由于参数设置的多样化, 筛选出的活性肽也会有多重结果, 需要结合实验验证或进一步发展人工智能预测模型等。

3 结论与展望

本文总结了中药活性肽发现及筛选方法, 基于分离-纯化-测试的活性肽发现流程效率较低,

因此开发和建立高效的筛选新方法对于活性肽的研究具有重要意义。目前活性肽的快速筛选方法主要包括亲和活性筛选以及虚拟筛选,有效提高了中药活性肽的发现效率。近年来,已有学者提出“活性中药肽的智慧预测与创制”方法,以基因组大数据为基础,结合人工智能、计算机虚拟筛选、转录组学等现代技术高通量筛选中药活性肽^[71]。此外,多肽在体内是否能有效发挥活性也值得关注,例如口服给药由于胃肠道消化、结构功能屏障等致生物利用度差;皮肤给药需要克服皮肤生理屏障^[72]等。因此,除了开发活性肽筛选新策略提高活性肽发现效率,研究多肽药物的体内过程及给药方案,确保有效性也十分必要。

参 考 文 献

- [1] 宋慧鹏, 杨华, 高雯, 等. 中药活性成分发现关键技术研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(7): 1093-1098.
- [2] Wang J, Wang GL, Zhang YF, et al. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides identified from walnut glutelin-1 hydrolysates: molecular interaction, stability, and antihypertensive effects[J]. *Nutrients*, 2021, 14(1): 151.
- [3] Kong XZ, Zhang LN, Song WG, et al. Separation, identification and molecular binding mechanism of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from walnut (*Juglans regia* L.) protein[J]. *Food Chem*, 2021, 347: 129062.
- [4] Feng YX, Wang ZC, Chen JX, et al. Separation, identification, and molecular docking of tyrosinase inhibitory peptides from the hydrolysates of defatted walnut (*Juglans regia* L.) meal[J]. *Food Chem*, 2021, 353: 129471.
- [5] Ji HX, Ma JX, Guo LJ, et al. Amino acid sequence identification of goji berry cyclic peptides and anticervical carcinoma activity detection[J]. *J Pept Sci*, 2021, 27(8): e3326.
- [6] Lu F, Yang H, Lin SD, et al. Cyclic peptide extracts derived from *Pseudostellaria heterophylla* ameliorates COPD via regulation of the TLR4/MyD88 pathway proteins[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 850.
- [7] 杨晓男, 阮丽君, 江兴, 等. 多肽类药物与中药肽研究展望[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 5978-5990.
- [8] Chen JR, Xie XF, Zhang HQ, et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives-a review[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 660757.
- [9] Tang YP, Hu CL, Liu YW. Effect of bioactive peptide of *Carapax Trionycis* on TGF- β 1-induced intracellular events in hepatic stellate cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(1): 69-73.
- [10] Wu HZ, Ren CY, Yang F, et al. Extraction and identification of collagen-derived peptides with hematopoietic activity from *Colla Corii Asini* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 182: 129-136.
- [11] 谢立亚, 安丽萍, 杜培革, 等. 北冬虫夏草多肽酶解工艺及对小鼠免疫功能的影响[J]. 中成药, 2016, 38(9): 2048-2050.
- [12] Wang J, Liu YM, Cao W, et al. Anti-inflammation and antioxidant effect of Cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*, in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats[J]. *Metab Brain Dis*, 2012, 27(2): 159-165.
- [13] Krobthong S, Yingchutrakul Y. Identification and enhancement of antioxidant P1-peptide isolated from *Ganoderma lucidum* hydrolysate[J]. *Food Biotechnol*, 2020, 34(4): 338-351.
- [14] Tran HB, Yamamoto A, Matsumoto S, et al. Hypotensive effects and angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides of Reishi (*Ganoderma lingzhi*) auto-digested extract[J]. *Molecules*, 2014, 19(9): 13473-13485.
- [15] Liu J, Wang HL, Luo Q, et al. LingZhi oligopeptides amino acid sequence analysis and anticancer potency evaluation[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(14): 8377-8384.
- [16] Gong XX, An Q, Le LQ, et al. Prospects of cereal protein-derived bioactive peptides: sources, bioactivities diversity, and production[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(11): 2855-2871.
- [17] 罗永康. 生物活性肽功能与制备[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2019: 10-21.
- [18] López-García G, Dublan-García O, Arizmendi-Cotero D, et al. Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins[J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1343.
- [19] Hou YQ, Wu ZL, Dai ZL, et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017, 8(1): 24.
- [20] Ishak NH, Sarbon NM. A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing[J]. *Food Bioproc Tech*, 2018, 11(1): 2-16.
- [21] Wang R, Yun JM, Wu SJ, et al. Optimisation and characterisation of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides prepared by double enzymatic hydrolysis from *Agaricus bisporus* scraps[J]. *Foods*, 2022, 11(3): 394.
- [22] Wang WQ, Liu ZC, Liu YJ, et al. Plant polypeptides: a review on extraction, isolation, bioactivities and prospects[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 207: 169-178.
- [23] Sridhar K, Inbaraj BS, Chen BH. Recent developments on production, purification and biological activity of marine peptides[J]. *Food Res Int*, 2021, 147: 110468.
- [24] De castro RJS, Sato HH. Biologically active peptides: processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries[J]. *Food Res Int*, 2015, 74: 185-198.

- [25] Jakubczyk A, Karaś M, Złotek U, et al. Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds [J]. *Food Res Int*, 2017, 100: 489-496.
- [26] Li XY, Guo ML, Chi JT, et al. Bioactive peptides from walnut residue protein [J]. *Molecules*, 2020, 25 (6): 1285.
- [27] Luo XY, Fei Y, Xu QZ, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from tartary buckwheat albumin (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) and their antioxidant activities [J]. *J Food Sci*, 2020, 85 (3): 611-617.
- [28] Xia J, Song HD, Huang K, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of mungbean protein [J]. *J Food Sci*, 2020, 85 (6): 1735-1741.
- [29] Zhao L, Wang X, Zhang XL, et al. Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus* Linnaeus) [J]. *J Food Drug Anal*, 2016, 24 (2): 376-384.
- [30] Yang JJ, Hu L, Cai TT, et al. Purification and identification of two novel antioxidant peptides from perilla (*Perilla frutescens* L. Britton) seed protein hydrolysates [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (7): e0200021.
- [31] Lafarga T, Ación-Fernández FG, García-Vaquero M. Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: natural occurrence, isolation, purification, and identification [J]. *Algal Res*, 2020, 48: 101909.
- [32] Zhang F, Qu J, Thakur K, et al. Purification and identification of an antioxidative peptide from peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed dreg [J]. *Food Chem*, 2019, 285: 266-274.
- [33] Memarpour-Yazdi M, Zare-Zardini H, Mogharrab N, et al. Purification, characterization and mechanistic evaluation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from *Zizyphus Jujuba* fruit [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 3976.
- [34] Piovesana S, Capriotti AL, Cavaliere C, et al. Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410 (15): 3425-3444.
- [35] Hao LL, Wang XC, Cao YR, et al. A comprehensive review of oyster peptides: preparation, characterisation and bioactivities [J]. *Rev Aquac*, 2022, 14 (1): 120-138.
- [36] Harnedy PA, O'keeffe MB, Fitzgerald RJ. Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata* [J]. *Food Chem*, 2015, 172: 400-406.
- [37] Memarpour-Yazdi M, Mahaki H, Zare-Zardini H. Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5 (1): 62-70.
- [38] 李天平, 徐珽, 吴逢波, 等. 多肽类物质分离纯化与鉴定方法的研究进展 [J]. *中国药房*, 2009, 20 (22): 1750-1752.
- [39] Tian JM, Shen YH, Yang XW, et al. Antifungal cyclic peptides from *Psammosilene tunicoides* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73 (12): 1987-1992.
- [40] Bao ZL, Cheng YC, Wei JJ, et al. Secondary structure characterization of glucagon products by circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Molecules*, 2022, 27 (22): 7805.
- [41] Yang SN, Zhang QL, Yang HY, et al. Progress in infrared spectroscopy as an efficient tool for predicting protein secondary structure [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 206: 175-187.
- [42] Zhang LX, Sun XJ, Lu X, et al. Characterization of peanut protein hydrolysate and structural identification of umami-enhancing peptides [J]. *Molecules*, 2022, 27 (9): 2853.
- [43] Al-Dhafri KS, Ching CL. Isolation and characterization of antimicrobial peptides isolated from *Fagonia bruguieri* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 194 (10): 4319-4332.
- [44] Huang YP, Dias FFG, Leite Nobrega de Moura Bell J M, et al. A complete workflow for discovering small bioactive peptides in foods by LC-MS/MS: a case study on almonds [J]. *Food Chem*, 2022, 369: 130834.
- [45] Feng TT, Zhang JX, Zhang YP, et al. A strategy for rapid discovery of marker peptides associated with fibrinolytic efficacy of *Pheretima aspergillum* based on bioinformatics combined with parallel reaction monitoring [J]. *Molecules*, 2022, 27 (9): 2651.
- [46] Krobthong S, Yingchutrakul Y, Samutrtai P, et al. The C-terminally shortened analogs of a hexapeptide derived from Lingzhi hydrolysate with enhanced tyrosinase-inhibitory activity [J]. *Arch Pharm*, 2021, 354 (11): 2100204.
- [47] Li ZY, Zhao S, Xin XD, et al. Purification, Identification and functional analysis of a novel immunomodulatory peptide from silkworm pupa protein [J]. *Int J Pept Res Ther*, 2020, 26 (1): 243-249.
- [48] Nuchprapha A, Paisansak S, Sangtanoo P, et al. Two novel ACE inhibitory peptides isolated from longan seeds: purification, inhibitory kinetics and mechanisms [J]. *RSC Adv*, 2020, 10 (22): 12711-12720.
- [49] Li ZY, Zhao S, Xin XD, et al. Purification and characterization of a novel immunomodulatory hexapeptide from alcalase hydrolysate of ultramicro-pretreated silkworm (*Bombyx mori*) pupa protein [J]. *J Asia Pac Entomol*, 2019, 22 (3): 633-637.
- [50] Wu Q, Li Y, Peng K, et al. Isolation and characterization of three antihypertension peptides from the mycelia of *Ganoderma Lucidum* (Agaricomycetes) [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67 (29): 8149-8159.
- [51] Lu X, Zhang LX, Sun Q, et al. Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant pep-

- tides from sesame (*Sesamum indicum* L.) protein hydrolysate [J]. Food Res Int, 2019, 116: 707-716.
- [52] Kim HS, Kim SY, Fernando IPS, et al. Free radical scavenging activity of the peptide from the alcalase hydrolysate of the edible aquacultural seahorse (*Hippocampus abdominalis*) [J]. J Food Biochem, 2019, 43 (7): e12833.
- [53] Ye YH, You LJ, Deng QH, et al. Preparation, structure identification and the anti-photoaging activity of peptide fraction OP-Ia from *Ostrea rivularis* [J]. RSC Adv, 2018, 9 (1): 44-51.
- [54] Zheng XB, Li J, Chen ZW, et al. Purification and characterization of an anticoagulant oligopeptide from *Whitmania pigra* Whitman [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11 (43): 444-448.
- [55] Feng TT, Zhang JX, Wang Y, et al. Purification and identification of thrombolytic peptides from enzymatic hydrolysate of *Pheretima vulgaris* [J]. J Food Biochem, 2022, 46 (12): e14414.
- [56] Wang JJ, Guo HB, Xu DH, et al. Cell affinity screening combined with nanoLC-MS/MS based peptidomics for identifying cancer cell binding peptides from *Bufo gargarizans* [J]. J Pharm Anal, 2021, 206: 114354.
- [57] Ma TX, Fu QQ, Mei QG, et al. Extraction optimization and screening of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Channa striatus* through bioaffinity ultrafiltration coupled with LC-Orbitrap-MS/MS and molecular docking [J]. Food Chem, 2021, 354: 129589.
- [58] Hu ZZ, Sha XM, Zhang L, et al. From fish scale gelatin to tyrosinase inhibitor: a novel peptides screening approach application [J]. Front Nutr, 2022, 9: 853442.
- [59] Lan XD, Liao DK, Wu SG, et al. Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation [J]. Food Chem, 2015, 182: 136-142.
- [60] Thewissen BG, Pauly A, Celus I, et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates [J]. Food Chem, 2011, 127 (4): 1653-1658.
- [61] Sun LX, Wu SG, Zhou LQ, et al. Separation and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from *Saurida elongata* proteins hydrolysate by IMAC-Ni²⁺ [J]. Mar Drugs, 2017, 15 (2): 29.
- [62] Liu PR, Lan XD, Yaseen M, et al. Immobilized metal affinity chromatography matrix modified by poly (ethylene glycol) methyl ether for purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from casein hydrolysate [J]. J Chromatogr B, 2020, 1143: 122042.
- [63] Liu PR, Lan XD, Yaseen M, et al. Purification, characterization and evaluation of inhibitory mechanism of ACE inhibitory peptides from pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) meat protein hydrolysate [J]. Mar Drugs, 2019, 17 (8): 463.
- [64] Silva P, Vilela SMF, Tomé JPC, et al. Multifunctional metal-organic frameworks: from academia to industrial applications [J]. Chem Soc Rev, 2015, 44 (19): 6774-6803.
- [65] Feng XZ, Liao DK, Sun LX, et al. Affinity purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from wakame (*Undaria pinnatifida*) using immobilized ACE on magnetic metal organic frameworks [J]. Mar Drugs, 2021, 19 (3): 177.
- [66] Chen ML, Ning P, Jiao Y, et al. Extraction of antioxidant peptides from rice dreg protein hydrolysate via an angling method [J]. Food Chem, 2021, 337: 128069.
- [67] 步营, 刘瑛楠, 何玮, 等. 基于分子对接技术筛选抗 SARS-CoV-2 海洋活性肽的研究 [J]. 包装与食品机械, 2021, 39 (4): 18-23.
- [68] 石嘉怿, 梁富强, 张太, 等. 基于生物信息学稻米半胱氨酸蛋白酶抑制剂来源生物活性肽的虚拟筛选及分子对接研究 [J]. 中国粮油学报, 2021, 36 (2): 1-8.
- [69] Zhang MK, Zhu L, Wu G, et al. Rapid screening of novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitory peptides from pea (*Pisum sativum* L.) protein using peptidomics and molecular docking [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70 (33): 10221-10228.
- [70] Yu ZP, Wang YX, Shuian D, et al. Identification and molecular mechanism of novel immunomodulatory peptides from gelatin hydrolysates: molecular docking, dynamic simulation, and cell experiments [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71 (6): 2924-2934.
- [71] 秦双双, 韦坤华, 胡营, 等. 药用植物 4.0 研究进展与展望 [J]. 中国现代中药, 2023, 25 (7): 1383-1395.
- [72] Anselmo AC, Gokarn Y, Mitragotri S. Non-invasive delivery strategies for biologics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18 (1): 19-40.

(收稿日期: 2023-04-16; 修回日期: 2023-04-27)

Toll 样受体在冠心病中的研究进展及靶向药物分析

张景, 王可, 来利红* (河南科技大学临床医学院 河南科技大学第一附属医院 心内科, 河南 洛阳 471003)

摘要: 冠心病 (CHD) 是一种以慢性炎症刺激和斑块聚集为特征的心血管疾病 (CVD), 严重威胁着成千上万患者的生命安全。研究发现 Toll 样受体 (TLRs) 通过介导免疫激活参与多种炎症因子的产生, 进而在 CHD 的发生发展中发挥着复杂的双向调节作用。靶向 TLRs 的治疗具有抗动脉粥样硬化的潜在作用。本文就 TLRs 信号在 CHD 中的作用机制及 TLRs 相关抗动脉粥样硬化药物的最新研究进展做一综述。

关键词: 冠状动脉粥样硬化性心脏病; Toll 样受体; 免疫; 炎症; 靶向药物

中图分类号: R541.4 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0168-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.026

Research progress of Toll-like receptors in coronary heart disease and target drug analysis

ZHANG Jing, WANG Ke, LAI Li-hong* (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471003)

Abstract: Coronary heart disease (CHD) is a cardiovascular disease characterized by chronic inflammatory stimulation and plaque accumulation, which seriously threatens the lives of thousands of patients. It has been found that Toll-like receptors (TLRs) participate in the production of many inflammatory factors by mediating the immune activation, and play a complex bidirectional regulatory role in the occurrence and development of CHD. Treatment with targeted TLRs has a potential anti-atherosclerotic effect. This article reviewed the mechanism of TLRs signaling in CHD and the latest research progress in TLRs-related anti-atherosclerotic drugs.

Key words: coronary heart disease; Toll-like receptor; immunity; inflammation; target drug

以冠心病 (coronary heart disease, CHD) 为代表的心血管疾病是全球人类死亡的常见原因^[1]。研究发现免疫系统介导产生的炎症信号参与了 CHD 的发病^[2]。病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 激活多种模式识别受体, 其中 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 在冠状动脉粥样硬化的发生发展中发挥着重要的作用。研究表明平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞等多种细胞均可表达 TLRs。TLR2 和 TLR4 表达于富含脂质和动脉粥样硬化斑块部位, 参与动脉粥样硬化相关炎症反应^[3]。TLR7 和 TLR9 具有加速或减轻动脉粥样硬化的双向调节作用^[4]。总之, 在 CHD 的发生、

进展、斑块的不稳定及破裂等各个时期, TLRs 信号均发挥着重要作用, 大量研究表明, 抑制 TLRs 可以在一定程度上减少血管炎症和动脉粥样硬化斑块的形成进而减缓疾病的进展^[4]。

1 Toll 样受体简介

Toll 样受体是 I 型跨膜模式识别受体, 通过识别 PAMPs 在固有免疫和适应性免疫中发挥关键作用^[5]。截至目前, 在人类和小鼠中共发现 13 种 TLRs^[6], 其中 10 种在人类中, 12 种在小鼠中^[7]。根据 TLRs 的细胞定位和特异性配体将其分为两大类, 其中一类在细胞表面表达并识别微生物的膜组分, 例如脂质、脂蛋白等 (TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR11); 另一

基金项目: 洛阳市科技发展计划项目 (No.2001029A)。

作者简介: 张景, 女, 硕士研究生, 主要从事心血管疾病靶向药物研究, email: zjing2518@163.com * 通信作者: 来利红, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病靶向药物研究, email: lailihongsuda@126.com

类在细胞内如内质网、溶酶体等囊泡的表面上表达, 识别微生物核酸 (TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9)^[4]。TLRs 主要由胞外区、跨膜区和胞内区三个功能区构成^[8]。胞外区是与配体结合的特异部位, 由十到二十余个存在较大差异的富含亮氨酸重复序列组成。跨膜区是富含半胱氨酸的结构域。胞内区由于其保守结构和人类白细胞介素 1 受体 (interleukin-1 receptor, IL-1R) 结构相似, 故被称为 TIR 结构域。该结构域是 TLRs 向下游转导信号的枢纽部位。依据募集到 TLRs 的不同配体, 可将 TLRs 信号传导途径大致分为两类: 髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖性通路和 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (Toll/interleukin-1 receptor domain containing adaptor inducing interferon β , TRIF) 依赖性通路^[8]。当内源性或外源性配体被 TLRs 识别并结合后, 程序性激活 MyD88 或 TRIF 及其下游蛋白, 通过核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、干扰素调节因子 (interferon regulatory factor, IRF) 等信号通路释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、I 型干扰素 (type I interferon, IFN-I) 等炎症因子, 最终参与动脉粥样硬化等多种疾病的发生发展^[2] (见图 1)。

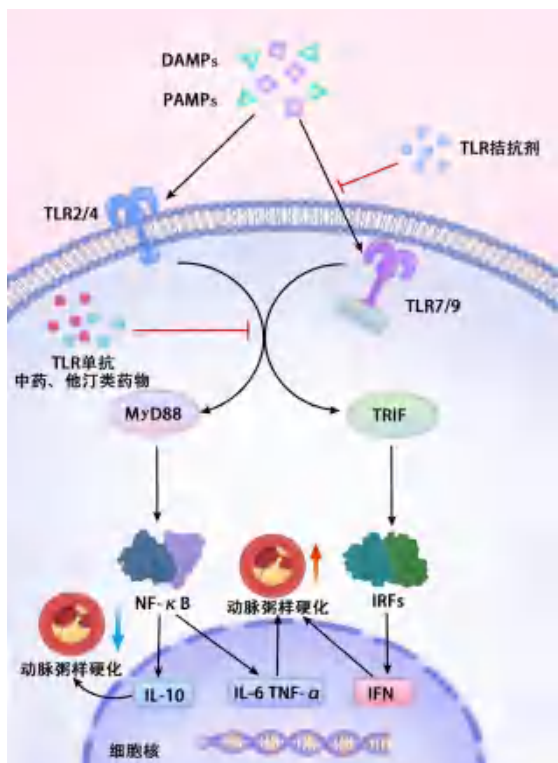


图 1 TLRs 信号在动脉粥样硬化中的调节机制
Fig 1 Regulatory mechanism of TLRs signaling in atherosclerosis

2 TLRs 与 CHD

固有免疫系统在激活炎症级联反应导致组

织损伤过程中起着关键作用。TLRs 激活后介导炎症介质参与 CHD 的发生。TLRs 识别 PAMPs 后, 通过释放促炎细胞因子和诱导适当的免疫反应来保护心肌细胞免受病原体的侵害^[9]。它们还可以通过损伤相关的分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 检测血管中的脂质沉积, 并引发无菌炎症, 对 CHD 起保护作用^[10]。然而, TLRs 的过度激活可能引起持续性炎症刺激进而打破免疫耐受。当 TLRs 识别到其相应配体时, DAMPs 会介导细胞因子风暴加速心肌及血管受损。因此, TLRs 在 CHD 中扮演着复杂的双重调节作用。

2.1 TLR2 与 CHD

既往研究发现 TLR2 激活与 CHD 有着密切的关联。Wen 等^[11]通过生物信息学技术发现 TLR2 与动脉粥样硬化的发生有关。TLR2 在心肌细胞中高表达, 并通过与 MyD88 结合激活 NF- κ B 信号通路以调节基因转录和炎性细胞因子的产生从而介导心肌炎症、心肌纤维化、心肌细胞凋亡和心肌梗死等过程^[12-13]。TLR2 亦可通过激活中性粒细胞和自由基介导的内皮损伤而诱导缺血再灌注后冠状动脉内皮功能障碍^[14]。此外, 心肌梗死患者外周血单核细胞的 TLR2 表达和体外缺氧介导的单核细胞的 TLR2 表达和促炎细胞因子表达呈时间依赖性增加, 这表明, 急性心肌梗死患者的 TLR2 上调和循环单核细胞中促炎细胞因子表达增加与疾病的严重程度相关^[15]。生物信息学技术亦发现 TLR2 的上调可能对急性心肌梗死具有较好的筛选价值^[16]。相反, 在缺乏 TLR2 的小鼠中观察到动脉粥样硬化进展受限、巨噬细胞募集减少和促炎细胞因子释放减少^[17]。因此, TLR2 介导的免疫反应在 CHD 的整个发病过程中发挥着重要的作用。

2.2 TLR4 与 CHD

TLR4 是心脏组织中最常见的 TLR, 是心脏炎症和凋亡过程的关键介质^[3]。研究表明, TLR4 可能参与动脉粥样硬化形成及动脉粥样斑块向易损斑块的进展, 贯穿于单核细胞活化、内皮细胞损伤、血管平滑肌细胞纤维化以及巨噬细胞和泡沫细胞形成的整个过程^[18]。冠状动脉中 TLR4 激活后, 亦可通过 MyD88/NF- κ B 信号诱导多种炎症介质产生, 并且可能通过协同作用促进 TLR2 信号的传导, 加速冠状动脉斑块不稳定和破裂, 最终导致冠状动脉闭塞^[11]。研究发现, 不稳定型心绞痛和急性心肌梗死患者循环单核细胞中 TLR4 表达升高^[19]。类似地, 与健康个体相比,

急性心肌梗死患者的心肌和血浆中 TLR4 和促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IL-10 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 的表达增加。此外, 与 *Tlr-KO* 小鼠相比, WT 小鼠心肌梗死后 α 平滑肌肌动蛋白上调, 表明 TLR4 加剧了心脏重构并增强了梗死区域纤维化^[20]。而抑制 TLR4 信号可以减少动脉粥样硬化病变过程中巨噬细胞的浸润, 减少斑块^[21]。TLR4 缺陷小鼠模型由于左室重塑减少, 心肌梗死后梗死面积显著减小, 存活率提高^[22]。研究发现, 心肌梗死大鼠中的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和 NF- κ B 水平明显高于对照组; 进一步的探索揭示心室旁核 (paraventricular nucleus, PVN) 内小胶质细胞的激活通过 TLR4/NF- κ B 信号通路和 ROS 的产生参与心肌梗死后的交感兴奋; 此外, 抑制 PVN 中 TLR4 和 NF- κ B 可减轻交感神经过度活跃和心肌梗死后的室性心律失常^[23]。这一系列发现表明 TLR4 与 CHD 的发病有着密切关联。

2.3 TLR7 与 CHD

TLR7 是一种定位于核内体或内质网的胞内受体, 显著表达于病毒感染及自身免疫性疾病中, 在冠状动脉疾病中亦可表达^[24]。除免疫细胞外, TLR7 还在内皮细胞、动脉粥样硬化斑块内的巨噬细胞和血小板中表达, 这些细胞在血管和心脏事件中高度活跃^[25]。研究表明巨噬细胞通过 TLR7/MyD88 信号途径诱导 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 等细胞因子的释放而发挥炎症作用^[25-26]。TLR7 亦可识别斑块形成过程中宿主细胞凋亡后释放的内源性 ssRNAs, 进而形成免疫风暴, 加剧心肌细胞的损伤及动脉粥样硬化斑块形成^[24]。更为严重的是, TLR7 可导致心肌梗死后不良左心室重塑^[27]。TLR7 激活的血小板可加速中性粒细胞聚集, 增加血栓形成的风险^[28]。而另一方面, TLR7 可能干扰 TLR2 和 TLR4 的炎症效应, 减少单核细胞趋化蛋白-1 的产生, 并减少巨噬细胞在动脉粥样硬化病变中的聚集, 抑或是通过降低血浆胆固醇来发挥其潜在的保护作用^[28-29]。TLR7 这种促进与抑制动脉粥样硬化的双向调节机制可能是由于其介导的抗炎细胞因子 IL-10 与促炎细胞因子的相互拮抗。

2.4 TLR9 与 CHD

除 TLR2、TLR4 和 TLR7 外, TLR9 对血管炎症和动脉粥样硬化的发展亦有贡献。动脉粥样硬化病变过程中血管坏死释放未甲基化的寡核苷酸 CpG 基序, 作为内源性配体被 TLR9 识

别, 从而激活巨噬细胞发挥固有免疫效应, 促进 IL-6、干扰素 (INF)- α 等炎症因子的产生, 加快泡沫细胞的聚集以及动脉粥样硬化斑块的形成, 亦可增加 CD4⁺ T 细胞对血管平滑肌细胞的细胞毒活性^[30]。类似地, 浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs) 通过 TLR9 信号活化, 产生 IFN-I 等促炎因子加剧血管病变。一项小鼠研究显示, 与远端或非梗死区相比, 心肌梗死区 *Tlr9* 基因表达增加^[31]。TLR9 的刺激会损害急性血管损伤后的再内皮化, 不改变内皮依赖性血管舒张, 同时增加 *Apoe*^{-/-} 小鼠的斑块形成。但也有一些研究者认为, TLR9 除了加速动脉粥样硬化斑块的形成, 还对动脉粥样硬化具有潜在的保护作用。TLR9 通过调节能量代谢和血管生成改善心肌梗死后的心脏功能^[32]。此外, 研究者发现某些药物 (如养心舒脉颗粒) 可以通过 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路调节巨噬细胞极化, 减轻动脉粥样硬化^[33]。TLR9 在动脉粥样硬化中的双向调节作用体现出 TLR9 的独特机制。

3 靶向 TLRs 药物治疗 CHD

TLRs 靶向治疗最初的临床应用主要集中在肿瘤和感染, 但越来越多的证据表明, TLRs 在动脉粥样硬化中发挥重要作用, 选择性靶向 TLRs 可能成为一个有前景的 CHD 治疗策略。

3.1 TLR2 调节剂

阻断 TLR2 途径被认为可以抑制动脉粥样硬化过程中细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶产生。抗 TLR2 单克隆抗体可通过减少 NF- κ B 介导的炎症细胞因子、白细胞内流和促凋亡信号通路, 减少梗死面积并改善心功能^[34]。T2.5 是具有治疗潜力的抗 TLR2 抗体之一, 其通过抑制心脏中的巨噬细胞募集和炎症来预防血管紧张素 II 诱导的心脏纤维化^[8]。同样作为 TLR2 抗体的 Opn301, 可以阻断 TLR2 诱导的细胞因子信号传导, 改善心脏功能并减少缺血再灌注损伤小鼠的梗死面积^[6]。丹参素通过抑制巨噬细胞 TLR2/NF- κ B 信号通路发挥显著的抗炎作用, 这一现象支持了其在治疗动脉粥样硬化和心脏的缺血再灌注损伤中的疗效^[35]。人参皂苷 Rh1 通过阻断脂多糖与 TLR2 和 TLR4 的结合来抑制脂多糖诱导的内皮细胞炎症和细胞凋亡^[36]。此外, 黄芪甲苷可以上调 miR-101a 表达, 从而抑制 TLR2 的表达, 具有潜在的抗炎活性和治疗心血管疾病的作用^[37]。

3.2 TLR4 调节剂

一些心血管药物可以通过减弱 TLR4 信号来发挥多效抗炎和抗动脉粥样硬化作用。例如他汀

类药物可以抑制 TLR4/MyD88 信号传导并引起免疫应答转变为抗炎应答来降低氧化应激，也可通过降低 TLR2 和 TLR4 的表达抑制 NF- κ B 途径来介导动脉粥样硬化斑块的稳定^[6]。阿托伐他汀可显著降低 TLR4 和 NF- κ B 的表达水平，同时下调 TNF- α 水平，并且可以抑制 C-反应蛋白诱导的 TLR4 过表达和人 CD14 单核细胞促炎细胞因子的大量释放。噻唑烷二酮类药物的抗动脉粥样硬化作用也可能是通过抑制 TLR4 信号通路而实现的^[17]。此外，柯里拉京（一种水溶性鞣质）通过抑制 TLR4-NF- κ B/MAPK 信号通路的激活来对抗 M1 型巨噬细胞极化和炎症，从而发挥抗动脉粥样硬化作用^[38]。益生元菊粉已被证明可以降低脂多糖管腔浓度并减轻 *ApoE*^{-/-} 小鼠的动脉粥样硬化^[6]。大黄通过调节血脂及抑制 TLR4 和炎症因子的表达，也显示出抗动脉粥样硬化和斑块稳定性。尽管这些药物尚未应用于 CHD 的治疗，但它们可能通过靶向 TLR4 信号传导来预防动脉粥样硬化的形成。

3.3 TLR7 调节剂

TLR7 在动脉粥样硬化过程中调节免疫应答，平衡促炎 - 抗炎细胞因子的分泌。研究发现，TLR7 拮抗剂通过干扰其配体来阻断 TLR7 信号传导，从而减少新生内膜、管腔狭窄和泡沫细胞的形成，同时减少了动脉壁巨噬细胞浸润^[26]。卡那单抗通过选择性抑制 TLR7 下游的 IL-1 β 水平进而改善心血管结局，并且具有降低血脂的作用^[24]。脑心通显著抑制脑缺血时大脑皮层和心脏中 TLR7 的表达，可能在一定程度上减少动脉粥样硬化的发生^[39]。黄连解毒汤可通过调节 TLR7/MyD88/NF- κ B 通路抑制氧化低密度脂蛋白干预的 RAW264.7 源性泡沫细胞炎症反应，这可能是黄连解毒汤抗动脉粥样硬化的分子机制之一^[40]。加味补阳还五汤抑制 TLR7 及其下游信号转导改善

主动脉细胞的炎性浸润程度和斑块管腔占比^[41]。这些研究表明 TLR7 及下游通路的阻断可能是一种有效的 CHD 治疗方法。有研究用 TLR7 配体咪喹莫特刺激小鼠后，观察到 IL-10 和 TNF- α 的分泌浓度与咪喹莫特剂量成正相关。考虑到 IL-10 和 TNF- α 分别为典型的抗炎和促炎因子，因此，该研究表明 TLR7 的活化能够双向调节动脉粥样硬化的发生发展^[24]。目前 TLR7 激动剂及拮抗剂在 CHD 中可能带来的影响仍不清楚，因此未来需要开展更多的研究，以更好地了解其治疗效果。

3.4 TLR9 调节剂

研究发现，通过干预 TLR9 配体来调控免疫反应，进而控制动脉粥样硬化的发展，可作为心脏缺血或其他损伤后组织修复的治疗措施。E6446 是一种具有口服生物活性的 TLR9 抑制剂，小鼠实验表明其可通过阻断 TLR9 与配体的结合，从而预防左心室扩张、心功能不全及纤维化的发生或延缓其进展^[42]。羟氯喹可以通过阻断 TLR9 与其配体的结合，进而抑制 IFN- I 的产生来减轻心肌梗死程度^[43]。解毒祛瘀滋阴方可通过促进胆固醇外排，抑制 TLR9/MyD88 激活，缓解系统性红斑狼疮合并动脉粥样硬化的症状^[44]。养心舒脉颗粒通过 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路调节巨噬细胞极化，减轻动脉粥样硬化程度^[33]。Wang 等^[45]报道了抗菌肽 CRAMP 通过激活心肌细胞中 TLR9/AMPK α 途径改善心肌梗死中的心功能障碍。考虑到 TLR9 有促动脉粥样硬化和抗动脉粥样硬化的双向调节作用，需要更好地了解 TLR9 激动剂和抑制剂的治疗效果，以实现把 TLR9 作为治疗靶点的 CHD 治疗策略。

截至目前，一些靶向 TLRs 治疗 CHD 的潜在药物已被发现，其疗效及安全性亦被探索，汇总见表 1。

表 1 TLR 调节剂在冠心病临床开发中的潜在作用

Tab 1 Potential role of TLR modulators in clinical development of CHD

靶向 TLRs	药物	机制	潜在疗效	参考文献
TLR2	T2.5	抑制心脏中的巨噬细胞募集和炎症	减少梗死面积并改善心功能	[8]
	Opn301	阻断 TLR2 诱导的细胞因子信号传导	改善心脏功能并减少缺血再灌注损伤的梗死面积	[6]
	丹参素	抑制巨噬细胞 TLR2/NF- κ B 信号通路	减轻动脉粥样硬化和心脏的缺血再灌注损伤	[35]
	人参皂苷 Rh1	阻断脂多糖与 TLR2 和 TLR4 的结合	减轻内皮细胞损伤	[36]
	黄芪甲苷	抑制 TLR2 表达	减轻动脉粥样硬化程度	[37]
TLR4	阿托伐他汀	抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路	抗动脉粥样硬化	[6]
	柯里拉京	抑制 TLR4-NF- κ B/MAPK 信号通路的激活来对抗 M1 巨噬细胞极化和炎症	抗动脉粥样硬化	[38]
	噻唑烷二酮药物	抑制 TLR4 信号通路	抗动脉粥样硬化	[17]
	益生元菊粉	降低脂多糖管腔浓度	降低动脉粥样硬化发生率	[6]
	大黄	调节血脂及抑制 TLR4 和炎症因子的表达	抗动脉粥样硬化	[17]

续表 1

靶向 TLRs	药物	机制	潜在疗效	参考文献
TLR7	脑心通	抑制心脏及大脑皮层中 TLR7 的表达	抗动脉粥样硬化	[39]
	黄连解毒汤	调节 TLR7/MyD88/NF-κB 通路抑制泡沫细胞炎症反应	减轻动脉粥样硬化程度	[40]
	加味补阳还五汤	抑制 TLR7 及其下游信号转导	改善主动脉细胞炎症浸润程度和斑块管腔占比	[41]
	卡那单抗	通过抑制 IL-1β 选择性炎症靶向治疗	改善心血管结局并独立降低血脂水平	[24]
	咪喹莫特	促进 IL-10 和 TNF-α 的分泌	暂不明确	[24, 29]
TLR9	E6446	阻断 TLR9 与配体的结合	预防心功能不全及纤维化	[42]
	羟氯喹	阻断 TLR9 与其配体的结合	减少心肌梗死面积	[43]
	解毒祛瘀滋阴方	抑制 TLR9/MyD88 激活	缓解动脉粥样硬化	[44]
	养心舒脉颗粒	通过 TLR9/MyD88/NF-κB 信号调节巨噬细胞极化	减轻动脉粥样硬化程度	[33]
	抗菌肽 CRAMP	激活心肌细胞中 TLR9/AMPKα 途径	改善心肌梗死中的心功能障碍	[45]

4 总结展望

TLRs 激活引发的促炎活性可能是促进动脉粥样硬化病变发展的关键因素。因此该信号通路可能作为 CHD 潜在的治疗靶点。然而，靶向 TLRs 的调节治疗是否可以改变 CHD 的进展尚未可知。总之，TLRs 信号是一把双刃剑，作为生理和病理介质发挥双重作用，因此在开发相关药物时，必须掌握这一通路的信号强度。此外，最佳干预时机的确定亦极其重要。值得注意的是，人体内有許多信号通路，存在相互串扰的现象，并且人和小鼠之间的物种差异可能会加大转化医学的难度。因此，基于免疫的心血管治疗仍存在许多不确定性。目前对 TLRs 的研究还很有限，需要对 TLRs 信号及其交叉通路进行更深入地研究。

参考文献

[1] Gaidai O, Cao Y, Loginov S. Global cardiovascular diseases death rate prediction [J]. *Curr Probl Cardiol*, 2023, 48 (5): 101622.

[2] Xu JW, Zheng YB, Zhao YQ, et al. Succinate/IL-1β signaling axis promotes the inflammatory progression of endothelial and exacerbates atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 817572.

[3] Huang RZ, Hu ZC, Chen XR, et al. The transcription factor SUB1 is a master regulator of the macrophage TLR response in atherosclerosis [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8 (19): e2004162.

[4] Komal S, Komal N, Mujtaba A, et al. Potential therapeutic strategies for myocardial infarction: the role of Toll-like receptors [J]. *Immunol Res*, 2022, 70 (5): 607-623.

[5] Kornilov FD, Shabalkina AV, Lin C, et al. The architecture of transmembrane and cytoplasmic juxtamembrane regions of Toll-like receptors [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 1503.

[6] Li BW, Xia YP, Hu B. Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (14): 2751-2769.

[7] Zhang YN, Wu JM, Dong E, et al. Toll-like receptors in cardiac hypertrophy [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1143583.

[8] Yu LL, Feng ZW. The role of Toll-like receptor signaling in the progression of heart failure [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 9874109.

[9] Zare-Bidaki M, Tsukiyama-Kohara K, Arababadi MK. Toll-like receptor 4 and hepatitis B infection: molecular mechanisms and pathogenesis [J]. *Viral Immunol*, 2014, 27 (7): 321-326.

[10] Zhou Y, Little PJ, Downey L, et al. The role of Toll-like receptors in atherothrombotic cardiovascular disease [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3 (3): 457-471.

[11] Wen J, Ren T, Zheng JZ, et al. Identification and verification of pivotal genes promoting the progression of atherosclerosis based on WGCNA [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2023; 51 (1): 276-285.

[12] Rotter Sopasakis V, Sandstedt J, Johansson M, et al. Toll-like receptor-mediated inflammation markers are strongly induced in heart tissue in patients with cardiac disease under both ischemic and non-ischemic conditions [J]. *Int J Cardiol*, 2019, 293: 238-247.

[13] Tang YP, Xu ZL, Chen XY, et al. Effects of enalapril on TLR2/NF-κB signaling pathway and inflammatory factors in rabbits with chronic heart failure [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 9594607.

[14] Vilahur G, Badimon L. Ischemia/reperfusion activates myocardial innate immune response: the key role of the toll-like receptor [J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 496.

[15] Selejan S, Pöss J, Walter F, et al. Ischaemia-induced up-regulation of Toll-like receptor 2 in circulating monocytes in cardiogenic shock [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33 (9): 1085-1094.

[16] Li MJ, Yan SB, Dong H, et al. Clinical assessment and molecular mechanism of the up regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) in myocardial infarction [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022, 22 (1): 314.

[17] Narayanankutty A. Toll-like receptors as a novel therapeutic target for natural products against chronic diseases [J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20 (10): 1068-1080.

[18] Zhang XS, Xue CY, Xu Q, et al. Caprylic acid suppresses inflammation via TLR4/NF-κB signaling and improves atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2019, 16: 40.

[19] van der Pouw Kraan TC, Bernink FJ, Yildirim C, et al. Systemic toll-like receptor and interleukin-18 pathway acti-

- vation in patients with acute ST elevation myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 67: 94-102.
- [20] Yang RH, Song ZX, Wu SQ, et al. Toll-like receptor 4 contributes to a myofibroblast phenotype in cardiac fibroblasts and is associated with autophagy after myocardial infarction in a mouse model [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 279: 23-31.
- [21] Koushki K, Shahbaz SK, Mashayekhi K, et al. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammatory and Toll-like receptor pathways [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 60 (2): 175-199.
- [22] Naftali-Shani N, Levin-Kotler LP, Palevski D, et al. Left ventricular dysfunction switches mesenchymal stromal cells toward an inflammatory phenotype and impairs their reparative properties via Toll-like receptor-4 [J]. *Circulation*, 2017, 135 (23): 2271-2287.
- [23] Wang Y, Hu HS, Yin J, et al. TLR4 participates in sympathetic hyperactivity Post-MI in the PVN by regulating NF- κ B pathway and ROS production [J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101186.
- [24] Shafeghat M, Kazemian S, Aminorroaya A, et al. Toll-like receptor 7 regulates cardiovascular diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113 (Pt A): 109390.
- [25] Cappelletti C, Salerno F, Canioni E, et al. Up-regulation of Toll-like receptors 7 and 9 and its potential implications in the pathogenic mechanisms of LMNA-related myopathies [J]. *Nucleus*, 2018, 9 (1): 398-409.
- [26] Karadimou G, Folkersen L, Berg M, et al. Low TLR7 gene expression in atherosclerotic plaques is associated with major adverse cardio-and cerebrovascular events [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113 (1): 30-39.
- [27] de Kleijn DPV, Chong SY, Wang X, et al. Toll-like receptor 7 deficiency promotes survival and reduces adverse left ventricular remodelling after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115 (12): 1791-1803.
- [28] Koupenova M, Corkrey HA, Vitseva O, et al. The role of platelets in mediating a response to human influenza infection [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1780.
- [29] Karadimou G, Gisterà A, Gallina AL, et al. Treatment with a Toll-like receptor 7 ligand evokes protective immunity against atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice [J]. *J Intern Med*, 2020, 288 (3): 321-334.
- [30] Fukuda D, Pham PT, Sata M. Emerging roles of the innate immune system regulated by DNA sensors in the development of vascular and metabolic diseases [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2022, 29 (3): 297-307.
- [31] Liu FY, Fan D, Yang Z, et al. TLR9 is essential for HMGB1-mediated post-myocardial infarction tissue repair through affecting apoptosis, cardiac healing, and angiogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (7): 480.
- [32] Zhou DC, Su YH, Jiang FQ, et al. CpG oligodeoxynucleotide preconditioning improves cardiac function after myocardial infarction via modulation of energy metabolism and angiogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (5): 4245-4257.
- [33] Huang H, Sun ZQ, Xu JY, et al. Yang-Xin-Shu-Mai granule alleviates atherosclerosis by regulating macrophage polarization via the TLR9/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 318 (Pt A): 116868.
- [34] Clerc OF, Haaf P, Buechel RR, et al. New therapies to modulate post-infarction inflammatory alterations in the myocardium: state of the art and forthcoming applications [J]. *Curr Radiopharm*, 2021, 14 (3): 273-299.
- [35] Ye TT, Xiong DFF, Li YF, et al. Inhibition of nuclear factor kappa B as a mechanism of danshensu during Toll-like receptor 2-triggered inflammation in macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106419.
- [36] Jin Y, Nguyen TLL, Myung CS, et al. Ginsenoside Rh1 protects human endothelial cells against lipopolysaccharide-induced inflammatory injury through inhibiting TLR2/4-mediated STAT3, NF- κ B, and ER stress signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2022, 309: 120973.
- [37] Wu Y, Fan ZJ, Chen ZJ, et al. Astragaloside IV protects human cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury by regulating miR-101a [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 470 (1-2): 41-51.
- [38] Meng D, Deng X, Wu Y, et al. Corilagin ameliorates macrophages inflammation in atherosclerosis through TLR4-NF κ B/MAPK pathway [J]. *Heliyon*, 2023, 9 (6): e16960.
- [39] Li QN, Shang JF, Jiang TY, et al. Exploration of mechanism of "simultaneous treatment of brain and heart" of naoxintong capsules based on Toll-like receptor signaling pathway [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2022, 47 (15): 4110-4118.
- [40] 于红红, 俞琦, 盛蒙, 等. 黄连解毒汤含药血清对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化 TLR7 信号通路的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36 (17): 2082-2085.
- [41] 尚卫兵, 朱博冉, 张海楼, 等. 加味补阳还五汤对防治动脉粥样硬化的 Toll 样受体 7 及其下游信号转导通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (4): 1767-1773.
- [42] Ueda H, Yamaguchi O, Taneike M, et al. Administration of a TLR9 inhibitor attenuates the development and progression of heart failure in mice [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4 (3): 348-363.
- [43] Marsh KM, Rastogi R, Zhang A, et al. Hydroxychloroquine attenuates myocardial ischemic and post-ischemic reperfusion injury by inhibiting the Toll-Like receptor 9-Type I interferon pathway [J]. *Cardiol Cardiovasc Med*, 2022, 6 (4): 416-423.
- [44] He YF, Tian WY, Zhang M, et al. Jieduquyuziyin prescription alleviates SLE complicated by atherosclerosis via promoting cholesterol efflux and suppressing TLR9/MyD88 activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116283.
- [45] Wang XF, Chen LL, Zhao XY, et al. A cathelicidin-related antimicrobial peptide suppresses cardiac hypertrophy induced by pressure overload by regulating IGF1R/PI3K/AKT and TLR9/AMPK α [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (2): 96.

(收稿日期: 2023-08-15; 修回日期: 2023-11-06)

β -谷甾醇调控信号通路治疗乳腺癌的作用机制研究进展

董秋艳, 程哲, 吕良晨, 程经伟, 郭新荣*, 高宇 (陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 乳腺癌是女性中最常见的癌症, 并在女性癌症相关死亡的原因中排名第二。 β -谷甾醇是当归等药用植物的主要活性成分, 具有抗氧化、调节细胞周期、促进细胞凋亡和抗炎等作用, 可通过调节雌激素、Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt、MAPK/ERK 和 NF- κ B 等信号通路发挥对乳腺癌的治疗作用。本研究旨在阐明 β -谷甾醇在治疗乳腺癌中的作用机制, 为其临床应用和新药研发提供理论基础。

关键词: β -谷甾醇; 信号通路; 乳腺癌; 作用机制

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0174-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.027

Research progress of mechanism of action of β -sitosterol-regulated signaling pathway in the treatment of breast hyperplasia

DONG Qiu-yan, CHENG Zhe, LYU Liang-chen, CHENG Jing-wei, GUO Xin-rong*, GAO Yu (Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712000)

Abstract: β -sitosterol is the main active ingredient of Angelica sinensis and other medicinal plants. It has antioxidant, cell cycle-regulating, apoptosis-promoting, and anti-inflammation effects. β -sitosterol can potentially play a therapeutic role in breast cancer by regulating signaling pathways such as estrogen, Wnt/ β -catenin, PI3K/Akt, MAPK/ERK, and NF- κ B. This study aims to elucidate the mechanism of β -sitosterol in the treatment of breast cancer and provide a theoretical basis for the clinical application and new drug development.

Key words: β -sitosterol; signaling pathway; breast cancer; mechanism of action

乳腺癌是全世界女性中最常见的恶性肿瘤, 约占所有女性癌症病例的 30%, 并且是女性癌症相关死亡的第二大原因^[1], 目前乳腺癌的非手术治疗方法有放疗、细胞毒性化疗、内分泌治疗和靶向治疗, 但依然存在抗肿瘤药物疗效差、毒性大、耐药等治疗问题^[2]。近年来研究发现, 天然产物具有显著的抗肿瘤活性, 且毒副作用较人工合成药物小^[3]。因此, 从天然产物中寻找新的活性成分, 有望成为治疗乳腺癌等疾病的有效药物。

β -谷甾醇是一种四环三萜类化合物, 化学名为 5, 22-三烯基- β -羟基-甾-7-烯-20-酮, 通常呈现为白色晶体或结晶性粉末, 无味或微苦味。它是一种植物固醇, 主要存在于谷物、坚果、种子、蔬菜等食品中。现代药理研究表明, β -谷甾醇具有调

节雌激素、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等多种功效^[4]。最新研究发现^[3], β -谷甾醇对乳腺癌有明确的治疗效果, 它可以保护乳腺组织, 抑制雌激素的合成和雌激素受体的表达, 调节乳腺上皮细胞的增殖、凋亡和分化, 调节乳腺细胞中炎症因子的表达, 清除自由基, 降低细胞氧化损伤^[5-6]。近年来, 其由于疗效显著、毒副作用小、安全性好成为研究热点, 被认为是治疗乳腺癌的理想药物。

本文对 β -谷甾醇治疗乳腺癌的分子机制和相关信号传导通路进行综述, 以为临床治疗乳腺癌提供新思路, 促进其在乳腺癌等疾病防治中的应用。

1 β -谷甾醇治疗乳腺癌的相关机制

1.1 氧化应激

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基金 (No.2020JM-586); 陕西省中医药管理局学术流派传承项目 (陕中医药发 [2018] 40 号 - 陕西郭氏针灸学术流派传承工作室项目)。

作者简介: 董秋艳, 女, 硕士研究生, 主要从事针灸治疗内分泌系统疾病的实验与临床研究, email: 408182661@qq.com *通信作者: 郭新荣, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事针灸调节神经-内分泌-免疫网络的临床与实验研究, email: gxr329@126.com

氧化应激是指细胞内活性氧 (ROS) 与活性氮 (RNS) 之间的平衡失衡, 进而激活转录因子, 导致生长因子、炎症细胞因子、趋化因子、细胞周期调控因子、抗炎因子等 500 多个基因不同程度的表达。此外, ROS 和 RNS 的失衡还会引起 DNA 的突变、缺失、扩增和重排等损伤, 进而影响疾病的发生发展。其中, ROS 是一组寿命短、活性高、含氧的分子, 已在多种癌症 (II 至 III 期乳腺癌、晚期非小细胞肺癌、晚期胰腺癌) 中检测到 ROS 产生增加。ROS 具有多种作用, 如可以激活促肿瘤信号, 增强肿瘤细胞存活和增殖, 并导致 DNA 损伤和遗传不稳定, 还可以诱导氧化应激引发的肿瘤细胞死亡^[7]。近年来, 抗氧化剂的致癌作用引起了人们的广泛关注。 β -谷甾醇是一种相对温和的抗氧化剂, 体外研究显示其能显著降低 ROS 水平, 起到抑癌作用^[8]。进一步研究发现, 高浓度 β -谷甾醇可以改善炎症反应, 改善氧化应激指标, 但低浓度 β -谷甾醇恶化氧化应激指标, 尤其是硫代巴比妥酸反应物质 (TBARs), 谷胱甘肽 (GSH) 和过氧化氢酶的水平、过氧化氢酶含量等^[9], 这与以往的研究结果相悖。

1.2 细胞周期

细胞周期失调和持续的细胞分裂是异常增生的一个标志, 通常是由于细胞周期控制途径 [例如细胞周期蛋白、周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 和检查点控制蛋白] 的突变或故障造成的。细胞有丝分裂周期可分为 G₁ 期、S 期、G₂ 期和 M 期, 细胞在 G₁ 期早期面临着“选择”: 保持细胞周期状态、退出细胞周期或进入静息态。其中, 调控细胞周期进程的关键分子为 CDK, 其活性取决于调节亚基细胞周期的蛋白。异常增生常伴有 CDK 的明显升高^[10]。 β -谷甾醇是一种新型的抗乳腺疾病药物, 可通过干预肿瘤细胞周期来达到治疗作用, 可通过下调 CDK4 表达, 导致乳腺癌 G₀/G₁ 细胞周期停滞; 抑制 CDK1 表达, 导致乳腺癌细胞 G₂/M 期停滞^[11]。此外, 还发现 β -谷甾醇可抑制 TGF- β /p-Smad2/3 通路活化, 下调 c-Myc 表达, 抑制乳腺癌细胞增殖、生长及 A1 细胞自噬^[12]。

1.3 炎症反应

炎症反应是乳腺癌发生发展的重要机制, 其中, 促炎性介质环氧化酶 -2 (COX-2) 作为前列腺素样前列腺素 E₂ (PGE₂) 合成的关键分子, 是抗炎、镇痛的重要靶点。与介导生理功能并在大多数组织中表达的同种型 COX-1 不同, COX-2

是一种在病变组织中高表达的蛋白, 其在正常细胞中微乎其微, 但在细胞增殖异常时高表达, 如在肿瘤细胞增殖时^[13-14]。COX-2 抑制剂一直被认为具有抗肿瘤活性^[15], 近期研究发现, β -谷甾醇对 COX-2 介导的免疫细胞、组分及炎症反应均有调控作用。 β -谷甾醇在肿瘤细胞系中对 COX-2 活性有明显抑制作用, 但对 COX-1 活性无影响, 提示其为选择性 COX-2 抑制剂, 具有抗肿瘤作用^[16]。此外, β -谷甾醇能促进人外周血淋巴细胞增殖^[17], 通过释放组胺、5-羟色胺及缓激肽、前列腺素 E 等发挥显著抗炎作用^[18], 进而影响巨噬细胞极化, 产生抗炎表型, 缓解炎症反应^[19]。进一步研究发现, β -谷甾醇抑制 COX-2 活性主要是通过 NF- κ B 调控 COX-2 转录及 MAPK 信号通路而实现的^[20]。

1.4 凋亡

细胞凋亡是一种由基因介导的细胞死亡方式, 在机体生长发育、组织稳态维持和清除损伤细胞等方面发挥着重要作用。凋亡是一种内源性途径, 当出现内源损伤时, 线粒体会释放 Apaf-1、Cyclin 等促凋亡因子。这些因子通过激活效应蛋白 Caspase-3, 促进细胞程序性死亡。在 β -谷甾醇处理的肿瘤细胞中, 发现半胱天冬酶开始翻译后激活、细胞色素 C 释放、PARP 和基因组 DNA 发生蛋白水解, 而以上这些变化均可被 Caspase-3 抑制剂阻断, 从而证实 β -谷甾醇可促进细胞凋亡^[21]。细胞凋亡受到多条信号通路的调控, β -谷甾醇对这些信号通路均有重要作用, 例如, AMPK、PI3K/AKT/mTOR、RAS/RAF/MAPK、JAK/STAT 等信号传导途径^[21]。这些信号通路可以通过凋亡机制诱导异常增生的细胞, 使其失去活性。

2 β -谷甾醇治疗乳腺癌的相关通路

2.1 雌激素信号通路

雌激素信号转导途径是一个复杂的生物过程。雌激素可与受体结合, 激活 ERK1/2 信号通路^[22-23], 调控基因转录及表达, 影响乳腺癌细胞的增殖、存活及分化。此外, BRAF/MEK 信号通路活性是乳腺癌复发风险的重要指标^[24], 联合雌激素受体 (ER) 活性, 可提高乳腺癌复发预测准确率, 为临床治疗提供依据。

β -谷甾醇在人体内具有类似于雌激素 [如他莫昔芬 (SERMs)] 的作用, 已有研究表明其可能通过调控 ER 发挥治疗乳腺癌的作用^[25]。此外, β -谷甾醇可与内质网结合, 下调激活蛋白 -1 (AP-1)、NF- κ B 等转录因子活性, 抑制细胞周期, 促

进乳腺上皮细胞分化,抑制其增殖,从而减慢或阻止乳腺疾病的进展。 β -谷甾醇还可以促进乳腺上皮细胞向分化状态发展,进一步抑制乳腺癌细胞的增殖,因此在治疗乳腺癌方面有潜在的应用价值^[26]。陶仕英等^[27-28]前期研究发现 β -谷甾醇可通过雌激素信号通路调控下游靶基因表达发挥类雌激素效应,并以 ER 拮抗剂 ICI182780 为工具药,发现高浓度 β -谷甾醇可抑制 T47D 细胞增殖,低浓度 β -谷甾醇可促进 T47D 细胞增殖,并可上调 ER 表达。因此,我们推测 β -谷甾醇可能通过调控雌激素信号通路影响乳腺癌细胞增殖及周期。此外, β -谷甾醇还能上调雌激素的表达,并通过 ER 介导 GPER 信号通路,增强对 T 细胞的抑制作用,抑制巨噬细胞炎症介质的产生,从而对乳腺组织起到保护作用^[29]。 β -谷甾醇可能通过雌激素信号通路发挥治疗乳腺疾病的作用。

2.2 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路是一条调控细胞增殖、分化、凋亡的重要通路。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的核心分子,CyclinD1 是其下游靶基因。经典 Wnt 信号通路高度保守,可通过自分泌/旁分泌方式激活胞外 Wnt 配体,并与细胞表面受体结合,从而激活细胞内的 Wnt 信号通路。因此, β -catenin 蛋白在胞质内的稳定性和蓄积是目前研究的热点。它们进入细胞核后与转录因子 TCF/LEF 结合,参与细胞增殖、生存、分化及基因转录和表达调控^[30-31]。

Wnt/ β -catenin 信号通路在乳腺癌发病中起重要作用。研究发现,可以通过调控 Wnt 通路活性,如抑制 Wnt 通路活化,抑制 CyclinD1 表达,促进 β -catenin 降解等治疗乳腺癌。王珂等^[32]发现,Wnt/ β -catenin 信号通路活化后, β -catenin 表达异常,从而促进乳腺癌细胞增殖及肿瘤发生,并且 Her2/Neu 酪氨酸激酶可磷酸化 β -catenin 使其失活,并导致 Wnt/ β -catenin 信号通路异常活化,促进乳腺癌的发生发展^[33]。还有研究发现, β -谷甾醇与 β -catenin 关系密切, β -谷甾醇能显著下调 LEF-1 基因及蛋白的表达,阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制肿瘤细胞的增殖及迁移^[34]。此外, β -谷甾醇可抑制 Wnt 通路下游靶基因 *CyclinD1*、*CDK4* 表达,上调 *p21/Cip1*、*p27/Kip1* 表达,抑制 CDK 激酶活性,使乳腺癌细胞停滞于 G₁ 期^[35]。

2.3 PI3K/Akt 信号通路

PI3K-Akt 信号通路是乳腺癌中最常见的上调通路,与细胞代谢、生长、增殖及凋亡密切相关。

首先,PI3K 活化 PIP2,使其磷酸化,生成第二信使 PIP3,从而激活 Akt,通过调节细胞周期进程影响乳腺癌的发生发展^[36]。其次,抑癌基因 PTEN 是 PI3K/Akt 信号通路的主要负向调节因子之一,它的活性可以有效地抑制 PI3K/Akt 通路的活化,从而起到抑制细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用^[37-38]。乳腺癌细胞内 PI3K/Akt 信号通路异常活化,可调节雌激素对乳腺上皮细胞增殖的抑制效应,进而促进乳腺肿瘤的发生发展^[39]。研究表明 β -谷甾醇可通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制人乳腺癌细胞(MCF-231、MDA-MB-3)的表达,显著降低 Bcl-2 相关细胞死亡信号分子(Bad)、PRAS40 及 GSK-3 β 磷酸化水平^[40-41]。

2.4 MAPK/ERK 信号通路

MAPK/ERK 信号通路也是乳腺癌发生的关键环节,其在乳腺癌细胞增殖分化中发挥重要作用^[42]。MAPK/ERK 信号通路主要由外周受体激活 RTK 和 G 蛋白偶联受体(GPCR)等受体构成,经过一系列蛋白激酶级联反应,最终激活 ERK 家族的蛋白激酶(ERK1、ERK2 和 JNK 1/2),这些蛋白激酶进入细胞核,调节转录因子的磷酸化修饰,进而调控基因的表达,从而影响乳腺细胞的生物学行为^[43-44]。此外,MAPK/ERK 信号通路还可调控乳腺基质细胞增殖及炎症反应,促进乳腺增生^[45]。在免疫功能正常的三阴性乳腺癌(TNBC)小鼠模型中,纤维细胞生长因子受体阻断通过下调乳腺疾病相关成纤维细胞(CAFs)中的 MAPK/ERK 通路来抑制其细胞增殖^[46]。同时研究发现,乳腺疾病中血管内皮生长因子(VEGF)表达水平显著高于邻近组织,并且与乳腺癌分子亚型相关,VEGF 高表达患者的生存时间明显缩短。VEGF 可通过 MAPK/ERK 通路促进 MDA-MB-231 细胞增殖,促进乳腺癌恶性进展^[47]。研究发现 β -谷甾醇可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,抑制 MAPK 通路活性,并可抑制其下游甲羟戊酸胆固醇合成。此外, β -谷甾醇可抑制 MAPK 通路中 ERK1/2 及 JNK 通路,抑制肿瘤细胞增殖^[48]。

2.5 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 作为一种转录因子,在乳腺癌中也有类似的激活模式,包括经典通路和非经典通路。经典通路是 NF- κ B 活化通路中的重要通路,在细胞增殖、分化、凋亡及炎症反应中发挥重要作用。经典的 NF- κ B 通路是指 NF- κ B 在胞质内与 I κ B 结合而不活化。当细胞受到外界刺激时,信

号通过受体或信号分子进入细胞内，激活 I κ B 激酶 (IKK) 复合体，使 I κ B 降解，释放 NF- κ B 入核，进而调控下游基因表达。除此之外，NF- κ B2 (p52) 是非经典信号通路中的关键转录因子，可与 RelB 形成二聚体，结合于 DNA，调控下游基因表达。与经典通路不同，非经典通路依赖于 NIK (NF- κ B 激酶) 介导，NIK 活化 IKK α ，使 p100 部分降解，释放 NF- κ B。研究表明，NF- κ B 信号通路的异常激活可引起乳腺上皮细胞的异常增殖分化，进而促进乳腺肿瘤的发生发展^[49]。

在相关研究中，从糙米中提取的 β -谷甾醇具有显著的抗肿瘤转移潜能，并能抑制乳腺癌细胞的侵袭迁移能力^[50]。 β -谷甾醇通过抑制 NF- κ B 信号通路发挥抗肿瘤转移的作用^[51]。炎症反应时，NF- κ B 持续活化，促进炎症反应，导致非激素依赖的恶性表型^[52]。 β -谷甾醇可以抑制 NF- κ B 的核易位^[53]，减轻炎症反应，抑制肿瘤向恶性转化。抑制 NF- κ B 活性可增加肿瘤细胞对肿瘤坏死因子 (TNF)- α 凋亡的敏感性^[54]，进而降低细胞迁移能力。因此， β -谷甾醇可能通过抑制 NF- κ B 信号通路发挥抗肿瘤、抗炎、抗肿瘤等作用，为乳腺疾病治疗提供新的思路。

3 结语与展望

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤。目前，乳腺癌治疗依赖于手术、放射治疗和化疗。这些治疗方法根据其特点和疗效，综合运用可使乳腺癌治疗的临床疗效显著提高，然而，大多数抗肿瘤药物都存在不良反应，并且都存在耐药性，限制了它们的临床疗效和广泛应用。因此，迫切需要更有效、更安全的抗肿瘤药物来治疗乳腺癌。中药因其多成分-多靶点-多途径的特点，在临床上对于乳腺癌有较好的疗效，因其独特的药理作用成为目前治疗的研究热点。天然活性成分 β -谷甾醇，是当归、天麻、千斤拔、泡沙参、三叶青等多种中药的主要药效成分，具有广泛的药理作用^[4]。在乳腺癌的体外实验中， β -谷甾醇对乳腺癌细胞具有明显的抑制作用，并在体内可减小肿瘤转移的大小和程度^[55]，还被证明与其他乳腺癌治疗药物 (他莫昔芬) 联合使用时可产生协同效应^[56]。关于 β -谷甾醇治疗乳腺癌的分子机制研究已较为深入，主要包括以下几个方面：① 抑制雌激素受体活化，进而抑制乳腺癌细胞增殖分化；② 抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导途径： β -谷甾醇可降低 β -catenin 核转及转录因子活性，阻断该信号转导途径，从而使乳腺细胞增殖、分化减

慢；③ 抑制 PI3K/Akt 信号转导途径： β -谷甾醇可抑制 PIP3 合成及 Akt 活化，阻断 PI3K/Akt 信号转导，抑制 PI3K/Akt 信号转导，使乳腺癌细胞增殖及存活能力降低；④ 抑制 MAPK 信号途径活化： β -谷甾醇可通过降低 MAPK 信号途径的传导，降低 ERK 磷酸化及活化，抑制乳腺细胞增殖分化。此外， β -谷甾醇还可通过抑制 JNK、p38 等信号通路，降低炎症反应，从而达到治疗乳腺增生症的目的；⑤ 抑制 NF- κ B 信号途径的活化： β -谷甾醇可通过抑制 I κ B 蛋白降解，抑制 IKK 的活化，抑制核转录因子 NF- κ B 的活性，进而抑制 NF- κ B 信号途径的激活及基因转录，减轻炎症反应，抑制乳腺细胞增殖，促进乳腺细胞凋亡，从而抑制乳腺增生。

随着我国乳腺癌患者的增多，寻找有效的治疗手段已成为研究热点。现代抗肿瘤药物治疗存在多种不良反应，因此，以天然植物为主要研究对象的药物逐渐受到人们的重视。天然活性成分 β -谷甾醇已被证实对乳腺癌有较好的非手术治疗作用。它是一种安全有效的抗乳腺癌药物，具有抗雌激素、抗炎、抗氧化、抑制肿瘤细胞增殖等作用。随着研究的深入， β -谷甾醇的药理作用和分子机制将越来越多地被发现，可为 β -谷甾醇新药的研发和临床应用奠定基础。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69 (1): 7-34.
- [2] Jin LT, Han BC, Siegel E, et al. Breast cancer lung metastasis: molecular biology and therapeutic implications [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19 (10): 858-868.
- [3] Bao XX, Zhang YA, Zhang HR, et al. Molecular mechanism of β -sitosterol and its derivatives in tumor progression [J]. Front Oncol, 2022, 12: 926975.
- [4] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37 (1): 148-153.
- [5] Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH. Anticancer effects of phytosterols [J]. Eur J Clin Nutr, 2009, 63 (7): 813-820.
- [6] Ramprasath VR, Awad AB. Role of phytosterols in cancer prevention and treatment [J]. J Aoac Int, 2015, 98 (3): 735-738.
- [7] Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, et al. ROS and the DNA damage response in cancer [J]. Redox Biol, 2019, 25: 101084.
- [8] Baskar AA, Al NS, Gabriel PM, et al. β -sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1, 2-dimethylhydra-

- zine-induced colon cancer [J]. *J Med Food*, 2012, 15 (4): 335-343.
- [9] Manral C, Roy S, Singh M, et al. Effect of β -sitosterol against methyl nitrosourea-induced mammary gland carcinoma in albino rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16 (1): 260.
- [10] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (3): 153-166.
- [11] Awad AB, Williams H, Fink CS. Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 2001, 40 (2): 157-164.
- [12] Wang XC, Li MJ, Hu MY, et al. BAMBI overexpression together with β -sitosterol ameliorates NSCLC via inhibiting autophagy and inactivating TGF- β /Smad2/3 pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37 (5): 3046-3054.
- [13] Müller-Decker K, Berger I, Ackermann K, et al. Cystic duct dilatations and proliferative epithelial lesions in mouse mammary glands upon keratin 5 promoter-driven overexpression of cyclooxygenase-2 [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166 (2): 575-584.
- [14] Regulski M, Regulska K, Prukała W, et al. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21 (4): 598-615.
- [15] Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy [J]. *FASEB J*, 2003, 17 (14): 1986-1995.
- [16] Raj S, Jayaraj R, Kodiveri MG. Chemical profiling and evaluation of antioxidant and anticancer potential of tuber crop *amorphophallus commutatus* var. *wayanadensis* [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2022, 77 (1): 68-76.
- [17] Bouic PJ, Etsebeth S, Liebenberg RW, et al. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1996, 18 (12): 693-700.
- [18] Khan Z, Nath N, Rauf A, et al. Multifunctional roles and pharmacological potential of β -sitosterol: emerging evidence toward clinical applications [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 365: 110117.
- [19] Liu R, Hao DL, Xu WY, et al. β -sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57 (1): 161-168.
- [20] Sun YN, Gao L, Hou W, et al. β -sitosterol alleviates inflammatory response via inhibiting the activation of ERK/p38 and NF- κ B pathways in LPS-exposed BV2 cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7532306.
- [21] Wang HY, Wang Z, Zhang ZH, et al. β -sitosterol as a promising anticancer agent for chemoprevention and chemotherapy: mechanisms of action and future prospects [J]. *Adv Nutr*, 2023, 14 (5): 1085-1110.
- [22] Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14 (10): 1649-1660.
- [23] Pratt MA, Satkunaratnam A, Novosad DM. Estrogen activates raf-1 kinase and induces expression of Egr-1 in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 189 (1-2): 119-125.
- [24] Liu DX, Zhou KH. BRAF/MEK pathway is associated with breast cancer in ER-dependent mode and improves ER status-based cancer recurrence prediction [J]. *Clin Breast Cancer*, 2020, 20 (1): 41-50. e8.
- [25] Gutendorf B, Westendorf J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens [J]. *Toxicology*, 2001, 166 (1): 79-89.
- [26] 王非, 吴开明. 中医对乳腺增生病的认识及实验研究概况 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19 (3): 622-623.
- [27] 陶仕英, 牛建昭, 赵丕文, 等. β -谷甾醇对 T47D 细胞雌激素受体表达及其下游基因 PS2 的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21 (2): 165-167, 174.
- [28] 陶仕英, 牛建昭, 王继峰, 等. β -谷甾醇对 T47D 细胞增殖和细胞周期的影响及作用机制探讨 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2015, 17 (2): 362-366.
- [29] Valerio M, Awad AB. β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A. 1 murine macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (8): 1012-1017.
- [30] Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Sci STKE*, 2005, 2005 (271): 1.
- [31] Liu JQ, Xiao Q, Xiao JN, et al. Wnt/ β -catenin signaling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (2): 3.
- [32] 王珂, 任予, 何建军, 等. 人乳腺癌组织中 Wnt/ β -catenin 信号传导通路的异常表达与 Her2 阳性表达间的关系 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2009, 30 (5): 587-591.
- [33] Shen GD, Gao Q, Liu FF, et al. The Wnt3a/ β -catenin/TCF7L2 signaling axis reduces the sensitivity of HER2-positive epithelial ovarian cancer to trastuzumab [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526 (3): 685-691.
- [34] Gu SL, Liu FH, Xie XH, et al. β -sitosterol blocks the LEF-1-mediated Wnt/ β -catenin pathway to inhibit proliferation of human colon cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2023, 104: 110585.
- [35] Rajavel T, Packiyaraj P, Suryanarayanan V, et al. β -sitosterol targets Trx/Trx1 reductase to induce apoptosis in A549 cells via ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 2071.
- [36] Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu Iulia-Ioana, et

- al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22 (1): 173.
- [37] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [38] Haddadi N, Lin YG, Travis G, et al. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17 (1): 37.
- [39] Cotrim CZ, Fabris V, Doria ML, et al. Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32 (19): 2390-2402.
- [40] Koren S, Reavie L, Couto JP, et al. PIK3CA (H1047R) induces multipotency and multi-lineage mammary tumours [J]. *Nature*, 2015, 525 (7567): 114-118.
- [41] Zhu YY, Yao Y, Shi ZX, et al. Synergistic effect of bio-active anticarcinogens from soybean on anti-proliferative activity in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells in vitro [J]. *Molecules*, 2018, 23 (7): 1557.
- [42] Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40 (12): 2707-2719.
- [43] 姚青, 骆军容, 陈江浩, 等. MAPK 信号通路相关信号转导分子在人乳腺癌细胞系中的表达及活化水平 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20 (3): 328-330.
- [44] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35 (6): 600-604.
- [45] Mirzoeva OK, Das D, Heiser LM, et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (2): 565-572.
- [46] Wu YS, Yi ZY, Li J, et al. FGFR blockade boosts T cell infiltration into triple-negative breast cancer by regulating cancer-associated fibroblasts [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (10): 4564-4580.
- [47] 王璐, 赵琳, 张丽芬, 等. VEGF 通过激活 ERK/MAPK 通路促进三阴性乳腺癌肿瘤干细胞的形成 [J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41 (10): 1484-1491.
- [48] Awad AB, Williams H, Fink CS. Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2003, 14 (2): 111-119.
- [49] Barham W, Chen LY, Tikhomirov O, et al. Aberrant activation of NF- κ B signaling in mammary epithelium leads to abnormal growth and ductal carcinoma in situ [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15 (1): 647.
- [50] Hayashi Y, Nakayama J, Yamamoto M, et al. Aberrant accumulation of NIK promotes tumor growth by dysregulating translation and post-translational modifications in breast cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23: 57.
- [51] Liao YF, Rao YK, Tzeng YM. Aqueous extract of *Anisomeles indica* and its purified compound exerts anti-metastatic activity through inhibition of NF- κ B/AP-1-dependent MMP-9 activation in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 2930-2936.
- [52] Uzzo RG, Leavis P, Hatch W, et al. Zinc inhibits nuclear factor-kappa B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (11): 3579-3583.
- [53] Valerio M, Awad AB. β -sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11: 1012-1017.
- [54] Muenchen HJ, Lin DL, Walsh MA, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in prostate cancer cells through inhibition of nuclear factor-kappaB by an Ikappa-Balpha "super-repressor" [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6 (5): 1969-1977.
- [55] Awad AB, Chinnam M, Fink CS, et al. Beta-sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14 (11): 747-754.
- [56] Awad AB, Barta SL, Fink CS, et al. Beta-sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52 (4): 419-426.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-10)

中药煮散的历史渊源、应用特点及现代化研究进展

谢翡翡^{1, 2}, 卢晓莹², 何广铭², 叶聪^{1, 2}, 吴润松^{1, 2}, 孙冬梅^{1, 2}, 罗文汇^{1, 2*} (1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 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: 中药煮散历史悠久, 具有良好的临床疗效, 且溶出速度快, 药材利用度高, 可节省药材资源、降低医疗成本。如今我国优质野生中药材资源日益匮乏, 造成中药材市场供需失衡, 中药煮散具有不容忽视的研究与开发价值。本文通过综述中药煮散的历史渊源, 与传统剂型对比分析煮散的应用特点, 阐述煮散基于质量控制、药效学研究和临床研究的现代化研究概况, 探讨了煮散现代化发展中存在的问题, 为传承与发展中药煮散、缓解中药资源紧张提供路径和参考依据。

关键词: 中药煮散; 应用特点; 现代化研究; 质量控制; 汤剂

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0180-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.028

Historical origin, application characteristics and modernization research of traditional Chinese medicine powder for boiling

XIE Fei-fei^{1, 2}, LU Xiao-ying², HE Guang-ming², YE Cong^{1, 2}, WU Run-song^{1, 2}, SUN Dong-mei^{1, 2}, LUO Wen-hui^{1, 2*} (1. *Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006*; 2. *Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules Enterprise, Foshan Guangdong 528244*)

Abstract: Traditional Chinese medicine powder for boiling has a long historical background and exhibits good clinical effect, facilitating the conservation of medicinal resources and the reduction of medical costs. However, nowadays, there is a shortage of high-quality wild Chinese medicinal materials in China, causing an imbalance in the market between supply and demand for these materials. Therefore, the significance of researching and developing traditional Chinese medicine powder for boiling cannot be underestimated. This article summarized the origin of traditional Chinese medicine powder for boiling, compared it with traditional dosage forms, analyzed its application characteristics, and elaborated the modern research status of powder for boiling. The quality control and pharmacodynamics were also discussed, as well as challenges in the modernization of powder for boiling. This article provided insights and a reference for the inheritance and advancement of traditional Chinese medicine powder for boiling, aiming to relieve the shortage of traditional Chinese medicine resources.

Key words: traditional Chinese medicine powder for boiling; application characteristics; modernization research; quality control; decoction

近年来, 人们对中药材的需求急速增加, 然而, 原有的野生中药资源面积逐渐缩减, 导致药价上涨, 药材质量下降, 供需平衡改变^[1], 提高中药材的有效利用率对中药资源可持续发展具有

重要意义。中药煮散是指在中医药理论指导下, 将中药材粉碎成一定粒度, 分装或用时称取, 加入水或引药煎煮, 连同药末一起或去渣服用的一种剂型^[2]。2018 年国家中医药管理局公布了《古

基金项目: 国家工信部 2022 年产业技术基础公共服务平台项目 - 中药全产业链质量技术服务平台 (项目编号: 2022-230-221)。

作者简介: 谢翡翡, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药质量评价研究, email: mtxffa@163.com ***通信作者:** 罗文汇, 男, 主任药师, 主要从事中药饮片及中药配方颗粒研究, email: acid123@126.com

代经典名方目录(第一批)》, 合计共 100 首方, 其中煮散 23 首, 此外有 5 首方(当归建中汤、温脾汤、温胆汤、小续命汤、三化汤)虽定义为汤剂, 但其制备工艺为先“咬咀”或“剉”后再进行煎煮, 实质也为煮散^[3]。中药煮散历史悠久, 其既保留了汤剂与水共煎的特性, 又具有散剂的起效快、药材利用度高和节省能源等特点, 具有诸多应用优势。

1 中药煮散的历史渊源

煮散是一种传统的中药煎法, 其应用最早可追溯至先秦时期, 我国现存最古老的医方典籍《五十二病方》便有“入三指一撮”(春)柏中, 煮以酒”的记载。《黄帝内经》中药材的修治多为“咬咀”, 大颗粒入煎, 且记载了“泽泻饮”和“翹饮”的药散用法, 此时已始见煮散雏形^[4]。

东汉时期, 一些“汤、散、丸”的方剂制法与煮散高度相似^[5]。张仲景所著《伤寒杂病论》中半夏散、瓜蒂散、抵当汤、防己黄芪汤等就具有煮散的特性, 而《金匱要略》中对“煮散”的应用记载详细, 散剂于口服剂中的应用比例略高于《伤寒杂病论》, 但书中并未予“煮散”之名^[6]。东晋葛洪《肘后备急方》中亦有煮散记载, 如用于辟瘟疫的“老君神明白散”。

庞安时《伤寒总病论》卷六中记载“唐自安史之乱, 历代战乱, 天灾人祸, 交通不便, 月药极多, 供不应求, 药物紧决, 为节约药材, 改汤剂为点散, 以适时需”。“煮散”最早定名于唐代孙思邈《备急千金要方》, 其中含煮散 16 首, 如丹参牛膝煮散、独活煮散、茯神煮散、远志煮散方等。《外台秘要》中也记载了煮散 25 首, 此时煮散的应用开始成熟, 散常为“筛为粗散”, 煎法

上多“以绵裹”取汁服, 开始将锉为粗末汤液剂称为“煮散”, 并与一般汤剂及用细末冲服的散剂区别开来^[4, 7]。

《圣济总录》中记载“近世一切为散, 遂忘汤法”, 煮散的应用在宋朝达到顶峰时期, 大量医书中频繁使用中药煮散, 包括宋代的三部官修方书《太平圣惠方》《圣济总录》《太平惠民和剂局方》, 此外还有《小儿药证直诀》《妇人大全良方》《博济方》等医籍。《太平惠民和剂局方》和《太平圣惠方》中煮散均约占总方剂数的 30%, 而在《妇人大全良方》和《小儿痘疹方论》中煮散占总方剂数的 60% 以上^[8], 此时煮散不仅广泛应用于成人病患, 还在儿科和妇科治疗中发挥作用, 宋代煮散的盛行与当时国家实行仁政、人口众多和军队庞大造成中药资源供不应求的国情息息相关。

因煮散以粗末形态入药, 与饮片相比存在“辨药之难”问题, 并且粗末经煎煮后易糊化、煎液浑浊等缺点逐渐显露, 故金元后煮散的临床应用逐渐减少。明清以后, 中草药资源供大于求, 药材私营化, 商人更青睐于生产技术成熟且易于辨认的传统中药饮片, 煮散逐渐被饮片所取代^[9]。

虽然中药煮散的应用势不如前, 但仍有许多煮散被沿用至今, 并显示出良好的疗效, 如元代朱震亨《丹溪心法》中的玉屏风散等。近代有中医名家蒲辅周、岳美中等人善用并鼓励推广使用中药煮散, 其中蒲老在治疗各种慢性疑难杂症时常用煮散, 如应用四逆散加味治疗肝胃不和, 获得了令人满意的疗效。此外, 在《蒲辅周医案》《蒲辅周医疗经验》中均有许多煮散应用的记载^[10]。历代记载中药煮散的相关医籍见表 1。

表 1 历代记载中药煮散的相关医籍^[6, 8]

Tab 1 Relevant medical records of traditional Chinese medicine powder for boiling in different dynasties^[6, 8]

朝代	阶段	代表医籍名称
先秦	起源	《五十二病方》《黄帝内经》
东汉	兴起	《伤寒杂病论》《金匱要略》
西汉		《武威汉简》
魏晋南北朝	发展	《肘后备急方》《刘涓子鬼遗方》《小品方》
隋朝		《医心方》
唐朝	成熟	《备急千金要方》《外台秘要》
宋朝	鼎盛	《太平圣惠方》《普济本事方》《太平惠民和剂局方》《圣济总录》《博济方》《济生方》《小儿药证直诀》《苏沈良方》《小儿痘疹方论》《三因极一病症方论》《仁斋直指方》《妇人大全良方》《银海精微》
金元	渐衰	《伤寒直格》《医学启源》《脾胃论》《丹溪心法》
明清	衰落	《温病条辨》《良方集腋》
近代	逐渐恢复	《蒲辅周医案》《蒲辅周医疗经验》

2 煮散的应用特点

2.1 煮散与传统饮片对比分析

中药煮散以粉体形态入药,质地均匀,与溶剂的接触面积较传统饮片大,药效成分更易溶出,可节约药材资源,且药液性质稳定^[11]。曹丽萍等^[12]研究发现 3 批夏枯草精准煮散饮片的出膏率及迷迭香酸含量均显著高于相同批次的普通饮片,差异具有统计学意义($P < 0.05$),并且 3 批普通饮片的迷迭香酸含量存在明显差异,RSD 为 28.17%,而精准煮散饮片的 RSD 仅为 3.88%。翁艳鸿等^[13]通过实验发现 29 批不同产地泽泻煮散的 7 种成分回收率的 RSD 在 1.3%~2.3%,显示煮散饮片的质量均一性较高。全小林等^[4]认为煮散比传统汤剂节省 1/2 以上的饮片用量。俱蓉等^[14-15]在对当归精准饮片和传统饮片中的 4 种指标性成分含量进行测定后,通过综合加权评分发现,1 g 当归精准煮散饮片的效果大致相当于 1.26 g 传统饮片,且精准煮散饮片中的 4 种指标成分整体含量较高;他们还比较了红芪精准煮散饮片与传统饮片中芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素 3 种成分的含量,结果发现 1.00 g 红芪精准煮散

饮片约相当于传统饮片 1.37 g。另外,有学者比较了泽泻煮散及原饮片的煎煮得膏率,结果表明质地坚硬致密的泽泻饮片制成煮散后得膏率明显改善,药材利用率大幅提升^[16]。

蒲老曾言:“中药煮散,轻舟速行。”中药煮散可以在较短时间内将有效成分浸出,同时避免了长时间沸腾可能造成的挥发性成分损失,如香豆素、萜类、苷类及挥发油等,进而导致药效降低。刘月等^[17]比较银翘散煮散饮片及普通饮片的煎煮过程后发现,银翘散煮散水煎液化学成分溶出速度较快,煮沸约 5 min 时,煮散水煎液中的非挥发性成分浓度已较高,意味着煮散可缩短煎煮时间,从而减少挥发性成分散失,提高疗效。孙玉雯等^[16]对比分析了 19 味根和根茎类药材的煮散与饮片水煎液中有效成分的含量及得膏率,发现在煎煮 10 min 的情况下,煮散的有效成分含量和得膏率均不低于煎煮 50 min 的饮片。

综上所述,中药煮散具有“省、效、快、留、合、均”的优点,传承和发展煮散可为缓解我国药材资源紧张、实现中医药应用降本增效提供新的发展路径。中药煮散的具体优缺点分析见表 2。

表 2 中药煮散的优缺点

Tab 2 Advantages and disadvantages of traditional Chinese medicine powder for boiling

剂型	优点	缺点
中药煮散	①省:得膏率、有效成分煎出率高,可节省药材资源,降低医疗成本;②效:药材利用度高,可充分利用贵重药材;③快:有效成分浸出快,节约煎煮时间;④留:较好地保留挥发性成分;⑤合:药辅合一,且保留传统汤剂的药性药效;⑥均:煮散饮片质量均一性高,药液性质稳定	①糊:煎煮过程中容易糊化、烧焦粘底;②浑:药渣吸附药液多、药液浑浊及不易过滤;③失:性状消失,难以鉴别且不利于调剂;④动:煮散饮片久置后质量不稳定,可能出现泛油、吸潮、氧化变色及气味散失等;⑤缺:缺乏标准操作规程和科学的质量标准;⑥量:药材或饮片制成煮散后的临床使用剂量还未得到科学的折算方法

2.2 煮散与散剂对比分析

散剂是常用的传统中药剂型之一,指将原料药物或与适宜的辅料经粉碎、均匀混合制成的干燥粉末状制剂,据 2020 年版《中国药典》四部通则 0115 规定^[18],散剂分为口服散剂和局部用散剂。口服散剂常分散在水、稀释液或其他液体中服用,或直接用水送服;局部用散剂可撒布、涂敷,以及纳阴、眼用、吹鼻、吸入、舌下含等多种应用形式。根据《本草纲目》记载,外用散剂多研为细末,撒于患处,起局部治疗作用,或用麻油、蜜、酒、醋等调敷于患处。含有毒药材的散剂常为外用,而无毒散剂常为内服。口服散剂的用量常为 6 g 以下,属于固体制剂,实质是对中药饮片全成分的应用;而煮散是汤剂的一种特殊应用形式,属液体制剂,常为 6~30 g,应用的是汤剂煎煮后溶出的成分。与煮散及传统汤剂相比,口服散

剂临床应用范围相对较小,口服散剂主要应用于不适于煎煮的矿物药,如由“朱砂(研细入)、牛黄”两药研末吞服的镇惊散^[19];而煮散主要应用于植物药,如藿香正气散。

3 煮散的现代化研究

3.1 质量控制研究

中药煮散的质量可控性是保证其临床应用安全有效的重要前提,也是其研究、生产、应用和监管的重点。中药煮散的粉碎工艺和煎煮工艺是影响其有效成分溶出和出膏率的关键参数,研究常以指纹图谱、多指标成分含量测定及得膏率为检测指标。孙玉雯等^[20]通过实验及统计分析发现粉碎粒度、加水量及煎煮次数对枳实煮散水煎液的指标成分含量和出膏率均有显著影响。陈燕等^[21]研究发现不同粒度的加味大柴胡汤煎液中化学成分存在差异,煮散饮片粒度在过 4 目不过

10 目筛，即为粗粉时各化学成分含量最高。张琦等^[22]通过考察特征图谱、相关特征峰面积及甘草酸、甘草苷得膏率对泻白散“锉散”的粒度及煎煮工艺进行优选，确定粉碎粒度以过 4 目筛为宜，并优选出其煎煮工艺为置陶瓷锅中，加水 420 mL，武火煮沸后文火煮至 300 mL。呼梅等^[23]采用正交试验，以五味子醇甲煎出量和得膏率为评价指标，对五味子煮散加水量、浸泡时间和煎煮时间进行考察，综合加权评分后确定优化工艺为加 20 倍量水，无需浸泡，煎煮 2 次，每次 15 min。不同粉碎粒度或不同煎煮工艺的煮散化学成分含量存在明显差异，通过对煮散粉碎粒度和煎煮工艺进行筛选、优化有助于实现对中药煮散的质量控制。

煮散饮片经粉碎后失去了性状特征，传统的鉴定方法已不适于煮散，DNA 条形码鉴定体系的出现解决了煮散的“辨药之难”问题。陈士林等^[24]开展了中药精准煮散饮片的相关研究，采用中药 DNA 条形码鉴定体系联合现有中药质量标准评价和中药指纹图谱技术构建了精准煮散饮片质量控制体系，有助于煮散的精准化鉴定和检测，此外精准煮散饮片还可通过二维码识别溯源技术结合信息化技术对煮散饮片的流通信息和质量信息进行跟踪查询，实现中药煮散饮片的生产全过程质量监控。张靖等^[25]采用了中药 DNA 条形码鉴定结合中药指纹图谱技术比较了三七精准煮散饮片与其原市售饮片的差异，发现两者属性一致，但三七精准煮散饮片的得膏率、指标成分含量及质量均一性均更优，煮散饮片的临床用药精准性更高。黄娟等^[26]利用第二内转录间隔区 (ITS2) 序列作为 DNA 条形码实现了对丹参精准煮散饮片的精准鉴定，同时利用指纹图谱对丹参原饮片及煮散饮片进行了化学成分分析，结果显示煎出成分无明显变化，指纹图谱相似度较高，但煮散饮片的煎出效率更高。

3.2 药效学研究

开展复方煮散药效学研究是中药煮散进入临床研究的关键一步。近年来有不少学者对复方煮散进行了药效学研究，为临床应用提供了实验数据和理论基础，但药效作用机制还需进一步探索。彭智平等^[27]采用 2 型糖尿病 SD 大鼠动物模型，观察不同浓度干姜黄芩黄连人参汤煮散与饮片对大鼠降血糖作用的影响，结果表明饮片组与煮散组的差异无统计学意义，但监测了 3 个月 (0 周、4 周、8 周) 血糖的变化情况后发

现煮散组具有优于饮片组的趋势，提示在同等条件下煮散工艺优于传统饮片，并可节省约 1/3 等量饮片。张敏等^[28]采用高糖高脂饲料联合链脲佐菌素复制 2 型糖尿病大鼠模型，对模型大鼠服用葛根芩连汤饮片和煮散后对血清中内源性代谢物变化的一般情况、体重及空腹血糖进行比较，发现两者均可改善内源性代谢物变化的一般情况、体重及空腹血糖，且代谢组学分析结果显示差异无统计学意义。宁英海^[29]开展了麻黄汤煮散与饮片汤剂的动物药效学研究，对比分析了高、中、低剂量煮散与传统饮片的解热、止咳及抗炎作用，结果表明煮散与传统饮片汤剂在解热、止咳、抗炎等作用方面差异无统计学意义，且煮散的药材用量仅需传统饮片的一半或更少。上述研究证明煮散在保留传统汤剂药理作用及临床疗效的同时，还具有节省药材资源的优势。

3.3 临床研究

近代许多医家如蒲辅周、岳美中等开始推崇“药力尽出”的中药煮散，煮散的临床研究逐渐得到重视。叶亚铭^[30]将茂名市中医院收治的 96 例小儿支原体感染后咳嗽患儿随机分为治疗组与对照组，进行了煮散三期分治的临床效果研究，结果显示与注射阿奇霉素的对照组相比，治疗组的总有效率更高 ($P < 0.05$)，说明煮散三期分治可改善小儿肺炎支原体感染后咳嗽的临床疗效。张力等^[31]按照临床对照研究的方法，观察 106 例深静脉血栓形成患者组成的血府逐瘀汤加味煮散组、血府逐瘀汤加味饮片组和抗凝组，比较治疗前及治疗后的局部症状、体征积分和凝血功能并计算总有效率，统计分析证明各组均可有效改善症状，且血府逐瘀汤加味对凝血功能影响及出血风险相较于抗凝组大大降低，说明血府逐瘀汤加味方可替代抗凝在临床中应用，特别适用于长期抗凝治疗。此外，有部分医者利用多年临床诊疗经验将临床常用方剂加减化裁并随证加减，整理出运用中药煮散治疗的经验方^[32-34]，在中医药治疗中发挥了其独到的作用。

现有多种慢性疾病采取西医常规治疗联合中药煮散辨证论治的治疗方案，临床疗效得到了客观证实。葛瑶等^[35]将 80 例山东中医药大学附属医院收治的慢性冠脉综合征合并 D 型人格患者按随机数字表法分成治疗组与西药对照组，治疗组在对照组基础上加用枳壳煮散汤剂治疗，研究结果显示，与对照组 (单纯西医常规治疗) 相比，治疗组可提升慢性冠脉综合征合并 D 型人格患者

的临床疗效,同时还能有效改善临床症状及情绪状态,具有心脏与心理双重治疗的优势。黄宝怡等^[34]将 80 例脾虚湿蕴型高尿酸血症无症状期患者按用药情况平均分为参苓降酸煮散联合非布司他片治疗的观察组和非布司他片治疗的对照组,研究发现参苓降酸煮散联合非布司他片治疗脾虚湿蕴型高尿酸血症无症状期患者效果确切,在改善中医证候、降低血清尿酸水平方面的治疗作用明显优于单纯非布司他片,并具有痛风发生率低及安全性较高的优势。陈文辉等^[36]通过实验证明壮骨方煮散可改善脾肾两虚夹瘀型绝经后低骨量患者的中医证候积分,缓解临床症状,而将煮散联合阿法骨化醇软胶囊与碳酸钙 D₃ 片治疗可提高腰椎骨密度,提升骨量,且疗效确切,不良反应少。根据目前的研究成果,在西医常规治疗的基础上联合中药煮散辨证论治大多具有良好的临床疗效和安全性,但仍需要大量基础研究及临床数据证明其临床应用科学性,保障安全性和有效性。

4 结语

中药煮散是一种传统的中药应用形式,既保留了传统汤剂的优势,又具有节省药材、煎煮效率高特点。煮散盛于唐宋,受当时技术及经济条件的限制而衰于明清,经过数百年的发展,我国中药制剂的研发、生产、加工等现代技术和质量控制与评价体系已逐渐成熟,中药煮散具有巨大的开发前景。目前,中药煮散的应用主要集中于各级医疗机构,经中医临床配方后使用,可以在保证疗效的同时降低患者的医疗费用,适合门诊推广;中药煮散的相关研究主要集中于植物药,对动物药和矿物药较少。《苏沈良方》中论,“汤、散、丸,各有所宜”,中药材是否适合制成煮散饮片,应结合中药材性状、有效成分理化性质及生产制剂成本进行考虑。根据文献报道,质地坚硬致密的药材、根及根茎类药材、使用上无特殊要求的皮类、茎木类及果实种子类药材制成煮散可节省药材用量或缩短煎煮时间,而对于质地轻薄的药材如花类、叶类、全草类,还需与传统饮片在相同煎煮条件下比较研究才可判断是否适宜将其制成煮散^[37]。

中药煮散的现代研究仍处于探索阶段,缺少标准操作规范和科学的质量标准,在制备工艺、质量控制和量效关系研究等方面还存在一系列问题亟待解决。煮散以粗粉形态入药,药材饮片粉碎后性状消失、不利于鉴定,久置可能泛油、吸潮、氧化变色及气味散失等,导致其质量不稳定。

同时,含糖类、胶质类、蛋白质类成分的煮散饮片在煎煮过程中容易糊化、烧焦粘底,且药液浑浊、不易过滤,影响药效成分的溶出率及患者服药依从性。鉴于此,建议在煎煮前进行粉碎,采取包煎的形式,加入大量水进行煎煮。然而,在相同煎煮条件下煮散与传统饮片成方制剂的疗效存在较大差异,药材或饮片制成煮散后的临床使用剂量还未有科学的折算方法,目前煮散的临床使用剂量主要依靠医者的临床经验判断,不足以保证煮散的剂量有效性和安全性。

传承与发展中药煮散还需要解决其“糊、浑、失、动、缺、量”的缺点,可从以下几个方面进行研究:①以指纹图谱、多指标成分含量及出膏率为指标,通过综合加权评分优选出煮散饮片的最佳粉碎粒度和煎煮工艺,制定煮散的标准操作规范;②从性状、显微、色谱鉴定、DNA 条形码鉴定、含量及水分测定等方面对药材及煮散进行质量控制,建立科学、系统、可追溯的中药煮散质量控制标准及评价体系;③加速开展单味煮散及复方制剂的药动学、药效学研究,同时进行大量的临床试验反复验证,确定传统饮片与煮散饮片组方最佳的剂量转化比例或方法,保障其安全性和有效性;④与药材或饮片对比分析,进行中药煮散稳定性研究;⑤利用现代制药工艺,经粉碎、制粒、干燥和分剂量包装等工序制成单味药或复方煮散颗粒,可减少调剂出错率,且携带方便、便于储存。如今,我国优质中药材资源日益匮乏、药价普遍上涨,传承与发展煮散可促进形成中药产业价值链和绿色供应链,实现中药资源可持续发展。

参考文献

- [1] 孟祥才,于鹏程,何录文,等.从社会发展角度探讨中药资源的历史、现在与未来[J].中草药,2022,53(16):5235-5244.
- [2] 袁联华,邝小红,原嘉文.中药煮散煎煮标准化研究[J].光明中医,2019,34(18):2794-2796.
- [3] 焦其树,郝丽霞,吴治丽,等.经典名方中煮散和散剂粒度探讨[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(1):1-6.
- [4] 全小林,张家成,穆兰澄,等.恢复煮散节省药材[J].中国新药杂志,2012,21(5):470-474.
- [5] 刘起华,孙玉雯,刘凤麟,等.浅析《太平惠民和剂局方》中“散”的运用[J].辽宁中医杂志,2015,42(2):369-371.
- [6] 章霞.宋以前煮散运用规律研究[D].兰州:甘肃中医药大学,2017.
- [7] 白雅黎,朱向东,兰雨泽,等.煮散剂的兴衰与现代研

- 究进展[J]. 中医临床研究, 2021, 13(27): 134-136.
- [8] 汪晓蓉. 宋代煮散运用规律研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2017.
- [9] 张子龙, 谢月, 梁奇, 等. 煮散与饮片、散剂和中药配方颗粒的比较及其现代化研究进展[J]. 中药材, 2018, 41(10): 2475-2479.
- [10] 徐海波. 中药煮散源流考[J]. 河北中医药学报, 1999, 14(4): 11-13.
- [11] 路立峰, 闫方杰, 胡高升. 中药煮散应用优势、质量控制、质量评价的研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(7): 1830-1833.
- [12] 曹丽萍, 林晓燕, 李曙光, 等. 夏枯草精准煮散饮片与普通饮片煎煮质量评价[J]. 天津药学, 2022, 34(4): 24-27.
- [13] 翁艳鸿, 李玲慧, 倪林君, 等. 不同产地泽泻煮散的含量测定及其化学计量学分析[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(1): 1-6.
- [14] 俱蓉, 杨秀娟, 李响, 等. 当归精准煮散饮片指纹图谱建立及 4 种成分含量测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(2): 93-97.
- [15] 李硕, 俱蓉, 杨秀娟, 等. 红芪精准煮散饮片 HPLC 指纹图谱建立及 3 种指标成分测定[J]. 中草药, 2022, 53(16): 5020-5025.
- [16] 孙玉雯, 仝小林, 王菲, 等. 中药煮散与饮片煎煮效率的对比研究 I. 部分根和根茎类、花类、叶类和全草类药材[J]. 中药材, 2016, 39(3): 598-602.
- [17] 刘月, 顾永哲, 罗云, 等. 银翘散煮散与饮片煎煮过程挥发性成分蒸发规律比较研究[J]. 中草药, 2022, 53(10): 2991-2999.
- [18] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 18.
- [19] 翟惠奇, 蒋亚联, 陈炜璇, 等. 散剂应用源流考[J]. 中药材, 2021, 44(8): 1994-1996.
- [20] 孙玉雯, 刘起华, 陈弘东, 等. 枳实煮散的粉碎粒度和煎煮工艺的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(2): 354-357.
- [21] 陈燕, 李倩, 窦霞, 等. 不同煮散粒度下加味大柴胡汤中各成分影响及其治疗糖尿病作用机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(10): 50-57.
- [22] 张琦, 高艳, 王彦, 等. 以泻白散为例探讨经典方中锉散粒度及煎煮工艺的研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4): 878-883.
- [23] 呼梅, 宋英, 袁强华. 五味子煮散颗粒煎煮工艺优化及其煎煮质量评价[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1448-1450.
- [24] 陈士林, 黄志海, 丘小惠, 等. 中药精准煮散饮片[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(9): 1430-1440.
- [25] 张靖, 雷迪, 丘小惠, 等. 三七精准煮散饮片的研制——质量均一性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 13-17.
- [26] 黄娟, 丘小惠, 白俊其, 等. 根茎类药材丹参精准煮散饮片的质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 18-22.
- [27] 彭智平, 张琳琳, 刘起华, 等. 干姜黄芩黄连人参汤饮片与煮散干预 2 型糖尿病 SD 大鼠的药效学初步分析[J]. 浙江中西医结合杂志, 2015, 25(12): 1100-1102.
- [28] 张敏, 杜晨晖, 李津, 等. 基于血清代谢组学比较葛根芩连汤饮片与煮散对 2 型糖尿病大鼠的干预作用[J]. 药理学学报, 2017, 52(9): 1444-1451.
- [29] 宁英海. 麻黄汤煮散工艺优化及药效研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2016.
- [30] 叶亚铭. 儿科煮散三期分治小儿肺炎支原体感染后咳嗽的临床研究[J]. 临床医学工程, 2021, 28(8): 1099-1100.
- [31] 张力, 刘秀娟, 李杰辉, 等. 血府逐瘀汤加味煮散治疗深静脉血栓形成临床研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 11-14.
- [32] 王林. 煮散治疗小儿泄泻临床验证总结[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(4): 716-717.
- [33] 李秋琦, 王晓燕. 王晓燕运用“葛根续命煮散”治疗缺血性中风急性期的经验[J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(14): 129-130.
- [34] 黄宝怡, 叶仁群, 梁奇. 参苓降酸煮散联合非布司他片治疗脾虚湿蕴型高尿酸血症临床疗效观察[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(12): 2793-2798.
- [35] 葛瑶, 张蕴慧, 蔡兆明. 枳壳煮散治疗慢性冠脉综合征合并 D 型人格的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(5): 883-887.
- [36] 陈文辉, 蒋云霞, 李双蕾, 等. 壮骨方煮散对脾肾两虚夹瘀型绝经后低骨量人群的防治疗效评价[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1556-1559.
- [37] 孙玉雯, 刘起华, 程艳玲, 等. 中药煮散与传统饮片煎煮效率的对比研究——皮类、茎木类及果实种子类药材[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(4): 337-341.

(收稿日期: 2023-06-07; 修回日期: 2023-08-10)

青皮的炮制历史沿革、效应物质及古今临方配伍研究进展

黄艺婷^{1,2}, 苏丹^{1,2}, 鲍毅^{1,2}, 艾志福^{1,2}, 杨明³, 朱根华^{1,2}, 宋永贵^{1,2*} (1. 江西中医药大学 江西省中医药管理局中药药效(防治精神障碍脑疾病)评价重点实验室, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学 江西省中医药管理局抑郁症中医证候动物模型重点实验室, 南昌 330004; 3. 江西古香今韵大健康产业有限公司, 南昌 330115)

摘要: 青皮为我国传统中药材, 炮制历史悠久, 方法多样。但随着历史的演变, 一些独具特色的炮制方法逐渐消失, 我们对青皮不同炮制品种的认识和传承有待加强。同时, 各地对不同品种的制法各异, 差别较大。而其加工炮制、质量控制、临床使用都不可避免地会受到这些问题的影响和制约。因此, 本文通过对青皮炮制历史沿革、现代炮制规范的详细梳理, 并综合药理作用的研究进展, 强化对青皮及其炮制品优势特色的认识, 寻找目前研究与开发的不足之处, 为今后优化青皮炮制工艺和建立质量标准控制体系提供参考。此外, 从中药功效和临床应用的角度进一步挖掘青皮及其炮制品在复方配伍方面的特点与规律, 促进对现代药理活性及潜在机制的阐述, 也为现代配伍研究提供依据。

关键词: 青皮; 历史沿革; 炮制规范; 药理作用; 临方配伍

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0186-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.029

Research progress in process evolution, effector substances, and compatibility of Citri reticulatae pericarpium viride

HUANG Yi-ting^{1,2}, SU Dan^{1,2}, BAO Yi^{1,2}, AI Zhi-fu^{1,2}, YANG Ming³, ZHU Gen-hua^{1,2}, SONG Yong-gui^{1,2*} (1. Key Research Office for Evaluation of TCM Efficacy (Prevention and Treatment of Mental Disorders and Brain Diseases) of Jiangxi Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Key Laboratory of Depression Animal Model Based on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Jiangxi Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 3. Jiangxi Guxiang Jinyun Comprehensive Health Industry Co., Ltd., Nanchang 330115)

Abstract: Citri reticulatae pericarpium viride is a traditional Chinese medicinal material with a long history and various processing methods. However, some unique processing methods have gradually disappeared before we understand processed products and inherit different methods of Citri reticulatae pericarpium viride. At the same time, different regions have different methods for different products, and the differences tend to be big. The processing, quality control, and clinical use will be inevitably affected and restricted accordingly. This paper detailedly reviewed the history and modern processing norms for Citri reticulatae pericarpium viride processed product, and comprehensive pharmacological effects, strengthened the advantages and characteristics of Citri reticulatae pericarpium viride and its processed products, and discussed the shortcomings of current research. It hopes to provide reference for optimizing Citri reticulatae pericarpium viride processing technology and establishing quality standard control system. In addition, from the perspective of the efficacy and clinical application of traditional Chinese medicine, the characteristics and rules of Citri reticulatae pericarpium viride and its processed products in compound compatibility were further determined, to promote modern pharmacological activities, potential mechanism, and compatibility research.

基金项目: 江西省杰青需求牵引类项目 (No.20224ACB218008); 国家自然科学基金项目 (No.82260764); 江西中医药大学科技创新团队项目 (No.CXTD22008)。

作者简介: 黄艺婷, 女, 主要从事中药炮制学与中药分析学研究, email: 1849198129@qq.com *通信作者: 宋永贵, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药炮制机制与中药分析研究, email: songyonggui1999@163.com

Key words: Citri reticulatae pericarpium viride; historical evolution; process specification; pharmacological effect; clinical prescription compatibility

青皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮。味苦、辛，性温。归肝、胆、胃经。有疏肝破气、消积化滞的功效。5~6 月收集自落的幼果，晒干，习称“个青皮”；7~8 月采收未成熟的果实，在果皮上纵剖成四瓣至基部，除尽瓢瓣，晒干，习称“四花青皮”^[1]。青皮始载于金代《珍珠囊》：“青橘皮气味俱浓，沉而降，阴也。”^[2] 中医用其煎剂内服治疗胸肋胀痛、胃部痞满、疝气、食积、乳肿、乳核等症，是一种用途广泛又经济的中药^[3]。青皮的炮制方法丰富，功效多样，但随着历史变迁并未得到充分的发展。一是对不同炮制品种的认识和传承不足，二是对主流品种的现代科学内涵阐释不够，三是各地对不同品种的制法各异，差别较大。而青皮的加工炮制、临床使用、质量控制等都不可避免地会受到这些问题的影响和制约。但是，目前尚无青皮炮制相关内容的梳理和综述。因此，本文拟从青皮的炮制历史沿革、现代炮制规范、炮制工艺以及炮制前后化学成分、药理作用的基础研究方面对青皮及其炮制品进行系统的整理与分析，促进青皮各炮制品的传承发展，推动炮制工艺及其标准的综合制定，同时为资源的开发利用后续提供参考依据。

1 炮制历史沿革

1.1 古代炮制历史沿革

青皮的炮制方法，始载于唐代，使用的是最简单的净制^[4]。而后切制、炒制、焙制陆续出现；自宋代加辅料的方法进一步发展，如盐制、醋制、蜜制等；至明清时期，有关青皮的炮制方法更加丰富，出现了巴豆制、斑蝥制、法制等，此外，醋制品在这一时期成为主要品种。

总体而言，宋代和明清时期是青皮炮制工艺发展历史中两个比较关键的时间段。在宋代及以前主要为净制、切制和炒制，宋代时期不仅丰富了辅料的品种，还出现了一种特殊的巴豆制法，借巴豆辛热之性与青皮理气之功相融合，用于治疗寒积之症。宋代以后，尤其是在明清时期，各种炮制方法百花齐放，不仅出现了供外用的青皮蒸制、炙制品种，并且加辅料的炮制方法更加多元化，如加固体辅料的水蛭炒制和麦麸炒制，加液体辅料的醋制、酒制、蜜制等。历代本草对青皮炮制的记载汇总见表 1，历代青皮炮制方法的可视化分析见图 1。

1.2 现代炮制方法

青皮的现代炮制方法以净制和醋制为主，还有部分采用麸制法。《中国药典》对青皮炮制的收录始于 1963 年版^[22]，其后历代药典^[23-30]中记载的青皮炮制方法大同小异，且在部分成方制剂项下附有不同的青皮炮制方法。经统计发现，醋制青皮现已应用于 2020 年版《中国药典》收录的通窍耳聋丸、补沉华郁丸等 14 种成方制剂中；麸炒青皮多用于理气疏肝，如其中收录的沉香曲、肝达康片等成方制剂。除《中国药典》外，1988 年《全国中药炮制规范》^[31]中收载青皮炮制方法有醋制和麸炒两种，其净制、切制及醋制法与《中国药典》所载方法类似。

此外，其他 15 个地区炮制规范中均收载了青皮的炮制方法^[32-46]。在青皮的采收和加工方面，大部分地方炮制规范收录的净制法与《中国药典》相似。但对青皮醋制所用工艺指导却有很大差异，主要体现在火候、醋的品种选用，以及

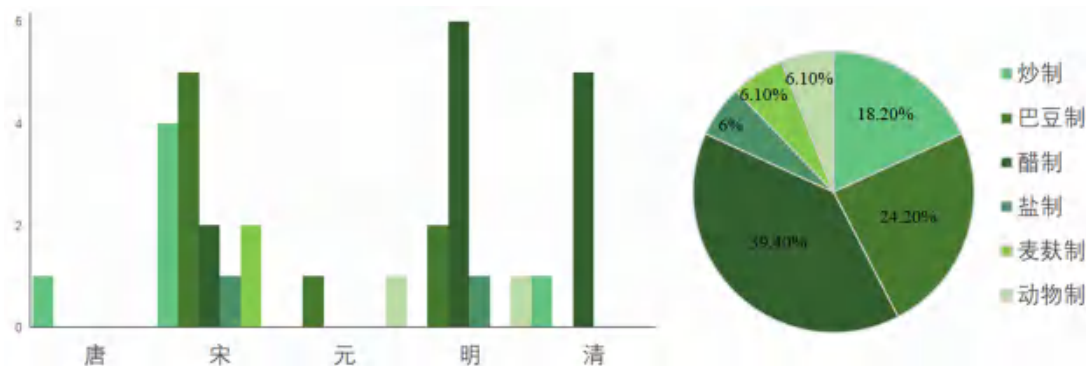


图 1 历代青皮炮制方法的可视化分析

Fig 1 Visual analysis of past dynasties of Citri reticulatae pericarpium viride and processed products

表 1 历代本草对青皮炮制的记载

Tab 1 Processing methods of Citri reticulatae pericarpium viride in ancient books

方法	朝代	本草著作	炮制描述	参考文献
净制	唐	《仙授理伤续断秘方》	去白	[4]
切制	宋	《传信适用方》	一斤汤浸三日，换水候苦味去尽，然后去瓢，切作指面大方片子	[5]
炒制	宋	《类编朱氏集验医方》	剉大块，慢火炒令变紫黑色	[6]
	清	《串雅内编》	炒至黄色烟尽为度，置土上碗复之，少时取出，研末	[7]
面炒制	宋	《博济方》	汤去瓢，细切，面炒	[8]
麸炒制	宋	《太平惠民和剂局方》	凡使，先以汤浸，磨去瓢，曝干麸炒入药用或急用，只焙干亦得	[9]
焙制	宋	《小儿卫生总微论方》	温汤浸软，去穰，焙干	[10]
巴豆制	宋	《小儿卫生总微论方》	去穰，称一分，切碎，去皮，入巴豆十粒，炒令焦，去巴豆，只用青皮	[10]
	宋	《类编朱氏集验医方》	二两，去瓢，剉碎，以巴豆三四粒，去皮膜，线穿定于青皮内，炒巴豆黑，去巴豆	[6]
	宋	《三因极一病证方论》	青皮同巴豆浆水浸一宿，次日漉出，同炒，青皮焦，去巴豆	[11]
醋制	宋	《三因极一病证方论》	米醋熬	[11]
	明	《本草原始》	醋拌瓦炒过用	[12]
	清	《本草述钩元》	消积定痛醋炒，炒黑则入血分	[13]
	清	《本草便读》	用醋炒者缓之、敛之，制其彪悍之性，引以入肝也	[14]
水蛭炒制	元	《世医得效方》	用水蛭等分同炒赤，去水蛭	[15]
火炮	明	《普济方》	炮	[16]
制炭	明	《普济方》	烧灰	[16]
斑蝥炒制	明	《普济方》	去白，二两，一两生用，一两切碎，以斑蝥五十个，去头翅足，同炒黄色，去斑蝥不用	[16]
盐制	明	《医学纲目》	四两，分作四分，一分用汤浸一宿去穰，余三分用盐二两拌匀，良久，桃内微炒焦为末	[17]
法制青皮	清	《本草述》	用青皮一斤，浸去苦味，去瓢，炼净白盐花五两，炙甘草六两，舶茴香四两，甜水一斗煮之，常搅勿令著底，候水尽慢火焙干，勿令焦，去甘草、茴香，只取青皮蜜收用	[18]
炙制	清	《外科证治全生集》	瓦上炙存性为末	[19]
蒸制	清	《外科证治全生集》	蒸透晒干再蒸	[19]
酒制	清	《幼幼集成》	酒炒	[20]
蜜制	清	《医醇賸义》	蜜水炒	[20]
马尿制	宋	《全生指迷方》	白马尿浸三日，令软透	[9]
麸、醋制	宋	《济世总录》	二两麸炒黄捣罗为末，醋一盏半于银石器内，文武火熬成膏	[21]

具体参数方面。其中，火候方面，仅 6 个地方（云南、北京、山东、广西、湖南、湖北）的炮制规范说明使用文火，其余地方未说明炮制使用火候大小；醋的品种方面，仅 2 个地方（北京、安徽）的炮制规范说明使用米醋，1 个地方（贵州）的说明使用食醋，其余地方未明确说明所用醋的品种；醋的润润方面，大部分地方炮制规范说明需在炒前将青皮润软，仅天津市炮制规范中表示四花青皮无需提前用醋润软，而是在炒制过程淋醋即可；醋的用量方面，大多数地方炮制规范说明每 100 kg 青皮用醋 15 kg，4 个地方（云南、湖南、湖北、天津）的炮制规范说明每 100 kg 青皮用醋 10 kg。除醋制外，青皮的麸炒法在不同地方所记录的炮制规范中也有所差异，主要体现在是否加蜜和麦麸用量方面。仅 2 个地方（浙江、上海）的炮制规范说明是蜜麸炒青皮，其余 8 个地方（四川、云南、广西、山东、贵州、河南、湖南、湖北）的炮制规范均说明是麸炒青皮；麦麸具体

用量不明确，仅少数地方的炮制规范规定麦麸用量为每 100 kg 青皮用麦麸 10 kg。

统计地方收录青皮制法的占比情况，结果显示醋制和麸炒是现在最常用的制法，两者占青皮总使用频率的 68%（醋制法 36%，麸炒法 32%）。这两种青皮炮制品的地区使用情况显示，品种分布呈现明显的地区不均衡性，大体集中在华中、华东和西南地区，而华北和华南等地区收录较少。如图 2 所示，醋制法分布较广泛，在华北、华南、华东、华中、西南地区均有收录；麸炒法除出现在华东和西南地区外，也见于华中及华南地区，蜜麸炒法则只见于华东地区。产生上述分布差异的原因可能与青皮古今药材资源地域分布、用药习惯、地方气候和经济水平等因素有关。此外，韩国虽然有关于青皮的记载，但仅有净制法。我国不仅是青皮使用历史最悠久，也是炮制品种最丰富的国家。

但是，其他方法如蒸制、盐制等，现已较少

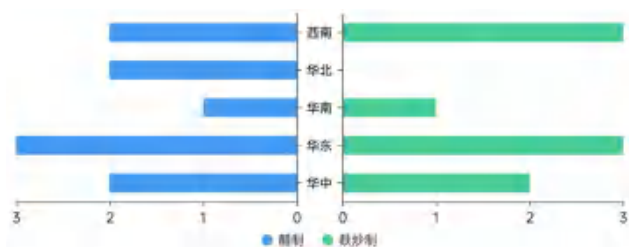


图 2 青皮醋制法及麸炒制法各地区收录情况

Fig 2 Collection of *Citri reticulatae pericarpium viride* processing with vinegar and stir-frying with wheat bran by region

应用, 这可能与疾病的变迁使这些制法的临床需求减少有关, 因此青皮的其他炮制工艺在传承过程中逐渐减少。但这些丰富的炮制品种不仅对青皮的现代开发使用, 对其他中药的相关炮制技术与共性规律研究, 仍具有重要价值, 是中药炮制传承不可或缺的组成部分。

2 药理作用

青皮的药理作用广泛, 其中对抑菌、保护肝胆及松弛平滑肌等方面药理作用的报道较多, 另外还有保护神经、修复损伤细胞、兴奋心脏等作用。对青皮炮制品方面的药理作用研究, 则主要集中在醋制品的松弛平滑肌方面, 与其醋炙增强止痛功效相关。

2.1 肝胆保护作用

青皮煎剂作用于肝损伤大鼠, 发现不同浓度的青皮煎剂能显著降低大鼠血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活性, 降低肝组织匀浆中丙二醛含量, 且保护作用随着剂量增加而增强, 呈现明显的量效依赖关系^[47]。青皮还能够明显促进大鼠的胆汁分泌, 增加胆汁流量, 有利于防止胆结石的形成^[48]。

2.2 平滑肌松弛作用

对大鼠离体十二指肠作用显示, 青皮生品和醋品均能在一定程度上抑制离体胃肠道平滑肌自发活动, 且能明显拮抗乙酰胆碱引起的肠道收缩痉挛, 从而使小肠松弛, 但未表明醋品是否具有增效作用^[49]。此外, 青皮提取物的研究表明, 大鼠离体小肠的各部位纵行肌条的收缩波平均振幅减小^[50], 还可抑制大鼠离体子宫平滑肌的自发收缩活动^[51]。

2.3 抑菌作用

青皮的挥发油成分最先受到关注, 随后的研究表明其非挥发性成分也具有抑菌活性。青皮挥发油混悬液作用于五种不同的细菌, 抑菌强度大小依次为: 藤黄微球菌 > 枯草芽孢杆菌、伤寒沙门氏菌 > 金黄色葡萄球菌 > 大肠埃希菌^[52]。青皮黄酮类成

分柚皮素显示出对变形链球菌的抑制能力, 最低抑菌浓度在 $100 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且能够抑制细菌生物膜的形成^[53]。有研究, 通过网络药理学对青皮作用于龋病的靶点进行探索, 发现青皮提取物对链球菌和龋菌的生长具有抑制潜力^[54]。

2.4 神经保护作用

青皮中的黄酮类成分川陈皮素被报道可以通过氧化应激途径发挥神经细胞的保护作用, 包括提高超氧化物歧化酶以及谷胱甘肽的生物活性, 同时降低氧化损伤细胞内乳酸脱氢酶的释放量和胱天蛋白酶 3 的活性^[55]。有文献采用网络药理学方法预测了青皮挥发油可能具有抗阿尔茨海默病的药效, 并推测该作用与神经元存活率的提高和炎症的抑制作用增强相关^[56]。此外, 青皮和青皮注射液在脑梗死模型中可以通过降低皮质下梗死灶周边的糖代谢^[57], 或增加缺血灶及其周边区的局部葡萄糖利用率发挥神经保护作用^[58]。

2.5 皮肤敏感缓解作用

最近的研究还显示了青皮在改善皮肤方面的潜力。青皮提取物可通过抑制瞬时受体电位香草酸亚型 1 的激活, 修复损伤细胞, 缓解皮肤对外界刺激过度反应后导致的敏感和刺激, 在一定程度上能够促进皮肤屏障修复^[59]。

2.6 心血管系统保护作用

青皮对心血管系统的作用, 主要集中在其注射液 (每 1 mL 相当于 2 g 的青皮生品) 的研究方面。通过明显缩短蟾蜍心脏的心动周期时间, 增强心肌收缩力, 兴奋心脏, 青皮注射液可发挥抗休克作用^[60]。临床试验发现青皮注射液还能够兴奋 α 肾上腺素能受体升高血压, 通过直接刺激压力感受器间接兴奋迷走神经, 可将阵发性室上性心动过速转变为正常的窦性心律^[61]。

2.7 其他作用

青皮挥发油中的 D- 柠檬烯成分还表现出对肾脏、卵巢、前列腺等肿瘤细胞的抑制活性, 还能够促使呼吸道黏膜分泌黏液, 缓解支气管痉挛^[62]。青皮中含量较高的单环单萜类成分 D- 柠檬烯显示良好的抗炎活性^[63]。

综上, 虽然青皮作用广泛, 但目前对青皮炮制品的现代药理学研究还远远不够, 特别是增效止痛等相关功效活性及其炮制机制的阐明亟需深入探索。

3 青皮及其炮制品的古今临床应用

青皮及其丰富的炮制品历来功效较多, 是中医临床实践的宝贵经验, 不能忽视。通过对其在

复方，特别是经典名方应用中的挖掘和梳理，将有助于我们理解青皮及炮制品在古方中的配伍规律，促进对青皮现代药理活性及潜在机制的阐述，同时也能够为现代配伍研究提供参考依据。

3.1 青皮及其炮制品的古方应用

根据《丹溪心法》《医方集解》等中医古籍所载，并结合方剂现代应用数据库、中国方剂数据库进行检索，综合结果显示，收录青皮及其制品的古籍中药方剂共有 1132 首。其中大部分传统方剂使用青皮，少部分使用醋青皮和麸炒青皮。本文从其理气、化积、止痛三个主要功效方面，展示青皮及其炮制品涉及的相关方药以及配伍规律。

3.1.1 疏肝理气 青皮苦泄辛行温通，性猛入肝，善于梳理肝胆之气，能破气散结。尤宜于肝郁气滞诸症。此功效主要以青皮生品入药为主。在配伍方面，当治疗滞寒凝之疝气时，常见与乌药、小茴香、木香等同用，行疏肝理气之效，如天台乌药散^[64]；治疗乳痈肿痛，以青皮疏厥阴肝经之滞，常配栝蒌、皂角刺等，如乳痈方^[65]；治疗气滞血瘀之症瘕积聚，久疝痞块，常见与三棱、莪术等配伍，如青皮汤^[66]；治疗脾胃受伤引起的肝胆疟疾，脾既受病，木又克之，多配柴胡以破滞而伐肝，柴胡疏上焦肝气，青皮疏下焦肝气，如清脾饮^[67]。

3.1.2 消积化滞 青皮辛苦降，又入胃经，能消积化滞。常用于治疗食积不化、胃脘痞闷胀痛，常与山楂、神曲等同用，如青皮汤^[68]；若三焦腹胀、腹满但觉中空，常与枳壳、大腹皮同用，如青皮饮^[69]；若小儿奶癖、疳瘦尽，可单用青皮为细末，猪胆汁为丸服之，如青皮丸^[70]。

此功效除以青皮生品入药外，麸炒青皮也是常用炮制品种。明代《本草蒙筌》曰：“麦麸皮制抑酷性勿伤上膈。”^[71]青皮经麸炒制后，辛燥之性得以缓和，不致破气而耗气，与健脾的药物配伍可增强消积化滞的功效。治疗伴有肚腹坚硬疼痛的脾疝，麸炒青皮可与麦芽、神曲、槟榔同用，取其解郁散结以疏肝理气之功，终使有形之积得去而无形之气得通，脾胃升降有序，纳运如常，如消疝理脾汤^[72]。

3.1.3 行气止痛 此功效主要以醋青皮入药为主。青皮经醋制后能引药入肝经，缓和辛烈之性，增强疏肝行气止痛的作用。治疗胁痛，醋青皮常配香附、橘皮以增强理气止痛之效，如平肝流气饮^[73]；治疗肝寒气滞、胁下满而痛引小腹，醋青皮又与醋柴胡、延胡索同用，如青阳汤^[74]；治疗

妇人月水不通、瘀血凝滞，常用醋青皮与红花、桃仁同用，如红花桃仁煎^[75]。

可见，不论对应现代何种疾病，当发挥青皮理气之功时，以生品为主；发挥化积之功时，以麸炒为宜；发挥止痛之功时，以醋制更佳。配伍方面，与三棱-莪术，山楂-麦芽，香附-柴胡是三种功效的常用药对。

3.2 青皮及其炮制品的现代临床应用

检索中药成方制剂标准数据库，结果显示，含青皮及其炮制品的中成药有 197 种。国家药品标准收录的中成药中，醋青皮入药的有 68 种，麸炒青皮入药的有 7 种，生品入药的有 122 种（见表 2）。

3.2.1 疏肝行气解郁 肝主疏泄，若疏泄不及，则肝气郁结，青皮味辛，能散能行，善入肝经而疏肝解郁。若肝郁气滞、胸脘胀痛者，可用开郁老蔻丸^[76]，青皮配伍豆蔻、陈皮等具有祛寒顺气的功效。青皮醋制后疏肝之力增强，中成药处方中多用醋青皮治疗肝郁气滞等。如治肝气郁结引起的胸胁胀痛，可用平肝舒络丸^[76]，醋青皮配伍柴胡、香附、乌药等能够平肝止痛；治气、血、痰、湿、食、火郁结，可用六郁丸^[76]，醋青皮配伍木香、郁金、槟榔等能够疏郁化结，顺气导滞。

3.2.2 消积散结止痛 脾为生气之源，人以胃气为本，青皮可畅调气机有助于脾胃之气升降，只有脾升胃降，才能保证食物的消化、吸收、转化和排泄功能正常。若胃肠积滞、脘腹胀痛者，青皮可与苍术、川芎等同用，如舒气丸^[76]；若胃脘痞闷、消化不良、嗝气、干啰气逆、纳差、腹胀者，青皮可与槟榔、枳壳、麦芽、神曲等同用，如开郁舒肝丸、舒郁九宝丸、沉香利气丸^[76]；若有脂肪肝、高脂血症属肝郁脾虚症者，可用青皮配伍三七、莪术、白术等，如三七脂肝丸^[77]。

综上，青皮及其炮制品涉及的现代方剂，在主体功效和应用方面与传统古方一脉相承，对疏肝理气、消积散结之功关注更多。但古方中记载其临床应用范围却在逐渐减少，日后应该加强对不同炮制品功效配伍的研究，让青皮在临床上发挥更大作用。

4 结语与展望

青皮的使用与炮制工艺历史悠久，金朝以前青皮与陈皮统称为陈皮使用，自金朝《珍珠囊》始用“青皮”入药。其炮制始于唐朝，于宋代快速发展，在明清时期发展至巅峰。历代医家积累了丰富的炮制经验与临床用药经验，多样的炮制

表 2 青皮及其制品在中成药中的应用

Tab 2 Use of Citri reticulatae pericarpium viride and processed products in Chinese patent medicine

炮制品	收载书籍	中成药
生青皮	《国家中成药标准汇编》	金甲排石胶囊、宝珍橡胶育、乳泰胶囊、三七脂肝丸、乳癖清胶囊、筋骨跌打丸、肝络欣丸、消肿镇痛膏、消石利胆胶囊、舒肝快胃丸、宽中老蔻丸、湘曲
	《卫生部药品标准中药成方制剂》	女宝胶囊、开郁老蔻丸、消食化痰丸、健脾养胃颗粒、调经姊妹丸、开郁顺气丸、圣济鳖甲丸、鸿茅药酒、伤科跌打片、五疲丸、宽胸利膈丸、沉香舒郁片、清热二十五味丸、甘露茶、风寒咳嗽冲剂、沉香化滞丸、跌打损伤丸、大活络丸、甘和茶、消痞阿魏丸、梁财信跌打丸、大温中丸、大活络胶囊、胆石片、木香顺气颗粒、安神镇惊二十味丸、红花跌打丸、大力药酒、妇科白凤口服液、胃活灵片、跌打万花油、痛经片、黄连羊肝片
	《新药转正标准》	麒麟丸、金龙舒胆颗粒、香药胃安胶囊、肝脾康胶囊、坤月安颗粒、大活络胶囊、胆石片、木香顺气颗粒、珍芪降糖胶囊、三七脂肝颗粒、香药胃安片
	《中国药典》	人参再造丸、木香顺气丸、木香槟榔丸、风寒咳嗽丸、齿痛消炎灵颗粒、金龙舒胆胶囊、复方益肝丸、蜀哮片、金噪利咽丸、柴胡舒肝丸、黄疸肝炎丸、痛经丸、舟车丸、和中糖浆、痛泻宁颗粒、乳疾灵颗粒、胆宁片、消瘤丸
其他	乳泰颗粒、金龙舒胆胶囊、乳安胶囊、朝阳胶囊、行气活血颗粒、乳疾灵胶囊、乳癖清片、痛经胶囊、金噪利咽片、保宁半夏颗粒	
醋青皮	《国家中成药标准汇编》	木香理气丸、快胃舒肝丸、和胃疔疝颗粒、调肝和胃丸、木香通气丸
	《中国药典》	香砂和中丸、清胃保安丸、平肝舒络丸、朴沉化郁丸、国公酒、通窍耳聋丸、利膈丸、儿童清热导滞丸、清暑益气丸、加味左金丸、再造丸、茴香橘核丸、黄连羊肝丸
	《卫生部药品标准中药成方制剂》	舒气丸、舟车丸、沉香舒气丸、同仁大活络丸、人参健脾片、加味四消丸、妇康丸、消积顺气丸、抑亢丸、宽胸舒气化滞丸、大黄化瘀丸、胃疡宁丸、舒郁九宝丸、温脾止泻丸、六郁丸、佛山人参再造丸、乳疮丸、清胃和中丸、调胃舒肝丸、沉香利气丸、烂积丸、舒肝调气丸、沉香利气丸、截疟七宝丸、平肝舒络丸、朴沉化郁丸、健身消导冲剂、消积丸、解郁和肝丸、羊痫疯癩丸、木香理气片、山楂内消丸、沉香舒郁丸、丁沉透膈丸、妇科回生丸、中华肝灵胶囊、药酒丸、妇宝金丸、活血调经丸、开郁舒肝丸、老蔻丸、济坤丸、小儿消积丸、香连化滞丸、抗衰复春片、益脾消食片
其他	舒肝健胃丸、抑亢散、健身消导颗粒	
麸炒青皮	《国家中成药标准汇编》	肝达康片、痰喘半夏颗粒、风寒骨痛丸、健肺丸、痰喘半夏颗粒、参桂再造丸、沉香曲

辅料制法能够减缓青皮的燥性，增加青皮止痛消积等功效，扩大了青皮的临床用药范围。而青皮现代的炮制方法则对历史上出现的其他炮制方法目前鲜见使用，只多见净制与醋制两种，随着现代研究的深入，青皮的炮制方法和相应的质量标准逐渐规范完善，但是各个省份的具体炮制方法存在差异，呈现明显的地域不均衡性。目前有关青皮炮制存在的问题主要如下。

4.1 青皮古法炮制的传承

青皮古法炮制技术繁杂，辅料种类多样。有不加辅料的蒸制、炮法、烘焙法，加辅料的麦麸炒制、蜜制、盐制、醋制、巴豆制、水蛭炒制、斑蝥炒制等。纵观青皮炮制历史沿革可知，古法炮制既有可借鉴传承之处，也有发展和认知的局限性。随着时代的发展，由于疾病种类的变迁、炮制辅料的缺乏和医家用药习惯等多种原因，致使青皮的炮制方法日渐趋于简单，多种古法未能得到传承，现代仅剩净制和醋制这两种主流炮制方法。中药炮制是中国医学临床用药的特色，是

中国医学遗产的重要组成部分，凝结了几千年来中国人民的智慧，我们要秉承“守正创新”的原则，利用现代中药研究科学技术，挖掘古籍中记载的青皮特色炮制方法，规范炮制各项参数，同时结合化学、物理学、生物学等现代科学技术进行实验验证，以期在继承古法炮制的基础上保证临床用药安全。

4.2 青皮炮制工艺及标准

自 1963 年药典收录青皮以来，历版《中国药典》对青皮各项质量标准也逐渐修订完善，其鉴别从简单的性状鉴别到性状、显微、薄层鉴别正逐步完善，但其含量测定一直以橙皮苷含量作为评价指标，与陈皮的评价指标相差不大，缺少其独有成分测定指标，在一定程度上难以与陈皮完全分辨。此外，《中国药典》及不同地区炮制规范所记载的青皮的炮制方法存在一定差异性，不论是醋制所用醋的品种与计量，还是麸炒所用麦麸的剂量都存在一定的差异，产生此类情况的原因可能是每个地方习惯制醋所用原料及制醋酸

度、炮制方式不同等因素所致，也可能是由于药典或地方炮制规范对炒制所用时间与火候等描述不清，导致青皮对人工炮制的依赖性较强，缺少相对精准的炮制工艺参数，以致其炮制品的品质参差不齐，影响临床使用的药效。中药饮片具有多成分、多通路、多靶点发挥功效的中药临床应用特点，因此，青皮的研究应该系统化、标准化，建立参数精准可控的炮制工艺。

4.3 青皮炮制机制的研究

不同的炮制方法可使青皮化学成分发生质和量的变化，促使青皮疗效多样化。我国历代中医先贤在临床实践中，通过青皮不同的炮制方法达到引药入肝经、缓和辛烈之性和增强消积化滞的作用，从而满足中医临床辨证施治、灵活用药的目的。早在 19 世纪，中国的学者就开始尝试用现代科学研究手段对中药进行研究，青皮抑菌、保护肝胆及松弛平滑肌等方面药理作用广泛。但现今由于青皮大部分炮制方法和技术的缺失，青皮及其炮制品的物质基础认识不足，靶点作用机制阐释不清，临床应用范围也逐渐减少。在科学高速发展的时代，探索青皮炮制方法和技术，剖析青皮及其炮制品药效物质基础，阐明炮制原理和作用机制，促进青皮及其炮制品临床应用多样化显得尤为重要。

综上所述，本研究通过文献考证，首次从历史沿革、现代炮制方法、效应物质及古今临方配伍等多方面对青皮炮制进行了较为全面的理论研究，总结了现代青皮炮制机制研究过程中存在的问题，以期为青皮炮制饮片的进一步研究、临床对青皮不同炮制品的应用提供文献支持，保证临床用药安全，使青皮炮制品在中医药治疗疾病中充分发挥其优势，以促进青皮炮制方法的发扬与传承。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 205.
 [2] 王艺涵, 赵佳琛, 金艳, 等. 经典名方中柑橘属皮用药材的本草考证[J]. 中国现代中药, 2020, 22(8): 1185-1200.
 [3] 许茹, 钟凤林, 吴德峰, 等. 中药青皮本草考证[J]. 中药材, 2013, 36(6): 1018-1023.
 [4] 兰道人. 仙授理伤续断秘方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 20.
 [5] 吴彦夔. 传信适用方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 11.
 [6] 朱佐. 类编朱氏集验医方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 52.

[7] 赵学敏. 串雅全书释义[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2009: 47.
 [8] 王袞. 博济方[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 49.
 [9] 王颉. 全生指迷方校注[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2014: 61.
 [10] 佚名. 小儿卫生总微论方[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1958: 126.
 [11] 陈言(无择). 三因极一病证方论 18 卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 82.
 [12] 李中立. 本草原始[M]. 北京: 学苑出版社, 2011: 466.
 [13] 杨时泰. 本草述钩元 37 卷[M]. 科技卫生出版社, 1958: 430.
 [14] 张秉成. 本草便读[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1958: 71.
 [15] 危亦林. 世医得效方[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 104.
 [16] 朱棣. 普济方第 4 册卷 148 至卷 184[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959: 82.
 [17] 楼英. 医学纲目白话精译珍藏本[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1999: 579.
 [18] 刘若金. 本草述校注[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2005: 471.
 [19] 王维德. 外科证治全生集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 17.
 [20] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典古代部分[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1998: 283.
 [21] 赵佶. 圣济总录 200 卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1962: 582.
 [22] 中国药典 1963 年版. 一部[S]. 1963: 152.
 [23] 中国药典 1977 年版. 一部[S]. 1977: 318.
 [24] 中国药典 1985 年版. 一部[S]. 1985: 164.
 [25] 中国药典 1990 年版. 一部[S]. 1990: 168.
 [26] 中国药典 1995 年版. 一部[S]. 1995: 167.
 [27] 中国药典 2000 年版. 一部[S]. 2000: 157.
 [28] 中国药典 2005 年版. 一部[S]. 2005: 137.
 [29] 中国药典 2010 年版. 一部[S]. 2010: 183.
 [30] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 197.
 [31] 全国中药炮制规范 1988 年版[S]. 1988: 160.
 [32] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范 2008 年版[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 263.
 [33] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药饮片炮制规范 2015 年版[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015: 562.
 [34] 云南省卫生厅. 云南省中药饮片炮制规范 1986 年[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 1986: 155.
 [35] 北京市食品药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范 2008 年版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 289.
 [36] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范 2006 年版[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2006: 160.
 [37] 江苏省药学会主. 江苏省中药饮片炮制规范[M]. 南京: 江苏凤凰科学技术出版社, 2020: 96.
 [38] 上海市药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018: 235.

- [39] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区中药饮片炮制规范 2007 年版 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2007: 200.
- [40] 山东省药品监督管理局. 山东省中药炮制规范 2002 年版 [M]. 济南: 山东友谊出版社, 2002: 199.
- [41] 安徽省食品药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范 2005 年版 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2005: 381.
- [42] 贵州省食品药品监督管理局. 贵州省中药饮片炮制规范 2005 年版 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005: 141.
- [43] 河南省食品药品监督管理局. 河南省中药饮片炮制规范 [M]. 郑州: 河南人民出版社, 2005: 196.
- [44] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药饮片炮制规范 2010 年版 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2010: 271.
- [45] 湖北省食品药品监督管理局. 湖北省中药饮片炮制规范 2009 年版 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2009: 362.
- [46] 天津市市场和质量管理委员会. 天津市中药饮片炮制规范 [M]. 天津: 天津市市场和质量管理委员会, 2012: 121.
- [47] 林丽, 汪炳华, 罗德生. 青皮煎剂预防大鼠急性化学性肝损伤的实验研究 [J]. 咸宁学院学报 (医学版), 2007, 21 (4): 292-294.
- [48] 隋艳华, 赵加泉, 崔世奎, 等. 香附、青皮、刺梨、茵陈、西南獐牙菜对大鼠胆汁分泌作用的比较 [J]. 河南中医, 1993, 13 (1): 19-20.
- [49] 黄华, 曾春华, 毛淑杰, 等. 青皮及醋制青皮对离体肠管运动的影响 [J]. 江西中医学院学报, 2005, 17 (2): 52-53.
- [50] 杨颖丽, 郑天珍, 瞿颂义, 等. 青皮和陈皮对大鼠小肠纵行肌条运动的影响 [J]. 兰州大学学报, 2001, 37 (5): 94-97.
- [51] 刘恒, 马永明, 瞿颂义, 等. 青皮对大鼠离体子宫平滑肌运动的影响 [J]. 中草药, 2000, 31 (3): 45-47.
- [52] 陈青, 钟宏波. 黔产青皮挥发油化学成分及抑菌活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (9): 118-121.
- [53] Yue JX, Yang HY, Liu SY, et al. Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans* [J]. J Dent, 2018, 76: 24-31.
- [54] 吴泽钰, 薛瑞, 袁曦玉, 等. 青皮对主要致龋细菌生长的影响及网络药理学分析其防龋机制 [J]. 口腔医学, 2020, 40 (2): 101-107.
- [55] 张辰, 王蕊, 余亚倩, 等. 基于网络药理学预测青皮治疗抑郁症的作用机制 [J]. 湖南中医杂志, 2022, 38 (7): 133-137.
- [56] 王腾华, 罗颖懿, 王驭辰, 等. 基于 GC-MS 与网络药理学的青皮挥发油防治阿尔茨海默症的活性成分及作用机制研究 [J]. 中国药房, 2020, 31 (17): 2093-2100.
- [57] 陈红, 曾非. 青皮对大鼠脑梗死灶周边区葡萄糖利用率的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2007, 14 (2): 70-72.
- [58] 郭乃燕, 李涛, 胡淑芳, 等. 青皮注射液对鼠脑梗死灶周围葡萄糖利用率的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23 (7): 889-890.
- [59] 周利丹, 卢伊娜, 刘青. 青皮提取物缓解皮肤敏感的作用机制研究 [J]. 日用化学工业, 2022, 52 (4): 418-424.
- [60] 李仪奎, 徐军, 王筠默. 青皮注射液对蟾蜍心肌生理特性的影响 [J]. 中草药, 1983, 14 (8): 22-24.
- [61] 蒋一鸣, 陈汝兴, 曹强, 等. 青皮注射液对阵发性室上性心动过速即刻转律作用的序贯检验研究 [J]. 中西医结合杂志, 1984, 4 (3): 162-163.
- [62] 刘洋, 吉燕华, 雒珂昕, 等. 柠檬烯应用的研究现状 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (5): 244-248.
- [63] 郭辉, 张斌, 钱俊青. 柑橘皮精油分离纯化工艺及其抗炎活性研究 [J]. 食品工业, 2014, 35 (1): 168-171.
- [64] 李杲. 医学发明 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959: 9.
- [65] 朱震亨. 丹溪心法评注 [M]. 西安: 三秦出版社, 2005: 239.
- [66] 李挺. 医学入门 [M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1988: 930.
- [67] 周鸿飞. 医方集解 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2017: 52.
- [68] 沈金鳌. 沈氏尊生书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 10.
- [69] 吕选民, 常钰曼. 柴草瓜果篇. 第四十一讲. 青皮 [J]. 中国乡村医药, 2018, 25 (21): 35-36.
- [70] 刘筏. 幼幼新书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 4.
- [71] 陈嘉谟. 本草蒙筌 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2009: 285.
- [72] 吴谦. 医宗金鉴 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 8.
- [73] 龚廷贤. 万病回春 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2007: 19.
- [74] 费伯雄. 医醇剩义 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 93.
- [75] 陈素庵. 陈素庵妇科补解 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 12.
- [76] 彭成. 中药成方制剂. 第 18 册. 保护品种分册二 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998.
- [77] 国家中成药标准汇编. 中成药地方标准上升国家标准部分 [S]. 2020.

(收稿日期: 2023-07-10; 修回日期: 2023-08-12)

药物分析与检验

盐酸氨溴索注射液玻璃安瓿包装中 20 种元素迁移量的测定与风险评估

齐艳菲, 贾菲菲, 王颖, 赵霞*, 杨会英* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 测定盐酸氨溴索注射液玻璃安瓿包装中 20 种元素的迁移量, 并进行风险评估。**方法** 采用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 测定 B、Al、Li、Ba、Mg、Fe、Zn、Mn、Cd、Ti、Co、Cd、Pb、As、Sb、Ce、Zr 17 种元素, 采用电感耦合等离子体发射光谱法 (ICP-OES) 测定 Si、K、Ca 3 种元素。**结果** 20 种元素回收率为 90.6% ~ 107.7%。ICP-MS 法测定 17 种元素检测限为 0.004 ~ 2.8 ng · mL⁻¹, ICP-OES 法测定 Si、K、Ca 3 种元素检测限分别为 7.4、10.1、7.9 ng · mL⁻¹。各元素按每日最大摄入量计, 均在安全范围内, 玻璃安瓿中主要迁出 Si、B、Al、Fe、Ti、Ba、Li 元素。**结论** ICP-MS 法与 ICP-OES 法经方法学验证可用于盐酸氨溴索注射液玻璃安瓿包装中 20 种元素迁移量的测定, 迁移量及迁移趋势可为其风险监控及玻璃包装发生脱片风险的预判提供参数。

关键词: 盐酸氨溴索注射液; 玻璃安瓿; 电感耦合等离子体质谱法; 电感耦合等离子体发射光谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0194-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.030

Migration determination and risk assessment of 20 elements in ambroxol hydrochloride injection in glass ampoule packaging

QI Yan-fei, JIA Fei-fei, WANG Ying, ZHAO Xia*, YANG Hui-ying* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050)

Abstract: Objective To determine the migration amount of 20 elements in ambroxol hydrochloride injection from glass ampoule packaging and to determine and evaluate the risk of migration amount in sample. **Methods** Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used to determine the migration amounts of 17 elements, including B, Al, Li, Ba, Mg, Fe, Zn, Mn, Cd, Ti, Co, Cd, Pb, As, Sb, Ce and Zr. Inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP-OES) was used to determine the migration amounts of Si, K and Ca. **Results** The recovery of 20 elements was 90.6% ~ 107.7%. The detection limit of 17 elements by ICP-MS was 0.004 ~ 2.8 ng · mL⁻¹, and the detection limit of Si, K and Ca by ICP-OES were 7.4, 10.1, 7.9 ng · mL⁻¹, respectively. According to the maximum daily intake, all the elements were within the safe range. Si, B, Al, Fe, Ti, Ba and Li were mainly removed from the glass ampoule. **Conclusion** ICP-MS and ICP-OES analysis is effective for the determination of 20 elements in ambroxol hydrochloride injection migrating from glass ampoule. Migration amount and migration trend can provide parameters for risk monitoring and prediction of glass delamination.

Key words: ambroxol hydrochloride injection; glass ampoule; ICP-MS; ICP-OES

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展基金 (No.2019C8)。

作者简介: 齐艳菲, 女, 助理研究员, 主要从事药包材检测及质量控制方面的研究, email: qyfnifdc@163.com *通信作者: 赵霞, 女, 主任药师, 主要从事药包材检测及质量控制方面的研究, email: rayradix@126.com; 杨会英, 女, 研究员, 主要从事药包材检测及质量控制方面的研究, email: yanghuiying@nicpbp.org.cn

盐酸氨溴索注射液是一种呼吸系统药物，具有促进黏液溶解的功能，可促进呼吸道内黏稠分泌物的排除及减少黏液的滞留，主要用于各种慢性呼吸道疾病的祛痰治疗，早产儿及新生儿的肺炎的治疗等。临床应用广泛，疗效好，无明显毒副作用，且耐受性较好^[1-4]。盐酸氨溴索注射液的包装容器为棕色玻璃安瓿。玻璃安瓿的生产工艺有两步，首先由石英砂、长石或氢氧化铝、硼砂、纯碱等物料按一定比例混合后经高温熔融制成玻璃管，然后再借助火焰热二次加工成型^[5-6]。其主要成分有 SiO₂、B₂O₃、Al₂O₃、Na₂O、K₂O、CaO、MgO、BaO 等，另外还有一些辅助玻璃成分，用以获得玻璃的某种特性，如 Li₂O 能够降低玻璃的黏度，提高玻璃的化学稳定性，As₂O₃、Sb₂O₃、CeO₂ 可作为澄清剂，以及 TiO₂、MnO、Fe₂O₃、CoO 等为玻璃着色剂，玻璃原材料以及生产过程亦会引入一定量的有害元素，如 Pb、Cd 等^[7]。

药物长时间贮存于玻璃包装容器内，会对玻璃容器内表面产生侵蚀，导致玻璃组分迁移至药液中，严重时产生玻璃脱片，玻璃脱片若进入人体，会造成人体局部血管堵塞、过敏等严重不良反应。玻璃主要成分如 Si、B、Al 等元素的迁移量可反映玻璃包装容器被药液侵蚀的程度，预测发生玻璃脱片的风险^[8-9]。同时，浸出组分可能与药物结合导致沉淀的产生或药品性状的变化，而影响药品的质量。另外，毒性较大的元素迁移进入药液也会产生潜在的安全性风险^[10-11]。因此，玻璃包装容器元素迁移量的测定是药物与玻璃容器相容性研究及安全性评价中至关重要的一部分。

目前元素分析方法主要有原子吸收分光光度法 (AAS)、电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-OES)、电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 与原子荧光光谱法 (AFS) 等。原子吸收光谱法每次只能测 1 个元素，应用于多批次样品的多种元素测定时费时耗力，并且测定部分元素时灵敏度较差。原子荧光光谱法虽具有较好的灵敏度，并且可实现多元素同时检测，但可测的元素种类很少。ICP-MS 与 ICP-OES 可同时进行多元素分析，方法简便、快速、高效。两种仪器所适用的待测元素浓度范围不同，可根据不同元素的特点及含量，选择不同的方法^[12]。

本文建立了 ICP-MS 与 ICP-OES 法测定盐酸氨溴索注射液玻璃安瓿包装中 20 种元素的迁移量，并对测定的结果进行风险评估。根据元素迁移趋势，分析盐酸氨溴索注射液与玻璃包装容器

的相互作用情况，为盐酸氨溴索注射液与玻璃包装容器的相容性研究结果的评价提供依据，为玻璃包装容器元素迁移量的测定提供参考。

1 仪器与试剂

iCAP RQ 型电感耦合等离子体质谱仪 (ThermoFisher 科技有限公司); 岛津 ICPE-9820 型电感耦合等离子体发射光谱仪 (岛津科技有限公司)。

Si、K、Ca、Ce、Zr、Ge、In、Rh、Tb、Sc、Lu 单元素标准溶液 (国家有色金属及电子材料分析测试中心, 1000 μg · mL⁻¹); Al、As、B、Ba、Be、Bi、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Ca、Li、Mg、Mn、Ni、Pb、Sb、Sn、Sr、Ti、Tl、V、Zn 24 种元素混合标准溶液 (国家有色金属及电子材料分析测试中心, 100 μg · mL⁻¹); 65% 硝酸 (德国默克密理博公司)。盐酸氨溴索注射液 (国内 A 公司, 批号分别为 20181105、20181106、20181107, 规格: 2 mL/15 mg)。中硼硅玻璃安瓿 (棕色, 国内 B 公司, 批号分别为 181003、181004、181005, 规格: 2 mL)。3 批药液与 3 批包材对应得到 5 批药品, 对应关系如表 1。

表 1 药品与包材批号的对应关系

Tab 1 Correspondence of batch number between drug and package

药品批号	对应药液批号	对应包材批号
C01	20181105	181003
C02	20181106	181003
C03	20181107	181003
C04	20181107	181004
C05	20181107	181005

2 方法与结果

2.1 元素测定种类的选择

测定元素范围参考国际人用药品注册技术协调会 (ICH) Q3D 元素杂质指南注射剂风险评估建议考虑的元素种类, 并结合其中关于包装材料中浸出的元素杂质风险评估的建议, 对于该类包装材料中不涉及的元素杂质, 无需进行额外的风险评估^[13], 最终选择了第一类元素 Cd、Pb、As, 第 2A 类元素 Co 与第三类元素 Li、Sb、Ba、Cr。另外参考《化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究技术指导原则 (试行)》元素迁移试验中建议的元素种类以及棕色玻璃安瓿的主要成分及可能添加的辅助成分^[8], 增加了 Si、B、Al、Na、K、Ca、Mg、Fe、Mn、Ti、Zn、Ce、Zr 元素。由于本药品含有大量的 Na 元素, Na 元素的测定结果难以准确反映玻璃容器中 Na 元素的迁移量,

因此本文测定了上述除 Na 元素以外的 20 种元素。

2.2 仪器参数

2.2.1 ICP-MS 用调谐溶液对仪器条件进行优化, 射频功率 1.55 kW, 等离子体氩气流速 $14 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 载气压力 0.65 MPa, 载气流速 $1.04 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 采样深度 5.0 mm, 蠕动泵速 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。氦碰撞模式, 氦气流速 $4.86 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。内标元素校正方式采用内插法, 以 ^{45}Sc 、 ^{73}Ge 、 ^{103}Rh 、 ^{115}In 、 ^{159}Tb 、 ^{175}Lu 为内标元素, 校正因子根据各内标元素的回收率及内标元素与待测元素质量数的差异进行加权计算。测定 ^7Li 、 ^{11}B 、 ^{24}Mg 、 ^{27}Al 、 ^{48}Ti 、 ^{52}Cr 、 ^{55}Mn 、 ^{57}Fe 、 ^{59}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{75}As 、 ^{90}Zr 、 ^{111}Cd 、 ^{121}Sb 、 ^{137}Ba 、 ^{140}Ce 、 ^{208}Pb 共 17 种元素, 以 ^{45}Sc 、 ^{73}Ge 、 ^{103}Rh 、 ^{115}In 、 ^{159}Tb 、 ^{175}Lu 混合溶液作为内标。

2.2.2 ICP-OES 射频功率 1.2 kW, 等离子体气流量 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气流量 $0.6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 载气流量 $0.7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 泵速 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 溶剂冲洗时间 20 s, 样品冲洗时间 15 s, 曝光时间 15 s, 观测模式: 轴向。测定 Si、K、Ca 3 种元素, 测定波长分别为 251.611 nm、769.896 nm、422.673 nm。

2.3 标准溶液的制备

2.3.1 ICP-OES 测定用标准溶液 分别精密量取 Si 元素标准溶液 1 mL 至 100 mL 塑料量瓶中, 以 2% 硝酸溶液稀释至刻度得到质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液 1。精密量取标准储备液 1 适量, 以 2% 硝酸溶液稀释成质量浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液。精密量取 K、Ca 标准溶液适量, 以 2% 硝酸与 0.09% 氯化钠溶液配制质量浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液, 配制方法同 Si 元素。

2.3.2 ICP-MS 测定用标准溶液 精密量取多元素标准溶液 1 mL 与 Zr、Ce 元素标准溶液 0.1 mL 至 100 mL 量瓶中, 以 2% 硝酸溶液稀释至刻度得到质量浓度为 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液 2。精密量取标准储备液 2 适量, 以 2% 硝酸溶液配制成质量浓度分别为 2、5、10、20、50、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液。精密量取 Ge、In、Rh、Tb、Sc、Lu 标准溶液适量, 以 2% 硝酸溶液配制质量浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ICP-MS 内标校正溶液。

2.4 供试品溶液的制备

分别取各批次盐酸氨溴索注射液 20 支, 将

药液混匀, 精密量取药液 1 mL, 以 2% 硝酸溶液稀释至 15 mL, 摇匀, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 取“2.3”项下系列标准溶液, 分别测定各元素的响应值, 以质量浓度为横坐标, 标准溶液的响应值为纵坐标, 绘制各元素的标准曲线, 计算回归方程和相关系数, 结果见表 2。

2.5.2 检测限与定量限 取空白溶液即 2% 硝酸溶液连续测定 11 次, 以测定结果的 3 倍标准偏差所对应的浓度值作为检测限, 以测定结果的 10 倍标准偏差所对应的浓度值作为定量限, 结果见表 2。

2.5.3 精密度 取“2.3”项下 ICP-MS 测定用质量浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 17 种混合元素标准溶液, ICP-OES 测定用质量浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Si、K、Ca 元素标准溶液, 分别连续测定 6 次, 计算各元素测得浓度的 RSD, 结果见表 2, RSD 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 加标回收率 取批号为 C03 的盐酸氨溴索注射液 20 支, 混匀, 精密量取 1 mL 至 15 mL 量瓶中, 平行 9 份, 根据样品中不同元素的浓度范围, 分别加入一定量的标准储备液 (Li、Cr、Mn、Fe、Co、As、Zr、Cd、Sb、Ce、Pb 11 种元素的加标质量浓度为 8、10、12 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Al、Ti、Zn、Ba 4 种元素的加标质量浓度为 16、20、24 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。B、Mg 元素的加标质量浓度为 32、40、48 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Si 元素的加标质量浓度为 400、500、600 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, K、Ca 元素的加标质量浓度为 160、200、240 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加 2% 硝酸溶液稀释制成 80%、100%、120% 浓度水平的加标供试品溶液, 每个加标浓度平行制备样品 3 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液。结果 20 种元素低、中、高浓度的加样回收率均在 90.6% ~ 107.7%, 各元素测定值的 RSD 均小于 5%, 表明本方法回收率良好。

2.5.5 重复性 取批号为 C03 的盐酸氨溴索注射液 6 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 测定 B、Mg、Al、Ti、Fe、Ba、Si、Zn 等 8 种元素的浓度, 并计算 RSD。其余元素含量极低或未检出, 故采用加标的方法进行考察, 加标浓度为“2.5.4”项下加标回收率项下低浓度水平。结果各元素测定值的 RSD 均小于 5%, 说明本法重复性良好。

表 2 20 种元素线性、检测限、定量限、精密度测定结果
Tab 2 Lineary, LODs, LOQs, and precision of 20 element

元素	回归方程	r	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)	检测限 / (ng · mL ⁻¹)	定量限 / (ng · mL ⁻¹)	精密度 /%
Li	$y = 3.8329 \times 10^4 x + 1.2711 \times 10^3$	0.9996	2 ~ 100	0.01	0.03	2.5
B	$y = 1.0368 \times 10^4 x + 3.8658 \times 10^4$	0.9993	2 ~ 100	0.6	2.0	2.7
Mg	$y = 3.3835 \times 10^4 x + 3.2042 \times 10^5$	0.9991	5 ~ 100	1.4	4.7	2.2
Al	$y = 4.8897 \times 10^4 x + 3.5394 \times 10^5$	0.9998	5 ~ 100	1.2	4.0	2.3
Ti	$y = 4.4297 \times 10^4 x + 3.7326 \times 10^5$	0.9998	2 ~ 100	0.1	0.3	2.3
Cr	$y = 5.1747 \times 10^4 x + 3.1943 \times 10^4$	0.9997	2 ~ 100	0.1	0.3	1.5
Mn	$y = 8.9706 \times 10^4 x + 1.8771 \times 10^4$	1.000	2 ~ 100	0.02	0.1	1.3
Fe	$y = 1.908 \times 10^3 x + 3.5796 \times 10^4$	0.9994	10 ~ 100	2.8	9.3	2.6
Co	$y = 6.1624 \times 10^4 x + 632.4$	1.000	2 ~ 100	0.004	0.01	1.4
Zn	$y = 3.5253 \times 10^3 x + 3.9370 \times 10^4$	0.9999	2 ~ 100	0.12	0.35	1.2
As	$y = 7.4696 \times 10^3 x + 994.3$	0.9998	2 ~ 100	0.04	0.1	1.9
Zr	$y = 6.2945 \times 10^4 x + 4.7466 \times 10^3$	1.000	2 ~ 100	0.02	0.1	1.4
Cd	$y = 1.2165 \times 10^4 x + 124.4$	1.000	2 ~ 100	0.005	0.02	1.4
Sb	$y = 3.7177 \times 10^4 x + 3.7021 \times 10^3$	0.9999	2 ~ 100	0.02	0.1	1.3
Ba	$y = 1.7798 \times 10^4 x + 1.9139 \times 10^4$	0.9995	2 ~ 100	0.2	0.7	1.7
Ce	$y = 1.5148 \times 10^5 x + 9.4720 \times 10^4$	0.9999	2 ~ 100	0.02	0.1	0.80
Pb	$y = 1.0225 \times 10^5 x + 1.6715 \times 10^5$	0.9993	2 ~ 100	0.4	1.3	1.2
Si	$y = 3.7175 \times 10^3 x + 297.4$	0.9996	50 ~ 2000	7.4	24.6	0.40
K	$y = 3.4364 \times 10^3 x - 343.6$	0.9994	50 ~ 2000	10.1	33.7	1.1
Ca	$y = 2.0040 \times 10^4 x + 1.8036 \times 10^3$	0.9999	50 ~ 2000	7.9	26.4	1.4

2.6 样品的测定

取不同批次加速 0、3、6 个月的盐酸氨溴素注射液，进样测定，每份样品平行测定 3 次，计算平均值，结果见表 3。5 批样品中均未检出 Ca、Sb、Pb、Cd、Ce，均检出一定量的 Si、B、Al、K、Fe、Ti、Ba、Zn、Mg、Mn、Co、Cr、Li、As、

Zr 元素。其中玻璃主成分 Si、B、Al 元素随着加速时间的延长，迁移量明显升高，另外 Fe、Ti、Ba、Li 元素亦随着加速时间的延长，迁移量有轻微的升高，预示盐酸氨溴素注射液对玻璃安瓿产生了一定的侵蚀作用，导致玻璃配方组分及添加的着色剂、澄清剂等浸出。

表 3 20 种元素在不同加速时间样品中的含量
Tab 3 Content of 20 elements in different acceleration time samples

元素	药品批号 C01			药品批号 C02			药品批号 C03			药品批号 C04			药品批号 C05		
	0 月	3 月	6 月	0 月	3 月	6 月	0 月	3 月	6 月	0 月	3 月	6 月	0 月	3 月	6 月
Si/ (μg · mL ⁻¹)	1.38	6.30	12.2	2.66	8.88	15.4	2.98	9.22	15.8	2.95	9.44	16.2	2.96	9.10	16.4
B/ (μg · mL ⁻¹)	0.53	0.93	1.29	0.54	0.92	1.48	0.59	0.95	1.36	0.52	1.10	1.47	0.52	0.93	1.49
Al/ (μg · mL ⁻¹)	0.27	0.67	1.22	0.30	0.74	1.31	0.34	0.78	1.18	0.32	0.83	1.24	0.50	0.75	1.23
K/ (μg · mL ⁻¹)	0.71	1.30	1.86	1.50	1.96	1.10	1.09	1.71	1.25	0.91	2.72	1.02	1.15	2.28	0.76
Fe/ (μg · mL ⁻¹)	< 0.14	0.28	0.38	< 0.14	0.28	0.47	0.14	0.29	0.43	< 0.14	0.32	0.44	0.25	0.28	0.46
Ti/ (μg · mL ⁻¹)	0.22	0.51	0.77	0.24	0.55	0.92	0.26	0.57	0.84	0.25	0.59	0.89	0.31	0.56	0.89
Ba/ (μg · mL ⁻¹)	0.35	0.58	0.78	0.36	0.60	0.92	0.41	0.60	0.82	0.36	0.63	0.86	0.35	0.59	0.89
Zn/ (μg · mL ⁻¹)	0.34	0.42	0.22	0.47	0.19	0.16	0.34	0.15	0.24	0.73	0.22	0.26	0.29	0.34	0.29
Mg/ (μg · mL ⁻¹)	0.66	0.90	0.57	0.64	0.84	0.61	0.64	0.68	0.73	0.80	1.16	0.62	0.60	0.96	0.79
Mn/ (ng · mL ⁻¹)	1.77	2.95	2.49	1.29	2.01	2.45	1.57	2.84	2.52	1.84	3.45	2.35	3.07	3.07	3.31
Co/ (ng · mL ⁻¹)	0.30	0.65	0.30	0.27	0.24	0.22	0.30	0.31	0.29	0.24	0.29	0.23	0.29	0.28	0.24
Cr/ (ng · mL ⁻¹)	9.45	6.76	7.63	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50	< 4.50
Li/ (ng · mL ⁻¹)	27.20	35.5	45.5	25.3	35.7	50.9	28.4	37.3	48.7	25.7	39.7	50.8	24.7	37.0	51.5
As/ (ng · mL ⁻¹)	7.05	6.95	7.66	6.95	6.56	8.67	7.13	7.26	8.42	7.07	6.94	8.78	6.84	8.10	8.53
Zr/ (ng · mL ⁻¹)	5.24	13.1	21.4	5.75	14.3	27.1	6.30	14.8	23.6	5.68	14.7	26.4	5.41	14.9	25.3

2.7 风险评估

参考 ICH Q3D 和《化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究技术指导原则(试行)》中的附件 6, 将药品中已建立日允许最大暴露量(PDE)的 30% 定义为控制阈值, 对已建立 PDE 数据的 Li、Cr、Co、As、Cd、Sb、Ba、Pb、Fe、Zn 10 种元素进行风险评估^[10, 13]。其他 10 种元素由于毒性较低等原因, 尚未建立 PDE 标准。参考欧洲药品管理局(EMA)颁布的金属催化剂或金属试剂残留量限度的规定文件, Mn 元素是第二类元素, 注射剂中 PDE 值为 $250 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[14]。Ce、Ti 元素均有文献报道其具有一定的毒性, 例如欧盟委员会(EC)将 TiO_2 分类为两类吸入致癌物, 但还缺少充分的毒理学数据建立 PDE 值^[15-17]。因此将其安全性视为与第二类金属元素相似, PDE 值为 $250 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。K、Ca、Mg 元素为人体必需的常量元素, 未见相关毒理学数据的报道, 因此将其安全性视为第三类元素, 注射 PDE 值为 $1300 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。参考相关文献, Si、B、Al 元素的推算 PDE 值分别为 $25\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $160 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $250 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[18]。

根据样品的 20 种元素的测定结果, 计算每日最大摄入量, 均远低于控制阈值(30%PDE)(见表 4, 该药品的每日最大剂量为 3 瓶, 折合每日用量为 6 mL, 根据表 3 检测的元素浓度结果, 计算出元素每日实际摄入量, 未检出的样品按检出限计算), 表明元素迁移量在安全范围内。另一方面, 玻璃组分的迁移量及趋势可反映玻璃容器被侵蚀程度, Si、B、Al 元素随着加速时间的延长, 迁移量显著增加, 预示发生玻璃脱片的倾向性, 虽然盐酸氨溴索注射液中未见玻璃脱片, 且不溶性微粒等指标未见变化, 但仍需继续监测其发生玻璃脱片的风险。

3 总结与讨论

3.1 测定方法的选择

ICP-MS 法与 ICP-OES 法均能同时测定多种元素, ICP-MS 法检测灵敏度高, 且注射液中大部分元素的迁移量较低, 因此选择 ICP-MS 法测定其中的 17 种元素。ICP-MS 法测定 Si、K、Ca 时, 由 Ar、C、O、H 等原子组成的多原子离子质谱干扰非常严重, 虽可以采用碰撞模式消除, 但结果灵敏度、重复性、准确性等均不理想, 且玻璃包装容器中 Si、K、Ca 3 种元素的迁移量也相对较高, 因此采用 ICP-OES 法测定。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

表 4 元素迁移结果的风险评估

Tab 4 Risk assessment of element migration results

元素名称	PDE/ ($\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$)	30%PDE/ ($\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$)	每日最大摄入量 (不同批次最高值)/ μg
Li	250	75	0.3
Cr	1100	330	0.06
Co	5	1.5	0.004
As	15	4.5	0.04
Cd	2	0.6	0.0008
Sb	90	27	0.005
Ba	700	210	0.005
Pb	5	1.5	0.04
Fe	1300	390	2.8
Zn	1300	390	11.3
Mn	250	75	0.02
Mg	1300	390	7.0
K	1300	390	16.3
Ca	1300	390	0.7
Ce	250	75	0.002
Al	250	75	7.9
Si	25 000	7500	98.4
B	160	48	8.9
Ti	250	75	5.5

元素分析时样品常需要进行一些前处理, 微波消解是一种常用的前处理方法, 常用于一些基质较为复杂的样品。盐酸氨溴索注射液由于结构简单, 且浓度较低(2 mL/15 mg), 供试品溶液的制备对比了直接稀释法与微波消解法, 测定结果基本一致。考虑到微波消解法比较耗时, 且赶酸过程对环境要求较高, 易引入元素杂质, 因此, 供试品的制备采用了直接稀释法, 能够满足测定需要。

3.3 干扰的消除

ICP-MS 法测定 As 元素时, 由于溶液中含有大量的 Cl^- 与载气形成 $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ 的多原子离子, 影响 ^{75}As 的测定, 本文采用氦碰撞模式, 消除多原子离子的干扰。盐酸氨溴索注射液辅料中含有磷酸氢二钠、氯化钠等成分, 对部分元素的测定存在基质干扰问题, 当采用 ICP-OES 法测定 K 元素时, 由于 Na、K 等碱金属很容易电离, 大量 Na 存会使得 K 电离平衡向原子态转变, 抑制 K 的电离, 使 K 的原子线信号增强, 导致结果偏高, 因此本文采用了基体匹配法测定了 K、Ca 元素。

3.4 盐酸氨溴索注射液对玻璃安瓿包装的侵蚀作用及包装容器选择的建议

玻璃安瓿包装盐酸氨溴索注射液后, 终端灭菌及加速放置过程中, 盐酸氨溴索注射液会与玻璃安瓿的内表面发生相互作用。一是注射液

中的大量水对玻璃产生侵蚀作用, 水中的 H^+ 与玻璃中的金属阳离子发生离子交换, 部分金属氧化物迁移至药液中^[19]。二是配方中含有枸橼酸、磷酸氢二钠、氯化钠等组分, 枸橼酸盐、磷酸盐、 Cl^- 等一方面作为亲核试剂, 对玻璃骨架产生侵蚀作用, 另一方面, 与玻璃组分形成络合物, 加速侵蚀过程, 导致玻璃主要成分迁移至药液中^[20]。两种机制共同作用导致了玻璃组分迁移至盐酸氨溴索注射液。

盐酸氨溴索注射液配方中存在多种与玻璃容器发生相互作用的组分, 导致玻璃中部分元素的浸出。并且盐酸氨溴索注射液对光不稳定, 需要棕色玻璃安瓿包装, 但棕色玻璃容器会加入一定量的着色剂如 MnO 、 TiO_2 等, 一定程度上降低了玻璃主要成分的比例, 从而降低其化学稳定性。建议盐酸氨溴索注射液的生产企业在选择棕色玻璃安瓿时, 严格把控玻璃容器的质量, 开展风险评估, 关注玻璃成分和杂质元素的浸出风险以及玻璃容器内表面化学耐受性和脱片风险, 以保证药品的质量和安全。

3.5 小结

本文建立了 ICP-MS 法与 ICP-OES 法同时测定盐酸氨溴索注射液玻璃安瓿瓶中 20 种元素的迁移量, 测定方法快速、简便, 结果准确。各元素按每日最大摄入量计, 均在安全范围内。玻璃主要成分 Si、B、Al 元素迁移量随着加速时间的延长明显升高, 预示玻璃安瓿被药液侵蚀, 玻璃组分迁出, 虽未最终影响药品质量, 但应持续关注其可能产生玻璃脱片的风险。本文可为盐酸氨溴索注射液的包材相容性及安全性评价提供技术支撑, 为注射剂与玻璃包装容器相容性研究中元素迁移量的测定提供参考。

参考文献

[1] 梅雪娇, 闫翔宇, 严相平. 盐酸氨溴索注射液降解杂质结构与降解途径分析[J]. 药学与临床研究, 2022, 30(4): 305-308.

[2] 曹圣楷, 谭健兵, 冀思华, 等. 高效液相色谱法测定盐酸氨溴索注射液中 2 种杂质的含量[J]. 中南药学, 2014, 12(11): 1136-1138.

[3] 杨群燕. 盐酸氨溴索注射液治疗毛细支气管炎 74 例[J]. 中国药业, 2013, 22(3): 71-72.

[4] 廖嘉宝, 苏少婵, 梁妍琨. 分析盐酸氨溴索注射液辅助治疗肺部感染的临床效果[J]. 中国医学创新, 2021, 18(1): 42-46.

[5] 田英良. 医药玻璃[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.

[6] Zuccato D, Guadagnino E, Richet P, et al. Glass for pharmaceutical use [J]. JACS, 2021, DOI: 10.1002/9781118801017.ch7.7.

[7] 赵彦钊, 殷海荣. 玻璃工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.

[8] 吴统选, 吴秋蓉, 张聪, 等. 注射用哌拉西林钠舒巴坦钠对中硼硅模制注射剂瓶中铝、硅、硼元素迁移量及其表面脱片趋势的影响[J]. 中南药学, 2023, 21(1): 82-86.

[9] 赵泽馨, 张迪, 刘巧, 等. 中性硼硅玻璃安瓿中铝、硅、硼元素的迁移量与其内表面脱片趋势关系的研究[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(12): 2214-2220.

[10] 原国家食品药品监督管理局. 化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究技术指导原则(试行)[M]. 北京: 原国家食品药品监督管理局, 2015.

[11] USP43-NF38. < 1660 > Evaluation of the inner surface durability of glass containers [S]. 2020.

[12] 朱俐, 赵瑜, 尹利辉, 等. 电感耦合等离子体原子发射光谱法和电感耦合等离子体质谱法检测药品中元素杂质的研究进展[J]. 理化检验-化学分册, 2022(3): 58.

[13] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q3D step 4 version: Guideline For Elemental Impurities [EB/OL]. (2022-4-26). https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R2_Guideline_Step4_2022_0308.pdf.

[14] EMMA. Implementing the Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents [EB/OL]. (2009-06-14). https://www.dgra.de/media/pdf/studium/masterthesis/master_reichert_u.pdf.

[15] 黄湘鹭, 罗飞亚, 邢书霞, 等. 二氧化钛及其纳米颗粒在食品、药品和化妆品领域安全风险研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(1): 63-73.

[16] International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc [M/OL]. Lyon: IARC Press, 2010: 275 [2021-11-25]. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono93.pdf>.

[17] 贺彦斌, 台培东, 孙梨宗, 等. 稀土元素铈对斑马鱼肝脏的遗传毒性[J]. 生态学杂志, 2018, 37(9): 2786-2793.

[18] 张璞. 电感耦合等离子体质谱法测定药用玻璃中易浸出元素及安全性评估[J]. 中国药业, 2021, 30(22): 91-94.

[19] Iacocca RG, Allgeier M. Corrosive attack of glass by a pharmaceutical compound [J]. J Mater Sci, 2007, 42(3): 801-811.

[20] Ogawa T, Miyajima M, Wakiyama N, et al. Effects of phosphate buffer in parenteral drugs on particle formation from glass vials [J]. Chem Pharm Bull, 2013, 61(5): 539-545.

(收稿日期: 2023-06-02; 修回日期: 2023-07-20)

离子色谱法测定别嘌醇中吗啉残留

赵晓亚, 郑文惠, 耿一楠, 刘晓, 常艳*, 丁俊飞 (华润双鹤药业股份有限公司, 北京 101111)

摘要: **目的** 建立了别嘌醇中痕量吗啉测定的离子色谱方法。**方法** 采用 IonPac CS12 (250 mm×4.0 mm) 阳离子色谱柱; 以 8 ~ 40 mmol·L⁻¹ 甲烷磺酸溶液洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 500 μL; 柱温为 30 °C; 抑制器为 CERS 300 (4 mm); 抑制电流为 161 mA; 外标法定量。**结果** 该方法下, 空白溶液和别嘌醇均不干扰吗啉的检测。吗啉在 0.001 487 ~ 0.014 87 μg·mL⁻¹ 与峰面积呈现良好的线性关系 ($r = 0.9991$), 加样回收率 ($n = 3$) 在 89.99% ~ 118.00%, 定量限为 1.487 ng·mL⁻¹。室温条件下, 吗啉对照品溶液和加标样品溶液分别在 46.5 h、38 h 内稳定性良好。**结论** 建立的方法灵敏、准确、专属性强、耐用性好, 可用于别嘌醇中痕量吗啉的检测。

关键词: 别嘌醇; 吗啉; 离子色谱; 致突变性杂质

中图分类号: R917, R971.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0200-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.031

Determination of morpholine residues in allopurinol by ion chromatography

ZHAO Xiao-ya, ZHENG Wen-hui, GENG Yi-nan, LIU Xiao, CHANG Yan*, DING Jun-fei (*China Resources Double-Crane Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 101111*)

Abstract: Objective To establish an ion chromatographic method for the determination of morpholine residues in allopurinol. **Methods** IonPac CS12 column (250 mm×4.0 mm) was used, and 8 ~ 40 mmol·L⁻¹ methanesulfonic acid was used as the mobile phases in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The injection volume was 500 μL. The column temperature was 30 °C. The analyte was detected conductively with a CERS 300 (4 mm), and the current of inhibitor was 161 mA. External standard method was used to determine the content of morpholine. **Results** The blank solvent and allopurinol caused no interference. The calibration curve had good linearity for morpholine at 0.001 487 ~ 0.014 87 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9991$). The recoveries of morpholine ranged at 89.99% ~ 118.00% ($n = 3$), and the limit of quantitation (LOQ) was 1.487 ng·mL⁻¹. The control solution and the labeled sample solution of morpholine were stable at room temperature within 46.5 h and 38 h, respectively. **Conclusion** The method is sensitive, and accurate with good specialization and durability, which can be used to determine morpholine residues in allopurinol.

Key words: allopurinol; morpholine; ion chromatography; mutagenic impurity

别嘌醇 (allopurinol), 化学名为 1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶 -4-醇, 是临床上治疗痛风的常用药物^[1]。此外, 研究表明别嘌醇对肾病也有良好的治疗效果^[2], 还可作为肿瘤溶解综合征低危患者和尿酸正常的中危患者的首选初始药物^[3]。别嘌醇治疗痛风的主要药用原理是别嘌醇及其代谢产物氧嘌呤醇通过抑制黄嘌呤氧化酶的活性, 使尿酸生成减少^[4]。目前, 别嘌醇常用的

工业化合成路线如图 1 所示^[5-6]。其中, 别嘌醇合成工艺中的重要起始物料吗啉, 在后续反应中可通过精制去除。由于别嘌醇常采用“一锅法”合成路线, 即生成 5-氨基-1H-吡唑-4-甲酰胺半硫酸盐^[5], 合成路线较短, 有残留吗啉的风险, 因此需严格控制吗啉残留量。参考致癌效力数据库 (CPDB) 提供的 1547 种化合物结构^[7], 吗啉结构与 1, 4-二氧己环结构类似, 具有潜在警示结构。

作者简介: 赵晓亚, 女, 硕士, 工程师, 主要从事化学药品质量研究, email: zxy_rd@163.com *通信作者: 常艳, 女, 工程师, 主要从事化学药品质量研究, email: CHANGYAN2@dcpc.com

因此,按照潜在致突变性杂质的要求制定吗啉限度为 $1.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ [18]。

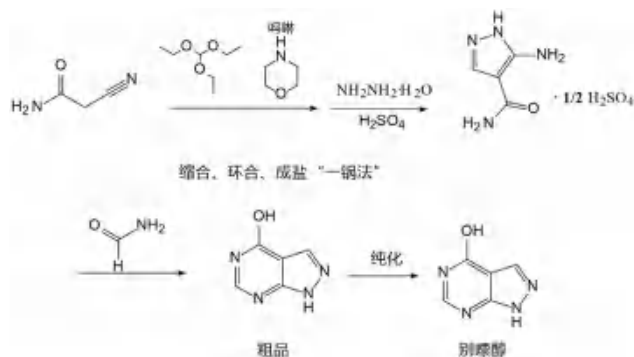


图 1 别嘌醇原料药的工艺路线

Fig 1 Process route of allopurinol API

目前,别嘌醇及其制剂的杂质相关研究内容较多 [9-10],但尚未发现对别嘌醇中吗啉进行检测的标准 [11-13] 或文献。吗啉检测通常采用气相色谱法 [14-15]、离子色谱法 [16]、液相色谱法 [17] 等分析方法,其中,离子色谱法具有简便、快速、灵敏度高,以及对强碱溶液的强耐受性等优点。本研究基于离子色谱法测定别嘌醇中的痕量吗啉,该法灵敏度高、专属性好、准确度高,不仅能够较好地满足别嘌醇中吗啉的质量控制要求,为别嘌醇质量标准的提升提供了科学依据,同时也为其他化合物中吗啉的检测提供了参考方法。

1 材料

1.1 仪器

ICS5000 型离子色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);Mettler ToledoXP205 电子分析天平(十万分之一,梅特勒-托利多国际有限公司);CS12 阳离子色谱柱(250 mm×4.0 mm,美国赛默飞世尔科技公司);Dionex OnGuard II H 固相萃取小柱(美国戴安公司)。

1.2 试剂

吗啉对照品(色谱级,批号:5002D30W,含量:99.6%,Alfa Aesar 化学有限公司);别嘌醇原料药[批号:4019 II 181101,含量:99.4%;批号:4019 II 181102,含量:99.5%;批号:4019 II 181103,含量:98.9%,华润双鹤药业(商丘)有限责任公司];甲烷磺酸(分析纯,北京伊诺凯科技有限公司);氢氧化锂(分析纯,中国医药集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 IonPac CS12 (250 mm×4.0 mm) 阳离子色谱柱为分析柱, IonPac CG12 (50 mm×4.0 mm) 为保护柱;以 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲烷磺酸溶液为淋洗

液 A, $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲烷磺酸溶液为淋洗液 B,梯度洗脱程序见表 1;流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量: $500 \mu\text{L}$;抑制器: CERS 300 (4 mm);抑制电流为 161 mA;柱温为 30°C 。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间/min	淋洗液 A/%	淋洗液 B/%
0	100	0
30	100	0
30.1	0	100
45	0	100
45.1	100	0
65	100	0

2.2 溶液配制

2.2.1 稀释剂 取 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化锂溶液,用 H 型固相萃取小柱滤过,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取别嘌醇 40 mg 置 10 mL 量瓶中,加约 3/4 量瓶体积稀释剂,置 90°C 加热 1 h 溶解,放冷,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,冰箱放置 1 h 后,用 $0.45 \mu\text{m}$ 聚醚砜滤膜滤过,即得。

2.2.3 对照品储备液 精密称取吗啉 36 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,移取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,再移取 1 mL,置 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 对照品溶液 精密移取对照品储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 专属性与系统适用性试验

分别取稀释剂、对照品溶液和供试品溶液各 $500 \mu\text{L}$,进样分析,记录色谱图见图 2。结果显示,稀释剂和别嘌醇均不干扰吗啉检测,吗啉的保留时间为 16.840 min,该色谱条件下与相邻杂质峰最小分离度为 1.5;连续 6 针对照品溶液色谱图中吗啉峰面积 RSD 为 1.5%,供试品溶液前后两针对照品溶液色谱图中吗啉峰面积 RD 为 3.7%。结果表明该方法专属性与系统适用性良好。

2.4 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

取吗啉对照品储备液,用稀释剂逐级稀释合适的倍数后进行测试,以信噪比 (S/N) 约为 10 时的进样浓度为其定量限,继续稀释,以 S/N 约为 3 时的进样浓度为其检测限。结果显示吗啉的定量限质量浓度为 $1.487 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,相当于供试品质量浓度 $0.37 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,检测限质量浓度为 $0.5558 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,相当于供试品质量浓度 $0.14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.5 线性关系考察

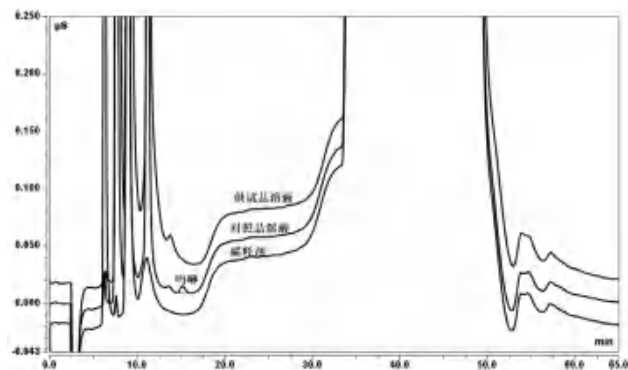


图 2 稀释剂、对照品溶液及供试品溶液离子色谱图
Fig 2 Ion chromatograms of diluent, standard solution and sample solution

取对照品储备液，分别稀释制成含吗啉 0.001 487 ~ 0.014 87 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液，分别精密量取线性溶液各 500 μL ，注入离子色谱仪，记录峰面积。以质量浓度 (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。结果显示吗啉线性回归方程为： $Y = 1.107X - 0.0004$, $r = 0.9991$, Y 轴截距占 100% 响应值的百分比为 5.2%。吗啉在 0.001 487 ~ 0.014 87 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.6 加样回收试验

精密称取别嘌醇 (4019 II 181103 批次) 40 mg，平行 10 份，分别置 10 mL 量瓶中，按照 3 个浓度准确加入对照品储备液，加稀释剂至 3/4 量瓶体积，置 90 °C 加热 1 h，溶解，放冷，用稀释剂稀释至刻度，摇匀，冰箱放置 1 h 后，用 0.45 μm 聚醚砜滤膜滤过，作为 50%、100%、150% 浓度水平的加样回收试验溶液，每个浓度水平平行配制 3 份，进样测定。结果回收率均在 89.99% ~ 118.00%，RSD 均小于 9.0%，所建立的方法的回收率较好 (见表 2)。

2.7 重复性考察

取“2.6”项下 100% 水平回收率溶液作为加标供试品溶液，注入离子色谱仪，分别测定 6 份加标供试品溶液中吗啉的含量。结果表明 6 份重复性溶液中吗啉含量均值为 1.8 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 12.3%。表明本方法具有良好的重复性。

2.8 稳定性考察

对照品溶液在室温下放置 46.5 h，各时间点峰面积与 0 h 峰面积的变化值均在 0.0% ~ 3.8%，表明对照品溶液在 46.5 h 内稳定。加标供试品溶液在室温下放置 38 h 后，各时间点峰面积与 0 h 峰面积的变化值均在 1.2% ~ 3.8% 内，表明加标供试品溶液在 38 h 内稳定。

表 2 加样回收试验

Tab 2 Recoveries

水平 / %	加入量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	测得量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
50	0.037 17	0.033 45	89.99	89.99	0.0
	0.037 17	0.033 45	89.99		
	0.037 17	0.033 45	89.99		
100	0.073 72	0.073 72	100.00	109.0	8.3
	0.073 72	0.079 62	108.00		
	0.073 72	0.086 99	118.00		
150	0.1106	0.1135	102.62	96.86	5.7
	0.1106	0.1017	91.95		
	0.1106	0.1062	96.02		

2.9 耐用性试验

取 100% 水平回收率溶液作为加标供试品溶液，分别用不同色谱柱、不同流速 0.9 ~ 1.1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、不同日期以及不同实验员操作，其他条件不变，测定加标供试品溶液中吗啉的含量。结果表明，与原条件结果比较，RD 在 0.0% ~ 10.5%。因此，色谱条件发生微小变化不影响吗啉的检测，耐用性良好。

2.10 样品中吗啉含量测定

分别取 4019 II 181101、4019 II 181102、4019 II - 181103 批次别嘌醇原料药配制供试品溶液，按外标法以峰面积计算吗啉的含量。结果显示，3 批别嘌醇供试品中均未检出吗啉。

3 讨论

3.1 检测方法选择

目前，吗啉检测通常以气相色谱法为主，采用溶液直接进样，结合氢火焰离子化检测器 [14-15]。但文献报道基于气相色谱法检测吗啉检出限最低为 2.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [14]，灵敏度较低。离子色谱法 [18-20] 具有简便、快速、灵敏度高，以及对强碱溶液的强耐受性等优点。张于等 [16] 曾采用离子色谱 - 间接紫外检测法对实验室合成的吗啉样品进行分析，且检测限小于 0.45 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本研究直接选用离子色谱 - 电导检测器法对别嘌醇中痕量吗啉进行检测，无需结合紫外检测器，检测限低，结果准确可靠。

3.2 溶剂选择

2020 年版《中国药典》载明别嘌醇在 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠或氢氧化钾溶液中易溶 [8]，但钠离子和钾离子在该色谱柱体系下，与吗啉分离较差。经筛选，发现采用 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化锂，以 H 型固相萃取小柱滤过后的溶液为溶剂时，别嘌醇能够溶解完全，且锂离子和吗啉的分离得到

了极大改善。本研究最终选用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化锂为溶剂。该溶剂的合理选择和处理方法, 为本方法开发成功的关键性因素。

3.3 淋洗液条件优化

本研究对淋洗液的浓度和梯度分别进行了考察。结果表明采用 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲烷磺酸溶液为淋洗液, 等度洗脱, 运行时间为 180 min 时, 样品中的所有杂质才能完全洗脱。但以 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲烷磺酸溶液为淋洗液进行梯度洗脱时, 45 min 内能将样品中所有的杂质完全洗脱, 且 65 min 内可完全平衡回初始梯度, 极大地节省了检测时间。

3.4 小结

本文采用离子色谱法实现了别嘌醇中吗啉进行有效的控制, 按照潜在致突变性杂质的要求制定吗啉限度为 $1.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[8], 方法学考察结果表明, 在此试验条件下, 吗啉在 $0.001487 \sim 0.01487 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好, 检测限为 $0.5558 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 专属性强、灵敏度高, 可有效避免样品假阴性, 满足杂质定量检测要求, 可作为别嘌醇中痕量吗啉的质量控制方法, 同时也可以作为其他化合物中吗啉含量测定的参考方法。

参考文献

- [1] 李凤敏, 顾玲玲, 付建茹. 非布司他与别嘌醇治疗高尿酸血症伴痛风的疗效比较 [J]. 医学信息, 2022, 35 (1): 165-167.
- [2] 张昀, 杨丹, 储晓天, 等. 别嘌醇对慢性肾脏病患者治疗效益的评价 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2020, 14 (1): 40-47.
- [3] 雷巧, 罗春香. 肿瘤溶解综合征的处理 [J]. 中国临床医生杂志, 2022, 50 (1): 23-25.
- [4] 覃珍, 陈超. 别嘌醇研究的新进展 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19 (11): 1220-1222.
- [5] 王丹, 杨昌雄, 陈玮琳, 等. 别嘌醇的合成工艺改进 [J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41 (1): 26-27.
- [6] 临海市恒源化工有限公司. 一种别嘌醇的合成方法: 中国, 201210028339.3 [P]. 2012-08-22.
- [7] European Medicines Agency (EMA). Guideline on the limits of genotoxic impurities [EB/OL]. [2006-06-28] www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf.
- [8] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 598.
- [9] 陈红, 朱蓉. 别嘌醇缓释片的含量测定和有关物质检查 [J]. 中国药房, 2013, 24 (1): 80-82.
- [10] 吴川彦, 朱蓉. 高效液相色谱法测定别嘌醇有关物质 [J]. 现代医药卫生, 2009, 25 (9): 1298-1300.
- [11] The United States Pharmacopoeia 43, The National Formulary 43 [S]. 2020: 131.
- [12] European Pharmacopoei [S]. 10th Edition, 2022: 576.
- [13] British Pharmacopoeia Commission Office [S]. BP2019. London: The Stationery Office, 2019.
- [14] 邓丽, 杨宝强, 谢天. 气相色谱法测定羟乙基吗啉中吗啉含量的研究 [J]. 广州化工, 2022, 50 (3): 94-96.
- [15] 石占崇, 王松芝, 刘昱. 吗啉产品纯度及杂质的气相色谱分析 [J]. 化工科技, 2013, 21 (1): 41-47.
- [16] 张于. 离子色谱-间接紫外检测法分析吡咯烷, 吗啉和过渡金属阳离子的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2016.
- [17] 吴殿军. 高效液相色谱法测定吗啉含量 [J]. 云南化工, 2000, 27 (3): 31-32.
- [18] 彭俊文, 陈建平, 布仁, 等. 离子色谱在药物分析中的应用进展 [J]. 中南药学, 2016, 14 (3): 290-294.
- [19] 王森, 顾小燕, 李耕, 等. 离子色谱法测定枸橼酸钾缓释片中枸橼酸的含量 [J]. 中南药学, 2022, 20 (12): 2897-2900.
- [20] 夏颖, 严菲, 李耕, 等. 离子色谱法测定环硅酸钠散中总钠和游离钠 [J]. 中南药学, 2022, 20 (3): 620-622.

(收稿日期: 2023-07-08; 修回日期: 2023-08-22)

高效液相色谱法测定醋酸氟卡尼片的含量

徐硕, 邝咏梅, 徐文峰, 金鹏飞* (北京医院药学部, 国家老年医学中心, 中国医学科学院老年医学研究院, 北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室(北京医院), 北京 100730)

摘要: **目的** 建立醋酸氟卡尼片的含量测定方法。**方法** 通过高效液相色谱法, 采用 Alltima C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (含 0.2% 三乙胺)(用磷酸调至 pH 3.0)(35 : 65), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 300 nm, 柱温为 30 °C。**结果** 醋酸氟卡尼在 196.0 ~ 588.0 μg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数为 1.000; 精密度、重复性和稳定性考察 RSD 均小于 1.0%; 低、中、高浓度的平均回收率在 98.79% ~ 99.20%, RSD 均 < 1.0%。**结论** 该方法准确、简单、快速, 能够用于醋酸氟卡尼片的含量测定。

关键词: 醋酸氟卡尼; 醋酸氟卡尼片; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0204-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.032

Content determination of flecainide acetate tablets by high-performance liquid chromatography

XU Shuo, KUANG Yong-mei, XU Wen-feng, JIN Peng-fei* (*Department of Pharmaceutical Sciences, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drug Risks and Individualized Application (Beijing Hospital), Beijing 100730*)

Abstract: Objective To determine the content of flecainide acetate tablets. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) was used with an Alltima C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate solution (containing 0.2% triethylamine) (pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid) (35 : 65) with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 300 nm and the column temperature was 30 °C. **Results** There was a good linearity between flecainide acetate and peak area in a certain concentration range of 196.0 ~ 588.0 μg·mL⁻¹, with the correlation coefficient (*r*) was 1.000. The relative standard deviations of precision, repeatability and stability were less than 1.0%. The average spiked recovery of low, middle, and high concentration was 98.79% ~ 99.20% with relative standard deviation (RSD) all less than 1.0% (*n* = 3). **Conclusion** The method is accurate, simple and rapid, and can be used for the content determination of flecainide acetate tablets.

Key words: flecainide acetate; flecainide acetate tablet; HPLC; content determination

氟卡尼是钠通道阻滞药, 属于 Ic 类抗心律失常药。醋酸氟卡尼片主要用于治疗室性心律失常, 包括室性期前收缩及室性心动过速、室上性期前收缩、室上性心动过速、心房扑动、心房颤动、预激综合征合并室上性心动过速等^[1-4]。醋酸氟卡尼片收载于《美国药典》^[5]和《日本药典》^[6]。

目前, 该药还没有在我国上市, 也未在《中国药典》中收载。关于醋酸氟卡尼片的研究主要集中在药理作用, 其含量测定方面的研究报道非常有限, 仅有一篇早期的报道^[7], 采用 HPLC 法和紫外分光光度法进行定量。利用 HPLC 法是通过内标法测定, 溶液配制操作复杂。文献报道以及

作者简介: 徐硕, 女, 副主任药师, 主要从事药物分析研究, email: jessica06250917@126.com *通信作者: 金鹏飞, 男, 主任药师, 主要从事药物分析及医院药学研究, email: j790101@163.com

《日本药典》记载的以紫外分光光度法测定醋酸氟卡尼含量,其专属性相对较差,《美国药典》中是采用 HPLC 法,流动相为高浓度缓冲盐溶液,梯度洗脱,该方法于 2019 年进行修订并沿用至今。而在此之前《美国药典》^[8]中收录的方法为采用 C₈ 分析柱,并且用四相混合溶液的复杂流动相体系,不利于色谱柱和液相系统的长时间运行。因此,有必要建立一种普适性强并且快速简便的方法,用于醋酸氟卡尼片中醋酸氟卡尼的定量分析。本研究通过 HPLC 技术,建立了醋酸氟卡尼片的含量测定方法,该方法简便、快速、准确,可为该药品的质量评价提供科学依据,现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 [Agilent 1260 型,包括四元梯度泵 (G1311C),自动进样器 (G1329B),柱温箱 (G1316A),二极管阵列检测器 (DAD) (G4212B),色谱工作站 (LC OpenLAB),美国 Agilent Technologies 有限公司];电子分析天平 (XP-205 型,精度:十万分之一,瑞士 Mettler Toledo 集团);SPX-250 IC 微电脑人工气候箱 (上海博迅实业有限公司);数控超声波清洗器 (KQ-300DB 型,昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

乙腈、磷酸 (Thermo Fisher Scientific 有限公司产品,色谱纯,批号分别为 192855、158625);磷酸二氢铵、冰醋酸、盐酸、30% 过氧化氢 (国药集团化学试剂有限公司产品,分析纯),氢氧化钠 (北京化工厂,分析纯);水为二级实验用水。醋酸氟卡尼对照品 [批号:G0K124,纯度:99.7%,USP];醋酸氟卡尼片 (规格:含醋酸氟卡尼 100 mg/片,批号:GUL050A、GUD052B、GTB072E,英国 Inova Pharmaceuticals 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱采用 Alltima C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (含 0.2% 三乙胺)(用磷酸调至 pH 3.0) (35:65);流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 300 nm;柱温为 30℃;进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取醋酸氟卡尼对照品适量,置于 500 mL 量瓶中,加入 2% 冰醋酸溶液 40 mL,超声使

其溶解,再加入流动相稀释至刻度,即得质量浓度约为 2 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 2.5、4、5、6、7.5 mL,置于 25 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得 5 个不同浓度的线性系列溶液 (质量浓度分别为 196.0、313.6、392、470.4、588.0 μg·mL⁻¹)。将中间浓度的溶液 (392 μg·mL⁻¹) 作为标准工作液,用作方法的系统适用性考察。

2.3 供试品溶液的配制

取醋酸氟卡尼片 20 片,精密称定,将其置于乳钵中研细,精密称取约相当于醋酸氟卡尼 100 mg 的样品 (约为 0.26 g),置于 250 mL 量瓶中,加入 2% 冰醋酸溶液 20 mL,超声提取 (功率为 300 W,频率为 40 kHz) 30 min,再加流动相定容至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即为供试品溶液。

2.4 阴性样品溶液的配制

依据醋酸氟卡尼片药品说明书提供的配方制得的不含醋酸氟卡尼的粉末作为阴性样品。精密称定该粉末适量,按照“2.3”项下方法操作,即得阴性样品溶液。

2.5 系统适用性、线性关系考察、检测限和定量限

在“2.1”项色谱条件下,将标准工作液连续进样 6 次,醋酸氟卡尼色谱峰的平均理论塔板数为 (4839.3±10.3)(*n* = 6)。精密吸取“2.2”项下 5 个不同浓度的对照品溶液各 10 μL,在“2.1”项色谱条件下进样测定,记录醋酸氟卡尼峰面积,以该成分的质量浓度 (μg·mL⁻¹) 为横坐标 (*X*),峰面积为纵坐标 (*Y*),进行回归分析,得到回归方程为: $Y = 3.549X + 3.566$, $r = 1.000$,醋酸氟卡尼在 196.0 ~ 588.0 μg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

取质量浓度为 196.0 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液,加入流动相进行稀释,进样测定,以低浓度对照品信噪比约为 3.0 和 10.0 时的浓度分别作为检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ),结果醋酸氟卡尼的 LOD 为 0.061 μg·mL⁻¹, LOQ 为 0.196 μg·mL⁻¹。

2.6 专属性试验

2.6.1 基质干扰试验 精密吸取上述阴性样品溶液、醋酸氟卡尼对照品溶液以及供试品溶液各 10 μL,进样分析,按照“2.1”项下色谱条件检测,结果显示样品中的辅料不干扰醋酸氟卡尼的测定 (见图 1)。

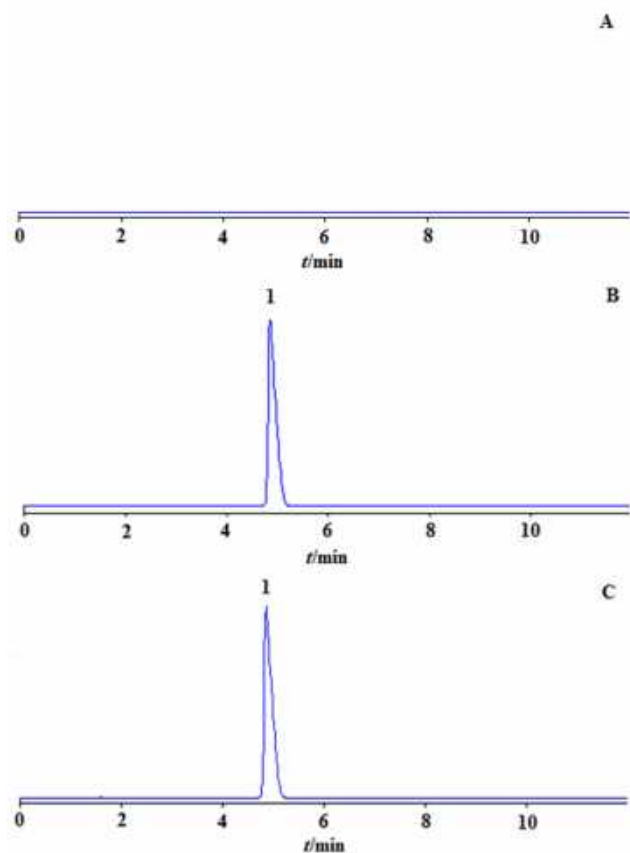


图 1 阴性样品溶液 (A)、对照品溶液 (B) 和供试品溶液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of negative sample solution (A), reference substance solution (B) and sample solution (C)

1. 醋酸氟卡尼 (flecainide acetate)

2.6.2 强制降解试验 为进一步考察方法的专属性, 对供试品进行强制降解试验, 参照国际通行的人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH) 方

法验证原则进行^[9-10]。考察的条件包括酸化、碱化、光照、氧化和高温。取醋酸氟卡尼片 (批号: GUL050A) 样品粉末, 精密称定 5 份, 每份约为 0.26 g (约相当于醋酸氟卡尼 100 mg), 置于 250 mL 量瓶中, 进行处理如下:

① 酸降解: 分别配制浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液, 量取 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 2 mL 加入样品中, 置于室温条件下放置 6 h 后, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液, 使其中和至中性, 依照“2.3”项下方法操作, 制得供试品溶液。② 碱降解: 量取 2 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液加入样品中, 置于室温条件下放置 6 h 后, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液, 使其中和至中性, 按照“2.3”项下方法操作, 制得供试品溶液。③ 光降解: 将样品放入微电脑人工气候箱中, 光照强度设置为 10 000 lx, 在该条件下照射 6 h, 依照“2.3”项下方法操作, 制得供试品溶液。④ 氧化降解: 在样品中加 30% 过氧化氢溶液 2 mL, 室温下放置 6 h, 依照“2.3”项下方法操作, 制得供试品溶液。⑤ 高温降解: 将样品放入烘箱中, 80°C 加热 6 h, 取出, 待其冷却到室温后, 依照“2.3”项下方法操作, 制得供试品溶液。

将上述溶液各进样 $10 \mu\text{L}$, 在“2.1”项色谱条件下进行检测。结果显示: 与未经过强制降解试验的样品比较, 醋酸氟卡尼在高温条件较为稳定, 未发生降解; 在光照、碱化、酸化及氧化条件下有所降解, 色谱峰面积略有降低, 氧化条件下降解较为明显, 可见降解产物色谱峰, 但对醋酸氟卡尼的定量分析不会造成干扰 (见图 2)。

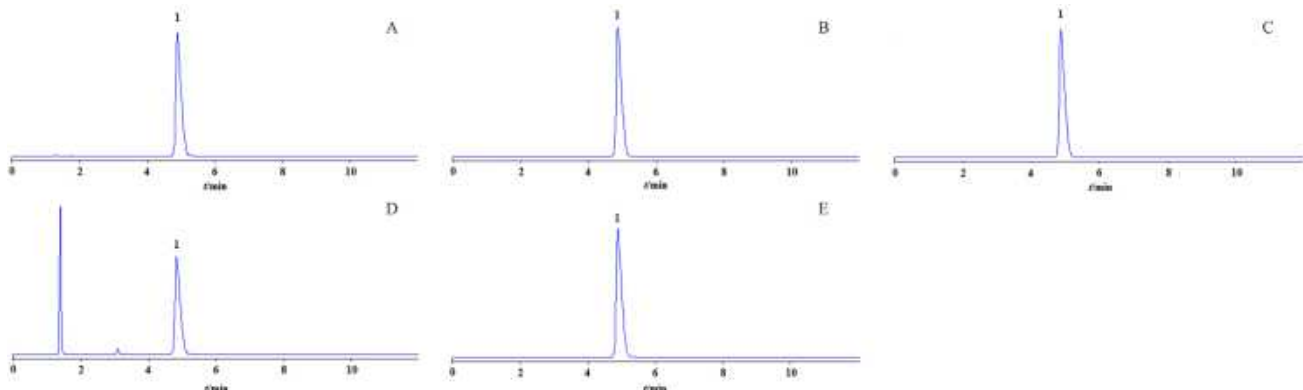


图 2 醋酸氟卡尼片样品强制降解试验 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of forced degradation test for flecainide acetate tablets samples

A. 酸降解 (acid degradation); B. 碱降解 (alkaline degradation); C. 光降解 (light degradation); D. 氧化降解 (oxidative degradation); E. 高温降解 (high-temperature degradation); 1. 醋酸氟卡尼 (flecainide acetate)

2.7 精密度试验

取批号为 GUL050A 的醋酸氟卡尼片制得的

供试品溶液, 连续进样 6 针, 记录峰面积, 结果醋酸氟卡尼色谱峰峰面积的 RSD 值为 0.14%

($n = 6$), 表明精密度良好。

2.8 重复性试验

精密称取批号为 GUL050A 的醋酸氟卡尼片样品 6 份, 每份约为 0.26 g, 按照“2.3”项下方法操作, 制得供试品溶液, 进样分析, 以外标法计算含量, 结果醋酸氟卡尼的平均含量为 98.15%, RSD 值为 0.53% ($n = 6$), 表明该方法具有良好的重复性。

2.9 稳定性试验

取批号为 GUL050A 的供试品溶液, 置于室温条件下, 分别在配制后的 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, 记录峰面积值, 计算醋酸氟卡尼色谱峰峰面积的 RSD 值为 0.49% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.10 加样回收试验

取批号为 GUL050A 的样品, 研细, 精密称取粉末 9 份, 每份约为 0.13 g, 分别精密加入“2.2”项下对照品储备液 20、25、30 mL, 按照“2.3”项下方法制备, 每个浓度制备 3 份样品, 进样测定, 计算回收率和 RSD , 结果如表 1 所示。

表 1 回收试验结果
Tab 1 Recovery test

原含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
49.81	39.20	88.33	98.27	98.98	0.73
49.62	39.20	88.71	99.72		
49.90	39.20	88.69	98.95		
50.62	49.00	99.19	99.12	99.20	0.62
50.24	49.00	98.57	98.63		
50.39	49.00	99.32	99.86		
50.18	58.80	108.0	98.33	98.79	0.64
50.79	58.80	109.3	99.51		
50.46	58.80	108.4	98.54		

2.11 耐用性考察

分别采用 Alltima C_{18} 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Shimadzu C_{18} 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Waters C_{18} 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m) 进行试验, 结果显示不同品牌色谱柱对醋酸氟卡尼的保留时间、峰形无影响。改变色谱条件中的柱温 (30±2) °C, 结果显示醋酸氟卡尼保留时间基本不变, RSD 为 0.63%。改变色谱条件中的流速 [(1.0±0.2) mL·min⁻¹], 醋酸氟卡尼的保留时间分别为 4.0、4.9、6.1 min。结果表明本方法的 HPLC 条件耐用性良好, 色谱参数的微调不会影响检测结果。

2.12 样品含量测定

采用已建立的方法测定了 3 批醋酸氟卡尼片, 每批样品精密称取 2 份, 按照“2.3”项下方法制得供试品溶液, 进样分析, 计算醋酸氟卡尼含量, 取平均值作为含量测定结果, 见表 2。

表 2 样品中醋酸氟卡尼的含量
Tab 2 Content of flecainide acetate in samples

批号	醋酸氟卡尼含量/(mg/片)	相对标示量/%
GUL050A	98.00	98.00
GUD052B	98.57	98.57
GTB072E	97.23	97.23

3 讨论

3.1 检测波长的选择

设定醋酸氟卡尼的检测波长是根据其在流动相中的紫外吸收谱图, 谱图显示该成分的最大吸收为 204 nm 和 300 nm, 将 300 nm 选定为含量测定的检测波长。

3.2 色谱条件的优化

考察不同流动相体系 [乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调至 pH 3.0)、乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (用冰醋酸调至 pH 3.0)、乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (含 0.1% 辛烷磺酸钠)(用磷酸调至 pH 3.0)、乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (用磷酸调至 pH 3.0)、乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (含 0.2% 三乙胺)(用磷酸调至 pH 3.0)] 对醋酸氟卡尼色谱峰的影响, 结果表明将乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (含 0.2% 三乙胺)(用磷酸调至 pH 3.0) 作为流动相时待测成分峰形较好, 理论塔板数大于 4500, 将其选定为流动相。考察了以乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (含 0.2% 三乙胺)(用磷酸调至 pH 3.0) 作为流动相, 调整有机相和水相不同比例, 以及设定不同流速 (0.5、0.8、1.0 mL·min⁻¹) 对待测成分保留时间的影响, 结果显示当乙腈和水相的比例为 35:65, 流速采用 1.0 mL·min⁻¹ 时, 醋酸氟卡尼的保留时间约为 5 min, 较为合适。

3.3 提取溶剂的选择

在含量测定分析中选择常用的超声提取法作为样品的提取方法, 比较了以乙腈、甲醇、2% 冰醋酸溶液、0.2% 冰醋酸溶液作为提取溶剂的影响, 结果表明用 2% 冰醋酸溶液 20 mL 作为提取溶剂能够提取完全, 之后再加流动相稀释至刻度能使色谱峰峰形良好。

3.4 样品取样量的选择

制备供试品溶液时, 对称取不同样品粉末量

(约相当于醋酸氟卡尼 25、100、250 mg) 进行比较, 结果显示当称取量约为相当于醋酸氟卡尼 100 mg, 加 2% 冰醋酸溶液 20 mL, 再用流动相稀释至 250 mL 时目标测定成分具有合适的响应值。

3.5 测定方法的改进

现行版《日本药典》^[6] 以及文献报道^[7] 的醋酸氟卡尼片含量测定方法为采用紫外分光光度法, 仪器设备和操作比较简单, 但其专属性不如 HPLC 法。文献中是通过吸光系数法进行定量, 未配制对照品溶液, 吸光系数法有可能造成测定结果的不准确, 如果杂质或辅料在选定的测定波长处有吸收, 则会导致结果偏高。HPLC 法具有定量准确、分离性能高、专属性强等特点, 在药品定量分析中具有一定优势^[11]。《美国药典》^[5] 中收录的醋酸氟卡尼片, 是通过 HPLC 法测定其含量, 流动相为乙腈 -100 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 (用乙酸调 pH 至 5.4), 梯度洗脱, 该方法于 2019 年修订并沿用至今, 缓冲盐的浓度较高, 长时间运行有可能引起盐析出, 堵塞色谱柱或管路; 梯度洗脱需要平衡色谱柱, 用时相对较长。而在修订之前《美国药典》^[8] 的方法是以乙腈 - 冰醋酸 - 四丁基氢氧化铵 - 甲醇的混合溶液为流动相, 溶液配制复杂, 四丁基氢氧化铵为离子对试剂, 长期运行对色谱柱和液相系统的损伤较大, 且使用后会使得柱平衡时间延长, 平衡时间不够可能对实验的重复性造成影响; 并且采用 C₈ 分析柱, 相比于 HPLC 法最常用的 C₁₈ 柱, 不利于方法的推广应用。文献报道^[7] 的 HPLC 法是采用内标法, 需配制胺碘酮内标溶液, 样品前处理溶液配制操作和结果计算相对较为耗时, 流动相采用 67 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液, 浓度较高, 对色谱系统的长期运行有一定损害。本研究采用乙腈 -20 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液为流动相, 缓冲盐浓

度较低, 有利于液相系统的长时间运行和样品的连续测定, 与用更高浓度的缓冲盐进行比较, 结果显示 20 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液即可获得较好的峰形。采用等度洗脱的方式能够节省时间, 可在 10 min 之内完成测定, 经专属性试验, 样品中的辅料和强制降解产物不干扰目标成分的定量分析。采用外标法定量, 相比于内标法, 样品前处理溶液配制过程以及测定结果计算简便快捷。

参考文献

- [1] 丁世芳. 氟卡尼的特性及其在心房颤动中的应用[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2005, 19(6): 506-509.
- [2] 刘念, 董建增, 马长生. 钠通道阻滞剂在儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速治疗中的应用[J]. 岭南心血管病杂志, 2013, 19(6): 657-660.
- [3] Debra SE, Jeremy NR. Use of flecainide for the treatment of atrial fibrillation [J]. Am J Cardiol, 2020, 125(7): 1123-1133.
- [4] Enrico P, Giulia S, Federico G, et al. Flecainide: electrophysiological properties, clinical indications, and practical aspects [J]. Pharmacol Res, 2019, 148: 104443.
- [5] USP-NF2021 [S]. 2021. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-30DC9AB2-A3B2-4324-B763-E4C-399B6555E_5_en-US.
- [6] JP XVIII [S]. 2021: 1013-1014.
- [7] Paw B, Przyborowski L, Slawik T. Determination of flecainide acetate in tablets by HPLC and UV-spectrophotometry [J]. Pharmazie, 1998, 53(2): 97-98.
- [8] USP32-NF27 [S]. 2009: 2381.
- [9] ICH-Q2A. Text on validation of analytical procedures [S]. 1995.
- [10] ICH-Q2B. Validation of analytical procedures: methodology [S]. 1996.
- [11] 徐硕, 徐文峰, 姜文清, 等. 中药中木脂素类成分含量测定方法的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2022, 37(2): 182-185.

(收稿日期: 2023-04-11; 修回日期: 2023-04-25)

九节茶药材质量标准研究

苏锐辉¹, 于小庆¹, 江涛^{1*}, 汤迎湛¹, 彭红英¹, 李怡芳², 何蓉蓉² (1. 广州白云山敬修堂药业股份有限公司, 广州 510130; 2. 暨南大学药学院, 广州 510632)

摘要: 目的 对九节茶药材开展全面的质量标准研究, 建立完善的九节茶质量标准。方法 收集 13 批九节茶药材, 以异嗪皮啉对照品和九节茶对照药材建立薄层色谱鉴别方法; 参考《中国药典》(2020 年版) 四部通则, 对九节茶水分、总灰分、酸不溶性灰分及浸出物进行检查; 采用高效液相色谱法测定九节茶中异嗪皮啉和迷迭香酸的含量。结果 九节茶薄层鉴别特征斑点清晰, 分离度良好; 13 批九节茶药材水分平均为 9.4%, 总灰分平均为 5.2%, 酸不溶性灰分平均为 0.5%, 浸出物平均为 12.6%; 异嗪皮啉平均含量为 0.026%, 迷迭香酸平均含量为 0.030%。结论 本研究建立的薄层鉴别、检查及含量测定方法专属性强、准确度高、操作简便, 可用于九节茶药材质量标准研究。

关键词: 九节茶; 质量标准; 异嗪皮啉; 迷迭香酸; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0209-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.033

Quality standard of *Sarcandra glabra*

SU Rui-hui¹, YU Xiao-qing¹, JIANG Tao^{1*}, TANG Ying-zhan¹, PENG Hong-ying¹, LI Yi-fang², HE Rong-rong² (1. Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510130; 2. College of Pharmacy, Ji'nan University, Guangzhou 510632)

Abstract: Objective To improve the quality standard of *Sarcandra glabra*. **Methods** Thirteen batches of *Sarcandra glabra* from different areas were used as the research object. As a control substance, isofraxidin and standard herb were identified by thin layer chromatography (TLC). The moisture, total ash, acid-insoluble ash, and extract of *Sarcandra glabra* were determined according to the general principles in *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition). The content of isofraxidin and rosmarinic acid was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The spots of TLC were clear and well separated. The content of moisture, total ash, acid-insoluble ash and extract of samples was 9.4%, 5.2%, 0.5% and 12.6%, respectively. The content of isofraxidin and rosmarinic acid was 0.026% and 0.030%, respectively. **Conclusion** This method is highly specific, accurate and simple, which may be used in the quality control of *Sarcandra glabra*.

Key words: *Sarcandra glabra*; quality standard; isofraxidin; rosmarinic acid; TLC; HPLC

九节茶为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥地上部分, 作为清热消炎宁胶囊的主要原料, 具有清热解毒、凉血、消斑、祛风除湿、通络止痛的功效^[1]。九节茶主要化学成分有倍半萜、倍半萜二聚体、倍半萜三聚体^[2]、香豆素^[3-4]、黄酮类^[4]和酚酸类^[5], 具有抗炎^[6-9]、抗肿瘤^[10-12]、抗菌^[3-4, 13]、抗氧化^[14]等

多种活性。九节茶具有悠久的历史, 主要产于福建、广东、广西和江西等省区^[15]。

九节茶现行质量标准收载于《广东省中药材标准第一册》(2004 年版), 检测项目仅包括性状、显微鉴别、薄层鉴别、含量测定, 尚未对水分、浸出物等项目进行考察。薄层鉴别采用甲苯展开系统, 毒性较大, 而且氨熏显色后, 异嗪皮啉特征斑点显

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金项目 (No. U1801284); 广东省中药材产业化基地建设项目。

作者简介: 苏锐辉, 男, 主管药师, 主要从事药品质量标准研究工作, email: suruihui3@163.com *通信作者: 江涛, 男, 制药正高级工程师, 主要从事中药学研究工作, email: jiangtao1609@163.com

色不明显，不利于结果判断。含量测定项中供试品溶液的制备需要长时间静置，同时使用毒性较大的三氯甲烷作为溶剂。为了完善九节茶药材质量标准，更好地控制九节茶质量，本研究对九节茶质量检测方法进行了探索，同时对影响九节茶质量的因素进行研究，旨在为九节茶采收加工提供一定参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); XA105 十万分之一电子天平、ME204T 万分之一电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; 鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司);

超声波清洗器 (深圳市洁盟清洗设备有限公司); 薄层色谱数码成像系统 [瑞士 CAMAG (卡玛) 公司]。

1.2 试药

九节茶对照药材 (批号: 121756-202001)、异嗪皮啉对照品 (批号: 110837-202009, 含量以 99.8% 计)、迷迭香酸对照品 (批号: 111871-202007, 含量以 98.1% 计) (中国食品药品检定研究院); 乙腈为色谱纯; 甲醇、乙醇为分析纯。13 批九节茶药材经中国科学院华南植物园华南植物鉴定中心叶华谷研究员鉴定为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥地上部分, 具体信息见表 1。

表 1 九节茶药材信息

Tab 1 Information of *Sarcandra glabra* samples

编号	产地	收集时间	编号	产地	收集时间
S1	广东韶关市始兴县	2020 年 12 月	S8	广西玉林市玉州区	2022 年 10 月
S2	广东韶关市连南瑶族自治县	2021 年 11 月	S9	广东韶关市乳源瑶族自治县	2022 年 10 月
S3	安徽六安市霍山县	2021 年 11 月	S10	云南文山富宁县	2022 年 10 月
S4	广西河池市宜州区	2022 年 06 月	S11	广东韶关市乳源瑶族自治县	2022 年 11 月
S5	贵州黔东南榕江县	2022 年 06 月	S12	广东韶关市乳源瑶族自治县	2022 年 11 月
S6	广东韶关市始兴县	2022 年 08 月	S13	广西玉林市容县	2022 年 12 月
S7	湖北恩施巴东县	2022 年 10 月			

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

取九节茶粉末约 1 g, 加水 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液加乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 25 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取九节茶对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。另取异嗪皮啉对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。参照《中国药典》(2020 年版) 四部通则 0502, 吸取上述 3 种溶液各 4 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯-甲酸 (3:6:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。再喷以 2% 三氯化铁溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 见图 1。

2.2 检查

2.2.1 水分 照《中国药典》(2020 年版) 四部通则 0832 第二法测定, 13 批药材的水分分别为 6.5% ~ 12.6%, 平均为 9.4%, 结果见表 2。

2.2.2 总灰分及酸不溶性灰分 照《中国药典》(2020 年版) 四部通则 2302 测定, 13 批药材的总灰分为 4.1% ~ 7.1%, 平均为 5.2%; 酸不溶性灰分为 0.1% ~ 1.5%, 平均为 0.5%。结果见表 2。

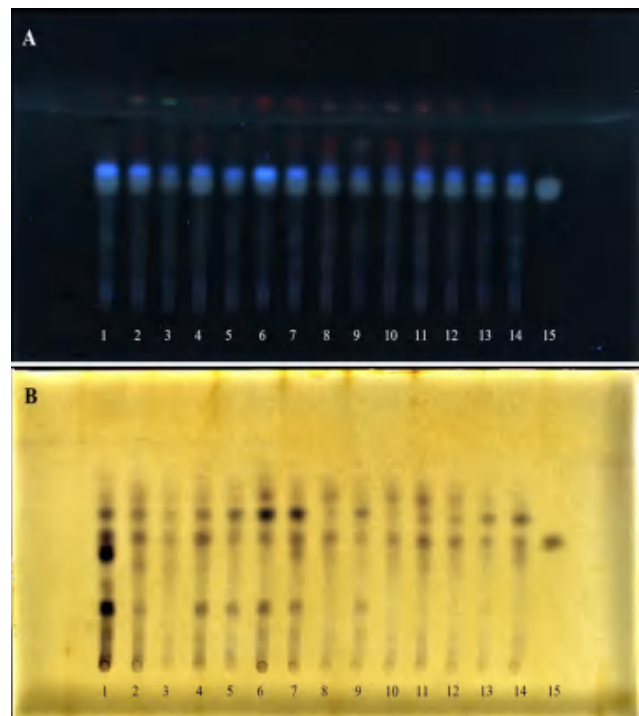


图 1 九节茶药材 365 nm 下 (A) 及日光下 (B) 薄层鉴别图

Fig 1 TLC chromatograms of *Sarcandra glabra* samples in 365 nm (A) and day light (B)

1 ~ 13. 九节茶药材 S1 ~ S13 (samples S1 ~ S13); 14. 九节茶对照药材 (reference medical material); 15. 异嗪皮啉对照品 (isofraxidin)

2.2.3 浸出物 照《中国药典》(2020 年版) 四部通

则 2201 项下的热浸法测定, 13 批药材的水溶性浸出物为 7.3% ~ 22.9%, 平均为 12.6%, 结果见表 2。

表 2 九节茶药材水分、灰分和浸出物测定

Tab 2 Moisture, total ash, acid-insoluble ash and extract of *Sarcandra glabra* samples

编号	水分 /%	总灰分 /%	酸不溶性灰分 /%	浸出物 /%
S1	9.0	6.0	1.5	22.9
S2	6.7	4.1	0.3	12.1
S3	6.9	4.9	0.4	9.2
S4	7.2	5.5	0.9	14.2
S5	6.5	4.3	0.2	12.0
S6	7.5	5.5	0.1	20.0
S7	9.7	7.1	0.8	7.3
S8	11.6	5.1	0.3	9.2
S9	9.2	6.9	0.9	10.6
S10	11.8	4.3	0.4	8.1
S11	12.5	4.7	0.1	12.2
S12	12.6	4.5	0.2	12.4
S13	10.6	4.5	0.2	14.0
平均含量	9.4	5.2	0.5	12.6

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈 -0.1% 磷酸溶液 (20 : 80) 为流动相; 检测波长为 342 nm, 进样量为 10 μL; 柱温为 25 °C。

2.3.2 对照品溶液的制备 取异嗪皮啶、迷迭香酸对照品各适量, 精密称定, 加 60% 甲醇制成每 1 mL 各含 10 μg 的溶液, 即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 取九节茶粉末约 0.4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 360 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定重量, 用 60% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 系统适用性试验 取对照品溶液和供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 异嗪皮啶及迷迭香酸与其相邻色谱峰分离度均大于 1.5, 理论板数均在 5000 以上, 色谱图见图 2。

2.3.5 线性关系考察 取异嗪皮啶、迷迭香酸对照品制成不同浓度混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 依法测定。以峰面积为纵坐标, 对照品含量为横坐标, 绘制标准曲线, 计算异嗪皮啶和迷迭香酸回归方程分别为 $Y_1 = 2958.90X_1 - 0.09$ ($r = 0.9999$), $Y_2 = 2509.72X_2 - 7.99$ ($r = 0.9999$), 线性范围分别为 0.0160 ~ 0.3203 μg、0.0157 ~ 1.5672 μg。

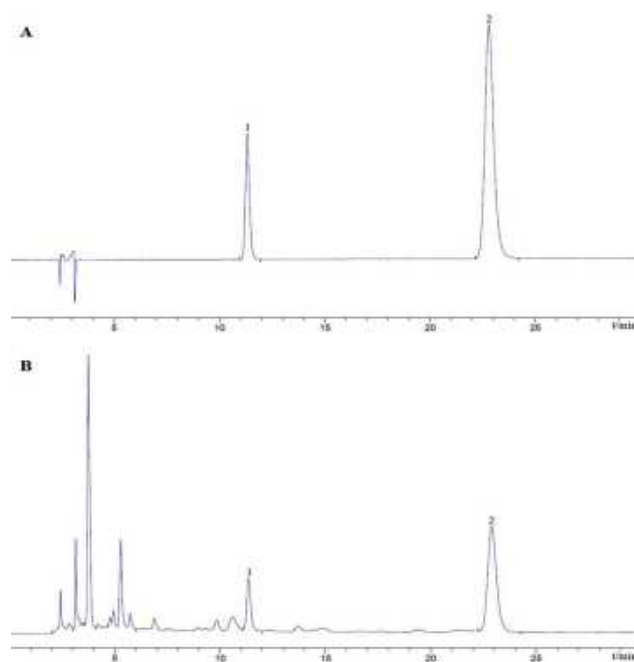


图 2 对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatograms of reference solution (A) and sample solution (B)

1. 异嗪皮啶 (isofraxidin); 2. 迷迭香酸 (rosmarinic acid)

2.3.6 方法学考察

① 检测限及定量限试验: 取异嗪皮啶、迷迭香酸对照品各适量, 加甲醇溶解, 逐级稀释, 进样测定。按信噪比 (S/N) 约为 3 : 1 计算, 异嗪皮啶检测限为 0.5 ng, 迷迭香酸检测限为 1.5 ng; 按 S/N 约为 10 : 1 计算, 异嗪皮啶定量限为 2.0 ng, 迷迭香酸定量限为 5.2 ng。

② 精密度试验: 取九节茶供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样, 测定 6 次, 计算异嗪皮啶和迷迭香酸峰面积 RSD 分别为 0.31%、0.58%, 说明仪器精密度良好。

③ 重复性试验: 取 S11 批九节茶按“2.3.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算异嗪皮啶平均含量为 0.025%, RSD 为 1.5%; 迷迭香酸平均含量为 0.028%, RSD 为 0.50%, 说明检测方法重复性良好。

④ 稳定性和耐用性试验: 取九节茶供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、16、24 h 进样测定, 计算异嗪皮啶和迷迭香酸峰面积 RSD 分别为 1.5%、0.28%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好; 取同一供试品溶液分别采用 3 根不同品牌的十八烷基硅烷键合硅胶填充色谱柱进样测定, 异嗪皮啶含量 RSD 为 2.3%, 迷迭香酸含量 RSD 为 2.6%, 说明检测方法耐用性良好。

⑤ 准确度试验: 取异嗪皮啶对照品、迷迭香

酸对照品适量，精密称定，加 60% 甲醇制成每 1 mL 各含 2 μg 的溶液。取已知异嗪皮啶和迷迭香酸含量的九节茶 6 份 (批号: S11)，各约 0.2 g，精密加入上述对照品溶液 25 mL，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算异嗪皮啶和迷迭香酸的加样回收率分别为 99.63% ~ 101.35%、96.91% ~ 98.73%，RSD 分别为 0.59%、0.75%，说明检测方法准确度良好。

2.3.7 样品含量考察 取九节茶样品适量，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，按干燥品计算样品中异嗪皮啶和迷迭香酸的含量，结果见表 3。

表 3 九节茶药材异嗪皮啶和迷迭香酸含量测定结果 (n = 3)

Tab 3 Contents of isofraxidin and rosmarinic acid in *Sarcandra glabra* samples (n = 3)

编号	异嗪皮啶 /%	迷迭香酸 /%	编号	异嗪皮啶 /%	迷迭香酸 /%
S1	0.035	0.030	S8	0.018	0.012
S2	0.017	0.002	S9	0.014	0.009
S3	0.006	0.010	S10	0.022	0.013
S4	0.044	0.024	S11	0.028	0.028
S5	0.013	0.019	S12	0.031	0.025
S6	0.028	0.070	S13	0.032	0.070
S7	0.046	0.081			

2.4 结果分析

2.4.1 不同生长年限对九节茶质量的影响 选取同一种植基地不同生长年限的九节茶药材进行对比，S9、S11、S12 生长年限分别为一年、两年、三年。结果显示不同生长年限九节茶药材水溶性浸出物含量接近，异嗪皮啶和迷迭香酸含量存在差异。一年生九节茶药材异嗪皮啶和迷迭香酸含量较低，两年生九节茶异嗪皮啶和迷迭香酸含量明显增加，三年生九节茶药材含量趋于稳定。

2.4.2 不同干燥条件对九节茶质量的影响 采用晒干及 30、50、70 °C 鼓风干燥 4 种不同干燥条件处理同一批两年生九节茶药材，干燥后九节茶水分为 9.97% ~ 11.56%。比较不同干燥条件下九节茶异嗪皮啶和迷迭香酸含量：70 °C 烘干时，迷迭香酸含量下降明显；晒干、30 °C 及 50 °C 烘干时，异嗪皮啶和迷迭香酸含量接近。综合考虑干燥时长、操作难度和九节茶特征成分含量，50 °C 鼓风干燥更适合九节茶大规模加工生产，结果见表 4。

3 讨论

3.1 考察指标的选择

九节茶现行质量标准以异嗪皮啶为含量测定指标成分，异嗪皮啶属于香豆素类化合物，是九节茶抗炎的主要活性成分^[6]。迷迭香酸为酚酸类化合物，具有抗炎^[8]、抗肿瘤^[10]等作用。异嗪皮

表 4 不同干燥条件对九节茶质量的影响

Tab 4 Contents of isofraxidin and rosmarinic acid in *Sarcandra glabra* with different drying methods

干燥条件	水分 /%	异嗪皮啶 /%	迷迭香酸 /%
晒干	9.97	0.028	0.028
30 °C 鼓风干燥	11.23	0.030	0.030
50 °C 鼓风干燥	10.51	0.030	0.030
70 °C 鼓风干燥	11.56	0.028	0.024

啶及迷迭香酸最大紫外吸收波长接近，在液相色谱上能实现同时测定。结合液相色谱分析，九节茶中异嗪皮啶和迷迭香酸含量均较高，因此选择异嗪皮啶和迷迭香酸作为含量测定指标。

3.2 薄层鉴别方法考察

本研究采用不同浓度甲醇溶液和乙醇溶液制备供试品溶液，均未能取得良好的鉴别效果。另外，本研究对展开剂 (二氯甲烷 - 乙酸乙酯 - 甲酸、正己烷 - 乙酸甲酯 - 甲酸、环己烷 - 乙酸乙酯 - 冰醋酸)、显色剂 (氨熏、硫酸乙醇溶液、三氯化铁溶液)、薄层板厂家 (青岛海洋化工有限公司、德国 Merck 公司)、点样量 (2、4、6 μL) 进行了考察，最终确定了本文的鉴别方法。

3.3 限量标准建议

13 批九节茶样品的水分为 6.5% ~ 12.6%，由于九节茶主要种植在南方林下，湿度较大，建议水分不得高于 15.0%；总灰分为 4.1% ~ 7.1%，建议总灰分不得高于 8.0%；酸不溶性灰分为 0.1% ~ 1.5%，考虑不同样品间酸不溶性灰分差异较大，建议酸不溶性灰分不得高于 2.0%；浸出物为 7.3% ~ 22.9%，建议浸出物不得少于 7%；异嗪皮啶含量为 0.006% ~ 0.046%，迷迭香酸含量为 0.002% ~ 0.081%，建议含量按干燥品计算，含异嗪皮啶不得少于 0.02%，含迷迭香酸不得少于 0.02%。

4 结论

本研究对九节茶药材质量检测方法进行了研究，改善了其薄层鉴别方法，同时以异嗪皮啶和迷迭香酸为对照品建立了含量测定方法。研究共收集 13 批九节茶药材进行分析，初步建立了九节茶药材质量标准，有效地评价了九节茶药材的质量。通过分析生长年限和干燥条件对九节茶药材质量的影响，为九节茶药材的采收加工提供依据。

参考文献

- [1] 广东省中药材标准编辑委员会. 广东省中药材标准. 第一册 [S]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 4-6.
- [2] 陈芳有, 陈志超, 罗永明. 草珊瑚化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (4): 872-879.
- [3] 许旭东, 胡晓茹, 袁经权, 等. 草珊瑚中香豆素化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (8): 900-902.

- [4] 袁珂, 朱建鑫, 斯金平, 等. 草珊瑚正丁醇部位化学成分及抑菌活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (15): 1843-1846.
- [5] 黎雄, 张玉峰, 杨柳, 等. 肿节风酚酸类化学成分研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23 (3): 295-298.
- [6] Liu L, Mu QL, Li WF, et al. Isofraxdin protects mice from LPS challenge by inhibiting pro-inflammatory cytokines and alleviating histopathological changes [J]. Immunobiology, 2015, 220 (3): 406-413.
- [7] 赵雪颖, 羊学荣, 宋静茹, 等. 草珊瑚乌药烷型倍半萜及其抗炎活性研究 [J]. 中药材, 2022, 45 (11): 2624-2631.
- [8] Wei YC, Chen JX, Cai GE, et al. Rosmarinic acid regulates microglial M1/M2 polarization via the PDK1/Akt/HIF pathway under conditions of neuroinflammation [J]. Inflammation, 2021, 44 (1): 129-147.
- [9] 刘俊宇, 曾元莲, 秦旭华, 等. 肿节风抗炎镇痛及对盆腔炎模型大鼠的影响 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38 (3): 135-140.
- [10] 李宏, 庄海林, 林俊锦, 等. 肿节风中迷迭香酸成分对乳腺癌细胞增殖、迁移能力及凋亡相关基因表达影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (16): 3335-3340.
- [11] 宋朝阳. 肿节风注射液联合阿帕替尼治疗晚期胃癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32 (6): 1114-1117.
- [12] Shen P, Wang HG, Li MM, et al. Isofraxidin inhibited proliferation and induced apoptosis via blockage of Akt pathway in human colorectal cancer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92 (8): 78-85.
- [13] 郭蒙蒙. 草珊瑚浸膏在体外对幽门螺旋杆菌的抑菌作用及其与抗生素的协同作用 [D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [14] 霍宇航, 张莹, 安苗, 等. 肿节风提取物不同部位对病毒性肺损伤小鼠氧化应激作用研究 [J]. 中药材, 2020, 43 (10): 2554-2558.
- [15] 陈超志, 李书渊. 九节茶的本草考证 [J]. 中药材, 2015, 38 (12): 2628-2631.
- (收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-02)

壮药火索藤汤剂指纹图谱的建立及含量测定研究

罗鑫^{1,2}, 陈彦洁^{1,2}, 蒋学青^{1,2}, 苏芳林¹, 王志萍^{1,2*}, 谢谭芳^{1,2*}, 陈豪^{1,2} (1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530200)

摘要: **目的** 建立壮药火索藤汤剂的 HPLC 指纹图谱及含量测定方法。**方法** 通过 HPLC 法建立 10 批壮药火索藤汤剂 HPLC 指纹图谱, 指认共有峰, 并进行聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA)、正交偏最小乘法-判别分析 (OPLS-DA) 等分析, 筛选出差异性物质并进行含量测定。**结果** 指纹图谱中共有峰 12 个、相似度均 ≥ 0.91 , 指认出 9 号峰为金丝桃苷、12 号峰为槲皮苷; CA、PCA 分析结果一致, 10 批药材样品共分为 3 组; OPLS-DA 分析筛选出 8 个差异物质, 金丝桃苷和槲皮苷的含量分别为 $0.15 \sim 0.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $1.71 \sim 6.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 样品中 S4、S5 批次指标成分含量最高。**结论** 本研究建立的 HPLC 指纹图谱和含量测定方法稳定性好, 可用来对该制剂质量控制和成分物质基础提供相关参考。

关键词: 火索藤; 指纹图谱; 化学计量学; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0213-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.034

Establishment of fingerprint and content determination of Zhuang medicine Huosuoteng decoction

LUO Xin^{1,2}, CHEN Yan-jie^{1,2}, JIANG Xue-qing^{1,2}, SU Fang-lin¹, WANG Zhi-ping^{1,2*}, XIE Tan-fang^{1,2*}, CHEN Hao^{1,2} (1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Key Laboratory of General Technology Research and Development of Traditional Chinese Medicine Preparations in Guangxi University, Nanning 530200)

基金项目: 2019—2021 年广西一流学科建设开放课题 (No. 2019XK116)。

作者简介: 罗鑫, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂的研究与开发, email: 791076202@qq.com *通信作者: 王志萍, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药、民族药新剂型、新制剂的研制与开发, email: 318007460@qq.com; 谢谭芳, 女, 副教授, 主要从事中药、民族药新剂型、新制剂的研制与开发, email: xietanf111@163.com

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints for Huosuo Teng decoction and determine the content. **Methods** HPLC fingerprints of 10 batches of Huosuo Teng decoction were obtained and the common peaks identified. CA, PCA and OPLS-DA were conducted to screen out the different substances and determine their content. **Results** There were 12 common peaks in the fingerprint, with similarity was greater than or equal to 0.91. Hyperoside was the 9 peak while quercitrin was the 12 peak. The CA and PCA analyses were consistent. The 10 batches of medicinal materials were divided into 3 groups. Eight substances were screened by OPLS-DA analysis. The content of hyperoside and quercitrin was $0.15 \sim 0.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and $1.71 \sim 6.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, and the content of index components in S4 and S5 batches was the highest. **Conclusion** The HPLC fingerprints and content determination method have good stability, which can be used to provide relevant reference for the quality control and component material basis of the preparation.

Key words: *Bauhinia aurea* Levl.; fingerprint; stoichiometry; content determination

火索藤 (*Bauhinia aurea* Levl.) 亦称为牛蹄藤^[1-3]、金毛羊蹄甲^[4]、金叶羊蹄甲^[5]、红绒毛羊蹄甲^[6]、合掌风、黄麻藤、红毛藤, 为豆科植物金毛羊蹄甲的根或茎, 分布于广西、四川、贵州、云南等地。作为壮族民间用药的一种, 其叶、藤和根均可供药用, 化学成分复杂多样, 主要有黄酮类、甾体类、芳香酸类等化合物, 具有补肾涩精、祛风湿、活血止痛等作用^[7-9]。由于火索藤药材基原地分布不均、药效成分和量效关系相关研究较少、《中国药典》历版无其收录等原因, 目前学界尚未对火索藤进行系统研究。

近年来国内外围绕中药汤剂进行了大量研究, 为火索藤标准汤剂及后续中药配方颗粒的标准制订提供了可借鉴的研究思路^[10-24], 其中通过 HPLC 指纹图谱结合化学计量分析是目前较为成熟且可行的研究路径。

本研究在前期研究基础上建立壮药火索藤汤剂样品的 HPLC 指纹图谱, 结合聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA)、正交偏最小乘法 - 判别分析 (OPLS-DA) 等对各批次汤剂进行评价, 并对金丝桃苷、槲皮苷进行含量测定, 明确不同批次汤剂之间的含量差异, 为其制剂的开发和研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030C 高效液相色谱仪 (岛津公司); SHB-B95 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); QUINTIX125D-1CN 型十万分之一电子天平 (德国赛多利斯); YTLG-10 冷冻干燥机 (上海叶拓科技有限公司); PL-FS40T 康士洁超声波清洗机 (东莞康士洁超声波科技有限公司)。

1.2 试药

磷酸 [色谱纯, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司]; 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲醇、乙醇 (分析纯, 成都市科隆化学品有限公司)。

金丝桃苷对照品 (纯度: 98.4%, 批号: MUST-22071210)、槲皮苷对照品 (纯度: 98.6%, 批号: MUST-22112917) (成都曼思特生物科技有限公司)。10 批火索藤药材分别从广西壮族自治区北流市、梧州市、南宁市等地采购所得, 药材经广西中医药大学韦松基教授鉴定为豆科植物火索藤 *Bauhinia aurea* Levl. 的藤茎和叶, 药材产地信息见表 1。

表 1 火索藤药材产地信息

Tab 1 Origin information of *Bauhinia aurea* Levl. medicinal materials

药材编号	采集时间	采集地点
S1	2019-09-01	广西岑溪市安平镇
S2	2020-10-26	广西玉林市容县
S3	2020-01-20	广西河池市东兰县弄门
S4	2019-07-26	广西来宾市兴宾区天堂乡
S5	2019-10-07	广西玉林市北流县下垌
S6	2022-11-06	广西北流市平政镇桐尾
S7	2022-11-07	广西梧州市龙圩区新地镇武廊
S8	2022-11-07	广西梧州市龙圩区新地镇芝鸦
S9	2022-11-16	广西南宁市隆安县南圩镇都乐屯
S10	2022-11-16	广西岑溪市安平镇

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 40 min, 2% ~ 6%A; 40 ~ 60 min, 6% ~ 9%A; 60 ~ 65 min, 9% ~ 10%A; 65 ~ 80 min, 10% ~ 12%A; 80 ~ 85 min, 12% ~ 12.5%A; 85 ~ 95 min, 12.5% ~ 13%A; 95 ~ 118 min, 13% ~ 16%A; 118 ~ 130 min, 16% ~ 14%A;

130 ~ 133 min, 14% ~ 8%A; 133 ~ 136 min, 8% ~ 2%A; 136 ~ 140 min, 2%A); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 320 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 混合对照品溶液的配制

取金丝桃苷、槲皮苷对照品各适量, 精密称定, 70% 甲醇定容, 再分别精密吸取各对照品溶液 2 mL 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加 70% 甲醇稀释定容制成质量浓度分别为 87.7、84.6 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

依照中药饮片标准汤剂工艺参数方法^[24], 取火索藤药材约 100 g (茎:叶 = 9:1), 精密称定, 加 8 倍量水浸泡 30 min, 第一次煎煮 30 min, 趁热 200 目筛网滤过, 残渣加 7 倍量水, 第二次煎 20 min, 趁热 200 目筛网滤过, 合并两次滤液, 浓缩至 500 mL, 冷冻干燥成粉末。取粉末约 0.2 g (过二号筛), 精密称定, 置于 25 mL 具塞锥形瓶, 加 70% 甲醇 10 mL, 超声提取 50 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 补足重量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 火索藤汤剂 HPLC 指纹图谱建立

2.4.1 精密度试验

取“2.3”项下供试品溶液 (S2), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别进行测定。以 12 号峰槲皮苷作为参照峰 (S) 计算各共有峰得相对保留时间 *RSD* 值 < 0.30%, 相对峰面积 *RSD* 值 < 2.7% (*n* = 6), 结果 *RSD* 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取同一批汤剂冻干粉 (S2) 6 份, 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 依照“2.1”项下色谱条件测定分析, 以 12 号峰槲皮苷作为参照峰 (S) 计算得各共有得峰相对保留时间 *RSD* 值 < 0.60%, 相对峰面积 *RSD* 值 < 2.9% (*n* = 6), 结果均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取“2.3”项下供试品溶液 (编号 S2), 室温分别放置 0、3、6、9、12、24 h, 依照“2.1”项下色谱条件测定分析, 以 12 号峰槲皮苷作为参照峰 (S) 计算得各共有峰相对保留时间 *RSD* 值 < 0.90%, 相对峰面积 *RSD* 值 < 2.9% (*n* = 6), 结果 *RSD* 均小于 3.0%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 稳定性良好。

2.4.4 火索藤汤剂指纹图谱的建立和共有峰标识

取 10 批火索藤药材, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件测定分析, 将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价

系统 (2012 版)”中, S1 为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗宽度为 0.1 min, 进行多点校正, 生成叠加共有峰图谱及对照图谱 R (见图 1), 确定了 12 个共有峰, 通过与混合对照品色谱图进行比对 (见图 2), 识别出 2 个成分, 其中 9 号峰为金丝桃苷、12 号峰为槲皮苷。

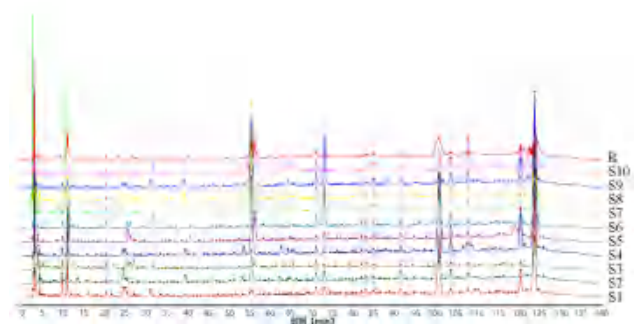


图 1 火索藤汤剂叠加共有峰图谱及对照图谱 R

Fig 1 Huosuo Teng decoction superposition common peak and control R

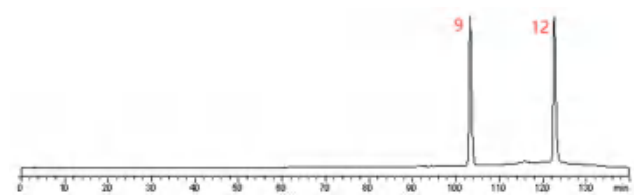


图 2 混合对照品的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of mixed reference

9. 金丝桃苷 (hyperoside); 12. 槲斗皮苷 (quercitrin)

2.5 相似度评价

在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”中对 10 批火索藤汤剂指纹图谱和对照指纹图谱进行相似度计算, 结果 S1 ~ S10 批汤剂样品的相似度结果均大于 0.91, 表明不同批次的火索藤药材质量较为稳定, 详见表 2。

以 12 号峰槲皮苷作为参照峰 (S) 计算各共有得峰相对保留时间 *RSD* 值和相对峰面积 *RSD* 值, 结果 12 个共有峰相对保留时间 *RSD* 值为 0.10% ~ 0.50%, 相对峰面积 *RSD* 值为 34% ~ 119% (*n* = 10), 这表明不同批次的火索藤汤剂化学成分种类均一, 但含量差异较大, 可能是由于不同产地不同生长环境所致。

2.6 聚类分析

以 12 个共有特征峰的峰面积为变量, 导入 SPSS 25.0 软件中, 采用组间联接 - 平方欧氏距离法进行聚类分析。结果如图 3 所示, 10 批壮药火索藤汤剂可聚为 3 类, S1、S2、S3、S6、S9 聚为一类, S4、S5 为第二类, S7、S8、S10 为第三类, 说明不同批次的火索藤汤剂化学成分质量存在一定差异。

2.7 主成分分析

表 2 10 批火索藤汤剂样品相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation of 10 batches of Huosuoteng decoction

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.968	0.919	0.988	0.988	0.898	0.921	0.980	0.824	0.843	0.976
S2	0.968	1.000	0.897	0.962	0.969	0.939	0.891	0.962	0.848	0.849	0.967
S3	0.919	0.897	1.000	0.919	0.919	0.876	0.986	0.953	0.904	0.918	0.960
S4	0.988	0.962	0.919	1.000	0.998	0.889	0.933	0.986	0.837	0.892	0.985
S5	0.988	0.969	0.919	0.998	1.000	0.909	0.933	0.982	0.854	0.880	0.987
S6	0.898	0.939	0.876	0.889	0.909	1.000	0.884	0.911	0.951	0.813	0.937
S7	0.921	0.891	0.986	0.933	0.933	0.884	1.000	0.960	0.925	0.938	0.970
S8	0.980	0.962	0.953	0.986	0.982	0.911	0.960	1.000	0.881	0.930	0.994
S9	0.824	0.848	0.904	0.837	0.854	0.951	0.925	0.881	1.000	0.870	0.913
S10	0.843	0.849	0.918	0.892	0.880	0.813	0.938	0.930	0.870	1.000	0.924
R	0.976	0.967	0.960	0.985	0.987	0.937	0.970	0.994	0.913	0.924	1.000

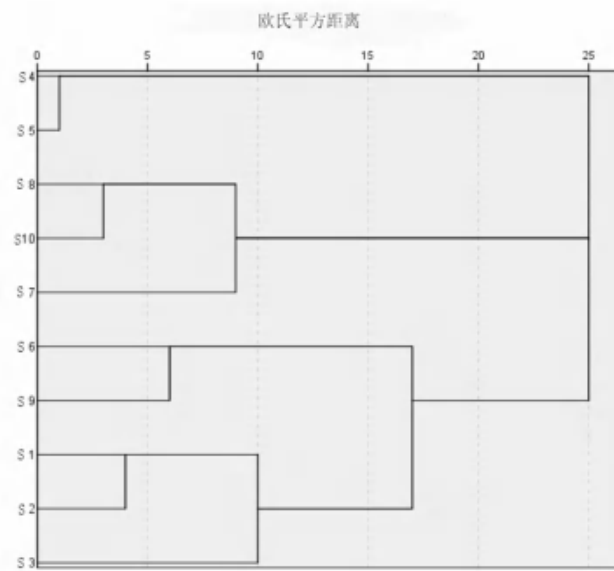


图 3 不同批次壮药火索藤汤剂聚类分析
Fig 3 Cluster analysis of different batches of Huosuoteng decoction

以 12 个共有特征峰的峰面积为变量，采用 SPSS 25.0 软件进行主成分分析，分析结果见表 3，共提取出 4 个主成分，特征值分别为 4.26、3.34、1.45、1.18，累计方差贡献率为 85.27%，表明这 4 个主成分含有汤剂样品指纹图谱的主要信息，可反映不同产地不同批次火索藤汤剂样品的整体质量。

表 3 主成分总方差解释

Tab 3 Principal component total variance interpretation

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差 /%	累计方差 /%	总计	方差 /%	累计方差 /%
1	4.26	35.49	35.49	4.26	35.49	35.49
2	3.34	27.85	63.34	3.34	27.85	63.34
3	1.45	12.08	75.42	1.45	12.08	75.42
4	1.18	9.85	85.27	1.18	9.85	85.27

再将标准化处理后的 12 个共有特征峰的峰面积作为变量，导入 SIMAC 14.1 软件中，进行主成分分析，生成主成分得分图见图 4，可知，

样品共聚为 3 类，S1、S2、S3、S6、S9 聚为一类，S4、S5 为第二类，S7、S8、S10 为第三类，其结果同聚类分析一致。

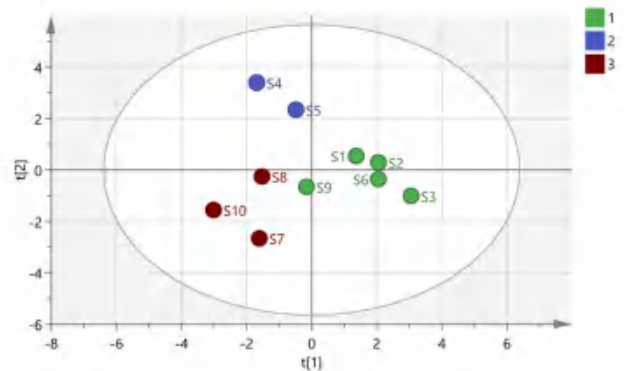


图 4 10 批火索藤汤剂样品主成分分析得分图
Fig 4 PCA score of 10 batches of Huosuoteng decoction

2.8 OPLS-DA

以 12 个共有峰的峰面积为变量，采用 SIMAC 14.1 软件，进行 OPLS-DA 分析，得到分散点图（见图 5）。并对模型进行 200 次置换检验。结果， R^2X 、 R^2Y 及 Q^2 分别为 0.62、0.80、0.67，均大于 0.6，这表明建立的模型预测能力较好。置换检验显示模型无过拟合现象，说明模型结果真实可靠。此外，由图 5 可知，10 批样品被分为 3 类，与聚类分析、主成分分析结果一致。

其次，为明确火索藤汤剂样品质量具有显著影响的成分，进一步通过 SIMAC 14.1 软件，在 OPLS-DA 分析基础上进行变量投影重要度（VIP）分析，以 $VIP > 0.95$ 为标准进行筛选，共筛选出 8 个成分，分别为峰 6、峰 2、峰 11、峰 8、峰 10、峰 4、峰 12（槲皮苷）、峰 9（金丝桃苷），见图 6。表明这 8 个成分可能是不同批次火索藤汤剂样品质量差异的主要因素。

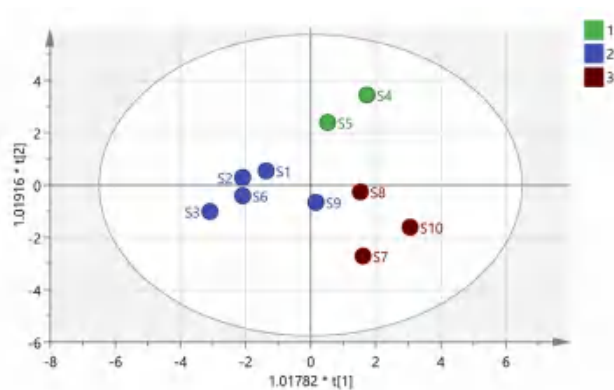


图 5 火索藤汤剂样品 OPLS-DA 得分图
Fig 5 OPLS-DA score of Huosuoteng decoction

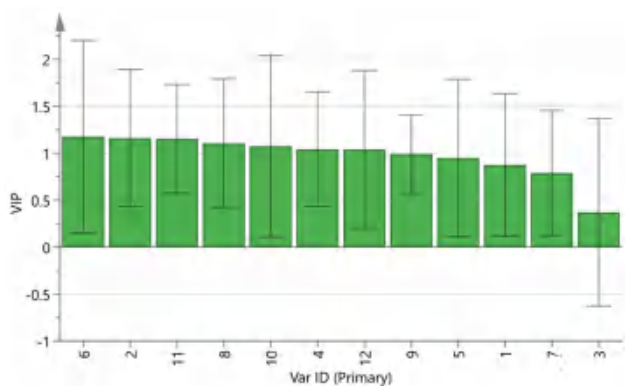


图 6 火索藤汤剂样品 OPLS-DA-VIP 图
Fig 6 OPLS-DA-VIP diagram of Huosuoteng decoction

2.9 壮药火索藤汤剂中 2 个差异成分的含量测定

2.9.1 混合对照品溶液的配制 分别取金丝桃苷、槲皮苷对照品适量，70% 甲醇定容，制成对照品溶液，精密吸取上述溶液各 2 mL 置于 10 mL 棕色量瓶中，加 70% 甲醇定容制成为 43.89、43.11 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.9.2 线性关系考察 取金丝桃苷、槲皮苷对照品适量，70% 甲醇定容，制成每 1 mL 含金丝桃苷 175.36 μg 、槲皮苷 169.13 μg 的混合对照品母液，再逐级稀释，依照“2.1”项下色谱条件进样测定，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，结果金丝桃苷和槲皮苷线性回归方程分别为 $Y = 1.48 \times 10^4 X - 1.00 \times 10^4$, $R^2 = 0.9999$ 及 $Y = 1.44 \times 10^4 X - 8.23 \times 10^3$, $R^2 = 0.9999$ ，说明金丝桃苷质量浓度在 0.7015 ~ 175.366 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，槲皮苷质量浓度在 0.6766 ~ 169.1380 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.9.3 精密度考察 取“2.9.1”项下混合对照品溶液，依照“2.1”项下色谱条件连续检测 6 次，记录各成分峰面积。结果金丝桃苷和槲皮苷峰面积的 RSD 值均为 0.1%，这表明仪器的精密度良好。

2.9.4 稳定性考察 取“2.3”项下供试品溶液

(S2)，室温放置 0、3、6、9、12、24 h，依照“2.1”项下色谱条件进行分析，记录各成分峰面积。结果金丝桃苷和槲皮苷峰面积的 RSD 值分别为 2.7%、2.2%，均小于 $< 3\%$ ，这表明 24 h 内火索藤汤剂样品稳定性良好。

2.9.5 重复性考察 精密称定火索藤汤剂样品 6 份 (S2)，按照“2.3”项下制备方法，平行制备 6 份，依照“2.1”项下色谱条件进行分析，记录各成分峰面积，依照回归方程计算各成分含量，结果金丝桃苷和槲皮苷的平均含量分别为 0.50、1.79 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ， RSD 值分别为 2.9%、2.6%，表明该方法重复性较好。

2.9.6 加样回收试验 取已知含量火索藤汤剂冻干粉约 0.2 g，按照 1:1 加入金丝桃苷和槲皮苷峰对照品，按照“2.3”项下制备方法，平行制备供试品溶液 6 份，依照“2.1”项下色谱条件进行分析，记录各成分峰面积，计算各成分加样回收率，结果显示金丝桃苷的加样回收率均值为 91.91%， RSD 值为 2.4%；槲皮苷加样回收率均值为 96.72%， RSD 值为 1.8%，两者结果均符合《中国药典》2020 年版四部通则 9101 的具体规定，证明该方法准确度良好。

2.9.7 不同批次火索藤汤剂中金丝桃苷与槲皮苷的含量测定 取 10 批不同产地批次的火索藤药材，按照“2.3”项下方法，制备成各供试品溶液 ($n = 2$)，依照“2.1”项下色谱条件分析，采用外标法计算壮药火索藤汤剂中金丝桃苷和槲皮苷的含量，取平均值，结果见表 4。10 批火索藤汤剂中金丝桃苷含量范围为 0.1520 ~ 0.6669 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，槲皮苷含量范围为 1.7108 ~ 6.5276 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 4 10 批火索藤汤剂中含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 4 Content determination of 10 batches of Huosuoteng decoction ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	金丝桃苷含量	槲皮苷含量
S1	0.1613	4.8234
S2	0.4027	1.7108
S3	0.1520	1.7563
S4	0.6669	6.5276
S5	0.6178	4.9263
S6	0.4397	2.8245
S7	0.2589	4.1974
S8	0.3987	4.9182
S9	0.4516	3.5024
S10	0.5561	3.1015
平均值	0.4106	3.8288

3 讨论

3.1 供试品制备方式的考察

通过比对纯汤剂样品和粉末进样后发现，汤

剂样品在经过处理后所得图谱信息更为完整、稳定。故本试验考察了不同提取方式(超声、回流)确定以超声为提取方式,同时对不同提取溶剂(水、甲醇、乙醇)、超声时间(20、30、40、50、60 min)进行考察,确定了以 70% 甲醇 10 mL 超声提取 50 min (功率 250 W, 频率 40 kHz) 的样品制备方式。

3.2 指纹图谱的建立及成分分析

通过对不同批次火索藤汤剂进行分析,确定了 12 个共有峰,与对照图谱比对其相似度均大于 0.91,表明各批次火索藤药材所制汤剂质量一致性较好,其后的聚类分析、主成分分析等结果显示这 10 个批次可分为 3 类,最后基于 OPLS-DA 分析的 VIP 指认结果发现了对这 10 批次药材制的样品间差异影响最大的 8 个成分,并根据前期研究基础,选取活性成分金丝桃苷与槲皮苷进行含量测定,以成分含量判断 S4、S5 批次两地区火索藤药材所制汤剂中金丝桃苷与槲皮苷含量均优于其他地区。

综上,本研究成功建立了壮药火索藤汤剂的 HPLC 指纹图谱,结合化学计量学分析筛选出 8 个主要差异性成分,并对其中 2 个成分的含量进行研究,用以评价样品质量,可为该药材汤剂质量控制和研究提供一定的参考。

参考文献

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第三十九卷. 北京: 科学出版社, 1988.
- 刘笑, 李林杰, 王昱涵, 等. 基于多种分析模式建立壮药材火索藤的 HPLC 指纹图谱 [J]. 湖北农业科学, 2022, 61 (7): 103-107.
- 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第四册) [M]. 第十一卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 2982.
- 中国科学院广西植物研究所. 广西植物志种子植物 [M]. 第二卷. 南宁: 广西科学技术出版社, 2005: 483.
- 中国树木志编辑委员会. 中国树木志 (第二册) [M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 1244.
- 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 (第二册) [M]. 北京: 科学出版社, 1972: 2.
- Kuo YH, Chu PH, Chang CI. Chemical studies of the bark of *Bauhinia purpurea* [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46 (10), 1630-1631.
- 尚小雅. 红绒毛羊蹄甲、五脉绿绒蒿和药用真菌桑黄化学成分研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- 尚小雅, 李帅, 王素娟, 等. 红绒毛羊蹄甲中的黄酮类成分 [J]. 中草药, 2009, 40 (2): 196-199.
- 黄丽坚, 杨剑. 中药汤剂的发展与剂型改革研究进展 [J]. 中国药房, 1998, 9 (1): 44-45.
- 尚小雅, 李帅, 王映红, 等. 红绒毛羊蹄甲中的二氢黄酮醇苷和黄烷醇类成分 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (9): 815-818.
- 王学圆, 代云桃, 靳如娜, 等. 荷叶标准汤剂质量评价方法的建立 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (6): 1363-1367.
- Dai YT, Li Q, Tong JY, et al. Quality marker identification based on standard decoction of differently processed materials of *Ephedrae Herba* [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 237: 47-54.
- Zhang H, Wang JN, Chen Y, et al. Establishing the chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine standard decoction based on quality by design approach: a case study of Licorice [J]. J Sep Sci, 2019, 42 (6): 1144-1154.
- 陈卜涛, 张特利, 高晗, 等. 马齿苋标准汤剂特征图谱研究 [J]. 海峡药学, 2022, 34 (7): 26-30.
- 宋艺君, 王荣靖, 郭涛, 等. 酒黄精饮片标准汤剂的制备与质量评价研究 [J]. 中国药师, 2022, 25 (10): 1792-1798.
- 姬莎莎, 刘红波, 朱华旭, 等. 北柴胡标准汤剂的制备与质量评价研究 [J]. 现代中医药, 2023, 43 (2): 102-108.
- 宛鑫, 李得堂, 张丽娟, 等. 健脾益肺鼻炎方标准汤剂特征图谱的建立及 4 种指标成分的含量测定 [J]. 中国药房, 2022, 33 (16): 1980-1985.
- 王晓蕾, 张慧慧, 邵长森, 等. 基于标准汤剂参比的温经汤颗粒提取、浓缩、干燥过程成分传递的考察 [J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46 (2): 260-266.
- 何根祥, 丘娜, 姚曼丽. 外感发热药浴方标准汤剂制备工艺优化和评价 [J]. 按摩与康复医学, 2021, 12 (24): 60-62.
- 杜义龙, 李赛, 李艳荣, 等. 半枝莲标准汤剂的指纹图谱建立与抗氧化活性成分的化学模式识别 [J]. 中国药房, 2022, 33 (4): 425-432.
- 李俊, 屈晓萍, 李兆奎. 婴儿健脾散的高效液相色谱双波长指纹图谱研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33 (9): 1261-1264.
- 刘冠琼, 胡小祥, 胡雯婷, 等. 藿香清胃片高效液相色谱指纹图谱的建立和化学模式识别分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33 (11): 1558-1564.
- 中国中医科学院中药研究所. 中药饮片标准汤剂 [M]. 第一卷. 北京: 科学出版社, 2018: 10.

(收稿日期: 2023-06-02; 修回日期: 2023-07-10)

抗菌药物预防人工流产后感染效果的系统性评价

冉江玲¹, 张家兴^{2*}, 赵华叶², 张瑞², 胡麟方², 王家雪², 蓝俊杰², 孙水梅², 谭松松³, 曹金永⁴, 李小让¹ (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550002; 2. 贵州省人民医院药剂科, 贵阳 550002; 3. 贵州省人民医院医保处, 贵阳 550002; 4. 贵州省人民医院内镜科, 贵阳 550002)

摘要: **目的** 系统评价抗菌药物预防人工流产后感染的效果。**方法** 通过计算机检索 PubMed、Cochrane Library、Embase、CNKI、万方、维普数据库, 纳入关于评价抗菌药物预防人工流产后感染的随机对照试验, 检索时限均为建库至 2023 年 8 月 28 日, 由两名研究者根据纳入与排除标准独立进行文献筛选、数据提取和质量评价, 采用 Rev Man 5.4 软件进行 meta 分析。**结果** 共纳入 12 项研究, 合计 5364 例患者。meta 分析结果显示, 与使用安慰剂相比, 无高危因素的人工流产手术患者术前使用抗菌药物术后子宫内膜炎的发生率相当 ($RR = 0.35$, $95\%CI: 0.11 \sim 1.08$, $P = 0.07$)、输卵管炎发生率相当 ($RR = 0.79$, $95\%CI: 0.08 \sim 7.49$, $P = 0.83$); 阴道菌群异常的人工流产手术患者术前使用抗菌药物术后盆腔感染风险降低 ($RR = 0.40$, $95\%CI: 0.23 \sim 0.67$, $P = 0.0006$); 患有盆腔炎病史的人工流产手术患者术前使用抗菌药物术后盆腔感染风险降低 ($RR = 0.61$, $95\%CI: 0.41 \sim 0.89$, $P = 0.01$); 没有盆腔炎病史的人工流产手术患者术前使用抗菌药物术后盆腔感染风险相当 ($RR = 0.75$, $95\%CI: 0.55 \sim 1.02$, $P = 0.07$)、膀胱炎发生率相当 ($RR = 0.50$, $95\%CI: 0.09 \sim 2.70$, $P = 0.42$); 衣原体阴性或阳性的人工流产手术患者术前使用抗菌药物术后盆腔感染风险相当 ($RR = 0.59$, $95\%CI: 0.28 \sim 1.23$, $P = 0.16$; $RR = 0.36$, $95\%CI: 0.06 \sim 2.24$, $P = 0.27$)。**结论** 当前证据显示, 术前给予抗菌药物仅对阴道菌群异常和患有盆腔炎病史的人工流产手术患者是有获益的, 但该结论还有待高质量的原始研究进一步验证。

关键词: 人工流产术; 抗菌药物; 预防; 感染; 系统评价; meta 分析

中图分类号: R169.42 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0219-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.035

Evaluation of the effectiveness of antimicrobials in infection prevention after induced abortion surgery: a systematic review and meta-analysis

RAN Jiang-ling¹, ZHANG Jia-xing^{2*}, ZHAO Hua-ye², ZHANG Rui², HU Lin-fang², WANG Jia-xue², LAN Jun-jie², SUN Shui-mei², TAN Song-song³, CAO Jin-yong⁴, LI Xiao-rang¹ (1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002; 2. Department of Pharmacy, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002; 3. Department of Medical Insurance, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002; 4. Department of Endoscopy, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.72064004); 贵州省中医药民族医药科学技术项目 (No.QZYY-2023-042); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (No.gzwkj2022-224, No. gzwkj2021-553)。

作者简介: 冉江玲, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药及民族药质量控制和新药研究, email: 1968932864@qq.com *通信作者: 张家兴, 男, 主任药师, 主要从事循证药学、临床药学、药物经济学研究, email: zjx19870619@126.com

Abstract: Objective To systematically evaluate the effectiveness of antimicrobials infection prevention after induced abortion surgery. **Methods** PubMed, Cochrane Library, Embase, CNKI, Wanfang and VIP were searched for randomized controlled trials on the effectiveness of antimicrobials in infection prevention after induced abortion surgery. Data from the establishment of the database to August 28, 2023 were searched. Two researchers independently screened the literature, collected data, and assessed their quality according to the established inclusion and exclusion criteria. Rev Man 5.4 was used for the meta-analysis. **Results** Totally 12 studies (involving 5364 patients) were included. The meta-analysis showed that compared with the placebo, abortion patients without high-risk factors, antimicrobials did not reduce the risk of postoperative endometritis ($RR = 0.35$, $95\%CI$: $0.11 \sim 1.08$, $P = 0.07$) and salpingitis infection ($RR = 0.79$, $95\%CI$: $0.08 \sim 7.49$, $P = 0.83$); For abortion patients with abnormal vaginal flora, reduced the risk of postoperative pelvic infection ($RR = 0.40$, $95\%CI$: $0.23 \sim 0.67$, $P = 0.0006$); For abortion patients with a history of pelvic inflammation, antimicrobials reduced the risk of postoperative pelvic infection ($RR = 0.61$, $95\%CI$: $0.41 \sim 0.89$, $P = 0.01$); For abortion patients without a history of pelvic inflammation antimicrobials did not reduce the risk of postoperative pelvic infection ($RR = 0.75$, $95\%CI$: $0.55 \sim 1.02$, $P = 0.07$) and cystitis infection ($RR = 0.50$, $95\%CI$: $0.09 \sim 2.70$, $P = 0.42$); For abortion patients with chlamydia-negative/-positive, antimicrobials did not reduce the risk of postoperative pelvic infection ($RR = 0.59$, $95\%CI$: $0.28 \sim 1.23$, $P = 0.16$; $RR = 0.36$, $95\%CI$: $0.06 \sim 2.24$, $P = 0.27$). **Conclusion** Current evidence suggests that antibiotic prophylaxis can be beneficial for abortion patients with abnormal vaginal flora or with a history of pelvic inflammation, but this conclusion should be verified with high quality primary studies. **Key words:** induced abortion; antimicrobial; prevention; infection; systematic review; meta-analysis

人工流产术简称人流术，是妇女作为避孕失败补救措施的重要手段之一^[1]。人工流产术是我国早期妊娠终止的主要手段，我国每年人工流产术人次已经超过一千万，并呈现一定上升趋势^[2]，25岁以下妇女的比例达47.5%，其中未育妇女比例高达49.7%，首次妊娠人工流产的比例高达35.8%，重复流产率高达55.9%，且间隔时间短^[3]。因此，我国人工流产术具有总数高、年轻化、未婚未育比例高、重复流产率高的特点^[4]。人工流产术作为一种侵袭性操作，容易对阴道造成损伤或导致外界病原体感染，破坏或减弱女性生殖系统生理性屏障的保护作用，术后子宫出血也为病原菌的侵袭、繁殖提供了机会，术后感染可能进一步导致盆腔炎症、不孕、异位妊娠等不良后果^[5-6]，严重影响女性的生殖健康和身心健康。2019年发表的《人工流产手术预防性抗菌药物应用的专家共识》^[3]探讨了关于人工流产术的患者是否应该使用抗菌药物以及如何应用的问题，该共识基于一项系统评价^[7]和一项随机对照试验^[8]推荐拟行负压吸引术及钳刮术的人工流产患者，均应使用抗菌药物进行预防。由于各种随机对照试验（randomized controlled trial, RCT）

对抗菌药物预防人工流产术后感染的效果评价不一，而近年来有一些关于该问题的RCT发表，故本研究采用系统评价的方法对关于抗菌药物预防人工流产术后感染的证据进行梳理，旨在为该人群的抗菌药物合理使用提供更新的循证医学评价证据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究纳入国内外公开发表的抗菌药物预防人工流产术后感染的RCT。纳入拟进行人工流产术的患者，手术类型不限，患者年龄、孕周大小不限。试验组术前使用抗菌药物进行预防，对照组术前采用安慰剂或不予以抗菌药物进行预防。观察术后子宫内膜炎、术后盆腔感染、术后膀胱炎以及术后输卵管炎、不良反应发生率、再次入院率。排除会议摘要、重复发表的文献、无法获取全文的文献、无法提取数据的文献。

1.2 文献检索策略

以“人工流产”“随机对照试验”“随机对照”“随机”“RCT”“RCTs”“感染”作为中文检索词，以“induced abortion”“randomized controlled trial”作为英文检索词，采用主题词和自由词相

结合的方式，通过计算机全面检索 PubMed、Cochrane Library、EMbase、CNKI、万方、维普数据库，检索时间均为建库至 2023 年 8 月 28 日。检索策略以 PubMed 为例。如表 1 所示。

表 1 文献检索策略

Tab 1 Literature retrieval strategy

数据库	步骤	检索策略	结果
PubMed	#1	“abortion, induced” [MeSH Terms]	42 890 篇
	#2	“induced abortion” [All Fields]	33 512 篇
	#3	#1 OR #2	45 734 篇
	#4	“Randomized Controlled Trial” [Publication Type]	600 181 篇
	#5	“Randomized Controlled Trials as Topic” [MeSH Terms]	167 451 篇
	#6	“Randomized Controlled Trial” [All Fields]	644 173 篇
	#7	#4 OR #5 OR #6	795 168 篇
	#8	#3 AND #7	1145 篇

1.3 文献筛选与资料提取

由两名研究者独立根据纳入与排除标准进行文献筛选和资料提取，如遇分歧，经讨论解决，必要时由第三位研究者决定。对纳入的研究使用 Excel 2010 提取资料，提取内容包括研究人群、年龄、孕周、手术方式、国家、干预措施及对照措施、样本量、随访时间以及所报告的所有结局指标等信息。

1.4 文献质量评价

由两名研究者独立采用 Cochrane Library 推荐的 RCT 偏倚风险评价工具^[9]对纳入研究的方法学质量进行评价。该评价工具包括 7 项条目：随机序列的产生方法、随机方案的分配隐藏方法、研究对象及研究者的盲法实施情况、结局测评者的盲法实施情况、结局随访的完整性、选择性报告研究结果的可能性、其他方面的偏倚来源，评价结果用“高偏倚风险”“低偏倚风险”以及“偏倚风险不清楚”表示。

1.5 统计分析

若有两个或两个以上的研究报告同一研究指标，采用 Cochrane 协作网提供 Rev Man 5.4 软件进行 meta 分析。分类变量使用相对危险度 (risk ratio, RR)，计量资料采用均数差 (mean difference, MD) 或标准化均数差 (standard mean difference, SMD) 为效应分析统计量，同时计算其 95% 置信区间 (confidence interval, CI)。各纳入研究结果间的异质性采用 χ^2 检验进行分析。若

各研究结果间异质性没有统计学意义 ($P > 0.1$, $I^2 < 50\%$)，采用固定效应模型进行 meta 分析。若各研究结果间异质性有统计学意义 ($P \leq 0.1$, $I^2 \geq 50\%$)，首先分析其异质性来源，并采用亚组分析进行处理；若各研究结果间的异质性并非临床异质性，则采用随机效应模型进行 meta 分析；若异质性过大则进行描述性分析。

2 结果

2.1 文献检索结果

文献筛选流程见图 1。共检获 3705 篇相关文献，其中中文文献 569 篇，英文文献 3136 篇。经逐层筛选后，最终纳入 12 项 RCT，均为英文研究。

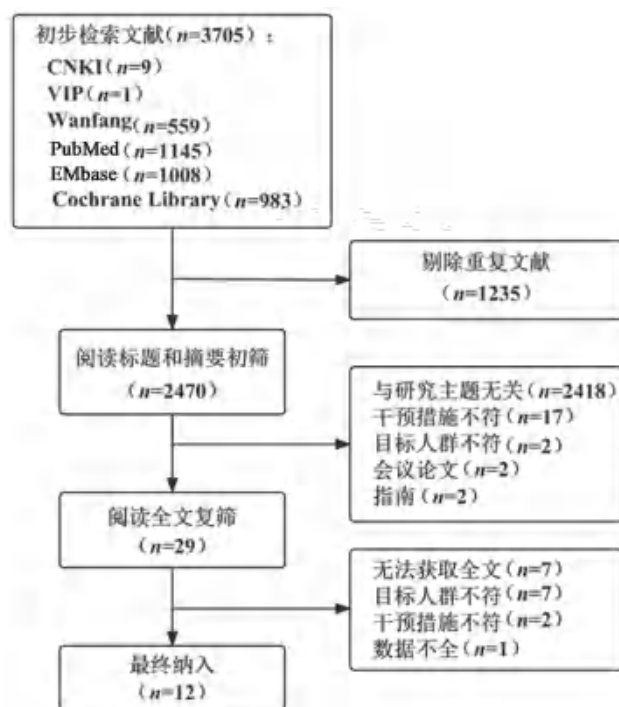


图 1 文献筛选流程图

Fig 1 Flow chart of literature screening

2.2 纳入研究的基本特征

如表 2 所示，纳入的 12 项^[10-21]RCT，均为英文文献，研究发表年份在 1981—2001 年。共纳入 5364 例拟接受人工流产术的患者，患者年龄在 14 ~ 45 岁，孕周 ≤ 15 周，其中 2688 例术前采用抗菌药物 (甲硝唑、红霉素、青霉素、克林霉素、四环素、氨苄西林 / 舒巴坦、头孢曲松、氧氟沙星、匹氨西林) 进行预防，2676 例术前采用安慰剂或不予以抗菌药物预防。所纳入的文献均评价了术后感染发生率，有 4 篇研究报道了不良反应的发生率。

表 2 纳入研究的基本特征
Tab 2 Basic characteristics of the included studies

纳入研究	人工流产 手术患者	年龄 / 岁	孕周 / 周	手术 方式	例数 (T/C)	随访时间	药物用法用量		结局指标
							T	C	
Krohn ^[18]	无高危因素	15 ~ 44	≤ 12	真空抽 吸术	145/140	术后 2 ~ 7 d	氨苄西林 / 舒巴坦, 术前静脉注射 0.5 g + 1 g	安慰剂, 术前静脉注 射 0.5 g + 1 g	术后子宫内膜炎发 生率; 术后输卵 管炎发生率
Crowley ^[20]	阴道菌群异常	14 ~ 45	≤ 12	真空抽 吸术	142/131	NR	甲硝唑栓剂, 手术时 直肠给药 2 g	安慰剂, 手术时直肠 给药 2 g	术后盆腔感染发生 率; 再次入院率
Larsson ^[17]	阴道菌群异常	≥ 16	≤ 12	真空抽 吸术	84/90	术后 1 个月	甲硝唑片剂, 术前 10 日口服 500 mg	安慰剂, 术前 10 日 口服 500 mg	术后盆腔感染发生 率
Larsson ^[10]	阴道菌群异常	≥ 18	≤ 11	真空抽 吸术	181/181	术后 4 ~ 6 周	克林霉素乳膏, 术 前 5 mL 阴道涂抹 4 ~ 7 次	安慰剂, 术前 5 mL 阴道涂抹 4 ~ 7 次	术后盆腔感染发生 率
Levallois ^[14]	衣原体阴性或阳 性	≤ 24	8 ~ 15	钳刮术	536/540	术后 5 周	盐酸多西环素胶囊, 术前 1 h 口服 100 mg; 术后 0.5 h 服 用 200 mg	安慰剂, 术前 1 h 口 服 100 mg; 术后 0.5 h 服用 200 mg	术后盆腔感染发生 率; 不良反应发 生率
Heisterberg ^[12]	衣原体阴性或阳 性	NR	NR	真空抽 吸术	269/260	术后 2 周	四环素胶囊, 术前 2 日口服 300 mg, 持 续 7 d	安慰剂, 术前 2 日口 服 300 mg, 持续 7 d	术后盆腔感染发生 率
Sørensen ^[19]	衣原体阴性或阳 性以及有或没 有盆腔炎病史	≥ 20	≤ 12	钳刮术	189/189	术后 1 周	红霉素软膏, 术前 1 晚 500 mg bid, 连 续 7 d	安慰剂, 术前 1 晚 500 mg bid, 连续 7 d	术后盆腔感染发生 率
Henriques ^[11]	没有盆腔炎病史	≥ 18	≤ 12	真空抽 吸术	275/274	术后 6 ~ 14 d	头孢曲松, 术前静脉 滴注 1 g	不予以抗菌药物	术后盆腔感染发生 率; 术后膀胱炎 发生率; 不良反 应发生率
Nielsen ^[16]	有或没有盆腔炎 病史	≥ 18	NR	真空抽 吸术	525/548	术后 12 d	氧氟沙星片剂, 术前 0.5 ~ 3 h 口服 200 mg	安慰剂, 术前 0.5 ~ 3 h 口服 200 mg	术后盆腔感染发生 率; 不良反应发 生率
Sonne-Holm ^[21]	有或没有盆腔炎 病史	14 ~ 45	6 ~ 12	钳刮术	254/238	术后 4 周	青霉素 G + 匹氨西 林, 术前 0.5 h、术 后 3 h 肌内注射青 霉素 G 200 万 IU; 术后口服匹氨西林 350 mg, 连续 4 d	安慰剂, 术前 0.5 h、 术后 3 h 注射	术后盆腔感染发生 率; 不良反应发 生率
Heisterberg ^[15]	有盆腔炎病史	≥ 26	6 ~ 12	钳刮术	24/31	术后 2 周	四环素胶囊, 手术 当日早晨口服 300 mg; 连续 14 d	安慰剂, 手术当日 早晨口服 300 mg; 连续 14 d	术后盆腔感染发生 率
Heisterberg ^[13]	有盆腔炎病史	NR	6 ~ 12	负压吸 引术	64/54	术后 2 周	甲硝唑片剂, 术前 1 h、术后 4 h 和 8 h 分别口服 400 mg	安慰剂, 术前 1 h、 术后 4 h 和 8 h 分 别口服 400 mg	术后盆腔感染发生 率

注 (Note): NR. 未报告 (NR. not reported); T. 试验组 (treatment group), C. 对照组 (control group)。

2.3 文献质量评价结果

如图 2 所示, 纳入的 12 项 RCT 中, 有 4 项研究分别采用了随机数字表^[13, 20]、计算机^[11, 14]等方法产生随机序列, 为低偏倚风险; 其余 8 项

研究仅提及随机, 未详细描述随机序列的产生方法, 其偏倚风险不清楚。5 项研究^[10-11, 14, 19-20]描述了分配隐藏的方法, 评价为低偏倚风险; 2 项研究^[10, 19]采用中心分配, 3 项研究^[14-15, 20]使用

密封的信封分配隐藏；其余研究均未描述分配隐藏，其偏倚风险不清楚。5 项研究^[10, 14-15, 19-20]对研究者和受试者采取盲法，评价为低偏倚风险。仅 2 项研究^[19-20]报道了对结局评估者采取盲法，其余研究均无充分信息判断是否对结局评估者实施盲法，其偏倚风险判定为不清楚。所有研究的结果数据完整或采用了恰当的方法处理缺失数据，随访偏倚判定为低风险。所有研究均未提供原始研究方案的注册号，所以不清楚有无选择性报告结果，选择报告偏倚判定为不清楚。均无足够的信息评价是否存在其他重要偏倚风险，故其他偏倚风险判定为不清楚。

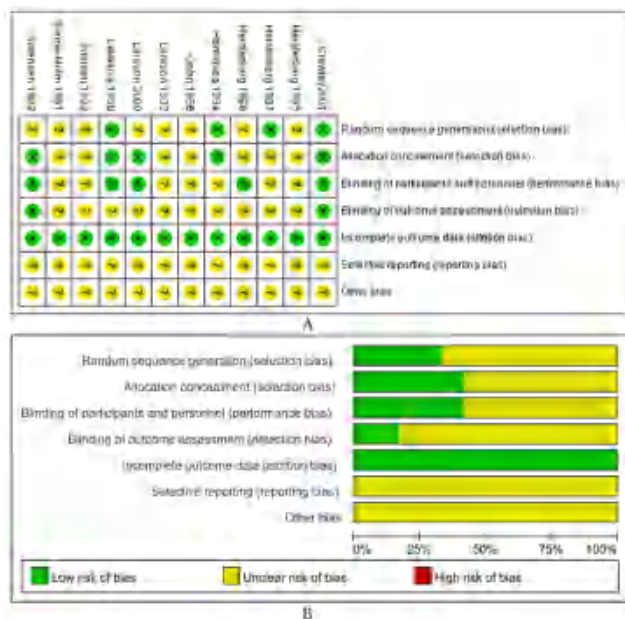


图 2 纳入研究的方法学质量评价
Fig 2 Evaluation on the methodological quality of the included studies
A. 各纳入研究的风险 (bias risk of the included studies); B. 各偏倚风险的百分比组成 (percentage of bias risk)

2.4 meta 分析结果

2.4.1 术后感染发生率 12 项研究均报告了术后感染发生率，共 5364 名患者。如表 3 所示，结果显示：无高危因素的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物与安慰剂的术后子宫内膜炎发生率相当 ($RR = 0.35, 95\%CI: 0.11 \sim 1.08, P = 0.07$)、输卵管炎发生率相当 ($RR = 0.79, 95\%CI: 0.08 \sim 7.49, P = 0.83$)；阴道菌群异常的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物相比于安慰剂可降低术后盆腔感染风险 ($RR = 0.40, 95\%CI: 0.23 \sim 0.67, P = 0.0006$)；患有盆腔炎病史的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物相比于安慰剂可降低术后盆腔感染风险 ($RR = 0.61, 95\%CI: 0.41 \sim 0.89, P = 0.01$)；没有盆腔炎病史的人

工流产手术患者，术前使用抗菌药物与安慰剂降低术后盆腔感染风险相当 ($RR = 0.75, 95\%CI: 0.55 \sim 1.02, P = 0.07$)、术后膀胱炎发生率的风险相当 ($RR = 0.50, 95\%CI: 0.09 \sim 2.70, P = 0.42$)；衣原体阴性的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物与安慰剂降低术后盆腔感染风险相当 ($RR = 0.59, 95\%CI: 0.28 \sim 1.23, P = 0.16$)；衣原体阳性的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物与安慰剂降低术后盆腔感染风险相当 ($RR = 0.36, 95\%CI: 0.06 \sim 2.24, P = 0.27$)。

2.4.2 不良反应发生率 有 4 项研究^[11, 14, 16, 21]报道了不良反应发生的情况，如恶心、呕吐、腹泻等胃肠道症状最常见。如表 4 所示，结果显示，术前使用抗菌药物相比于安慰剂术后出现呕吐 ($RR = 3.76, 95\%CI: 2.48 \sim 5.71, P < 0.0001$)、恶心 ($RR = 4.65, 95\%CI: 2.13 \sim 10.15, P = 0.0001$) 等症状的风险更高；术前使用抗菌药物与使用安慰剂术后出现腹泻、皮疹、瘙痒等不良反应风险相当。

2.4.3 再次入院率 1 项研究^[20]报告了对于阴道菌群异常的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物与安慰剂的再次入院率差异没有统计学意义 ($RR = 0.92, 95\%CI: 0.06 \sim 14.60, P = 0.95$)。

3 讨论

本研究结果显示，对于阴道菌群异常和患有盆腔炎病史的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物可以降低术后感染风险；而对于无高危因素的人工流产手术患者、没有盆腔炎病史的人工流产手术患者、衣原体阴性或阳性的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物并不能降低术后感染风险。同时使用抗菌药物容易出现恶心、呕吐、腹泻等不良反应，但总体来看，所出现的不良反应患者通常可以耐受。因此，根据目前相关证据的整理结果，并非所有进行人工流产手术的患者都应该术前使用抗菌药物进行预防，应充分了解患者的病史和基础情况。

对于患有盆腔炎病史的人工流产手术患者，meta 分析的结果显示术前使用抗菌药物可降低术后感染的发生率，这与另一项系统评价^[7]的研究结果相同；而对于没有盆腔炎病史以及衣原体阳性的人工流产手术患者，当前证据显示术前使用抗菌药物并无明显获益，这与另一项系统评价^[7]的预防使用抗菌药物可降低术后感染发生率的结论不一致，主要原因在于纳入的 RCT 不同，已发表的系统评价^[7]中没有纳入 Henriques

表 3 抗菌药物预防术后感染 meta 分析结果

Tab 3 Meta analysis of the effectiveness of antibiotics in the prevention of postoperative infection

人工流产手术患者	结局指标	纳入数量	抗菌药物组的人数	对照组的人数	效应模型	RR	95%CI	P
无高危因素	子宫内膜炎发生率	1	4/145	11/140	NA	0.35	0.11 ~ 1.08	0.07
	输卵管炎发生率	1	3/145	1/140	NA	0.79	0.08 ~ 7.49	0.83
阴道菌群异常	盆腔感染发生率	3	12/142	21/131	固定效应模型	0.40	0.23 ~ 0.67	0.0006
			3/84	11/90				
			3/181	12/181				
有盆腔炎病史	盆腔感染发生率	5	7/64	7/54	固定效应模型	0.61	0.41 ~ 0.89	0.01
			2/24	7/31				
			7/50	8/40				
			20/149	27/159				
没有盆腔炎病史	盆腔感染发生率	4	13/139	22/149	固定效应模型	0.75	0.55 ~ 1.02	0.07
			35/375	46/389				
			2/275	4/274				
			13/207	13/180				
衣原体阴性	膀胱炎发生率	1	2/275	4/274	NA	0.50	0.09 ~ 2.70	0.42
	盆腔感染发生率	3	2/503	15/499	随机效应模型	0.59	0.28 ~ 1.23	0.16
衣原体阳性	盆腔感染发生率	3	18/240	22/241	随机效应模型	0.36	0.06 ~ 2.24	0.27
			19/176	24/175				
			1/33	11/41				
			7/29	3/19				
			1/13	6/14				

注 (Note): NA. 不适用 (NA. not applicable)。

表 4 抗菌药物预防术后感染不良反应发生率比较的 meta 分析结果

Tab 4 Meta-analysis of the safety profile of antimicrobials in the prevention of postoperative infection

结局指标	纳入研究	抗菌药物组人数	对照组人数	效应模型	RR	95%CI	P
呕吐	Levallois 1988 ^[14]	96/535	25/539	固定效应模型	3.76	2.48 ~ 5.71	< 0.000 01
	Nielsen 1993 ^[16]	1/525	1/548				
腹泻	Henriques 1994 ^[11]	17/275	3/274	随机效应模型	2.06	0.15 ~ 29.20	0.59
	Levallois 1988 ^[14]	0/535	1/539				
恶心	Levallois 1988 ^[14]	32/535	7/539	固定效应模型	4.65	2.13 ~ 10.15	0.0001
	Nielsen 1993 ^[16]	2/525	0/548				
皮疹	Henriques 1994 ^[11]	2/275	5/274	固定效应模型	0.45	0.14 ~ 1.45	0.18
	Nielsen 1993 ^[16]	2/525	2/548				
瘙痒	Henriques 1994 ^[11]	4/275	0/274	随机效应模型	1.89	0.08 ~ 46.81	0.70
	Nielsen 1993 ^[16]	0/525	1/548				
念珠菌病	Levallois 1988 ^[14]	5/525	2/539	NA	2.57	0.50 ~ 13.17	0.26
其他 (皮肤、动作、头疼)	Levallois 1988 ^[14]	3/525	3/539	NA	1.03	0.21 ~ 5.06	0.97
细菌性阴道	Henriques 1994 ^[11]	2/275	5/274	NA	2.74	0.98 ~ 7.60	0.05
头疼	Henriques 1994 ^[11]	3/275	2/274	NA	2.1	0.39 ~ 11.42	0.39
其他 (恶心、头晕、弥漫性胃痛)	Henriques 1994 ^[11]	0/275	2/274	NA	0.06	0.00 ~ 1.07	0.06
夜间疼痛	Nielsen 1993 ^[16]	1/525	0/548	NA	3.13	0.13 ~ 76.69	0.48
舌疱疹	Nielsen 1993 ^[16]	0/525	1/548	NA	0.35	0.01 ~ 8.52	0.52

注 (Note): NA. 不适用 (NA. not applicable)。

1994^[11]、Heisterberg 1985^[12]、Heisterberg 1987^[13]、Heisterberg 1988^[15]的研究结果, 因此对于这两类

人群是否应该预防性使用抗菌药物仍存在争议, 尚需进一步的研究。对于衣原体阴性的人工流产

手术患者，当前证据显示术前使用抗菌药物无明显获益，而已发表的系统评价^[7]只纳入了两项 RCT^[14, 19]，因研究间存在较大的异质性没有进行 meta 分析，没有得出明确的结论。当前证据显示对于无高危因素的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物不能降低术后子宫内膜炎及输卵管炎的发生率；而对于阴道菌群异常的人工流产手术患者，术前使用抗菌药物可降低术后感染发生率。而在已发表的系统评价^[7]中则未对这两类人群进行讨论。因此，尽管国内专家共识^[3]和国外的一项指南^[22]建议所有人工流产手术患者都应该术前使用抗菌药物进行预防。但本研究基于当前的研究证据，仍建议临床医师在考虑对拟进行人工流产术的患者使用抗菌药物预防感染时，应充分了解患者病史并评估患者的基础情况，而非不加以区分地预防性滥用抗菌药物。对于抗菌药物的选择，本研究中纳入的 RCT 选择了甲硝唑、红霉素、青霉素、克林霉素、四环素、氨苄西林/舒巴坦、头孢曲松、氧氟沙星、匹氨西林等抗菌药物进行预防，而我国住院治疗的盆腔炎感染患者最常见的致病菌是大肠埃希菌和表皮葡萄球菌，因此国内专家共识^[3]建议人工流产手术预防性应用抗菌药物应选择能够覆盖盆腔的需氧菌、厌氧菌及性传播病菌（如淋病奈瑟菌和沙眼衣原体）的抗菌药物，如二代头孢菌素、甲硝唑、多西环素、米诺环素和阿奇霉素^[23]。

另一方面，根据 Cochrane 偏倚风险评价工具^[9]评价结果提示：① 该领域大部分 RCT 仅提及随机，未详细描述随机序列的产生方法以及分配隐藏的方法，使得纳入的 RCT 存在选择性偏倚的风险不清楚；② 大部分纳入的 RCT 未报告盲法实施对象和方法，导致实施偏倚和测量偏倚的风险不清楚；③ 所有纳入的 RCT 均未提供原始研究方案的注册号，难以保证研究过程的透明性，导致选择性报告偏倚的风险不清楚。而上述这些方法学方面的缺陷，将大大降低这些 RCT 结论的可信度，因此本研究也建议未来该领域的 RCT 在设计时需从上述三个方面进行方法学的改良和优化。

此外，本研究在对各 RCT 报告的结局指标进行梳理时发现：目前该领域尚无统一规范的结局指标体系，虽然大部分的研究都报告了盆腔感染发生率，但是对于该结局指标的定义、测量时间和测量方法还存在争议，这为提高临床研究质量和规范证据整合带来了巨大的挑战。而核心

指标集（COS）^[24]的构建能够有效地解决上述问题，COS 是指特定健康领域的临床研究中应当报告的最小指标集合，即业界公认的临床结局、结局指标及其测量方法和测量时间点等的最小集合。2010 年，国际知名的循证医学领域专家成立“有效性试验核心结局指标测量”（COMET）工作组，致力于 COS 的构建、实施、传播和更新，并为信息共享和学术交流创建了一个免费、公开可检索的平台（www.comet-initiative）^[25]。目前在 COMET 数据库中，有两项关于人工流产 COS 构建的研究^[26-27]；Jaffe 等^[26]采用系统评价的方式准备建立药物流产和手术流产的 COS，但是这个研究还在进行阶段，尚未完成；Whitehouse 等^[27]基于国际专家共识建立了标准化人工流产的 COS。但是目前还没有关于抗菌药物预防人工流产后感染的 COS，因此迫切需要开展相关的研究构建该领域统一规范的结局指标体系。

本研究存在以下的局限性：① 仅纳入了中英文文献，且大部分来自欧美发达国家；② 纳入的 RCT 整体方法学质量偏低，且部分结果存在较大异质性，无法进行 meta 分析，因此该结论还有待在中国人群中开展多中心、大样本、方法学设计良好的 RCT 来进一步验证；③ 对于衣原体阳性的人工流产手术患者，纳入的 RCT 间的异质性较大，主要原因可能是使用的抗菌药物种类不同以及方法学质量的差异，故对于该类患者，抗菌药物是否能降低术后感染风险尚有争议，其 meta 分析的结果仍需高质量的原始研究进一步验证；④ 纳入的 RCT 年份较久远，整体质量偏低，故本研究的结论还有待开展高质量的原始研究进一步验证。

参考文献

- [1] 刘朝晖, 张林爱, 张师前, 等. 人工流产围手术期下生殖道感染筛查和诊治的中国专家共识 (2022 年版) [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38 (10): 996-1000.
- [2] 刘欣燕, 黄薇, 郁琦, 等. 人工流产术后促进子宫内膜修复专家共识 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37 (3): 322-326.
- [3] 于晓兰, 顾向应, 刘欣燕, 等. 人工流产手术预防性抗菌药物应用的中国专家共识 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2019, 11 (8): 10-12.
- [4] 李健. 人工流产术前女性阴道微生态的研究进展 [J]. 医疗装备, 2017, 30 (6): 197-198.
- [5] 王辰, 董梦婷. 重视阴道微生态检测在女性阴道炎症诊治中的应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2016, 41 (4): 256-258.

- [6] 欧阳才颜, 罗一平, 叶桂娥, 等. 858 例人工流产术前女性阴道微生态状况的临床分析 [J]. 热带医学杂志, 2016, 16 (1): 88-90.
- [7] Low N, Mueller M, Van Vliet HA, et al. perioperative antibiotics to prevent infection after first-trimester abortion [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 3 (3): CD005217.
- [8] Penney GC, Thomson M, Norman J, et al. A randomised comparison of strategies for reducing infective complications of induced abortion [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1998, 105 (6): 599-604.
- [9] Higgins G, Green S. *Cochrane handbook for systematic reviews of intervention of intervention version 5.1.0* [EB/OL]. 2022-03-25. <http://handbook.Cochrane.Org/>.
- [10] Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Dalaker K, et al. Treatment with 2% clindamycin vaginal cream prior to first trimester surgical abortion to reduce signs of postoperative infection: a prospective, double-blinded, placebo-controlled, multicenter study [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2000, 79 (5): 390-396.
- [11] Henriques CU, Wilken-Jensen C, Thorsen P, et al. A randomized controlled trial of prophylaxis of post-abortion infection: ceftriaxone versus placebo [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1994, 101 (7): 610-614.
- [12] Heisterberg L, Moller BR, Manthorpe T, et al. Prophylaxis with lymecycline in induced first-trimester abortion: a clinical controlled trial assessing the role of chlamydia trachomatis and mycoplasma hominis [J]. *Sex Transm Dis*, 1985, 12 (2): 72-75.
- [13] Heisterberg L. Prophylactic antibiotics in women with a history of pelvic inflammatory disease undergoing first-trimester abortion [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1987, 66 (1): 15-18.
- [14] Levallois P, Rioux JE. Prophylactic antibiotics for suction curettage abortion: results of a clinical controlled trial [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 158 (1): 100-105.
- [15] Heisterberg L, Gnarpe H. Preventive lymecycline therapy in women with a history of pelvic inflammatory disease undergoing first-trimester abortion: a clinical controlled trial [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1988, 28 (3): 241-247.
- [16] Nielsen IK, Engdahl E, Larsen T. No effect of single dose ofloxacin on postoperative infection rate after first trimester abortion [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1993, 72 (7): 556-559.
- [17] Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Henning T, et al. Incidence of pelvic inflammatory disease after first trimester legal abortion in women with bacterial vaginosis after treatment with metronidazole: a double-blind, randomized study [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1992, 166 (1): 100-103.
- [18] Krohn K. Effect of prophylactic administration of sulbactam/ampicillin on the rate of postoperative endometritis after first-trimester abortion [J]. *Rev Infect Dis*, 1986, 8 (5): 576-578.
- [19] Sørensen JL, Thranov I, HoK G, et al. A double-blind randomized study of the effect of erythromycin in preventing pelvic inflammatory disease after first trimester abortion [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1992, 99 (5): 434-438.
- [20] Crowley T, Low N, Turner A, et al. Antibiotic prophylaxis to prevent post/abortal upper genital tract infection in women with bacterial vaginosis: randomised controlled trial [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 2001, 108 (4): 396-402.
- [21] Sonne-Holm S, Heisterberg L, Hebjorn S, et al. Prophylactic antibiotics in first-trimester abortions: a clinical controlled trial [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1981, 139 (6): 693-696.
- [22] Achilles SL, Reeves MF. Prevention of infection after induced abortion [J]. *Contraception*, 2011, 83 (4): 295-309.
- [23] 国家卫生和计划生育委员会. 国家中医药管理局, 解放军总后勤部卫生部. 抗菌药物临床应用指导原则 (2015 年版) [Z]. 北京: 2015.
- [24] Kirkham JJ, Gorst S, Altman DG, et al. Core outcome set standards for reporting: the COS-STAR statement [J]. *PLoS Med*, 2016, 13 (10): 1002148.
- [25] <https://www.comet-initiative.org/Studies/SearchResults>.
- [26] Jaffe A. *Woman-centered outcomes for medical and surgical abortion: a systematic review of core outcomes* [D]. Cape Town: Faculty of Health Sciences, 2021.
- [27] Whitehouse KC, Stifani BM, Duffy J, et al. Standardizing abortion research outcomes (STAR): results from an international consensus development study [J]. *Contraception*, 2021, 104 (5): 484-491.

(收稿日期: 2023-08-11; 修回日期: 2023-09-12)

佐剂重组带状疱疹疫苗用于 50 岁以上人群的快速卫生技术评估

华敏凡¹, 宋沧桑^{1, 2*}, 李兴德^{1, 2}, 王国徽², 陆维², 毛盼盼² (1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 昆明市第一人民医院药学部, 昆明 650000)

摘要: **目的** 评价佐剂重组带状疱疹疫苗 (RZV) 用于 50 岁以上人群的有效性、安全性、经济性, 为临床药物选择和决策提供循证证据。**方法** 采用快速卫生技术评估 (HTA) 方法, 计算机检索 PubMed、Cochrane Library、Embase、CNKI、万方和维普等数据库及相关 HTA 网站, 检索时间均为数据库建库至 2023 年 5 月。由两名研究者根据纳入标准、排除标准进行文献筛选、数据提取和质量评价, 对研究结果进行综合性定性分析与比较。**结果** 共纳入 13 篇研究, 包括 4 项 meta 分析/系统评价和 9 篇药物经济学研究。在有效性方面, RZV 具有更高的有效性、疫苗效力、预防带状疱疹神经痛的效力和预防带状疱疹眼的效力, 优于带状疱疹减毒活疫苗和安慰剂; 在安全性方面, RZV 的注射部位不良反应发生率增加 (包括注射部位发红、肿胀、疼痛; 全身不良事件; 严重不良事件和死亡), 差异不具有统计学意义; 在经济学研究方面, RZV 更具有经济学优势。**结论** 基于当前有限的证据, RZV 用于 50 岁以上人群预防带状疱疹和并发症发生的有效性、安全性、经济性均较好, 但使用时需格外注意免疫力低下的人群, 该研究仍需进一步研究和临床实践予以证实。

关键词: 重组带状疱疹疫苗; 带状疱疹; 快速卫生技术评估

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0227-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.036

Rapid health technology assessment of adjuvanted recombinant herpes zoster vaccine in people over 50 years old

HUA Min-fan¹, SONG Cang-sang^{1, 2*}, LI Xing-de^{1, 2}, WANG Guo-hui², LU Wei², MAO Pan-pan² (1. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650000)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy, safety and economy of recombinant herpes zoster vaccine (RZV) in people over 50 years old, and provide evidence-based evidence for clinical drug selection and decision-making. **Methods** PubMed, Cochrane Library, Embase, CNKI, Wanfang, VIP, and rapid health technology assessment were searched. Two investigators screened the literatures, collected data and evaluated the quality according to the inclusion criteria and exclusion criteria. The results were compared qualitatively. **Results** Totally 13 studies were included, including 4 meta-analyses/systematic reviews and 9 economic studies. RZV had better efficacy in vaccine, preventing postherpetic neuralgia and zoster ophthalmicus, than herpes zoster live attenuated vaccine and placebo, with significant difference. In terms of safety, RZV had more adverse reactions in injection sites (including injection site redness, swelling, pain; systemic adverse events; serious adverse events and deaths), with not significant difference. In terms of economics, RZV had more economic advantages. **Conclusion** Based on current limited evidence, RZV is effective, safe, and economical

基金项目: 云南省临床药学中心建设项目; 云南省卫生健康委员会医学领军人才培养计划项目 (No. L-2018012); 昆明市医学科技领军人才培养项目 [No. 2023-SW (领军)-04]; 昆明市卫生健康委员会卫生科研课题项目 (No. 2022-13-01-014)。

作者简介: 华敏凡, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 1321381168@qq.com *通信作者: 宋沧桑, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学和药物基因组学的研究, email: songcs163@163.com

in preventing herpes zoster and reducing the occurrence of postherpetic neuralgia and zoster ophthalmicus in people over 50 years old. Special attention should be paid to the population with low immunity when using RZV, which needs further confirmation.

Key words: recombinant herpes zoster vaccine; herpes zoster; rapid health technology assessment

带状疱疹 (herpes zoster, HZ) 由水痘带状疱疹病毒 (varicella zoster virus, VZV) 在作为水痘初次感染后的再活化引起的疾病^[1]。在儿童和青少年中, 带状疱疹是罕见的, 成年人中, 高龄、其他感染 (如获得性免疫缺陷综合征或 COVID-19) 和免疫抑制是最常见的风险因素^[2]。约三分之一的人在一生中会患带状疱疹, 带状疱疹最常见的并发症是带状疱疹后神经痛 (postherpetic neuralgia, PHN)、带状疱疹眼 (herpes zoster ophthalmicus, HZO)^[3]。Zhang 等^[4]估算了我国带状疱疹的疾病负担, 结果显示, 我国带状疱疹发病率为 4.28/1000 人年, 且随着年龄的增加而增加, 尤其是 ≥ 60 岁的人群, 发病率为 11.69/1000 人年, 而且 PHN、带状疱疹复发率分别为 12.6% 和 9.7%。

接种抗带状疱疹疫苗是最有效的预防干预措施, 可显著降低带状疱疹患病率。Shingrix 是重组带状疱疹疫苗 (recombinant zoster vaccine, RZV), 其含有水痘带状疱疹病毒糖蛋白 E 抗原和 AS01B 佐剂系统。2018 年, RZV 在欧盟、美国、日本、加拿大和澳大利亚还获批用于预防 ≥ 50 岁成人带状疱疹, 在欧盟和澳大利亚还获批用于预防 PHN^[5]。RZV 于 2020 年 6 月在中国获得许可, 但 RZV 在国内的接种情况不容乐观, 主要问题包括对带状疱疹及其并发症的认识不足、疫苗知晓度低、接种意愿低、政策法规缺乏或落实不足、宣传力度低、接种服务可及性差、疫苗单一等问题^[6]。除此之外, 尚未开展 RZV 在中国上市后的评价研究。在此背景下, 需要更多依据指导其临床实践, 快速卫生技术评估 (rapid health technology assessment, rHTA) 是一种利用循证医学、卫生经济学等多种学科理论, 全面系统地评价卫生技术的有效性、安全性、经济性和社会性等的方法。rHTA 采用简化 HTA 流程, 可快速整合和收集信息, 已被应用于社会科学和实践中^[7-8]。本研究采用 rHTA 方法, 对 RZV 疫苗用于 50 岁以上人群的有效性、安全性和经济性进行分析, 对 RZV 在中国的临床使用的获益与风险进行初步评估, 旨在为决策者提供全面的循

证依据。

1 资料与方法

1.1 纳入和排除标准

1.1.1 纳入标准 ① 研究对象: 50 岁以上人群。② 干预措施: 注射 RZV, 剂量不限。③ 对照组: 注射带状疱疹减毒活疫苗 (ZVL)、安慰剂、未接种疫苗。④ 结局指标: 主要有效性指标包括疫苗有效性、疫苗效力、疫苗预防 PHN 的效率、疫苗预防 HZO 的有效性; 主要安全性指标包括注射部位不良事件、全身不良事件。⑤ 研究类型: HTA 报告、系统评价/meta 分析、经济学研究。

1.1.2 排除标准 ① 干预措施或对照措施混杂; ② 重复发表或研究类型不符的文献; ③ 无法获取全文的文献等。

1.2 检索策略

计算机检索数据库 PubMed、Embase、Cochrane Library、中国知网、万方和维普及卫生技术评估 (health technology assessment, HTA) 相关网站。英文数据库的检索词为 (“herpes zoster vaccine” OR “zoster vaccine”) AND (“meta-analysis” OR “systematic review” OR “cost” OR “economic”)。

中文数据库的检索词为 “带状疱疹疫苗” AND (“系统评价” OR “meta 分析” OR “荟萃分析” OR “成本” OR “经济” OR “费用”); HTA 机构官方网站以 “herpes zoster vaccine” 为关键词进行检索, 以 “RZV” 或 “recombinant herpes zoster vaccine” 等进行筛选。检索时间均为数据库建库至 2023 年 5 月, 检索文献的语种限定为中文和英文。

1.3 文献筛选与数据提取

采用 EndNote 软件对文献进行筛选, 再由两名研究者独立按照纳入标准与排除标准筛选文献, 交叉核对。通过阅读标题和摘要进行初筛, 在排除明显不相关的文献后, 阅读全文并最终判断是否纳入。如遇分歧, 则通过讨论或咨询第三方讨论解决。提取内容包括作者、发表年限、纳入研究个数、纳入研究类型、患者例数、干预措施、结局指标 (SR/meta 分析); 所在国家、研究方法、研究视角、模型、干预措施和对照措施 (经济学研究)。

1.4 质量评价

采用系统性评价方法学质量评估表 (a measurement tool to assess systematic reviews 2, AMSTAR-2) 评价 SR/meta 分析的质量^[9]; 对于经济学研究, 采用卫生经济学评价报告标准共识 (consolidated health economic evaluation reporting standards, CHEERS) 评价^[10]。

1.5 证据的合成与分析

应用 rHTA 的方法, 将所有纳入的 SR/meta 分析和经济学研究, 根据纳入研究的基本特征和结论, 采用描述性分析方法, 对资料进行合成、分析与讨论, 并对结果进行谨慎解释与推测。

2 结果

2.1 文献检索结果

通过检索数据库, 共获得相关文献 1089 篇, 根据纳入及排除标准, 经过剔除、初筛、复筛后, 最终纳入 4 篇 SR/meta 分析, 9 篇药物经济学研究, 无相关 HTA 报告。文献筛选流程见图 1。

2.2 纳入文献的基本特征与质量评价

本研究纳入 4 篇 SR/meta 分析^[11-14], 发表时间为 2018—2022 年, 均为高质量文献。共纳入 9

篇药物经济学研究, 发表年限为 2018—2023 年, 文献质量良好。纳入研究的基本特征和质量评价结果见表 1、2。

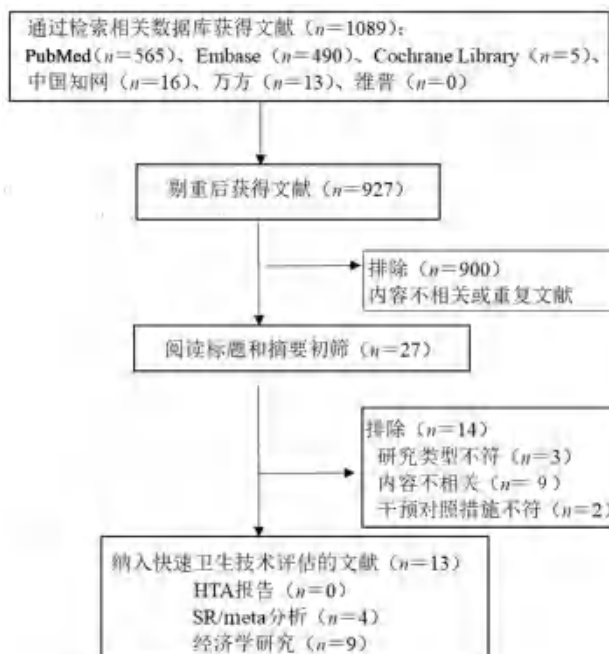


图 1 文献筛选流程图

Fig 1 Flow chart of literature screening

表 1 纳入研究基本特征

Tab 1 Baseline information of included studies

作者及发表年份	纳入研究 / 个	纳入研究类型	纳入患者数量	干预措施	对照措施	结局指标	AMSTAR-2 量表表达标项目数
Xia 2022 ^[11]	36	RCT (17), 队列研究 (19)	84 264	RZV	ZVL/安慰剂 / 未接种疫苗	① 有效性; ② 预防 PHN 的效率; ③ 安全性 (包括注射部位发红、肿胀、疼痛; 全身不良事件)	14
Mbinta 2022 ^[13]	7	RCT (5), 队列研究 (2)	15 680 151	RZV	未接种疫苗	① 有效性; ② 预防 PHN 的效率; ③ 预防 HZO 的有效性	14
McGirr 2019 ^[14]	6	RCT (6)	30 963	RZV	ZVL/安慰剂	① 疫苗效力; ② 注射部位不良事件	15
Tricco 2018 ^[12]	22	RCT	2 044 504	RZV	ZVL/安慰剂	① 疫苗效力; ② 预防 PHN 的效率; ③ 预防 HZO 的有效性; ④ 安全性 (包括注射部位发红、肿胀、疼痛; 全身不良事件)	15

表 2 纳入药物经济学研究的基本特征

Tab 2 Baseline information of included pharmacoeconomic studies

作者及发表年份	国家	研究方法	研究视角	模型	干预措施	对照措施	CHEERS 量表表达标项目数
Jiang 2023 ^[15]	中国	成本-效果分析	社会	马尔可夫模型	RZV	未接种疫苗	18
Teng 2022 ^[16]	日本	成本-效益分析	支付者、社会	马尔可夫模型	RZV	未接种疫苗	17
Carpenter 2019 ^[17]	美国	成本-效果分析	社会	马尔可夫模型	RZV	ZVL/未接种疫苗	18
Curran 2019 ^[18]	美国	成本-效益分析	社会	马尔可夫模型	RZV	ZVL/未接种疫苗	17
Prosser 2019 ^[19]	美国	成本-效果分析	社会和医疗保健部门	马尔可夫模型	RZV	ZVL/未接种疫苗	16
Curran 2018 ^[20]	美国	成本-效益分析	未提及	马尔可夫模型	RZV	ZVL/未接种疫苗	14
Dooling 2018 ^[21]	美国	成本-效益分析	社会	未提及	RZV	ZVL/未接种疫苗	9
Le 2018 ^[22]	美国	成本-效果分析	参与者	马尔可夫模型	RZV	ZVL/未接种疫苗	14
Le 2018 ^[23]	美国	成本-效益分析	参与者	马尔可夫模型	RZV	ZVL/未接种疫苗	10

2.3 有效性评价

2.3.1 疫苗有效性 2 篇^[11, 13] SR/meta 分析报告了 RZV 对 50 岁以上人群疫苗有效性。Xia 等^[11]对

接种 RZV 和 ZVL 进行了比较, 结果显示在年龄 ≥ 60 岁的免疫活性受试者中, RZV 疫苗有效性优于 ZVL [RR = 49%, 95%CI: 21% ~ 67%, P < 0.05]。

Mbinta 等^[13]对接种 RZV 和未接种疫苗进行了比较,结果显示在 50 岁及以上成人中, RZV 的有效性为 79.2%, 优于未接种疫苗者 [95%CI: 57.6 ~ 89.7, $P < 0.01$]。

2.3.2 疫苗效力 2 篇^[12, 14]SR/meta 分析报告了 RZV 对 50 岁以上人群疫苗效力。McGirr 等^[14]对 RZV 和 ZVL 进行了比较,结果显示 RZV 的疗效显著高于 ZVL: 在 ≥ 60 岁的成人中 [$VE_{RZV} = 0.92$, 95%CI: 0.88 ~ 0.94, $P < 0.05$]; 在 ≥ 70 岁成人中 [$VE_{RZV} = 0.91$, 95%CI: 0.87 ~ 0.94, $P < 0.05$]。Tricco 等^[12]对 RZV 和 ZVL、安慰剂进行了比较,结果显示 RZV 免疫效果明显优于 ZVL [$VE_{RZV} = 85\%$, 95%CI: 31% ~ 98%, $P < 0.05$]和安慰剂 [$VE_{RZV} = 94\%$, 95%CI: 79% ~ 98%, $P < 0.05$]。

2.3.4 疫苗预防 PHN 的效率 3 篇^[11-13]SR/meta 分析报告了 RZV 对 50 岁以上人群预防 PHN 的效率。Xia 等^[11]对接种 RZV 和未接种疫苗进行了比较,结果显示在免疫功能正常的受试者中, RZV 预防 PHN 有一定的效率 [IRR = 77%, 95%CI: 34% ~ 92%, $P < 0.05$]。Tricco 等^[12]对 RZV 和安慰剂进行了比较,结果显示 RZV 预防 PHN 有一定的效率 [$RR = 87\%$, 95%CI: 65% ~ 96%, $P < 0.05$]。Mbinta 等^[13]研究结果显示 RZV 预防 PHN 有一定的效率 [$HR = 76.0\%$, 95%CI: 68.4% ~ 81.8%, $P < 0.05$]。

2.3.5 疫苗预防 HZO 的有效性 2 篇^[12-13]SR/meta 分析报告了 RZV 对 50 岁以上人群预防 HZO 的效率。Tricco 等^[12]在 13 900 例患者中的研究结果显示, RZV 统计学上优于安慰剂 [$RR = 88\%$, 95%CI: 16% ~ 100%, $P < 0.05$]。Mbinta 等^[13]研究结果显示 RZV 预防 HZO 有一定的效率 [$HR = 66.7\%$, 95%CI: 60.7% ~ 72.0%, $P < 0.05$]。

2.4 安全性评价

2.4.1 注射部位不良事件 3 篇^[11-12, 14]SR/meta 分析 RZV 与 ZVL 或安慰剂对患者发生注射部位不良事件的影响。Xia 等^[11]研究显示, 与安慰剂组相比, 接种 RZV 注射部位有更高的发红率 [$RR = 30.09$, 95%CI: 23.95 ~ 37.81, $P = 0.56$]、肿胀 [$RR = 24.89$, 95%CI: 19.25 ~ 32.17, $P = 0.31$]和疼痛 [$RR = 7.79$, 95%CI: 6.66 ~ 9.11, $P = 0.05$]。McGirr 等^[14]对 RZV 和 ZVL 进行了比较, RZV 注射部位反应发生率略高于 ZVL。Tricco 等^[12]对 RZV 和 ZVL、安慰剂进行了比较, 与 ZVL 相比, RZV 注射部位有更多的不良事件 [$RR = 1.79$, 95%CI: 1.05 ~ 2.34, $P > 0.05$]; 与安慰剂相比, RZV 注射部位有更多的不良事件 [$RR = 5.63$, 95%CI: 3.57 ~ 7.29, $P > 0.05$],

但差异不具有统计学意义。

2.4.2 全身不良事件 2 篇^[11-12]SR/meta 分析 RZV 与 ZVL 或安慰剂对患者发生全身不良事件的影响。Xia 等^[11]研究显示, RZV 具有更高的全身不良事件, 疲乏 [$RR: 2.26$, 95%CI: 1.88 ~ 2.73, $P = 0.94$]、肌痛 [$RR: 4.01$, 95%CI: 3.11 ~ 5.17, $P = 0.40$]、头痛 [$RR: 2.43$, 95%CI: 2.26 ~ 2.61, $P = 0.45$]和胃肠道症状 [$RR: 1.29$, 95%CI: 1.13 ~ 1.47, $P = 0.70$]。此外, RZV 与安慰剂相比, 具有严重不良事件 [$RR: 0.97$, 95%CI: 0.92 ~ 1.03, $P = 0.68$]或死亡 [$RR: 0.93$, 95%CI: 0.85 ~ 1.03, $P = 0.89$]。Tricco 等^[12]研究显示, RZV 的不良事件少于安慰剂 [$RR: 2.28$, 95%CI: 1.45 ~ 3.65, $P < 0.05$]。

2.5 经济性评价

日本 2022 年的一项成本效益研究, 从支付者、社会的角度进行了 RZV 与未接种疫苗的成本效益分析^[16]。结果显示, 与未接种疫苗相比, RZV 估计预防每百万 65 岁人群中 71 423 例带状疱疹病例和 15 858 例 PHN 病例。从付款人的角度来看, 增量成本效果比 (ICER) 为 4205 515 日元认为具有成本效益, 对疫苗效力减弱、带状疱疹患者发生 PHN 的比例和带状疱疹发病率的假设最为敏感。从社会角度来看, ICER 为 3854 192 日元 (仅因遭受带状疱疹而导致的生产力损失) 和 4622 212 日元 (遭受带状疱疹而导致的生产力损失和接种疫苗所需时间) 认为具有成本效益。总体而言, 在 65 岁的日本成年人中, 接种 RZV 比未接种疫苗具有成本效益。

美国 7 项研究^[17-23]对 RZV 进行了药物经济学研究。Meredith 等^[24]对美国的 7 项药物经济学研究进行了系统评价, 评估带状疱疹疫苗在美国的成本效益, 研究结果表明与未接种疫苗和 ZVL 相比, RZV 具有成本效益。

我国 2023 年进行了一项 RZV 在 50 岁以上成人中的药物经济学研究。Jiang 等^[15]从社会角度测算 RZV 与未接种疫苗的成本效果分析。RZV 比不接种疫苗的费用高出 27.8 亿美元, 额外增加了 65 008 个质量调整生命年 (QALY), 并可避免 1 893 530 例带状疱疹病例、295 761 例 PHN 病例、51 734 例其他并发症和 229 例带状疱疹相关死亡。RZV 的 ICER 在 34 465.5 ~ 51 002.7 美元变化。在概率敏感性分析中, RZV 具有成本效益的概率在 50 ~ 59 岁、60 ~ 69 岁、70 ~ 79 岁和 ≥ 80 岁的人群中分别为 43.95%、59.32%、45.27% 和 39.50%, 其中人均国内生产总值的三倍 (37 654.5

英镑/QALY) 作为支付意愿阈值。结果显示 RZV 在 60~69 岁的人群中最有可能具有成本效益。疫苗成本的轻微下降将导致 RZV 在所有年龄 ≥ 50 岁的人群中具有成本效益。

3 讨论

本研究共纳入 4 篇 SR/meta 分析, 9 篇药物经济学研究, 文献质量良好。在有效性和安全性方面, RZV 与 ZVL 或安慰剂相比, RZV 的疫苗有效性、疫苗的效力、预防 PHN 的效率、预防 HZO 的有效性较好, 差异具有统计学意义; 但是 RZV 具有更高的注射部位不良反应 (包括注射部位发红、肿胀、疼痛; 全身不良事件; 严重不良事件和死亡), 差异不具有统计学意义。经济学研究显示: 与 ZVL 和安慰剂相比, RZV 更具有经济学优势。

Lal 等^[25] 在 18 个国家进行了一项带状疱疹预防研究 (SPS), 以评估 RZV 在老年人 (≥ 50 岁) 中的疗效和安全性, 在平均 3.2 年的随访中, 接种 RZV 和安慰剂的发病率为 0.3/1000 人年、9.1/1000 人年, 疫苗效力在 96.6% 至 97.9%。Oxman 等^[26] 的一项 SPS 研究显示, RZV 对带状疱疹的保护至少 10 年, 10 年后其效力为 89%, 数据模型预测免疫应答至少可以保护 20 年。虽然注射部位反应在疫苗接种者中更常见, 但通常是轻度的, 最常见的是注射部位发红、肿胀, 全身肌痛、乏力、头痛等, 1~3 d 可自行缓解^[26-27]。大量的真实世界有效性研究证实了 RZV 的安全性和有效性, RZV 显著降低了 50 岁或以上成年人患带状疱疹的风险, 且在免疫功能低下的人群中是安全的^[21, 28-30]。

《带状疱疹疫苗预防接种专家共识》^[31] 指出, 随着我国老龄化加剧, 带状疱疹已经成为一个公共卫生问题。目前中国正处于 RZV 应用的初期阶段, 公众对于 RZV 的认知度不高, 接种率也相对较低。世界卫生组织认为, 疫苗是有效的疾病预防措施。在保护人类免遭疾病痛苦和死亡威胁的同时, 还可以大大降低医疗费用, 是最具成本效益的健康投资之一。并且 RZV 对免疫缺陷人群如获得性免疫缺陷综合征者、肿瘤患者以及移植受者相比较安慰剂也具有免疫原性, 而 ZVL 不推荐用于免疫功能缺陷或免疫抑制疾病患者。据报道, 近年来, 我国带状疱疹发病呈年轻化趋势, 长春百克生物科技股份有限公司研发的减毒活疫苗于 2023 年 1 月 31 日获批上市, 是我国的第一款带状疱疹疫苗, 将适用人群年龄扩为 40

岁及以上, 填补了我国 40~50 岁人群没有带状疱疹疫苗保护的空白^[32], 期待在未来有更多优质的带状疱疹疫苗投入使用, 以缓解带状疱疹疾病为中国社会和医疗体系带来的疾病负担, 进一步提高中国中老年群体的生活质量。

本研究存在一定的局限性: ① 安全性、有效性有关的研究纳入较少, 仍需大量的研究证实 RZV 的安全性和有效性; ② 在药物经济学方面, 国内相关研究较少, 国内外治疗成本、经济条件等有一定的差异, 故国外研究的结果参考价值有限。

综上所述, 基于当前有限的证据, RZV 用于 50 岁以上的人群预防带状疱疹和并发症具有良好的有效性和经济性。该结论仍需要进一步研究和临床实践予以证实。期待未来开展更多高质量的临床研究, 为后续的临床综合评价和促进临床合理用药奠定基础。

参考文献

- [1] Johnson RW, Levin MJ. Herpes zoster and its prevention by vaccination [J]. *Interdiscip Top Gerontol Geriatr*, 2020, 43: 131-145.
- [2] Patil A, Goldust M, Wollina U. Herpes zoster: a review of clinical manifestations and management [J]. *viruses*, 2022, 14 (2): 192.
- [3] Harbecke R, Cohen JI, Oxman MN. Herpes zoster vaccines [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224 (12 Suppl 2): S429-S442.
- [4] Zhang Z, Liu X, Suo L, et al. The incidence of herpes zoster in China: a meta-analysis and evidence quality assessment [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2023, 19 (2): 2228169.
- [5] Syed YY. Recombinant zoster vaccine (Shingrix®): a review in herpes zoster [J]. *Drugs Aging*, 2018, 35 (12): 1031-1040.
- [6] 刘青, 张杰. 带状疱疹及其疫苗接种的研究进展 [J]. *预防医学论坛*, 2023, 29 (2): 157-160.
- [7] 钱晨月, 胡展红, 徐敏芹, 等. 阿托西班治疗早产的快速卫生技术评估 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42 (10): 1041-1045.
- [8] 唐惠林, 门鹏, 翟所迪. 药物快速卫生技术评估方法及应用 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2016, 14 (2): 1-4.
- [9] Shea BJ, Reeves BC, Wells G, et al. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both [J]. *BMJ*, 2017, 358: j4008-j4016.
- [10] Husereau D, Drummond M, Petrou S, et al. Consolidated health economic evaluation reporting standards (CHEERS) statement [J]. *BMC Med*, 2013, 120 (6): 765-770.
- [11] Xia Y, Zhang X, Zhang LR, et al. Efficacy, effective-

- ness, and safety of herpes zoster vaccine in the immunocompetent and immunocompromised subjects: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 978203.
- [12] Tricco AC, Zarin W, Cardoso R, et al. Efficacy, effectiveness, and safety of herpes zoster vaccines in adults aged 50 and older: systematic review and network meta-analysis [J]. *BMJ*, 2018, 363: k4029.
- [13] Mbinta JF, Nguyen BP, Awuni P, et al. Post-licensure zoster vaccine effectiveness against herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Healthy Longev*, 2022, 3 (4): e263-e275.
- [14] McGirr A, Widenmaier R, Curran D, et al. The comparative efficacy and safety of herpes zoster vaccines: a network meta-analysis [J]. *Vaccine*, 2019, 37 (22): 2896-2909.
- [15] Jiang MH, Yao XL, Peng J, et al. Cost-effectiveness of recombinant zoster vaccine for adults aged ≥ 50 years in China [J]. *Am J Prev Med*, 2023, 12: S0749-3797 (23): 225-228.
- [16] Teng L, Mizukami A, Ng C, et al. Cost-effectiveness analysis update of the adjuvanted recombinant zoster vaccine in Japanese older adults [J]. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2022, 12 (6): 1447-1467.
- [17] Carpenter CF, Aljasseem A, Stassinopoulos J, et al. A cost-effectiveness analysis of an adjuvanted subunit vaccine for the prevention of herpes zoster and post-herpetic neuralgia [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2019, 6 (7): ofz219.
- [18] Curran D, Patterson BJ, Van Oorschot D, et al. Cost-effectiveness of an adjuvanted recombinant zoster vaccine in older adults in the United States who have been previously vaccinated with zoster vaccine live [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15 (4): 765-771.
- [19] Prosser LA, Harpaz R, Rose AM, et al. A cost-effectiveness analysis of vaccination for prevention of herpes zoster and related complications: input for national recommendations [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170 (6): 380-388.
- [20] Curran D, Patterson B, Varghese L, et al. Cost-effectiveness of an adjuvanted recombinant zoster vaccine in older adults in the United States [J]. *Vaccine*, 2018, 36 (33): 5037-5045.
- [21] Dooling KL, Guo A, Patel M, et al. Recommendations of the advisory committee on immunization practices for use of herpes zoster vaccines [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2018, 67 (3): 103-108.
- [22] Le P, Rothberg MB. Cost-effectiveness of the adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults [J]. *JAMA Intern Med*, 2018, 178 (2): 248-258.
- [23] Le P, Rothberg MB. Cost-effectiveness of the recommendations of the advisory committee on immunization practices for the recombinant adjuvanted zoster subunit vaccine [J]. *JAMA Intern Med*, 2018, 178 (9): 1277-1278.
- [24] Meredith NR, Armstrong EP. Cost-effectiveness of herpes zoster vaccines in the U. S.: a systematic review [J]. *Prev Med Rep*, 2022, 29: 101923.
- [25] Lal H, Cunningham AL, Godeaux O, et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372 (22): 2087-2096.
- [26] Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, et al. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352 (22): 2271-2284.
- [27] Simberkoff MS, Arbeit RD, Johnson GR, et al. Safety of herpes zoster vaccine in the shingles prevention study: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2010, 152 (9): 545-554.
- [28] Stadtmauer EA, Sullivan KM, Marty FM, et al. A phase 1/2 study of an adjuvanted varicella-zoster virus subunit vaccine in autologous hematopoietic cell transplant recipients [J]. *Blood*, 2014, 124 (19): 2921-2929.
- [29] Godeaux O, Kovac M, Shu D, et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted herpes zoster subunit candidate vaccine in adults ≥ 50 years of age with a prior history of herpes zoster: a phase III, non-randomized, open-label clinical trial [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13 (5): 1051-1058.
- [30] Izurieta HS, Wu X, Forshee R, et al. Recombinant zoster vaccine (Shingrix): real-world effectiveness in the first 2 years post-licensure [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73 (6): 941-948.
- [31] 潘锋.《带状疱疹疫苗预防接种专家共识》在京发布 [J]. *中国医药导报*, 2022, 19 (12): 1-3.
- [32] 林志吟.带状疱疹国产疫苗研发再获新进展 [N]. *第一财经日报*, 2023-06-01 (A09).

(收稿日期: 2023-08-08; 修回日期: 2023-09-15)

环硅酸锆钠治疗慢性肾脏病和血液透析伴高钾血症患者 有效性与安全性的 meta 分析

安兴宇¹, 李兴德^{1, 2*}, 宋沧桑^{1, 2}, 毛盼盼², 张函舒², 王国徽² (1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 昆明市第一人民医院药学部, 昆明 650000)

摘要: **目的** 系统评价慢性肾脏病和血液透析伴高钾血症患者使用环硅酸锆钠的有效性和安全性, 以为环硅酸锆钠治疗高钾血症的临床使用提供参考。**方法** 检索中国知网、中国生物医学文献数据库、维普数据库、万方数据库、Cochrane Library、PubMed、Embase、Web of Science, 收集环硅酸锆钠治疗高钾血症的随机对照试验。检索时间为各数据库建库至 2023 年 7 月 1 日。对符合入选和排除标准的文献采用 R 4.3.1 统计软件进行 meta 分析。**结果** 共纳入 11 篇文献, 包括 1321 例患者, 试验组 664 例, 对照组 657 例, meta 分析结果显示, 与安慰剂或低钾饮食组相比, 环硅酸锆钠组的降钾效果显著 [$MD = -0.67$, $95\%CI (-0.80 \sim -0.54)$], 亚组分析显示在亚洲人群中环硅酸锆钠降低血钾的效果较好 [$MD = -0.76$, $95\%CI (-0.98 \sim -0.55)$]。对其他电解质水平的影响, 两组差异无统计学意义 [$MD = 0.01$, $95\%CI (-0.04 \sim 0.05)$]; 两组便秘、胃肠道反应和外周水肿发生率差异无统计学意义; 环硅酸锆钠组低钾血症的发生率大于安慰剂或低钾饮食组 [$RR = 5.93$, $95\%CI (1.46 \sim 24.04)$]。**结论** 环硅酸锆钠能够显著降低高钾血症患者体内的血钾值, 在亚洲人群当中效果同样显著, 并且不影响其他电解质水平, 不良反应发生率较低, 但可能会出现低钾血症。

关键词: 环硅酸锆钠; 高钾血症; 慢性肾脏病; 血液透析; 治疗效果

中图分类号: R692, R589.4 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0233-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.037

Efficacy and safety of sodium zirconium cyclosilicate for chronic kidney disease with hyperkalemia and hemodialysis with hyperkalemia: a meta-analysis

AN Xing-yu¹, LI Xing-de^{1, 2*}, SONG Cang-sang^{1, 2}, MAO Pan-pan², ZHANG Han-shu², WANG Guo-hui² (1. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650000)

Abstract: Objective To systematically evaluate the efficacy and safety of sodium zirconium cyclosilicate in patients with chronic kidney disease with hyperkalemia and hemodialysis with hyperkalemia, to provide reference for clinical use of sodium zirconium cyclosilicate. **Methods** CNKI, China Biology Medicine disc, VIP database, Wanfang database, Cochrane Library, PubMed, Embase and Web of Science were searched to collect randomized controlled trials of sodium zirconium cyclosilicate for hyperkalemia. Literatures from the establishment of each database to July 1st, 2023 were included and searched. R 4.3.1 was used for meta-analysis of the literatures that met the inclusion and exclusion criteria. **Results** Totally 11 literatures were included, involving 1321 patients (664 in the experimental group and 657 in the control group). The meta-analysis showed that compared with placebo or low-potassium diet group, sodium zirconium cyclosilicate

基金项目: 云南省临床药学中心项目; 云南省卫生健康委员会医学领军人才培养项目 (编号: L-2018012); 云南省科技厅科技计划项目 (编号: 202301AY070001-112); 昆明市卫生科技人才培养项目 (编号: 2022-SW (带头)-32)。

作者简介: 安兴宇, 男, 硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 1614998848@qq.com *通信作者: 李兴德, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学和药事管理方面的研究, email: smart1103@163.com

group had a significant potassium reduction effect [$MD = -0.67, 95\%CI (-0.80 \sim -0.54)$]. Subgroup analysis showed that sodium zirconium cyclo better reduced blood potassium in Asian population [$MD = -0.76, 95\%CI (-0.98 \sim -0.55)$]. There was no significant effect on the level of other electrolytes between the two groups [$MD = 0.01, 95\%CI (-0.04 \sim 0.05)$]. The incidence of constipation, gastrointestinal reaction and peripheral edema were not significantly different between the two groups. The incidence of hypokalemia was higher in the sodium zirconium cyclo silicate group than in the placebo or low-potassium diet group [$RR = 5.93, 95\%CI (1.46 \sim 24.04)$]. **Conclusion** Sodium zirconium cyclosilicate can significantly reduce the serum potassium value in patients with hyperkalemia. The effect is significant in Asian population, but it does not affect the level of other electrolytes. The incidence of adverse reactions is low, which may lead to hypokalemia.

Key words: sodium zirconium cyclosilicate; hyperkalemia; chronic kidney disease; hemodialysis; therapeutic effect

研究显示, 中国门诊患者高钾血症患病率为 3.86%^[1], 在合并慢性肾脏病 (chronic kidney diseases, CKD)、心力衰竭、高血压和糖尿病等基础疾病的患者中, 高钾血症的发生比例更高^[2], 其中 CKD 患者高钾血症的患病率高达 22.89%^[3]。慢性肾脏疾病预后联盟研究的 27 项队列研究结果显示, 高钾血症 (血清 $K > 5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在普通人群队列中的患病率为 0.49%, 而在 CKD 队列中的患病率为 4.2%^[4]。随着 CKD 的进展, 高钾血症的发病率逐渐升高, CKD 1 期和 5 期的高钾血症发病率分别为 8.9% 和 56.7%^[5]。高钾血症已被证明是影响 CKD 患者生存质量的重要因素, 会导致医疗成本和死亡率的升高^[6]。

高钾血症也是引起血液透析 (hematodialysis, HD) 患者致死的重要因素之一。研究显示 HD 患者的高钾血症患病率高达 30% ~ 50%^[7]。高钾血症是一个反复发作的慢性过程, 首次高钾血症发作后, 患者可能持续处于高血钾状态^[8-9]。法国 14 个血液透析中心的 527 例 HD 患者数据显示, 40% 高钾血症会在一个月内复发^[10]。HD 虽然能够清除体内钾离子, 但是透析后 1 h 患者的血钾水平会迅速升高, 且在非透析日的血钾无法得到有效排除, 易引起高钾血症进而增加患者心律失常、心搏骤停及心血管死亡风险^[11], 所以 HD 患者的高钾管理尤为重要。

然而, 传统口服降钾药物长期治疗高钾血症时存在诸多问题。例如葡萄糖和胰岛素、碳酸氢钠和利尿剂等传统治疗方法可以有效降低血钾浓度, 但它们不能改变体内钾的总量, 因此不适合慢性高钾血症患者的长期管理^[12]。聚苯乙烯磺

酸钠曾是美国食品药品监督管理局唯一批准用于高钾血症治疗的药物, 但因起效缓慢, 不能用于急性高钾血症, 且产生的肠道不良反应十分严重, 特别是肠梗阻和结肠坏死, 故临床使用较少^[13-14]。因此亟须一种更安全有效的手段来治疗高钾血症。

作为人造树脂的胃肠道阳离子交换剂环硅酸锆钠 (sodium zirconium cyclosilicate, SZC), 可以结合肠道中的钾排出体外, 降低患者体内血钾值^[15]。研究表明, 患有高钾血症的 CKD 患者和 HD 患者在接受 SZC 治疗后, 血钾下降稳定, 不良反应较少。但是由于 SZC 作为治疗高钾血症的新型离子交换树脂, 上市时间短, 疗效和安全性尚未得到广泛验证^[16]。因此本文旨在通过循证医学方法, 对 SZC 治疗 CKD 伴高钾血症和 HD 伴高钾血症患者有效性与安全性进行 meta 分析, 旨在为临床用药提供依据。

1 资料与方法

1.1 文献检索策略

检索中国知网、中国生物医学文献数据库、维普数据库、万方数据库、Cochrane Library、PubMed、Embase、Web of Science; 检索时间为各数据库建库至 2023 年 7 月 1 日; 中文检索词: “慢性肾脏病” “终末期肾病” “血液透析” “慢性肾衰竭” “环硅酸锆钠”。英文检索词: “chronic kidney diseases” “end-stage renal disease” “hematodialysis” “chronic renal failure” “sodium zirconium cyclosilicate”。

1.2 文献纳入及排除标准

纳入标准: ① 研究对象为 CKD 伴高钾血症

患者或 HD 伴高钾血症患者，年龄 18 岁以上；② 试验设计为随机对照研究 (RCT)，语种限中英文；③ 研究必须具有明确的疗效指标，包括干预前后的基线值；④ 文献的干预措施为试验组采用 SZC 或 SZC 加低钾饮食，对照组采用安慰剂或低钾饮食，两组均不服用其他降钾药，且治疗时间不限。

排除标准：① 试验没有明确的疗效判定指标；② 文献无全文或无完整的数据；③ 患者服用除 SZC 外的其他降钾药。

1.3 文献筛选及数据提取

由两名研究者严格按照纳入和排除标准筛选文献及提取相关数据，并由第三方进行核对检查，出现不同意见时三方共同决定。提取的内容包括：① 作者姓名、发表时间；② 两组基本资料、样本量及透析时间；③ 有效性指标：治疗前后血钾水平变化；④ 安全性指标：治疗前后血钾、血钠、血钙、血镁和血磷水平的影响、低钾血症发生率、便秘发生率、胃肠道不良反应发生率、外周水肿发生率。

1.4 文献质量评价

针对 RCT 的文献质量评价，本研究采用 Cochrane 协作网提供的专门的偏倚风险评价工具，RoB2 进行文献质量评价。RoB2 设置了 5 个领域的评价条目：① 研究随机化过程中产生的偏倚；② 偏离既定干预措施产生的偏倚；③ 结局指标缺失产生的偏倚；④ 测量结局指标时产生的偏倚；⑤ 结果选择性报告产生的偏倚。每个领域的评估结果分为三个等级：低风险 (low risk of bias)、有一定风险 (some concerns)、高风险 (high risk of bias)。

1.5 统计学处理

连续变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组干预前后数据变化计算公式为 $SD^2 \text{change} = [SD^2_{\text{治疗前}} + SD^2_{\text{治疗后}} - (2 \times \text{Corr} \times SD_{\text{治疗前}} \times SD_{\text{治疗后}})]$, Corr 取 0.5。采用 R 4.3.1 软件进行分析。若异质性检验 $P \geq 0.05$ 且 $I^2 \leq 50\%$ 时，说明异质性无统计学意义，采用固定效应模型分析；若异质性检验 $P < 0.05$ 或 $I^2 > 50\%$ 时，说明异质性有统计学意义，采用随机效应模型分析，并利用敏感性分析等方法对异质性来源进行探讨。连续变量的合并效应量采用均数差 (MD) 及其 95% 置信区间 (CI) 表示，二分类变量和合并效应量采用相对危险度 (RR) 及其 95% CI 表示。

2 结果

2.1 文献筛选流程

本课题经过初步检索一共获得有关文献 278 篇，严格按照纳入及排除标准筛选后，最终纳入 11 篇 RCT 研究，8 篇为英文，3 篇为中文。文献筛选流程见图 1。

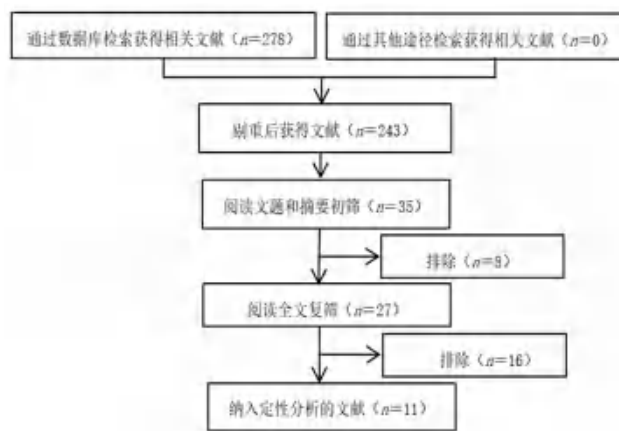


图 1 文献筛选流程及结果

Fig 1 Literature screening process and results

2.2 纳入文献的基本信息

纳入研究的发表年限为 2014—2023 年，所有研究均为随机平行试验；11 篇文献共包括 1321 例患者，试验组 664 例，对照组 657 例，研究时间由 2 d 到 11 周不等，所有纳入文献结局指标均包含明确的疗效判定指标。其中试验组和对照组患者性别、年龄、体质量指数 (BMI)、病程等人口统计学特征基本保持一致，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。纳入的文献基本特征见表 1。

2.3 纳入文献的质量评价

纳入的 11 项研究均为 RCT 研究，其中 7 项研究中采用了具体的随机方法，评定为低风险；3 项研究随机方法不清楚，评定为有一定风险；1 项研究采用了适应性随机化方法，评定为高风险。6 项研究在试验中护理人员、干预措施提供者和受试者均不知道受试者分配到哪种干预措施，评定为低风险；5 项研究在试验中护理人员、干预措施提供者和受试者可能知道受试者被分配到哪种干预措施，评定为有一定风险。10 项研究没有结局数据缺失，评定为低风险；1 项研究存在结局数据缺失，且没有证据证明结局数据的缺失没有对结果造成偏倚，评定为有一定风险。所有纳入研究均无结局测量的偏倚，评定为低风险。所有纳入研究均无选择性报告结果，评定为低风险 (见图 2)。

表 1 纳入 meta 分析文献的基本信息
Tab 1 Includes the basic information of the meta-analysis literature

纳入文献	地区	疾病类型	例数	干预措施		治疗时间	结局指标
				试验组	对照组		
Ash ^[17]	美国	CKD	24/30	SZC	安慰剂	2 d	血钾、便秘、腹泻
Zannad ^[18]	亚洲	CKD	99/50	SZC	安慰剂	4 周	血钾、便秘、腹泻、水肿、低钾血症
Kosiborod ^[19]	美国	CKD	51/85	SZC	安慰剂	4 周	血钾、胃肠道、水肿、低钾血症
Packham ^[20]	美国	CKD	143/158	SZC	安慰剂	2 d	血钾、腹泻、低钾血症
Kashihara ^[21]	日本	CKD	36/33	SZC	安慰剂	2 d	血钾、低钾血症
董生荣 ^[22]	中国	HD	35/35	低钾饮食 + SZC	低钾饮食	6 周	血钾、血钠、血钙、血镁、血磷、便秘、水肿
童成林 ^[23]	中国	HD	36/28	低钾饮食 + SZC	低钾饮食	6 周	血钾、血钠、血钙、血镁、血磷、便秘、水肿
秦玉萍 ^[24]	中国	HD	30/30	低钾饮食 + SZC	低钾饮食	4 周	血钾、血钠、血钙、血镁
Fishbane ^[25]	美国、日本	HD	97/99	SZC	安慰剂	11 周	血钾
Ni ^[26]	中国	HD	66/67	SZC	安慰剂	12 周	血钾、低钾血症、腹泻、胃肠道
Ford ^[27]	美国、日本	HD	46/42	SZC	安慰剂	4 周	血钾

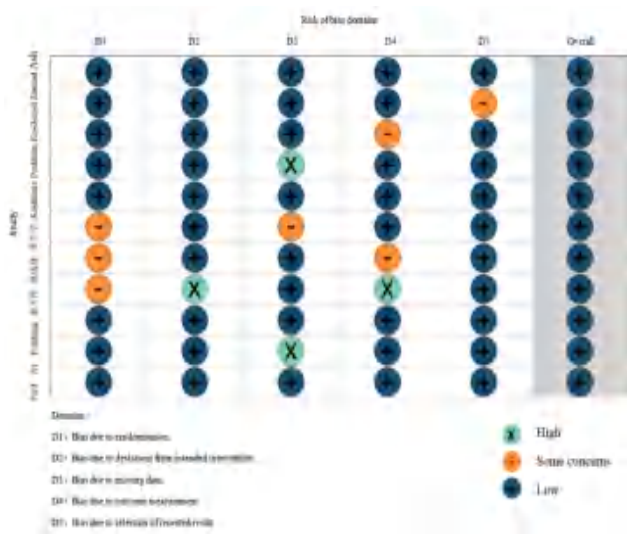


图 2 文献质量评价结果
Fig 2 Literature quality evaluation

2.4 纳入文献的 meta 分析结果

2.4.1 对血钾水平的影响 5 篇文献^[17-21]报道了 CKD 伴高钾血症患者使用 SZC 治疗前后血钾水平的变化，纳入病例数为 709 例，其中试验组 (SZC 组) 353 例，对照组 356 例。各研究间存在异质性 ($I^2 = 69\%$, $P = 0.01$)，采用随机效应模型进行合并分析。Meta 分析结果显示，与对照组相比，SZC 的降钾效果显著 [$MD = -0.69$, $95\%CI (-0.85 \sim -0.52)$]。

6 篇文献^[22-27]报道了 HD 伴高钾血症患者使用 SZC 治疗前后血钾水平的变化，纳入病例数为 612 例，其中试验组 (SZC 组) 311 例，对照组 301 例。各研究间存在异质性 ($I^2 = 83\%$, $P < 0.01$)，采用随机效应模型进行合并分析。结果显示与对照组相比，试验组的降钾效果显著 [$MD = -0.65$, $95\%CI (-0.86 \sim -0.44)$] (见图 3)。

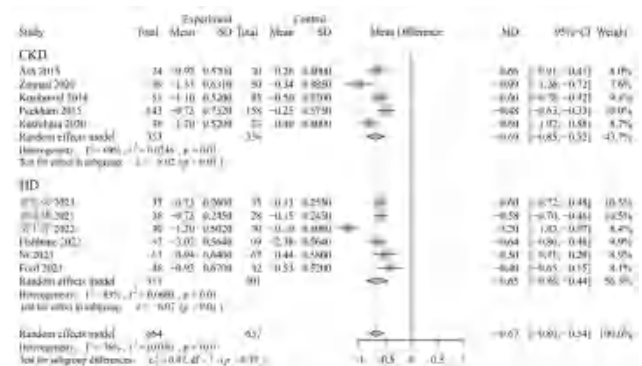


图 3 试验组与对照组对血钾水平的影响
Fig 3 Blood potassium levels in the experimental group and the control group

2.4.2 亚组分析 6 篇文献^[18, 21-24, 26]报道了在亚洲人群中使用 SZC 治疗前后降钾效果的对比，纳入病例数为 546 例，其中试验组 (SZC 组) 303 例，对照组 243 例。各研究间存在异质性 ($I^2 = 85\%$, $P < 0.01$)，采用随机效应模型进行合并分析。Meta 分析结果显示，在亚洲人群当中使用 SZC 的降钾效果显著，可以快速降低患者血钾 [$MD = -0.76$, $95\%CI (-0.98 \sim -0.55)$] (见图 4)。

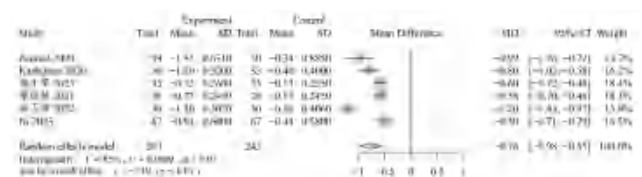


图 4 试验组与对照组在亚洲人群中的亚组分析
Fig 4 Subgroup analysis of the experimental group and the control groups in Asian population

2.4.3 对电解质水平的影响 3 篇文献^[22-24]报道了使用 SZC 治疗前后电解质水平的变化，纳入病例数为 194 例，其中试验组 (SZC 组) 101 例，

对照组 93 例。各研究间不存在异质性 ($I^2 = 0\%$, $P = 0.88$), 采用固定效应模型进行合并分析。Meta 分析结果显示, 对于血钙、血钠、血镁和血磷, 试验组与对照组差异无统计学意义 [$MD = 0.01, 95\%CI (-0.04 \sim 0.05)$] (见图 5)。

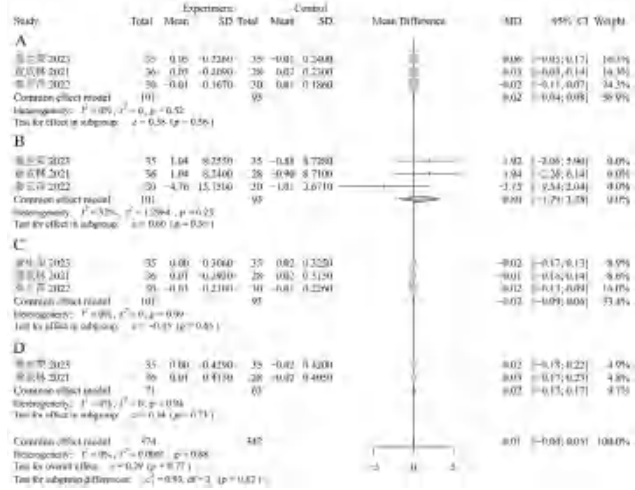


图 5 试验组与对照组对电解质水平的影响
Fig 5 Electrolyte levels of the experimental group and the control group
A. 血钙 (blood calcium); B. 血钠 (blood sodium); C. 血镁 (blood magnesium); D. 血磷 (blood phosphorus)

2.4.4 不良反应发生率 9 篇文献^[17-24, 26]报道了使用 SZC 治疗前后出现不良反应的情况, 纳入病例数为 1037 例, 其中试验组 (SZC 组) 521 例, 对照组 516 例。对于低钾血症, 便秘和外周水肿发生率各研究间不存在异质性 ($I^2 = 0\%$, P 均 > 0.01), 采用固定效应模型进行合并分析。对于胃肠道反应发生率, 各研究间存在异质性 ($I^2 = 58\%$, $P = 0.07$), 采用随机效应模型进行合并分析。Meta 分析结果显示, 对于便秘、胃肠道反应和外周水肿发生率, 试验组和对照组差异无统计学意义, 低钾血症的发生率试验组大于对照组 [$RR = 5.93, 95\%CI (1.46 \sim 24.04)$] (见图 6)。

2.4.5 敏感性分析 本研究通过逐一剔除文献后对各指标的合并结果进行敏感性分析发现, CKD 伴高钾血症患者使用 SZC 治疗前后血钾水平的变化异质性主要来自 Zannad 等^[18]2020 年的研究, 异质性明显降低 ($I^2 = 0\%$, $P = 0.58$); HD 伴高钾血症患者使用 SZC 治疗前后血钾水平的变化异质性主要来自秦玉萍等^[24]2022 年的研究, 异质性明显降低 ($I^2 = 0\%$, $P = 0.52$), 两项合并后不存在异质性 ($I^2 = 0\%$, $P = 0.71$) (见图 7)。

3 讨论
在这项对 11 篇 RCT 的 1321 例患者的 meta 分析中, 将试验组与对照组在 CKD 和 HD 伴高

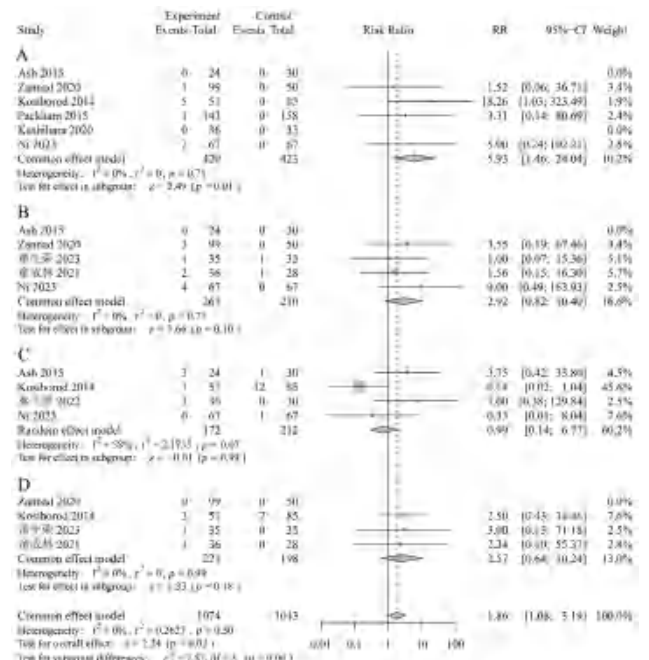


图 6 试验组与对照组不良反应发生率
Fig 6 Incidence of adverse reactions in the experimental group and the control group
A. 低钾血症 (hypokalemia); B. 便秘 (constipation); C. 胃肠道不良反应 (gastrointestinal adverse reaction); D. 外周水肿 (peripheral edema)

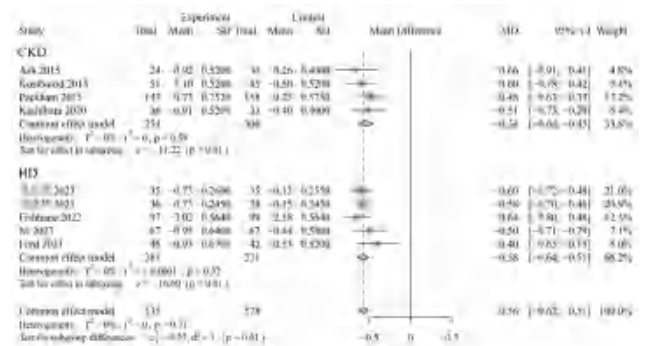


图 7 对血钾水平影响的敏感性分析
Fig 7 Sensitivity analysis of the influence of blood potassium level

钾血症患者进行了有效性和安全性比较。汇总人群分析的主要发现是与对照组相比, SZC 能够显著降低 CKD 患者的血钾水平, 这与中国慢性肾脏病患者血钾管理实践专家共识^[2]当中提到的效果一致。同时 SZC 也能够降低 HD 患者在非透析日的血钾值, 使患者在透析前后的血钾波动减少, 降低患者心血管相关死亡和全因死亡风险。亚组分析结果显示, 在亚洲人群中与对照组相比, SZC 降低患者血钾水平较好, 目前尚未有系统评价汇总在亚洲人群中使用 SZC 的有效性和安全性。SZC 在降低患者血钾水平的同时, 不影响其他电解质水平 (包括血钙、血钠、血镁和

血磷), 这与 Yao 等^[28]的研究结果一致, SZC 对钾离子具有高度选择性。两组间在便秘、胃肠道和外周水肿的不良反应发生率方面差异没有统计学意义, 但试验组出现低钾血症的频率大于对照组, 提示患者在使用 SZC 的过程中可能出现低钾血症, 在长期应用中应定期监测患者的血钾值, 根据变化调整剂量。

CKD 和 HD 患者往往合并多种并发症, 患者常需要使用肾素-血管紧张素-醛固酮系统拮抗剂 (RAASi)、螺内酯、 β -受体阻滞剂等药物治疗, 但是这些药物均会增加高钾血症风险^[29-31]。目前已有研究对高钾血症导致心力衰竭的患者使用 SZC 的疗效进行了系统评价: Carvalho 等^[32]的系统评价结果显示使用新的钾结合剂 Patiromer 或 SZC 可以增加 RAASi 的治疗优化率 [RR = 1.14, 95%CI (1.02 ~ 1.28)], 并降低高钾血症的风险 [RR = 0.66, 95%CI (0.52 ~ 0.84)], 但会导致患者发生低钾血症的风险显著增加 [RR = 5.61, 95%CI (1.49 ~ 21.08)]。所以对于 CKD 和 HD 患者使用 SZC 能否增加 RAASi、螺内酯、 β -受体阻滞剂等药物的治疗优化率需要进行更深入的研究。

本研究存在以下局限性: 所纳入研究的数量及样本量均偏少且部分指标只纳入 2 ~ 3 项研究, 可能存在发表偏倚。SZC 在中国上市时间较短, 疗效和安全性仍需更多研究来验证。缺乏长期的观察性研究, 纳入研究的随访期从 2 d 到 12 周不等, 分析临床终点的时间很短。

综上所述, 当前证据表明, 对于 CKD 和 HD 伴高钾血症患者规律使用 SZC 可以快速降低血钾值到正常范围, 在亚洲人群中同样适用, 并且不影响其他电解质水平, 安全性良好。本研究基于已有的临床数据, 对 CKD 和 HD 伴高钾血症患者使用 SZC 的有效性和安全性进行了评价, 但目前研究数量较少, 还需要更多设计严谨、大样本量的随机对照临床研究, 为 SZC 的临床使用提供更多更可靠的循证依据。

参考文献

- [1] Valdivielso JM, Balafa O, Ekart R, et al. Hyperkalemia in chronic kidney disease in the new era of kidney protection therapies [J]. *Drugs*, 2021, 81 (13): 1467-1489.
- [2] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 中国慢性肾脏病患者血钾管理实践专家共识 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2020, 36 (10): 781-792.
- [3] Kashihara N, Kohsaka S, Kanda E, et al. Hyperkalemia in real-world patients under continuous medical care in Japan [J]. *Kidney Int Rep*, 2019, 4 (9): 1248-1260.
- [4] Kovesdy CP, Matsushita K, Sang Y, et al. Serum potassium and adverse outcomes across the range of kidney function: a CKD prognosis consortium meta-analysis [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39 (17): 1535-1542.
- [5] Borrelli S, Matarazzo I, Lembo E, et al. Chronic hyperkalemia in chronic kidney disease: an old concern with new answers [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (12): 1-13.
- [6] Yamada S, Inaba M. Potassium metabolism and management in patients with CKD [J]. *Nutrients*, 2021, 13 (6): 1-19.
- [7] Agiro A, Duling I, Eudicone J, et al. The prevalence of predialysis hyperkalemia and associated characteristics among hemodialysis patients: the RE-UTILIZE study [J]. *Hemodial Int*, 2022, 26 (3): 397-407.
- [8] Karoboyas A, Zee J, Brunelli SM, et al. Dialysate potassium, serum potassium, mortality, and arrhythmia events in hemodialysis: results from the dialysis outcomes and practice patterns study (DOPPS) [J]. *Am J Kidney Dis*, 2017, 69 (2): 266-277.
- [9] Karoboyas A, Robinson BM, James G, et al. Hyperkalemia excursions are associated with an increased risk of mortality and hospitalizations in hemodialysis patients [J]. *Clin Kidney J*, 2021, 14 (7): 1760-1769.
- [10] Rossignol P, Lamiral Z, Frimat L, et al. Hyperkalemia prevalence, recurrence and management in chronic haemodialysis: a prospective multicentre French regional registry 2-year survey [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32 (12): 2112-2118.
- [11] Huang YY, Wang J, Wang NN, et al. Related factors for hyperkalemia and its recurrence in maintenance hemodialysis patients [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2021, 101 (42): 3484-3489.
- [12] Nguyen T, Ondrik D, Zhufyak O, et al. Hyperkalemia and potential pitfalls of sodium polystyrene sulfonate [J]. *JAAPA*, 2015, 28 (3): 41-45.
- [13] Palmer BF, Clegg DJ. Diagnosis and treatment of hyperkalemia [J]. *Cleve Clin J Med*, 2017, 84 (12): 934-942.
- [14] Long B, Warix JR, Koyfman A. Controversies in management of hyperkalemia [J]. *J Emerg Med*, 2018, 55 (2): 192-205.
- [15] Takkar C, Nassar T, Qunibi W. An evaluation of sodium zirconium cyclosilicate as a treatment option for hyperkalemia [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021, 22 (1): 19-28.
- [16] Nassif ME, Kosiborod M. New frontiers for management of hyperkalaemia: the emergence of novel agents [J]. *Eur Heart J Suppl*, 2019, 21 (Suppl A): A34-A40.
- [17] Ash SR, Singh B, Lavin PT, et al. A phase 2 study on the treatment of hyperkalemia in patients with chronic kidney disease suggests that the selective potassium trap, ZS-9, is safe and efficient [J]. *Kidney Int*, 2015, 88 (2): 404-411.

- [18] Zannad F, Hsu BG, Maeda Y, et al. Efficacy and safety of sodium zirconium cyclosilicate for hyperkalaemia: the randomized, placebo-controlled HARMONIZE-global study [J]. *ESC Heart Fail*, 2020, 7 (1): 54-64.
- [19] Kosiborod M, Rasmussen HS, Lavin P, et al. Effect of sodium zirconium cyclosilicate on potassium lowering for 28 days among outpatients with hyperkalemia: the HARMONIZE randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2014, 312 (21): 2223-2233.
- [20] Packham DK, Rasmussen HS, Lavin PT, et al. Sodium zirconium cyclosilicate in hyperkalemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372 (3): 222-231.
- [21] Kashihara N, Nishio T, Osonoi T, et al. Correction of serum potassium with sodium zirconium cyclosilicate in Japanese patients with hyperkalemia: a randomized, dose-response, phase 2/3 study [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2020, 24 (12): 1144-1153.
- [22] 董生荣, 景舒梦, 苟伟康, 等. 环硅酸锆钠治疗围透析期患者慢性高钾血症的有效性研究 [J]. *中国卫生标准管理*, 2023, 14 (2): 140-143.
- [23] 童成林, 黄益麒. 环硅酸锆钠治疗维持性血液透析患者高钾血症的疗效 [J]. *江苏医药*, 2021, 47 (9): 899-902.
- [24] 秦玉萍, 路利娟, 季帅燕. 环硅酸锆钠散对维持性血液透析合并高钾血症患者短期降钾的疗效观察 [J]. *南通大学学报 (医学版)*, 2022, 42 (3): 280-282.
- [25] Fishbane S, Ford M, Fukagawa M, et al. Potassium responses to sodium zirconium cyclosilicate in hyperkalemic hemodialysis patients: post-hoc analysis of DIALIZE [J]. *BMC Nephrol*, 2022, 23 (1): 59-67.
- [26] Ni ZH, Lu RH, Xu XD, et al. DIALIZE China: a phase IIIb, randomized, placebo-controlled study to reduce pre-dialysis hyperkalemia with sodium zirconium cyclosilicate in Chinese patients [J]. *Clin Ther*, 2023, 16 (18): 1-10.
- [27] Ford M, Fishbane S, Spinowitz B, et al. Effectiveness of sodium zirconium cyclosilicate in hemodialysis patients with severe hyperkalemia [J]. *Kidney Int Rep*, 2021, 6 (12): 3074-3078.
- [28] Yao L, Xing XY, Li YB, et al. Effects of different potassium-lowering regimens on acute hyperkalemia in hemodialysis patients: a real-world, retrospective study [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1): 333-341.
- [29] Banerjee D, Rosano G, Herzog CA. Management of heart failure patient with CKD [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2021, 16 (7): 1131-1139.
- [30] Palmer BF. Potassium binders for hyperkalemia in chronic kidney disease-diet, renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor therapy, and hemodialysis [J]. *Mayo Clin Proc*, 2020, 95 (2): 339-354.
- [31] Leon SJ, Whitlock R, Rigatto C, et al. Hyperkalemia-related discontinuation of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors and clinical outcomes in CKD: a population-based cohort study [J]. *Am J Kidney Dis*, 2022, 80 (2): 164-173.
- [32] Carvalho P, Veiga T, Lacerda H, et al. Safety and efficacy of new potassium binders on hyperkalemia management in patients with heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Clin Res Cardiol*, 2023, 112 (7): 991-1002.

(收稿日期: 2023-08-08; 修回日期: 2023-09-01)

口服中成药治疗慢性脑供血不足的用药规律研究

秦璎琳¹, 金香兰^{2*} (1. 北京中医药大学第二临床医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

摘要: **目的** 分析治疗慢性脑供血不足的口服中成药的用药特点及组方规律, 为临床治疗和新药研发提供参考。**方法** 通过检索中国知网、万方、维普、PubMed 等中英文数据库, 筛选中成药治疗慢性脑供血不足的相关文献。建立数据库并提取有效信息, 统计中成药剂型、使用频率、证型、单味中药使用频次及性味归经、高频药对; 利用 SPSS Modeler 软件对中药进行关联规则分析。**结果** 共收集 481 篇文献, 涉及 86 种中成药, 中成药剂型以胶囊剂为主, 养血清脑颗粒用于治疗慢性脑供血不足使用频次最高, 慢性脑供血不足涉及多个证型; 使用频次较高的单味中药有川芎、丹参、当归、黄芪、牛膝、甘草、天麻等, 药物性味以温药、苦味为主, 归经以肝、心、脾为主, 功效以活血祛瘀、补血为主; 高频药对为川芎-当归、川芎-丹参、川芎-红花、川芎-黄芪, 功效以补血活血、活血祛瘀、活血通经、益气活血为主; 关联规则分析结果显示, 核心组方为黄芪、川芎、当归、红花、丹参。**结论** 中成药治疗慢性脑供血不足涉及多个证型, 川芎是其核心用药, 益气活血通络为其基本组方思路, 黄芪、川芎、当归、红花、丹参为其核心处方。

关键词: 中成药; 慢性脑供血不足; 用药规律

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)01-0240-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.038

Medication rules of oral Chinese patent medicine for chronic cerebral circulation insufficiency

QIN Ying-lin¹, JIN Xiang-lan^{2*} (1. *The Second Clinical School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029*; 2. *Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078*)

Abstract: Objective To analyze the medication characteristics and composition rules of oral Chinese patent medicines for chronic cerebral circulation insufficiency, and to provide reference for clinical treatment and new drug development. **Methods** By searching CNKI, Wanfang, VIP, PubMed database and other Chinese and English databases, related literatures of Chinese patent medicines were screened. We established a database and collected useful information: dosage form, frequency of use, certificate type, frequency of use of single flavor Chinese medicine, taste attribution, and high-frequency drug pairs. SPSS Modeler software was used to associate the rules with traditional Chinese medicines. **Results** Totally 481 articles were collected, involving 86 Chinese patent medicines. The dosage form of Chinese patent medicines was mainly capsules. Yangxue Qingnao granules were most frequently used for multiple types of chronic cerebral circulation insufficiency. Single-flavor traditional Chinese medicines used frequently included *Ligusticum chuanxiong*, *Salvia miltiorrhiza*, *Angelica sinensis*, *Astragalus membranaceus*, *Achyranthes bidentata*, *Glycyrrhiza uralensis*, and *Gastrodia elata*, etc., with medicinal taste mainly being warm medicine and bitter taste. The meridian covered mainly the liver, the heart and the spleen to activate the blood and remove the stasis and replenish the blood. Drugs with high-frequency included *Ligusticum chuanxiong*-*Angelica*

基金项目: 全国中医临床特色技术传承骨干人才培养项目(国中医药人教函[2019]36号); 北京中医药大学 2020 年度基本科研业务费重点攻关项目(No. 2020-JYB-ZDGG-124)。

作者简介: 秦璎琳, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中医药防治脑病研究, email: 1830370808@qq.com * **通信作者:** 金香兰, 女, 主任医师, 主要从事中医药防治脑病研究, email: jxlan2001@126.com

sinensis, *Ligusticum chuanxiong-Salvia miltiorrhiza*, *Ligusticum chuanxiong-Carthamus tinctorius* and *Ligusticum chuanxiong-Astragalus membranaceus*, and their effects were mainly to replenish and activate blood, activate the blood and circulation, dispel the stasis, and invigorate qi. The rules association that the core components were *Astragalus membranaceus*, *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *Carthamus tinctorius* and *Salvia miltiorrhiza*. **Conclusion** There are multiple types of chronic cerebral circulation insufficiency. *Ligusticum chuanxiong* is mostly commonly used. Qiinvigorating and blood circulation activation are the basic mechanism, and *Astragalus membranaceus*, *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *Carthamus tinctorius* and *Salvia miltiorrhiza* consists of the core prescriptions.

Key words: Chinese patent medicine; chronic cerebral circulation insufficiency; medication rule

慢性脑供血不足 (chronic cerebral circulation insufficiency, CCCI) 是指各种原因导致全脑出现长期、慢性的血流供应减少, 引起脑组织不同程度病理损害, 是临床常见的缺血性脑血管病^[1]。CCCI 主要临床表现为头晕、头痛、睡眠障碍、记忆力下降、情绪波动等, 若不及时进行干预, 易发展为认知障碍及其他脑血管病, 目前研究发现 CCCI 是导致血管性痴呆、阿尔茨海默病、缺血性卒中的中间环节^[2]。据统计, 我国 60 岁以上人群中约 2/3 存在 CCCI, 严重威胁老年人的身体健康和^[3]。目前, CCCI 药物治疗以对因及对症治疗为主, 包括控制血压、改善脑部血流循环、止晕、改善认知等, 但多种药物联合使用降低了患者的服药依从性, 且易产生不良反应。

中医学虽然对 CCCI 无专门的论述, 但对本病的描述散见于“眩晕”“头痛”“健忘”等疾病中。中药组方立足于整体, 且药物成分具有多靶点、多通路的优势, 在改善 CCCI 的同时, 还可以改善头晕、记忆力下降等症状。大量临床研究显示口服中成药在治疗 CCCI 方面取得了较好的临床效果, 临床应用前景好^[4]。但目前研究涉及的中成药种类较多, 缺乏对方药信息的整体把握。本研究通过数据挖掘整理口服中成药治疗 CCCI 的处方, 分析该类药物的用药规律, 以期治疗 CCCI 和新药研发提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源与文献检索

系统检索中国知网、维普、万方、PubMed 等中英文数据库, 收集 2000 ~ 2023 年公开发表的临床研究。中文检索词包括 (“供血不足” OR “慢性脑缺血”) AND (“丸” OR “方” OR “胶囊” OR “颗粒” OR “散” OR “液”) 等, 英文检索词包括 (“chronic cerebral circulatory insufficiency” OR “chron-

ic cerebral hypoperfusion”) AND (“pill” OR “capsule” OR “granule” OR “powder” OR “oral liquid”) 等。共检索到 2741 篇。

1.2 处方筛选标准

纳入标准: ① 研究类型为临床研究; ② 研究对象为 CCCI 患者; ③ 临床研究中使用已上市的中成药进行治疗; ④ 临床疗效确切。

排除标准: ① 成分为中药加工提取物, 如三七通舒胶囊; ② 主要成分含有西药, 如心脑血管软胶囊。

1.3 数据库建立及数据规范化处理

1.3.1 数据库的建立 将文献导入 NoteExpress 5.4 中, 首先剔除重复文献, 然后按照处方筛选标准, 通过阅读标题、摘要, 再次对文献进行筛选, 获得最终文献。由两名研究者提取数据, 包括标题、作者、中成药处方名称、主治、功效、组成等信息。其中处方辅料不录入, 如“蜂蜜”“糊精”等。

1.3.2 数据规范化处理 对收集到的中成药进行规范化处理, 以《中药学》和《中国药典》为标准, 删除炒、炙、蜜制等炮制方法, 如制何首乌规范为何首乌, 炒桃仁规范为桃仁。

1.4 数据分析

1.4.1 描述性分析 通过 Excel 2003 统计中成药治疗 CCCI 的剂型和使用频次、中成药使用频次情况、提取药物说明书适应证证型; 统计高频单味中药及药对; 统计所有中成药药物性味归经。

1.4.2 关联规则分析 应用 IBM SPSS Modeler 18.0 Premium 软件, 采用 Apriori 算法挖掘中成药治疗 CCCI 配伍规律, 统计 2 ~ 3 种药物支持度排名前 5 位的关联规则。取高频药物与支持度高的药物配伍交集作为核心处方。

2 结果

2.1 文献检索结果

通过对中成药治疗 CCCI 的临床研究文献进行检索和筛选,共纳入 481 篇文献,其中中国知网 413 篇,万方 65 篇,维普 3 篇,采用 GraphPad Prism 9 绘制文献检索流程图,见图 1。

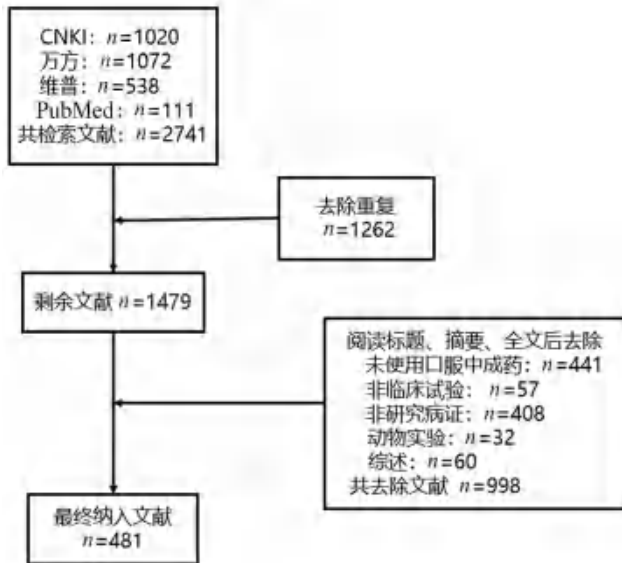


图 1 文献筛选流程图

Fig 1 Flowchart of the literature search selection

2.2 用药频次

所纳入文献中共出现 86 种口服中成药,总频次为 498 次,不同剂型的使用情况见表 1。结果显示 CCCI 临床研究胶囊种类最多。对中成药具体品种的使用情况进行分析,文献发表量排名前 10 位的中成药,总使用频次为 352 次,见图 2。

其中养血清脑颗粒出现频次最高,为 163 次。

表 1 CCCI 中成药剂型使用频次

Tab 1 Frequency statistics of Chinese patent medicines dosage forms use in CCCI

剂型	个数	频次	占比/%
胶囊	48	217	43.57
片剂	10	45	9.04
丸剂	12	39	7.83
颗粒剂	10	185	37.15
口服液	6	12	2.41
合计	86	498	100.00

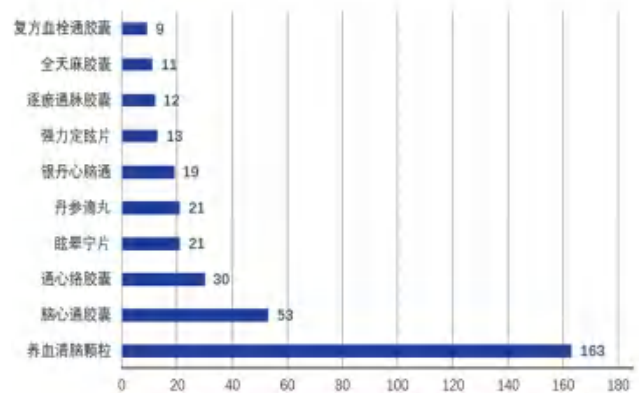


图 2 前 10 位中成药使用频次统计

Fig 2 Frequency statistics of the top 10 Chinese patent medicines use

通过查询纳入研究的中成药说明书,对中成药的辨证使用证型进行归类,发现所纳入的研究中适应证型为血瘀证和气虚血瘀的中成药品种较多,分别为 17、16 种。中成药的具体适应证型情况见表 2。

表 2 CCCI 中成药适应证型统计

Tab 2 Statistics of syndrome types of Chinese patent medicines in CCCI

中成药名称	品种数	证型
大黄蛰虫丸、大株红景天胶囊、丹参片、丹灯通脑软胶囊、丹田降脂丸、脉血康胶囊、脑髓康胶囊、脑血康滴丸、脑血康片、溶栓胶囊、双丹颗粒、四味通络胶囊、通天口服液、心脉通胶囊、心脑舒通胶囊、中风回春胶囊、逐瘀通脉胶囊	17	血瘀
诺迪康胶囊、抗栓胶囊、乐脉颗粒、脑安胶囊、脑脉泰胶囊、脑心通胶囊、脑安脑片、脑血疏口服液、芪参胶囊、芪龙胶囊、山玫胶囊、通塞脉片、通心络胶囊、消栓胶囊、消栓通络胶囊、活血胶囊	16	气虚血瘀
归脾丸、养血清脑丸、养血清脑颗粒、安神补脑液、参芎胶囊、逍遥丸、舒肝解郁胶囊、芪归蝮蛇胶囊、培元通脑胶囊、软脉灵口服液、天麻醒脑胶囊、眩晕宁颗粒、眩晕宁片、金匱肾气丸、补中益气丸	15	血虚/气血两虚/肾精不足/肝肾亏虚
牛黄降压片、强力定眩片、强力天麻杜仲胶囊、全天麻胶囊、松龄血脉康胶囊、天菊脑安胶囊、天麻钩藤颗粒、天舒胶囊、天智颗粒、消眩止晕片、镇脑宁胶囊、安脑片、愈风宁心片	13	风痰上扰/肝阳上亢
丹参滴丸、复方丹参片、舒脑欣滴丸、心脑宁胶囊、血府逐瘀胶囊、血府逐瘀颗粒、血府逐瘀口服液、银丹心脑通、麝香保心丸	9	气滞血瘀
活血通脉胶囊、降脂通脉胶囊、天丹通络胶囊、头痛宁胶囊、稀莪通栓胶囊、脂必泰胶囊、川芎清脑颗粒、颈复康颗粒、大活络丸	9	痰瘀互结/风湿瘀阻/风湿阻络
灯盏生脉胶囊、复方血栓通胶囊、脉络宁口服液、稳心颗粒、心脑欣胶囊、益脑胶囊、参松养心胶囊	7	气阴两虚

2.3 单味中药使用频次分析

对所纳入单味中药在中成药中的使用频次进行统计,结果显示使用频次 ≥ 10 次的中药有 14

种,排名靠前的为川芎 ($n = 27$)、丹参 ($n = 26$)、当归 ($n = 25$)、黄芪 ($n = 17$)、牛膝 ($n = 16$),具体见图 3。中药高频药物结果显示,药物

功效以活血祛瘀、补血、健脾益气、滋补肝肾、平肝熄风、通经活络为主。

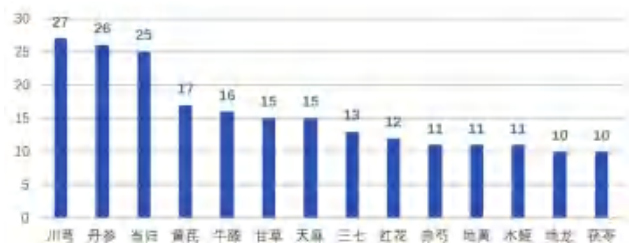


图 3 CCCI 中成药高频药物频次统计
Fig 3 High frequency drug statistics of Chinese patent medicines in CCCI

2.4 中药性味、归经分析

对所有中药进行性味、归经分析，结果显示，药物四气以温药为主，使用频次依次为温 ($n = 285$)、寒 ($n = 179$)、平 ($n = 133$)、凉 ($n = 35$)、热 ($n = 11$)，结果见图 4；药物五味以苦味为主，使用频次依次为苦 ($n = 324$)、甘 ($n = 318$)、辛 ($n = 255$)、咸 ($n = 69$)、酸 ($n = 65$)，见图 4。药物归经排名前 3 位的为肝 ($n = 410$)、心 ($n = 306$)、脾 ($n = 253$)，见图 5。

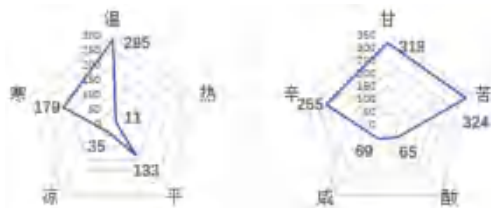


图 4 四气、五味频次分布图
Fig 4 Frequency distribution of four qi and five taste

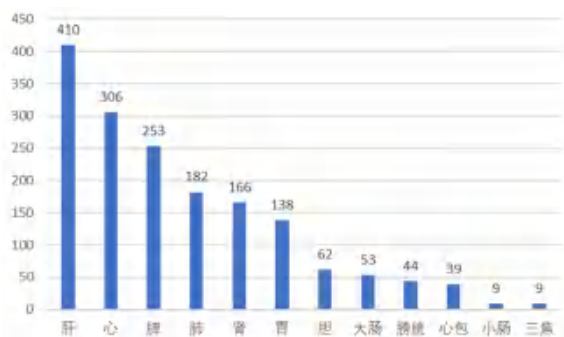


图 5 药物归经频次统计
Fig 5 Frequency statistics of drug meridian tropism

2.5 中药高频药对分析

对所纳入中成药中的药对使用频次进行统计，结果显示药对频次 ≥ 7 次的中药有 17 种，排名前 4 的药对为川芎-当归 ($n = 13$)、川芎-丹参 ($n = 13$)、川芎-红花 ($n = 11$)、川芎-黄芪 ($n = 11$)，具体见表 3。中药高频药对结果显示以补血活血、活血祛瘀、活血通经、补气活血为主。

表 3 CCCI 中成药高频药对统计
Tab 3 High frequency drug pairs statistics of Chinese patent medicines in CCCI

药对	频次	药对	频次
川芎-当归	13	当归-红花	9
川芎-丹参	13	当归-牛膝	8
川芎-红花	11	川芎-牛膝	8
川芎-黄芪	11	川芎-桃仁	7
丹参-三七	10	红花-桃仁	7
当归-甘草	9	丹参-红花	7
丹参-当归	9	川芎-天麻	7
丹参-黄芪	9	赤芍-川芎	7
当归-黄芪	9		

2.6 中药之间关联规则分析

对所有药物进行关联规则分析，统计 2 ~ 3 种药物支持度排名前 5 位的关联规则，得到中成药治疗 CCCI 的核心组方为黄芪、川芎、当归、红花、丹参，结果见表 4，中药之间关联规则网络图，见图 6。

表 4 2 ~ 3 种药物支持度排名前 10 位的关联规则分析
Tab 4 Association rules for the top 10 support rankings of 2 and 3 drugs

药物组合	支持度 /%	置信度 /%
2 种药物		
黄芪-川芎	22.368	64.706
甘草-当归	19.737	60.000
三七-丹参	17.105	61.538
红花-川芎	15.789	91.667
红花-当归	15.789	75.000
3 种药物		
川芎、当归-红花	17.105	61.538
红花、川芎-桃仁	14.474	63.636
红花、川芎-当归	14.474	72.727
黄芪、川芎-丹参	14.474	63.636
红花、当归-桃仁	11.842	66.667

3 讨论

3.1 CCCI 中成药证型及高频中成药分析

人步入中老年后身体机能开始出现衰退，新陈代谢降低。中医理论认为 CCCI 以气血亏虚、肝肾亏损、髓海不足为本，以气机升降失职、浊气上逆、瘀阻蒙蔽脑窍为标，属本虚标实之证^[5]。目前尚无 CCCI 统一认识的辨证分型和治疗方法。黄立武等^[6]对慢性脑缺血患者进行中医证候调查，结果显示以气虚证占比最多，其次为肾虚证、血瘀证、痰浊证、肝阳证，且半数以上患者存在两种证候组合。本研究发现，中成药治疗 CCCI，常见虚证证型为血虚、气血两虚、肾精不足、肝肾阴虚、气阴两虚等，常见实证证型为

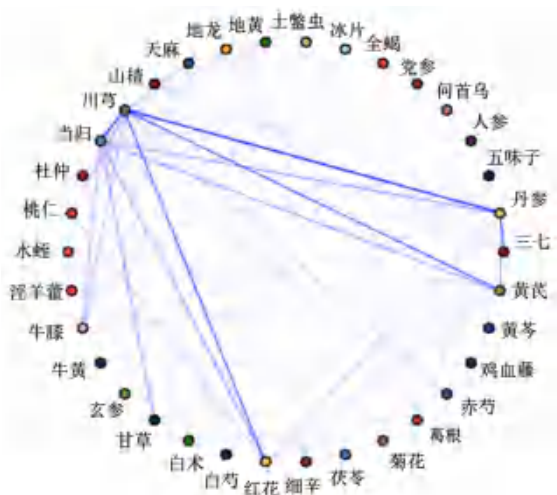


图 6 中药之间关联规则网络图
Fig 6 Network diagram of association rules between traditional Chinese medicine

血瘀、肝风内动、痰瘀互结等，虚实夹杂证型为气虚血瘀。通过整理中成药适应证，本研究发
现 CCCI 在临床治疗也采用对症治疗，头晕、头痛
和记忆力下降是其主要症状。脑为髓海，气血失
于濡养出现头晕，可选用强力定眩胶囊、天麻杜
仲胶囊、眩晕宁等；瘀血阻滞清窍，不通则痛，
发为头痛可选用全天麻胶囊、川芎清脑颗粒、天
麻钩藤颗粒等；神失所养出现记忆力下降等症
状，可选用天智颗粒、养血清脑颗粒、安神补脑
液等。通过整理中成药剂型频次发现，胶囊剂型
使用更多，考虑与其服用方便、能掩盖药物不良
味道，更适用于长期服用有关。本文通过检索文
献发现，养血清脑颗粒在治疗 CCCI 临床研究中
热度最高。

3.2 高频药物、药对及性味归经分析

中药高频药物结果显示，使用频次较高的单
味中药有川芎、丹参、当归、黄芪、牛膝、甘
草、天麻等，药物功效以活血祛瘀、补血、健
脾益气、滋补肝肾、平肝熄风、通经活络为主。
高频药物中有 8 个为活血祛瘀药物，活血化
瘀类药物在疾病治疗中占据重要地位。其中川
芎使用频次最高，川芎具有活血行气、祛风止
痛的作用，《本草纲目》称其为血中之气药，可
上达巅顶，《医学启源》云：“补血，治血虚头
痛”。《本草新编》言其：“血闭者能通，外感
者能散，疗头风其神。”张锡纯称其“能引人
身清轻之气上至于脑”^[7]。现代药理学研究发
现，川芎主要成分苯酞类和有机酚酸类对心脑
血管系统、神经系统具有多方面的药理活性，其
中苯酞类化合物能够扩张血管、抗血小板聚集、
抗血栓形成，且对慢性脑缺血有显著的神经保
护作用^[8]。有机酸类化合物可以通过改善

血液流动性、参与葡萄糖代谢、降低低密度脂
蛋白和总胆固醇的氧化减少患心脑血管病的风险^[9]。
研究发现川芎挥发油还可通过抑制脑内炎症反
应、调节海马神经递质、提高大脑皮层乙酰胆碱
含量改善学习记忆能力^[10]。现代研究证实丹参
主要有效成分丹参多酚酸盐可通过 JAK2/STAT3
信号通路调节脑缺血后血管生长因子，促进脑
缺血后血管生成改善 CCCI^[11]；当归中所含的
挥发油可以使血管阻力降低、脑血流量增加，从
而缓解 CCCI^[12]；黄芪有效成分黄芪甲苷具有多
种药理作用，可以通过保护血脑屏障、调节能量
代谢，清除氧自由基治疗缺氧缺血性脑血管病^[13]；
牛膝中甾酮类化学成分具有神经保护、降血糖、
降脂、抗衰老等作用^[14]；甘草、天麻在药理学
研究中也证实对缺血性脑损伤具有保护作用^[15-16]。

中成药治疗 CCCI 药物性味中四气频次最高
为温，其次是平、微寒；五味频次最高为苦味，
其次为甘味、辛味，甘味药物具有补益的作用，
且药物作用缓和，适应于中老年人，辛味药具
有发散，行气，行血的功效，能够上达巅顶，
作用于脑部，辛甘相配祛瘀而不伤正。药物归
经以肝为主，其次为心、脾。《素问·五脏生
成》记载：“肝藏血，心行之。”脾为气血生
化之源，《名医汇粹》言：“脾统诸经之血”，
三脏在改善 CCCI 方面起到了重要作用。

高频药对以活血祛瘀为主。“川芎-当归”
药对源自宋代《太平惠民和剂局方》的“芎归
汤”，其中川芎辛温香窜，行气活血止痛，当
归性柔而质润，养血活血止痛，川芎以行气为
主，当归以养血为要，两者相伍，互制其短而
展其长，气血兼顾，可增强养血、活血之功。
现代研究发现川芎-当归能够增加大脑血流，为
治疗缺血性脑血管病的核心组合，其配伍使用
能起到协同增效的作用^[17]。“川芎-丹参”
药对为活血化瘀类复方中药常见的组合，其中
川芎性温，入心经，可上行头目，为血中之
动品，丹参，性微寒，主入心、肝经，为血中
之静品，两者相伍，静中有动，使人体气血运
行流畅，广泛用于心脑血管疾病的治疗，临床
研究发现其有效成分可以共同发挥调节脂代
谢、减轻血管内皮损伤、保护神经等作用^[18-19]。

3.3 关联规则及核心处方分析

关联规则显示黄芪-川芎支持度最高，川
芎、黄芪为经典益气活血药对，黄芪补脾肺
气、生津养血，川芎活血化瘀，行气通滞，气
为血之帅，血为气之母，两者共奏益气活血之
效，使血

脉通畅，气血充沛。研究显示黄芪与川芎配伍对药物吸收有明显的促进作用^[20]，对治疗脑卒中有一定防治作用^[21]，明确益气活血法在 CCCI 中的潜在配伍规律。3 种药物关联规则支持度最高的为“川芎、当归-红花”，为补阳还五汤的组成，此组方意在活血通经，消除血脉瘀滞，使脉道通畅，本研究得出核心处方黄芪、川芎、当归、红花、丹参。其中川芎、当归、红花、丹参虽都为活血类药物，但又各有不同。川芎为血中之气药，一方面可以助血行，另一方面可治疗 CCCI 引起的头痛；当归长于补血，为补血圣药；丹参主要走血分可以“破宿血，补新血”，能够祛瘀生新，并具有清心除烦的功效，可治疗 CCCI 伴随的失眠、易怒、心烦等症状；红花，轻灵上浮，走气分，善于疏通头部瘀血，四药相合，祛瘀不伤正，养血不留瘀。黄芪升阳益气，一方面，可以促进血行，并能生血，另一方面，CCCI 患者常有头晕、疲倦等症状，黄芪可以升阳，去除疲倦及气虚下陷导致的头晕等症状，黄芪配伍众多活血药全方共同起到益气活血、疏通脑络之效。

4 总结

本研究通过梳理文献，总结目前治疗 CCCI 的中成药使用情况，并通过数据挖掘，筛选口服中成药治疗 CCCI 的主要证型、高频药物及高频药对等，总结口服中成药治疗 CCCI 的用药规律，以期为治疗 CCCI 和新药研发提供参考。但是本研究仅对治疗 CCCI 的中成药进行用药规律分析，未对古代经典名方和名家经验进行挖掘，故存在一定局限性，在后续研究中将进一步完善，并引入更加多元的现代数理统计学方法，进行更加翔实的挖掘分析，为全面系统展示中医药治疗 CCCI 提供参考。

参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会，中华医学会神经病学分会脑血管病学中国脑血管疾病分类 2015 [J]. 中华神经科杂志，2017，50 (3): 168-171.

[2] Zhou D, Meng R, Li SJ, et al. Advances in chronic cerebral circulation insufficiency [J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24 (1): 5-17.

[3] 李建章. 慢性脑供血不足新思维 [J]. 中国实用神经疾病杂志，2007，10 (5): 1-2.

[4] 陈顺中. 慢性脑供血不足的中医治疗研究进展 [J]. 实用老年医学，2023，37 (2): 124-127.

[5] 高利. 慢性脑缺血中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志，2018，38 (10): 1161-1167.

[6] 黄立武，刁丽梅，陈远平，等. 慢性脑缺血患者中医证候临床调查分析 [J]. 现代中西医结合杂志，2011，20 (25): 3121-3122, 3128.

[7] 张锡纯. 医学衷中参西录 [M]. 北京: 中医古籍出版社，2016: 623.

[8] 唐飞，闫洪玲，杨丽，等. 川芎茎叶中苯酞类化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发，2022，34 (3): 390-398.

[9] 韩炜. 川芎的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药，2017，19 (9): 1341-1349.

[10] 周雪，李小清，刘琪，等. 川芎挥发油防治脂多糖致小鼠血管认知障碍的作用机制研究 [J]. 中草药，2019，50 (10): 2390-2397.

[11] 隋玉玲. 丹参多酚酸盐的药理作用与临床应用研究进展 [J]. 临床合理用药杂志，2017，10 (23): 178-180.

[12] 马艳春，吴文轩，胡建辉，等. 当归的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报，2022，50 (1): 111-114.

[13] 杜澍金，高维娟. 黄芪甲苷对急性缺血性脑卒中神经保护作用研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志，2021，27 (9): 1532-1534.

[14] 罗懿钊，欧阳文，唐代凤，等. 牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展 [J]. 中国现代中药，2020，22 (12): 2122-2136.

[15] 李泽宇，郝二伟，李卉，等. 甘草配伍应用的药理作用及机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28 (14): 270-282.

[16] 全毅恒，上官晨虹，陈琛. 天麻中酚类成分对心脑血管疾病的药理作用研究进展 [J]. 中草药，2022，53 (14): 4582-4592.

[17] 刘亚鹭，徐士欣，张军平，等. 川芎-当归药对有效成分在缺血性脑卒中应用的研究进展 [J]. 华西药学杂志，2018，33 (6): 550-553.

[18] 张翠英. 丹参川芎药对及其组方冠心宁制剂治疗心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中成药，2017，39 (5): 1018-1024.

[19] 赵玉涵，肖光旭，范斯文，等. 丹参-川芎药对治疗心脑血管疾病的作用机制及临床研究 [J]. 中国动脉硬化杂志，2022，30 (6): 461-469.

[20] 周惠芬，何昱，张宇燕，等. 黄芪川芎主要有效成分配伍的转运研究 [J]. 中华中医药学刊，2015，33 (4): 868-871.

[21] 吴作敏，郭丽娜，王单单，等. 黄芪-川芎药对治疗脑卒中的网络药理学研究 [J]. 药物评价研究，2019，42 (9): 1749-1756.

(收稿日期: 2023-07-03; 修回日期: 2023-08-24)

药物与临床

CDK4/6 抑制剂联合芳香化酶抑制剂类药物用于 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线治疗的临床综合评价

张佳雯^{1,2}, 李琴¹, 范国荣¹, 程学芳^{1*} (1.上海交通大学医学院附属第一人民医院临床药学科, 上海 200080; 2.上海市松江区新浜镇社区卫生服务中心药剂科, 上海 201605)

摘要: **目的** 比较 CDK4/6 抑制剂哌柏西利、瑞博西利、阿贝西利联合芳香化酶抑制剂 (AI) 类药物一线治疗 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌的临床综合价值, 以期为临床用药实践提供参考。**方法** 根据《抗肿瘤药品临床综合评价技术指南 (2022 年版试行)》构建 CDK4/6 抑制剂联合 AI 类药物用于 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线治疗的临床综合评价指标体系, 并通过网状 meta 分析、专家咨询等方法进行各维度的临床综合评价。**结果** 在安全性方面, 哌柏西利、瑞博西利和阿贝西利联合 AI 的总体不良反应发生率相似, 但阿贝西利联合 AI 的 3 级以上不良反应发生率最低。在有效性方面, 三种治疗方案在无进展生存期和总生存期方面彼此间差异无统计学意义。在经济性方面, 阿贝西利的治疗所需费用略低于哌柏西利。在创新性方面, 阿贝西利的用药方式和作用靶点更多样, 哌柏西利的专利价值最低但可促进技术国产化。在适宜性方面, 阿贝西利适应证和医保目录涵盖范围更广, 但哌柏西利的药品剂型更多样, 瑞博西利适宜性相对较差。在可及性方面, 阿贝西利的可获得性和可负担性均优于哌柏西利, 瑞博西利尚未在中国上市, 可及性最低。**结论** 综合来看, 阿贝西利在 6 个维度均表现良好, 其临床综合价值高于哌柏西利和瑞博西利。建议临床应用时结合患者基本情况选择适当的药物。

关键词: 临床综合评价; CDK4/6 抑制剂; 芳香化酶抑制剂; 乳腺癌

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0246-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.039

Clinical comprehensive evaluation of CDK4/6 inhibitor combined with aromatase inhibitors drugs for first-line treatment for patients with HR⁺/HER2⁻ advanced breast cancer

ZHANG Jia-wen^{1,2}, LI Qin¹, FAN Guo-rong¹, CHENG Xue-fang^{1*} (1. Department of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200080; 2. Department of Pharmacy, Xinbang Community Health Service Center of Songjiang District, Shanghai 201605)

Abstract: Objective To compare the clinical comprehensive value of CDK4/6 inhibitors palbociclib, ribociclib, and abemaciclib in combination with aromatase inhibitors (AIs) as first-line treatment for patients with HR⁺/HER2⁻ advanced breast cancer, and to provide reference for clinical medication use. **Methods** According to "Clinical Comprehensive Evaluation Technical Guidelines for Antineoplastic Drugs (2022 Trial Version)", a clinical comprehensive evaluation system for CDK4/6 inhibitors in combination with AIs for first-line treatment of HR⁺/HER2⁻ advanced breast cancer was established with network meta-analysis, expert consultation, and other methods.

基金项目: 2021 年上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划——临床药师项目 (沪卫人事 [2022] 65 号)。

作者简介: 张佳雯, 女, 主要从事临床药学研究, email: ZJW15821966478@163.com ***通信作者:** 程学芳, 女, 博士, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: kscxf100@126.com

Results The clinical comprehensive evaluation showed that in terms of safety, the overall incidence of adverse reactions of palbociclib, ribociclib, and abemaciclib in combination with AIs was similar, but abemaciclib in combination with AIs had the lowest incidence of adverse reactions (grade 3 or above). In terms of efficacy, there was no significant difference among the three treatment regimens concerning progression-free survival and overall survival. As to cost-effectiveness, the treatment cost of abemaciclib was slightly lower than that of palbociclib. In terms of innovation, abemaciclib had more diverse drug administration methods and target mechanisms, while palbociclib had the lowest patent value but could promote domestic technology. As for suitability, abemaciclib had a broader indication and coverage in the medical insurance catalog, while palbociclib had more diverse drug formulations, and ribociclib had relatively poor suitability. In terms of accessibility, abemaciclib had better availability and affordability compared to palbociclib, and ribociclib was not yet available in China, thus poor accessibility. **Conclusion** Overall, abemaciclib demonstrates good performance in all six dimensions, with better clinical comprehensiveness than that of palbociclib and ribociclib. Appropriate drugs should be based on patients' baseline characteristics in clinical practice.

Key words: comprehensive clinical evaluation; CDK4/6 inhibitor; aromatase inhibitor; breast cancer

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。据世界卫生组织 GLOBOCAN^[1] 数据显示, 全球乳腺癌年新发病例数从 2018 年的 210 万例增至 2020 年的 226 万例。在中国, 2020 年新发乳腺癌约 41.6 万例, 高居女性恶性肿瘤的首位。其中, 约 70% 的乳腺癌患者为激素受体 (hormone receptor, HR) 阳性和人表皮因子生长受体-2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阴性 (HR⁺/HER2⁻)^[2-3]。

CDK4/6 抑制剂可通过与 CDK4 和 CDK6 激酶的三磷酸腺苷 (ATP) 结合位点结合, 抑制其活性, 干扰网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 的磷酸化, 阻断细胞周期从 G₁ 期到 S 期的进程, 抑制肿瘤细胞增殖。此外, CDK4/6 抑制剂还能抑制上游雌激素受体信号通路的表达, 与内分泌治疗之间存在协同增效作用^[3-4]。迄今为止, 已有 5 种 CDK4/6 抑制剂获批上市, 分别是哌柏西利、瑞博西利、阿贝西利、曲拉西利 (预防骨髓抑制) 和达尔西利 (2021 年底获批上市, 未纳入本研究)。国内外权威指南一致推荐 CDK4/6 抑制剂联合芳香化酶抑制剂 (aromatase inhibitor, AI) 用于 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线治疗。然而, 目前国内外尚无相关 CDK4/6 抑制剂联合 AI 类药物临床综合评价研究报道。

本研究选取 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线治疗药物哌柏西利、瑞博西利和阿贝西利作为研究对象, 拟通过临床综合评价的方法, 比较哌柏西利、瑞博西利和阿贝西利联合 AI 方案的临床综合价值, 以期为临床用药实践提供参考。

1 研究方法

1.1 临床综合评价指标体系构建与评价方法

本研究基于《抗肿瘤药品临床综合评价技术指南 (2022 年版试行)》等^[5-10], 围绕 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线治疗的安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性和可及性 6 个维度进行综合分析。通过文献查询确定各维度评价指标并构建形成 CDK4/6 抑制剂联合 AI 类药物用于 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线治疗的临床综合评价指标体系。在安全性和有效性方面, 本研究采用网状 meta 分析进行定量分析。在经济性、创新性、适宜性和可及性方面, 本研究采用国内药品价格、纳入医保情况、综合专利情况、地区药品配备量等数据进行定量分析, 并结合药品说明书等相关资料进行定性分析。

1.2 文献筛选与资料提取

系统检索 PubMed、Cochrane Library、中国知网和万方数据库, 采用主题词加自由词组合检索, 检索时限均为建库至 2023 年 1 月 20 日。中文检索词包括晚期乳腺癌、哌柏西利、瑞博西利/瑞博西尼/瑞博西林、阿贝西利等, 英文检索词包括 advanced breast cancer、palbociclib、ribociclib、abemaciclib 等。纳入标准: ① 目标人群是临床明确诊断为 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌患者; ② 临床试验类型为 II 期或 III 期随机对照试验 (randomized controlled trial, RCT); ③ 干预措施是 CDK4/6 抑制剂联合 AI 对比 AI; ④ 结果指标为无进展生存期 (progression free survival, PFS)、总生存期 (overall survival, OS) 及不良反应情况。排除标准: 排除个案报道、综述、荟萃分析等。

由两名研究员根据纳入与排除标准独立筛选文献，如遇分歧，则咨询第三方人员协商解决。先将文献导入 Endnote 软件，删除重复文献，然后阅读文献标题和摘要，初步筛选文献，进一步阅读全文，确定最后纳入的文献。资料提取内容包括：第一作者；发表年份；研究设计类型；患者基线特征；患者例数；干预和对照措施；相关结局指标。

1.3 文献偏倚风险评价

由两名研究员根据 Cochrane 偏倚风险评估工具独立评估所纳入文献质量，如遇分歧，则咨询第三方人员协商解决。

1.4 统计学处理

通过 R4.2.2 和 R studio12.0 软件实现安全性和有效性的贝叶斯网状 meta 分析。根据 I^2 指数或 Q 检验判断各研究间异质性，若异质性较小 ($I^2 \leq 50\%$, $P \geq 0.05$)，选用固定效应模型进行网状 meta 分析；若异质性较大 ($I^2 > 50\%$, $P < 0.05$)，在排除异质性后，进行网状 meta 分析；若无法确定异质性来源，仅做描述性分析。根据误差信息准则 (deviance information criterion, DIC) 判断一致性，若 DIC 差值小于 5，表明一致性较好。Brooks-Gelman-Rubin 诊断图判断模型收敛程度。二分类资料 (总体 3 级以上不良反应发生率) 采用比值比 (odds ratio, OR) 及 95%CI 表示，并使用累计概率排序图下面积 (SUCRA) 进行综合排序，其数值越大不良事件发生可能性越大。生存相关的时间-事件资料 (PFS 和 OS)，采用风险比 (hazard ratio, HR) 及 95%CI 表示，并使用 P 分数 (P-score) [11] 比较不同治疗方案的优劣程度，其数值越大优势程度越大。

2 结果

2.1 临床综合评价指标体系构建

本研究指标体系包括安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性和可及性 6 个维度。其中，安全性包括总体不良反应/事件、3 级以上不良反应/事件和不良反应发生类型；有效性包括临床疗效即 PFS 和 OS；经济性包括单疗程治疗药品费用；创新性包括用药方案、作用靶点、专利价值和技术国产化；适宜性包括药品说明书适应证和医保目录、药品使用与储存条件、药品剂型选择的优先性；可及性包括可获得性和可负担性，共 15 个指标。

2.2 临床综合评价

2.2.1 安全性 纳入文献的基本特征见表 1。对纳入文献进行 Cochrane 风险评估，结果显示整体文献质量较高。异质性检验提示存在部分异质性，怀疑

异质性可能来源于 PALOMA-4 试验，剔除该试验后，提示无明显异质性 ($I^2 = 0\%$)，选择固定效应模型进行分析。一致性检验表明一致性好 (DIC 差值 < 5)；Brooks-Gelman-Rubin 诊断显示收敛程度满意。各 CDK4/6 抑制剂联合 AI 总体不良反应发生率相似，接近 100%，见表 1。

表 1 纳入安全性评价研究的基本特征

Tab 1 Basic characteristics of included studies on safety evaluation

纳入研究	组别	干预措施	患者例数	总体不良反应 / [n (%)]	3 级及以上不良反应 / [n (%)]
PALOMA-1 等 [12]	干预组	哌柏西利 + AI	84	83 (99)	64 (76)
	对照组	AI	77	65 (84)	16 (21)
PALOMA-2 等 [13]	干预组	哌柏西利 + AI	444	439 (99)	336 (76)
	对照组	AI	222	212 (95)	54 (24)
PALOMA-4 等 [14]	干预组	哌柏西利 + AI	169	168 (99)	149 (88)
	对照组	AI	168	155 (92)	36 (21)
MONALEE-SA-2 等 [15]	干预组	瑞博西利 + AI	334	329 (99)	271 (81)
	对照组	AI	330	320 (97)	108 (33)
MONARCH 3 等 [16]	干预组	阿贝西利 + AI	327	323 (99)	191 (58)
	对照组	AI	161	152 (94)	40 (25)
MONARCH plus 等 [17]	干预组	阿贝西利 + AI	205	204 (100)	121 (59)
	对照组	AI	99	88 (89)	23 (23)

3 级以上不良反应率的网状 meta 分析结果显示：相对于阿贝西利联合 AI，哌柏西利联合 AI ($OR = 2.3$, 95%CI: 1.4 ~ 3.7) 和瑞博西利联合 AI ($OR = 2$, 95%CI: 1.2 ~ 3.3) 可增加 3 级以上不良反应发生风险，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。哌柏西利联合 AI 和瑞博西利联合 AI 的 3 级以上不良反应发生率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，具体见表 2。

3 级以上不良反应发生风险的 SUCRA 值排序为哌柏西利联合 AI (0.903 329 2) > 瑞博西利联合 AI (0.762 358 3) > 阿贝西利联合 AI (0.334 312 5) > 单纯 AI (0.000 000 0)，提示哌柏西利联合 AI 的 3 级以上不良反应发生风险最大，而阿贝西利联合 AI 的 3 级以上不良反应发生风险较小。各方案常见不良反应对比显示：三种药物不良反应类型基本一致，均引起血液毒性、疲劳、恶心、腹泻等常见不良反应，但各类型发生率有差异，详见表 3。其中哌柏西利及瑞博西利最常见不良反应及 3 级以上不良反应均是中性粒细胞减少，阿贝西利最常见不良反应是腹泻，3 级以上最常见不良反应是中性粒细胞减少。

2.2.2 有效性 纳入文献的基本情况见表 4，其中 6 项研究报道了 PFS 数据，4 项研究报道了 OS 数据。对纳入文献进行 Cochrane 风险评估，结果显示整体文献质量较高。 Q 统计量检验提示不存在异质性 ($P > 0.05$)，选择固定效应模型进行分析。一致性

表 2 不同方案 3 级以上不良反应发生率的网状 meta 分析结果 [HR(95%CI)]

Tab 2 Network meta-analysis on incidence of grade 3 and above adverse reactions in different therapeutic regimens [HR(95%CI)]

哌柏西利+ AI			
1.1 (0.7, 1.9)	瑞博西利+ AI		
2.3 (1.4, 3.7) ^a	2 (1.2, 3.3)	阿贝西利+ AI	
10 (7.3, 14)	8.9 (6.3, 13)	4.5 (3.2, 6.2)	AI

注 (Note): ^aP < 0.05。

检验表明一致性好 (DIC 差值 < 5); Brooks-Gelman-Rubin 诊断显示收敛程度满意。PFS 的网状 meta 分析结果显示:与单纯 AI 相比, 哌柏西利联合 AI (HR = 0.59, 95%CI: 0.51 ~ 0.68)、瑞博西利联合 AI (HR = 0.57, 95%CI: 0.46 ~ 0.70) 和阿贝西利联合 AI (HR = 0.53, 95%CI: 0.43 ~ 0.65) 在改善 PFS 方面的干预效果更好 (P < 0.05), 其余干预措施彼此

表 3 常见不良反应及 3 级以上不良反应

Tab 3 Common adverse reactions and grade 3 and above adverse reactions

不良事件	哌柏西利+ AI		瑞博西利+ AI	阿贝西利+ AI	
	PALOMA-1 (n = 84)	PALOMA-2 (n = 444)	MONALEESA-2 (n = 334)	MONARCH 3 (n = 327)	MONARCH plus (n = 205)
所有级别 [n (%)]	83 (99)	439 (99)	329 (99)	323 (99)	204 (100)
所有级别 (≥ 30%)	血液系统: 中性粒细胞减少 (75%), 白细胞减少 (43%), 贫血 (35%); 消化系统: 恶心 (30%); 全身性损害: 疲劳 (41%)	血液系统: 中性粒细胞减少 (80%), 白细胞减少 (40%); 消化系统: 恶心 (35%), 口腔炎 (30%); 全身性损害: 疲劳 (37%); 肌肉骨骼系统: 关节痛 (33%); 皮肤及皮下组织: 脱发 (33%)	血液系统: 中性粒细胞减少 (74%), 白细胞减少 (33%); 消化系统: 恶心 (51%); 腹泻 (35%); 全身性损害: 疲劳 (37%); 皮肤及皮下组织: 脱发 (33%)	血液系统: 中性粒细胞减少 (44%), 贫血 (32%); 消化系统: 腹泻 (82%); 恶心 (41%), 腹痛 (31%), 呕吐 (30%); 全身性损害: 疲劳 (41%)	血液系统: 中性粒细胞减少 (80%), 白细胞减少 (76%), 贫血 (62%), 血小板减少 (44%); 消化系统: 腹泻 (80%); 谷丙转氨酶 (ALT) 升高 (35%), 谷草转氨酶 (AST) 升高 (35%); 神经系统: 疲劳 (30%)
3 ~ 4 级 [n (%)]	64 (76)	336 (76)	271 (81)	191 (58)	121 (59)
3 ~ 4 级 (≥ 10%)	中性粒细胞减少 (71%); 白细胞减少 (22%)	中性粒细胞减少 (66%); 白细胞减少 (25%)	中性粒细胞减少 (59%); 白细胞减少 (21%); 高血压 (10%); 肝酶升高 (10%)	中性粒细胞减少 (24%)	中性粒细胞减少 (26%); 白细胞减少 (13%); 贫血 (11%)

间差异无统计学意义, 见表 5。利用 P-score 比较各治疗方案的优劣程度, P-score 从小到大排序依次为 AI (0.0000)、哌柏西利联合 AI (0.5254)、瑞博西利联合 AI (0.6361) 和阿贝西利联合 AI (0.8385), 提示阿贝西利联合 AI 在延长 PFS 上可能具有一定优势, 但差异无统计学意义。OS 的网状 meta 分析结果显示: 与单纯 AI 相比, 瑞博西利联合 AI (HR = 0.76, 95%CI: 0.63 ~ 0.92) 和阿贝西利联合 AI (HR = 0.75, 95%CI: 0.58 ~ 0.97) 在改善 OS 方面的干预效果更好, 其余干预措施彼此间差异无统计学意义, 见表 6。P-score 从小到大排序依次为 AI (0.0000)、哌柏西利联合 AI (0.3312)、瑞博西利联合 AI (0.7828) 和阿贝西利联合 AI (0.7861), 提示阿贝西利联合 AI 在延长 OS 上可能具有一定优势, 但差异无统计学意义。**2.2.3 经济性** 由于瑞博西利尚未在中国上市, 关于瑞博西利在中国的经济性研究困难。我们根据单疗程治疗药品费用比较各干预方案的经济性, 参照丁香园 Insight 数据库提供的价格信息, 截至 2023 年 1 月 20 日, 检索发现哌柏西利胶囊 (爱博新)

125 mg 价格为 13 668 元/瓶 (每瓶 21 粒), 阿贝西利片 (唯择) 150 mg 医保价格为 1190 元/盒 (每盒 14 片), 来曲唑片 (芙瑞) 2.5 mg 价格为 21.14 元/盒 (每盒 10 片)。根据说明书用法用量, 哌柏西利 125 mg 每日一次, 连服 21 日之后停药 7 日; 阿贝西利 150 mg 每日两次; 来曲唑 2.5 mg 每日一次。按照临床研究中 28 日为一个疗程计算, 哌柏西利、阿贝西利联合来曲唑单疗程药品费用分别为 13 727 元和 4819 元。而哌柏西利胶囊 (爱博新) 于 2023 年 3 月 1 日进入医保目录, 价格更新为 4275.6 元每盒 (125 mg/粒), 单疗程费用降为 4334.6 元。进一步结合文献报道的单疗程周期间不良反应发生情况与治疗成本费用分析, 哌柏西利方案和阿贝西利方案发生率 ≥ 5% 的 3/4 级不良事件和 3/4 级腹泻 (发生率 < 5%), 发现单人单疗程周期间阿贝西利方案的 3/4 级不良事件的治疗费用显著低于哌柏西利方案 (201.2 元 vs 319.8 元)^[23]。另由上市前安全性分析可知, 哌柏西利 1 ~ 4 级血液毒性发生率均显著高于阿贝西利, 而阿贝西利 1 ~ 4 级腹泻发生

表 4 纳入文献有效性基本特征

Tab 4 Basic characteristics of included studies on effectiveness evaluation

纳入研究	试验阶段	参与者特征	治疗线数	组别	干预组和对对照组	入组人数	中位年龄 / 岁	HR (95%CI)	
								PFS	OS
PALOMA-1 ^[18]	II	ER ⁺ /HER2 ⁻ 晚期乳腺癌	一线	干预组	哌柏西利 + AI	84	63	0.488 (0.319 ~ 0.748)	0.897 (0.623 ~ 1.294)
				对照组	AI	81	64		
PALOMA-2 ^[19-20]	III	ER ⁺ /HER2 ⁻ 晚期乳腺癌	一线	干预组	哌柏西利 + AI	444	62	0.563 (0.461 ~ 0.697)	0.956 (0.777 ~ 1.777)
				对照组	AI	222	61		
PALOMA-4 ^[14]	III	ER ⁺ /HER2 ⁻ 晚期乳腺癌	一线	干预组	哌柏西利 + AI	169	54	0.68 (0.53 ~ 0.87)	/
				对照组	AI	171	54		
MONALEESA-2 ^[21]	III	HR ⁺ /HER2 ⁻ 晚期乳腺癌	一线	干预组	瑞博西利 + AI	334	62	0.57 (0.46 ~ 0.70)	0.76 (0.63 ~ 0.93)
				对照组	AI	334	63		
MONARCH 3 ^[16, 22]	III	HR ⁺ /HER2 ⁻ 晚期乳腺癌	一线	干预组	阿贝西利 + AI	328	63	0.540 (0.418 ~ 0.698)	0.754 (0.584 ~ 0.974)
				对照组	AI	165	63		
MONARCH plus ^[17]	III	HR ⁺ /HER2 ⁻ 晚期乳腺癌	一线	干预组	阿贝西利 + AI	207	54	0.499 (0.346 ~ 0.719)	/
				对照组	AI	99	54		

表 5 不同方案 PFS 的网状 meta 分析结果 [HR(95%CI)]

Tab 5 Network meta-analysis of PFS in different therapeutic regimens [HR(95%CI)]

哌柏西利 + AI			
1.04 (0.80, 1.34)	瑞博西利 + AI		
1.12 (0.87, 1.45)	1.08 (0.81, 1.46)	阿贝西利 + AI	
0.59 (0.51, 0.68)	0.57 (0.46, 0.70)	0.53 (0.43, 0.65)	AI

注 (Note): 粗体表示差异具有统计学意义, $P < 0.05$ (Bold font indicates statistical differences, $P < 0.05$)。

表 6 不同方案 OS 的网状 meta 分析结果 [HR(95%CI)]

Tab 6 Network meta-analysis of OS in different therapeutic regimens [HR(95%CI)]

哌柏西利 + AI			
1.21 (0.87, 1.70)	瑞博西利 + AI		
1.22 (0.84, 1.78)	1.01 (0.73, 1.39)	阿贝西利 + AI	
0.92 (0.70, 1.21)	0.76 (0.63, 0.92)	0.75 (0.58, 0.97)	AI

注 (Note): 粗体表示差异具有统计学意义, $P < 0.05$ (Bold font indicates statistical differences, $P < 0.05$)。

率更高。中性粒细胞减少 (如聚乙二醇化重组人粒细胞刺激因子注射液 3 mg×1 支为 1670 元) 的治疗费用相对较高, 腹泻的治疗费用相对较低 (如盐酸洛哌丁胺 2 mg×6 粒 / 盒约 10 元)。因此, 哌柏西利方案不良反应诊治成本高于阿贝西利。综上, 阿贝西利方案单疗程周期间不良反应治疗成本略低于哌柏西利方案。

2.2.4 创新性

① 用药方式: CDK4/6 抑制剂联合 AI 类药物可作为 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线方案。除此之外, 基于 MONARCH 1 试验结果^[24], FDA 批准了阿贝西利单药末线治疗既往接受过内分泌治疗与化疗后转移阶段 HR⁺/HER2⁻ 乳腺癌患者。因此, 阿贝西利是唯一取得单药治疗和联合治疗

HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌的 CDK4/6 抑制剂。

② 作用靶点: 根据说明书和文献总结发现, 阿贝西利的作用靶点较哌柏西利、瑞博西利更广。三种药物都可抑制 CDK4、CDK6 激酶, 但 George 等^[25] 研究发现阿贝西利对 CDK1、CDK2、CDK5、CDK9、CDK14、CDKs16-18 激酶也具有抑制作用。哌柏西利对 CDK4、CDK6 选择性相近, CDK4 参与肿瘤细胞增殖, CDK6 能加速造血干细胞增殖, 因此哌柏西利的骨髓抑制明显; 瑞博西利对 CDK4 选择性大于 CDK6, 因此瑞博西利骨髓抑制较为常见, 但弱于哌柏西利; 阿贝西利对 CDK4 选择性远大于 CDK6, 虽然阿贝西利骨髓抑制也较为常见, 但弱于哌柏西利, 此外, 阿贝西利对 CDK9 等激酶也有一定亲和力, 而 CDK9 参与肠道细胞转录, 因此阿贝西利的腹泻发生率远大于哌柏西利和瑞博西利。

③ 专利价值: 检索 FDA 的 Orange Book 和文献发现, 瑞博西利和阿贝西利专利价值高于哌柏西利。哌柏西利化合物核心专利已于 2023 年 1 月 16 日到期, 而瑞博西利和阿贝西利化合物核心分别将于 2031 年 11 月 9 日和 2029 年 12 月 15 日专利到期。

④ 技术国产化: 检索药融云数据库发现, 哌柏西利可促进技术国产化。截至 2023 年 1 月 20 日, 国内已有 3 家药企获得了哌柏西利胶囊仿制药的生产批文, 另有 10 余家药企的仿制药上市申请在审评审批中。除此之外, 哌柏西利片也于 2022 年 8 月在中国获批上市, 国内有两家药企递交了仿制药上市申请。瑞博西利和阿贝西利目前暂无国产仿制药上市申请。

2.2.5 适宜性 在药品适应证和医保方面, 结合说明书和国家医保目录发现, 阿贝西利国内获批

适应证最广；阿贝西利是最先进入医保目录的 CDK4/6 抑制剂，医保支付范围限 HR⁺/HER2⁻ 的局部晚期或转移性乳腺癌，而哌柏西利胶囊也于 2023 年 3 月进入医保目录。在药品使用与储存方面，阿贝西利可连续服用，哌柏西利和瑞博西利需间歇给药；除此之外，哌柏西利需随餐服

用，但瑞博西利和阿贝西利非必需。三种药品储存条件相似。在药品剂型方面，哌柏西利的剂型更多样，便于患者服用，提高了患者依从性。总体而言，阿贝西利在适宜性方面优于瑞博西利，略优于哌柏西利，详见表 7。

表 7 适宜性评价指标

Tab 7 Evaluation content of suitability indicators

药物名称	国内获批适应证	纳入医保	药品使用	储存条件	药品剂型
阿贝西利	① 早期乳腺癌成人患者的辅助治疗；② HR ⁺ /HER2 ⁻ 的局部晚期或转移性乳腺癌	是	连续服用	20 ~ 25 °C 的原包装内	片剂
瑞博西利	国内尚未上市	/	间歇给药	开封后保存在室温下原包装瓶内	片剂
哌柏西利	HR ⁺ /HER2 ⁻ 的局部晚期或转移性乳腺癌	是	间歇给药（随餐服用）	在 30 °C 以下密封保存	胶囊剂和片剂

2.2.6 可及性

① 可获得性：咨询药专业人士和国家医保服务平台发现，阿贝西利的可获得性优于哌柏西利、瑞博西利。哌柏西利和阿贝西利分别于 2018 年 7 月和 2020 年 12 月在中国获批上市，而瑞博西利目前尚未在国内上市，可获得性较差。以上海为例，截至 2023 年 1 月 20 日，哌柏西利的配备机构包括定点医疗机构 7 家，无定点零售药店；而阿贝西利的配备机构包括医疗机构 30 家，定点零售药店 8 家。

② 可负担性：以年人均用药费用占城镇 / 农村居民人均可支配收入比作为指标，计算结果显示阿贝西利的可负担性优于哌柏西利。以 2022 年为例，2022 年城镇和农村居民人均可支配收入分别是 49 283 元和 20 133 元。哌柏西利联合来曲唑年治疗费用约为 178 928 元，分别占城镇和农村居民人均可支配收入的 363% 和 889%。阿贝西利联合来曲唑年治疗费用 62 819 元，分别占城镇和农村居民人均可支配收入的 127% 和 312%。

3 讨论与总结

本研究从多维度开展了哌柏西利、瑞博西利和阿贝西利联合 AI 方案用于 HR⁺/HER2⁻ 晚期乳腺癌一线治疗的临床综合评价，科学建立临床综合评价体系并规范运用网状 meta 分析等方法，研究结果较为可靠，可为临床用药实践提供参考。

在安全性方面，上市前三种药物的总体不良反应发生率相似，近 100%。网状 meta 分析显示阿贝西利联合 AI 的 3 级以上不良反应发生风险最低。三种药物不良反应发生类型基本一致，但各类型的发生率有所差异，哌柏西利和瑞博西利以中性粒细胞减少最为常见，而阿贝西利是腹泻。总体来看，阿贝西利安全性和耐受性良好，

优于哌柏西利和瑞博西利。就有效性而言，相对于单纯 AI，阿贝西利联合 AI 和瑞博西利联合 AI 均可延长 PFS 和 OS，而哌柏西利联合 AI 仅改善 PFS，OS 呈数值上延长，但差异无统计学意义。同时，三种治疗方案彼此间差异无统计学意义。在经济性方面，结合安全性分析提示阿贝西利联合来曲唑的药品成本和不良反应诊治费用总额低于哌柏西利联合来曲唑。在创新性方面，阿贝西利的用药方式和作用靶点更多样，哌柏西利目前专利已到期，因此在促进技术国产化方面存在一定优势，瑞博西利的创新性较差。在适宜性方面，阿贝西利药品说明书适应证更广且给药方便，但哌柏西利的药品剂型更多样，瑞博西利适宜性相对较差。在可及性方面，瑞博西利未在中国上市，可及性最差。阿贝西利的药品配备机构数量较多，可负担性优于哌柏西利。综上所述，阿贝西利在各维度均表现良好。

本研究也存在一定局限性：① 缺乏直接比较的大样本真实世界安全性和有效性数据，且信息收集过程有待优化；② 未能构建药物经济性模型，系统分析比较三种方案的成本 - 效果；③ 未能实时反映哌柏西利和阿贝西利的药品配备率，随着哌柏西利于 2023 年 3 月 1 日正式进入医保目录，届时 CDK4/6 抑制剂市场格局将会进一步发生改变。

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] 地里呼玛尔·吐鲁洪, 李欣芳, 王少华. HR⁺/HER2⁻ 乳腺癌内分泌治疗的研究进展 [J]. 东南国防医药, 2021,

- 23 (4): 387-392.
- [3] 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会, 中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会. CDK4/6 抑制剂治疗激素受体阳性人表皮生长因子受体 2 阴性晚期乳腺癌的临床应用共识 [J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43 (4): 405-413.
- [4] 张帆, 毛大华. CDK4/6 抑制剂治疗 HR 阳性和 HER2 阴性晚期乳腺癌的作用机制研究进展 [J]. 医学综述, 2021, 27 (12): 2349-2353.
- [5] 国家药物和卫生技术综合评估中心 (国家卫生健康委卫生发展研究中心). 抗肿瘤药品临床综合评价技术指南 (2022 年版试行) [S]. 2022: 1-62.
- [6] 董艳珍, 宋沧桑, 李兴德, 等. 集中带量采购政策下的药品临床综合评价研究进展 [J]. 中南药学, 2023, 21 (5): 1388-1392.
- [7] 林思思, 陈丽萍, 江绮云, 等. 抗肺癌药品临床综合评价指标体系的构建及实证研究 [J]. 中国药房, 2023, 34 (11): 1313-1319.
- [8] 朱碧帆, 胡嘉浩, 刘宇晗, 等. 药品临床综合评价创新性指标的构建——以 PD-1/PD-L1 抑制剂为例 [J]. 中南药学, 2023, 21 (4): 979-983.
- [9] 邱晓燕, 余悦, 武卓, 等. 新型抗肿瘤药的临床综合评价 [J]. 上海医药, 2022, 43 (S2): 126-135.
- [10] 符雨嫣, 孙辉, 王昊德, 等. 抗肿瘤药品临床综合评价方法研究 [J]. 中国卫生质量管理, 2022, 29 (6): 4-8.
- [11] Rucker G, Schwarzer G. Resolve conflicting rankings of outcomes in network meta-analysis: partial ordering of treatments [J]. Res Synth Methods, 2017, 8 (4): 526-536.
- [12] Finn RS, Crown JP, Ettl J, et al. Efficacy and safety of palbociclib in combination with letrozole as first-line treatment of ER⁺ positive, HER2⁻ negative, advanced breast cancer: expanded analyses of subgroups from the randomized pivotal trial PALOMA-1/TRIO-18 [J]. Breast Cancer Res, 2016, 18 (1): 67.
- [13] Im SA, Mukai H, Park IH, et al. Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in postmenopausal Asian women with metastatic breast cancer: results from the phase III, randomized PALOMA-2 study [J]. J Glob Oncol, 2019, 5 (5): 1-19.
- [14] Xu BH, Hu XC, Li W, et al. Palbociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in Asian postmenopausal women with oestrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer: primary results from PALOMA-4 [J]. Eur J Cancer, 2022, 175: 236-245.
- [15] Sonke GS, Hart LL, Campone M, et al. Ribociclib with letrozole vs letrozole alone in elderly patients with hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer in the randomized MONALEESA-2 trial [J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 167 (3): 659-669.
- [16] Johnston S, Martin M, Di Leo A, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer [J]. NPJ Breast Cancer, 2019, 5 (1): 5.
- [17] Zhang QY, Sun T, Yin YM, et al. MONARCH plus: abemaciclib plus endocrine therapy in women with HR⁺/HER2⁻ advanced breast cancer: the multinational randomized phase III study [J]. Ther Adv Med Oncol, 2020, 12: 1-14.
- [18] Finn RS, Boer K, Bondarenko I, et al. Overall survival results from the randomized phase 2 study of palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone for first-line treatment of ER⁺/HER2⁻ advanced breast cancer (PALOMA-1, TRIO-18) [J]. Breast Cancer Res Treat, 2020, 183 (2): 419-428.
- [19] Finn RS, Rugo HS, Dieras VC, et al. Overall survival (OS) with first-line palbociclib plus letrozole (PAL + LET) versus placebo plus letrozole (PBO + LET) in women with estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer (ER⁺/HER2⁻ ABC): analyses from PALOMA-2 [J]. J Clin Oncol, 2022, 40 (17): LBA1003.
- [20] Gelmon K, Walshe JM, Mahtani R, et al. Efficacy and safety of palbociclib in patients with estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with preexisting conditions: a post hoc analysis of PALOMA-2 [J]. Breast, 2021, 59: 321-326.
- [21] Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Overall survival with ribociclib plus letrozole in advanced breast cancer [J]. N Engl J Med, 2022, 386 (10): 942-950.
- [22] Goetz MP, Toi M, Huober J, et al. MONARCH 3: interim overall survival (OS) results of abemaciclib plus a nonsteroidal aromatase inhibitor (NSAI) in patients (pts) with HR⁺/HER2⁻ advanced breast cancer (ABC) [J]. Ann Oncol, 2022, 33 (7): S1384.
- [23] Iwata H, Im SA, Masuda N, et al. PALOMA-3: phase III trial of fulvestrant with or without palbociclib in premenopausal and postmenopausal women with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer that progressed on prior endocrine therapy-safety and efficacy in Asian patients [J]. J Glob Oncol, 2017, 3 (4): 289-303.
- [24] Dickler MN, Tolaney SM, Rugo HS, et al. MONARCH 1, A phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as a single agent, in patients with refractory HR⁺/HER2⁻ metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23 (17): 5218-5224.
- [25] George MA, Qureshi S, Omene C, et al. Clinical and pharmacologic differences of CDK4/6 inhibitors in breast cancer [J]. Front Oncol, 2021, 11: 693104.

(收稿日期: 2023-07-19; 修回日期: 2023-09-24)

五酯胶囊联合他克莫司在肾移植患者中的疗效及安全性研究

叶倩倩¹, 李思曼², 蒋跃平¹, 唐密密¹, 丁翔³, 刘韶^{1*} (1. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 2. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 3. 中南大学湘雅医院器官移植中心, 长沙 410008)

摘要: **目的** 通过分析五酯胶囊联合他克莫司治疗肾移植患者的疗效及安全性, 为临床安全合理用药提供依据。**方法** 回顾性研究 2020 年 1 月至 2021 年 2 月在中南大学湘雅医院行同种异体肾移植术的患者, 分析联用五酯胶囊对他克莫司浓度、肾移植术后常见并发症以及全身免疫炎症指数 (SII) 的影响, 探讨联用五酯胶囊对肾移植患者疗效及安全性的影响。**结果** 共纳入 87 例患者, 31 例 (35.63%) 患者术后规律使用五酯胶囊, 联用达稳态后他克莫司谷浓度较前升高且服药日剂量较前显著下降 ($P < 0.001$)。五酯胶囊联用组在术后 1 个月时血红蛋白为 $(105.06 \pm 15.93) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著低于他克莫司单用组 $(114.58 \pm 17.71) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P = 0.015$), 在术后 3 个月时逐渐升高且两组间差异消失。五酯胶囊联用组全身免疫炎症指数在术后 1 个月无明显变化, 术后 3 个月显著下降 ($P = 0.006$)。**结论** 五酯胶囊联合他克莫司可显著提高肾移植患者他克莫司的血药浓度且减少用药剂量, 联合用药初期应关注患者贫血情况。五酯胶囊对肾移植患者全身免疫炎症状态的影响仍需进一步研究。

关键词: 五酯胶囊; 他克莫司; 肾移植; 安全性; 全身免疫炎症指数

中图分类号: R932, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0253-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.040

Efficacy and safety of Wuzhi capsules combined with tacrolimus for kidney transplantation patients

YE Qian-qian¹, LI Si-man², JIANG Yue-ping¹, TANG Mi-mi¹, DING Xiang³, LIU Shao^{1*} (1. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 3. Department of Organ Transplant Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

Abstract: Objective To determine the efficacy and safety of Wuzhi capsules combined with tacrolimus for patients undergoing kidney transplantation, and to provide reference for the safe, rational, and effective use of combined immunosuppression therapy. **Methods** Patients who underwent allogeneic kidney transplantation at Xiangya Hospital of Central South University from January 2020 to February 2021 were collected to determine the effect of coadministration of Wuzhi capsules on the concentration of tacrolimus and incidence of common complications after kidney transplantation and systemic immune inflammation index, and to analyze the efficacy and safety of Wuzhi capsules combined with tacrolimus for renal transplantation patients. **Results** Totally 87 patients were included. Totally 31 patients (35.63%) were regularly administered Wuzhi capsules after the transplantation. The trough plasma concentration of tacrolimus was increased, while the daily dose was significantly lower than before ($P < 0.001$). Hemoglobin was $(105.06 \pm 15.93) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the Wuzhi capsule group 1 month after the transplantation, which is much lower than that in the tacrolimus group $(114.58 \pm 17.71) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P = 0.015$). Hemoglobin in the Wuzhi capsules group gradually increased within 3 months after the transplantation until the variance between the two groups finally vanished. The systemic immune inflammation index in the Wuzhi capsule group did not change as compared to that in the tacrolimus group within 1 month after the transplantation,

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (No. 2022JJ80047)。

作者简介: 叶倩倩, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: 313349415@qq.com *通信作者: 刘韶, 男, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事药事管理、天然药化研究和开发, email: liushao999@csu.edu.cn

and even reduced significantly 3 months postoperatively ($P = 0.006$). **Conclusion** Combination of Wuzhi capsules with tacrolimus significantly increases the blood concentration of tacrolimus in kidney transplantation patients and reduces the daily dose of the drug. However, the effect of Wuzhi capsules on the systemic immune-inflammation needs further verification.

Key words: Wuzhi capsule; tacrolimus; kidney transplantation; safety; systemic immune inflammation index

他克莫司免疫抑制作用强大,常作为肾移植术后免疫抑制方案的一线用药^[1]。但是,其治疗窗窄、个体差异大以及影响药物浓度因素较多,许多患者服药后未能达到有效目标血药浓度^[2-3]。五酯胶囊是由木兰科植物华中五味子的果实经醇提的脂溶性活性成分制成的中成药,临床上广泛用于治疗各种类型肝损伤。研究发现,五酯胶囊与他克莫司联用可降低他克莫司用药剂量,减轻患者经济负担,具有积极的临床意义和较高的社会价值^[4-6]。近年来,但五酯胶囊与他克莫司联用时对受者的安全性、移植肾功能恢复情况及预后仍不明确。故研究五酯胶囊联合治疗对他克莫司的疗效、预后及不良反应方面愈加重要。

研究显示,五酯胶囊的主要成分五味子乙素及五味子醇甲在分子机制中已显示出抗炎作用,并有望成为临床治疗炎症疾病的潜在药物^[7]。全身免疫炎症指数(systemic immune inflammation index, SII)是一种新型炎症指标,在多种疾病的病情评估及预后判断中具有一定临床价值^[8]。本研究以肾移植患者为研究对象,分析联用五酯胶囊对他克莫司疗效及安全性的影响,并分析五酯胶囊对 SII 的影响,初步探讨其对肾移植患者的免疫状态影响,为肾移植受者安全合理使用五酯胶囊提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

纳入 2020 年 1 月—2021 年 2 月在中南大学湘雅医院行同种异体肾移植术的患者。本研究经中南大学湘雅医院医学伦理委员会审核批准(批件号:202109963)。

纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁;②移植术后规律使用他克莫司、霉酚酸类药物及糖皮质激素三联免疫抑制方案;③服用稳定剂量的他克莫司胶囊及五酯胶囊,或单用他克莫司胶囊疗程超过 8 周;④术后规律在我院随访 3 个月,且临床资料可得。排除标准:①五酯胶囊随访期间停用;②联用其他影响他克莫司浓度的药物,如三唑类抗

菌药物、地尔硫草等;③未在本科室随访,临床资料无法获得;④术后因移植肾坏死等原因行移植肾切除术;⑤多器官移植。

研究共纳入 87 名患者,将入组患者分为两组,联用组(五酯胶囊+他克莫司)共计 31 例,单用组(他克莫司)共计 56 例。

1.2 免疫抑制方案

免疫诱导方案:兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白 50 mg 分别于术中及术后第 3 日输注,或术中及术后第 4 日给予巴利昔单抗 20 mg。术前口服吗替麦考酚酯胶囊 1 g,术后均采用三联免疫抑制方案治疗。术后第 1 日开始口服吗替麦考酚酯 $1.5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$,分两次口服,1 年后逐渐减少到 $1 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。术中及术后前 2 d 应用甲泼尼龙注射液(500 mg, 250 mg, 250 mg),之后改为口服泼尼松片 $30 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,1 个月后逐渐减量至 $10 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,1 年后减少至 $5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。他克莫司血药浓度术后 3 个月内维持在 $8 \sim 12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。联用组在三联免疫抑制方案基础上联用五酯胶囊(规格:五味子甲素 11.25 mg/粒,四川禾正制药有限责任公司)。治疗过程中,加用五酯胶囊后他克莫司浓度升高,为平衡疗效及避免不良反应发生,及时根据他克莫司血药浓度调整剂量,使其控制在治疗窗内。

1.3 资料收集

记录患者一般情况(性别、年龄、体重、身高)、术前基础疾病、术后用药信息(他克莫司、五酯胶囊用药剂量及浓度)、实验室指标(血常规、肝肾功能)、住院时间、术后并发症等。

1.4 指标定义

记录患者术前最近一次、术后 1 个月以及术后 3 个月的血常规及肝肾功能检验结果, $\text{SII} = (\text{血小板计数} \times \text{中性粒细胞计数}) / \text{淋巴细胞计数}$ 。

1.5 统计方法

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析,计量资料符合正态分布以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验进行比较。计数资料以例数表示,采用卡方检验或 Fisher 确切概率检验

进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

联用组于术后 (8.0 ± 3.6) d 加用五酯胶囊, 且加用五酯胶囊后规律服药至术后 3 个月。单用组

与联用组一般临床资料相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。术后 1 周时单用组他克莫司日剂量显著低于联用组 ($P < 0.05$), 且血药浓度显著高于联用组 ($P < 0.05$), 术后 1 个月时两组血药浓度差异无统计学意义。

表 1 患者一般资料比较
Tab 1 Baseline characteristics

指标	单用组 ($n = 56$)	联用组 ($n = 31$)	P
受体男性 / n	40	17	0.119
年龄 / 岁	41.50 ± 10.91	42.71 ± 12.11	0.635
体质量指数 (BMI) / ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	22.31 ± 3.13	21.70 ± 3.37	0.409
肾移植次数 ≥ 2 次	0	2	0.124
DCD 供肾	52	29	/
吸烟史	10	11	0.066
饮酒史	5	3	0.908
血透	41	23	0.849
透析时间 / 月	17.61 ± 20.74	16.16 ± 17.10	0.742
术前输血史	9	9	0.153
术前冠心病病史	1	1	/
术前高血压病史	8	4	0.858
术前糖尿病病史	6	5	0.467
术前乙肝病史	8	2	0.273
尿毒症病因			
慢性肾炎综合征	43	19	0.126
糖尿病肾病	4	5	0.187
IgA 肾病	3	1	/
多囊肾	1	2	0.288
高血压肾病	3	0	0.550
其他肾病	2	4	0.181
围术期使用巴利昔单抗	17	13	0.251
术后 1 周他克莫司剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$)	6.83 ± 1.90	7.89 ± 1.46	0.009
术后 1 周他克莫司浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10.92 ± 5.25	4.76 ± 1.62	< 0.001
术后 1 个月他克莫司剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$)	5.93 ± 1.80	7.03 ± 1.35	0.002
术后 1 个月他克莫司浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	8.90 ± 2.20	9.56 ± 2.97	0.243
供体男性 / n	48	26	0.817
供体年龄 / 岁	45.35 ± 12.15	43.07 ± 16.16	0.476

2.2 五酯胶囊对他克莫司浓度影响

分析发现, 联用组加用五酯胶囊后他克莫司使用日剂量较前降低、血药浓度较前显著升高 ($P < 0.001$), 见表 2。

2.3 五酯胶囊临床安全性分析

联用组在治疗期间, 术后 1 个月红细胞计数显著低于单用组 ($P < 0.05$)。在术后 1 个月时联用组的血红蛋白为 $(105.06 \pm 15.93) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著低于单用组 $(114.58 \pm 17.71) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P = 0.015$), 在术后 3 个月时逐渐升高且组间差异消失。随访期间, 五酯胶囊对患者的肝肾功能、肾功能延迟恢复及排斥、高血糖等术后常见并发症无明显影响 ($P > 0.05$), 未见五酯胶囊相关不良反应记录, 见表 3。

2.4 五酯胶囊对 SII 的影响

表 2 联用组患者血药浓度达稳态后他克莫司日剂量与血药浓度比较

指标	加用五酯胶囊		P
	胶囊前	囊达稳态后	
他克莫司日剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$)	7.92 ± 1.37	6.92 ± 1.56	< 0.001
他克莫司血药浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	4.47 ± 1.22	8.90 ± 0.97	< 0.001

术前两组间 SII 无显著性差异, 术后 1 个月时单用组 SII 呈升高趋势, 3 个月时稳定无明显变化, 见表 4。联用组 SII 在术后 1 个月无明显变化, 术后 3 个月显著下降 (1055.31 ± 752.74 vs 617.73 ± 377.83 , $P = 0.006$)。与术前基线值相比, 联用组 SII 在术后 3 个月时显著降低 (972.92 ± 786.20 vs 617.73 ± 377.83 , $P = 0.029$), 单用组与术前相比差异无统计学意义。

表 3 两组患者肾移植术后安全性分析

Tab 3 Safety of patients after kidney transplantation in 2 groups

指标	单用组 (n = 56)	联用组 (n = 31)	P
肾功能延迟恢复	3	3	0.662
围术期感染	7	8	0.116
围术期腹泻	6	7	0.137
术后 3 个月内排斥	4	2	/
出院时空腹血糖 / (mmol · L ⁻¹)	5.75 ± 1.31	5.59 ± 1.09	0.594
出院时早餐后 2 h 血糖 / (mmol · L ⁻¹)	8.11 ± 2.23	7.85 ± 2.32	0.631
术前			
红细胞计数 / (×10 ¹² · L ⁻¹)	3.70 ± 0.83	3.52 ± 0.66	0.335
血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	107.91 ± 22.72	110.06 ± 17.08	0.648
白蛋白 / (g · L ⁻¹)	42.16 ± 4.42	41.94 ± 5.14	0.828
总胆红素 / (μmol · L ⁻¹)	6.36 ± 2.60	5.55 ± 2.23	0.145
直接胆红素 / (μmol · L ⁻¹)	3.51 ± 1.46	2.98 ± 1.08	0.081
谷丙转氨酶 / (U · L ⁻¹)	25.83 ± 31.71	18.24 ± 28.36	0.271
谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	21.05 ± 15.17	17.06 ± 12.07	0.183
肌酐 / (μmol · L ⁻¹)	888.24 ± 215.38	898.94 ± 259.30	0.837
尿素氮 / (mmol · L ⁻¹)	21.05 ± 7.38	22.14 ± 6.83	0.498
尿酸 / (μmol · L ⁻¹)	376.76 ± 102.16	387.08 ± 104.56	0.656
术后 1 个月			
红细胞计数 / (×10 ¹² · L ⁻¹)	3.92 ± 0.68	3.44 ± 0.65	0.002
血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	114.58 ± 17.71	105.06 ± 15.93	0.015
白蛋白 / (g · L ⁻¹)	44.08 ± 3.96	43.38 ± 5.89	0.514
总胆红素 / (μmol · L ⁻¹)	7.21 ± 3.07	6.52 ± 3.86	0.367
直接胆红素 / (μmol · L ⁻¹)	3.60 ± 4.66	2.99 ± 1.84	0.122
谷丙转氨酶 / (U · L ⁻¹)	21.03 ± 13.82	27.62 ± 33.50	0.203
谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	18.49 ± 8.47	23.42 ± 16.80	0.135
肌酐 / (μmol · L ⁻¹)	140.35 ± 42.89	148.05 ± 62.70	0.502
尿素氮 / (mmol · L ⁻¹)	10.62 ± 4.73	11.14 ± 4.68	0.625
尿酸 / (μmol · L ⁻¹)	335.59 ± 86.33	352.87 ± 89.58	0.382
三酰甘油 / (mmol · L ⁻¹)	1.88 ± 0.78	1.45 ± 0.48	0.027
胆固醇 / (mmol · L ⁻¹)	5.61 ± 1.32	5.29 ± 1.24	0.365
高密度脂蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	1.43 ± 0.37	1.42 ± 0.38	0.878
低密度脂蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	3.49 ± 0.89	3.28 ± 0.89	0.384
空腹血糖 / (mmol · L ⁻¹)	5.57 ± 1.16	5.61 ± 1.45	0.881
糖化血清蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	2.30 ± 0.27	2.31 ± 0.32	0.896
他克莫司浓度 / (ng · mL ⁻¹)	8.90 ± 2.20	9.56 ± 2.97	0.243
术后 3 个月			
红细胞计数 / (×10 ¹² · L ⁻¹)	4.30 ± 0.89	3.93 ± 0.76	0.059
血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	121.82 ± 25.25	118.30 ± 17.92	0.503
白蛋白 / (g · L ⁻¹)	44.98 ± 3.55	43.72 ± 2.73	0.093
总胆红素 / (μmol · L ⁻¹)	8.26 ± 3.53	7.91 ± 4.06	0.680
直接胆红素 / (μmol · L ⁻¹)	3.72 ± 1.54	3.81 ± 1.74	0.823
谷丙转氨酶 / (U · L ⁻¹)	21.65 ± 14.01	23.24 ± 19.47	0.666
谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	24.66 ± 9.67	27.94 ± 14.54	0.219
肌酐 / (μmol · L ⁻¹)	138.11 ± 51.56	137.96 ± 49.74	0.989
尿素氮 / (mmol · L ⁻¹)	8.55 ± 3.07	8.92 ± 3.04	0.601
尿酸 / (μmol · L ⁻¹)	336.87 ± 98.47	374.42 ± 90.21	0.088
三酰甘油 / (mmol · L ⁻¹)	1.92 ± 1.12	1.65 ± 0.63	0.242
胆固醇 / (mmol · L ⁻¹)	4.88 ± 1.08	5.25 ± 1.16	0.154
高密度脂蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	1.32 ± 0.35	1.41 ± 0.35	0.298
低密度脂蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	3.02 ± 0.78	3.29 ± 0.78	0.135
空腹血糖 / (mmol · L ⁻¹)	5.85 ± 1.64	5.63 ± 1.22	0.529
糖化血清蛋白 / (mmol · L ⁻¹)	2.27 ± 0.41	2.54 ± 1.12	0.144
他克莫司浓度 / (ng · mL ⁻¹)	9.17 ± 2.32	8.34 ± 2.14	0.112

表 4 两组患者肾移植术后的 SII
Tab 4 Systemic immune inflammation index after the kidney transplantation in 2 group

时间节点	SII		P
	单用组 (n = 56)	联用组 (n = 31)	
术前	708.92 ± 431.81	972.92 ± 786.20	0.091
术后 1 个月	950.08 ± 732.61	1055.31 ± 752.74	0.528
术后 3 个月	853.90 ± 725.35	617.73 ± 377.83	0.053

3 讨论

3.1 五酯胶囊对他克莫司稳态谷浓度的影响分析

现有研究显示,五酯胶囊作为他克莫司的增效剂,药物-药物相互作用 (drug-drug interactions, DDIs) 发挥着重要作用^[9]。五酯胶囊的质控成分为五味子甲素,其可抑制 CYP3A 酶及 P-糖蛋白 (P-gp) 的活性^[10],其他主要成分五味子乙素、五味子酯甲、五味子醇甲等在体内外研究中也显示出对细胞色素 CYP3A4/CYP3A5 和 P-gp 具有不同程度的抑制作用^[11-12]。此外,联用五酯胶囊在浓度达标时显示出更低的他克莫司用药日剂量,本研究与以往研究结果一致。

3.2 联用五酯胶囊对肾移植术后常见并发症的影响分析

他克莫司治疗窗较窄,疗效及不良反应与稳态谷浓度密切相关,并且不良反应的发生率与他克莫司血药浓度成正比^[13-14]。本研究对肾移植术前和术后血常规、肝肾功能以及肾移植术后常见并发症进行常规监测,结果显示联用组较单用组对肾功能恢复、排斥、感染、腹泻、高尿酸血症、高血脂及高血糖等常见并发症的发生率没有显著差异。然而,本研究观察到肾移植术后 1 个月时联用组红细胞计数及血红蛋白均低于单用组,术后 3 个月时较前升高。肾移植术后贫血 (post-transplantation anemia, PTA) 是移植术后常见并发症之一,一项国内研究报道术后 1 个月时 PTA 的发生率高达 84.3%,3 个月时为 39.5%^[15]。引起早期 PTA 的危险因素主要包括围术期出血、肾功能延迟恢复、病毒感染及缺铁等^[16]。目前尚无五酯胶囊引起贫血的相关报道,本课题组拟开展相关研究以探讨其诱发机制。故建议对服用五酯胶囊的患者,术后 1 至 3 个月期间需密切监测血常规,警惕移植术后贫血的发生。

3.3 联用五酯胶囊对 SII 的影响分析

SII 是一种新型炎症指标,可以更稳定地反映宿主全身性炎症和免疫反应状态^[17]。较高的 SII 水平显示出与一些疾病的预后较差相关,特

别是在肿瘤学领域^[18-19]。研究显示,SII 作为一种可靠的生物标志物,可以很好地预测精神障碍及心血管疾病全因死亡率^[20-21]。本研究结果显示五酯胶囊联用组在术后 3 个月时 SII 水平较术前明显降低。对于移植患者,伴随着免疫抑制的长期应用以及社会、心理环境的改变,术后心理障碍及肿瘤的发生率明显增高,心血管疾病更是移植术后死亡率的重要原因^[22-23]。现有研究显示,高 SII 值与移植患者较差的预后相关,Taner 等^[24]在儿童肾移植患者中发现移植术后 5 年的肌酐水平与同期 SII 成正比;Zhang 等^[25]发现高 SII 患者的无排斥生存率明显低于低 SII 患者,高 SII 值是肝移植术后肝癌复发的独立危险因素。本研究发现五酯胶囊联用组 SII 呈下降趋势,鉴于样本量小及随访时间短等因素限制,五酯胶囊对移植长期预后如肿瘤发生率、移植肾存活率等重要监测指标的影响仍需大样本、多中心临床研究。

五酯胶囊的活性成分包括五味子甲素、五味子乙素、五味子醇甲等,已有研究报道五味子甲素具有保肝、抗炎、护肾、抗肿瘤、抗抑郁等多种药理作用^[26]。一项体外试验研究显示五味子甲素可以诱导卵巢癌细胞的 G₀/G₁ 细胞周期停滞,同时抑制肿瘤相关巨噬细胞活性、减少微环境下炎症因子如基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 水平^[27]。Xu 等^[28]研究显示五味子乙素通过阻断 Toll 样受体 4 和髓样分化因子信号通路对脓毒症产生保护作用,分子机制上提示其有望成为治疗脓毒症的新型抗炎和免疫抑制药物。五酯胶囊的药理作用研究多为体外研究,本研究首次显示出五酯胶囊对移植患者的全身免疫炎症状态有明显的影 响,可逐渐降低宿主的 SII 值,其对肾移植受者的深入影响仍需要更多临床试验数据支持。

综上,本文从药效及安全性出发,全面分析肾移植患者联用五酯胶囊对肝肾功能及术后主要并发症的影响,并首次发现联用五酯胶囊可能会改变移植患者的全身免疫炎症状态,以期临床用药提供依据。五酯胶囊已在临床应用多年,然而对其研究仍然十分有限,因此多中心、大样本的真实世界研究对中成药个体化使用具有深刻影响。

参考文献

- 田普训, 敖建华, 李宁, 等. 器官移植免疫抑制剂临床应用技术规范 (2019 版) [J]. 器官移植, 2019, 10 (3): 213-226.

- [2] Lee DH, Lee H, Yoon HY, et al. Association of P450 oxidoreductase gene polymorphism with tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (2): 261.
- [3] 吴云, 王家莹, 卢映蓉, 等. 器官移植患者他克莫司血药浓度影响因素的研究进展 [J]. *医药导报*, 2022, 41 (5): 669-674.
- [4] 郑会丹, 占阮娟, 胡卢丰, 等. 五酯胶囊影响他克莫司血药浓度的回顾性分析 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33 (3): 155-157.
- [5] Qu JL, Bian RR, Liu BG, et al. The pharmacokinetic study of tacrolimus and Wuzhi capsule in Chinese liver transplant patients [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 956166.
- [6] He QF, Bu FJ, Wang QZ, et al. Examination of the Impact of CYP3A4/5 on drug-drug interaction between Schizandrol A/Schizandrol B and tacrolimus (FK-506): a physiologically based pharmacokinetic modeling approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 4485.
- [7] 梁子涵, 尹兰兰. 五味子提取物及其活性成分抗炎作用的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39 (11): 1657-1661.
- [8] Zhang K, Hua YQ, Wang D, et al. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients with advanced pancreatic cancer [J]. *J Transl Med*, 2019, 17 (1): 30.
- [9] 叶倩倩, 尹桃, 伍列林, 等. 中草药、食物及膳食补充剂对肾移植患者用药及肾功能的影响 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (11): 1890-1894.
- [10] Zhang F, Zhai JX, Weng N, et al. A comprehensive review of the main lignan components of Schisandra chinensis (North Wu Wei Zi) and Schisandra sphenanthera (South Wu Wei Zi) and the lignan-induced drug-drug interactions based on the inhibition of cytochrome P450 and P-glycoprotein activities [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 816036.
- [11] Qin XL, Bi HC, Wang XD, et al. Mechanistic understanding of the different effects of Wuzhi Tablet (Schisandra sphenanthera extract) on the absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of Tacrolimus (FK506) [J]. *Int J Pharm*, 2010, 389 (1-2): 114-121.
- [12] Wei H, Tao X, Di P, et al. Effects of traditional Chinese medicine Wuzhi capsule on pharmacokinetics of tacrolimus in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41 (7): 1398-1403.
- [13] Francke MI, Andrews LM, Le HL, et al. Avoiding tacrolimus underexposure and overexposure with a dosing algorithm for renal transplant recipients: a single arm prospective intervention trial [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110 (1): 169-178.
- [14] Sikma MA, Hunault CC, van de Graaf EA, et al. High tacrolimus blood concentrations early after lung transplantation and the risk of kidney injury [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2017, 73 (5): 573-580.
- [15] Huang ZL, Song TR, Fu L, et al. Post-renal transplantation anemia at 12 months: prevalence, risk factors, and impact on clinical outcomes [J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47 (9): 1577-1585.
- [16] 张健, 陶冶. 肾移植术后贫血的危险因素 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2018, 27 (4): 387-390.
- [17] Huang HP, Liu Q, Zhu LX, et al. Prognostic value of preoperative systemic immune-inflammation index in patients with cervical cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 3284.
- [18] Nost TH, Alcalá K, Urbarova I, et al. Systemic inflammation markers and cancer incidence in the UK Biobank [J]. *Eur J Epidemiol*, 2021, 36 (8): 841-848.
- [19] Meng LH, Yang YJ, Hu X, et al. Prognostic value of the pretreatment systemic immune-inflammation index in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Transl Med*, 2023, 21 (1): 79.
- [20] Xia YY, Xia CL, Wu LD, et al. Systemic immune inflammation index (SII), system inflammation response index (SIRI) and risk of all-cause mortality and cardiovascular mortality: a 20-year follow-up cohort study of 42 875 US adults [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (3): 1128.
- [21] Zhou LN, Ma XC, Wang W. Inflammation and coronary heart disease risk in patients with depression in China mainland: a cross-sectional study [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 81-86.
- [22] 付迎欣. 肾移植术后随访规范 (2019 版) [J]. *器官移植*, 2019, 10 (6): 667-671.
- [23] Biyyala D, Joseph R, Varadharajan N, et al. Incidence and prevalence of depressive, anxiety, and insomnia symptoms among adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Gen Hosp Psychiatry*, 2023, 80: 26-34.
- [24] Taner S, Goktepe B, Zaman EI, et al. Role of systemic inflammatory markers in pediatric kidney transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2023, 55 (5): 1152-1155.
- [25] Zhang WQ, Bi Y, Yang K, et al. A new model based on gamma-glutamyl transpeptidase to lymphocyte ratio and systemic immune-inflammation index can effectively predict the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1178123.
- [26] 李静, 张培, 李文尧, 等. 五味子甲素研究进展 [J]. *中国药业*, 2020, 29 (5): 53-56.
- [27] Lee K, Ahn JH, Lee KT, et al. Deoxyschizandrin, isolated from schisandra berries, induces cell cycle arrest in ovarian cancer cells and inhibits the protumoural activation of tumour-associated macrophages [J]. *Nutrients*, 2018, 10 (1): 91.
- [28] Xu JJ, Lu CJ, Liu ZJ, et al. Schizandrin B protects LPS-induced sepsis via TLR4/NF-kappaB/MyD88 signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10 (4): 1155-1163.

(收稿日期: 2023-05-07; 修回日期: 2023-07-09)

米非司酮终止妊娠经逆转治疗继发宫颈机能不全妊娠的临床分析与药学监护

李小波¹, 杨龙娜², 容玉仪¹, 赵建彬¹, 周国坚¹ (1. 珠海市中西医结合医院, 广东 珠海 519020; 2. 广东省中医院珠海医院, 广东 珠海 519000)

关键词: 米非司酮; 宫颈机能不全; 终止妊娠; 逆转治疗; 药学监护; 不良反应

中图分类号: R711.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)01-0259-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.041

米非司酮为孕激素受体拮抗剂, 黄体酮的竞争性抑制剂, 临床上广泛用于终止早孕的预处理诱导剂, 配伍米索前列醇、依沙吖啶或缩宫素以及手术流产等, 以提高孕早期流产的有效性和安全性^[1-2], 有效性可提高约 20%^[3], 具有更高的成本效益^[4-5]。米非司酮可能导致蜕膜出血、供血不足及蜕膜细胞死亡, 其批准适应证包括催经止孕、终止早孕等; 还有超适应证的临床应用如异位妊娠、终止中期妊娠、孕中晚期死胎引产、流产前宫颈扩张、手术操作前宫颈处理、子宫腺肌病和平滑肌瘤等^[6]。

宫颈机能不全是指妊娠后, 未足月前宫颈展平、变薄, 宫颈管扩张、变宽、缩短的临床状态, 最终导致中期流产或早产, 是导致复发流产和早产的主要疾病之一^[7], 发病率为 0.1%~2%, 病因机制复杂, 多在孕中晚期才出现症状而被发现诊断, 预后欠佳, 主要治疗方案黄体酮、宫颈托、宫颈环扎术^[8], 大多数指南对宫颈机能不全不推荐双胞胎妊娠的积极治疗, 也不建议两种以上治疗方案联合使用。宫颈机能不全的高危因素主要包括孕前体质量指数 (BMI)、多囊卵巢综合征、辅助生殖技术、宫颈阴道炎、宫颈锥切术史、早产史、剖宫产史、刮宫术史、第二产程延长史、急产史等^[9]。

笔者就米非司酮终止妊娠经逆转治疗继发宫颈机能不全的情况, 通过 PubMed、EBSCO 和中国知网等数据库检索“米非司酮、妊娠、宫颈机能不全”等关键词组合, 检索最近 10 年文献, 综合 30 余篇文献对米非司酮终止妊娠和对宫颈功能影响的可能机制, 以及逆转治疗的药学监护进

行分析。

1 病历资料与治疗经过

孕妇 32 岁, 身高 165 cm, 孕前体重 50 kg, BMI 18.37 kg·m⁻², 适龄结婚, 孕 1 产 0。平素月经规则, 初潮 15 岁, 5/28 d, 量中, 偶有痛经。既往体健, 2013 年 2 月行开腹右侧卵巢内子宫内膜异位囊肿剔除术+盆腔粘连松解术。家族史无异常, 无药物过敏史。

2022 年 1 月 24 日行体外受精胚胎移植术 (IVF-ET) 移植冻胚两枚, 推测末次月经 1 月 6 日, 预产期 10 月 13 日。3 月 11 日 (停经 9⁺¹ 周) 早孕 B 超示“宫内早孕、存活, 胎芽 23 mm/22 mm”, 符合孕周。口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 3.67-10.08-7.63 mmol·L⁻¹, 饮食及运动控制血糖好。孕颈部半透明厚度 (NT)、地中海贫血、无创 DNA、中晚期胎儿畸形筛查等未见明显异常。未行早期、中期唐氏筛查。

5 月 12 日 (孕 18 周) 孕妇上班突感无明显诱因阴道出血, 月经量, 偶有下腹坠胀感, 无腹痛, 以“先兆流产”急入某院就诊, 予阿托西班保胎、头孢哌酮抗感染。当日晚间因病情由外院转入本院, 予硫酸镁保胎、头孢哌酮抗感染, 签字告知难免流产可能。次日孕妇要求终止妊娠, 遂于 5 月 14 日顿服米非司酮 200 mg, 当日复查超声提示血肿未见明显增大, 孕妇自觉症状好转, 要求继续妊娠。5 月 15 日开始予地屈孕酮口服 10 mg tid, 黄体酮肌内注射 20 mg qd, 保胎治疗。5 月 19 日复查 B 超示宫内双活胎, 续予阿托西班一个疗程抑制宫缩, 地屈孕酮、黄体酮等保

基金项目: 2023 年度珠海市科技创新局医学科研项目 (No.2320004000099)。

作者简介: 李小波, 男, 副主任药师, 主要从事妊娠哺乳期安全用药方面的研究, email: 330173675@qq.com

胎治疗半个月后出院，定期产检。

7 月 1 日（孕 25⁺¹ 周）B 超诊断宫颈机能不全：宫颈内口扩张，呈漏斗状，内口分离 11 mm，扩张长度 11 mm，剩余宫颈长 18 mm（见图 1A）。7 月 22 日（孕 28⁺¹ 周）下腹紧缩感，伴褐色分泌物，查 B 超提示：宫颈内口扩张，呈漏斗状，内口分离 17 mm，扩张长度 20 mm，剩余宫颈长 3 mm（见图 1B）。考虑“宫颈机能不全”入院。入院完善相关检查，严密监测血糖，予地塞米松促胎肺成熟、硫酸镁脑保护治疗，交替硝苯地平及吲哚美辛抑制宫缩，间断自备阿托西班抑制宫缩。宫颈机能不全呈进展性，8 月 1 日（孕 29⁺⁴ 周）宫颈机能筛查 B 超示宫颈管全程扩张，8 月 15 日颈管全程 U 形扩张，较宽处约 4.1 cm（见图 1C）。住院期间每周复查血常规及感染指标未见异常，7 月 1 日（孕 25⁺¹ 周）孕中晚期四维胎儿畸形筛查未见明显异常。

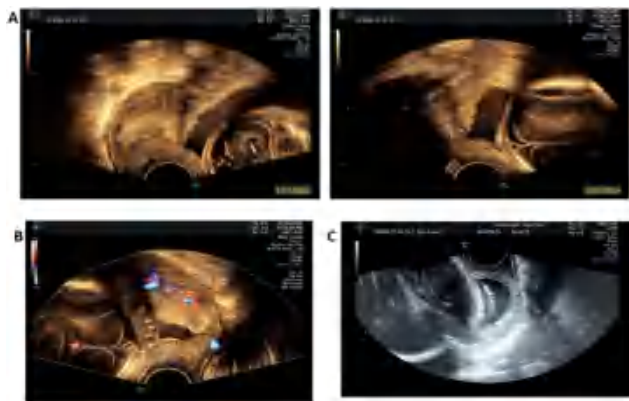


图 1 宫颈机能筛查 B 超

A. 7 月 1 日（宫颈内口扩张，呈漏斗状，内口分离 11 mm，扩张长度 11 mm，剩余宫颈长 18 mm）；B. 7 月 22 日（宫颈内口扩张，呈漏斗状，内口分离 17 mm，扩张长度 20 mm，剩余宫颈长 3 mm）；C. 8 月 15 日（宫颈管全程呈 U 形扩张，较宽处约 4.1 cm）

8 月 26 日（孕 33⁺¹ 周）下腹阵痛，阴道流血性分泌物，无阴道流液，查宫口开 6 cm，先露 S-1，早产临产，保胎已无法继续，告知孕妇及家属知情同意后行剖宫产。分娩顺利，两女婴，体重 1980/2150 g，身长 40/42 cm，Apgar 评分均为 1 min 9 分（肤色 - 1 分）、5 min 10 分、10 min 10 分。新生儿因早产转送至新生儿科治疗，精神反应好，出现气促，无发绀，考虑早产新生儿呼吸窘迫，予无创呼吸机辅助通气、咖啡因兴奋呼吸，维生素 K₁ 预防出血、静脉营养支持、蓝光退黄等对症治疗，转归较好。

2 讨论

2.1 米非司酮促宫颈扩张、软化和成熟

孕妇病史可知其宫颈机能不全的高危因素有辅助生殖技术和宫颈阴道炎，孕 25⁺¹ 周临床诊断宫颈机能不全。孕妇曾于孕 18⁺² 周因先兆流产服用米非司酮（服药 200 mg）终止妊娠，后改变主意逆转治疗继续妊娠，米非司酮对继续妊娠的影响不容忽视。

米非司酮能促进宫颈扩张。因其对宫颈前列腺素的影响，可使宫颈扩张和软化，为用于辅助流产手术的宫颈准备^[6]，放置宫颈扩张器的有效辅助手段^[10]。

米非司酮降低宫颈胶原蛋白含量促宫颈软化。米非司酮拮抗抑制孕酮和局部炎症，控制的宫颈重塑，调节剂宫颈分泌性白细胞蛋白酶抑制剂（PGRN）和颗粒蛋白前体（SLPI）表达水平^[11]。子宫颈承重部分是基质，由富含胶原蛋白的细胞外基质组成^[12]。米非司酮用于流产可能影响正常妊娠所需的宫颈胶原蛋白的胶原交联密度和结构组织的进行性变化，导致胶原蛋白含量下降^[13]，从而影响宫颈的机械承载特性，为宫颈软化、成熟的特定分子途径^[14]。

米非司酮能促进宫颈成熟，可提高 Bishop 评分，作为宫颈成熟的诱导剂使用，并可减少其他分娩诱导剂的剂量^[15]。米非司酮可有效诱导足月妊娠宫颈成熟，用于引产和自然分娩，母体和新生儿结局没有显著差异^[16-17]。分娩前米非司酮促宫颈成熟，服用第一次米非司酮 200 mg，44.6% 的孕妇产宫颈成熟并自然分娩；第二次米非司酮 200 mg 后，再有 69.1% 的孕妇产宫颈成熟和 90.6% 的自然分娩^[18]。

宫颈机能不全的病因和病理生理机制尚不完全清楚，主要集中在 Shirodkar 概述的宫颈生理紊乱和 Lash 提出的瘢痕组织理论^[19]。米非司酮促宫颈扩张、软化和成熟，影响宫颈的机械承载特性，该药物因素对宫颈生理功能的影响是否会诱发或促进宫颈机能不全，值得临床警惕，也有待进一步研究确认。米非司酮具有吸收快和半衰期长（ $t_{1/2}$ 在 25 ~ 30 h）的药代动力学特征。值得注意的是，在摄入单剂量米非司酮（100 ~ 800 mg）后，血清样本 24 h 后质量浓度均约为 1000 ng · mL⁻¹^[20]，单剂量米非司酮对宫颈的影响是相同的。米非司酮的使用会增加早产概率，但具体原因尚不清楚，而宫颈机能不全也是早产的主要原因，目前未见国内外米非司酮与宫颈机能不全关系的报道。

2.2 使用米非司酮后逆转妊娠的药学监护

孕妇因先兆流产使用米非司酮终止妊娠，改变

主意后决定继续妊娠，临床予孕酮进行逆转治疗，一个半月后继发宫颈机能不全，主要予以药物抑制宫缩和辅助休息治疗，最后获得良好妊娠结局。临床药师全程参与其药物治疗并开展药学监护。

2.2.1 米非司酮常见不良反应的分析和监护 本例患者孕 18⁺² 周服用米非司酮终止妊娠，属于超说明书用药，并且超过指南推荐的 8~16 周。在患者知情同意后，开始服用米非司酮 200 mg 欲终止妊娠。服药后当日复查 B 超血肿未见增大，孕妇自感良好，遂要求继续妊娠。治疗作用在孕妇改变主意继续妊娠后随即转变成了不良反应。在告知米非司酮的药理作用机制和可能存在的杀胚毒性后，孕妇坚持继续妊娠，后续予地屈孕酮、黄体酮逆转治疗。鉴于米非司酮半衰期长，监护米非司酮不良反应一周，未见明显药品不良反应、阴道流血、流液和下腹痛等。

2.2.2 米非司酮致畸的可能性分析和监护 米非司酮终止妊娠尝试失败并不是终止妊娠的绝对指征，但需要详细 B 超检查诊断监护胎儿发育正常。米非司酮可通过胎盘，在胎儿血浆样品中的药物质量浓度估计为 7.1 ng · mL⁻¹，远低于母亲血液样本中的浓度^[21]。米非司酮临床应用是相对安全的，它并不是终止妊娠的指征，继续妊娠是可以考虑的，且较少对继续妊娠产生毒性反应^[22]，同时也必须强调继续妊娠的风险，不能仅依据米非司酮的绝对风险，而需要综合评估。米非司酮用于高危妊娠合并卵巢癌，可以显著缩短产程和减少出血量，显著减少分娩不良反应和并发症的发生，有利于患者康复^[23]。有妊娠 21 周经腹宫颈环扎使用米非司酮做宫颈准备的病例报道，未见并发症^[24]，但仍需大规模研究以证实。临床药师经文献查阅后对患者进行释疑和心理安抚，跟踪监护孕期畸形 B 超筛查以及 28 周后 B 超检查，根据胚胎该时期的发育特点，重点观察耳、眼及外生殖器等发育情况，未见明显异常报告。

2.2.3 米非司酮相关的不良妊娠结局分析和监护 研究显示米非司酮紧急避孕失败后继续妊娠畸形率无增加，自然流产率、新生儿窒息率显著升高^[25]，需积极预防。姜薇等^[26] 一项 meta 分析认为孕早期米非司酮可能会增加流产、早产、新生儿畸形、呼吸窘迫等不良影响，如继续妊娠积极预防是必要的。Zhao 等^[27] 报道一例米非司酮诱导流产致继续妊娠胎盘植入的罕见病例。从安全角度出发应该引起重视，给予这方面的监护也是必要的，还需要跟踪关注新生儿 Apgar 评分，观察有无气促、发绀等

情况。临床药师通过文献检索对可能的药品不良反应进行预测和监护。孕 33⁺¹ 周孕妇早产，剖宫产两女婴，体重 1980/2150 g，身高 40/42 cm，Apgar 评分良好，外貌，神志、精神良好，外生殖器无异常，但有气促，无发绀，考虑早产新生儿呼吸窘迫，转新生儿科对症治疗，转归较好。

2.2.4 孕酮逆转米非司酮的分析和监护 孕酮逆转米非司酮流产治疗存在争议。孕酮是建立和维持妊娠的重要甾体激素，对孕产妇免疫系统调节起着关键作用，孕酮和米非司酮具有相互拮抗作用^[28]。Garratt 等^[29] 报道了病例系列研究，在摄入米非司酮开始药物流产但还未服用米索前列醇的妇女阴道给药黄体酮治疗两周，可有效预防米非司酮引起的药物流产反应而继续妊娠。Delgado 等^[30] 通过病例系列研究认为孕酮逆转米非司酮是安全有效的，肌肉注射黄体酮和口服孕酮有效逆转率为 64% ($P < 0.001$) 和 68% ($P < 0.001$)，同时先天缺陷没有增加。黄体酮的拮抗作用可紧急预防米非司酮诱导的流产，但无法估计黄体酮对米非司酮拮抗的效果。米非司酮给药 24~48 h 后肌肉注射甲羟孕酮不影响孕早期药物流产的成功^[31]。Grossman 等^[32] 的一项系统评价显示，计划流产服用米非司酮后，使用黄体酮逆转治疗，约 67% 继续妊娠至足月，服用米非司酮低剂量且高胎龄成功继续妊娠更常见，但证据还是不足以确定使用黄体酮治疗对比不使用黄体酮的期待治疗会具有更高的逆转率。黄体酮孕早期使用的风险较低，临床也常用于治疗先兆流产，用来抵抗米非司酮的流产反应，但也需要更多的确证研究。服用米非司酮后，如果改变主意决定继续妊娠，还需加强病情监护和对胎儿发育的监测，并予对症治疗。临床药师经文献学习认可医师米非司酮逆转治疗用药方案合理性，密切监护药物可能的不良反应和治疗效果，孕妇精神状态良好，无明显不适，孕妇无阴道流血、流液和腹痛的先兆流产症状。

2.2.5 宫颈机能不全的药学监护分析 孕妇孕 25⁺¹ 周，B 超诊断宫颈机能不全，并呈进展性。国内尚无宫颈机能不全的临床诊疗指南，借鉴国外美国妇产科医师学会 (ACOG) 和加拿大妇产科学会 (SOGC) 指南，对该病例限制活动、卧床休息是双胎妊娠仅有策略，延长孕周和提升妊娠结局的有效性未得到证实，抗菌药物和保胎药物的预防使用也不能提高疗效。临床上抑制宫缩及时完成促胎肺成熟。药学监护建议密切监测宫缩和是否有宫缩痛、宫颈扩张和缩短、阴道出血、先兆流产等病情变化，避免感染，适时终止妊娠。最后孕妇孕 33⁺¹ 周，早产临产。

3 结论

米非司酮对胎儿也是相对安全的, 经逆转治疗如病情好转, 在加强监护的情况下是可以继续妊娠的, 多数有比较好的妊娠结局, 但米非司酮用药后继续妊娠相关的不良妊娠结局和安全性也不能完全忽视。

米非司酮能够促宫颈扩张、软化和成熟, 对宫颈生理功能产生一定作用, 影响宫颈的机械承载特性, 可能会是诱发或促进宫颈功能不全进展的因素, 需要进一步研究证实。

宫颈机能不全具有复杂且尚未阐明的病因和病理生理机制, 一般到了孕中、晚期才出现症状, 对母婴安全威胁较大, 很多女性都是在孕期或流产后才得以确诊。宫颈机能不全通常在孕前子宫颈就存在异常生理状况, 对宫颈功能不全可能的相关因素进行挖掘分析, 早发现、早治疗, 加以监护干预, 有利于改善妊娠结局。

参考文献

- [1] Schreiber CA, Creinin MD, Atrio J, et al. Mifepristone pretreatment for the medical management of early pregnancy loss [J]. NEJM, 2018, 378 (23): 2161-2170.
- [2] 中华医学会计划生育学分会. 米非司酮配伍米索前列醇终止 8 ~ 16 周妊娠的应用指南 [J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50 (5): 321-322.
- [3] van den Berg J, Hamel CC, Coppus SF, et al. Current and future expectations of mifepristone treatment in early pregnancy failure: a survey among Dutch gynaecologists [J]. J Obstet Gynaecol, 2019, 39 (7): 1006-1011.
- [4] Nagendra D, Koelper N, Loza-Avalos SE, et al. Cost-effectiveness of mifepristone pretreatment for the medical management of nonviable early pregnancy: secondary analysis of a randomized clinical trial [J]. JAMA Netw Open, 2020, 3 (3): e201594-e201594.
- [5] Okeke OCB, Williams EV, Chu JJ, et al. Cost-effectiveness of mifepristone and misoprostol versus misoprostol alone for the management of missed miscarriage: an economic evaluation based on the MifeMiso trial [J]. BJOG, 2021, 128 (9): 1534-1545.
- [6] Hagey JM, Givens M, Bryant AG. Clinical update on uses for mifepristone in obstetrics and gynecology [J]. Obstet Gynecol Surv, 2022, 77 (10): 611-623.
- [7] 夏恩兰.《ACOG 宫颈环扎术治疗宫颈机能不全指南》解读 [J]. 国际妇产科学杂志, 2016, 43 (6): 652-656.
- [8] Putora K, Hornung R, Kinkel J, et al. Progesterone, cervical cerclage or cervical pessary to prevent preterm birth: a decision-making analysis of international guidelines [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2022, 22 (1): 355.
- [9] 陈静, 丁文婧, 朱晓璐, 等. 宫颈机能不全的病因学 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2014, 30 (2): 85-88.
- [10] Uhm S, Mastey N, Baker CC, et al. Mifepristone prior to osmotic dilators for dilation and evacuation cervical preparation: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study [J]. Contraception, 2022, 107: 23-28.
- [11] Samejima T, Nagamatsu T, Akiba N, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor and progranulin as possible regulators of cervical remodeling in pregnancy [J]. J Reprod Immunol, 2021, 143: 103241.
- [12] Zhang Y, Kaplan DL, House MD. Tissue engineering for cervical function in pregnancy [J]. Curr Opin Biomed Eng, 2022, 22: 100385.
- [13] Bokström H, Norström A. Effects of mifepristone and progesterone on collagen synthesis in the human uterine cervix [J]. Contraception, 1995, 51 (4): 249-254.
- [14] Nallasamy S, Akins M, Tetreault B, et al. Distinct reorganization of collagen architecture in lipopolysaccharide-mediated premature cervical remodeling [J]. Biol Reprod, 2018, 98 (1): 63-74.
- [15] Sharma P, Pathania K, Rana UB. Study of effects of mifepristone on full-term pregnancies [J]. J Obstet Gynaecol, 2020, 40 (2): 188-189.
- [16] Baev OR, Rumyantseva VP, Tsyachnyu OV, et al. Outcomes of mifepristone usage for cervical ripening and induction of labour in full-term pregnancy. Randomized controlled trial [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017, 217: 144-149.
- [17] Hcini N, Jolivet A, Pomar L, et al. Cervical maturation using mifepristone in women with normal pregnancies at or beyond term [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2020, 248: 58-62.
- [18] Кравченко. OB. Modern approaches to the pre-induction cervical ripening of mifepristone [J]. Reproductive Endocrinology, 2018, (39): 55-58.
- [19] Barter RH. Cervical incompetence in pregnancy [J]. Ann N Y Acad Sci, 1962, 97 (3): 743-745.
- [20] Szpot P, Wachelko O, Jurek T, et al. Determination of mifepristone (RU-486) and its metabolites in maternal blood sample after pharmacological abortion [J]. Molecules, 2022, 27 (21): 7605.
- [21] Ishii A, Zaitso K, Kusano M, et al. Identification and quantitation of mifepristone and its *N*-demethyl metabolite in the plasma of an aborted fetus by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-Q-TOFMS) and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) [J]. Forensic Toxicol, 2015, 33: 409-412.
- [22] 裴开颜, 林静, 刘爽, 等. 米非司酮毒理学和安全性研究 [J]. 生殖医学杂志, 2021, 30 (8): 1113-1117.
- [23] Shang LL, Wang YJ, Lyu YL. Clinical effect of mifepristone on patients with ovarian cancer in pregnancy [J]. Pak J Pharm Sci, 2019, 32 (1 Special): 421-426.
- [24] Gilbert AL, Amico JR. Dilation and evacuation with an abdominal cerclage at 21 weeks gestation: a case report [J]. Contraception, 2022, 108: 78-79.

- [25] 李静玲, 赵仁峰. 米非司酮紧急避孕失败后继续妊娠 100 例临床分析 [J]. 中国临床新医学, 2016, 9 (9): 782-784.
- [26] 姜薇, 陈玥. 妊娠早期服用米非司酮和前列腺素对继续妊娠的安全讨论 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34 (11): 1601-1604.
- [27] Zhao P, Zhao Y, He J, et al. Subsequent placenta accreta after previous mifepristone-induced abortion: a case report [J]. World J Clin Cases, 2021, 9 (33): 10244.
- [28] Shah NM, Imami N, Johnson MR. Progesterone modulation of pregnancy-related immune responses [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1293.
- [29] Garratt D, Turner JV. Progesterone for preventing pregnancy termination after initiation of medical abortion with mifepristone [J]. Eur J Contracept Reprod Health Care, 2017, 22 (6): 472-475.
- [30] Delgado G, Condly S, Davenport M, et al. A case series detailing the successful reversal of the effects of mifepristone using progesterone [J]. Issues Law Med, 2018, 33: 21.
- [31] Lang C, Chen ZE, Johnstone A, et al. Initiating intramuscular depot medroxyprogesterone acetate 24-48 hours after mifepristone administration does not affect success of early medical abortion [J]. BMJ Sex Reprod Health, 2018, 44 (4): 242-247.
- [32] Grossman D, White K, Harris L, et al. Continuing pregnancy after mifepristone and "reversal" of first-trimester medical abortion: a systematic review [J]. Contraception, 2015, 92 (3): 206-211.

(收稿日期: 2023-07-05; 修回日期: 2023-10-11)

药师在肝癌合并梗阻性黄疸患者营养支持治疗中的实践

张卿, 张攀, 侯敏, 幸海燕* (中国人民解放军陆军特色医学中心药剂科, 重庆 400042)

摘要: 营养专科临床药师、肝胆外科驻科临床药师和静配中心审方药师协同联动参与一例肝癌合并梗阻性黄疸患者术后的营养支持治疗。审方药师发现该患者肠外营养医嘱中脂肪乳用量过大, 遂联系营养药师查看病历协助审核医嘱。了解病情后营养药师将意见反馈给驻科药师, “药师联动”协助临床医师调整营养支持治疗方案。医师采纳药师团队建议, 患者肝功能显著好转, 营养指标有所升高。“药师联动”模式可发挥各专业、各岗位药师的优势, 在问题处方的发现、优化、追踪随访方面发挥了重要作用。

关键词: 药师联动; 肝癌; 营养支持; 梗阻性黄疸

中图分类号: R735.706, R575.05 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)01-0263-04
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.042

肝脏是人体糖、脂肪和蛋白质代谢的中枢器官, 严重的肝脏损害和功能下降导致不同程度的营养和代谢紊乱^[1], 肝癌患者可出现复杂的营养代谢改变, 甚至营养不良。因此, 肝癌的治疗, 除了积极针对相关病因治疗、对症治疗外, 合理的营养治疗对于提高患者生命质量、改善患者长期预后至关重要。本文结合循证医学证据, 将营养药师、驻科药师和审方药师的“药师联动”模式用于一例胆红素和转氨酶高的肝癌合并梗阻性黄疸患者营养支持治疗的干预和随访, 并探讨该模式对改善患者肝功能和提高营养治疗有效性的作用, 旨在为临床工作提供有益的经验与参考。

1 病史摘要

患者, 男, 57 岁, 63 kg, 165 cm。20 余天前, 患者无明显诱因出现皮肤瘙痒, 偶伴有右上腹部隐痛, 至外院就诊行腹部 MR 增强提示: 肝总管管壁增厚, 肝左叶团片状异常信号, 考虑胆管细胞癌可能, 高位胆道梗阻。为求进一步治疗至我院就诊, 以“梗阻性黄疸: 肝内胆管细胞癌?”于 2022 年 3 月 22 日收入肝胆外科。患者自发病以来精神食欲睡眠均稍差, 体重减轻约 7 kg, 大便每日 3~4 次。

2 治疗过程及肠外营养方案调整

患者入院后查体: 右上腹部轻度压痛, 无反

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (No.CSTB2022NSCQ-MSX1072); 重庆市科卫联合医学科研项目 (No.2023MSXM139); 重庆市临床药学重点专科建设项目 [渝卫办发〔2020〕68 号]。

作者简介: 张卿, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: zhangqingzq023@163.com ***通信作者:** 幸海燕, 女, 主管药师, 主要从事新药研发与临床合理用药评价, email: 95114755@qq.com

跳痛及肌紧张，肝区叩痛（+）。入院腹部增强 CT 示：肝Ⅳ段近肝门部占位性病变，考虑胆管细胞癌可能性大。查肝功能示：总蛋白 $56.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ↓、白蛋白 $30.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ↓、前白蛋白 $71.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ↓、总胆红素 $261.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑、直接胆红素 $135.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑、间接胆红素 $125.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑、谷草转氨酶（AST） $436.1 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑、碱性磷酸酶（ALP） $1745 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑。尿常规：胆红素+++↑、潜血+++↑。入院后予以保肝等对症治疗。

完善各项检查后，于 3 月 28 日在全麻下行左半肝切除术+肝门部胆管成形+胆肠吻合术+胆囊切除。手术时长 4 h 45 min，术后进行抗感染、抑酸、营养支持等治疗。

营养支持治疗过程为：术后第 1 日（3 月 29 日）启用含三种脂肪乳的肠外营养方案 1，具体方案见表 1。审方药师发现该肠外营养医嘱中脂肪乳用量过大，遂联系营养师查看病历协助审核医嘱。营养师查看病历后考虑脂肪乳用量过大且品种选择不当，将意见反馈给驻科药师，联

系临床医师减少脂肪乳用量和停用长链脂肪乳，并增加氨基酸用量，实际调整为方案 2，同时反馈给审方药师根据调整后医嘱再行配制。

后续治疗过程中，药师持续协同联动。术后第 3 日患者已排气，营养师查看方案 2 考虑氨基酸存在重复用药和品种选择不当的问题，所以再次将意见反馈给驻科药师，联系临床医师进一步调整为方案 3。

术后第 4 日患者排便，驻科药师监护发现该患者肝功能各项指标均较前明显好转，营养指标也有所升高，并将结果反馈给营养师，营养师建议患者应尽早尝试流质饮食。术后第 5 日患者停用肠外营养，开始流质饮食。术后第 6 日和第 15 日复查肝功能较前均明显改善。术后第 19 日，患者病情稳定，予以出院。患者术后病理结果示：中分化胆管细胞癌，癌组织侵犯肝脏被膜并累及周围脂肪组织，可见脉管内癌栓及神经侵犯，病理 AJCC 分期 pT2Nx。患者住院期间肠外营养支持方案更换详情见表 1，相关参数见表 2，肝功能及营养指标变化见表 3。

表 1 肠外营养方案

方案	糖	脂肪	氨基酸	微量元素	维生素	电解质
方案 1 (3 月 29 日)	50% 葡萄糖 400 mL	ω -3 鱼油脂肪乳 100 mL、20% 中长链脂肪乳 500 mL、脂肪乳	丙氨酰谷氨酰胺 10 g、脂肪乳 氨基酸 (18) 250 mL + 750 mL	多种微量元素 10 mL	脂溶性 / 水溶 维生素 1 盒	10% 氯化钾 40 mL
方案 2 (3 月 30 日)	50% 葡萄糖 400 mL	ω -3 鱼油脂肪乳 100 mL、20% 中长链脂肪乳 250 mL	丙氨酰谷氨酰胺 10 g、复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 750 mL	多种微量元素 10 mL	脂溶性 / 水溶 维生素 1 盒	10% 氯化钾 40 mL
方案 3 (3 月 31 日—4 月 2 日)	50% 葡萄糖 400 mL	ω -3 鱼油脂肪乳 100 mL、20% 中长链脂肪乳 250 mL	丙氨酰谷氨酰胺 10 g、10% 复方氨基酸 (20AA) 1000 mL	多种微量元素 10 mL	脂溶性 / 水溶 维生素 1 盒	10% 氯化钾 40 mL

表 2 肠外营养相关参数

方案	液体量 /mL	总热量	氨基酸	脂肪	热氮比	糖脂比
方案 1 (3 月 29 日)	2050	2510 kcal [39.8 kcal/ (kg · d)]	47.5 g [0.75 g/ (kg · d)]	160 g [2.54 g/ (kg · d)]	305.3 : 1	0.61 : 1
方案 2 (3 月 30 日)	1550	1662 kcal [26.4 kcal/ (kg · d)]	110.5 g [1.75 g/ (kg · d)]	60 g [0.95 g/ (kg · d)]	69.3 : 1	1.23 : 1
方案 3 (3 月 31 日—4 月 2 日)	1800	1660 kcal [26.3 kcal/ (kg · d)]	110 g [1.75 g/ (kg · d)]	60 g [0.95 g/ (kg · d)]	69.3 : 1	1.23 : 1

表 3 肝功能及营养指标

日期	总蛋白 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	白蛋白 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	前白蛋白 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	总胆红素 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	直接胆红素 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	间接胆红素 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	谷丙转氨酶 (ALT) / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
3 月 23 日	56.1↓	30.3↓	71.3↓	261.6↑	135.7↑	125.9↑	401.6↑	436.1↑
3 月 29 日	53.7↓	31.1↓	78.2↓	211.7↑	93.1↑	118.6↑	1066.7↑	1276.8↑
3 月 31 日	55.5↓	31.5↓	65↓	114.1↑	52.0↑	62.1↑	352.6↑	145.1↑
4 月 3 日	62.8↓	33.7↓	85.7↓	149.7↑	72.7↑	77↑	170.5↑	77.8↑
4 月 6 日	67.3	35.9↓	74.9↓	113.3↑	54.4↑	58.9↑	108.2↑	79.7↑
4 月 9 日	62.0↓	30.0↓	91.3↓	103.0↑	48.2↑	54.8↑	66.6↑	56.8↑
4 月 14 日	63.0↓	29.2↓	100.6↓	68.5↑	30.8↑	37.7↑	36.5	33.8

3 分析与讨论

3.1 “药师联动”模式在药学服务中的价值

处方前置审核系统是一种智能化的处方质量

管理体系，但由于计算机程序化特点，常出现假阳性、假阴性处方情况，故我院采取“处方前置审核系统+审方药师”的审核模式，以补充系统

的漏洞。但审方药师缺乏临床思维,审方过程中往往难以实现基于患者病情开展个体化审方。相较而言,驻科药师具备充足的时间深入临床,在所驻科室的临床工作参与度比其他药师更高。而营养药师能发挥其自身专业优势,弥补临床医师和驻科药师对专科用药熟悉但对营养药物相关知识及进展了解不够等不足,其通过营养用药干预、个体化用药指导等方式可切实提高住院患者的用药安全性和有效性。但目前营养药师配备严重不足,难以满足全院营养药物的相关咨询与会诊、随访和监护等方面的实际需求。

因此,基于前置审方工作的任务要求以及临床诊疗过程对药学服务的迫切需求,我院进一步探索开展营养支持治疗的“药师联动”。营养药师既要不断提升专业基础知识,为临床提供营养药物最新信息和使用建议,又要建立与其他驻科药师和审方药师的协作,从而组成监护和治疗团队。审方药师可以成为发现和阻断营养药物问题处方的第一道防线,驻科药师可以成为营养药师跟临床诊疗团队的桥梁,使临床科室与营养药师更好地沟通营养药物问题处方开具的原因并解决。因此,“药师联动”可进一步完善我院的临床药学专科协作模式,切实提高药学服务质量和效率。

3.2 肝癌患者营养支持治疗原则

肝癌患者的营养支持治疗目的是通过恰当有效的营养干预,改善患者营养状态和肝功能,增强其对手术或其他治疗的耐受能力,减少治疗过程中并发症。因此入院对患者进行营养风险筛查尤为重要,该患者 NRS2002 评分 5 分,为重度营养不良患者,可在术前给予 7~14 d 营养支持,营养状态恢复后行手术治疗^[2]。该患者术后才开始进行营养支持,启动时机过晚。而且肝切除术后营养治疗提倡“先肠内、后肠外、肠内不足肠外补”,因为肠内营养有助于维护肠道屏障功能,防止肠道细菌易位^[3]。该患者术后立即启动肠外营养,营养支持方式欠合理,术后应尽早进食水,肠内营养不能满足需求时再通过肠外营养补充。

3.3 肝癌患者术后肠外营养方案调整分析

3.3.1 脂肪乳的用量和品种调整 该患者术后第 1 日复查胆红素较高,但给予的初始肠外营养方案中包含三种脂肪乳,分别为: ω -3 鱼油脂肪乳 100 mL、20% 中长链脂肪乳 500 mL、脂肪乳氨基酸(18) 250 mL + 750 mL,脂肪乳用量高达 160 g [2.54 g/(kg·d)]。审方药师发现该医嘱中脂肪乳用量过大,遂联系营养药师查看病历协助审核

医嘱。营养药师查看后发现该处方糖脂比 0.61:1,而且其中脂肪乳氨基酸(18)含有的是长链脂肪乳。营养药师认为含长链和中链的混合乳剂比单纯长链的乳剂对患者血脂代谢与胆红素水平的影响更小。但仍要注意控制脂肪乳剂用量一般不超过 1 g/(kg·d)^[4]。指南^[5]中也明确指出,长链脂肪乳的长期输注可能导致肝损伤和胆汁淤积,建议终末期肝病患者应用中/长链脂肪乳。因此,营养药师将意见反馈给驻科药师,联系临床医师建议调整肠外营养方案。调整后的方案 2 脂肪由 160 g 减少为 60 g [0.95 g/(kg·d)],且未再使用含有长链脂肪乳的品种。更换方案 2 d 后复查肝功能示:总胆红素 114.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,直接胆红素 52.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,间接胆红素 62.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,ALT 352.6 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,AST 145.1 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,各项指标均较前明显好转。患者调整为方案 3 使用 4 d 后停用肠外营养,逐步恢复流质饮食。患者出院前于 4 月 14 日复查肝功能示:总胆红素 68.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,直接胆红素 30.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,间接胆红素 37.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,ALT 36.5 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$,AST 33.8 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$,肝功能各项指标进一步好转。

鱼油脂肪乳剂是临床上一种常用的治疗型脂肪乳剂,主要生理作用是调节机体炎症反应和减轻免疫抑制^[6]。国内外大量研究证实鱼油脂肪乳剂作为肠外营养中的重要组成部分,可改善外科和重症等患者的临床结局^[7-8]。还有研究表明,与大豆油比较,鱼油脂肪乳剂具有更好的肝脏保护作用,手术患者肠外营养中添加鱼油脂肪乳剂可显著改善肝功能^[9]。多项研究表明鱼油脂肪乳剂有逆转胆汁淤积的功效^[10],所以药师团队认为该患者可以继续使用鱼油脂肪乳搭配中/长链脂肪乳供能。

3.3.2 氨基酸的用量和品种调整 该患者术后第 1 日复查白蛋白较低、转氨酶较高。给予初始肠外营养方案中包含平衡氨基酸 37.5 g 和丙氨酰谷氨酰胺 10 g,提供氨基酸仅 0.75 g/(kg·d),远低于指南推荐的稳定期肝癌患者建议的蛋白质摄入 1.2~1.5 g/(kg·d)^[1]。因此营养药师将意见反馈给驻科药师,联系临床医师建议增加氨基酸的用量。更改后的方案 2 使用复方氨基酸(15)双肽(2)注射液 750 mL 和丙氨酰谷氨酰胺 10 g,增加氨基酸的用量到 110.5 g [1.75 g/(kg·d)]。营养药师认为首先氨基酸的用量超过了推荐的 1.5 g/(kg·d) 的上限,存在氨基酸用量过多导致热氮比偏低的问题。其次复方氨基酸(15)双肽(2)注射液中已含有谷氨酰胺,但是谷氨酰胺占

氨基酸总量不应超过 20%，所以谷氨酰胺占比偏大。此外，以富含支链氨基酸（BCAA）的复方氨基酸制剂作为氮源，将有助于减轻肝脏代谢负担，调整血浆支链氨基酸/芳香氨基酸（BCAA/AAA）比例，防止肝性脑病^[4]。因此，营养师建议适当减少氨基酸用量，并更换氨基酸品种。3 月 31 日临床考虑患者总蛋白等指标较低，采纳部分意见，方案 3 更改为 10% 复方氨基酸注射液（20AA）1000 mL 和丙氨酰谷氨酰胺 10 g。更换方案 4 d 后停用肠外营养，4 月 3 日复查总蛋白 62.8 g·L⁻¹↓，白蛋白 33.7 g·L⁻¹↓，前白蛋白 85.7 mg·L⁻¹↓，各项营养指标均较前有所好转。复查肝功能示：ALT 170.5 U·L⁻¹↑，AST 77.8 U·L⁻¹↑，肝功能各项指标进一步好转。患者 4 月 3 日停用肠外营养，逐步恢复流质饮食。患者出院前于 4 月 14 日复查总蛋白 63.0 g·L⁻¹↓，前白蛋白 100.6 mg·L⁻¹↓，营养指标均较前有所好转，复查肝功能各项指标也进一步好转。

4 小结

肝切除术是肝癌最主要的根治性治疗手段，其手术死亡率虽已下降至 5% 以下，但术后并发症发生率仍然高达 15% ~ 50%，如何进一步降低术后并发症的发生率是目前亟待解决的临床问题^[11]。部分患者术后出现不同程度的肝损伤。因此，应高度重视肝切除术后肝功能的监测和护肝治疗。除了根据病因进行肿瘤规范化治疗，营养支持也至关重要。肝癌患者的营养不良发生率达 50% ~ 90%^[1]。肝损伤及功能下降导致碳水化合物、脂肪、蛋白质三大营养物质以及维生素和微量元素等代谢异常。长期营养代谢异常进一步加重肝损伤，增加并发症的发生率^[12]。因此，药师应重视会影响该类患者预后的营养药物选择、用法用量以及输液速度等。“药师联动”模式可取长补短，既发挥了营养师有系统的营养专业知识的优势，又运用了驻科药师可以及时监护患者和跟临床医师沟通的“桥梁”作用和审方药师的

“第一道防线”作用，进一步保证营养用药的安全性及有效性，提升药学服务质量。

参考文献

- [1] 赵文昊, 刘雪莲, 李宏伟, 等. 原发性肝癌的营养代谢特点及意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35 (4): 905-907.
- [2] 中华医学会外科学分会外科学学组, 中国医疗保健国际交流促进会, 加速康复外科学分会肝脏外科学组. 肝切除术后加速康复中国专家共识 (2017 版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33 (10): 1876-1882.
- [3] 海峡两岸医药卫生交流协会肿瘤防治专家委员会. 肝癌肝切除围手术期管理中国专家共识 (2021 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43 (4): 414-430.
- [4] 吴国豪. 临床营养治疗理论与实践 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2015.
- [5] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会. 终末期肝病临床营养指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35 (6): 1222-1230.
- [6] 中华医学会肠外肠内营养学会. 鱼油脂肪乳剂临床应用中国专家共识 (2022 版) [J]. 中华消化外科杂志, 2022, 21 (10): 1313-1325.
- [7] Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, et al. ESPEN guidelines on parenteral nutrition: intensive care [J]. Clin Nutr, 2009, 28 (4): 387-400.
- [8] Calder PC, Adolph M, Deutz NE, et al. Lipids in the intensive care unit: recommendations from the ESPEN Expert Group [J]. Clin Nutr, 2018, 37 (1): 1-18.
- [9] Bae HJ, Lee GY, Seong JM, et al. Outcomes with perioperative fat emulsions containing omega-3 fatty acid: a metaanalysis of randomized controlled trials [J]. Am J Health Syst Pharm, 2017, 74 (12): 904-918.
- [10] Xu Z, Li Y, Wang J, et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids to reverse biopsy-proven parenteral nutrition-associated liver disease in adults [J]. Clin Nutr, 2012, 31 (2): 217-223.
- [11] 中华医学会外科学分会肝脏外科学组. 肝切除术围手术期管理专家共识 [J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37 (5): 525-530.
- [12] 梁海, 程刚, 张华鹏, 等. 1 例肝癌合并上消化道出血及营养代谢异常患者的营养支持及药学监护 [J]. 中南药学, 2021, 19 (4): 781-785.

(收稿日期: 2023-03-05; 修回日期: 2023-06-02)

临床药师参与 1 例肺部感染患者血小板减少的病例分析

李海滨¹, 龚卫静^{2*} (1. 荆门市中心医院药学部, 湖北 荆门 448000; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院药学部, 武汉 430022)

摘要: 临床药师参与 1 例肺部感染患者血小板减少的会诊, 分析患者血小板减少的可能原因。临床药师分析发现该患者血小板减少可能与感染, 尤其是新型冠状病毒感染密切相关; 也可能与抗感染药物头孢哌酮钠舒巴坦钠相关, 氯吡格雷也不能排除。建议使用升血小板药物对症处理, 停用头孢哌酮钠舒巴坦钠, 氯吡格雷在密切监测下继续使用, 最终患者血小板恢复正常。对于血小板减少, 医务工作者应引起重视并尽快寻找可能的所有原因。若疑与药物有关, 临床药师应积极配合医师, 给出相应的处理方案。

关键词: 肺部感染; 血小板减少; 新型冠状病毒感染; 药物不良反应

中图分类号: R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)01-0267-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.043

Clinical pharmacist participating in the analysis of thrombocytopenia in a patient with pulmonary infection

LI Hai-bin¹, GONG Wei-jing^{2*} (1. Department of Pharmacy, Jingmen Central Hospital, Jingmen Hubei 448000; 2. Department of Pharmacy, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022)

Abstract: Clinical pharmacists participated in the consultation on thrombocytopenia for a patient with pulmonary infection, and determined the possible causes. After the analysis, clinical pharmacists found that thrombocytopenia in the patient might be closely related to infection, especially COVID-19 infection. An anti-infection drug cefoperazone sodium and sulbactam sodium was a possible factor for thrombocytopenia. What's more, clopidogrel tablets might not be excluded. Clinical pharmacists suggested the patient should be treated with platelet-raising drugs. Clopidogrel may continue under close monitoring, while cefoperazone sodium and sulbactam sodium should be stopped. The platelets levels returned to normal finally. Medical workers should try to determine the various causes of thrombocytopenia. When drug adverse reactions were doubted, clinical pharmacists need to cooperate with physicians in deciding on treatment plan.

Key words: pulmonary infection; thrombocytopenia; COVID-19; adverse drug reaction

血小板是人体重要的血液成分, 其主要功能是参与止血和组织修复, 在促血小板生成素的作用下由巨核细胞生成^[1]。血小板减少尤其是重度减少可导致出血风险升高。血小板减少症是一组异质性疾病, 导致血小板减少的原因包括感染、恶性肿瘤、肝脏疾病、自身免疫性疾病、弥散性血管内凝血、妊娠、药物治疗和凝血障碍^[2-3]。医务人员应根据可能的原因采取相应的治疗干预。

1 病史摘要

1.1 入院基本情况

患者为 59 岁男性, 2023 年 4 月 29 日发热, 就诊疑为新型冠状病毒感染, 予以连花清瘟颗粒和双氯芬酸钠栓治疗。5 月 2 日、5 月 10 日先后出现发热, 最高 39.0℃, 用退烧药后热退。5 月 12 日再次出现发热, 同时伴胸闷、呼吸困难, 自用退烧药物后, 仍反复发热, 于当地医院办理入

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82003868); 湖北省自然科学基金项目 (No.2020CFB388)。

作者简介: 李海滨, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 540639075@qq.com *通信作者: 龚卫静, 男, 博士, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: weijingong@hust.edu.cn

院,查新型冠状病毒核酸阳性,行肺 CT 提示肺部感染,予以头孢噻肟钠、阿兹夫定片治疗,体温控制不佳。5 月 17 日患者咳嗽、咳痰症状加重,并伴气喘,肺 CT 提示肺部感染较前加重,遂转入我院呼吸科。既往有慢性肾衰竭 10 余年,高血压,冠心病,糖尿病病史。

查体示体温:36.6℃,脉搏:94 次·min⁻¹(规则),呼吸:32 次·min⁻¹(规则),血压:146/103 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。神志清楚。心音正常,心律整齐,杂音无,胸肺听诊呼吸音正常,无胸膜摩擦音。

入院诊断为:①肺部感染待查;②慢性肾衰竭;③冠心病支架置入术后。

1.2 治疗过程

入院后完善相关检查:C-反应蛋白(CRP)27.80 mg·L⁻¹↑;白细胞8.23×10⁹·L⁻¹;中性粒细胞百分比93.70%↑,淋巴细胞百分比2.8%↓,中性粒细胞7.71×10⁹·L⁻¹↑,淋巴细胞0.23×10⁹·L⁻¹↓;D-二聚体2.50 mg·L⁻¹↑,纤维蛋白原4.92 g·L⁻¹↑;铁蛋白595.3 μg·L⁻¹↑;白细胞介素-6(IL-6)11.36 pg·mL⁻¹↑;肌酐(酶法)381.7 μmol·L⁻¹↑,肾小球滤过率13.99 mL/[min·(1.73 m²)]↓;外周血细胞形态及性质、自免全套等无明显异常。

患者入院后给予注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠3 g bid ivgtt (5 月 18 日至 5 月 24 日)和莫诺拉韦0.2 g qd po (5 月 18 日至 5 月 22 日)抗感染,盐酸氨溴索注射液0.15 g qd ivgtt 化痰治疗。患者 5 月 22 日病情较前好转,新型冠状病毒核酸转阴,查血小板125×10⁹·L⁻¹,加用硫酸氢氯吡格雷片0.75 g qd po。5 月 24 日查血小板58×10⁹·L⁻¹。因患者血小板反复减少和用药复杂,呼吸科医师请临床药师会诊。临床药师结合患者既往史,梳理病情如下:

入院前,患者于 2023 年 2 月 12 日行球囊扩张术,术后给予阿司匹林肠溶片、硫酸氢氯吡格雷片长期服用;3 月 2 日、4 月 7 日先后两次行冠状动脉药物涂层支架植入术,术后给予替格瑞洛片、吲哚布芬片长期服用。4 月 17 日患者因大腿双侧皮下出血,替格瑞洛片更换为硫酸氢氯吡格雷片。4 月 29 日前血小板均处于正常水平。5 月 12 日查血小板值为63×10⁹·L⁻¹,暂停硫酸氢氯吡格雷片和吲哚布芬片。5 月 13 日给予头孢噻肟钠1.0 g bid ivgtt,升血小板胶囊1.8 g tid po,阿兹夫定片5 mg qd po 等治疗。后于 5 月 17 日

转入我院治疗。

患者 5 月 12 日至 5 月 20 日血小板减少与肺部感染(CRP 升高、肺部 CT 提示感染病变、新型冠状病毒阳性)时间上一致。5 月 22 日血小板恢复正常后,5 月 24 日再次减少。期间患者使用的药物头孢哌酮钠舒巴坦钠和硫酸氢氯吡格雷片可能与血小板减少有关。但患者 2 月 12 日至 3 月 2 日和 4 月 17 日至 4 月 29 日均服用硫酸氢氯吡格雷片,期间查血小板均处于正常水平。后 5 月 12 日复查发现血小板减少,停用氯吡格雷后也无上升趋势。因此,临床药师分析患者前期血小板减少可能与感染关系较大,而此次血小板减少可能与头孢哌酮钠舒巴坦钠和氯吡格雷相关,但氯吡格雷可能性低。建议停用头孢哌酮钠舒巴坦钠,加用升血小板药物,氯吡格雷可在密切监测下继续使用。医师采纳建议,继续使用氯吡格雷,加用升血小板胶囊1.8 g tid po 和咖啡酸片0.2 g tid po。

患者好转后出院。临床药师对患者院外电话随访,6 月 12 日复查血小板134×10⁹·L⁻¹,停用升血小板药物,6 月 15 日和 6 月 26 日血小板均处于正常水平(158×10⁹·L⁻¹、135×10⁹·L⁻¹)。整个治疗过程患者的相关临床指标见表 1。

2 药物治疗与分析

2.1 感染与血小板减少

从检查指标来看,患者从 5 月 12 日至 5 月 20 日血小板一直处于较低水平,由图 1 可见,从炎症指标 CRP 和肺部 CT 结果看此段时间患者的感染较为严重,且患者该期间新型冠状病毒核酸阳性,因此,患者的血小板减少可能与感染密切相关。感染可加重血管内皮损伤,诱发弥散性血管内凝血,导致血小板渐进性下降至明显下降,血小板下降程度与疾病严重程度成正相关^[4]。新型冠状病毒感染可导致患者血栓形成和血小板减少^[5]。一项全国性多中心回顾性研究表明新型冠状病毒阳性患者血小板减少(<150×10⁹·L⁻¹)的发生率为36.2%^[6],其可能原因是新型冠状病毒可能感染骨髓细胞,导致造血功能异常,减少血小板生成;也可能会增加自身抗体和免疫复合物的水平,导致免疫系统对血小板的特异性破坏;且病毒感染和炎症会导致肺部损伤,受损的肺组织和肺内皮细胞可能激活肺部的血小板,导致微血栓的聚集和形成,从而增加血小板消耗^[7]。有病例报道,接种新型冠状病毒疫苗及核酸检测阳性均可使血小板减少风险增加^[8]。因此,

表 1 患者的相关临床指标

Tab 1 Relevant clinical indicators of the patient

日期	血小板 / ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$) [(125 ~ 350) $\times 10^9 \cdot L^{-1}$]	C 反应蛋白 / ($mg \cdot L^{-1}$) (< 8.00 $mg \cdot L^{-1}$)	肌酐清除率 / ($mL \cdot min^{-1}$) (80 ~ 120 $mL \cdot min^{-1}$)
2023 年 2 月 16 日	198		
2023 年 3 月 2 日	247	2.83 (超敏)	18.3
2023 年 3 月 8 日	121		37.4
2023 年 4 月 7 日	158	0.72 (超敏)	16.4
2023 年 4 月 29 日	143	2.66 (超敏)	
2023 年 5 月 12 日	63	101.38	
2023 年 5 月 13 日	54	125.10	
2023 年 5 月 15 日	56		
2023 年 5 月 17 日	45	118.10	19.5
2023 年 5 月 18 日	35	117.85	
2023 年 5 月 19 日	30	161.68	
2023 年 5 月 20 日	47	88.38	17.6
2023 年 5 月 22 日	125	27.80	
2023 年 5 月 24 日	58		
2023 年 5 月 25 日	125	26.50	20.3
2023 年 5 月 26 日	110		
2023 年 6 月 12 日	134		
2023 年 6 月 15 日	158		
2023 年 6 月 26 日	135		

临床上对新型冠状病毒感染合并细菌感染肺炎患者应关注血小板，尤其是对合并可影响血小板的疾病或正在服用可降低血小板药物的患者。

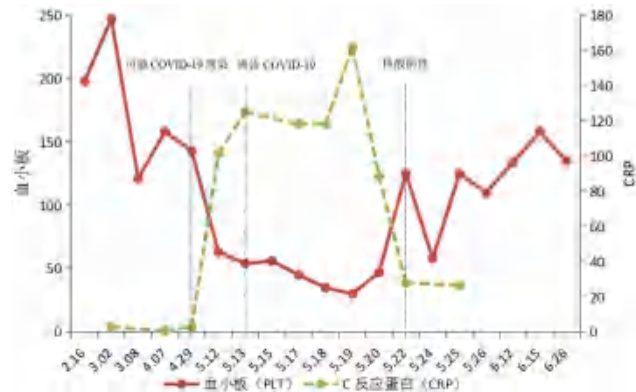


图 1 炎症指标与血小板变化的趋势图

Fig 1 Changes of inflammatory indicators and platelets

2.2 氯吡格雷与血小板减少

患者因冠状动脉支架植入术需长期服用抗血小板药物氯吡格雷。氯吡格雷虽然有安全的长期临床用药史，但也可能引起血小板减少症^[9-11]。根据《中国成人血小板减少症诊疗专家共识》，药物介导的免疫性血小板减少一般出现在药物暴露 5 ~ 10 d 后，血小板计数通常在停药 4 ~ 5 个药物半衰期后开始恢复。患者 2023 年 2 月 12 日

至 3 月 2 日、4 月 17 日至 4 月 29 日服用氯吡格雷片期间血小板都处于正常水平。出院后患者停用升血小板药物后继续服用氯吡格雷，血小板依然处于正常水平。从患者病情和出院后的随访来看，患者血小板减少可能与氯吡格雷药物无关。

2.3 头孢哌酮钠舒巴坦钠与血小板减少

患者因考虑肺部感染，给予头孢哌酮钠舒巴坦钠（2023 年 5 月 18 日至 5 月 24 日）。住院期间患者病情及炎症指标逐渐好转，但是血小板仍波动较大，处于较低水平，5 月 19 日血小板降到了最低值 $30 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ；如图 1 所示。患者从这段时间的用药来看，不能排除抗菌药物头孢哌酮钠舒巴坦钠对血小板的影响。根据《中国成人血小板减少症急诊管理专家共识》， β -内酰胺类抗菌药物是诱发血小板减少的常见药物。头孢哌酮钠舒巴坦钠的主要不良反应包括可逆性中性粒细胞减少、嗜酸粒细胞增多、血小板减少和凝血酶原时间延长等^[4]。对于有高危因素患者，如高龄、体质量指数偏低、中重度肾功能不全、头孢哌酮钠舒巴坦钠使用时间较长的患者，应加强血小板计数等指标的监测^[12-13]。

2.4 慢性肾衰竭与血小板减少

肾衰竭也是常见引起血小板减少的因素之一。当肾损害进入慢性期时，该器官的促红细胞生成素分泌减少，毒性代谢积累，引起血液学改变，包括血细胞比容、红细胞平均体积、红细胞和血小板计数减少，因此，建议慢性肾衰竭患者应定期检查血小板计数，以防止出血^[14]。但是，该患者慢性肾衰竭已有 10 余年，从检查指标上看如表 1 与图 2 所示，该患者的血小板减少可能与慢性肾衰竭无相关性。但是，临床上仍需密切关注患者的疾病状态。

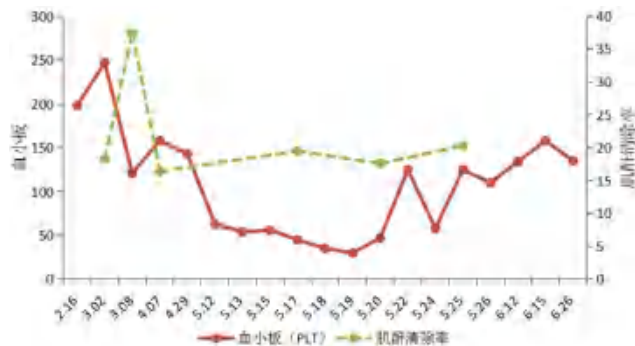


图 2 血小板与肾功能指标的变化趋势图

Fig 2 Changes of platelets and renal function indexes

3 小结

综上，该患者血小板减少的因素主要可能为感

染,尤其是与新型冠状病毒感染密切相关。临床药师收到会诊后,对患者病情进行及时梳理和分析,并与医师协商,给出治疗建议。通过对患者出院后的按时电话随访,明确了药物因素对该患者血小板减少的影响,对患者今后的长期安全用药将起到很好的作用。临床上,对于各种复杂原因导致的血小板减少,都应该进一步分析可能的原因,并给予相应的监测或处理。

参考文献

- [1] 中国成人血小板减少症急诊管理共识专家组. 中国成人血小板减少症急诊管理专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2022, 31(2): 161-168.
- [2] Greenberg EM, Kaled ES. Thrombocytopenia[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2013, 25(4): 427-434.
- [3] 王建祥, 张奉春, 刘晓清, 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.
- [4] 屈强, 屈健, 刘理. 临床药师参与 1 例多因素导致血小板减少诊治的药学实践[J]. 中南药学, 2019, 17(6): 925-928.
- [5] Iba T, Levy JH. Thrombosis and thrombocytopenia in COVID-19 and after COVID-19 vaccination[J]. Trends Cardiovasc Med, 2022, 32(5): 249-256.
- [6] Guan WJ, Zhong NS. Clinical characteristics of COVID-19 in China. Reply[J]. N Engl J Med, 2020, 382(19): 1861-1862.
- [7] Xu P, Zhou Q, Xu J. Mechanism of thrombocytopenia in COVID-19 patients[J]. Ann Hematol, 2020, 99(6): 1205-1208.
- [8] Hippisley-Cox J, Patone M, Mei XW, et al. Risk of thrombocytopenia and thromboembolism after COVID-19 vaccination and SARS-CoV-2 positive testing: self-controlled case series study[J]. BMJ, 2021, 374: n1931.
- [9] Guo YL, Li JJ, Yuan JQ, et al. Profound thrombocytopenia induced by clopidogrel with a prior history of long-term safe administration[J]. World J Cardiol, 2010, 2(6): 160-162.
- [10] Khodor S, Castro M, McNamara C, et al. Clopidogrel-induced refractory thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with rituximab[J]. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2016, 9(2): 76-79.
- [11] Rubano JA, Chen K, Sullivan B, et al. Clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura following endovascular treatment of spontaneous carotid artery dissection[J]. J Neurol Surg Rep, 2015, 76(2): e287-e290.
- [12] 郭晓明, 王莹, 刘娜, 等. 头孢哌酮钠舒巴坦钠致血小板减少症的危险因素分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(10): 1273-1276, 1280.
- [13] 王为, 曹爱霖, 钱皎. 1 例头孢哌酮舒巴坦致患者血小板减少的用药分析与药学监护[J]. 中南药学, 2018, 16(9): 1315-1318.
- [14] Dorgalaleh A, Mahmudi M, Tabibian S, et al. Anemia and thrombocytopenia in acute and chronic renal failure[J]. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2013, 7(4): 34-39.

(收稿日期: 2023-08-01; 修回日期: 2023-10-09)

药品不良反应

阿糖胞苷致重度横纹肌溶解症继发多器官功能衰竭 1 例

杨钰华, 刘月, 黄晓娜* (南京医科大学附属无锡人民医院药学部, 江苏 无锡 214023)

关键词: 阿糖胞苷; 横纹肌溶解症; 多器官功能衰竭; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)01-0271-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.044

横纹肌溶解症 (rhabdomyolysis, RM) 是骨骼肌肌肉破坏后, 肌酸激酶 (creatinase, CK)、肌红蛋白 (myoglobin, Myo) 等酶类以及离子和小分子毒性物质释放到循环中, 引起的生化紊乱及脏器功能损伤的综合征。临床表现为肌痛、肌无力、深色尿、CK 升高, 严重者可能发展成急性肾衰竭 (acute renal failure, ARF) [1]。目前, 国际上尚未制订统一的 RM 诊断标准, 常以下列几项指标 [1-2] 作出诊断: ① 有引起横纹肌溶解的病因; ② CK 显著增高, \geq 正常峰值 5 倍或 $> 1000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$; ③ 血、尿肌红蛋白水平明显增高; ④ 尿潜血试验阳性, 但是镜下未见红细胞。临床上用 CK 的血浆浓度来判断 RM 的严重程度: CK 在 $1000 \sim 5000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 为轻度 RM; CK 在 $5000 \sim 15000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 为中度 RM; CK $\geq 15000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 为重度 RM [3]。引起 RM 的因素广泛而复杂, 目前确定的导致 RM 的众多因素中, 药物是最常见的诱因 [4-5]。

RM 是急性白血病罕见的并发症, 偶有报道, 多由感染或大剂量化疗药物引起 [6-7]。标准剂量下, 阿糖胞苷导致 RM 极为罕见。而急性白血病化疗后骨髓抑制期合并 RM, 极易漏诊, 若不及时处理, 易出现器官功能损伤, 病死率近 30% [6]。本文报道 1 例急性非淋巴细胞白血病患者在标准剂量阿糖胞苷治疗下引发的重度 RM 继发多器官功能衰竭, 为识别及处理阿糖胞苷导致的 RM 提供参考。

1 病历资料

患者, 女, 50 岁, 身高 166 cm, 体重 59 kg, 体质指数 $21.41 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。因“确诊急性非淋巴细胞白血病 3 d”于 2022 年 10 月 11 日入

院。既往有剖宫产及子宫肌瘤切除术史, 无基础疾病, 无食物药物过敏史。入院查体: 体温 $36.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 脉搏 $80 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸 $16 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压 $122/69 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$), 体格检查正常, 心肺无特殊。入院诊断: 急性非淋巴细胞性白血病。

患者入院后查肝肾功能、凝血功能正常, CK $80 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) $3.2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 均在正常范围内, 血常规: 白细胞计数 (WBC) $1.47 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 中性粒细胞计数 (N) $0.19 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 血红蛋白 (Hb) $103 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 血小板计数 (PLT) $102 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, C 反应蛋白 (CRP) $< 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。10 月 12 日起予标准 IA 方案诱导化疗, 具体为: 注射用盐酸伊达比星 (瀚晖制药有限公司, 规格: 10 mg , 批号: 22002111) $10 \text{ mg qd d1} \sim 4$, 注射用阿糖胞苷 [辉瑞制药 (无锡) 有限公司, 规格: 0.1 g , 批号: GA5500] $0.1 \text{ g q12h d1} \sim 7$, 辅以碳酸氢钠水化碱化、奥美拉唑抑酸护胃、托烷司琼止吐等治疗。化疗 d1 ~ 5, 患者有恶心、反酸, 无其他不适。10 月 15 日 (化疗 d4) 复查血常规: WBC $0.99 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, N $0.17 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, PLT $102 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, Hb $96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, CRP $< 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

10 月 17 日, 患者夜间出现低热, 体温 $37.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 诉双下肢疼痛, 以肌肉痛为主, 急查血常规: WBC $0.20 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, N $0.06 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, PLT $74 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, Hb $96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, CRP $15.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$; 肝肾功能: 谷丙转氨酶 (ALT) $20.8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 谷草转氨酶 (AST) $54 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 肌酐 (Scr) $33.6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 心肌酶谱: CK $745 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, CK-MB $26 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, Myo $921.20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$ 。考虑化

基金项目: 江苏省药学会——奥赛康医院药学基金 (编号: A202132); 南京医科大学科技发展基金 (编号: NMUB20210326)。

作者简介: 杨钰华, 女, 药师, 主要从事临床药学方面的研究, email: 864979802@qq.com *通信作者: 黄晓娜, 女, 主管药师, 主要从事临床药学及药物警戒方面的研究, email: nanabo_1218@163.com

疗后 RM，合并粒细胞缺乏，暂停阿糖胞苷，予碳酸氢钠水化碱化，曲马多、双氯芬酸钠止痛等对症治疗。

10 月 18 日（暂停化疗 d1），患者诉全身肌肉酸痛，疼痛剧烈，有低热（38.1℃），解深红色尿，大便正常。复查肾功能：Scr 32.2 μmol·L⁻¹↓，钾 3.38 mmol·L⁻¹↓，总钙 1.68 mmol·L⁻¹↓，钠 119.8 mmol·L⁻¹↓。患者电解质紊乱，予补钾补钠补钙对症处理，加强利尿，同时加用拉氧头孢+莫西沙星预防感染。

10 月 19 日 1:13，患者再次出现双下肢剧烈疼痛，伴大汗淋漓。3:00 左右患者血压 66/47 mmHg，导出酱油色尿液，尿量少。查体：四肢湿冷，肢端、口唇青紫，右大腿外侧及膝关节以下、左侧膝关节以下痛触觉消失，伴胸闷气喘。肝功能：白蛋白 21.8 g·L⁻¹↓，ALT 714.1 U·L⁻¹↑，AST 3668 U·L⁻¹↑；心肌酶谱：CK 44 709 U·L⁻¹↑，CK-MB 2966.4 U·L⁻¹↑，Myo > 2000 ng·mL⁻¹↑。予升压、补液扩容、保肝、加强水化碱化等对症处理，多学科综合治疗（MDT）讨论后调整抗菌药物为亚胺培南+替加环素+泊沙康唑广泛覆盖抗感染。

10 月 19 日 20:08，患者转入重症监护室，予呼吸机辅助呼吸，人粒细胞刺激因子升白，去甲肾上腺素升压，纠正酸中毒，连续性肾脏替代治疗（CRRT）等治疗。急查血培养（阴性），血常规：WBC 0.22×10⁹·L⁻¹↓，N 0.02×10⁹·L⁻¹↓，PLT 10×10⁹·L⁻¹↓，Hb 104 g·L⁻¹↓，CRP 333.1 mg·L⁻¹↑。

10 月 20 日，复查肝功能：ALT 1349.9 U·L⁻¹↑，AST 6417 U·L⁻¹↑；CK、CK-MB 无法检出。患者四肢湿冷伴花斑、肿胀较前明显加重，气喘明显，血压、指脉氧测不出，神志浅昏迷，并出现室颤、心搏骤停，病情危重，患者家属要求放弃治疗自动出院。

患者住院期间 ALT、AST、CK、CK-MB 变化趋势及相关用药情况见图 1。

2 讨论

2.1 阿糖胞苷致 RM 的关联性分析

患者入院后予阿糖胞苷联合伊达比星治疗急性非淋巴细胞性白血病，化疗第 6 日出现肌肉剧烈疼痛，解深红色尿等症状，CK 值最高达 44 709 U·L⁻¹↑，可诊断为重度 RM^[3]。据文献报道，感染是急性白血病发生 RM 的主要诱因^[6-7]。患者在化疗后粒细胞低下期出现发热，有感染可能，但患者血培养阴性，使用广谱抗菌药物治疗后症状改善不明显，且粒细胞缺乏伴发热出现在患者

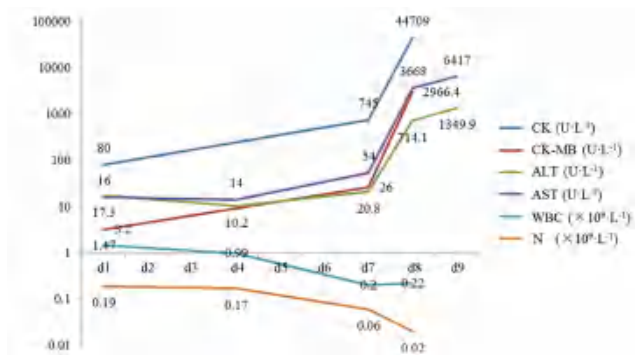


图 1 住院期间实验室检查指标变化趋势

CK 升高、肌肉酸痛症状之后，考虑感染引起该患者 RM 的可能性不大。虽然高热也有引起 RM 的报道，但多为近 40℃ 的恶性高热^[8]。患者发热与双下肢肌肉疼痛同时发生，且最高体温仅有 38.1℃，考虑发热可能是 RM 的伴随症状，而非导致 RM 的原因。

该患者在应用阿糖胞苷第 6 日发生 RM，符合阿糖胞苷已知的药物不良反应类型，且用药与不良反应的发生有合理的时间关联性。其合并用药伊达比星目前无引起 RM 的报道，且在发生 RM 前 2 日已停用。虽然在发生 RM 后及时停用阿糖胞苷，但因疾病进展较快，RM 未能缓解。此外，用药前患者体征正常，CK、CK-MB 均在正常范围，多脏器功能衰竭是在 RM 之后发生，RM 发生与其原发病也无明确的相关性。阿糖胞苷与 RM 的诺氏评估量表评分为 5 分，表明该患者发生 RM 继发多器官功能衰竭与阿糖胞苷“很可能”相关，属于极少见的药物严重不良反应。

2.2 阿糖胞苷致 RM 继发多器官功能衰竭原因分析

阿糖胞苷抑制 DNA 聚合酶，干扰体内 DNA 的生物合成，从而阻滞肿瘤细胞增殖，属于细胞周期特异性药物。有研究者认为肌肉损伤可能与已知的阿糖胞苷触发线粒体释放细胞色素 C 的能力有关，从而严重影响骨骼肌产生三磷酸腺苷（ATP）并导致横纹肌溶解，同时低钾血症、低磷血症和感染等因素可能增强阿糖胞苷对线粒体的作用^[9]。

阿糖胞苷引发 RM 极为少见，通过检索 CNKI、万方、PubMed 等中外文数据库，仅收集到阿糖胞苷致 RM 的病例报道 2 例，均为使用大剂量阿糖胞苷后出现了 RM，1 例死亡，1 例预后不详^[9-10]。本例患者入院后使用标准剂量阿糖胞苷（100 mg q12 h），化疗第 6 日出现 RM，之后继发电解质紊乱、急性肾功能不全、肝功能不全、代谢性酸中毒、低蛋白血症、感染等，虽然

及时停药, 液体治疗并启动 CRRT 等相关治疗, 但是患者病情进一步恶化, 最终发展成多器官功能衰竭。回顾该病例, 患者处于化疗后骨髓抑制状态, 并发感染, 也是其疾病进展迅速, 继发多器官功能衰竭的原因之一。电解质紊乱也会引起 RM^[11-12]。患者在 RM 发生后出现了严重的电解质紊乱, 考虑这也是患者 RM 逐渐加重的原因之一。其次, CK > 5000 U · L⁻¹ 时即有肾脏替代治疗的指征, 患者 10 月 19 日晚启动 CRRT 治疗时, CK 已急剧升高至 44 709 U · L⁻¹, 因此预后差。有研究指出, McMahan 风险评分可以预测肾脏替代治疗或导致 RM 患者的死亡率, McMahan 评分 6 分及以上与 CK 水平大于 5000 U · L⁻¹ 相比, 在预测肾脏替代治疗风险方面具有更高的敏感性和特异性^[13-14]。根据评分标准, 该患者女性 (1 分), 10 月 18 日即出现电解质紊乱 (总钙 1.68 mmol · L⁻¹) (2 分), 阿糖胞苷化疗后出现 RM (3 分), 总评分 6 分, 应尽早考虑 CRRT 肾脏保护治疗。

3 小结

目前的病例报道及药品说明书均仅提示在使用高剂量阿糖胞苷后可能发生 RM, 本例标准剂量下阿糖胞苷致重度 RM 继发多器官功能衰竭的病例报道极为罕见, 具有一定的临床价值。结合患者诊疗经过, 在临床使用标准剂量阿糖胞苷时也应充分意识到化疗后骨髓抑制期间 RM 的可能性, 并警惕其引发严重的并发症, 迅速停药并积极进行液体治疗, 及时进行 McMahan 风险评分, 保护肾功能, 同时及时处理感染、电解质紊乱等潜在诱发因素。

参考文献

- [1] Kodadek L, Carmichael SP, Seshadri A, et al. Rhabdomyolysis: an American association for the surgery of trauma

critical care committee 4 clinical consensus document [J]. *Trauma Surg Acute Care Open*, 2022, 7: e000836.

- [2] Zutt R, van der Kooij AJ, Linthorst GE, et al. Recurrent rhabdomyolysis: screening for underlying disease [J]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2010, 154: A2290.
- [3] Farkas J. Rhabdomyolysis. Retrieved June 25, 2021, from <https://emcrit.org/ibcc/rhabdo>.
- [4] Torres PA, Helmstetter JA, Kaye AM, et al. Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. *Ochsner J*, 2015, 15 (1): 58-69.
- [5] 陈茜, 吴岳桐, 赵华平, 等. 药源性横纹肌溶解症病例回顾及文献分析 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2020, 18 (5): 55-59.
- [6] 王素丽, 朱斌, 潘绍英, 等. 急性淋巴细胞白血合并横纹肌溶解症 1 例并文献复习 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2022, 31 (4): 235-237.
- [7] Le Y, Li HQ, Wan CY, et al. Rhabdomyolysis during myelosuppression in a patient with central nervous system leukemia: a case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97 (45): e13091.
- [8] 崔会娣, 于桂, 胡国薇. 高热致横纹肌溶解 1 例报告 [J]. *北京医学*, 2008, 30 (6): 381-382.
- [9] Truica CI, Frankel SR. Acute rhabdomyolysis as a complication of cytarabine chemotherapy for acute myeloid leukemia: case report and review of literature [J]. *Am J Hematol*, 2002, 70 (4): 320-323.
- [10] Margolis D, Ross E, Miller KB. Rhabdomyolysis associated with high-dose cytarabine [J]. *Cancer Treat Rep*, 1987, 71 (12): 1325-1326.
- [11] 刘超, 孙雪峰. 横纹肌溶解症研究进展 [J]. *中国实用内科杂志*, 2022, 42 (12): 1036-1040.
- [12] He R, Guo WJ, She F, et al. A rare case of hypokalemia-induced rhabdomyolysis [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2018, 15 (4): 321-324.
- [13] Simpson JP, Taylor A, Sudhan N, et al. Rhabdomyolysis and acute kidney injury: creatine kinase as a prognostic marker and validation of the McMahan score in a 10-year cohort [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2016, 33 (12): 906-912.
- [14] Cabral BMI, Edding SN, Portocarrero JP, et al. Rhabdomyolysis [J]. *Dis Mon*, 2020, 66 (8): 101015.

(收稿日期: 2023-07-13; 修回日期: 2023-10-13)

奈玛特韦片 / 利托那韦片致血管性水肿

张婷, 聂晶磊*, 付敏, 李江 (昆明市中医医院, 昆明 650051)

关键词: 奈玛特韦 / 利托那韦; 血管性水肿

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)01-0274-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.045

1 病历资料

患者男, 39 岁, 因“咳嗽伴发热、全身酸痛 1 d”于 2023 年 5 月 8 日收入我院肺病科。患者 1 d 前无明显诱因出现咳嗽, 呈阵发性, 喉中有痰不易咯出, 咽干咽痛, 伴有发热, 体温最高达 40 °C, 发热时全身酸痛、双下肢酸软乏力, 自服“布洛芬混悬液”后体温未降至正常, 未系统诊治。次日上述症状加重, 遂来我院就诊。既往体健, 无高血压、糖尿病等特殊病史, 吸烟史 20 余年, 20 支·d⁻¹, 未戒烟, 否认食物及药物过敏史。

入院查体, 体温 (T): 37.0 °C, 呼吸 (P): 19 次·min⁻¹, 心率 (R): 92 次·min⁻¹, 血压 (BP): 116/66 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。神清, 精神状态良好。口唇红润, 咽部黏膜稍充血, 颈软, 双侧颈静脉无怒张。双肺叩清音, 双肺呼吸音粗糙, 双肺未闻及干性啰音。皮肤黏膜无皮疹瘙痒, 双膝无红肿疼痛。实验室检查血生化, 谷丙转氨酶 (ALT): 57 U·L⁻¹↑, 谷草转氨酶 (AST): 45 U·L⁻¹↑, 谷氨酰转肽酶 (GGT): 125 U·L⁻¹↑, 钾 (K): 3.19 mmol·L⁻¹↓; 入院诊断: 咳嗽原因待查 (急性气管支气管炎? 肺部感染?)。入院当日患者持续发热, 体温达 38.5 °C, 咳嗽、咳白色黏痰, 新型冠状病毒核酸检测回示: 阳性 (+); 胸部 CT 示: 双肺纹理增多、增强, 右下肺外基底段胸膜下 5 mm 实性结节。明确诊断为: 新型冠状病毒感染 (轻型)。予布洛芬混悬液 (10 mL po, 按需) 退热治疗, 氯化钾缓释片 (0.5 g po tid) 补钾, 双环醇片 (25 mg po tid) 保肝护肝治疗, 奈玛特韦片 / 利托那韦片 (Paxlovid) (奈玛特韦片 300 mg, 利托那韦片 100 mg po bid) 抗病毒治疗。用药约 8 h 后患者出现双膝水肿性红斑, 边界不清, 压之无凹陷, 肤温稍高, 稍感麻木肿胀, 无疼痛, 未见明显鳞屑、糜

烂、渗出, 双下肢散在皮疹, 压之不褪色, 考虑可能为 Paxlovid 所致的药物不良反应 (ADR), 立即嘱患者停用 Paxlovid, 请皮肤科会诊。皮肤科医师会诊后考虑为 Paxlovid 所致的血管性水肿, 嘱停用 Paxlovid, 予盐酸西替利嗪片 (10 mg po qd)、咪唑斯汀缓释片 (10 mg po qd) 抗组胺, 5% 葡萄糖注射液 250 mL + 葡萄糖酸钙注射液 2 g + 维生素 C 注射液 2 g ivgtt qd 降低血管通透性, 冰片、芒硝外敷双膝, 地奈德乳膏外擦。2 d 后患者双膝水肿性红斑、双下肢皮疹基本消失。

2 讨论

血管性水肿为急性局限性水肿, 又称巨大型荨麻疹, 属于 I 型变态反应, 是由于真皮深部和皮下组织小血管受累后释放的组胺等介质导致血管扩张、渗透性增高, 渗出液从血管进入疏松组织中形成的局限性水肿^[1]。常发生在组织松弛的部位, 如眼睑、口唇、舌、喉头、外生殖器、手足等, 也可累及上呼吸道, 可与荨麻疹同时发生。重者可引起喉头水肿, 窒息而死亡, 应引起高度重视^[2]。引起血管性水肿常见的因素有某些特定的药物、食物、花粉、感染、昆虫叮咬等。药源性血管性水肿一般发生于用药后数小时至 1 周后, 与药物剂量无关^[3]。每年因药物引起的血管性水肿占有 ADR 的 2.3%^[4]。引起血管性水肿常见的药物为非甾体抗炎药、抗菌药物及血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 类药物^[5-6]。新型冠状病毒感染亦可发生皮肤损害, 其比例为 0.2% ~ 20.5%^[7], 主要表现为红斑发疹型及荨麻疹样皮损, 水疱、水痘样皮疹, 瘀点、紫癜及缺血性皮损。新型冠状病毒感染相关红斑发疹型及荨麻疹样皮损主要累及躯干, 多伴面部受累, 伴瘙痒; 新型冠状病毒感染相关瘀点、紫癜及缺血性皮损其主要原因为感染后的凝血异常导致^[8]。而血管性水肿是由于血管扩张和体液外渗所致的

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目 (No.202101AZ070001-126); 昆明市卫生科技人才培养项目 [No.2022-SW (后备) -81]。

作者简介: 张婷, 女, 主管中药师, 主要从事临床药学工作, email: 807257915@qq.com *通信作者: 聂晶磊, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 2289533211@qq.com

真皮、结缔组织或黏膜的水肿，水肿特点是突然发生、无痛、硬而富有弹性的局限性水肿，边缘不清，不痒。该患者入院后查血常规、凝血功能均无异常，皮疹主要在双下肢，无面部皮疹，为突发性水肿，主要累及膝盖，水肿无压痛、边界不清、不痒，符合血管性水肿的累及特点，且应用抗组胺及抗过敏药物疗效较好，因此考虑该患者血管性水肿为过敏性血管性水肿。由此判断该血管性水肿与原患疾病无关。

根据国家药品不良反应中心制定的关联性评价标准^[9]，对本案例进行关联性评价：

① 患者首次使用 Paxlovid 约 8 h 后出现皮疹和血管性水肿，皮疹和血管性水肿的出现与服用 Paxlovid 存在时间相关性。

② 患者当日服用的布洛芬混悬液、氯化钾缓释片、双环醇片、Paxlovid 说明书中均提及有致皮疹的风险，但氯化钾缓释片、双环醇片、Paxlovid

目前国内外无致血管性水肿的文献报道，仅布洛芬混悬液有致血管性水肿^[10-11]的文献报道。患者院外自行服用布洛芬混悬液后未出现皮疹和血管性水肿，且患者停用 Paxlovid 后继续使用布洛芬混悬液、氯化钾缓释片、双环醇片，均未出现双膝红肿加重及新发皮疹，由此判断 Paxlovid 引起皮疹和血管性水肿的可能性较大，与合并用药无关。

③ 停用 Paxlovid，同时抗组胺、改善血管通透性治疗 2 d，患者双膝水肿性红斑、双下肢皮疹基本消失。

④ 患者为中年男性，既往体健，无相关病史，无相关食物及药物过敏史，Paxlovid 使用前未见过敏反应等症状。

因诺氏药物不良反应评估量表对新的 ADR 的关联性评价较为敏感，故根据诺氏药物不良反应评估量表^[12]进行关联性评价，Paxlovid 与血管性水肿的关联性为很可能（6 分），详见表 1。

表 1 诺氏药物不良反应评估量表

相关问题	得分情况				评分理由
	是	否	未知	得分	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	+ 1	0	0	0	目前无 Paxlovid 引起血管性水肿的相关报道
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	+ 2	- 1	0	2	血管性水肿是在使用 Paxlovid 后发生的
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	+ 1	0	0	1	停药及应用拮抗剂后患者症状好转
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	+ 2	- 1	0	0	未再使用 Paxlovid
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	- 1	+ 2	0	2	已排除疾病本身及合并用药引起血管性水肿
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	- 1	+ 1	0	0	未使用安慰剂
7. 药物在血液或其他液体中是否达到毒性浓度	+ 1	0	0	0	未测定 Paxlovid 是否达到毒性浓度
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	+ 1	0	0	0	未知
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	+ 1	0	0	0	患者先前未暴露于同种或同类药物并出现过类似反应
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	+ 1	0	0	1	患者凝血功能监测、双膝红肿等症状可视为该反应的客观证据
总分值					6

注：总分值 ≥ 9 分，表明该药物与不良反应的因果关系为肯定的；5 ~ 8 分为很可能有关；1 ~ 4 分为可能有关；≤ 0 为可疑。

综上所述，虽目前无 Paxlovid 致血管性水肿的相关报道，但在临床中应予以关注。该例患者服用 Paxlovid 约 8 h 后发生血管性水肿，Paxlovid 口服 5 ~ 6 h 后血药浓度达峰值，提示医师应注意该药的迟发性过敏反应。一旦发生血管性水肿，应及时停药，并避免联合使用非甾体抗炎药、抗菌药物及 ACEI 类药物等。且用药前应详细询问过敏史，服药过程中要注意密切监测，尤其是 24 h 内，警惕该药喉头黏膜水肿的发生。

参考文献

[1] 王鑫璐, 李艳娇, 宋燕青, 等. 乙酰半胱氨酸注射液致血管性水肿 1 例分析[J]. 中国药物警戒, 2020, 17(5): 305-307.
 [2] 刁丽, 吕增禄, 王淑梅. 红花黄色素氯化钠注射液致血

管神经性水肿[J]. 药物不良反应杂志, 2016, 18(2): 143-145.
 [3] 李雪青, 刘丽英. 口服布洛芬混悬液致血管神经性水肿 1 例[J]. 临床荟萃, 2010, 25(8): 668.
 [4] Leeyaphan C, Kulthanan K, Jongjarearnprasert K, et al. Drug-induced angioedema without urticaria: prevalence and clinical features [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2010, 24(6): 685-691.
 [5] 田旭, 侯继秋, 李艳娇, 等. 雷米普利致血管性水肿[J]. 药物不良反应杂志, 2019, 21(4): 299-300.
 [6] 陈静. 血管紧张素转换酶抑制剂致血管性水肿 38 例文献分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(10): 1430-1431, 1434.
 [7] Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China [J]. J Integr Med, 2020, 382(18): 1708-1720.
 [8] 邵雅昆, 常建民. 新型冠状病毒感染的皮肤表现[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2020, 36(8): 500-504.

- [9] 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.
- [10] 林文明, 周慧萍, 陈永春, 等. 布洛芬混悬液致急性荨麻疹伴血管神经性水肿 1 例 [J]. 中国药物应用与监测, 2022, 19 (6): 419-421.
- [11] Chopra A, Pappu R, Sivaraman K. Ibuprofen-induced localized frontal and temporal forehead swellings: a rare case report [J]. J Indian Soc Periodontol, 2020, 24 (2): 178-181.
- [12] 郑飞跃, 吴燕, 饶跃峰, 等. 诺氏评估量表在药物不良反应评价中的作用及实例分析 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47 (8): 650-652.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-02)

复方磺胺甲噁唑致全血细胞减少伴药物性肝损伤 1 例

张灵¹, 张津翌¹, 范茂飞², 刘辉^{1*} (贵州省安顺市人民医院, 1. 药剂科, 2. 呼吸与危重症医学科, 贵州 安顺 561000)

关键词: 复方磺胺甲噁唑; 全血细胞减少; 药物性肝损伤

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)01-0276-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.01.046

复方磺胺甲噁唑作为抗耶氏肺孢子菌肺炎一线治疗药物, 临床应用较广泛, 其不良反应的发生率也较高。临床报道较多的不良反应主要为皮疹、恶心、呕吐、肝脏损害、血小板减少等; 严重的不良反应较少见, 一旦出现仍然有致命的危险。临床药师在药学实践中成功处置了 1 例复方磺胺甲噁唑致全血细胞减少伴药物性肝损伤患者, 现报道如下。

1 病历资料

患者, 男, 71 岁, 因“反复咳嗽、咳痰 4 年, 再发加重伴发热 10 d”于 2023 年 1 月 13 日入院治疗。3 个月前诊断为双肺炎 (耶氏肺孢子菌、流感嗜血杆菌感染)、前纵隔肿瘤, 轻度贫血等; 2023 年 1 月 3 日患者出现发热、咳嗽、咳痰遂再次入院治疗。查体: 体温 (T) 37.3 °C, 心率 (R) 70 次·min⁻¹, 呼吸 (P) 26 次·min⁻¹, 血压 (BP) 118/65 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。神清、精神萎靡, 双肺可闻及哮鸣音及湿啰音。实验室检查示: 白细胞 (WBC) 4.84×10⁹·L⁻¹、中性粒细胞百分比 66.7%、红细胞 (RBC) 2.68×10¹²·L⁻¹↓、血红蛋白 (Hb) 79 g·L⁻¹↓、血小板 (PLT) 118×10⁹·L⁻¹↓、C 反应蛋白 (CRP) 134.34 mg·L⁻¹↑、血清谷丙转氨酶 (ALT) 15 U·L⁻¹、血清谷草转氨酶 (AST) 26 U·L⁻¹, 尿常规、乙肝、丙肝、人类免疫缺陷病毒、梅毒等无异常。胸部 CT 示前纵隔肿瘤, 双肺支气管扩张并

感染。既往有高血压病病史、自诉对“青霉素、阿托伐他汀”等药物过敏, 否认食物过敏史。入院主要诊断: 慢性阻塞性肺疾病急性加重期 (AECOPD)、支气管扩张并感染并咯血, 原发性高血压 3 级 很高危组, 前纵隔肿瘤等。

入院后先后给予头孢哌酮舒巴坦、左氧氟沙星、哌拉西林他唑巴坦抗感染治疗, 多索茶碱、氨溴索等止咳平喘化痰, 主要治疗药物及相关指标变化见表 1~2。D7 患者仍有发热, 痰 NGS 示耶氏肺孢子菌, 序列数 8407; 加用磺胺甲噁唑片口服 1.44 g q6h 抗耶氏肺孢子菌治疗, D9 复查: WBC 3.78×10⁹·L⁻¹、RBC 2.60×10¹²·L⁻¹↓、Hb 76 g·L⁻¹↓、PLT 87×10⁹·L⁻¹↓; ALT 113 U·L⁻¹↑、AST 157 U·L⁻¹↑, CRP 32.85, WBC、PLT 较前减少, 转氨酶较前升高。D11 复查示全血细胞减少: WBC 2.08×10⁹·L⁻¹↓、RBC 2.37×10¹²·L⁻¹↓、Hb 69 g·L⁻¹↓、PLT 59×10⁹·L⁻¹↓; ALT 198 U·L⁻¹↑、AST 235 U·L⁻¹↑; 转氨酶进一步升高。D13 临床药师会诊考虑复方磺胺甲噁唑引起不良反应可能性较大, 建议停用, 医师采纳, 同时给予异甘草酸镁注射液 20 mL ivgtt qd 保肝治疗, 咖啡酸片 0.2 g po tid, 生血宝合剂 15 mL po tid, 重组人粒细胞集落刺激因子注射液 150 μg ih st 升白细胞和血小板。D16 患者再次发热, 复查 WBC 5.12×10⁹·L⁻¹、RBC 2.74×10¹²·L⁻¹↓、Hb 82 g·L⁻¹↓、PLT

作者简介: 张灵, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学方面的工作, email: 547181634@qq.com *通信作者: 刘辉, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学方面的工作, email: 53951947@qq.com

$92 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$; ALT $226 U \cdot L^{-1} \uparrow$ 、AST $123 U \cdot L^{-1} \uparrow$, 降钙素原 (PCT) $0.146 ng \cdot mL^{-1} \uparrow$, (1, 3) β -D 葡聚糖 $139.8 pg \cdot mL^{-1} \uparrow$ 。临床药师建议加用还原型谷胱甘肽 $1.8 g ivgtt qd$ 保肝, 注射用醋酸卡泊芬净 $70 mg ivgtt qd$ (首剂) 抗真菌治疗, 临床医师采纳。D25 复查: WBC $4.88 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 、RBC $2.56 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$ 、Hb $77 g \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $250 \times 10^9 \cdot L^{-1}$; ALT $77 U \cdot L^{-1} \uparrow$ 、AST $32 U \cdot L^{-1}$ 。骨髓涂片示: 骨髓增生活跃。临床药师会诊考虑患者 WBC、PLT 及转氨酶指标均较前恢复, 抗耶氏肺孢子菌感染治疗需达疗程, 建议加用复方磺胺甲噁唑片口服 $1.92 g q8h$, 同时严密监测血常规和肝功能, 医师采纳。D30 复查: WBC $3.50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 、RBC $2.53 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$ 、Hb $80 g \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $172 \times 10^9 \cdot L^{-1}$; ALT $29 U \cdot L^{-1}$ 、AST $18 U \cdot L^{-1}$ 。遂予出院。

表 1 血细胞、转氨酶变化

指标	住院天数							
	D1	D7	D9	D11	D14	D16	D25	D30
WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	4.84	6.7	3.78	2.08	7.47	5.12	4.88	3.5
RBC/ ($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	2.68	2.52	2.6	2.37	2.66	2.74	2.56	2.53
Hb/ ($g \cdot L^{-1}$)	79	75	76	69	78	82	77	80
PLT/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	118	114	87	59	60	92	250	172
ALT/ ($U \cdot L^{-1}$)	15	70	113	198	230	226	77	29
AST/ ($U \cdot L^{-1}$)	26	134	157	235	160	123	32	18

表 2 主要治疗药物

主要治疗药物	给药时间
头孢哌酮舒巴坦 $3.0 g ivgtt q12h$	D2 ~ D3
左氧氟沙星 $0.5 g ivgtt qd$	D4 ~ D13
复方磺胺甲噁唑 $1.44 g po q6h$	D7 ~ D12
哌拉西林他唑巴坦 $4.5 g ivgtt q8h$	D16 ~ D23
异甘草酸镁 $20 mL ivgtt qd$	D10 ~ D18
还原型谷胱甘肽 $1.8 g ivgtt qd$	D16 ~ D25
双环醇 $25 mg po tid$	D18 ~ D30
卡泊芬净首剂 $70 mg$, 次日 $50 mg ivgtt qd$	D16 ~ D30
复方甘草酸苷 $160 mg ivgtt qd$	D18 ~ D30
复方磺胺甲噁唑 $1.92 g po q8h$	D26 ~ D30

2 讨论

全血细胞减少是临床上较常见的一种血液学表现, 其原因较复杂, 包含血液系统疾病、感染、肿瘤等相关因素^[1]。D11 患者达到全血细胞减少临床诊断, 转氨酶进一步升高, 其中 AST 上升超过正常上限 5 倍。结合患者既往住院史, 入院时检查提示 RBC、Hb 降低, 考虑与患者既往前纵隔肿瘤、轻度贫血疾病相关; 患者无肝脏基础疾病, 且肝炎病毒指标为阴性, 加用复方磺胺甲噁唑期间肺部感染症状有所好转, 未再发热, 感染指标 CRP 较前下降, 考虑全血细胞减少由感染加重引起可能性不大, 同时基本排

除其他疾病或病情进展导致全血细胞减少及肝功能损害情况, 临床药师会诊考虑药物因素可能性较大; 且基于肝损伤生物化学异常模式的临床分型和 R 值, 药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 可分为肝细胞损伤型、胆汁淤积型和混合型^[2-3]。通过评估, 该患者 DILI 属于混合型。梳理患者用药史, 考虑复方磺胺甲噁唑引起全血细胞减少伴肝功能损害可能性最大, 暂时停用该药。同时积极给予保肝、升白细胞和血小板治疗, 经过治疗后患者白细胞、血小板、转氨酶均恢复正常。根据 Naranjo's 评估量表对其关联性进行分析, 复方磺胺甲噁唑得分为 5 分 (见表 3); 同时根据药品不良反应因果关系判断 5 项原则^[4], 认为该药物不良反应的发生与复方磺胺甲噁唑的关联性评价结果为“很可能”。

表 3 复方磺胺甲噁唑致全血细胞减少伴药物性肝损伤的 Naranjo's 评估结果

评价标准	是	否	未知
1. 该 ADR 先前是否已有结论性报告	+ 1		
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后出现	+ 2		
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	+ 1		
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后再次出现		- 1	
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR			0
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现			0
7. 药物在血液或其他体液中是否达毒性浓度			0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少而缓解	+ 1		
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现类似反应			0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	+ 1		
总得分			5

注: 总分 ≥ 9 分, 表明该药物与不良反应的因果关系为肯定的; 5 ~ 8 分为很可能有关; 1 ~ 4 分为可能有关; ≤ 0 分为可疑的。

复方磺胺甲噁唑致全血细胞减少、肝功能损伤以往均有文献报道^[2, 5], 但两者同时发生的报道尚未见。磺胺甲噁唑主要作用于二氢叶酸合成酶, 甲氧苄啶选择性抑制二氢叶酸还原酶, 两者合用可使细菌的叶酸代谢受到双重阻断, 长期或大剂量使用时, 复方磺胺甲噁唑可能会减少叶酸的生成导致贫血等, 但是否因此引起全血细胞减少还有待考证^[5-6]。有文献报道复方磺胺甲噁唑的严重不良反应与血清甲氧苄啶、磺胺甲噁唑浓度有关^[5, 7], 该例患者缺少复方磺胺甲噁唑血药浓度数据, 无法判断全血细胞减少是否与其体内浓度相关。复方磺胺甲噁唑引起药物性肝损伤说明书已知, 早期已有多篇文献报道。复方磺胺甲噁唑主要在肝脏中进行代谢, 对肝细胞易造成损伤及胆汁淤积^[2, 8]; 有研究报道, 复方磺胺甲噁唑

抑制肝细胞中的溶酶体磷脂酶 A，可能与引起肝功能损害有关^[2, 9]。综上，结合本例患者，再次使用复方磺胺甲噁唑后并未发生类似不良反应，考虑该严重不良反应的发生可能与复方磺胺甲噁唑给药频次有关；同时也与该患者的个体因素相关，免疫力低下、感染程度重等，均可能是该患者发生此严重药物不良反应的诱因。

3 小结

临床治疗过程中，药物不良反应时常发生。本案例中，临床药师通过收集整理患者疾病史、用药史，查阅相关文献，及时发现可疑药物并停药对症处理；同时为患者制订合适的抗耶氏肺孢子菌肺炎方案，对疗效及不良反应进行监护，充分发挥了临床药师的作用。在临床上遇到治疗方案出现矛盾时，临床药师利用自身专业知识，权衡利弊，协助医师为患者制订出最佳的治疗方案，体现了临床药师的价值。

参考文献

- [1] 刘文, 吴侠, 李峰敏, 等. 全血细胞减少的病因诊断及治疗 [J]. 中国全科医学, 2011, 14 (17): 1961-1963.
- [2] 陈超, 胡莉娟, 金美玲, 等. 临床药师参与 1 例肺部感染患者药物性肝损伤的病例分析 [J]. 上海医药, 2019, 40 (17): 64-67.
- [3] 中华医学会肝病学会药物性肝病学组. 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.
- [4] CFDA. Provisions for adverse drug reaction reporting and monitoring. 2011 [EB/OL]. (2011-05-04) [2017-02-15]. http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0053/62621_7.html.
- [5] 舒舟, 陈平, 伍三兰. 复方磺胺甲噁唑疑致肾功能不全患者全血细胞减少伴高钾血症 1 例 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (21): 2306-2309.
- [6] Sawalha K, Sobash PT, Kamoga GR. A rare cause of drug-induced pancytopenia: trimethoprim-sulfamethoxazole-induced pancytopenia [J]. Clinpract, 2021, 11 (2): 358-362.
- [7] Ye WL, Tang N, Wen YB, et al. Underlying renal insufficiency: the pivotal risk factor for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunosuppressed patients with non-transplant glomerular disease [J]. Int Urol Nephrol, 2016, 48 (11): 1863-1871.
- [8] Munoz SJ, Martinez-Hernandez A, Maddrey WC. Intrahepatic cholestasis and phospholipidosis associated with the use of trimethoprim-sulfamethoxazole [J]. Hepatology, 1990, 12 (2): 342-347.
- [9] Kowdley KV, Keeffe EB, Fawaz KA. Prolonged cholestasis due to trimethoprim sulfamethoxazole [J]. Gastroenterology, 1992, 102 (6): 2148-2150.

(收稿日期: 2023-06-08; 修回日期: 2023-08-10)

《中南药学》2024 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学学术交流，我刊现在开始启动 2024 年“毕业季”论文征稿。凡在校全日制药理学硕、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：<http://znyx.cbpt.cnki.net>，请注册投稿。

如有任何疑问可联系我们：

Tel: 0731-82258487, 0731-84895602

email: znyxzz2003@vip.163.com