中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 22 卷　第 3 期（总第 218 期）　2024 年 3 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑：中南药学编辑委员会

地址：长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院内

出版：《中南药学》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

目　次

指南或共识

（553）静脉注射用免疫球蛋白在血液系统疾病中应用的专家共识 …… 中国抗癌协会肿瘤与微生态专业委员会血液学组，广东省预防医学会血液肿瘤防治专业委员会，中国感染免疫与微生态研究转化协作组

临床营养药学研究及进展专题

（562）希特林蛋白缺乏症的营养及药物治疗 …… 邓嘉玉，邱新云，曲晓宇，等

（567）重症患者营养支持现状对临床结局的影响 …… 李德品，苏佳沌，曹科，等

（575）肠外营养致肝功能异常的主动监测和危险因素分析 …… 游利江，唐密密，邓晟

中医药原创思维与临床疗效提升研究专题

（580）从《辅行诀》所载“汤液经法图”角度论证半夏泻心汤类方的泻脾功效 …… 张爽，郭红叶，金锐

（586）基于《辅行诀》所载“汤液经法图”的辛味毒性中药炮制辅料的药味规律研究 …… 罗春梅，李蒙蒙，金锐

（592）运用《辅行诀》所载“汤液经法图”理论开展中药治疗痹证的药学监护及干预 1 例 …… 于琪，郭红叶，高婷婷，等

研究论文

（598）雷公藤甲素调控 nSMase2-Cer 鞘脂代谢信号通路发挥抗胰腺癌的作用及其相关机制研究 …… 唐科，罗余琴，谭亲友

（606）漆黄素固体脂质纳米粒的制备及体外释放评价 …… 王浩，孟梦，谢芹芹，等

（612）苏葶宣肺颗粒的制备工艺及初步药效研究 …… 叶晨雨，周丽玲，姜德，等

（619）三种递送体系对麝香草酚在致病菌胞内吸收的影响 …… 徐谭芳，刘军锋，王平，等

（626）松果菊苷下调 Skp2 的表达抑制胶质母细胞瘤上皮间质转化及胶质瘤干细胞干性 …… 吴振德，王兆涛，鞠其超，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　娄月芬　宫　建
祝德秋　秦红岩　袁　成　袁　易
贾素洁　夏道宗　原永芳　徐　珽
徐　萍　徐必学　徐华丽　高利臣
郭　韧　郭怀忠　郭建军　唐　芳
曹　玲　常福厚　章越凡　巢志茂
彭文兴　董亚琳　董得时　蒋孟良
覃　丽　傅　强　温金华　谢　诚
谢奕丹　睢大筼　肇丽梅　翟　青
黎　敏　颜　苗　潘卫三　魏高文

（633）鼠尾草酸对产后抑郁小鼠模型的作用研究
…… 兰前清，赵丞，王小青，等

（641）基于 SPG 膜乳化法制备熊果酸微球的处方优化与体外释放研究
…… 王振霖，齐娜

（647）基于网络药理学和体外实验探究天麻抗抑郁的作用机制
…… 杨淑贤，刘树森，韩雯，等

（654）藏菖蒲提取工艺优化及抑菌和抗氧化活性研究
…… 牛航迪，马迎红，谢青贵，等

（660）雷公藤甲素双向调控 Nrf2/p65 产生毒 / 效作用的机制研究
…… 刘灵，张慧民，郭林，等

（668）处方和工艺对盐酸美金刚片含量均匀度的影响
…… 肖颖，黄引，钟莹，等

（673）大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠重复给药的毒性研究
…… 杨鹏飞，吴梦瑶，邓友田，等

（679）秦皮乙素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解的影响 …… 贾绍华，郭浩，丁海鑫，等

（685）金 / 多壁碳纳米管修饰玻碳电极检测盐酸曲美他嗪
…… 崔紫瑞，李帅晴，许晴，等

（691）基于 HPLC-Q-Exactive-MS 技术定性分析冠心七味片的化学成分
…… 刘成东，郭俊英，李君，等

（699）基于肠道菌群探讨黄诺玛苷对脾虚泄泻小鼠肠道功能的影响
… 阿卜力克木・买买提吐尔逊，古力孜热木・艾尼瓦尔，骆新

综述

（708）基于化学成分、药理作用和网络药理学的没食子质量标志物预测分析 …… 丁艳，白姣姣，萨巴海提・阿不力米提，等

（715）共晶改善黄酮类化合物成药性能的研究进展
…… 尹苗苗，尚海花，侯越，等

（724）中药抗电离辐射药理作用及机制研究进展
…… 王帅，李航，王闯闯，等

（733）丹参调控糖脂代谢作用研究进展 … 黄傲，方晓洋，何维维，等

（741）外用药物制剂体外释放试验技术要求概况
…… 殷连珍，李慧敏，苏梅，等

药物分析与检验

（748）十大功劳叶 UPLC 特征图谱及多指标成分含量测定研究
…… 詹智洪，魏家保，唐双燕，等

（753）舒肝宁注射液的 ^{1}H-NMR 指纹图谱分析
…… 何峰，朱彤彤，韩春月，等

（760）基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术建立银花抗病毒口服液的指纹图谱及多指标含量测定 …… 谭金桃，周思倩，方艳，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
董德刚　蒋跃平　蒋德旗　韩立峰
韩晓芳　韩晓鹏　舒　畅　曾贵荣
蒙光义　廖德华　潘　昊　魏　博

编辑：邬志娟　彭金飞　李　科
陆窈窈

本刊声明：

本刊已入编中国知网、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。

（767）芡实配方颗粒高效液相色谱特征图谱和 4 个成分含量测定
…… 张耀元，仝一丹，邱俊棠，等

医院药学

（772）免疫检查点抑制剂所致免疫相关性肝损伤的真实世界研究
…… 唐亚娟，史金平，张琰，等
（778）四川地区 24 例鹦鹉热衣原体肺炎的临床特点及治疗分析
…… 周燕，邹娅，卢鋆，等
（784）医疗机构麻醉、第一类精神药品信息化管理模式探讨
…… 王晨，张剑，王元园，等
（791）免疫检查点抑制剂治疗肾细胞癌致免疫相关不良反应与预后相关性的 Meta 分析 …… 桂辉娜，刘晓波，温瑾，等
（799）带量采购政策对我院核苷类抗乙型肝炎病毒药物使用情况的影响
…… 陈刚，袁玉丽

药物与临床

（805）结核丸联合抗结核化疗药物治疗儿童肺结核的临床疗效
…… 陈芳，江杰，危松青，等
（810）基于条件价值评估法的肠道准备药物支付意愿调查
…… 付兴维，徐怀伏

临床药师在临床

（815）临床药师参与 1 例西罗莫司治疗肺淋巴管肌瘤病后继发肝损伤、肺结核患者的药学监护 …… 龙靓，刘湘，龚婷
（818）1 例脑脊液二代测序检出解脂耶氏酵母菌病例分析
…… 刘清慧，张颖佩

药学教育

（821）“BOPPPS ＋ E” 教学模式在《药剂学》课程中的应用
…… 高祎婷，孙晓飞，刘晓航，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*280*zh*P*30.0*42*2024-3
本期责任编辑：李科，陆窈窈，彭金飞，邬志娟
英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 3 March 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

Advertisement Publishing Certification
4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

(563) Nutritional and pharmacological treatment of Citrin protein deficiency ····· *DENG Jia-yu, QIU Xin-yun, QU Xiao-yu, et al*

(567) Effect of nutrition support status on the clinical outcome of critically ill patients ····· *LI De-pin, SU Jia-dun, CAO Ke, et al*

(575) Risk factors and active surveillance for abnormal liver function induced by parenteral nutrition ····· *YOU Li-jiang, TANG Mi-mi, DENG Sheng*

(581) Effect of Banxia Xiexin decoction on spleen purging based on "Tang-ye-jing-fa map" in *Fuxingjue* ····· *ZHANG Shuang, GUO Hong-ye, JIN Rui*

(586) Herbal property rules of processing excipients of pungent toxic Chinese medicine based on the "Tang-ye-jing-fa map" in *Fuxingjue* ····· *LUO Chun-mei, LI Meng-meng, JIN Rui*

(592) Pharmaceutical care for one patient with paralysis based on "Tang-ye-jing-fa map" in *Fuxingjue* ····· *YU Qi, GUO Hong-ye, GAO Ting-ting, et al*

(598) Triptolide regulates nSMase2-Cer sphingolipid metabolism signal pathway against-pancreatic cancer and its related mechanism ····· *TANG Ke, LUO Yu-qin, TAN Qin-you*

(606) Preparation and in vivo release of fisetin solid lipid nanoparticles ····· *WANG Hao, MENG Meng, XIE Qin-qin, et al*

(612) Preparation and efficacy of Suting Xuanfei granules ····· *YE Chen-yu, ZHOU Li-ling, JIANG De, et al*

(619) Effect of 3 delivery systems on the intracellular uptake of thymol in pathogenic bacteria ····· *XU Tan-fang, LIU Jun-feng, WANG Ping, et al*

(626) Echinacoside inhibits Skp2-induced epithelial-mesenchymal transition and stemness in glioblastoma ····· *WU Zhen-de, WANG Zhao-tao, JU Qi-chao, et al*

(633) Effect of carnosic acid on postpartum depression mouse model ····· *LAN Qian-qing, ZHAO Cheng, WANG Xiao-qing, et al*

Postal code
42-290

Publish
Editorial 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.

(641) Formulation optimization and in vitro release of ursolic acid microspheres prepared by SPG membrane emulsification
…… *WANG Zhen-lin, QI Na*

(647) Mechanism of antidepressant effect of *Gastrodia elata* Bl. based on network pharmacology and in vitro experiments
…… *YANG Shu-xian, LIU Shu-sen, HAN Wen, et al*

(654) Extraction optimization and antibacterial and antioxidant activities of Acorus calamus
…… *NIU Hang-di, MA Ying-hong, XIE Qing-gui, et al*

(660) Bidirectional regulation of triptolide on Nrf2/P65 and related toxic/therapeutic effects…… *LIU Ling, ZHANG Hui-min, GUO Lin, et al*

(668) Effect of prescription technology on the content uniformity of memantine hydrochloride tablets
…… *XIAO Ying, HUANG Yin, ZHONG Ying, et al*

(673) Toxicity of repeated dose of *Flemingia macrophylla* (Willd.) Prain and *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe in rats
…… *YANG Peng-fei, WU Meng-yao, DENG You-tian, et al*

(679) Effect of aesculetin on the proliferation, migration, invasion and glycolysis of human gastric cancer SGC-7901 cells
…… *JIA Shao-hua, GUO Hao, DING Hai-xin, et al*

(685) Determination of trimetazidine hydrochloride by Au/MWCNTs modified glassy carbon electrode
…… *CUI Zi-rui, LI Shuai-qing, XU Qing, et al*

(691) Qualitative analysis of chemical constituents of Guanxin Qiwei tablets based on HPLC-Q-Exactive-MS technique
…… *LIU Cheng-dong, GUO Jun-ying, LI Jun, et al*

(699) Effect of flavanomarein on the intestinal function in mice with spleen deficiency diarrhea based on intestinal flora
…… *Abulikemu Maimaitituerxun, Guliziremu Ainiwaer, LUO Xin*

(708) Prediction of quality markers for *Quercus Infectoria* Galls based on chemical composition, pharmacological effect and network pharmacology
…… *DING Yan, BAI Jiao-jiao, Sababaiti Abulimiti, et al*

(715) Research progress in cocrystal improvement of druggable properties of flavonoids …… *YIN Miao-miao, SHANG Hai-hua, HOU Yue, et al*

(724) Research progress in pharmacological action and mechanism of Chinese medicine against ionizing radiation
…… *WANG Shuai, LI Hang, WANG Chuang-chuang, et al*

(733) Research progress in Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma) in regulation of glucose and lipid metabolism
…… *HUANG Ao, FANG Xiao-yang, HE Wei-wei, et al*

(741) **Technical requirements of in vitro release test studies for topical drug products** ····· *YIN Lian-zhen, LI Hui-min, SU Mei, et al*

(748) **UPLC characteristic chromatogram and multi-index component content determination of Folium Mahoniae** ····· *ZHAN Zhi-hong, WEI Jia-bao, TANG Shuang-yan, et al*

(753) **^{1}H-NMR fingerprint of Shuganning injection** ····· *HE Feng, ZHU Tong-tong, HAN Chun-yue, et al*

(760) **Fingerprint of Yinhua antiviral oral liquid and multi-index determination content based on UPLC-Q-TOF-MS** ····· *TAN Jin-tao, ZHOU Si-qian, FANG Yan, et al*

(767) **HPLC specific chromatogram and quantitation of 4 components in Euryales semen formula granules** ····· *ZHANG Yao-yuan, TONG Yi-dan, QIU Jun-tang, et al*

(772) **A real-world study of immune mediated hepatitis induced by immune checkpoint inhibitors** ····· *TANG Ya-juan, SHI Jin-ping, ZHANG Yan, et al*

(778) **Clinical characteristics and treatment of 24 patients with *Chlamydia psittaci* pneumonia in Sichuan area** ····· *ZHOU Yan, ZOU Ya, LU Yun, et al*

(784) **Information management models for narcotic drugs and first category psychotropic drugs in medical institutions** ····· *WANG Chen, ZHANG Jian, WANG Yuan-yuan, et al*

(791) **Meta-analysis of the correlation between immune-related adverse events and prognosis of immune checkpoint inhibitors for renal cell carcinoma** ····· *GUI Hui-na, LIU Xiao-bo, WEN Jin, et al*

(799) **Effect of purchasing policy with quantity on the use of nucleoside anti-hepatitis B drugs in our hospital** ····· *CHEN Gang, YUAN Yu-li*

(805) **Clinical effect of tuberculosis pills combined with anti-tuberculosis chemotherapy drugs on children with pulmonary tuberculosis** ····· *CHEN Fang, JIANG Jie, WEI Song-qing, et al*

(810) **Survey of willingness to pay for bowel preparation drugs based on the contingent evaluation method** ····· *FU Xing-wei, XU Huai-fu*

(821) **Teaching mode of BOPPPS + E in the course of *Pharmaceutics*** ····· *GAO Yi-ting, SUN Xiao-fei, LIU Xiao-hang, et al*

指南或共识

静脉注射用免疫球蛋白在血液系统疾病中应用的专家共识

中国抗癌协会肿瘤与微生态专业委员会血液学组，广东省预防医学会血液肿瘤防治专业委员会，中国感染免疫与微生态研究转化协作组

摘要：静脉注射用免疫球蛋白目前已广泛应用于临床，尤其在血液系统疾病（如血液肿瘤化疗、细胞免疫治疗及造血干细胞移植）、免疫系统疾病等方面的应用也越来越普遍，目前国内外尚无静脉注射用免疫球蛋白在血液系统疾病中应用的临床指南或共识。中国抗癌协会肿瘤与微生态专业委员会血液学组、广东省预防医学会血液肿瘤防治专业委员会和中国感染免疫与微生态研究转化协作组组织有关专家共同讨论，提出《静脉注射用免疫球蛋白在血液系统疾病中应用的专家共识》，该共识基于血液系统疾病静脉注射用免疫球蛋白应用的国内外研究进展而制订，可为静脉注射用免疫球蛋白在血液系统疾病中的规范化使用提供依据。

关键词：静脉注射用免疫球蛋白；临床应用；血液系统疾病；嵌合抗原受体 T 细胞；造血干细胞移植；专家共识

中图分类号：R55　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0553-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.001

静脉注射用免疫球蛋白（intravenous immunoglobulin，IVIG）是一种从健康供者血浆中获得的血液制品，主要含有 98% 的免疫球蛋白 G（immunoglobulin G，IgG）、小量免疫球蛋白 A（immunoglobulin A，IgA）和免疫球蛋白 M（immunoglobulin M，IgM），IgG 有 4 个亚型，即 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，主要为 IgG1，占 55% ～ 70%。IVIG 具有非特异性抗炎和免疫调节作用，在 20 世纪 80 年代初首次被引入，用于治疗原发性体液免疫缺陷 [1]。目前 IVIG 已广泛应用于临床，如免疫缺陷病、特发性血小板减少性紫癜、川崎病和神经系统疾病（包括吉兰 - 巴雷综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、重症肌无力、多发性肌炎、多发性硬化症和自身免疫性脑炎）的治疗 [2-3]，其在恶性血液肿瘤化疗、靶向治疗、细胞免疫治疗及造血干细胞移植中的应用也越来越普遍 [4-5]，但国内外尚无 IVIG 应用于血液系统疾病中的临床指南或共识。为进一步提高 IVIG 在血液系统疾病中的规范应用，中国抗癌协会肿瘤与微生态专业委员会血液学组、广东省预防医学会血液肿瘤防治专业委员会和中国感染免疫与微生态研究转化协作组组织包括血液学（含造血干细胞移植专业）、感染科、重症医学科、药学部等专业的专家组成一个多学科会诊（multiple disciplinary team，MDT）指导委员会共同讨论，综合国内外相关研究现状，主要参考近 10 年公开发表的中英文文献，共同研讨制订了 IVIG 在血液系统疾病中应用的专家共识。

本共识制订流程包括三个环节：筛选共识主题、形成临床问题、形成推荐内容和强度，共识主题基于血液系统疾病 IVIG 应用的国内外研究进展而制订，形成推荐意见为 IVIG 在血液系统疾病规范化使用提供依据。共识使用 GRADE（Grading of Recommendations Assessment，Development and Evaluation）评价系统 [6]，根据 GRADE 证据分级将证据质量评为高（A）、中（B）、低（C）或极低（D）。根据 GRADE 证据 MDT 小组将建议的强度评为强或有条件（支持或反对利益干预），如果关键结局中证据的总体质量非常低，则不推荐，最终 MDT 全体专家进行投票并达成共识。治疗指南中证据推荐强度及证据水平标准：A 级（多个临床随机对照试验的 meta 分析或系统评价；多个临床随机对照试验或 1 个样本量足够的临床随机对照试验）；B 级（至少一个较高质量的临床随机对照试验）；C 级（虽未随机但设计良好的对照试验；或设计良好的队列研究或病例对照研究）；D 级（无同期对照的系

* 通信作者：郭智，email：guozhi77@126.com

列病例分析或专家共识）。Ⅰ级（基于A级证据或专家高度一致的共识，如不能做临床随机对照试验的情况）；Ⅱ级（基于B级证据和专家共识）；Ⅲ级（基于C级证据和专家共识）；Ⅳ级（基于D级证据和专家共识）。

1 IVIG概述

1.1 IVIG的作用机制

IVIG的作用机制尚不完全清楚，IVIG具有多种免疫调节作用。目前提出的关于IVIG的作用机制主要有：① IgG的Fc片段能特异性地与一些免疫效应细胞结合，封闭单核巨噬细胞Fc受体，抑制抗体依赖细胞介导的细胞毒性；② IVIG通过与抗原结合F（ab）2部分发挥免疫替代作用，IVIG中的多种特异性抗体既可直接封闭机体抗原的作用位点，使致病性抗体滴度下降，又可与机体抗原结合形成抗原抗体复合物被吞噬细胞吞噬；③ IVIG具有广谱抗正常人蛋白和抗独特性抗体的作用，可通过抢占自身抗体的作用位点，加速清除和中和循环中的自身抗体；④ 抗炎作用：IVIG可通过调节多种细胞因子的分泌，抑制促炎性细胞因子的产生，从而达到抗炎作用。此外，IVIG还可能通过补体抑制、阻断Fas配体介导的细胞凋亡等其他多种作用机制发挥潜在的抗炎作用，且这些机制并非相互排斥而是相互协同作用；⑤ 清除致病微生物：IVIG中含有多种抗细菌毒素抗体，中和细菌毒素含有的超抗原，可清除体内持续存在的病毒、细菌毒素等致病微生物[7]。

1.2 不良反应

IVIG引起感染性并发症的风险极低，是因为对输入血浆的供者筛查和传染病检测的要求非常严格。此外，IVIG制造过程本身包括至少1个、通常是2个病毒灭活或去除步骤，以防止在筛查过程中出现传染性病原体。然而，IVIG是一种由大量人血浆制成的产品，仍存在传染病传播的风险[8]。关于IVIG相关不良反应的前瞻性数据报道较少，IVIG的总体不良反应发生率在3%～15%，这些不良反应通常是自限性的，常见不良反应为头痛、发热、皮疹等，通常为轻至中度的不良反应，一般可以通过降低IVIG的输液速度来减轻或避免。IVIG禁忌人群包括对人免疫球蛋白过敏或有其他严重过敏史者，以及有抗IgA抗体选择性IgA缺乏者。严重不良反应为严重过敏反应、急性肾衰竭、血栓栓塞事件和无菌性脑膜炎。IVIG相关的严重不良反应可能影响肾脏、心血管、中枢神经系统、皮肤和血液系统。其中使用免疫球蛋白可导致血栓形成，风险因素包括高龄、长期卧床、血液高凝状态、有静脉或动脉血栓形成病史、使用雌激素、中心静脉导管留置、高粘血症以及心血管风险因素[9]。应对有血栓形成事件已知危险因素的患者及对有高粘血症风险患者的血液黏度进行基线评估。有血栓形成风险的患者应给予小剂量和最小滴速，用药前应确保患者进行适当的补水[9]。鉴于其缺乏潜在不良事件的严重性和发生率的数据，本共识认为临床医师应限制IVIG的处方，只有在证据充分的情况下才使用。此外，每个品牌的IVIG因制备方案不同，可能有独特的耐受性和安全性。

2 血液系统疾病临床应用

根据IVIG的作用机制，其在血液系统疾病临床应用可分为免疫调节及抗炎、免疫替代和抗感染两大部分。

2.1 免疫调节及抗炎作用

2.1.1 免疫性血小板减少症（immune thrombocytopenia，ITP） 最早发现大剂量IVIG在治疗原发ITP有确切疗效[10]，ITP是一种自身免疫性疾病，其主要是由于患者对自身血小板抗原免疫失耐受，通过体液免疫和细胞免疫使血小板遭到自身免疫系统的过度破坏，血小板生成受到抑制，导致外周血中血小板计数减少。国内外治疗指南均提到一线首选糖皮质激素和IVIG治疗ITP[11-12]。ITP是第一个使用IVIG治疗的自身免疫性疾病，疗效同类固醇激素[13]。在活动性出血情况下，IVIG可诱导血小板计数快速回升，迅速止血，1～3 d开始反应，高峰持续2～7 d[14]。不同中心采用的IVIG剂量和疗程不同。一项meta分析显示，低剂量IVIG（总量＜2 g•kg^{-1}）对比大剂量IVIG（总量＞2 g•kg^{-1}）治疗急性ITP，两组在临床疗效及发展成慢性ITP等方面无显著差异，且低剂量IVIG不良反应花费少[15]。美国血液学会指南小组建议以单剂量IVIG 0.8～1 g•kg^{-1}或短程糖皮质激素作为ITP的一线治疗方案，为了迅速提升血小板水平，两者可联用[16]。

共识1：对需要治疗的急性ITP成人患者，推荐一线治疗方案为单剂量IVIG 0.8～1.0 g•kg^{-1}或常规剂量0.4 g/（kg•d）×（3～5）d；对于出血患者紧急治疗，推荐糖皮质激素联合IVIG 1 g/（kg•d）×2 d（Ⅰ级推荐）。

2.1.2 噬血细胞综合征（hemophagocytic syndrome，HPS） HPS又称噬血细胞性淋巴组织细

胞增多症（hemophagocytic lymphohistiocytosis，HLH），是一种原发性或继发性免疫功能异常引起的过度炎症反应综合征，主要由淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞系统异常激活、增殖，分泌大量炎性细胞因子，引起的一系列炎症反应。根据病因不同，HPS 可分为原发性和继发性，继发性 HPS 原因多见于感染、恶性肿瘤、自身免疫性疾病，临床表现以持续性发热、肝脾肿大、全血细胞减少以及骨髓、肝、脾、淋巴结组织发现噬血现象为主要特征，HLH-1994 方案适合于各种类型 HPS 的一线诱导治疗，诱导治疗包括依托泊苷和地塞米松 [17]。应用 IVIG 可通过多种炎症机制抑制巨噬细胞的活性和减轻组织细胞的损伤，目前认为可作为 HPS 的辅助治疗，尤其是感染相关的 HPS 早期，部分患者对 IVIG 单药反应良好，采用 IVIG 治疗可避免相关药物的不良反应，治疗指南均提到 HPS 患者感染支持治疗原则和造血干细胞移植标准相似来补充 IVIG[18]。

共识 2：对于 HPS 合并感染支持治疗或者中性粒细胞减少预防感染可每周补充 IVIG 0.4 g・kg^{-1}（Ⅰ级推荐）。

2.1.3　血栓性血小板减少性紫癜（thrombotic thrombocytopenic purpura，TTP）　TTP 是一种严重的弥散性血栓性微血管病，以微血管病性溶血性贫血、血小板聚集消耗性减少以及微血栓形成造成器官损害（如肾脏、中枢神经系统等）为特征。TTP 的发病机制主要与血管性血友病因子裂解酶（ADAMTS13）活性缺乏、血管内皮细胞血管性血友病因子（VWF）异常释放、补体异常活化、血小板异常活化等因素有关，导致微血管内血栓形成、微血管病性溶血，进而引起相应器官缺血、缺氧及功能障碍，引起临床症状，TTP 五联征即血小板减少性紫癜、微血管病性溶血、中枢神经系统症状、发热以及肾脏损害，多数 TTP 患者起病急骤，病情凶险，如不治疗，死亡率高达 90%。大剂量 IVIG 可以通过抑制血小板聚集及脾脏对血小板和红细胞的破坏作用，从而对部分血浆置换无效患者发挥作用 [19-20]。

共识 3：复发难治性及多次复发 TTP 患者推荐大剂量 IVIG 治疗，IVIG 1.0 g/（kg・d）×2 d 或常规剂量 0.4 g/（kg・d）×5 d，必要时可重复给药，治疗效果不及血浆置换（Ⅱ级推荐）。

2.1.4　获得性血友病 A（acquired hemophilia A，AHA）　AHA 是指由于体内产生抑制因子Ⅷ（FⅧ）的特异性自身抗体导致 FⅧ活性（FⅧ：C）降低的获得性出血性疾病。AHA 虽然常有危及生命的严重出血，诊断正确、治疗及时可达到有效的止血效果，治疗原则包括去除诱因及治疗原发病、及时治疗及预防出血和尽早开始免疫抑制治疗以清除 FⅧ抑制物，治疗方案的确定取决于出血的严重程度和抗体特性 [21-22]。

共识 4：对于免疫抑制方案无反应的 AHA 患者，推荐给予 IVIG 1.0 g/（kg・d）×2 d 或 0.4 g/（kg・d）×5 d。IVIG 在 AHA 中疗效不佳，因此不推荐以清除抗体为目的使用 IVIG（Ⅱ级推荐）。

2.1.5　自身免疫性溶血性贫血（autoimmune hemolytic anemia，AIHA）　AIHA 系体内免疫功能调节紊乱，产生自身抗体和（或）补体吸附于红细胞表面，通过抗原抗体反应加速红细胞破坏而引起的一种溶血性贫血。自身抗体的产生涉及免疫系统的多个环节，如内源性红细胞和外源性 / 环境抗原的交叉反应，感染、恶性肿瘤等后天因素，自身抗原结构改变抗原呈递失调从而产生自身抗体，B 细胞和 T 细胞功能障碍等。AIHA 根据抗体作用于红细胞膜所需的最适温度可分为温抗体型和冷抗体型，IgG 介导的温抗体型最常见，AIHA 一线治疗包括糖皮质激素或糖皮质激素联合利妥昔单抗，糖皮质激素治疗无效、复发、不耐受和依赖的患者都可以进行二线治疗，首选方案是利妥昔单抗，三线治疗有脾切除和环孢素 A、西罗莫司、硫唑嘌呤等免疫抑制剂。在普通变异型免疫缺陷病相关温抗体型继发性 AIHA，患者应用糖皮质激素、免疫抑制剂或利妥昔单抗后容易发生严重感染，甚至危及生命，治疗过程中推荐给予 IVIG 以升高免疫球蛋白水平 [23-24]。

共识 5：大剂量 IVIG 可用于危及生命的溶血或其他治疗无效的溶血，推荐仅在严重或快速溶血时，给予大剂量激素联合 IVIG 1.0 g/（kg・d）×2 d 或 0.4 g/（kg・d）×5 d 挽救治疗（Ⅰ级推荐）。

2.1.6　移植物抗宿主病（graft-versus-host disease，GVHD）　在移植相关的死亡病例中，50% 以上直接或间接与 GVHD 相关，需要寻找有效的 GVHD 防治方法。GVHD 往往与移植后患者免疫功能重建延迟密切相关，促进免疫重建的形成是解决异基因造血干细胞移植（allogenic hematopoietic stem cell transplantation，allo-HSCT）后并发症的根本途径。诱导免疫耐受是指移植后受体在不需要免疫抑制剂的情况下，对感染有抵抗力又不会出现排斥反应，移植物能长期保持稳定功能 [25]。近年的研究热点提到肠道菌群在机体

抗肿瘤免疫反应的作用（包括在化疗和 allo-HSCT 中的作用）已受到越来越多的关注。肠腔共生的微生物即肠道菌群在 GVHD 的病理生理过程中发挥重要作用，肠道菌群变化可能决定了 GVHD 的严重程度，移植改变了肠道菌群的组成从而发生菌群失调，肠道微生物易穿透受损的肠黏膜，引起异常免疫反应，活化了 T 淋巴细胞，促进炎症介质释放，造成胃肠黏膜屏障受损，从而损伤胃肠道等靶器官[26-27]。基于 IVIG 的免疫调节作用，一项针对 allo-HSCT 患者的大型随机对照研究，比较了移植前－ 7 d 至移植后＋ 90 d 每周给予 IVIG 0.5 g • kg^{-1}，随后第 90 ～ 360 日每月给予 IVIG 0.5 g • kg^{-1}，多变量分析显示，与 IVIG 接受者相比，对照组发生急性 GVHD ＞ 2 级的风险增加（RR 1.63，P ＜ 0.0056）[28]。在另一项研究中，超过 600 名受试者随机接受 0.1 g • kg^{-1}、0.25 g • kg^{-1} 或 0.5 g • kg^{-1} 的 IVIG，每周一次直至移植后第 90 日，然后每月一次直至移植后 1 年，研究显示人类白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）相合无关供者组和接受最高剂量 IVIG 受试者的急性 GVHD 发生率最低[29]。

共识 6：推荐在配型不合 allo-HSCT 时，针对 GVHD 高危人群，移植前－ 7 d 至移植后＋ 90 d 每周给予 IVIG 0.5 g • kg^{-1}，移植后第 90 日至移植后 1 年每月给予 IVIG 0.5 g • kg^{-1}（Ⅱ级推荐）。

2.2 免疫替代和抗感染

2.2.1 嵌合抗原受体 T 细胞免疫治疗（chimeric antigen receptor T-cell，CAR-T） CAR-T 是通过基因工程将针对肿瘤抗原的单链可变区与共刺激分子的基因片段整合至 T 细胞基因组并在 T 细胞上表达，特异识别肿瘤抗原并启动下游信号通路，使 CAR-T 细胞增殖、活化，发挥靶向肿瘤杀伤效应，CAR-T 用于难治 / 复发急性 B 淋巴细胞白血病的常见靶点为 CD19 和 CD22[30]。CAR-T 细胞产品在治疗复发难治 B 细胞肿瘤中取得了较好的疗效，主要靶点为 CD19，适应证主要包括弥漫大 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤等[31]。CAR-T 治疗复发难治性多发性骨髓瘤以 B 细胞成熟抗原（B cell maturation antigen，BCMA）为首个靶点，CS1、GPRC5D、CD38、CD138 等许多其他靶点也已进入临床试验[32]。回输 CAR-T 前的预处理化疗方案会引起淋巴细胞衰竭，CAR-T 回输后靶向杀伤肿瘤细胞的同时，也会破坏正常 B 淋巴细胞，导致 B 淋巴细胞免疫功能缺陷和低丙种球蛋白血症（hypogammaglobulinemia，HG）[33]，以上及其他因素引起 CAR-T 治疗后感染风险明显增加，多数接受 CAR-T 治疗的患者都有不同程度的 HG 或 B 淋巴细胞缺陷[34]。多发性骨髓瘤患者接受 BCMA CAR-T 治疗后，76% 的患者出现了 HG，增加了感染风险[35]。一项研究急性淋巴细胞白血病患者回输 CAR-T 后 28 d 内的感染的发生率为 40%[36]，另一项 BCMA CAR-T 治疗多发性骨髓瘤的临床试验中感染发生率为 42% ～ 69%[37]。国内专家共识认为预防性静脉注射丙种球蛋白是接受 CAR-T 治疗的患者的常规辅助治疗，美国国立综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network，NCCN）指南建议接受 CAR-T 的患者需要定期注射丙种球蛋白。欧洲血液和骨髓移植学会及美国血液和骨髓移植学会建议 CAR-T 治疗后的 IVIG 替代治疗遵循 X- 连锁无丙种球蛋白血症原则[37]。

共识 7：CAR-T 治疗后定期复查 B 淋巴细胞数量和免疫球蛋白水平，每月至少一次 IVIG 输注，每次 0.4 g • kg^{-1}，直到免疫球蛋白和 B 淋巴细胞恢复到正常范围或 CAR-T 治疗后 6 个月（Ⅰ级推荐）。

共识 8：CAR-T 治疗后血清 IgG ＜ 4 g • L^{-1} 且严重或反复感染的患者，应继续每月至少一次 IVIG 输注，每次 0.4 g • kg^{-1}，直到危险因素消除；若血清 IgG 4 ～ 6 g • L^{-1}，治疗后仍存在严重或反复感染，同样需要每月至少一次 IVIG 输注，每次 0.4 g • kg^{-1}；对于血清 IgG ＞ 6 g • L^{-1}，且并发感染者，建议进一步评估各型免疫球蛋白水平（IgG、IgA 及 IgM）和 B 淋巴细胞数量（Ⅰ级推荐）。

2.2.2 急性白血病化疗（acute leukemia，AL） 强化疗是 AL 患者缓解病情和延长生存时间的主要手段，随着化疗方案的不断改进以及化疗强度的提高，AL 预后已有显著改善，但受到化疗后粒细胞严重缺乏、免疫抑制剂和糖皮质激素的使用等各种因素影响，患者极易发生感染，从而影响治疗效果，加重经济负担，严重时还会威胁患者的生命安全。因此，AL 化疗后预防及积极控制感染的发生是极为重要的[38]。尽管在接受化疗的 AL 患者中发现 B 淋巴细胞受损、免疫球蛋白水平降低，但输注 IVIG 尚未被广泛系统地用于 AL 患者的相关感染预防或治疗，可能是多数感染归因于疾病和 / 或化疗相关的中性粒细胞减少，对获得缓解和完成治疗的患者，免疫功能缺陷可能在完成治疗后还会持续 6 ～ 12 个月。AL 化疗后出现中性粒细胞减少时，中性粒细胞介导的炎症反应不明显，严重中性粒细胞减少最常发生在

造血干细胞移植、AL 初次诱导化疗、大剂量化疗巩固阶段，必须及早识别中性粒细胞减少性发热并及时开始经验性全身性抗微生物药物治疗，以避免脓毒症综合征及死亡，在抗感染治疗的同时输注 IVIG 十分重要[39]。

共识 9：建议对 AL 患者输注 IVIG 的益处和风险进行个体化评估，在权衡与治疗相关的风险和成本后，建议每月至少一次 IVIG 输注，每次 0.4 g • kg^{-1}，目标血清 IgG 4 ～ 6 g • L^{-1}；有突破性感染时，目标血清 IgG ＞ 6 ～ 8 g • L^{-1}，同时应监测血清 IgG 水平、特异性抗体滴度和感染情况，以指导 IVIG 治疗周期（Ⅱ级推荐）。

此外，AL 强化疗也会造成严重的骨髓抑制，化疗后需要反复输血治疗，反复输血易合并输血不良反应，还有部分患者反复输注血小板可发生血小板无效输注，其主要原因是同种免疫反应，与抗人类白细胞抗原的特异性抗体有关，AL 还会引起患者 ABO 血型抗原减弱，影响到临床配血，增加因血型不合而发生溶血反应的风险，严重时甚至导致患者死亡。应用 IVIG 可以封闭单核 - 巨噬细胞的 Fc 受体，使自身抗体介导的组织细胞的破坏减少，减少输血不良反应，提高输血治疗的安全性。

共识 10：针对反复输注血小板无效、输血不良反应明显的 AL 患者，可推荐输血前使用 IVIG，每次 0.2 ～ 0.4 g • kg^{-1}（Ⅱ级推荐）。

2.2.3　多发性骨髓瘤（multiple myeloma，MM）治疗　由于疾病、治疗和宿主相关因素的累积效应，感染因素仍是多发性 MM 患者发病和死亡的主要原因，疾病相关的浆细胞异常、抗肿瘤治疗的影响、发病年龄大和疾病相关并发症（如肾衰竭）等因素，都会导致 MM 患者的感染易感性增加，因此在 MM 治疗过程中预防感染至关重要，最佳预防策略包括抗菌药物预防、感染控制措施以及 IVIG 输注[40]。NCCN 指南提到 MM 患者感染风险与以下治疗增加有关：自体造血干细胞移植、双特异性抗体、CAR-T 治疗、细胞毒类化疗药、蛋白酶体抑制剂、CD38 单抗、糖皮质激素等，另外 HG 是 MM 化疗的一种靶外肿瘤毒性，是感染风险增加的重要驱动因素[37]。MajesTEC-1 研究中 75% 的接受双特异性抗体治疗的患者出现了 HG[41]。早期一项研究对 3000 名 MM 患者进行回顾性分析，结果显示 60 d 内有 10% 的患者死亡，其中 45% 死于感染[42]。一项研究显示接受 IVIG 预防治疗的 MM 患者严重感染的例数少于对照组，在接受 BCMA 双特异性抗体治疗的 MM 患者中，预防性使用 IVIG 可将严重感染的风险降低 90%[43]。因此，每月输注 IVIG 0.4 ～ 0.6 g • kg^{-1}，持续 6 ～ 12 个月可使 MM 患者获益，需根据患者情况调整剂量和时间，充分预防感染。输注 IVIG 还要注意两点：① 沙利度胺、来那度胺和泊马度胺等免疫调节剂治疗会增加血栓形成风险[44]，输注 IVIG 会进一步增加血栓风险；② 部分 MM 患者会出现肾功能不全，输注 IVIG 可能会进一步增加肾损伤的风险，目前大多数 IVIG 产品去除蔗糖（以前用作稳定剂），可以降低 IVIG 肾损伤风险。

共识 11：对于血清 IgG ≤ 4 g • L^{-1} 且严重或反复感染的 MM 患者，建议每月至少一次 IVIG 输注，每次 IVIG 0.4 g • kg^{-1}；对于 CAR-T 治疗后的 MM 患者，建议每月至少一次 IVIG 输注，每次 IVIG 0.4 g • kg^{-1}，直至 CAR-T 治疗结束后 1 年（Ⅱ级推荐）。

2.2.4　非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin’s lymphomas，NHL）治疗　NHL 是最常见的淋巴系统恶性肿瘤，可以分为 B 细胞型和 T 细胞型，B 细胞型 NHL 占 60% ～ 70%，化疗能有效治疗 NHL，但化疗不仅会导致骨髓抑制，还具有免疫抑制作用，CD20 单抗是 B 细胞淋巴瘤治疗的重大突破，使得淋巴瘤进入免疫治疗时代，显著提高了淋巴瘤患者的疗效，但 CD20 单抗联合化疗导致患者的免疫功能进一步降低，容易引发多种感染，如带状疱疹、肺部感染等，极不利于疾病的治愈，CD20 单抗同时杀灭异常和正常的 B 淋巴细胞，使得外周血 B 淋巴细胞数量下降、抗体产生减少，最终导致体液免疫缺陷，增加 NHL 患者发生感染的风险[45]。使用靶向药物（如布鲁顿氏酪氨酸激酶抑制剂）、免疫调节剂（如来那度胺）、免疫检查点抑制剂等药物也会增加感染发生率[46]。英国血液学标准委员会指南认为 NHL 患者治疗期间定期输注 IVIG 可减少感染发生[47]，NCCN 指南建议接受 CD20 单抗和 CAR-T 治疗的 NHL 患者需要定期输注 IVIG[48]。

共识 12：NHL 患者治疗期间需要定期输注 IVIG 以增强免疫力、预防感染，尤其 IgG ≤ 4 g • L^{-1} 或复发性感染、严重感染的 NHL 患者，每 3 ～ 4 周输注一次 IVIG，每次 0.4 g • kg^{-1}（Ⅱ级推荐）。

2.2.5　造血干细胞移植（hematopoietic stem cell transplantation，HSCT）中的应用　HSCT 尤其

是 allo-HSCT，目前仍是许多良、恶性血液系统疾病的唯一治愈手段[49-52]，同时移植后的感染、GVHD、血栓性微血管病、肝窦隙阻塞综合征（sinusoidal obstruction syndrome，SOS）等并发症与移植相关死亡率密切相关，这些并发症影响着移植工作的开展[53-54]。人免疫球蛋白具有协同抗感染、调节免疫等功能，常被用于移植后控制感染及 GVHD 等并发症，HSCT 后应用 IVIG 可有效预防如巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）感染、GVHD、细菌感染等，美国 FDA 批准将 IVIG 作为年龄≥ 20 岁的 HSCT 患者的预防用药，以降低肺炎等感染并发症的发生率[55]。

① 移植后 CMV 感染中应用：CMV 感染是导致异基因造血干细胞移植患者感染和预后不良的主要原因之一，CMV 可导致 CMV 感染、急慢性 GVHD、机会感染、骨髓抑制等多种严重不良事件，影响 HSCT 患者的预后。CMV 感染的发生率为 10% ～ 40%，CMV 肺炎是最主要的类型，病死率高达 70%，由于预防和抢先治疗的广泛应用，CMV 感染发生率已降至 10% 以下，病死率 20% ～ 60%[56]。移植后 100 d 内 CMV 再激活伴随着移植相关死亡率的增加，抢先应用抗病毒药物以及使用 CMV 阴性或去白细胞的血液制品大大降低了移植后 CMV 感染的发生率[57]。早期研究显示预防性应用 IVIG 使 CMV 感染率、非 CMV 感染间质性肺炎死亡率有所降低[58]。然而，一项单臂研究显示 CMV 再激活高危患者，包括患者血清 IgG ＜ 4 g • L^{-1}、NK 细胞＜ 100 • μL^{-1} 及有急慢性 GVHD，移植患者从移植后＋ 30 d 开始给予 IVIG，每月两次，每次 IVIG 0.5 g • kg^{-1}，持续一年，与历史对照进行比较，CMV 感染率、GVHD 的累计发生率没有明显差异[59]。另一项研究评估了从移植前－ 7 d 至＋ 98 d 每周预防性使用 IVIG 5 g，结果显示 IVIG 治疗受试者和对照组在移植后＋ 100 d 时 CMV 感染的累计发生率相似，这些数据表明对于可接受抗病毒药物治疗的移植患者，IVIG 对于 CMV 再激活显示不出明显优势。然而，CMV 再激活的高危人群是否能从这些干预措施中受益无研究证实[60]。

共识 13：推荐在 allo-HSCT 中具有 CMV 高危激活因素的患者中可预防性使用 IVIG，每周输注 1～2 次 IVIG，5～10 g/ 次，至移植后＋ 100 d（Ⅱ级推荐）。

② 移植后细菌感染中应用：HSCT 患者进行了清髓性化疗，经过超强度的预处理放化疗后，患者机体处于骨髓空巢期，免疫功能重建过程较长，中性粒细胞重度缺乏时间亦较长，加上长时间使用激素等免疫抑制剂，细菌、真菌、病毒等各种感染发生率较高。对于移植过程中是否需要输注 IVIG 来预防细菌感染，美国血液与骨髓移植学会相关指南一致建议不要常规预防性使用 IVIG 针对移植后面临的细菌感染[61]。然而当患者合并有严重 HG（血清 IgG ＜ 4 g • L^{-1}）时，建议在移植前预处理化疗开始到移植后 100 d 内接受预防性 IVIG 输注，维持血清 IgG ＞ 4 g • L^{-1}。缺乏足够的临床随机对照研究支持此建议，唯一客观数据基于 IVIG 药代动力学研究显示，移植患者的半衰期约为 6 d，正常受试者的半衰期为 22 d，这种差异的原因可能是 GVHD 导致蛋白质分解代谢增加及蛋白质转换合成能力的降低[62]。

共识 14：推荐对于血清 IgG ＜ 4 g • L^{-1} 的患者移植前－ 7 d 至移植后＋ 90 d 每周给予 IVIG 0.5 g • kg^{-1}，移植后第 90 日至移植后 1 年每月给予 IVIG 0.5 g • kg^{-1}，以预防严重细菌感染，每 2 周监测一次血清 IgG 浓度，根据血清 IgG 水平及感染情况进行个体化治疗（Ⅱ级推荐）。

2.2.6 HG HG 是一种免疫系统疾病，定义是血清 IgG ＜ 7 g • L^{-1}，因血液中没有产生足够的丙种球蛋白，导致抗体计数降低，增加感染风险，HG 可以是原发性或继发性起源的，HG 可能由多种基础原发性 / 先天性固有免疫系统缺陷或继发性免疫缺陷状态（如血液系统恶性肿瘤、蛋白丢失性疾病等）引起，原发性体液免疫缺陷最常见为 X- 连锁无丙种球蛋白血症和常见可变性免疫缺陷。HG 最常见的临床特征是反复细菌性感染、吸收不良综合征、脂肪泻、蛋白质丢失性肠病等，易并发多种自身免疫性疾病如 AIHA、ITP、皮肌炎等，并发恶性肿瘤的概率也较高[63-64]。

共识 15：HG 患者采用 IVIG 替代治疗，预防感染，每次 0.4 g • kg^{-1}，推荐每 3 周一次，持续 4 ～ 6 个月（Ⅱ级推荐）。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

共识制订专家委员会

组长：

郭智（华中科技大学协和深圳医院）

委员（以姓氏拼音排序）：

曹宇（北京大学深圳研究生院）

陈鹏（解放军总医院第五医学中心血液病医学部）

陈林（江苏省昆山市疾病预防控制中心）

戴纬（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

邓丽娟（北京大学肿瘤医院淋巴瘤科）

邓启文（华中科技大学协和深圳医院感染科）

杜振兰（解放军总医院第七医学中心儿科医学部）

郭智（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

黄振倩（广州医科大学附属第一医院血液内科）

姜义荣（东莞市人民医院血液内科）

黎永谦（汕头市中心医院血液内科）

李淑娈（中国医学科学院肿瘤医院深圳医院临床营养科）

李志铭（中山大学附属肿瘤医院肿瘤内科）

梁婧（山东第一医科大学第一附属医院肿瘤内科）

黎国伟（惠州市中心人民医院血液内科）

刘黎琼（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

刘岩松（华中科技大学协和深圳医院重症医学科）

孟景晔（深圳市第三人民医院血液内科）

皮国良（湖北省肿瘤医院放疗中心）

瞿嵘（惠州市中心人民医院重症医学科）

任骅（深圳新风和睦家医院肿瘤中心）

邵亮（武汉大学中南医院血液内科）

史渊源（深圳北京中医药大学研究院）

苏永忠（汕头大学医学院第一附属医院血液内科）

孙志强（南方医科大学深圳医院血液内科）

谭晓华（深圳市第三人民医院血液内科）

王淡瑜（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

王福祥（深圳市第三人民医院感染科）

王华（中山大学附属肿瘤医院血液肿瘤科）

王亮（首都医科大学附属北京同仁医院血液内科）

王强（武汉科技大学医学部）

王钧（香港大学深圳医院血液内科）

吴清明（武汉科技大学医学部）

吴为（广东省公共卫生研究院）

夏忠军（中山大学附属肿瘤医院血液肿瘤科）

向晓晨（武汉科技大学医学部）

谢利霞（华中科技大学协和深圳医院药学部）

许晓军（中山大学附属第七医院血液内科）

杨文燕（山东第一医科大学）

张国君（中国医科大学附属盛京医院血液内科）

张利玲（华中科技大学同济医学院附属协和医院淋巴瘤科）

张弋慧智（南方科技大学医学部）

张幸鼎（中山大学医学院）

张钰（南方医科大学南方医院血液内科）

周浩（华中科技大学同济医学院附属协和医院血液内科）

周辉（湖南省肿瘤医院血液肿瘤科）

周欢欢（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

周昱（广州医科大学附属肿瘤医院内科）

周昭贵（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

钟楠（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

执笔人：

郭智（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

钟楠（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

周欢欢（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

周昭贵（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

戴纬（华中科技大学协和深圳医院血液内科）

参考文献

[1] Eibl MM. History of immunoglobulin replacement [J]. Immunol Allergy Clin North Am，2008，28（4）：737-764.

[2] Pecoraro A，Crescenzi L，Granata F，et al. Immunoglobulin replacement therapy in primary and secondary antibody deficiency：the correct clinical approach [J]. Int Immunopharmacol，2017，52：136-142.

[3] Beecher G，Anderson D，Siddiqi ZA. Subcutaneous immunoglobulin in myasthenia gravis exacerbation：a prospective，open-label trial [J]. Neurology，2017，89（11）：1135-1141.

[4] Wat J，Barmettler S. Hypogammaglobulinemia after chimeric antigen receptor（CAR）T-cell therapy：characteristics，management，and future directions [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2022，10（2）：460-466.

[5] Kotton CN，Torre-Cisneros J，Aguado JM，et al. Cytomegalovirus in the transplant setting：where are we now and what happens next? A report from the International CMV Symposium 2021 [J]. Transpl Infect Dis，2022，24（6）：e13977.
[6] Atkins D，Briss PA，Eccles M，et al. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations Ⅱ：pilot study of a new system [J]. BMC Health Serv Res，2005，5（1）：25.
[7] Rizk JG，Kalantar-Zadeh K，Mehra MR，et al. Pharmaco-immunomodulatory therapy in COVID-19 [J]. Drugs，2020，80（13）：1267-1292.
[8] Guo Y，Tian X，Wang XF，et al. Adverse effects of immunoglobulin therapy [J]. Front Immunol，2018，9：1299.
[9] Imbach P，Barandun S，d’Apuzzo V，et al. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood [J]. Lancet，1981，1（8232）：1228-1231.
[10] 卫生部合理用药专家委员会 . 中国临床医师 / 药师合理用药指南第 2 版 [M]. 重庆：重庆出版社，2014：1071.
[11] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组 . 成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国指南（2020 年版）[J]. 中华血液学杂志，2020，41（8）：617-623.
[12] Provan D，Arnold DM，Bussel JB，et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia [J]. Blood Adv，2019，3（22）：3780-3817.
[13] Cooper N，Ghanima W. Immune thrombocytopenia [J]. N Engl J Med，2019，381（10）：945-955.
[14] Rodeghiero F，Stasi R，Gernsheimer T，et al. Standardization of terminology，definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children：report from an international working group [J]. Blood，2009，113（11）：2386-2393.
[15] Qin YH，Zhou TB，Su LN，et al. The efficacy of different dose intravenous immunoglobulin in treating acute idiopathic thrombocytopenic purpura：a meta-analysis of 13 randomized controlled trials [J]. Blood Coagul Fibrinolysis，2010，21（8）：713-721.
[16] Neunert CE，Cooper N. Evidence-based management of immune thrombocytopenia：ASH guideline update [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program，2018，2018（1）：568-575.
[17] 中国医师协会血液科医师分会，中华医学会儿科学分会血液学组，噬血细胞综合征中国专家联盟 . 中国噬血细胞综合征诊断与治疗指南（2022 年版）[J]. 中华医学杂志，2022，102（20）：1492-1499.
[18] Hines MR，von Bahr Greenwood T，Beutel G，et al. Consensus-based guidelines for the recognition，diagnosis，and management of hemophagocytic lymphohistiocytosis in critically ill children and adults [J] Crit Care Med，2022，50（5）：860-872.
[19] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组 . 血栓性血小板减少性紫癜诊断与治疗中国指南（2022 年版）[J]. 中华血液学杂志，2022，43（1）：7-12.
[20] Zheng XL，Vesely SK，Cataland SR，et al. ISTH guidelines for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. J Thromb Haemost，2020，18（10）：2486-2495.
[21] Pai M. Acquired hemophilia A [J]. Hematol Oncol Clin North Am，2021，35（6）：1131-1142.
[22] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组，中国血友病协作组 . 获得性血友病 A 诊断与治疗中国指南（2021 年版）[J]. 中华血液学杂志，2021，42（10）：793-799.
[23] 中华医学会血液学分会红细胞疾病（贫血）学组 . 中国成人自身免疫性溶血性贫血诊疗指南（2023 年版）[J]. 中华血液学杂志，2023，44（1）：12-18.
[24] Barcellini W，Fattizzo B. How I treat warm autoimmune hemolytic anemia [J]. Blood，2021，137（10）：1283-1294.
[25] 中国抗癌协会肿瘤与微生态专业委员会 . 肠道微生态与造血干细胞移植相关性中国专家共识 [J]. 国际肿瘤学杂志，2021，48（3）：129-135.
[26] Guo Z，Gao HY，Zhang TY，et al. Analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with high-dose cyclophosphamide-induced immune tolerance for severe aplastic anemia [J]. Int J Hematol，2016，104（6）：720-728.
[27] Bili ń ski J，Jasi ń ski M，Basak GW. The role of fecal microbiota transplantation in the treatment of acute graft-versus-host disease [J]. Biomedicines，2022，10（4）：837.
[28] Sullivan KM，Kopecky KJ，Jocom J，et al. Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation [J]. N Engl J Med，1990，323（11）：705.
[29] Cordonnier C，Chevret S，Legrand M，et al. Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized，double-blind，dose effect，placebo-controlled，multicenter trial [J]. Ann Intern Med，2003，139（1）：8-18.
[30] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组，中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会造血干细胞移植与细胞治疗学组 . 嵌合抗原受体 T 细胞治疗成人急性 B 淋巴细胞白血病中国专家共识（2022 年版）[J]. 中华血液学杂志，2022，43（2）：89-95.
[31] 应志涛，林宁晶，吴梦，等 . 北京大学肿瘤医院嵌合抗原受体 T 细胞治疗淋巴瘤全流程管理原则 [J]. 白血病・淋巴瘤，2021，30（11）：674-684.
[32] 中国医师协会血液科医师分会，中华医学会血液学分会 . 嵌合抗原受体 T 细胞治疗多发性骨髓瘤中国血液临床专家共识（2022 年版）[J]. 中华血液学杂志，2022，43（4）：265-271.
[33] Dai HR，Wu ZQ，Jia HJ，et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia [J]. J Hematol Oncol，2020，13（1）：30.
[34] Li P，Liu Y，Liang Y，et al. 2022 Chinese expert consensus and guidelines on clinical management of toxicity in anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma [J]. Cancer Biol Med，2023，20（2）：129-146.
[35] Kambhampati S，Sheng Y，Huang CY，et al. Infectious complications in patients with relapsed refractory multiple myeloma after BCMA CAR T-cell therapy [J]. Blood Adv，2022，6：2045-2054.

[36] Vora SB，Waghmare A，Englund JA，et al. Infectious complications following CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for children，adolescents，and young adults [J]. Open Forum Infect Dis，2020，7（5）：ofaa121.
[37] Mohan M，Chakraborty R，Bal S，et al. Recommendations on prevention of infections during chimeric antigen receptor T-cell and bispecific antibody therapy in multiple myeloma [J]. Br J Haematol，2023，203（5）：736-746.
[38] 郭智，刘玄勇，陈丽娜，等 . 伏立康唑注射液治疗血液肿瘤化疗后合并侵袭性肺部真菌感染的临床疗效 [J]. 现代肿瘤医学，2020，28（21）：3786-3789.
[39] Wang J，Liang J，He MX，et al. Chinese expert consensus on intestinal microecology and management of digestive tract complications related to tumor treatment（version 2022）[J]. J Cancer Res Ther，2022，18（7）：1835-1844.
[40] Raje NS，Anaissie E，Kumar SK. Consensus guidelines and recommendations for infection prevention in multiple myeloma：a report from the International Myeloma Working Group [J]. Lancet Haematol，2022，9（2）：e143-e161.
[41] Moreau P，Garfall AL，van de Donk NWCJ，et al. Teclistamab in relapsed or refractory multiple myeloma [J]. N Engl J Med，2022，387（6）：495-505.
[42] Augustson BM，Begum G，Dunn JA，et al. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma：analysis of patients entered onto the United kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002——Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party [J]. J Clin Oncol，2005，23（36）：9219-9226.
[43] Lancman G，Parsa K，Kotlarz K，et al. IVIG use associated with ten-fold reduction of serious infections in multiple myeloma patients treated with anti-BCMA bispecific antibodies [J]. Blood Cancer Discov，2023，28：OF1-OF12.
[44] Li A，Wu Q，Warnick G，et al. The incidence of thromboembolism for lenalidomide versus thalidomide in older patients with newly diagnosed multiple myeloma [J]. Ann Hematol，2020，99（1）：121-126.
[45] Reboursiere E，Fouques H，Maigne G，et al. Rituximab salvage therapy in adults with immune thrombocytopenia：retrospective study on efficacy and safety profiles [J]. Int J Hematol，2016，104（1）：85-91.
[46] Wei LY，Xie J，Wang YQ，et al. The efficacy of PD-1 inhibitors in the maintenance treatment of diffuse large B-cell lymphoma：a single-center retrospective analysis [J]. J Cancer Res Ther，2022，18（2）：525-531.
[47] Scier D，Dearden C，Eren E，et al. Guidelines on the diagnosis，investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia [J]. Br J Haematol，2012，159（5）：541-564.
[48] Saad A，de Lima M，Anand S，et al. Hematopoietic cell transplantation，version 2.2020，NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw，2020，18（5）：599-634.
[49] 贤晓敏，蓝晓凤，刘玄勇，等 . R-CHOP 方案序贯自体造血干细胞移植在中高危弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的应用：单中心回顾性分析 [J]. 中南药学，2022，20（7）：1503-1509.
[50] 郭智，陈惠仁 . 单倍体造血干细胞移植后高剂量环磷酰胺诱导免疫耐受治疗再生障碍性贫血的研究 [J]. 中华器官移植杂志，2015，36（12）：753-755.
[51] 王昱，黄晓军 . 造血干细胞移植在血液疾病中的应用进展 [J]. 中华血液学杂志，2019，40（8）：704-708.
[52] Tarlock K，Sulis ML，Chewning JH，et al. Hematopoietic cell transplantation in the treatment of pediatric acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes：guidelines from the american society of transplantation and cellular therapy [J]. Transplant Cell Ther，2022，28（9）：530-545.
[53] Lehrnbecher T，Fisher BT，Phillips B，et al. Clinical practice guideline for systemic antifungal prophylaxis in pediatric patients with cancer and hematopoietic stem-cell transplantation recipients [J]. J Clin Oncol，2020，38（27）：3205-3216.
[54] Maertens JA，Girmenia C，Brüggemann RJ，et al. European guidelines for primary antifungal prophylaxis in adult haematology patients：summary of the updated recommendations from the European Conference on Infections in Leukaemia [J]. J Antimicrob Chemother，2018，73（12）：3221-3230.
[55] Perez EE，Orange JS，Bonilla F，et al. Update on the use of immunoglobulin in human disease：a review of evidence [J]. J Allergy Clinl Immunol，2017，139（3S）：S1-S46.
[56] 中华医学会血液学分会干细胞应用学组 . 异基因造血干细胞移植患者巨细胞病毒感染管理中国专家共识（2022 年版）[J]. 中华血液学杂志，2022，43（8）：617-623.
[57] Teira P，Battiwalla M，Ramanathan M，et al. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era：a CIBMTR analysis [J]. Blood，2016，127（20）：2427-2438.
[58] Bass EB，Powe NR，Goodman SN，et al. Efficacy of immune globulin in preventing complications of bone marrow transplantation：a meta-analysis [J]. Bone Marrow Transplantation，1993，12（3）：273-282.
[59] Schmidt-Hieber M，Schwarck S，Stroux A，et al. Prophylactic i. v. Igs in patients with a high risk for CMV after allo-SCT [J]. Bone Marrow Transplant，2009，44（3）：185.
[60] Ichihara H，Nakamae H，Hirose A，et al. Immunoglobulin prophylaxis against cytomegalovirus infection in patients at high risk of infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Transplant Proc，2011，43（10）：3927-3932.
[61] Tomblyn M，Chiller T，Einsele H，et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients：a global perspective [J]. Biol Blood Marrow Transplant，2009，15（10）：1143-238.
[62] Derienzo SY，Chiang KY，O’Neal WM，et al. Evaluation of the half-life of intravenous human cytomegalovirus immune globulin in patients receiving partially mismatched related donor bone marrow transplantation [J]. Pharmacotherapy，2012，20（10）：1175-1178.
[63] Cardenas-Morales M，Hernandez-Trujillo VP. Agammaglobulinemia：from X-linked to autosomal forms of disease [J]. Clin Rev Allergy Immunol，2022，63（1）：22-35.
[64] Viallard JF. Management of hypogammaglobulinemia [J]. Rev Med Interne，2023，44（3）：133-138.

（收稿日期：2023-11-13；修回日期：2023-12-21）

临床营养药学研究及进展专题

【编者按】

营养支持治疗作为当代医疗实践中至关重要的一环已经得到公认，临床营养药师在营养支持治疗中的重要作用也不断得到认识和重视。营养药师参与营养筛查、评估、治疗、监护，为改善患者营养状态、保证患者治疗的顺利完成奠定了基础。如何利用现有条件规范营养支持治疗是摆在广大营养药师面前的难题。利用药物监护系统规范营养治疗，借助中国医院药物警戒系统开展营养补充剂不良反应监测，通过人体测量参数来进行营养风险筛查，探索营养不良的危险因素及其与其他疾病进展的联系，防治营养补充剂不良反应，并致力于精准营养，是临床营养药师工作中的重要任务。本专题拟基于循证医学证据和临床数据，开展专题研究探索营养不良与临床治疗不良结局的相关性，并客观评价真实世界中营养治疗的弊端及临床意义。

【主持人简介】

邓晟，中南大学湘雅医院主任药师，硕士研究生导师。主要从事临床药学、临床药理学和遗传学研究；深入研究药物转运体的遗传药理学特征，从分子水平阐明转运体基因多态性在药物安全性和有效性中的作用机制，筛选对转运体具有抑制或诱导效应的药物，使药物的靶向转运安全可控，解决部分药物临床应用的安全性问题并促进新药开发。先后在“*Clin Ther*”“*Neuroscience Letters*”“*Acta Pharmacol Sin*”“*Microvasc Res*”等杂志发表论文 70 余篇，其中 SCI 收录 40 余篇。主持国家自然科学基金面上项目 2 项，湖南省自然科学基金 3 项。获教育部科技成果奖 1 项、湖南省科技进步二等奖 1 项、湖南省医学科技一等奖和二等奖各 1 项。担任中国药理学会药物基因组学专业委员会常委、中华医学会细菌感染与耐药防治分会青年委员、中国药学会罕见病药物专业委员会委员、中国老年医学学会感染管理质量控制分会委员、湖南省药学会理事、湖南省药理学会理事等职务。

希特林蛋白缺乏症的营养及药物治疗

邓嘉玉[1]，邱新云[2]，曲晓宇[1]，雷天资[1]，宋燕青[1, 2]，王相峰[1*]（1. 吉林大学第一医院乐群院区药学部，长春 130031；2. 吉林大学药学院，长春 130021）

摘要：希特林蛋白缺乏症是由位于 7q21.3 染色体 *SLC25A13* 基因中的双等位基因致病变异引起的常染色体隐性遗传病，分为新生儿肝内胆汁淤积症（NICCD），希特林蛋白缺乏导致的发育不良和血脂异常（FTTDCD）及成人发病的Ⅱ型瓜氨酸血症（CTLN2）。饮食治疗是 NICCD 和 FTTDCD 的关键干预措施，过多、过量的碳水化合物摄入会加剧本病，而补充中链脂肪酸可以为肝细胞提供能量，促进脂肪生成。希特林蛋白缺乏症的根本治疗方案为肝移植，但由于供体稀缺和价格昂贵，营养干预和药物治疗仍然是临床治疗的主要手段。本文对希特林蛋白缺乏症的代谢途径、发病机制和临床表现进行简要概述，收集药物治疗和营养治疗方法并进行简要综述。

关键词：希特林蛋白缺乏症；瓜氨酸血症；营养治疗；药物治疗

中图分类号：R725.9 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0562-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.002

基金项目：2022 年吉林大学医院管理研究项目。

作者简介：邓嘉玉，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学研究，email：dengjiayu@jlu.edu.cn * **通信作者：**王相峰，男，主管药师，主要从事临床药学研究，email：wangxiangfeng@jlu.edu.cn

Nutritional and pharmacological treatment of Citrin protein deficiency

DENG Jia-yu[1], QIU Xin-yun[2], QU Xiao-yu[1], LEI Tian-zi[1], SONG Yan-qing[1, 2], WANG Xiang-feng[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Lequn Branch*, *the First Hospital of Jilin University*, *Changchun* 130031; 2. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Jilin University*, *Changchun* 130021)

Abstract: Citrin deficiency is an autosomal recessive genetic disorder caused by pathogenic variations in the biallelic genes of the *SLC25A13* gene located on chromosome 7q21.3, which included neonatal intrahepatic cholestasis caused by Citrin deficiency (NICCD), failure to thrive and dyslipidemia caused by Citrin deficiency (FTTDCD), and adult-onset type Ⅱ citrullinemia (CTLN2). Dietary intervention is a key measure for NICCD and FTTDCD. Excessive carbohydrate intake can exacerbate the condition. Supplementation of medium-chain fatty acids can provide energy to the liver cells and promote lipid synthesis. Liver transplantation is the fundamental treatment for Citrin deficiency syndrome, but due to donor scarcity and high cost, nutritional intervention and drug therapy remain the main clinical approaches. This paper briefly reviewed the metabolic pathways, pathogenic mechanism, clinical manifestations of Citrin deficiency, and drug and nutritional treatment methods.

Key words: Citrin protein deficiency; citrullinemia; nutrition therapy; drug therapy

希特林蛋白缺乏症（Citrin protein deficiency）也称Ⅱ型瓜氨酸血症，是由位于 7q21.3 染色体 *SLC25A13* 基因中的双等位基因致病变异引起的常染色体隐性遗传病。该基因编码线粒体内膜中的天冬氨酸 / 谷氨酸载体蛋白（Citrin 蛋白），该亚型主要在肝脏中表达[1]。

在 19 世纪 50 年代，希特林蛋白缺乏症首次被称为成人Ⅱ型瓜氨酸血症（CTLN2），但直到 90 年代后期，日本研究小组才确定了该病是由希特林蛋白相应基因突变导致的。该疾病最初在日本发现，被认为仅发生于亚洲人群，但现在它已经成为一种泛种族疾病，在世界范围内广泛地出现。在我国，该疾病有着较高的携带率（携带率约为 1/79，纯合子频率约为 1/25 000）并具有明显的南北方差异（携带者频率：南方 1/48，北方 1/940；*SLC25A13* 突变纯合子频率：南方 1/9200，北方 1/3 500 000）[2]，但在全国范围内对该疾病的病例报道很少，对该病的临床治疗建议较为有限。

希特林蛋白缺乏症的根本治疗方案为肝移植，但该方案由于其供体稀缺和价格昂贵等因素而受到一定的限制，因此饮食干预和药物治疗仍然是临床治疗的主要手段。本文对希特林蛋白缺乏症除肝移植手术治疗方案外的目前已使用和已经进行临床试验的治疗方式进行收集和整理，希望为临床实践提供治疗思路。

1　代谢途径和临床表型

目前希特林蛋白缺乏症的发病机制尚不完全清楚，推测是由遗传引起的，研究表明近亲结婚会使发病率大大提高[3]。希特林蛋白缺乏会影响细胞内许多相互关联的代谢途径（见图 1）：其一，希特林蛋白是一种钙结合天冬氨酸 / 谷氨酸载体，作用是将天冬氨酸（Asp）从线粒体转运到胞质中，在胞质中精氨琥珀酸合成酶（ASS）的作用下，Asp 参与尿素循环，合成尿素，而希特林蛋白缺乏会导致线粒体向胞质中的 ASS 提供的 Asp 不足（ASS 是尿素循环中的关键酶），尿素合成周期受损，易引起高氨血症；其二，作为苹果酸 - 天冬氨酸穿梭体系的一员，希特林蛋白参与糖代谢途径，希特林蛋白缺乏会影响胞质中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）运至线粒体过程，抑制糖酵解途径，减少三磷酸腺苷（ATP）的生成，导致能量产生不足[4-6]；其三，线粒体与胞质之间 NADH 比例不平衡，影响糖异生[4-6]。

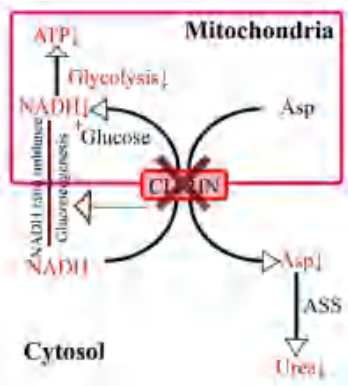


图 1　希特林蛋白缺乏影响代谢的机制

Fig 1　Mechanism of Citrin protein deficiency affecting the metabolism

希特林蛋白缺乏也会影响肝细胞内能量供应。肝细胞的主要能量来源是脂肪酸，人体进食后，肝细胞在高糖状态下摄取葡萄糖，将大部分葡萄糖合成糖原或参与从头合成脂质过程[7-10]。希特林蛋白缺乏将影响葡萄糖代谢，导致糖原合成受损，脂肪酸减少，最终能量供应不足。另外有研究发现，大多数患者肝细胞脂质代谢的主要调节因子过氧化物酶体增殖物激活受体（PPARα）表达显著下调，此受体与患者的脂肪酸β氧化具有相关性[6]。希特林蛋白缺乏会抑制碳水化合物和脂质的利用，肝细胞减少使用葡萄糖和脂肪酸作为能量来源，影响肝细胞持续的能量获取，导致能量不足，同时 PPARα 受体使脂肪代谢受限，造成恶性循环。

希特林蛋白缺乏症可依据年龄分型，在新生儿或婴儿中表现为新生儿肝内胆汁淤积症（NICCD），一岁以下的儿童普遍表现为低出生体重、生长受限、肝内胆汁淤积、脂肪肝和溶血性贫血等。在年龄较大的儿童中表现为发育迟缓和血脂异常（FTTDCD），其他可能出现的症状包括低血糖、胰腺炎、严重疲劳和厌食等。在成人中表现为反复 CTLN2 同时伴有神经精神症状，如谵妄、定向障碍、嗜睡、记忆丧失、扑动性震颤、抽搐和昏迷等[11]。大部分患者的症状会在一岁左右消退[6，11]，少数具有 NICCD 或 FTTDCD 既往史的患者在经历漫长的“沉默期”后，可能再次出现 CTLN2 症状，这种情况一般是由多种因素所触发，通常与手术（禁食）、饮酒、过量的碳水化合物、药物和疲劳有关[6，11]。

2 希特林蛋白缺乏症的治疗

2.1 营养治疗

营养治疗是希特林蛋白缺乏症最重要和最有效的管理方法，是 FTTDCD 和 CTLN2 时期控制症状的关键措施，尽早的营养干预也能够预防 CTLN2 的再次发生。

2.1.1 希特林蛋白缺乏症饮食特点　有研究表明，从婴儿期到成年期希特林蛋白缺乏症患者具有明显的饮食特点，最早在 2 ～ 6 岁时就已经形成，表现为偏爱高蛋白、高脂肪食物，例如肉类、蛋类、鱼类和坚果，厌恶碳水化合物，例如蔬菜、海藻、水果、糖果、饮料和谷物[4，12]。研究发现，该饮食特点符合患者的身体所需，对该疾病能够有效管理。有大量病例显示，高糖高热量的饮食可诱导 CTLN2 的发生，相反，高蛋白高脂质低碳水的饮食干预，能够降低脑病发作频率和复发风险[13]。目前，饮食疗法已成为希特林蛋白缺乏症的主要治疗疗法。

2.1.2 营养疗法管理　希特林蛋白缺乏症儿童照料者的饮食管理能力普遍较差，特别是在以碳水化合物为主的东亚地区，需要进行合理的饮食指导及沟通，同时需要控制各种营养物质的比例，保证摄入的总能量能够维持机体所需，避免造成体重过轻，生长不良、发育延迟等[14]。Okano 等[12，15]的研究表明：希特林蛋白缺乏症患者较同一饮食文化下的其他家庭成员摄入的总能量较高（约高 15%），并且建议蛋白质∶脂肪∶碳水化合物（PFC）能量比的置信区间应为 20% ～ 22%∶46% ～ 53%∶25% ～ 33%。建议患者每日摄入碳水化合物 100 ～ 200 g，以满足最低能量要求。迄今为止，未有关于健康成年人摄入过多蛋白质或脂肪对健康产生不良影响的报道，并且该饮食目标对蛋白质和脂肪的能量摄入没有上限要求。Bölsterli 等[16]研究发现 6 名希特林蛋白缺乏症患者在接受了限制碳水化合物 / 富含脂肪的饮食后，实验室生化指标数值回归正常。希特林蛋白缺乏症患者也可尝试生酮饮食（等卡路里、低碳水化合物、高脂肪饮食），使代谢转变，减少葡萄糖利用（糖酵解），增加β氧化以及酮体产生，这对于改善线粒体的功能、肝脏能量的比例分配具有积极作用[6，16]。

2.1.3 营养疗法补充剂　随着对希特林蛋白缺乏症的不断研究和临床治疗的不断摸索，在饮食治疗的基础上，可配合中链三酰甘油（MCT）、丙酮酸、L- 精氨酸等补充剂[11，17-18]。

目前广泛的观点认为，使用中链 MCT 对希特林蛋白缺乏症有明显效果。MCT 快速水解，主要以中链脂肪酸（MCFA）的形式被吸收，经门静脉到达肝脏，经β氧化代谢为乙酰辅酶 A，增强三羧酸循环活性，增加肝细胞中 ATP 的水平，促进脂肪生成。建议在 NICCD 和 CTLN2 时期分别使用限制乳糖配方补充 MCT，或在低碳水化合物饮食下补充 MCT。在 CTLN2 发病不久后使用 MCT，可预防再次发作[11，17-18]。大多数 NICCD 患儿在使用不含乳糖且富含 MCT 并补充脂溶性维生素的治疗方案后，症状可在 12 个月时消失，部分患者停用母乳和普通配方奶，食用肉类和鸡蛋等固体补充剂后，也可自行改善。

此外，也有使用丙酮酸钠和精氨酸对患者进行治疗的。有病例报道，对患者使用低碳水化合物饮食配合 L- 精氨酸给药能够改善病情[19]。L- 精氨酸不仅能有效降低血氨，也能降低血浆三酰甘油，预防高氨血症。另一项病例报道中，一位 73 岁的老年女性患者使用丙酮酸钠和精氨酸后治疗成功，血氨水平恢复正常，能够使用助行器行

走，并在没有帮助的情况下自己吃饭[4]。丙酮酸和精氨酸在老年患者中有明显疗效，在年轻患者中也同样适用。一名 13 岁希特林蛋白缺乏症女孩经过长期的饮食改善，并使用补充剂，临床症状和实验室检查结果均趋于正常化[20]。这种方法为促进代谢，提高生活质量和延长寻找合适肝源的时间提供了暂时的治疗方案。

2.2　*药物治疗*

2.2.1　胆汁淤积药物治疗　希特林蛋白缺乏症无特殊药物治疗，使用的药物仅限于对症处理。在 NICCD 时期，患者表现为胆汁淤积、发育迟缓、低蛋白血症、低血糖和多种氨基酸血症。这一时期的治疗旨在阻止胆汁淤积的进展和缓解其他症状，患者的病情在 6 ～ 12 个月时大都是自限性的，但是仍不可放松，警惕因延迟医疗干预而出现死亡的情况。药物治疗主要使用维生素 K_2、脂溶性维生素和熊去氧胆酸。维生素 K_2 可以提高患者的凝血能力，参考给药方案如下：最低每周口服 2 mg，最高每日口服 5 mg，和 / 或静脉注射 1 ～ 2 mg。熊去氧胆酸可以参考给药剂量：5 ～ 15 mg/（kg・d）[6，19]。脂溶性维生素可以参考表 1 的给药剂量。

表 1　脂溶性维生素参考剂量给药

Tab 1　Fat soluble vitamins administered dosage

名称	剂量
维生素 A（视黄醇棕榈酸酯）	400 ～ 500 IU/（kg・d）
维生素 D（阿法骨化醇）	0.05 ～ 0.1 μg/（kg・d）
维生素 E（醋酸生育酚）	5 ～ 10 mg/（kg・d）(轻度病例)
	20 ～ 50 mg/（kg・d）(严重病例)

2.2.2　FTTDCD 治疗　在 FTTDCD 时期最常见的临床表现为低血糖、生长迟缓和血脂异常[21]。该时期为孩童的重要生长发育期，药物治疗十分有限，主要采用饮食疗法，并且补充丙酮酸钠和 MCT。但若发生持续低血糖且较难通过饮食纠正，应监测血糖浓度，持续输注低糖溶液（约 5% 葡萄糖浓度）或临时静脉输注高糖溶液（约 20% 葡萄糖浓度）。在 CTLN2 时期的临床表现与 FTTDCD 类似。据报道，每日两次服用 10 ～ 15 mL MCT 可缓解 CTLN2[22-23]。值得注意的是，这种给药方式将会增加老年患者患肝癌或肝细胞癌风险[24]。

2.2.3　中药治疗　我国传统中药治疗对 NICCD 也有良好效果。具体治疗方法为在一般治疗基础上，采用病证结合模式加用利胆合剂。根据中医对胆汁淤积具体分型，进行药方的裁减和添加，个体化给药见表 2。将药物加水 600 mL，水煎 2 次，过滤浓缩至 100 mL，灌装封口。该药方可采用常规口服给药、插鼻饲管或灌肠给药，共治疗 15 d，随访 1 年，观察后效[25]。

表 2　利胆合剂的裁减和添加

Tab 2　Reduction and addition of Lidan mixture

利胆合剂	分型	调整
茵陈 30 g、连翘 30 g、何首乌 10 g、熟大黄 5 g、赤芍 30 g、桂枝 5 g、枳壳 10 g、白术 10 g、五味子 10 g、穿山甲 3 g、甘草 5 g	湿热熏蒸型	去桂枝加栀子
	寒湿阻滞型	去熟大黄
		中度者加干姜
		重度者再加肉桂
	淤积发黄型	加赤芍、虎杖
		中度者加桃仁、红花
		重度者加黄芪、鳖甲
	气血两虚型	去熟大黄加当归、茯苓
		中度者加黄芪
		重度者加地龙

2.2.4　潜在药物治疗　Saheki 等[3]通过建立疾病动物模型 *SLC25A13* 和线粒体甘油 -3- 磷酸脱氢酶（Gpd2；mGPD）*citrin/mGPD* 双基因敲除小鼠，研究在小肠内氨基酸的转化及对肝脏功能的影响，发现 Asp 部分会在小肠转化为丙氨酸（Ala），运输至门静脉周围肝细胞转化回 Asp，此过程需鸟氨酸（Orn）参与。单独使用 Orn ＋ Asp、Orn ＋ Ala 或 Ala、Asp 或 Glu 都是 CTLN2 候选治疗补充剂。也有研究显示不含氯化钠（NaCl）的 Orn 和 Asp、L- 鸟氨酸、L- 天冬氨酸（LOLA）的组合在降低血氨方面非常有效，此方案目前正在检验其临床疗效[2，26]。

3　小结

目前，国内外关于希特林蛋白缺乏症首选的治疗方法仍然是肝移植，该方法可以有效纠正代谢紊乱，控制高氨血症。但供体稀缺和价格昂贵使希特林蛋白缺乏症患者并非都能接受肝移植治疗，而其他治疗主要针对希特林蛋白缺乏症所致的高氨血症、脑水肿、血脂异常等症状而采用对症治疗，所以探索新的治疗方法是非常必要的。近年来，基因疗法和酶疗法在治疗遗传代谢性疾病方面取得了较好的效果，在药物递送系统也有研究，例如利用脂质纳米粒封装优化 mRNA 治疗希特林蛋白缺乏症小鼠，该模型显示出很好的治疗前景[27]。同时学界在中药和天然药物中寻找治疗希特林蛋白缺乏症的有效方法，但仍需要大量的临床实践。

参考文献

[1]　Iijima M，Jalil A，Begum L，et al. Pathogenesis of adult-onset type Ⅱ citrullinemia caused by deficiency of

citrin，a mitochondrial solute carrier protein：tissue and subcellular localization of Citrin [J]. Adv Enzyme Regul，2001，41：325-342.

[2] Lu YB，Kobayashi K，Ushikai M，et al. Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the *SLC25A13* gene of Japanese patients with Citrin deficiency [J]. J Hum Genet，2005，50：338-346.

[3] Saheki T，Moriyama M，Funahashi A，et al. AGC2（Citrin）deficiency-from recognition of the disease till construction of therapeutic procedures [J]. Biomolecules，2020，10（8）：100.

[4] Yazaki M，Kinoshita M，Ogawa S，et al. A 73-year-old patient with adult-onset type Ⅱ citrullinemia successfully treated by sodium pyruvate and arginine [J]. Clin Neurol Neurosurg，2013，115（8）：1542-1545.

[5] 国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于印发罕见病诊疗指南（2019 年版）的通知 [EB/OL].（2019-02-27）[2022-07-28]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/201902/61d06b4916c348e0810ce1fceb844333.shtml.

[6] Okano Y，Ohura T，Sakamoto O，et al. Current treatment for citrin deficiency during NICCD and adaptation/compensation stages：strategy to prevent CTLN2 [J]. Mol Genet Metab，2019，127（3）：175-183.

[7] Arias IM，Alter HJ，Boyer JL，et al. The liver：biology and pathobiology，fifth edition [J]. J Clin Gastroenterol，2010，17（1）：1-382.

[8] Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans：metabolic and regulatory aspects [J]. Eur J Clin Nutr，1999，53：S53-S65.

[9] Komatsu M，Kimura T，Yazaki M，et al. Steatogenesis in adult-onset type Ⅱ citrullinemia is associated with down-regulation of PPARα [J]. Biochim Biophys Acta，2015，1852（3）：473-481.

[10] Hayasaka K，Numakura C，Watanabe H. Treatment and pathomechanism of citrin deficiency [J]. Brain Nerve，2015，67（6）：739-747.

[11] Hayasaka K，Numakura C. Adult-onset type Ⅱ citrullinemia：current insights and therapy [J]. Appl Clin Genet，2018，12（11）：163-170.

[12] Okamoto M，Okano Y，Okano M，et al. Food preferences of patients with Citrin deficiency [J]. Nutrients，2021，13（9）：3123.

[13] Yazaki M，Ikeda S，Kobayashi K，et al. Therapeutic approaches for patients with adult-onset type Ⅱ citrullinemia（CTLN2）：effectiveness of treatment with low-carbohydrate diet and sodium pyruvate [J]. Rinsho Shinkeigaku，2010，50（11）：844-847.

[14] Zhang SX，Du Y，Cai LL，et al. Obstacles to home-based dietary management for caregivers of children with Citrin deficiency：a qualitative study [J]. Orphanet J Rare Dis，2022，17（1）：256.

[15] Okano Y，Okamoto M，Yazaki M，et al. Analysis of daily energy，protein，fat，and carbohydrate intake in Citrin-deficient patients：towards prevention of adult-onset type Ⅱ citrullinemia [J]. Mol Genet Metab，2021，133（1）：63-70.

[16] Bölsterli BK，Boltshauser E，Palmieri L，et al. Ketogenic diet treatment of defects in the mitochondrial malate aspartate shuttle and pyruvate carrier [J]. Nutrients，2022，14（17）：3605.

[17] Hayasaka K. Metabolic basis and treatment of Citrin deficiency [J]. J Inherit Metab Dis，2021，44（1）：110-117.

[18] Hayasaka K，Numakura C，Toyota K，et al. Treatment with lactose（galactose）-restricted and medium-chain triglyceride-supplemented formula for neonatal intrahepatic cholestasis caused by Citrin deficiency [J]. JIMD Rep，2012，2：37-44.

[19] Unita S，Hirashima N，Shimada M，et al. Successful treatment of adult-onset type Ⅱ citrullinemia with a low-carbohydrate diet and L-arginine after DNA analysis produced a definitive diagnosis [J]. Clin J Gastroenterol，2020，13（5）：823-833.

[20] Mutoh K，Kurokawa K，Kobayashi K，et al. Treatment of a Citrin-deficient patient at the early stage of adult-onset type Ⅱ citrullinaemia with arginine and sodium pyruvate [J]. J Inherit Metab Dis，2008，31（S2）：S343-S347.

[21] Arai-Ichinoi N，Kikuchi A，Wada Y，et al. Hypoglycemic attacks and growth failure are the most common manifestations of Citrin deficiency after 1 year of age [J]. J Inherit Metab Dis，2021，44（4）：838-846.

[22] Hayasaka K，Numakura C，Toyota K，et al. Medium-chain triglyceride supplementation under a low-carbohydrate formula is a promising therapy for adult-onset type Ⅱ citrullinemia [J]. Mol Genet Metab Rep，2014，1：42-50.

[23] Hayasaka K，Numakura C，Yamakawa M，et al. Medium-chain triglycerides supplement therapy with a low-carbohydrate formula can supply energy and enhance ammonia detoxification in the hepatocytes of patients with adult-onset type Ⅱ citrullinemia [J]. J Inherit Metab Dis，2018，41（5）：777-784.

[24] Kido J，Häberle J，Sugawara K，et al. Clinical manifestation and long-term outcome of Citrin deficiency：report from a nationwide study in Japan [J]. J Inherit Metab Dis，2022，45（3）：431-444.

[25] 张领领，鄢素琪，周俪姗，等. Citrin 缺陷导致的新生儿肝内胆汁淤积症的临床特征及中医治疗 [A] // 全国中医药高等教育学会儿科教育研究会暨中国中医药研究促进会综合儿科分会 2017 年全国学术交流大会论文集 [C]. 2017.

[26] Saheki T，Moriyama M，Kuroda E，et al. Pivotal role of inter-organ aspartate metabolism for treatment of mitochondrial aspartate-glutamate carrier 2（Citrin）deficiency，based on the mouse model [J]. Sci Rep，2019，9（1）：4179.

[27] Cao J，An D，Galduroz M，et al. mRNA therapy improves metabolic and behavioral abnormalities in a murine model of Citrin deficiency [J]. Mol Ther，2019，27（7）：1242-1251.

（收稿日期：2023-10-12；修回日期：2023-11-23）

重症患者营养支持现状对临床结局的影响

李德品[1]，苏佳沌[2]，曹科[3]，徐吟秋[1]，梁培[1]，葛卫红[1]，卞晓洁[1*]（1.南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京　210008；2.中国药科大学南京鼓楼医院药学部，南京　210008；3.南京大学医学院附属鼓楼医院重症医学科，南京　210008）

摘要：目的　调查分析重症患者营养支持现状对其营养指标及临床结局的影响。**方法**　本研究为一项单中心回顾性队列研究，回顾性选取 2022 年 1 月至 6 月入住南京大学医学院附属鼓楼医院 ICU 病区且符合入组条件的患者为研究对象，探究重症患者营养支持状况对临床结局的影响。**结果**　共纳入 126 名重症患者（女性 35 例，男性 91 例），年龄为（63.93±18.78）岁。患者 SOFA 评分和 APACHE-Ⅱ评分分别为（6.62±4.11）分、（20.92±7.51）分。91 例（72.2%）为高营养风险患者（NUTRIC 评分≥6），35 例（27.8%）为低营养风险患者（NUTRIC 评分＜6），接受营养支持的患者有 111 例（88.1%）。在接受肠内营养的 86 例患者中，有 55 例（64.0%）患者早期肠内营养支持开始时机≤入室 48 h。在进行营养支持的 111 例患者中，23 例（20.7%）患者能量和蛋白质同时达标时间≤入室 72 h。高营养风险组患者的总住院时间更久（P ＜ 0.05），早期肠内营养组患者的 28 d 死亡率更低（P ＜ 0.01），蛋白质早期充足组患者入室 7 d 内人血白蛋白的变化值更大（P ＜ 0.05）。**结论**　所有 ICU 住院时间超过 48 h 的患者，均推荐入室 48 h 内开展早期肠内营养支持，早期肠内营养支持可以降低其 28 d 死亡率；早期蛋白质或者能量是否充足可能对 ICU 住院患者临床结局没有影响。

关键词：营养支持；重症监护；肠内营养；肠外营养
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0567-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.003

Effect of nutrition support status on the clinical outcome of critically ill patients

LI De-pin[1], SU Jia-dun[2], CAO Ke[3], XU Yin-qiu[1], LIANG Pei[1], GE Wei-hong[1], BIAN Xiao-jie[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *Affiliated Hospital of Medical School*, *Nanjing University*, *Nanjing* 210008; 2. *Department of Pharmacy*, *China Pharmaceutical University Nanjing Drum Tower Hospital*, *Nanjing* 210008; 3. *Department of Intensive Care Unit*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *Affiliated Hospital of Medical School*, *Nanjing University*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To determine the impact of state of nutritional support on nutritional indicators and clinical outcomes in critically ill patients. **Methods** A single-center retrospective cohort study was conducted. Patients admitted to the ICU of Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University from January to June 2022 who were eligible for enrollment were selected retrospectively. The impact of nutritional support status of critically ill patients on clinical outcome was determined. **Results** Totally 126 critically ill patients (35 females and 91 males) aged (63.93±18.78) years were included. The SOFA score and APACHE-Ⅱ score of patients were (6.62±4.11) and (20.92±7.51), respectively. Altogether 91 (72.2%) patients were at high nutritional risk (NUTRIC score ≥ 6) and 35 (27.8%) patients were at low nutritional risk (NUTRIC score ＜ 6). Totally 111 (88.1%) patients received nutritional support. Of the 86 patients who received enteral nutrition, 55 (64.0%) received early enteral nutrition support at ≤ 48 h of admission. Of the 111 patients who had nutritional support, 23 patients (20.7%) showed both energy and protein compliance

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 82002082）；南京大学中国医院改革发展研究院课题（No. NDYG2022051）。
作者简介：李德品，男，硕士，药师，主要从事临床药学工作，email：ccclavin@126.com　*通信作者：卞晓洁，女，硕士，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学工作，email：18061678828@189.cn

at ≤ 72 h of admission. The total length of hospital stay was longer in the high-nutritional-risk group ($P < 0.05$), and the 28-day mortality rate in the early enteral nutrition group was lower ($P < 0.01$); the change in the serum albumin within 7 days of admission was greater ($P < 0.05$) for patients in the early protein adequacy group. **Conclusion** Early enteral nutritional support within 48 h of admission is recommended for patients with ICU stay longer than 48 h. Early enteral nutritional support reduces the 28-day mortality; early protein or energy adequacy has little effect on clinical outcome of patients in the ICU.

Key words: nutritional support; intensive care; enteral nutrition; parenteral nutrition

重症医学科（intensive care unit，ICU）中的重症患者病情通常较复杂，其中营养不良作为严重的临床问题，发生率高达 38% ～ 78%[1]。营养支持治疗普遍被认为有助于防止细胞氧化引起的机体损伤，并能改善胃肠道功能、减轻创伤引发的分解代谢反应，从而促进机体恢复并减少死亡率，因此为重症患者提供合理的营养支持治疗无论是对其短期病情康复或是远期预后都显得尤为重要[2-4]。近年来有文献分别研究了营养风险筛查、早期肠内营养、能量与蛋白质早期足量摄入对重症患者 ICU 住院时间及 28 d 死亡率等临床结局的影响[5-8]，但少有文献报道以上所有指标对重症患者临床结局的影响。因此本研究结合 2023 年欧洲肠外和肠内营养学会（European Society for Parenteral and Enteral Nutrition，ESPEN）及 2022 年美国肠外和肠内营养学会（American Society for Parenteral and Enteral Nutrition，ASPEN）重症营养指南推荐意见[9-10]，并以危重症疾病急性早期作为时间节点（入室 3 d 内）[9]，对南京大学医学院附属鼓楼医院 ICU 病区患者的营养支持现状对其营养指标和临床结局的影响进行调查分析，以期引起医护人员的重视，为建立规范化重症营养管理模式提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究为一项单中心回顾性队列研究，回顾性选取 2022 年 1 月至 6 月所有入住南京大学医学院附属鼓楼医院 ICU 病区的重症患者为研究对象，该研究已获得南京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会批准（批件号：2023-032-01）。纳入标准：① 年龄≥ 18 岁；② ICU 住院时间在 7 d 以上。排除标准：① 晚期肿瘤恶病质患者；② 严重肝肾功能衰竭患者；③ 严重代谢紊乱的患者；④ 妊娠或哺乳期患者。患者相关数据均从医院信息管理系统中进行检索。

1.2 研究方法

本次研究应用医院信息管理系统及重症监护护理系统，收集患者的姓名、性别、年龄、体质量指数（BMI）、主要诊断、急性生理与慢性健康评分（APACHE-Ⅱ）、序贯器官衰竭估计评分（SOFA）、营养支持情况、各项营养指标及临床结局等。营养指标主要包括血清总蛋白（TP）、人血白蛋白（ALB）、淋巴细胞计数（LYM）。出于控制基线情况的考虑，分别计算了重症患者入室第 7 日与第 1 日三项营养指标组间的变化值用于统计分析。临床结局主要包括 28 d 临床转归、总住院时间、ICU 住院时间。本研究的主要研究终点为 28 d 临床转归，根据文献报道[11]并结合预试验结果，预计高营养风险患者的 28 d 死亡率为 34.6%，低营养风险患者的 28 d 死亡率为 12.4%，设双侧 $\alpha = 0.05$，把握度（$1 - \beta$）为 90%。根据样本量计算公式 [$n = 2\overline{pq}(Z_\alpha + Z_\beta)^2/(P_1 - P_2)^2$] 计算样本量，共计约需要纳入 108 例研究对象。

营养支持是否合理的判断标准主要依据 2023 年 ESPEN 及 2022 年 ASPEN 发布的重症营养指南[9-10]，由专业人员利用 EXCEL 软件统计患者在室期间每日的营养制剂使用情况及每日能量、蛋白质摄入量。目标能量计算公式[4]：目标能量（$kcal \cdot d^{-1}$）= 标准体重（kg）×25 [kcal/（kg • d）]，其中实际摄入能量值占目标能量值的比率≥ 80% 视为能量充足[2]。本研究的蛋白质摄入标准定为 1.3 ～ 2.0 g/（kg • d）[9-10]（不含人血清白蛋白输注量），蛋白质摄入≥ 1.3 g/（kg • d）为蛋白质摄入充足，蛋白质摄入< 1.3 g/（kg • d）为蛋白质摄入不足。

本研究中所有重症患者在室期间均未进行营养风险筛查，由临床药师后期进行补评，使用的营养风险筛查工具为危重症营养风险评分（nutrition risk in the critically ill score，NUTRIC 评分）[12]，如表 1 所示。NUTRIC 评分可以有效地帮助识别哪些患者可以从积极的营养支持治疗中获

得更大的效益，其评估内容主要包括年龄、疾病严重程度、器官功能情况、并发症、从住院到入住 ICU 的时间及炎症指标（白细胞介素，IL-6）。其中总分 0 ～ 5 分为低营养风险患者，6 ～ 10 分为高营养风险患者。同时为了防止人血清白蛋白输注对 TP、ALB 的结果产生影响，本研究统计了重症患者入室期间人血清白蛋白输注的总量。

表 1　重症患者营养风险筛查评分表 (NUTRIC 评分表)

Tab 1　Nutritional risk screening scale for critically ill patients (NUTRIC score)

变量		得分 / 分
年龄 / 岁	＜ 50	0
	50 ～ 74	1
	≥ 75	2
APACHE- Ⅱ评分 / 分	＜ 15	0
	15 ～ 19	1
	20 ～ 27	2
	≥ 28	3
SOFA 评分 / 分	＜ 6	0
	6 ～ 9	1
	≥ 10	2
并发症 / 个	0 ～ 1	0
	≥ 2	1
从住院到入住 ICU 时间 /d	0 ～＜ 1	0
	≥ 1	1
IL-6 水平 /（ng • L^{-1}）	＜ 400	0
	≥ 400	1

1.3　统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。所有计量资料均进行正态性检验，符合正态分布的两组计量资料比较采用独立样本 t 检验，数据表示为均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）；不符合正态分布的两组计量资料采用非参数 Mann-Whitney U 检验，数据表示为中位数（四分位数间距）[M（Q_{25} ～ Q_{75}）]。计数资料用率（%）表示，计数资料采用卡方检验或 Fisher 精准检验。以 P ＜ 0.05 为差异有统计学意义。

2　研究结果

共筛选出 ICU 病区住院的重症患者 141 例，其中符合纳入标准的患者 126 例，排除 15 例患者（包括晚期肿瘤恶病质的患者 3 例，严重肝肾功能衰竭的患者 8 例，严重代谢紊乱的患者 4 例）。

2.1　一般资料

纳入的 126 例患者中女性 35 例，男性 91 例。平均年龄为（63.93±18.78）岁，年龄＜ 50 岁 26 例，年龄 50 ～ 74 岁 60 例，年龄≥ 75 岁 40 例。婚姻状况中已婚患者 114 例，未婚患者 7 例，离婚患者 5 例。文化程度为文盲的患者 12 例，为小学或初中的患者 78 例，为高中的患者 17 例，为大学的患者 19 例。从住院到入住 ICU 时间＜ 1 d 的患者 48 例，≥ 1 d 的患者 78 例。BMI ＜ 18.5 kg • m^{-2} 者 12 例，18.5 ～ 23.9 kg • m^{-2} 者 79 例，≥ 24.0 kg•m^{-2} 者 35 例。ICU 住院时间 8 ～ 14 d 患者 52 例，15 ～ 28 d 患者 39 例，＞ 28 d 患者 35 例。入室主要诊断排名分别为消化系统疾病（29 例）、呼吸系统疾病（25 例）、循环系统疾病（15 例）、泌尿系统疾病（13 例）、神经系统疾病（12 例）、其他疾病（32 例），其他疾病包括外伤骨折、药物中毒、系统性红斑狼疮（SLE）、血小板减少伴出血（新型布尼亚病毒感染）等。APACHE-Ⅱ评分＜ 15 分者 20 例，15 ～ 19 分者 47 例，20 ～ 27 分者 40 例，≥ 28 分者 19 例。SOFA 评分＜ 6 分者 39 例，6 ～ 9 分者 72 例，≥ 10 分者 15 例。

2.2　营养支持方式

126 例患者中获得营养支持的 111 例（88.1%），其中采用全肠内营养（TEN）支持的患者 35 例（27.8%），采用全肠外营养（TPN）支持的患者 25 例（19.8%），采用肠外营养（PN）和肠内营养（EN）支持序贯或联合使用的患者有 51 例（40.5%），EN 和 PN 均未开展的患者 15 例（11.9%），详见图 1。高营养风险患者中 TEN、TPN、PN 和 EN 序贯或联合支持的分别为 21 例（23.1%）、23 例（25.3%）、35 例（38.5%），其余 12 例（13.2%）未获得营养支持。低营养风险患者中 TEN、TPN、PN 和 EN 序贯或联合支持的分别为 14 例（40.0%）、2 例（5.7%）、16 例（45.7%），其余 3 例（8.6%）未获得营养支持。

图 1　ICU 重症患者营养支持方式分布

Fig 1　Distribution of nutritional support types for critically ill patients in the ICU

2.3　营养风险筛查对营养指标和临床结局的影响

126 例患者在室期间均未进行营养风险筛查，均由临床药师后期进行补评，使用的筛查工具为 NUTRIC 评分。其中 91 例（72.2%）为高营养风

险患者（NUTRIC 评分≥ 6），35 例（27.8%）为低营养风险患者（NUTRIC 评分＜ 6）。高营养风险患者中，79 例（86.8%）获得了营养支持，其余 12 例（13.2%）未获得营养支持。低营养风险患者中，32 例（91.4%）获得了营养支持，其余 3 例（8.6%）未获得营养支持。

在进行营养支持的 111 例入组患者中，按照营养风险筛查的结果分为高营养风险组和低营养风险组，并进行营养指标与临床结局的对比。其中高营养风险组共有 79 例患者（71.2%），低营养风险组共有 32 例患者（28.8%）。高营养风险组的重症患者年龄更大、APACHE-Ⅱ评分及 SOFA 评分更高、总住院时间更久（P ＜ 0.05），其余指标差异均无统计学意义（见表 2）。

表 2 重症患者基本资料及营养风险对其临床结局的影响

Tab 2 Basic information of critically ill patients and the effect of nutritional risk on their clinical outcome

项目		高营养风险组（n ＝ 79）	低营养风险组（n ＝ 32）	P 值
性别（人，%）	男性	60（75.9）	22（68.8）	0.434
	女性	19（24.1）	10（31.2）	
年龄 /[岁，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		71.5（61.0 ～ 78.0）	51.5（39.0 ～ 66.2）	＜ 0.001
APACHE ～Ⅱ /[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		25.0（21.0 ～ 28.0）	15.0（13.0 ～ 18.0）	＜ 0.001
SOFA/[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		8.0（7.0 ～ 9.0）	3.0（2.0 ～ 6.0）	＜ 0.001
人血白蛋白输注总量 /[g，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		155.0（85.0 ～ 237.5）	142.0（64.5 ～ 199.5）	0.702
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		54.1（48.2 ～ 59.4）	56.5（49.0 ～ 59.1）	0.602
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		57.5（52.7 ～ 64.1）	61.6（55.2 ～ 66.3）	0.237
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		3.5（－ 0.1 ～ 7.9）	5.4（－ 1.3 ～ 12.1）	0.340
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		32.0（29.5 ～ 35.0）	31.3（30.4 ～ 36.0）	0.984
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		34.2（30.1 ～ 36.8）	36.2（32.1 ～ 39.6）	0.634
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		2.1（－ 2.1 ～ 6.2）	2.0（－ 1.3 ～ 8.9）	0.320
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		0.8（0.5 ～ 1.2）	0.7（0.5 ～ 1.1）	0.226
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		0.9（0.6 ～ 1.4）	1.0（0.6 ～ 1.1）	0.685
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		0.0（－ 0.3 ～ 0.3）	0.1（－ 0.1 ～ 0.2）	0.546
ICU 住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		19.0（12.0 ～ 35.0）	13.0（9.0 ～ 24.0）	0.072
总住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		24.0（15.0 ～ 48.8）	20.0（13.8 ～ 25.0）	0.039
28 d 临床转归（人，%）	存活	66（83.5）	31（96.9）	0.109
	死亡	13（16.5）	1（3.1）	

注：a. ICU 入室第 1 日数值；b. ICU 入室第 7 日数值；c. ICU 入室第 7 日与第 1 日变化值。

Note：a. ICU admission day 1 values；b. ICU admission day 7 values；c. the variation value between day 7 and day 1 of ICU admission.

2.4 早期 EN 开始时间对营养指标和临床结局的影响

在获得 EN 支持的 86 例患者中，早期 EN 支持开始时间≤ 48 h 者有 55 例（64.0%），EN 支持开始时间＞ 48 h 者有 31 例（36.0%）。导致患者 EN 支持延迟的原因主要为胃肠道功能障碍、血流动力学不稳、代谢严重紊乱等。在获得营养支持的 111 例入组患者中，患者营养支持能量达标时间≤ 72 h 有 49 例（44.1%），患者营养支持能量与蛋白质均达标时间≤ 72 h 有 23 例（20.7%），其余数据见表 3。

进行 EN 支持的重症患者总计 86 例，根据重症患者 EN 的开始时间是否在入室 48 h 内分为早期 EN 组和延迟 EN 组。其中早期 EN 组共有 55 例患者（64.0%），延迟 EN 组共有 31 例患者（36.0%）。两组患者性别、年龄、APACHE-Ⅱ评分、SOFA 评分等差异均无统计学意义，在临床结局的分析中发现，早期 EN 组的 28 d 死亡率更低（P ＜ 0.01），详见表 4。

表 3 ICU 重症患者早期 EN 开始时间及达成目标时间

Tab 3 Start time and target attainment time of nutritional support for critically ill patients in ICU

项目	时机	人数 /n	百分比 /%
早期 EN 开始时间 /h	≤ 48	55	64.0
	＞ 48	31	36.0
能量达标时间 /h	≤ 72	49	44.1
	＞ 72	43	38.7
	未达标	19	17.1
能量及蛋白质均达标时间 /h	≤ 72	23	20.7
	＞ 72	36	32.4
	未达标	52	46.8

2.5 能量及蛋白质摄入对营养指标和临床结局的影响

在进行营养支持的 111 例患者中，利用重症监护护理系统软件精确计算患者每日的能量与蛋白质摄入水平。患者在开始营养支持的第 3、5、7 日的能量达标比例分别为 44.1%、59.5%、70.3%；蛋白

表 4　重症患者基本资料及早期 EN 对其临床结局的影响

Tab 4　Basic information of critically ill patients and the effect of early enteral nutrition on their clinical outcome

项目		早期 EN 组（n = 55）	延迟 EN 组（n = 31）	P 值
性别（人，%）	男性	39（70.9）	24（77.4）	0.513
	女性	16（29.1）	7（22.6）	
年龄 /[岁，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		66.5（50.0 ～ 75.8）	69.0（56.0 ～ 74.5）	0.795
APACHE ～Ⅱ /[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		22.0（17.0 ～ 25.8）	25.0（19.0 ～ 27.0）	0.363
SOFA/[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		7.0（5.0 ～ 8.0）	8.0（5.5 ～ 8.5）	0.495
人血白蛋白输注总量 /[g，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		120.0（45.0 ～ 180.0）	160.0（110.0 ～ 285.0）	0.060
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		54.8（49.3 ～ 59.6）	51.9（45.3 ～ 59.3）	0.293
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		58.2（53.1 ～ 64.2）	58.0（52.6 ～ 64.7）	0.909
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		3.5（－ 0.7 ～ 7.6）	3.4（－ 0.6 ～ 7.7）	0.749
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		31.8（29.8 ～ 34.9）	33.3（29.3 ～ 35.9）	0.628
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		34.3（30.6 ～ 36.8）	35.6（32.3 ～ 38.8）	0.233
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		1.6（－ 1.5 ～ 6.2）	0.7（－ 3.1 ～ 4.8）	0.582
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		0.8（0.5 ～ 1.1）	0.9（0.5 ～ 1.2）	0.591
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		0.9（0.6 ～ 1.3）	1.0（0.6 ～ 1.3）	0.241
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		0.0（－ 0.2 ～ 0.3）	0.0（－ 0.2 ～ 0.2）	0.992
ICU 住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		20.5（13.0 ～ 34.8）	18.0（13.0 ～ 34.5）)	0.841
总住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		22.5（16.2 ～ 44.2）	28.0（15.5 ～ 45.0）	0.985
28 d 临床转归（人，%）	存活	52（94.5）	22（71.0）	0.007
	死亡	3（5.5）	9（29.0）	

注：a. ICU 入室第 1 日数值；b. ICU 入室第 7 日数值；c. ICU 入室第 7 日与第 1 日变化值。

Note：a. ICU admission day 1 values；b. ICU admission day 7 values；c. the variation value between day 7 and day 1 of ICU admission.

质达标比例为 20.7%、25.2%、28.8%；能量及蛋白质均达标比例为 20.7%、25.2%、28.8%（见表 5）。

表 5　ICU 重症患者能量与蛋白质摄入情况

Tab 5　Energy and protein supply for critically ill patients in the ICU

时间	能量 /kcal	能量达标比例 /%	蛋白质 /g	蛋白质达标比例 /%	能量及蛋白质均达标比例 /%
第 3 日	1010.09±692.73	44.1	42.56±28.71	20.7	20.7
第 5 日	1266.73±556.39	59.5	52.79±24.87	25.2	25.2
第 7 日	1393.20±451.19	70.3	57.21±21.03	28.8	28.8

患者能量与蛋白质的摄入与营养指标和临床结局的相关情况见表 6 和表 7，按照入室 72 h 内患者的营养支持能量摄入是否达标分为早期能量充足组和早期能量缺乏组，蛋白质摄入同理，分别对其进行营养指标与临床结局的对比。早期能量充足组共有 49 例患者（44.1%），早期能量缺乏组共有 62 例患者（55.9%）；早期蛋白质充足组共有 23 例患者（20.7%），早期蛋白质缺乏组共有 88 例患者（79.3%）。早期能量充足组与早期能量缺乏组相比营养指标与临床结局差异均无统计学意义；早期蛋白质充足组入室 7 d 内的 ALB 变化值大于早期蛋白质缺乏组（P < 0.05），且两组在室期间人血清白蛋白的输注总量差异无统计学意义。

3　讨论与结论

任何疾病在适当的情况下都可能导致营养不良，但危重症疾病更可能会使这种状态恶化。因为重症患者的免疫功能低下，更容易受到营养不良结果的影响。在这种情况下，不同程度的营养不足或营养过剩都会导致机体成分的改变和功能的减退 [13]。危重症患者机体处于高分解状态，此时如果缺乏足够的营养干预，会对患者的临床预后产生影响，而进行合理的营养支持治疗有助于重症患者的整体康复。

重症营养指南 [9-10] 中推荐：所有 ICU 住院患者均应考虑营养支持治疗，尤其是 ICU 住院时间超过 48 h 的患者 [推荐等级：GPP，强一致性（100% 一致）]；成年重症患者若无法经口进食，应实施早期 EN（48 h 内），而不是延迟 EN[推荐等级：B，强一致性（100% 一致）]；为避免过度喂养，重症患者不应早期使用全量 EN 和全量 PN，而应在 ICU 入室 3 ～ 7 d 内逐步达标 [推荐等级：A，强一致性（100% 一致）]；对于危重症患者，蛋白质摄入量可逐渐增加至 1.3 g/（kg・d）[推荐等级：0，强一致性（92% 一致）]。本研究中重症患者均未常规开展营养风险筛查，从结果分析可知高营养风险患者的总住院时间更久，因此建议常规开展重症患

表 6 重症患者基本资料及早期能量摄入对其临床结局的影响

Tab 6 Basic information of critically ill patients and the effect of early energy intake on their clinical outcome

项目		能量充足组（n = 49）	能量缺乏组（n = 62）	P 值
性别（人，%）	男性	37（75.5）	45（72.6）	0.727
	女性	12（24.5）	17（27.4）	
年龄 /[岁，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		67.5（54.2 ～ 78.0）	67.0（53.0 ～ 74.0）	0.233
APACHE ～Ⅱ /[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		20.0（16.2 ～ 25.0）	23.0（18.5 ～ 27.0）	0.081
SOFA/[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		7.0（3.2 ～ 8.0）	8.0（6.0 ～ 8.0）	0.140
人血白蛋白输注总量 /[g，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		125.0（60.0 ～ 192.5）	140.0（80.0 ～ 220.0）	0.652
TP/[g • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		54.4（48.0 ～ 57.3）	54.5（49.1 ～ 60.1）	0.433
TP/[g • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		56.5（52.7 ～ 62.9）	59.3（52.8 ～ 64.8）	0.304
TP/[g • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		4.8（0.0 ～ 8.8）	4.2（－ 0.1 ～ 8.7）	0.915
ALB/[g • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		31.6（29.4 ～ 34.6）	32.6（29.8 ～ 35.7）	0.364
ALB/[g • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		35.0（31.4 ～ 37.0）	34.5（30.8 ～ 37.1）	0.773
ALB/[g • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		2.5（－ 2.0 ～ 7.1）	0.6（－ 2.0 ～ 6.5）	0.407
LYM/[×10^{9} • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}		0.8（0.5 ～ 1.1）	0.8（0.5 ～ 1.2）	0.339
LYM/[×10^{9} • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}		0.9（0.5 ～ 1.1）	1.0（0.6 ～ 1.4）	0.142
LYM/[×10^{9} • L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}		0.0（－ 0.2 ～ 0.3）	0.1（－ 0.2 ～ 0.2）	0.987
ICU 住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		18.0（12.0 ～ 30.0）	17.0（12.0 ～ 30.0）	0.872
总住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]		22.0（15.2 ～ 41.8）	23.0（13.0 ～ 38.5）	0.731
28 d 临床转归（人，%）	存活	45（91.8）	52（83.9）	0.333
	死亡	4（8.2）	10（16.1）	

注：a. ICU 入室第 1 日数值；b. ICU 入室第 7 日数值；c. ICU 入室第 7 日与第 1 日变化值。

Note：a. ICU admission day 1 values；b. ICU admission day 7 values；c. the variation value between day 7 and day 1 of ICU admission.

者营养风险筛查，以判断开展补充性肠外营养支持的时机。早期无法开展 EN 的高营养风险患者，推荐入住 ICU 病区后尽早开始 PN 支持；而早期无法开展 EN 的低营养风险患者，推荐入住 ICU 病区 7 d 后给予 PN 支持。在获得 EN 支持的 86 例患者中，早期 EN 支持开始时间≤ 48 h 者仅占 64.0%，仍有将近 40% 的患者采用延迟 EN 支持。进行早期 EN 支持的患者 28 d 死亡率更低，因此推荐重症患者入室 48 h 内在排除 EN 禁忌后应尽早开展 EN 支持。早期能量摄入充足的患者与早期能量摄入缺乏的患者相比营养指标与临床结局差异均无统计学意义；早期蛋白质摄入充足的患者入室 7 d 内 ALB 的变化值更大，但对临床结局无明显影响。此结果和指南推荐是一致的，重症患者入室早期并不需要保持足量的能量与蛋白质摄入，应谨慎的逐渐增加能量与蛋白质的供给直至推荐摄入量。

重症患者的营养状况与临床结局密切相关，如 ICU 住院时间、总住院时间及死亡率等 [14-16]。因此，为重症患者提供合理的营养支持治疗是重症监护治疗的重要组成部分。指南推荐所有重症患者入室时均应进行营养风险筛查 [10]，一些研究也证实，NUTRIC 评分结果为高营养风险分组的重症患者更能从营养治疗中获益 [17]。其次，早期 EN 支持对重症患者的机体恢复同样重要。2018 年重症患者早期肠内营养专家共识 [18] 及 2022 年中国急诊危重症患者肠内营养专家共识 [19] 均指出：在排除 EN 禁忌证后，重症患者在入住 ICU 24 ～ 48 h 内尽早启动 EN 支持治疗。同时几项观察性研究及荟萃分析也表明，ICU 重症患者进行早期 EN 治疗与延迟 EN 治疗相比可有效降低感染风险、肺炎发生率和重症患者死亡率 [20-23]。

众所周知，高热量喂养对重症患者的血糖控制、肝功能、感染和临床预后均有着不利影响，因此危重症患者在入室 7 d 内谨慎地逐渐增加至目标热量是有必要的 [24]。一项荟萃分析报告称，与标准正常热量喂养相比，允许性喂养不足的住院死亡率相对较低 [25]。目前几乎所有指南都建议使用间接测热法（indirect calorimetry，IC）单独测量危重症患者的精确能量需求。在关于 IC 指导危重症患者热量的研究中指出，IC 引导的能量输送可显著降低危重症患者的短期死亡率 [26]。

蛋白质是重症患者能量底物的主要来源。人体中没有储备的“蛋白质库”，当患者机体处于严重应激状态时，骨骼肌中的蛋白质会迅速代谢，以应对受伤或急性炎症后机体能量需求的增加。Weijs 等 [27] 研究表明，早期高蛋白摄入并不能改善患者的负氮平衡和死亡率。国外的 PROTINVENT 研究 [28] 提示，ICU 入室 3 d 内低蛋白 [＜ 0.8 g/（kg • d）]、3 ～ 5 d 内正常蛋白 [0.8 ～ 1.2 g/（kg • d）] 以及 5 d 后高蛋白 [＞ 1.2 g/（kg • d）] 可降低重症患者 6 个月死亡率。徐颖等 [8] 表明早期低蛋白联合晚期足量蛋白可改善重症患者的临床结局。

表 7　重症患者基本资料及早期蛋白质摄入对其临床结局的影响

Tab 7　Basic information of critically ill patients and the effect of early protein intake on their clinical outcome

项目	蛋白质充足组（n = 23）	蛋白质缺乏组（n = 88）	P 值
性别（人，%）　男性	17（73.9）	65（73.9）	0.996
女性	6（26.1）	23（26.1）	
年龄 /[岁，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]	68.0（49.0 ～ 76.0）	67.0（56.0 ～ 77.0）	0.991
APACHE ～Ⅱ /[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]	22.0（17.0 ～ 27.0）	22.0（17.2 ～ 25.8）	0.982
SOFA/[分，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]	7.0（4.0 ～ 9.0）	8.0（5.0 ～ 8.0）	0.955
人血白蛋白输注总量 /[g，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]	160.0（90.0 ～ 265.0）	130.0（60.0 ～ 200.0）	0.360
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}	52.3（47.2 ～ 56.2）	54.6（49.5 ～ 59.7）	0.090
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}	58.0（52.1 ～ 67.1）	58.4（53.0 ～ 63.8）	0.863
TP/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}	6.2（2.5 ～ 9.3）	3.9（－ 0.8 ～ 8.6）	0.120
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}	31.0（26.5 ～ 34.0）	31.7（30.0 ～ 34.7）	0.112
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}	34.5（32.0 ～ 36.9）	34.1（30.1 ～ 36.6）	0.312
ALB/[g・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}	3.9（0.8 ～ 7.8）	0.5（－ 2.7 ～ 6.2）	0.031
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{a}	0.8（0.5 ～ 1.2）	0.8（0.5 ～ 1.1）	0.991
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{b}	0.9（0.4 ～ 1.1）	0.9（0.6 ～ 1.3）	0.652
LYM/[×10^{9}・L^{-1}，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]^{c}	0.1（－ 0.2 ～ 0.3）	0.0（－ 0.2 ～ 0.3）	0.741
ICU 住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]	21.0（9.0 ～ 29.5）	17.0（12.0 ～ 33.0）	0.666
总住院时间 [d，M（Q_{25} ～ Q_{75}）]	24.0（21.0 ～ 43.5）	20.5（13.2 ～ 37.0）	0.093
28 d 临床转归（人，%）　存活	22（95.7）	75（85.2）	0.323
死亡	1（4.3）	13（14.8）	

注：a. ICU 入室第 1 日数值；b. ICU 入室第 7 日数值；c. ICU 入室第 7 日与第 1 日变化值。

Note：a. ICU admission day 1 values；b. ICU admission day 7 values；c. the variation value between day 7 and day 1 of ICU admission.

近年来，重症患者的营养支持越来越受到重视。为了优化重症患者的营养支持效果，许多国家提出建立一个由医师、护士、营养师或药师组成的跨学科营养支持团队（NST）[29-30]。国内一项多中心调研发现，多家医院的 ICU 医护人员对于营养支持的认识与指南相比存在较大差距 [31]。重症患者的异质性很大，每位患者的基础情况都不同，营养干预可能对某些重症患者有益，但对其他不同疾病状态的患者可能效果欠佳，而这也正是目前重症营养发展的最大挑战 [11]。因此对于 ICU 医护人员来说，在面对各种突发情况时都能够有条不紊地为患者提供针对性的个体化营养支持方案，重视营养支持的细节并创造最佳的治疗环境，才是开展各项临床研究、制定各项指南的最终目标。

此外本研究仍存在一定的局限性：① 是单中心研究，样本量不足；② 由于医院条件限制，重症患者未能常规检测前白蛋白及转铁蛋白，能量测定也未能使用指南中推荐较为准确的 IC，因此可能会对结果的准确性有一定影响；③ 由于大部分重症患者为卧床状况难以流畅应答，因此未能进行 NRS 2002 营养风险筛查评分的问诊。

综上所述，所有 ICU 住院时间超过 48 h 的患者，均推荐入室 48 h 内开展早期 EN 支持，早期 EN 支持可以降低其 28 d 死亡率；早期蛋白质或者能量是否充足可能对 ICU 住院患者临床结局没有影响。因此对于医护人员来说，建立规范化营养支持管理模式，可以帮助更快地建立营养支持并改善患者预后，也是为重症患者制订和实施最佳营养计划的关键。

参考文献

[1] Charles-Chin-Han L，Yandell R，Fraser RJL，et al. Association between malnutrition and clinical outcomes in the intensive care unit：a systematic review [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，2017，41（5）：744-758.

[2] McClave SA，Taylor BE，Martindale RG，et al. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient：Society of Critical Care Medicine（SCCM）and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition（A. S. P. E. N.）[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，2016，40：159-211.

[3] Singer P. Preserving the quality of life：nutrition in the ICU [J]. Crit Care，2019，23（Suppl 1）：139.

[4] Moisey LL，Merriweather JL，Drover JW. The role of nutrition rehabilitation in the recovery of survivors of critical illness：underrecognized and underappreciated [J]. Crit Care，2022，26（1）：270.

[5] Majari K，Imani H，Hosseini S，et al. Comparison of modified NUTRIC，NRS-2002，and MUST scores in iranian critically ill patients admitted to intensive care units：a prospective cohort study [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，2021，45（7）：1504-1513.

[6] Khalid I，Doshi P，DiGiovine B. Early enteral nutrition and outcomes of critically ill patients treated with vasopressors and mechanical ventilation [J]. Am J Crit Care，2010，19

（3）：261-8.
[7] 冼凌军，汤少炫，谭其佳，等 . 不同肠内营养热量摄入对重症患者器官功能及预后的影响 [J]. 中国现代医药杂志，2016，18（11）：47-50.
[8] 徐颖，梁培，虞文魁，等 . 早期足量蛋白质摄入对重症患者结局的影响 [J]. 中华临床营养杂志，2019，27（3）：133-137.
[9] Singer P，Blaser AR，Berger MM，et al. ESPEN practical and partially revised guideline：clinical nutrition in the intensive care unit [J]. Clin Nutr，2023，42（9）：1671-1689.
[10] Compher C，Bingham AL，McCall M，et al. Guidelines for the provision of nutrition support therapy in the adult critically ill patient：the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，2022，46（1）：12-41.
[11] 徐佳宁，王沪旭，尹卓伟，等 . 改良 Nutric 评分在重症患者中的应用 [J]. 中国临床医生杂志，2019，47（11）：1323-1326.
[12] Heyland DK，Dhaliwal R，Jiang X，et al. Identifying critically ill patients who benefit the most from nutrition therapy：the development and initial validation of a novel risk assessment tool [J]. Crit Care，2011，15（6）：R268.
[13] Sharma K，Mogensen KM，Robinson MK. Pathophysiology of critical illness and role of nutrition [J]. Nutr Clin Pract，2019，34（1）：12-22.
[14] Lew CCH，Yandell R，Fraser RJL，et al. Association between malnutrition and clinical outcomes in the intensive care unit：a systematic review [J]. JPEN J Parenter Enter Nutr，2017，41：744e58.
[15] Mogensen KM，Horkan CM，Purtle SW，et al. Malnutrition，critical illness survivors，and postdischarge outcomes：a cohort study [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，2018，42（3）：557-565.
[16] Lew C，Wong G，Cheung K，et al. Association between malnutrition and 28-day mortality and intensive care length-of-stay in the critically ill：a prospective cohort study [J]. Nutrients，2018，10：10.
[17] Rosa M，Heyland DK，Fernandes D，et al. Translation and adaptation of the NUTRIC score to identify critically ill patients who benefit the most from nutrition therapy [J]. Clin Nutr ESPEN，2016，14：31-36.
[18] 中国急诊危重症患者肠内营养治疗专家共识组 . 中国急诊危重症患者肠内营养治疗专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志，2022，31（3）：281-290.
[19] 孙仁华，江荣林，黄曼，等 . 重症患者早期肠内营养临床实践专家共识 [J]. 中华危重病急救医学，2018，30（8）：715-721.
[20] Doig GS，Heighes PT，Simpson F，et al. Early enteral nutrition，provided within 24 h of injury or intensive care unit admission，significantly reduces mortality in critically ill patients：a meta-analysis of randomised controlled trials [J]. Intensive Care Med，2009，35（12）：2018-2027.
[21] Khalid I，Doshi P，DiGiovine B. Early enteral nutrition and outcomes of critically ill patients treated with vasopressors and mechanical ventilation [J]. Am J Crit Care，2010，19（3）：261-268.
[22] Woo SH，Finch CK，Broyles JE，et al. Early *vs* delayed enteral nutrition in critically ill medical patients [J]. Nutr Clin Pract，2010，25（2）：205-211.
[23] Tian F，Heighes PT，Allingstrup MJ，et al. Early enteral nutrition provided within 24 hours of ICU admission：a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Crit Care Med，2018，46（7）：1049-1056.
[24] Berger MM，Pichard C. Best timing for energy provision during critical illness [J]. Crit Care，2012，16（2）：215.
[25] Marik PE，Hooper MH. Normocaloric versus hypocaloric feeding on the outcomes of ICU patients：a systematic review and meta-analysis [J]. Intensive Care Med，2016，42（3）：316-323.
[26] Duan JY，Zheng WH，Zhou H，et al. Energy delivery guided by indirect calorimetry in critically ill patients：a systematic review and meta-analysis [J]. Critical care（London，England），2021，25（1）：88.
[27] Weijs PJ，Looijaard WG，Beishuizen A，et al. Early high protein intake is associated with low mortality and energy overfeeding with high mortality in non-septic mechanically ventilated critically ill patients [J]. Crit Care，2014，18（6）：701.
[28] Koekkoek WACK，van Setten CHC，Olthof LE，et al. Timing of PROTein INtake and clinical outcomes of adult critically ill patients on prolonged mechanical VENTilation：the PROTINVENT retrospective study [J]. Clin Nutr，2019，38（2）：883-890.
[29] Zhou X，Qiu F，Wan D，et al. Nutrition support for critically ill patients in China：role of the pharmacist [J]. Asia Pac J Clin Nutr，2019，28（2）：246-251.
[30] Nieto-Gómez P，Morón Romero R，Planells Del Pozo E，et al. Evaluation of quality indicators for nutrition and metabolism in critically ill patients：role of the pharmacist [J]. Eur J Hosp Pharm，2021，28（Suppl 2）：e62-e65.
[31] 任珊，龙玲，赵浩天，等 . 河北省多家重症医学科医护人员营养治疗认知现状及分析 [J]. 肠外与肠内营养杂志，2020，27（5）：285-288.

（收稿日期：2023-10-13；修回日期：2023-12-11）

肠外营养致肝功能异常的主动监测和危险因素分析

游利江[1]，唐密密[2, 3]，邓晟[2, 3*]（1.南华大学附属第二医院临床药学科，湖南　衡阳　421001；2.中南大学湘雅医院药学部，长沙　410008；3.国家老年疾病临床医学研究中心（湘雅医院），长沙　410008）

摘要：目的　探索肠外营养所致肝功能异常在胃肠道恶性肿瘤患者中的发生率、临床特点及危险因素，降低临床用药风险。**方法**　通过中国医院药物警戒系统（CHPS）搜索 2022 年 7 月 1 日—12 月 31 日在南华大学附属第二医院使用肠外营养治疗的胃肠道恶性肿瘤患者，病例组为 CHPS 中触发警报信号指示肝功能异常且经药师审核的患者，在未触发警报信号的患者中，剔除重复入院患者得到对照组，分析肝功能异常的发生情况，采用二元 Logistic 回归分析筛选潜在风险因素。**结果**　肠外营养所致肝功能异常在胃肠道恶性肿瘤患者的发生率为 4.98%；85% 发生在用药后 5 ～ 10 d，以轻度转氨酶升高为主要表现。二元 Logistic 回归分析显示败血症、合并脂肪乳是肠外营养致肝功能异常的独立危险因素（$P < 0.05$）。**结论**　本研究通过 CHPS 开展药品不良反应主动监测，可反映肠外营养所致肝功能异常在胃肠道恶性肿瘤患者的发生情况，为临床安全用药提供参考。

关键词：肠外营养；肝功能异常；主动监测；中国医院药物警戒系统
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0575-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.004

Risk factors and active surveillance for abnormal liver function induced by parenteral nutrition

YOU Li-jiang[1], TANG Mi-mi[2, 3], DENG Sheng[2, 3*] (1. *The Second Affiliated Hospital*, *Department of Clinical Pharmacy*, *Hengyang Medical School*, *University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001; 2. *Department of Pharmacy*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 3. *National Clinical Research Center for Geriatric Disorders*, *Changsha* 410008)

Abstract: Objective To determine the incidence, clinical characteristics and risk factors of abnormal liver function related to parenteral nutrition in patients with gastrointestinal malignancies, and reduce the risks of clinical drug use. **Methods** Patients with gastrointestinal malignancies admitted to our hospital between July 1st and December 31st, 2022, and treated with parenteral nutrition were monitored with the China Hospital Pharmacovigilance System (CHPS). The experimental group comprised patients who had abnormal liver function and checked by pharmacists after CHPS alarm signals were triggered. The control group consisted of patients who did not trigger the alarm signals, with re-admitted patients being excluded. Binary Logistic regression analysis was conducted to analyze the risk factors for abnormal liver function. **Results** The incidence of abnormal liver function related to parenteral nutrition in patients with gastrointestinal malignancies was 4.98%. Dysfunction occurred in approximately 85% of patient cases within 5 to 10 days after the treatment, with mild elevation of transaminase as the main manifestation. Binary Logistic regression analysis showed that sepsis and combined fat emulsion were independent risk factors with statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Active monitoring of adverse drug reactions by CHPS can reveal the occurrence of

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.81803233）；中国博士后科学基金第 69 批面上基金资助项目（No.2021M693561）；湖南省卫生健康委课题项目（No.202213054567）。
作者简介：游利江，女，硕士，主要从事营养相关临床研究，email：youlijiang1988@163.com　*通信作者：邓晟，男，博士，主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学研究，email：dengsxy@sina.com

abnormal liver function related to parenteral nutrition in patients with gastrointestinal malignancies.
Key words: parenteral nutrition; abnormal liver function; active surveillance; China Hospital Pharmacovigilance System

国内外指南和共识[1-4]均推荐，对于有营养风险或营养不良的胃肠道恶性肿瘤患者，营养治疗首选肠内营养（EN），但当肠内营养不可行或不能满足目标能量需求时，建议肠外营养（PN）或肠内营养＋肠外营养治疗。但接受肠外营养治疗的患者可能因缺乏肠内喂养而遭受严重的胆汁淤积，有时还会因肝损伤和肠萎缩而出现致命的并发症。肠外营养相关肝功能异常是指肠外营养所引起的肝功能指标如谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、总胆红素（TBIL）等的异常。国家药品监督管理局 2021 年化学药品注射剂不良反应报告数量排名前 3 位的药品类别是抗感染药，肿瘤用药，电解质、酸碱平衡及营养药。此外，复方氨基酸注射液和脂肪乳注射液的说明书均提示偶可影响肝功能，但发生率、临床特点和相关危险因素均未知。

《“十三五”国家药品安全规划》要求在“十三五”期间“利用医疗机构电子数据，建立药品、医疗器械安全性主动监测与评价系统”[5]，《药品不良反应报告和监测管理办法》[6]、《中华人民共和国药品管理法》[7]为该项工作的推进提供了强有力的政策支撑。研究文献表明，中国医院药物警戒系统（China Hospital Pharmacovigilance System，CHPS）主动监测反映了真实世界中药物治疗过程中的不良反应（ADR），为临床安全用药提供了参考[8-10]。因此，主动监测成为我国 ADR 监测未来的趋势。2018 年 3 月南华大学附属第二医院（以下称“我院”）加入国家药品不良反应监测哨点联盟，成为衡阳市首家 CHPS 授牌医院，目前我院已将 CHPS 系统升级为以主动监测及预警模式为重点的 2.0 版本。本研究基于 CHPS 开展胃肠道恶性肿瘤患者肠外营养相关肝功能异常的真实世界主动监测研究，明确其发生率、临床特点和相关危险因素，降低临床用药风险。

1 资料与方法

1.1 系统配置

利用 CHPS 与我院电子诊疗病历对接，可自动导出患者电子诊疗信息。基于全球促发工具白皮书[11]、处方序列分析以及常见不良事件评价标准（CTCAE）5.0 版在 CHPS 中设置报警条件：胃肠道恶性肿瘤患者使用氨基酸或脂肪乳肠外营养治疗期间，ALT ＞正常值上限和 / 或 AST ＞正常值上限和 / 或 TBIL ＞正常值上限。

1.2 研究对象与分组

通过 CHPS 搜索 2022 年 7 月 1 日—2022 年 12 月 31 日在我院胃肠外科接受肠外营养治疗的胃肠道恶性肿瘤患者。

病例组：CHPS 中触发警报信号提示肝功能异常的患者，由 2 名临床药师对系统报警病历进行核实，按照药品不良反应关联性评价标准判定为可能、很可能、肯定的纳入病例组。

对照组：未触发警报信号的患者，并剔除重复入院患者。

1.3 不良反应关联性评价

采用 WHO 国际药品不良反应监测合作中心建议的因果关系评价方法，满足“用药与肝功能异常出现的时间关系合理，停药后肝功能异常消失或减轻”，判定为“可能”，在此基础上如“排除患者病情的进展、合并用药及其他治疗的影响”，判定为“很可能”，在此基础上如“再次用药后再次出现肝功能异常”，则判定为“肯定”。

1.4 肝损伤严重程度分级

根据《中国药物性肝损伤诊治指南》[12]的严重程度分级，分为 1 级（轻度）、2 级（中度）、3 级（重度）、4 级（致命）。

1.5 统计学处理

提取患者的一般资料（年龄、性别、肿瘤分期、吸烟史、饮酒史、药物过敏史、合并疾病、联合用药、手术、败血症、肠外营养用药时间及合并脂肪乳），通过 IBM SPSS26 统计软件，计量资料使用独立样本 t 检验或秩和检验，计数资料使用 χ^2 检验进行组间比较，二元 Logistic 回归分析筛选潜在风险因素。

2 结果

2.1 入组患者情况

通过 CHPS 搜索获得 402 例接受肠外营养治疗的胃肠道恶性肿瘤患者。系统报警 36 例，经临床药师人工审核，其中 20 例患者其肝功能异常发生与肠外营养的关联性评价为“可能”(13 例)

和“很可能”（7 例），纳入病例组，未触发警报信号的患者中剔除重复入院纳入对照组（94 例）。

2.2　肝功能异常发生特点和规律

2.2.1　发生率　肠外营养所致肝功能异常的发生率为 4.98%（20/402）。20 例患者中判断为 1 级肝功能损伤的 2 例，2 级肝功能损伤的 1 例，具体肝功能指标见表 1。

表 1　病例组中 20 例患者的肝功能指标

Tab 1　Liver function indexes of 20 patients in the case group

患者序号	肝功能指标		
	ALT/（U・L^{-1}）（0 ～ 40）	AST/（U・L^{-1}）（5 ～ 40）	TBIL/（μmol・L^{-1}）（3.4 ～ 20.9）
1	125.5	92.6	16.3
2	49.8	102.9	10.5
3	15.1	66.0	22.0
4	84.8	100.9	8.1
5	51.5	75.6	18.2
6	84.6	42.1	11.9
7	51.9	54.5	10.8
8	13.5	16.8	16.0
9	11.5	12.1	25.2
10	62.7	76.0	15.3
11	48.7	145.5	18.0
12	59.9	132.9	100.6
13	136.9	132.3	98.2
14	37.0	126.8	20.1
15	18.0	23.2	25.1
16	24.1	23.9	34.6
17	35.6	71.0	15.4
18	369.0	449.7	10.2
19	54.8	132.0	12.9
20	213.4	227.0	35.1

2.2.2　发生时间　发生肝功能异常的用药时间为（10±5）d，13 例（65%）发生在首日用药 5 d 之内，4 例（20%）发生在首日用药 10 d 之内，3 例（15%）发生在首日用药 15 d 之内。

2.2.3　用药情况　胃肠外科肠外营养均以单瓶输注复方氨基酸和 / 或中长链脂肪乳注射液，20 例患者均存在联合用药（＞ 3 种）。

2.3　肝功能异常相关影响因素

计量资料使用独立样本 t 检验或秩和检验，计数资料使用 χ^2 检验进行组间比较分析，显示手术、败血症、肠外营养时间＞ 7 d、合并脂肪乳与肠外营养导致肝功能异常相关（$P < 0.05$）（见表 2）。以这些因素作为候选变量，建立二元 Logistic 回归分析，结果显示败血症和合并脂肪乳是肠外营养相关肝功能异常的独立危险因素（见表 3）。

表 2　病例组和对照组的基线特征

Tab 2　Baseline characteristics of the experimental group and the control group

变量	病例组（n = 20）	对照组（n = 94）	t/χ^2	P
年龄（岁，$\bar{x}\pm s$）	65.0±10.9	62.0±10.0	1.041	0.300
性别 [n（%）]				
男	14（70.0）	57（60.6）	0.615	0.433
女	6（30.0）	37（39.4）		
肿瘤分期 [n（%）]				
Ⅰ	3（15.0）	2（2.1）	7.496	0.082
Ⅱ	5（25.0）	26（27.7）		
Ⅲ	3（15.0）	31（33.0）		
Ⅳ	2（10.0）	6（6.4）		
分期不明	7（35.0）	29（30.9）		
吸烟史 [n（%）]	6（30.0）	26（27.7）	0.045	0.832
饮酒史 [n（%）]	4（20.0）	16（17.0）	0.101	0.750
药物过敏史 [n（%）]	0（0.0）	10（10.6）	2.332	0.205
合并疾病 [n（%）]				
高血压	4（20.0）	24（25.5）	0.272	0.777
糖尿病	2（10.0）	13（13.8）	0.212	1.000
肝炎	1（5.0）	3（3.2）	0.159	0.543
冠心病	0（0.0）	9（9.6）	2.079	0.356
慢性阻塞性肺疾病	0（0.0）	1（1.1）	0.215	1.000
联合用药＞ 3 种 [n（%）]	20（100.0）	78（83.0）	3.960	0.070
手术 [n（%）]	12（60.0）	15（16.0）	17.698	＜ 0.001
败血症 [n（%）]	5（25.0）	2（2.1）	14.969	0.002
肠外营养用药时间＞ 7 d [n（%）]	17（85.0）	26（27.7）	23.081	＜ 0.001
合并脂肪乳 [n（%）]	10（50.0）	9（9.6）	19.404	＜ 0.001

表 3　肠外营养相关肝功能异常的二元 Logistic 回归分析

Tab 3　Binary Logistic regression analysis of parenteral nutrition-associated abnormal liver function

变量	回归系数（B）	标准误（SE）	$Wald$	OR（95%CI）	p
手术	1.045	0.725	2.080	2.844（0.687，11.772）	0.149
败血症	2.034	1.008	4.071	7.647（1.060，55.176）	0.044
肠外营养用药时间＞ 7 d	0.320	0.842	0.145	1.377（0.264，7.172）	0.704
合并脂肪乳	1.505	0.741	4.130	4.505（1.055，19.233）	0.042

3　讨论

肠外营养制剂安全性再评价一直是国家药政工作的重点，根据中国专家共识[13]，单瓶、多瓶平行或序贯串输等形式输注存在感染和代谢并发症风险高，药物不良反应增加，营养素配比不合理、利用率低、供给不全，增加护士工作量及不必要的耗材费用等问题，首选“全合一”输注，但目前大部分医疗机构仍存在单瓶营养输注。虽然与短期肠外营养相关的肝功能异常通常是可逆

的，但接受长期肠外营养的肝功能障碍可能发展为终末期肝病和肝衰竭，是肠外营养最严重的并发症之一，所以我们应加强对肠外营养相关肝功能异常的监测。目前有关文献集中在对肠外营养作用机制研究和散在的病例观察[14-17]，而复方氨基酸注射液和脂肪乳注射液的说明书均提示偶可影响肝功能，但缺乏针对胃肠道恶性肿瘤患者肝损伤情况的发生率、临床特点和相关危险因素的真实世界数据分析。

对于胃肠道功能障碍或功能衰竭的患者，虽然肠外营养可以维持营养，挽救生命，但禁食期间缺乏食物刺激会导致消化液分泌异常，导致一系列酶的分泌异常，从而导致各种肝脏疾病的发生[18]。肠外营养致肝功能异常可通过肝功能监测预测[19]，典型表现为血清转氨酶水平轻度至中度升高，血清碱性磷酸酶和胆红素浓度较不明显升高。这些生化指标通常在肠外营养治疗后 2 周内升高，即使继续肠外营养治疗也可能恢复正常。大多数患者无症状[20]，与本研究结果一致。研究表明，在接受肠外营养的 127 名外科手术患者中，开始静脉营养时仅 26 名患者肝功能指标正常，肝功能指标低于正常的患者更容易出现转氨酶和 γ-谷氨酰转肽酶水平异常[21]。Wagman 等[22]的研究结果显示转氨酶基线水平偏高的肿瘤患者，使用肠外营养 1 周后转氨酶升高的发生率为 93.56%。在接受肠外营养平均 2 年的患者中，有 95% 的患者报告了肝功能异常，但只有 4% 的患者观察到严重的肝脏疾病[23]。本研究肝功能异常发生率为 4.98%，且大部分为轻微肝功能异常，可能的原因是本研究纳入的患者初始肝功能水平基本正常，而且肠外营养的使用时间和肝功能监测时间均比较短，这也表明对于肝功能正常的胃肠道恶性肿瘤患者短期内使用肠外营养对肝功能影响较小。

肠外营养相关肝功能异常的营养因素主要包括肠外营养配方中葡萄糖或脂类供应过多。研究表明，严重营养不良和碳水化合物摄入量是肠外营养致肝功能异常的独立危险因素[24]，但本研究为回顾性研究，当时患者的营养状况和碳水化合物摄入量的数据缺失，所以无法得出类似结论。败血症和肠内喂养的缺乏都与三酰甘油脂肪酸释放的惰性以及肝脏对三酰甘油的摄取和合成的增加有关，因此也是肝功能改变相关的因素[25]，本研究同样得出败血症是肠外营养相关肝功能异常的独立危险因素。但由于医保限制，当时大部分患者的肠内营养制剂均为外购，所以无法明确缺乏肠内营养是否为其危险因素。在墨西哥成年人口中，$>1\ g \cdot kg^{-1}$ 的脂质剂量与肠外营养致肝功能异常无关[26]，而本研究纳入病例的脂质剂量均小于 $1\ g \cdot kg^{-1}$，所以无法明确脂质剂量是否为肠外营养致肝功能异常的独立危险因素，但本研究显示复方氨基酸针合并输注脂肪乳是肠外营养致肝功能异常的独立危险因素。本研究表明，败血症应妥善处理，应鼓励和尽可能扩大肠内营养，并应避免肠外过量喂养，以防发生不可逆转的肝损伤。

本研究基于 CHPS 开展胃肠道恶性肿瘤患者的肠外营养相关肝功能异常的主动监测，初步明确了肠外营养相关肝功能异常的发生率和可能的危险因素，为提高肠外营养临床安全性提供了参考。但本研究有一定的局限性，作为一项回顾性研究，纳入病例数有限，还需建立大样本、多中心的研究，以获得更可靠的结果。

参考文献

[1] 李子禹，闫超，李沈 . 胃癌围手术期营养治疗中国专家共识（2019 版）[J]. 中国实用外科杂志，2020，40（2）：145-151.

[2] 董明，周建平，姚宏伟 . 结直肠癌围手术期营养治疗中国专家共识（2019 版）[J]. 中国实用外科杂志，2019，39（6）：533-537.

[3] Muscaritoli M，Arends J，Bachmann P，et al. ESPEN practical guideline：clinical nutrition in cancer [J]. Clin Nutr，2021，40（5）：2898-2913.

[4] 中华医学会肠外肠内营养学分会 . 肿瘤患者营养支持指南 [J]. 中华外科杂志，2017，55（11）：801-829.

[5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 . “十三五” 国家药品安全规划 [EB/OL].（2017-02-23）[2023-4-26]. https：//www. nhc. gov. cn/bgt/gwywj2/201702/c07f7b4667fb4f-71991cf5975302bdb6. shtml.

[6] 国家药品监督管理局 .《药品不良反应报告和监测管理办法》[EB/OL].（2011-05-04）[2023-04-26]. https：//www. nmpa. gov. cn/yaopin/ypfgwj/ypfgbmgzh/20110504162501325. html.

[7] 国家药品监督管理局 .《中华人民共和国药品管理法》[EB/OL].（2019-08-27）[2023-04-26]. https：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/fgwj/flxzhfg/20190827083801685. html.

[8] 罗万婷，温润龙，李亮华 . 头孢曲松钠与左氧氟沙星不良反应主动监测数据分析 [J]. 中国药房，2016，27（11）：1504-1506.

[9] Sun J，Deng XY，Chen XP，et al. Incidence of adverse drug reactions in COVID-19 patients in China：an active monitoring study by hospital pharmacovigilance system [J]. Clin Pharmacol Ther，2020，108（4）：791-797.

[10] 吴菲，沈爱宗，李民 . 基于“中国医院药物警戒系

统”ADR 主动监测模块的研究与应用[J]. 中南药学，2020，18（1）：154-157.

[11] Institute for Healthcare Improvement（IHI）. IHI Global Trigger Tool for Measuring Adverse Events [DB/OL].（2009-01-01）[2023-04-12]. https：//www. ihi. org/resources/Pages/Tools/IHIGlobalTriggerToolforMeasuringAEs. aspx.

[12] 中国医药生物技术协会药物性肝损伤防治技术专业委员会，中华医学会肝病学分会药物性肝病学组 . 中国药物性肝损伤诊治指南（2023 年版）[J]. 中华肝脏病杂志，2023，31（4）：355-384.

[13] 丛明华 . 肠外营养安全性管理中国专家共识[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志，2021，8（5）：495-502.

[14] 朱洁瑾，李晴宇，江砚，等 . 肠外营养致严重肝功能损伤 1 例[J]. 中国医院药学杂志，2018，38（10）：1127-1129.

[15] 闫忠芳，陈丽芳，齐玉梅 . 97 例脂肪乳注射液致不良反应的文献分析[J]. 中国药房，2010，21（32）：3038-3040.

[16] 严虹霞，杨静，柴丽敏，等 . 不同肠外营养支持用于结直肠癌术后的疗效及不良反应比较[J]. 中国药房，2015，26（5）：664-666.

[17] Madnawat H，Welu AL，Gilbert EJ，et al. Mechanisms of parenteral nutrition-associated liver and gut injury [J]. Nutr Clin Pract，2020，35（1）：63-71.

[18] Ren HN，Huang WX. Research advances in liver diseases associated with parenteral nutrition [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi，2017，25（7）：557-560.

[19] Żalikowska-Gardocka M，Niewada M，Niewiński G，et al. Early predictors of liver injury in patients on parenteral nutrition [J]. Clin Nutr ESPEN，2022，51：319-322.

[20] Kumpf VJ. Parenteral nutrition-associated liver disease in adult and pediatric patients [J]. Nutr Clin Pract，2006，21（3）：279-290.

[21] Robertson JF，Garden OJ，Shenkin A. Intravenous nutrition and hepatic dysfunction [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，1986，10（2）：172-176.

[22] Wagman LD，Burt ME，Brennan MF. The impact of total parenteral nutrition on liver function tests in patients with cancer [J]. Cancer，1982，49（6）：1249-1257.

[23] Salvino R，Ghanta R，Seidner DL，et al. Liver failure is uncommon in adults receiving long-term parenteral nutrition [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，2006，30（3）：202-208.

[24] Lakananurak N，Tienchai K. Incidence and risk factors of parenteral nutrition-associated liver disease in hospitalized adults：a prospective cohort study [J]. Clin Nutr ESPEN，2019，34：81-86.

[25] Badia-Tahull MB，Leiva-Badosa E，Llop-Talaverón J，et al. Liver function test alterations associated with parenteral nutrition in hospitalized adult patients：incidence and risk factors [J]. Nutr Hosp，2012，27（4）：1279-1285.

[26] Díaz de León González E，Gutiérrez Hermosillo H，Piquet Uscanga YO，et al. Factores de riesgo para las anormalidades de enzimas hepáticas de la nutrición parenteral en un hospital de referencia de México [Risk factors for abnormal liver function tests of parenteral nutrition in a referral hospital in Mexico] [J]. Nutr Hosp，2011，26（4）：729-736.

（收稿日期：2023-05-04；修回日期：2023-07-11）

中医药原创思维与临床疗效提升研究专题

【编者按】

“十四五”中医药发展规划指出，中医药高质量发展应坚持中医药原创思维，深入挖掘中医药精华，并积累转化为临床优势。基于此，本团队从敦煌遗书《辅行诀》中收录的“汤液经法图”入手，尝试还原 3600 年前中医组方配伍的真正原理，解析传统中医理论识药用药的真实思路，为提高中医临床疗效提供切实可行的参考资料。本次专题从医理、医方、中药、炮制和临床角度，运用“汤液经法图”解决了中医中药领域若干关键问题，例如揭示了毒性中药炮制辅料选择的奥秘、诠释了半夏泻心汤的组方配伍原理、优化了脏腑辨证体系、厘清了常用中药大黄的药性属性、丰富了运气学派司天方的选药逻辑，并且汇报了“汤液经法图”用于临床药师会诊的实践案例，为广大中医药学者理解、运用“汤液经法图”奠定基础。

【主持人简介】

金锐，男，中药学博士，副主任中药师，临床药师，科普自媒体人。具有中西药学联合培养教育背景，主要从事医院药学和中医药科普科研。率先开展中药处方用药合理性评价的药学标准研究及“汤液经法图”研究，主笔中药合理使用相关专家共识 4 个，主持首都卫生发展科研专项 1 项、中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目 1 项，主编学术专著 5 部，发表学术论文 60 余篇。担任中国科协、中国非处方药协会科普专家，北京药学会《药物与人》专栏主持，央视十台“健康之路”特邀嘉宾，“小金药师说药事”公众号主创，主编科普专著 3 部，发表科普文章 700 余篇，科普书《小病药治》获全国百部优秀科普作品奖。

从《辅行诀》所载“汤液经法图”角度论证半夏泻心汤类方的泻脾功效

张爽，郭红叶，金锐*（中国中医科学院西苑医院药学部，北京 100091）

摘要：半夏泻心汤类方是张仲景《伤寒论》中治疗心下痞的经典名方，临床上主要用于心下痞、恶心呕吐、肠鸣下利等脾胃病症，疗效显著并沿用至今。从“汤液经法图”角度看，该类方虽名为“泻心汤”，但其功效却非泻心而是泻脾为主，本文对此进行论证。首先，从组方配伍看，半夏泻心汤类方以辛味药、甘味药和苦味药组方，符合“汤液经法图”辛味泻脾、甘味补脾和苦味燥脾的药物定位原则，且其适应证属于脾实证范畴，即为入脾泻脾之方。其次，历代医家多将“心”解读为“心下”病位，多将其用于心下痞。无论古今临床应用，半夏泻心汤类方多用于脾胃疾病。最后，通过对半夏泻心汤类方的组方量化分析，再次明确其对于脾胃疾病的补泻兼施功效，分析其加减配伍原则，旨在为半夏泻心汤类方的配伍实质研究和临床合理使用提供学术支持。

关键词：半夏泻心汤；伤寒论；汤液经法图；辅行诀；泻脾

中图分类号：R944 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0580-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.005

基金项目：中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目（No.CI2021A03805，No.CI2021A00101）。

作者简介：张爽，女，硕士，主要从事临床药学工作研究，email：zhangshuang835@163.com *通信作者：金锐，男，副主任药师，主要从事中医药基本理论与中药临床药学研究，email：jinrui9862@126.com

Effect of Banxia Xiexin decoction on spleen purging based on "Tang-ye-jing-fa map" in *Fuxingjue*

ZHANG Shuang, GUO Hong-ye, JIN Rui* (*Department of Pharmacy, Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100091)

Abstract: Banxia Xiexin decoction is a classic formula in Zhang Zhongjing's "*Shanghanlun*" for epigastric fullness. It is mainly used in clinical practice for spleen and stomach diseases such as epigastric fullness, nausea and vomiting, and diarrhea. The therapy is effective and still in use today. In "Tang-ye-jing-fa map", although this type of formula is called Xiexin decoction, its efficacy is not to purge the heart fire, but mainly the spleen, which was discussed in this paper. In terms of compatibility, Banxia Xiexin decoction consists of pungent, sweet, and bitter herbs, which conforms to the drug use principles in "Tang-ye-jing-fa map" for pungent flavor purging the spleen, sweet flavor tonifying the spleen, and bitter flavor drying the spleen. Its indications belonged to the category of spleen syndrome. Throughout history, many doctors often interpreted 'heart' as below the heart in terms of disease location and used it for epigastric fullness. In both ancient and modern clinical applications, Banxia Xiexin decoction and other formulas are mostly used for the spleen and stomach diseases. Finally, through quantitative analysis of the formula, we once again clarified its tonifying and reducing effects on the spleen and stomach diseases, analyzed the principles of its addition and subtraction compatibility, aiming to provide academic support for the substantive research and clinical rational use of Banxia Xiexin decoction.

Key words: Banxia Xiexin decoction; *Shanghanlun*; Tang-ye-jing-fa map; *Fuxingjue*; purging spleen

半夏泻心汤及其加减方生姜泻心汤、甘草泻心汤（简称"三泻心汤"）等经典名方均出自张仲景的《伤寒论》，用于治疗水热互扰、心下之痞证[1-2]。"三泻心汤"在方药组成、病因病机上极为相似，却与传统泻心汤如三黄泻心汤、大泻心汤等有所不同。"三泻心汤"遵循辛开苦降的原则，主治中焦斡旋功能失调所致的腹部胀满、恶心呕吐、困倦乏力、肠鸣下利等症状，虽然沿袭了"泻心"之名，但其病机在脾胃，由此统称半夏泻心汤类方。这一类方还包括黄连汤、旋覆代赭汤以及一些成方如枳实消痞丸、左金丸等[3]。本文从"汤液经法图"理论体系出发，分析其组方配伍原理和功效特点，认为其真正的功效特点应该是泻脾而非泻心，同时分别从适应证、临床应用和方剂加减等多角度展开论证。

1 基于汤液经法图分析半夏泻心汤类方的组方配伍

"汤液经法图"源自梁·陶弘景《辅行诀五脏用药法要》（简称《辅行诀》）一书，主要阐述以脏腑虚实辨证和五味补泻治疗为主的辨证论治体系，展示出了独特的五味配伍成方的原理。《辅行诀》记载："脾实则腹满，飧泻；虚则四肢不用，五脏不安"。可见腹满肠鸣、食谷不化、溏泻等症状为脾实证，乏力疲惫、四肢无力、心烦不安为脾虚证。根据"虚则补为主，实则泻为主"的治疗原则，脾实证应以泻脾为主，脾虚证应以补脾为主。那么补泻是如何从方剂配伍中体现的呢？陶云："脾德在缓，以甘补之，辛泻之。脾苦湿，急食苦以燥之"。结合"汤液经法图"（见图 1）则更加清晰：脾土证治疗包含辛、甘、苦三种药味，泻脾以辛味药为主，补脾以甘味药为主，燥脾以苦味药为主。比如小泻脾汤治脾气实，下利清谷，里寒外热，腹冷，脉微者，方中包含附子（一枚，辛），干姜（辛）、炙甘草（甘）各三两，组方构成为"二辛一甘"，主导药味是辛味药，以泻脾为主，故称小泻脾汤；小补脾汤治饮食不化，时自吐利，吐利已，心中苦饥，无力，身重，足痿，善转筋者，方中包含人参（甘）、炙甘草（甘）、干姜（辛）各三两，术（苦）一两，组方构成为"二甘一辛一苦"，组方以甘味药为主，辅以辛味药泻脾和苦味药燥脾。这种组方规律体现了"补中有泻，泻中有补"的五行生克制化平衡思想[4]。研究认为，"汤液经法图"是《伤寒论》经方配伍的重要理论来源[4-8]。

根据"汤液经法图"的组方配伍理论分析，半夏泻心汤类方的组方配伍以辛、甘、苦味药为主（见表 1），其正是脾土治疗的配伍结构。以代表方半夏泻心汤为例，组方构成共含有七味药，其中半夏、干姜为辛味药，黄芩、黄连为苦味药，人参、甘草和大枣同为甘味药。根据药味组成可以定位在"汤液经法图"中的脾土区域（见图 1），也就是说半夏泻心汤主要作用脏腑在脾胃。从方解看，半夏泻心汤以辛温半夏为君，散结除痞，降逆止呕；以干姜、黄连、黄芩为臣，温中散寒、泄热开痞；君臣相

辅，寒热平调，辛开苦降。所以半夏泻心汤是以半夏、干姜辛味药为主导的泻脾方。同理，生姜泻心汤、甘草泻心汤及黄连汤也都是由辛、甘、苦药味组成（见表 1），也是补泻相调的脾土治疗方。生姜泻心汤的配伍结构为“三辛二苦三甘”，增加了辛味药生姜的用量来消痞散水、和胃降逆，从而增加泻脾的功效。甘草泻心汤的配伍结构为“二辛二苦三甘”，增加甘味药甘草的用量来除烦补虚、缓急止痛，从而增加补脾的功效。黄连汤的药物组成和剂量与半夏泻心汤极为相似，多家学者也将黄连汤归为半夏泻心汤类方 [9-11]。其配伍结构为“三辛一苦三甘”，加用了辛味药桂枝，增强泻脾兼有补肝之力；去黄芩增加黄连的剂量，清热和阴，温中通阳，虽有所区别，但仍遵循辛开苦降甘补的组方原则。

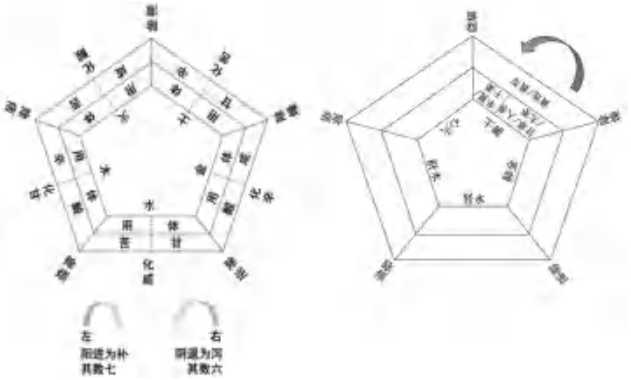


图 1 汤液经法图和半夏泻心汤组方配伍特点

Fig 1 Tang-ye-jing-fa map and Banxia Xiexin decoction compatability

表 1 半夏泻心汤类方组成和药味

Tab 1 Composition and taste of Banxia Xiexin decoction

名称	组方用药及药味	辛味药 - 甘味药 - 苦味药的数目比例
半夏泻心汤	半夏半升（辛）、黄芩三两（苦）、干姜三两（辛）、人参三两（甘）、黄连一两（苦）、大枣十二枚（甘）、甘草三两（甘）	2：3：2
生姜泻心汤	生姜四两（辛）、甘草三两（甘）、人参三两（甘）、干姜一两（辛）、黄芩三两（苦）、半夏半升（辛）、黄连一两（苦）、大枣十二枚（甘）	3：3：2
甘草泻心汤	甘草四两（甘）、黄芩三两（苦）、人参三两（甘）、干姜三两（辛）、黄连一两（苦）、大枣十二枚（甘）、半夏半升（辛）	2：3：2
黄连汤	黄连三两（苦）、甘草三两（甘）、干姜三两（辛）、桂枝三两（辛）、人参二两（甘）、半夏半升（辛）、大枣十二枚（甘）	3：3：1

2 半夏泻心汤类方在临床应用中的功能主治

2.1 《伤寒论》中半夏泻心汤类方的功能主治

半夏泻心汤类方源于张仲景的《伤寒论》，太阳病症篇第 149 条：“伤寒五六日，呕而发热者，柴胡汤证具，而以他药下之，柴胡证仍在者，复与柴胡汤。此虽已下之，不为逆。必蒸蒸而振，却发热汗出而解。若心下满而硬痛者，此为结胸也，大陷胸汤主之。但满而不痛者，此为痞，柴胡不中与之，宜半夏泻心汤”；第 157 条：“伤寒汗出解之后，胃中不和，心下痞鞕，干噫食臭，胁下有水气，腹中雷鸣下利者，生姜泻心汤主之”；第 158 条：“伤寒中风，医反下之，其人下利，日数十行，谷不化，腹中雷鸣，心下痞鞕而满，干呕，心烦不得安，医见心下痞，谓病不尽，复下之，其痞益甚，此非结热，但以胃中虚，客气上逆，故使鞕也，甘草泻心汤主之”。

从《伤寒论》原文可见，该类方都可用于治疗心下痞，心下指胃脘部，痞者塞也，心下痞一般指患者上腹部、胃脘部感到堵塞不通、胀满呕吐的自觉症状。心下位于人体的中焦，对机体的阴阳、气血、气机、水火的升降有调节、控制作用。寒热错杂的心下痞证病机在于中气受伤、中焦斡旋失司、寒热互存。根据心下痞、心下满、心下硬等程度不同而选择不同方剂，其中半夏化痰和胃、降逆消痞，以半夏为君适于心下胀满而不痛者；生姜温散水饮、散寒发表，以生姜为君药适用干噫食臭、腹中雷鸣下利者；甘草调补中气、何胃消痞，以甘草为君药适用干呕心烦不得安者。所以三方均用于治疗各种原因引起的寒热错杂的心下痞，功效不同于传统泻心汤，虽然沿袭了“泻心”之名，却无泻心的功效，“心”指病位“心下”之意，实则作用在脾胃。而从“汤液经法图”角度看，以腹胀、呕吐和腹泻为主的脾胃病证当属脾实证范畴。也有学者认为三黄泻心汤有可能是泻心汤类第一方，随着不断拓展应用而逐渐发展出半夏泻心汤、生姜泻心汤和甘草泻心汤等方剂，从而出现了这种名实不副的现象 [3，12]。

2.2 医学古籍中半夏泻心汤类方的主治病证

半夏泻心汤作为代表方适用范围最广泛，临床应用最多，且在许多医学古籍中均有记载，如唐代《外台秘要方》《千金翼方》，明代《医方考》《本草纲目》，清代《温病条辨》《伤寒贯珠集》等，多集中在明清时期的著作 [13]。绝大多数医家记载的对半夏泻心汤类方的主治病证与《伤寒论》相同，均记载为心下满而不痛。其他各家方义论述，虽略有些差异，但也都是围绕心下痞证病机而论。如吴谦《医宗金鉴》中写道“但满而不痛，此为虚热气逆之痞，即呕有发热之少阳证，柴胡亦不中与之。法当治痞也，宜半夏泻心汤主之”。费伯雄《医醇賸义》中写道“误下结胸，痞满不痛，身寒而呕，饮食不下者，半夏泻心汤主之”。尤在泾《伤寒贯珠集》中写道“痞者，满而不实之谓。夫客邪内陷，即不可从汗泄，而满而不实，又不可从下夺，故惟半夏、干姜之辛，能散其结，黄连、黄芩之苦，能泄其满，而其所以泄与散者，虽药之能，而实胃气之使也。用参、草、枣者，以下后中虚，故以之益气，而助其药之能也”。这说

明历代医家在临床治疗心下痞时，多有对半夏泻心汤加减应用。成无己在《伤寒明理论》中提到“塞而不通，否而不分为痞。泻心汤为分解之剂，所以谓之泻心者，谓泻心下之邪也”。痞者，留邪在心下，名曰泻心，实则泻的是心下之脾胃，也就是说历代医家应用半夏泻心汤治疗的都是胃痞证。

清代医家柯琴在《伤寒来苏集》中提到半夏泻心汤的病机在于“寒热之气，互结心下”，后世医家也大都认同这一说法。现代伤寒名家刘渡舟将其概括为“脾胃阴阳不调，阳不得阴，胃气不降而生热；阴不得阳，脾气不升而生寒”，这种观点被现行中医教材普遍接受，将胃热脾寒作为寒热错杂痞的病机核心[14]。目前中医药高等院校所使用的《方剂学》《伤寒论》及《金匮要略》等教材中，半夏泻心汤更是专为寒热错杂之痞证而设[15]。现代《方剂学》中，半夏泻心汤与附方生姜泻心汤、甘草泻心汤、黄连汤共同归属于调和寒热剂一节中，适于中焦升降失常而致心下痞、恶心呕吐、肠鸣下利等脾胃病症。

综上所述，临床应用半夏泻心汤时，除主证心下痞以外，还应同时具备胃热和脾寒两个症状。部分现代医家认为只有胃热证或脾寒证的痞证、没有寒热错杂而由气滞引起的心下痞、以及由胃阴虚或食滞胃脘引起的痞证都不应使用该类方[16-17]。《外台秘药方》和《普济方》中提到服用半夏泻心汤时“禁用羊肉、饧、海藻、菘菜、猪肉、冷水”，现代应用半夏泻心汤类方也是嘱咐患者服用期间忌辛辣、腥膻、油腻、不易消化的食物。由此可见，半夏泻心汤泻的是脾胃，治的是胃病。

2.3　现代指南中半夏泻心汤类方的临床应用

随着后世的不断延用和拓展，半夏泻心汤类方的应用不再拘泥于脾胃病，也逐渐应用到其他系统，并且部分已经纳入到治疗指南和专家共识当中。目前纳入的指南或专家共识如表 2 所示，涉及脾胃病、糖尿病、肿瘤等多个领域，其中以脾胃病中医指南多见，辨证多为寒热错杂证。证据级别最高的是半夏泻心汤治疗慢性胃炎，可显著改善胃脘胀满、胃中嘈杂、食少纳呆、口干口苦症状（Ⅱa 级），此外，还可用于寒热错杂所致的痞满、消化不良、腹胀腹泻等脾胃病。对于脾虚胃热型的糖尿病患者也有较好的疗效。生姜泻心汤还可用于伊立替康方案化疗导致腹泻的食管癌患者，甘草泻心汤还可用于脾胃湿热所致的口疮症等。所以半夏泻心汤类方在指南中的应用看似广泛，实则都离不开其病机脾虚胃热、寒热错杂，由此也体现了中医“异病同治”的思想。

表 2　纳入的半夏泻心汤的指南和专家共识

Tab 2　Guidelines and expert consensus on Banxia Xiexin decoction

指南	半夏泻心汤	生姜泻心汤	甘草泻心汤
《痞满中医临床实践指南（2018）》	寒热错杂证（Ⅲb）	/	/
《慢性胃炎中医临床实践指南》	改善症状（Ⅱa/Ⅲb）	/	/
《消化系统常见病功能性消化不良中医诊疗指南》	寒热错杂证	/	/
《消化系统常见病功能性腹胀中医诊疗指南》	寒热错杂证	/	/
《消化系统常见病功能性腹泻中医诊疗指南》	寒热错杂证	/	/
《消化系统常见病复发性口腔溃疡中医诊疗指南》	/	/	寒热错杂证
《2 型糖尿病病证结合诊疗指南》	高血糖 - 脾虚胃热者（2b）	/	/
《糖尿病前期中医药循证临床实践指南》	湿热蕴脾证（Ⅳ弱推荐）	/	/
《国家基层糖尿病防治管理指南（2022）》	糖尿病前期 - 湿热蕴结证；腹胀 - 寒热错杂证（合枳术汤加减）；易饥多食 - 胃强脾弱证	/	/
《糖尿病合并高脂血症病证结合诊疗指南》	低高密度脂蛋白胆固醇血症 - 脾虚胃热证（3b）	/	/
《咳嗽的诊断与治疗指南（2015）》	胃气上逆证（合旋覆代赭汤加减）	/	/
《咳嗽中医诊疗专家共识意见（2011）》	胃气上逆证（合旋覆代赭汤加减）	/	/
《晚期肿瘤患者非治疗性恶心呕吐中西医治疗专家共识》	肿瘤患者非治疗性恶心呕吐 - 寒热错杂证	/	/
《中西医结合食管癌治疗方案专家共识（2021 版）》	预防癌变	联合伊立替康方案治疗腹泻	/
《艾滋病中医诊疗指南（2013 版）》	/	/	口疮（脾胃湿热证）
《口疮中医临床实践指南（2018）》	/	/	口疮 - 寒热错杂证 白塞病

针对半夏泻心汤的临床研究也大多是在胃炎、胃溃疡、功能性消化不良等消化系统疾病[18-20]。袁晞钒等[21]对近十年发表的泻心汤类方相关的文献进行分析，结果表明泻心汤类方中医用来治疗脾胃疾病频数最高（占比 79.4%），优势病症为胃脘痛、痞满、呕吐、泄泻、嘈杂等。现代医学主治病症为消化系统疾病（占比 78.7%），优势病种为胃炎、结肠炎、功能性消化不良、消化性溃疡等。随着现代研究水平的不断提高，学者们也发现了半夏泻心汤类方治疗脾胃的原理：药物主要作用于脑肠轴，影响胃肠运动及内脏高敏感性，并且通过调控信号通路、抑制炎症因子表达、调节胃肠道菌群等多靶点、多通路实现寒热平调、扶正祛邪的作用[2]。

3　半夏泻心汤类方的补泻功效与加减规则

半夏泻心汤类方在开方时应重点把握“辛 - 甘 - 苦”的组方配伍原则，根据患者症状、舌苔、脉象等不同灵活变换或加减药味，调整气血脏腑之间的关系[22]。方剂加减可以分为原方给药剂量的增减和不改变总治疗方向情况下的少量药味的加减。从“汤液经法图”理论看，增加辛味药的剂量或者药味就能增加泻脾功效，增加甘味药的剂量或者药味就能增加补脾功效，全方仍然要以辛、甘为主导药味。若是大量增加苦味药或者剂量就会导致治疗方向的变化。

3.1 半夏泻心汤各药味的配伍比例

仲景经方的给药剂量一直是业界争议的话题，由于汉代度量衡的差异以及中药品种、产地、炮制等问题导致分析经方配伍比例存在一定差异。《伤寒论》原文中，半夏泻心汤类方的给药计量单位包括“两、升、枚”。现代研究对仲景经方给药剂量折算大体可分为两种：一种是根据书籍记载、临方应用等进行折算，如李时珍“古之一两，今用一钱”之说，现代教材中多借鉴于此，又结合“古方一剂合约现方三剂”直接按一两等于 3 g 折算；另一种是以柯雪帆等[23]为代表的学者们对汉代重量单位进行考究，认为一两为 15.625 g（约 15 g）。而对于原方半夏“半升”以及大枣“十二枚”的重量问题，实物测量结果不一，具体结果和给药剂量比重如表 3 所示，其中畅达[24]、王辉武[25]等也按一两 15 g 计。结果显示，三泻心汤甘味药占比最高，黄连汤辛味药占比最高，整体以辛味药、甘味药为主，苦味药占比最低。从各家测量结果的比值来看，柯雪帆[23]、畅达[24]的方剂与《方剂学》的辛 - 甘 - 苦药味比例最为相近，但畅达[24]的方剂整体剂量较大，而王辉武[25]所测结果中辛味药和苦味药比例相近，因此柯氏之说可能最贴近原方比例。

若将药味量化成坐标，辛味药代表泻脾功效、甘味药代表补脾功效，则可以在直角坐标系中直观看出方剂的补泻程度。以表 3 中柯雪帆（黑点）、《方剂学》（白点）结果为例，将量化后的半夏泻心汤类方的补泻程度在图 2 中展示，坐标值代表甘、辛味药剂量比值。坐标位置越接近 X 轴（补）则说明补的功效越大，同样地，越接近 Y 轴（泻）说明泻的功效越大。可以看出：① 半夏泻心汤类方都是补泻兼施方；② 甘草泻心汤的补脾功效最大，黄连汤的泻脾功效最大，这也与上文所述适应证相符。虽然两者给药剂量不同，但各方剂大体上的补泻程度还是比较一致的，相比之下，柯氏组整体补脾功效大于《方剂学》，这可能源于大枣的测量值偏大导致补味药占比增大。

表 3 半夏泻心汤类方不同剂量与药味比值

Tab 3 Different dosages and ratios of Banxia Xiexin decoction

方剂	方剂来源			
	《方剂学》[6]	柯雪帆[23]	畅达[24]	王辉武[25]
半夏泻心汤及药味比	半夏 12 g、黄芩 9 g、干姜 9 g、人参 9 g、甘草 9 g、黄连 3 g、大枣 6 g（辛:甘:苦＝7：8：4）	半夏 42 g、黄芩 45 g、干姜 45 g、人参 45 g、甘草 45 g、黄连 15 g、大枣 30 g（辛:甘:苦＝8.7：12：6）	半夏 55 g、黄芩 45 g、干姜 45 g、人参 45 g、甘草 45 g、黄连 15 g、大枣 42 g（辛:甘:苦＝9.7：13.2：6）	半夏 29 g、黄芩 45 g、干姜 45 g、人参 45 g、甘草 45 g、黄连 15 g、大枣 36 g（辛:甘:苦＝7.4：12.6：6）
生姜泻心汤及药味比	生姜 12 g、甘草 9 g、人参 9 g、干姜 3 g、黄芩 9 g、半夏 9 g、黄连 3 g、大枣 6 g（辛:甘:苦＝2：2：1）	生姜 60 g、甘草 45 g、人参 45 g、干姜 15 g、黄芩 45 g、半夏 42 g、黄连 15 g、大枣 30 g（辛:甘:苦＝11.7：12：6）	生姜 60 g、甘草 45 g、人参 45 g、干姜 15 g、黄芩 45 g、半夏 55 g、黄连 15 g、大枣 42 g（辛:甘:苦＝13：13.2：6）	生姜 60 g、甘草 45 g、人参 45 g、干姜 15 g、黄芩 45 g、半夏 29 g、黄连 15 g、大枣 36 g（辛:甘:苦＝10.4：12.6：6）
甘草泻心汤及药味比	甘草 12 g、黄芩 9 g、人参 9 g、干姜 9 g、黄连 3 g、大枣 6 g、半夏 9 g（辛:甘:苦＝6：9：4）	甘草 60 g、黄芩 45 g、人参 45 g、干姜 45 g、黄连 15 g、大枣 30 g、半夏 42 g（辛:甘:苦＝8.7：13.7：6）	甘草 60 g、黄芩 45 g、人参 45 g、干姜 45 g、黄连 15 g、大枣 42 g、半夏 55 g（辛:甘:苦＝10：14.7：6）	甘草 60 g、黄芩 45 g、人参 45 g、干姜 45 g、黄连 15 g、大枣 36 g、半夏 29 g（辛:甘:苦＝7.4：14.1：6）
黄连汤及药味比	黄连 9 g、甘草 9 g、干姜 9 g、桂枝 9 g、人参 6 g、半夏 9 g、大枣 6 g（辛:甘:苦＝9：7：3）	黄连 45 g、甘草 45 g、干姜 45 g、桂枝 45 g、人参 30 g、半夏 42 g、大枣 30 g（辛:甘:苦＝13.2：10.5：4.5）	黄连 45 g、甘草 45 g、干姜 45 g、桂枝 45 g、人参 30 g、半夏 55 g、大枣 42 g（辛:甘:苦＝14.5：11.7：4.5）	黄连 45 g、甘草 45 g、干姜 45 g、桂枝 45 g、人参 30 g、半夏 29 g、大枣 36 g（辛:甘:苦＝11.9：11.1：4.5）

3.2 方剂加减应用

半夏泻心汤类方临床应用时，多根据患者伴随症状灵活加减，加减时尽量选择苦味药、辛味药和甘味药，以免影响原方的治疗。脾胃以运化水谷为主，胃热脾寒互结中焦，气机阻滞就会有湿热产生，所以在临床证候中会有舌苔黄腻、呕吐、泄泻。若呕吐腹泻、气滞腹痛等典型脾实症较重，可加辛减甘，如加大半夏、干姜剂量或增加枳实、生姜以开结散滞；若困倦乏力、饮食不佳等脾虚证较重，可加甘减辛如加大人参、甘草剂量或加用茯苓、黄芪以行气补脾。若舌苔黄腻较重，热多寒少征象，可加苦减甘，增加苦味药黄芩、黄连清泻胃热，减甘草、人参；若寒多热少，可加辛减苦，重用干姜、川芎等。

在临床应用中，为满足不同需求、克服煎煮不便的缺陷，半夏泻心汤类方也不断发展出了多

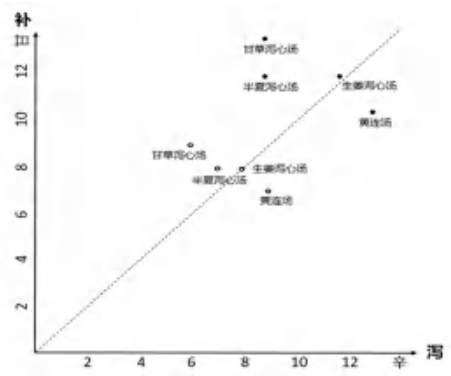


图 2　半夏泻心汤类方补泻图

Fig 2　Tonifying and reducing effect of Banxia Xiexin decoction

种成方制剂。如由原方衍化来的半夏和胃颗粒，其成分包含姜半夏、黄芩、干姜、黄连、党参、炙甘草、大枣，与原方基本相同。说明书中明确标注药味为“味甜、微苦、辣”，而成方制剂往往为了口感好，提高用药依从性会适当添加矫味剂，使整体味道偏甜，所以半夏泻心汤的真实味道应该是以辛辣为主，其次为甜、微苦。从味道上也可以明确其组方配伍为辛 - 甘 - 苦，若是缺少辛辣之味，那么其泻脾功效也会大大降低。

又比如元代李杲《兰室秘藏》中以半夏泻心汤为基础化裁而成的枳实消痞丸，目前常用于化湿热，消痞满，其主要成分为枳实（酸辛）、白术（苦）、法半夏（辛）、黄连（苦）、党参（甘）、甘草（甘）、茯苓（甘）、厚朴（咸辛）、麦芽（辛）、干姜（辛），配伍结构为“三辛三甘二苦一咸一酸”，根据“汤液经法图”五味化合理论，酸咸化辛，故可概括为“五辛三甘二苦”[26]。可见，枳实消痞丸也是补泻兼施的泻脾方。

4　讨论与结论

本文从多维度验证半夏泻心汤类方的泻脾功效：从组方配伍看，类方包含辛 - 甘 - 苦的组方配伍模式，根据辛泻脾、甘补脾、苦燥脾，全方作用脏腑在脾胃而不是心脏，配伍比例以辛味药泻脾为主，同时辅以补脾，泻中有补，补泻兼施；从适应证看，半夏泻心汤类方主治寒热互结，胃热脾寒，中焦斡旋失常而出现的腹部胀满、恶心呕吐、肠鸣下利等脾胃病；从临床使用看，历代医家都用此类方治疗慢性胃炎、胃溃疡等消化系统疾病。由此可见，半夏泻心汤类方虽然在命名上沿袭了“泻心”之名，却是一类泻脾方。同时也在一定程度上验证了“汤液经法图”具有极高的医学价值，其可以透视组方的底层逻辑，明辨主治病证的本质特点，掌握不同方剂的配伍理论[26]。

参考文献

[1]　张仲景 . 伤寒杂病论 [M]. 王叔和，撰次 . 钱超尘，郝万山，整理 . 北京：人民卫生出版社，2005：60-61.

[2]　甘丽华，杨坤，郭超峰 . 半夏泻心汤类方的方证释义与现代研究概况 [J]. 辽宁中医药大学学报，2022，24（11）：82-86.

[3]　陈萌，张冬梅，刘敏，等 . 仲景经方命名演变规律解析 [J]. 国医论坛，2016，31（5）：6-8.

[4]　李崇超 . 以小补脾汤与小泻脾汤为例试析《辅行诀》中补泻的含义 [J]. 江苏中医药，2014，46（9）：66-68.

[5]　李刚，张薛光，黄煌，等 .《汤液经法》图略解 [J]. 中国中医基础医学杂志，2015，21（9）：1148-1150.

[6]　金锐，李凡 .《辅行诀》所载“汤液经法图”蕴含的中药药性理论新内容探析 [J]. 医药导报，2023，42（4）：479-483.

[7]　李冀，左铮云 . 方剂学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2021：68-69.

[8]　金锐 .“汤液经法图”系列研究之二：基于五味补泻理论的 10 首经方配伍原理解析 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2020，22（8）：2961-2968.

[9]　王宇光，金锐 .“汤液经法图”系列研究之三：25 味药精五行属性内涵的探索性研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（2）：385-390.

[10]　尤在泾 . 伤寒贯珠集 [M]. 太原：山西科学技术出版社，2006：59.

[11]　菜陆仙 . 中国医药汇海方剂部 [M]. 北京：中华书局印行，1985：792-794.

[12]　陈萌，李丽娜，张冬梅 . 泻心汤类方源流探讨 [J]. 中华中医药杂志，2013，28（6）：1657-1659.

[13]　王德民 . 半夏泻心汤的临床应用体会 [J]. 中国社区医师，2018，34（18）：103，105.

[14]　刘佳丽，张冬梅，何飞武，等 . 从阳气变动规律探讨三泻心汤证寒热错杂机理 [J]. 中医药导报，2017，23（24）：19-20.

[15]　段金娜，徐升，黄蕊 . 半夏泻心汤病机刍议 [J]. 中医药临床杂志，2014，26（3）：282.

[16]　刘建民，王洁 . 半夏泻心汤临床应用体会 [J]. 现代中医药，2010（5）：15-16.

[17]　李柏，田同儒，王爱成 . 辛开苦降法调理脾胃不和证 [J]. 中医学报，2015，30（11）：1630-1632.

[18]　黄博瑜，胡小英 .“三泻心汤”临床应用探析 [J]. 中国中医药信息杂志，2020，27（1）：111-114.

[19]　毛燕，李立华 . 高才达 . 运用泻心汤治疗痞证经验 [J]. 世界中医药 2021，16（3）：491-495，499.

[20]　周勇，魏盼，周小康 . 浅析《伤寒论》之“泻心汤”与“心下痞”[J]. 中医学报，2019，34（2）：248-251.

[21]　袁晞钒，雷会霞，苗明三 . 基于数据挖掘的泻心汤类方应用特点及用药规律分析 [J]. 中药药理与临床，2023，39（9）：95-100.

[22]　王阳，王萍，姜艾利，等 . 温艳东运用半夏泻心汤治疗胃痞病经验总结 [J]. 中国中医基础医学杂志，2020，26（8）：1187-1189，1209.

[23]　柯雪帆，赵章忠，张玉萍，等 .《伤寒论》和《金匮要略》中的药物剂量问题 [J]. 上海中医药杂志，1983（12）：36-38.

[24]　畅达，郭广义 .《伤寒论》药物中非衡器计量的初探 [J]. 中成药研究，1985（8）：44.

[25]　王辉武 . 经方药物剂量的临床价值 [J]. 中医杂志，2002，43（10）：784-785.

[26]　金锐 . 医方图解 [M]. 北京：中国中医药出版社，2023：64-65.

（收稿日期：2023-11-07；修回日期：2023-11-25）

基于《辅行诀》所载“汤液经法图”的辛味毒性中药炮制辅料的药味规律研究

罗春梅[1]，李蒙蒙[2]，金锐[3*]（1. 陆军军医大学第二附属医院药剂科，重庆 400037；2.河南省直第三人民医院药学部，郑州 450000；3. 中国中医科学院西苑医院药学部，北京 100091）

摘要：目的 用“汤液经法图”五味补泻用药理论分析 2020 年版《中国药典》辛味毒性中药炮制辅料的药味规律，为中药炮制理论提供新思路。**方法** 选取 2020 年版《中国药典》辛味毒性中药，通过药智网和蒲标网检索各省市历代炮制规范中所采用的辅料，对辅料的五味属性进行统计分析，并采用“汤液经法图”五味补泻用药理论进行分析验证。**结果** 从“汤液经法图”五味补泻用药理论角度看，辛味药补肝、酸味药泻肝；甘味药补脾、辛味药泻脾。由于补泻关系相反的两种药味具有相互制约的能力，故辛味毒性中药可用甘味、酸味辅料来炮制。2020 年版《中国药典》辛味毒性中药共有 48 种，21 种辛味毒性中药采用辅料炮制，炮制辅料总共 53 种，其中 14 种辛味的毒性中药炮制辅料药味以甘味、酸味为主（出现频次最高），包括附子、半夏、艾叶、吴茱萸等，与“汤液经法图”五味补泻用药理论相符。**结论** 从“汤液经法图”五味补泻用药理论角度看，辛味毒性中药可采用甘味、酸味辅料进行炮制，可为中药炮制理论提供参考。

关键词：汤液经法图；五味；辛味毒性中药；炮制；解毒
中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0586-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.006

Herbal property rules of processing excipients of pungent toxic Chinese medicine based on the “Tang-ye-jing-fa map” in *Fuxingjue*

LUO Chun-mei[1], LI Meng-meng[2], JIN Rui[3*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Second Affiliated Hospital of the Army Medical University*, *Chongqing* 400037; 2. *Department of Pharmacy*, *Henan No.*3 *Provincial People's Hospital*, *Zhengzhou* 450000; 3. *Department of Pharmacy*, *Xiyuan Hospital*, *Chinese Academy of Chinese Medical Science*, *Beijing* 100091)

Abstract: Objective To analyze the herbal property rules of processing excipients of pungent toxic Chinese medicine in Chinese Pharmacopoeia (2020 Editon) based on the theory of tonification and purgation of five flavors in “Tang-ye-jing-fa map” and to provide new ideas for the processing of traditional Chinese medicine. **Methods** Processing excipients of pungent toxic Chinese medicine in the Chinese Pharmacopoeia were retrieved through regulations on the processing of Chinese medicines over the years recorded by Yaozhi.com and Pubiao.com. The five flavors properties of pungent toxic processing excipients were analyzed and verified by the theory of tonification and purgation of five flavors in “Tang-ye-jing-fa map”. **Results** In “Tang-ye-jing-fa map”, pungent Chinese medicine could tonify the liver and purge the spleen; sour taste could purge the liver; sweet taste could tonify the spleen. Two types of Chinese medicines with opposite pharmaceutical properties might constrain each other. So, pungent toxic Chinese medicines could be processed with sweet and sour medicinal excipients. The 2020 Edition of the Chinese Pharmacopoeia included 48 pungent toxic Chinese medicines, 21 of which were prepared with excipients based on the the processing regulations

基金项目：中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目（No. CI2021A03805，No. CI2021A00101）。
作者简介：罗春梅，女，硕士，主管药师，主要从事中药临床药学与中药药效物质基础研究，email：luochunmei0305@163.com
[*]**通信作者：**金锐，男，博士，副主任药师，主要从事中药临床药学和中医药基本理论研究，email：jinrui9862@126.com

of Chinese medicines. There were 53 processing excipients in total 14 of which were mainly of sweet and sour taste, consistent with the theory of tonification and purgation of five flavors in “Tang-ye-jing-fa map”. **Conclusion** Pungent toxic Chinese medicine can be prepared with sweet and sour excipients according to “Tang-ye-jing-fa map”, which provides reference for the processing of Chinese medicine.
Key words: Tang-ye-jing-fa map; five flavor; pungent toxic Chinese medicine; processing excipient; detoxification

中药炮制解毒技术是我国的一项传统制药技术，是中医药临床用药的特色与精华。辅料炮制解毒是有毒中药炮制的重要组成部分，能降低有毒中药的毒副作用、保证临床应用安全有效，辅料在毒性中药炮制过程中的作用，是中药炮制理论研究的重要内容[1]。中药炮制所用辅料历史悠久，许多辅料（黄酒、醋、蜂蜜、白矾、姜汁、甘草汁、黑豆汁、羊油脂等）本身就有性味、归经和功能主治，因此也可以视为一味中药。利用辅料本身的药性与毒性药材一起炮制，以减轻或消除毒副作用，这可以看作是中药的一种配伍关系[2-3]。目前辅料炮制解毒领域的研究已取得突破性进展，通过除去毒性部位、降低毒性成分含量、破坏毒性成分结构等方式而达到炮制解毒的目的[4-5]。多数研究集中在辅料炮制前后中药有效成分含量以及药效毒理的变化，在一定程度上从化学和药理学角度阐明了炮制原理，但辅料炮制理论研究比较薄弱，尤其是多种辅料的炮制解毒规律尚不明确[6-7]。

“汤液经法图”（见图 1）在脏腑虚实理论框架下，描述了脏腑虚实辨证，以及由辛、咸、甘、酸、苦五味配伍及五味合化而进行配伍组方的原理[8-9]。与传统“一对一”的五脏五味配属关系不同，“汤液经法图”描绘了一幅“多对一”的五脏五味配属关系，表现为补味、泻味和化味“三对一”的对应关系，全图结构工整对称，搭配巧妙，具有很强的严谨性和逻辑性[10-11]。陶弘景认为此图乃《汤液经法》尽要之妙，学者能熟悉之，医道毕矣[12-13]。著名医史文献大家钱超尘教授认为，《伤寒杂病论》主要是张仲景在继承《汤液经法》的基础上“论广”而成的。因此，“汤液经法图”被称为“万方之源”[14]。辅料炮制毒性药材的本质是一种配伍关系，以 2020 年版《中国药典》辛味有毒中药为例，通过检索其历代炮制规范，对炮制辅料进行统计分析，尝试用“汤液经法图”五味补泻用药理论体系对有毒中药辅料炮制解毒机制进行解析，为中药炮制解毒理论研究提供一种新思路。

1　资料与方法

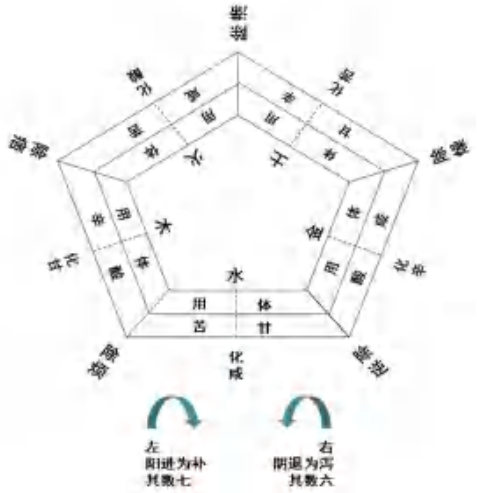


图 1　汤液经法图

Fig 1　Tang-ye-jing-fa map

1.1　资料来源

查询 2020 年版《中国药典》收载的辛味毒性中药，并在药智网（https：//www.yaozh.com）和蒲标网（https：//db.ouryao.com）检索其炮制规范，统计各毒性中药炮制用辅料的名称和出现频次，检索时间为建库以来至 2023 年 2 月 1 日。

1.2　辅料药味的确定

辅料药味的确定以 2020 年版《中国药典》的记载为主，同时根据《中药大辞典》《中华本草》或各省市炮制规范中的记载佐证。

2　结果

2.1　辛味毒性中药的品种

2020 年版《中国药典》共收录毒性中药 83 种，四气五味中记载有辛味的毒性中药有 48 种，见表 1。

2.2　辛味毒性中药炮制辅料药味的确定

通过药智网数据和蒲标网数据检索 2020 年版《中国药典》中 48 种辛味有毒中药各省市历代炮制法规，统计收载的炮制方法中所采用的辅料，共有 53 种，其中米、米泔水、糯米均统计为米；黄酒、酒、白酒均统计为酒；明矾、白矾统计为白矾；皮硝、芒硝统计为芒硝，麸炒枳实、麸炒枳壳药味为苦、辛、酸，统计为酸；陈皮、青皮药味为苦、辛，统计为辛；诃子苦、酸，统

表 1 2020 年版《中国药典》辛味有毒中药

Tab 1 Pungent toxic Chinese medicine in Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition)

药名	性味	归经	功能与主治
天仙子	苦、辛、温；有大毒	心、胃、肝	解痉止痛，平喘，安神
川乌（制）	辛、苦、热；有大毒（有毒）	心、肝、肾、脾	祛风除湿，温经止痛
巴豆（霜）	辛，热；有大毒	胃、大肠	峻下冷积，逐水退肿，豁痰利咽；外用蚀疮
红粉	辛，热；有大毒	肺、脾	拔毒，除脓，去腐，生肌
闹羊花	辛，温；有大毒	肝	祛风除湿，散瘀定痛
草乌（制）	辛、苦、热；有大毒（有毒）	心、肝、肾、脾	祛风除湿，温经止痛
斑蝥	辛，热；有大毒	肝、胃、肾	破血逐瘀，散结消癥，攻毒蚀疮
干漆	辛，温；有毒	肝、脾	破瘀通经，消积杀虫
土荆皮	辛、温；有毒	肺、脾	杀虫，疗癣，止痒
千金子（霜）	辛、温；有毒	肝、肾、大肠	泻下逐水，破血消癥；外用疗癣蚀疣
天南星（制）	苦、辛，温；有毒	肺、肝、脾	燥湿化痰，祛风止痉，散结消肿
仙茅	辛、热；有毒	肾、肝、脾	补肾阳，强筋骨，祛寒湿
白附子	辛、温；有毒	胃、肝	祛风痰，定惊搐，解毒散结，止痛
半夏	辛、温；有毒	脾、胃、肺	燥湿化痰，降逆止呕，消痞散结
全蝎	辛、平；有毒	肝	息风镇痉，通络止痛，攻毒散结
芫花	苦、辛、温	肺、脾、肾	泻水逐饮；外用杀虫疗疮
苍耳子	苦、甘、辛，性温，有毒	肺经、肝	散风寒，通鼻窍，祛风湿
两头尖	辛，热；有毒	脾	祛风湿，消痈肿
附子	辛、甘，大热；有毒	心、肾、脾	回阳救逆，补火助阳，散寒止痛
轻粉	辛，寒；有毒	大肠、小肠经	外用杀虫，攻毒，敛疮
香加皮	辛、苦，温；有毒	肝、肾、心	利水消肿，祛风湿，强筋骨
洋金花	辛，温；有毒	肺、肝	平喘止咳，解痉定痛
臭灵丹草	辛、苦，寒；有毒	肺	清热解毒，止咳祛痰
狼毒	辛，平；有毒	肝、脾	散结，杀虫
常山	苦、辛，寒；有毒	肺、肝、心	涌吐痰涎，截疟
雄黄	辛，温；有毒	肝、大肠	解毒杀虫，燥湿祛痰，截疟
蓖麻籽	甘、辛，平；有毒	大肠、肺	泻下通滞，消肿拔毒
蜈蚣	辛，温；有毒	肝	息风镇痉，通络止痛，攻毒散结
蟾酥	辛，温；有毒	心	解毒，止痛，开窍醒神
丁公藤	辛、温；有小毒	肝、脾、胃	祛风除湿，消肿止痛
九里香	辛、微苦，温；有小毒	肝、胃	行气止痛，活血散瘀
大皂角	辛、咸，温；有小毒	肺、大肠	祛痰开窍，散结消肿
飞扬草	辛、酸，凉；有小毒	肺、膀胱、大肠	清热解毒，利湿止痒，通乳
艾叶	辛、苦，温；有小毒	肝、脾、肾	温经止血，散寒止痛；外用祛湿止痒
两面针	苦、辛，平；有小毒	肝、胃	活血化瘀，行气止痛，祛风通络，解毒消肿
吴茱萸	辛、苦，热；有小毒	肝、脾、胃、肾	散寒止痛，降逆止呕，助阳止泻
金铁锁	苦、辛，温；有小毒	肝	祛风除湿，散瘀止痛，解毒消肿
草乌叶	辛、涩，平；有小毒		清热，解毒，止痛
南鹤虱	苦、辛，平；有小毒	脾、胃	杀虫消积
急性子	微苦、辛，温；有小毒	肺、肝	破血，软坚，消积
蛇床子	辛、苦，温；有小毒	肾	燥湿祛风，杀虫止痒，温肾壮阳
蒺藜	辛、苦，微温；有小毒	肝	平肝解郁，活血祛风，明目，止痒
鹤虱	苦、辛，平；有小毒	脾、胃	杀虫消积

计为酸。在《中国药典》《中华本草》和历代炮制规范中尚未记载胆巴的药味，胆巴又称卤盐，为氯化镁、硫酸镁和氯化钠的固体混合物，药物的真实滋味为酸咸，故药味统计为酸。辛味有毒中药的辅料药味见表 2。

2.3 辛味毒性中药炮制辅料统计

通过药智网数据和蒲标网数据检索 2020 年版《中国药典》中 48 种辛味有毒中药各省市历代炮制法规中收载的炮制方法，其中 21 种辛味有毒中药采用辅料炮制，并对其炮制辅料在各省市历代炮制规范中出现的次数进行统计，见表 3。

由表 3 可知，除蟾酥、常山、仙茅、蒺藜、全蝎、香加皮、洋金花 7 种中药以外，其余 14 种辛味有毒中药炮制辅料药味均以甘味或酸味的出现频次最多。其中，采用辅料炮制减毒的辛味有毒中药主要是毛茛科的川乌、草乌、附子，天南星科的天南星、半夏、白附子和大戟科的狼毒、芫花。毛茛科有毒中药川乌、草乌、附子均

表 2　辛味有毒中药的炮制辅料药味

Tab 2　Flavor of pungent toxic Chinese medicine processing excipients

药味	辅料
辛	生石灰、生姜、皂角、石灰、酒、陈皮、青皮、小茴香、麻黄、桂枝、薄荷、川芎、公丁香、木香、白豆蔻、沉香、肉桂、砂仁、紫苏子、南坪细辛、白前、麝香
苦	栀子、黄连
甘	甘草、黑豆、豆腐、金银花、米、竹沥、面粉、青礞石、天花粉、牛奶、麦麸、谷糠
酸	白矾、醋、五味子、诃子、胆巴、麸炒枳实、麸炒枳壳
咸	芒硝、盐、童尿、青稞、童便

含有乌头碱等双酯型生物碱毒性成分，历代炮制规范中，均采用甘味药（甘草、黑豆、金银花）、酸味药（皂角、白矾、胆巴）、辛味药（生姜）等辅料进行炮制，出现频次最多的炮制辅料为甘味药甘草，比如附子炮制辅料共有 6 种，分别是甘草、黑豆、米、豆腐、胆巴、生姜，其中甘草和胆巴使用得最多，在历代炮制规范中共出现 22 次，其次黑豆（17 次）和豆腐（4 次）。天南星科的天南星、半夏、白附子均含有毒针晶和凝集素蛋白等毒性成分，历代炮制规范中，均采用酸味药（白矾、皂角）、甘味药（甘草）、辛味药（生姜）等辅料进行炮制，出现频次最多的炮制辅料为酸味药的白矾，例如半夏炮制辅料共有 20 种，辛味药 18 种、甘味药 4 种、酸味药 4 种、苦味 3 种、咸味药 3 种，但酸味药白矾使用得最多，在历代炮制规范中共出现 87 次，其次是生姜（54 次）和甘草（50 次）。大戟科的狼毒、芫花均含有二萜类毒性成分，历代炮制规范中出现频次最多的炮制辅料为酸味药醋，例如狼毒炮制辅料共有 3 种，辛味药 1 种、甘味药 1 种、酸味药 1 种，但酸味药醋使用得最多，在历代炮制规范中共出现 31 次。由此可知，辛味有毒中药多采用酸、甘味辅料进行炮制。

表 3　21 种辛味有毒中药炮制辅料统计分析

Tab 3　21 processing excipients for pungent toxic Chinese medicine

中药	炮制辅料五味出现频次				
	辛	甘	酸	咸	苦
川乌	生石灰（1）、生姜（28）、皂角（16）	甘草（38）、黑豆（12）、豆腐（5）、金银花（3）	白矾（5）、醋（3）		
草乌	生石灰（1）、生姜（11）、皂角（5）	甘草（25）、黑豆（6）、豆腐（6）、金银花（5）	白矾（6）、醋（3）、诃子（2）	童尿（1）	
斑蝥		米（19）、甘草（1）		青稞（1）、童便（1）	
附子	生姜（2）	甘草（22）、黑豆（17）、米（2）、豆腐（4）	胆巴（22）		
天南星（制）	生姜（40）、皂角（4）	甘草（5）	白矾（43）		
半夏	生姜（54）、皂角（11）、麻黄（7）、桂枝（7）、陈皮（5）、薄荷（3）、小茴香（3）、青皮（1）、川芎（1）、公丁香（1）、木香（1）、白豆蔻（1）、沉香（1）、肉桂（1）、砂仁（1）、紫苏子（1）、南坪细辛（1）、生石灰（1）	甘草（50）、竹沥（8）、面粉（1）、天花粉（2）	白矾（87）、五味子（3）、炒枳实（1）、炒枳壳（1）	盐（3）、芒硝（9）、青蒙石（2）	栀子（5）、白前（2）、枇杷叶（2）
白附子	生姜（24）、皂角（3）	甘草（4）、豆腐（1）	白矾（31）		
狼毒	酒（1）	牛奶（1）	醋（31）		
芫花			醋（30）		
蟾酥	酒（25）	牛奶（10）			
常山	酒（23）	麦麸（1）、谷糠（1）	醋（4）		
仙茅	酒（19）	米（7）		盐（2）	
吴茱萸	生姜（3）、酒（5）	甘草（42）	醋（6）	盐（25）	黄连（13）
艾叶	酒（6）、生姜（2）		醋（39）		
蒺藜				盐（22）	
全蝎	薄荷（5）、酒（3）、麝香（1）	甘草（2）		盐（3）	
香加皮	酒（1）				
鹤虱		甘草（1）			
两头尖	酒（2）		醋（3）		
巴豆		米（3）			
洋金花	生姜（3）、酒（3）				

2.4　从“汤液经法图”角度解析辛味有毒中药炮制辅料药味规律

“汤液经法图”展示了一个完整的辨证论治体系，以五脏虚实辨证，以五味补泻治疗，同一脏腑的疾病有虚证和实证的区别，分别需要不同的药味来补虚和泻实，这是阴阳的对立统一关系。例如，在肝木区域，辛味补肝、酸味泻肝、甘味

缓肝，对于肝虚证应选择以辛味药为主治疗，不应以酸味药为主来治疗。在辛味药为主的补肝方中增加酸味药，可减弱辛味药的功效。这一配伍原则，可以用于辛味毒性中药的炮制法。对于辛味毒性中药，采用酸味辅料炮制，可以减弱其辛味毒性作用。同理，在脾土区域，辛味泻脾，甘味补脾，而苦味燥脾，甘味药能减弱辛味药泻脾的作用（见图 2）。因此，从“汤液经法图”角度看，酸味和甘味辅料可以用于辛味毒性中药的炮制减毒。

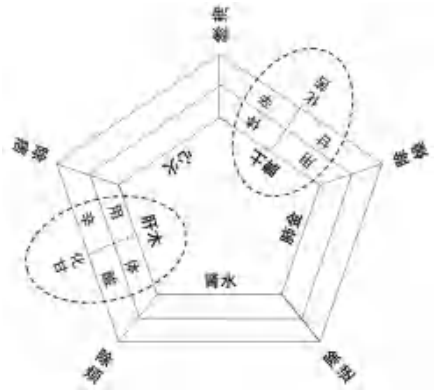


图 2 “汤液经法图”中辛味药的补泻（用体）关系

Fig 2 Tonification and purgation relationship of pungent Chinese medicine in “Tang-ye-jing-fa map”

用辅料炮制药材，本质上是药物与辅料之间配伍关系的体现。药物的偏性、燥性、毒性和副作用是普遍存在的，用适宜的辅料对其加以炮制，可以降低药材的毒副作用。从“汤液经法图”角度来看，辛味有毒中药可以采用酸、甘味辅料来进行炮制，减轻药物的毒副作用。2020 年版《中国药典》辛味有毒中药中有 21 种采用辅料炮制，其中 14 种（川乌、草乌、斑蝥、附子、天南星、半夏、白附子、狼毒、芫花、吴茱萸、艾叶、鹤虱、两头尖、巴豆）采用最多的是酸味、甘味辅料，这与“汤液经法图”理论推导的结果一致。

3 讨论

3.1 “汤液经法图”理论或许能够阐明毒性中药炮制辅料选择背后的原理

从纷繁复杂的历代炮制资料中可以看到，几乎每一味毒性中药都记载了十几种甚至几十种不同的炮制方法，所采用的炮制辅料也都各不相同，而现代研究不可能对历史上出现的多种炮制品逐一分析，通过化学、药理学和生物学方法，阐明其炮制机制。其实，历代毒性中药炮制的辅料是有规律可循的，可能并非是随机尝试的结果，但隐藏在背后的原理尚未阐明。本研究采用“汤液经法图”理论，尝试阐明毒性中药炮制辅料选择的依据。

在“汤液经法图”五味补泻理论中，辛味药补肝、酸味药泻肝、甘味药缓肝；甘味药补脾、辛味药泻脾、苦味药燥脾；酸味药补肺、咸味药泻肺、辛味药散肺；苦味药补肾、甘味药泻肾、咸味药润肾；咸味药补心、苦味药泻心、酸味药收心。因此，对于辛味毒性药，甘味和酸味辅料可以制约其毒性，本研究结果也证实了这一结论。同理，对于苦味毒性药，也可以运用这一规律进行炮制减毒，即选择甘味和咸味辅料进行炮制解毒。

根据本研究中各省市历代炮制规范中辛味毒性中药炮制辅料的统计结果，结合辛味毒性中药的炮制解毒机制文献研究，发现辛味毒性中药炮制辅料的解毒机制可为“汤液经法图”五味补泻用药理论指导下的辅料选择提供科学依据 [15-21]。辛味有毒中药川乌、草乌、附子炮制最多的辅料是甘味药甘草；半夏、天南星、白附子炮制最多的辅料是酸味药白矾；狼毒、芫花炮制最多的辅料为酸味药醋。川乌、草乌、附子中的剧毒性成分是以乌头碱为代表的双酯型生物碱类成分，具有神经毒性和心脏毒性 [15]，而甘草中酸性成分甘草酸、甘草苷与双酯型生物碱发生水解、酯交换，同时还可生成络合物或“酸碱中和成盐”形成沉淀，促使双酯型生物碱水解，游离双酯型生物碱的含量显著降低，达到炮制减毒的目的 [16-17]。半夏、天南星、白附子中的毒性成分以毒针晶和凝集素蛋白为代表，有显著的致炎作用，以黏膜刺激性毒性最为常见，白矾中铝离子可络合毒针晶中草酸钙的草酸，使毒针晶的晶型结构破坏；而白矾可使凝集素蛋白降解和变性，使毒蛋白的致炎作用降低，这是白矾炮制天南星科植物减毒的重要机制 [18-19]。甘遂中毒性较大的二萜类成分在醋制的过程中，其环氧环结构被破坏，生成双键结构，转化为毒性小或者低毒的二萜类成分 [20]。芫花炮制的关键在于辅料醋，醋炙后有毒的二萜原酸酯类成分水解，有刺激性的苷水解为苷元，毒性成分含量降低，有效成分富集，达到减毒增效的目的 [21]。从现代药理学和中药化学角度，上述研究初步阐明了辛味有毒中药采用酸味、甘味的辅料炮制减毒的机制，也侧面印证了在“汤液经法图”五味补泻用药理论指导下，辛味毒性中药用酸、甘味辅料炮制药的科学性。

3.2 对本研究结果中不一致情况的说明

经本研究统计结果分析可知，仍有部分辛味毒性中药炮制时，最常用的辅料不是酸味和甘味，而是辛味和咸味。蟾酥、常山、仙茅、香加皮、洋金花炮制采用辅料最多的是酒，全蝎炮制采用

辅料最多的是辛味药薄荷，蒺藜炮制采用辅料最多的是盐。推测出现这种现象的原因有：

①《中国药典》记载的某些中药的药味与该药的五行属性不一致，而“汤液经法图”是根据药物的五行属性和功效确定药味的，这就造成了统计上的误差。如《中国药典》中全蝎记载为辛味，而在“汤液经法图”体系中全蝎属于“火中金”，其主导药味可能是咸、酸，而薄荷的药味是苦、辛，用苦味、辛味的薄荷对咸味、酸味的全蝎进行炮制减毒，这与“汤液经法图”五味补泻原理（咸补心、苦泻心，辛补肝、酸泻肝）相符合。② 一种中药的药味并不是单一的，有的中药有两个以上的药味，本文为便于统计分析，只选取了其中一个药味。例如根据《辅行决》中的记载，枳实、枳壳既有酸味，又有辛味，为便于数据分析，本文只选取酸味进行统计。③ 本研究数据来源于药智网和蒲标网收载的历年各省市炮制法规，数据库收录的信息不一定完整，故本研究的结论有一定的局限性。

3.3 “汤液经法图”理论对未来中药炮制发展的影响

中药炮制辅料众多，辅料使用是否得当直接影响药物的安全和临床疗效，但现代研究对于辅料炮制原理尚待深入研究，尤其是多种辅料如何与药物进行性、味、效配伍组合，发挥减毒增效的作用尚不明确，也无法还原古代真正的炮制意图。中药辅料炮制，也可称为“以药制药”，其本质是药物之间的配伍关系。“汤液经法图”包含了中药五行属性、五味补泻理论以及五味配伍转化理论，不仅对中药组方配伍具有良好的指导作用，同时也可为炮制辅料的选择及毒性中药饮片复方的配伍研究提供理论支持和新思路。例如，从以辛酸化甘的角度看，附子的炮制可以选用白芍或者木瓜等酸味药，白芍和木瓜的酸味可以降低辛味药附子的毒性，又能增强附子止痛的作用，适用于老年患者虚实夹杂的风寒湿痹证。由此可见，“汤液经法图”不仅拓宽了中药药性理论内涵及其运用场景，也为毒性中药炮制辅料的选择提供了依据，对于丰富中药炮制理论研究有重要的参考价值。

参考文献

[1] 李向东 . 浅谈加辅料炮制对中药疗效的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘，2015，15（5）：140-141.

[2] 王业勤 . 中药炮制辅料应用研究 [J]. 中国药物经济学，2014，9（S1）：80-81.

[3] 蔡泓，李军，王君明，等 .“以药制药”炮制技术的历史沿革理论依据及其现代研究策略 [J]. 时珍国医国药，2017，28（11）：2703-2705.

[4] 王卫，王奎龙，单雪莲，等 . 有毒中药的炮制解毒技术及共性解毒机制 [J]. 南京中医药大学学报，2017，33（5）：448-462.

[5] 薛蓉，宫静雯，屈凌芸，等 . 毒性中药饮片炮制研究进展与探讨 [J]. 世界中医药，2022，17（9）：1193-1201.

[6] 杨冰，杨陆，周滨滨，等 . 新世纪 20 年：中药炮制机制研究热点与前沿分析 [J]. 中国中药杂志，2022，47（5）：1161-1169.

[7] 刘倩，张定堃，黄伟，等 . 中药饮片多辅料共制的传承挖掘与现代研究概况 [J]. 中草药，2023，42（4）：479-483.

[8] 金锐，李凡 .《辅行诀》所载“汤液经法图”蕴含的中药药性理论新内容探析 [J]. 医药导报，2023，42（4）479-483.

[9] 金锐，郭红叶，田佳鑫 .《辅行诀》所载“汤液经法图”体系中五脏虚实辨证的四诊信息库构建和判别模型研究 [J]. 医药导报，2023，42（4）：464-471.

[10] 金锐，方子寒，朱贺，等 .“汤液经法图”五味化合理论的数学模型分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（20）：191-199.

[11] 金锐，韩晟 .“汤液经法图”系列研究之四：五味化合规律的数理分析 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（4）：1036-1041.

[12] 陶弘景 . 张大昌，钱超尘主编 .《辅行诀五脏用药法要》传承集 [M]. 北京：学苑出版社，2008.

[13] 郭红叶，田佳鑫，张爽，等 . 基于《辅行诀》所载“汤液经法图”解析心病治疗的经方时方与医案 [J]. 医药导报，2023，42（4）：472-478.

[14] 王淑民 .《辅行诀脏腑用药法要》与《汤液经法》、《伤寒杂病论》三书方剂关系的探讨 [J]. 中医杂志，1998，39（11）：694-696.

[15] 张晓晨，郑清阁，杨菁华，等 . 附子 C19 二萜生物碱结构及活性研究进展 [J]. 中草药，2020，51（2）：531-541.

[16] 毛营营，栗焕焕，任晓亮 . 附子 - 甘草药对配伍研究进展 [J]. 天津中医药大学学报，2021，40（1）：119-127.

[17] 马丽娜，叶祖光，张广平 . 从体外成分变化 - 体内代谢 - 生物效应拮抗解析附子甘草配伍减毒作用机制 [J]. 中国中药杂志，2019，44（19）：4165-4170.

[18] 王卫 . 天南星科 4 种有毒中药凝集素蛋白促炎作用机制及炮制的影响 [D]. 南京：南京中医药大学，2019.

[19] 李书晖，郁红礼，吴皓，等 . 法半夏炮制过程对半夏中毒蛋白凝集素蛋白的影响 [J]. 中国中药杂志，2020，45（11）：2546-2551.

[20] 张元斌 . 大戟属有毒中药狼毒和京大戟醋制解毒存效机制研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2021.

[21] 董倩 . 芫花及其炮制品的质量评价 [D]. 大连：辽宁中医药大学，2010.

（收稿日期：2023-11-07；修回日期：2023-12-14）

运用《辅行诀》所载“汤液经法图”理论开展中药治疗痹证的药学监护及干预 1 例

于琪[1]，郭红叶[2]，高婷婷[3]，刘南阳[2]，金锐[2*]（1. 北京市海淀医院，北京 100080；2. 中国中医科学院西苑医院，北京 100091；3. 内蒙古自治区人民医院，呼和浩特 010010）

摘要：《辅行诀》所载“汤液经法图”展示了一套以五脏虚实辨证结合五味补泻治疗为基础的辨证论治体系，体现了中医组方配伍的根本原理，可用于中药饮片处方审核和临床药师药学会诊。本文记载 1 例中药临床药师运用“汤液经法图”开展药学监护并进行药学干预的案例。患者老年女性，主因反复腰痛 5 余年，加重伴右下肢麻木 2 个月入住院。医师请药师采用“汤液经法图”进行联合会诊分析。药师运用“汤液经法图”理论体系，判定该患者为肝虚合并肾虚，虚实夹杂，处方应以补肝补肾为主，补泻兼施，药味以辛、苦为主，酸、甘为辅，并与医师联合拟定中药饮片处方一首，患者用药后治疗效果满意，出院后药学随访效果满意。此案例提示，临床药师运用“汤液经法图”开展中药饮片处方的药学评价和药学监护是可行的和有效的。

关键词：汤液经法图；中药；药学监护；临床药师；辅行诀

中图分类号：R963，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0592-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.007

Pharmaceutical care for one patient with paralysis based on “Tang-ye-jing-fa map” in *Fuxingjue*

YU Qi[1], GUO Hong-ye[2], GAO Ting-ting[3], LIU Nan-yang[2], JIN Rui[2*] (1. *Beijing Haidian Hospital*, *Beijing* 100080; 2. *Xiyuan Hospital*, *Chinese Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100091; 3. *People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region*, *Hohhot* 010010)

Abstract: “Tang-ye-jing-fa map” in the *Fuxingjue* displays a syndrome differentiation and treatment system based on the deficiency or excessiveness of five major organs together with five major flavors. It reflects the fundamental principles of traditional Chinese medicine (TCM) formula compatibility and can be used for the review of TCM decoction prescriptions and clinical pharmacist consultations. This article reported a case of TCM clinical pharmacists using the “Tang-ye-jing-fa map” to conduct pharmaceutical intervention. An elderly woman, with repeated lower back pain for more than 5 years, aggravated with numbness in the right lower limb for 2 months was hospitalized. The doctor asked pharmacist to join the consultation with the help of “Tang-ye-jing-fa map”. The pharmacist determined that the main problem of the patient was liver deficiency plus kidney deficiency based on “Tang-ye-jing-fa map” theoretical system. The prescription should focus on tonifing the liver and the kidney, with medicinal flavor being mainly bitter and pungent, supplemented by sour and sweet. Pharmacists and physicians jointly worked out a decoction prescription. The patient showed satisfactory treatment effect after taking the medication, and the follow-up was also satisfactory. It is feasible and effective for clinical pharmacists to use “Tang-ye-jing-fa map” in pharmaceutical intervention of TCM decoction prescriptions.

Key words: Tang-ye-jing-fa map; traditional Chinese medicine; pharmaceutical care; clinical pharmacist; *Fuxingjue*

基金项目：中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目（No.CI2021A03805；No.CI2021A00101）。

作者简介：于琪，女，主管中药师，主要从事中药临床药学研究，email：yuqi_0321@126.com *通信作者：金锐，男，副主任药师，主要从事中医药基本理论与中药临床药学研究，email：jinrui9862@126.com

药学监护是临床药师参与临床治疗的途径。通过药学监护，临床药师对患者的药物治疗方案开展全过程的药学审核与建议指导，运用药学专业知识提升药物治疗的有效性和安全性，提高患者的医疗质量[1-2]。目前，临床中药师已经能够运用中医药基本理论和循证医学思路，参与病例的药学监护与讨论，并将药学监护贯穿在患者药物治疗的全过程，必要时给予干预。

“汤液经法图”原载于《辅行诀五脏用药法要》（简称《辅行诀》）[3]，又称为“五味补泻体用图”，描述了在脏腑辨证框架下，辛、咸、甘、酸、苦五味对各脏腑疾病的补泻作用以及相应的组方结构与配伍原则。“汤液经法图”展示了严密规整的五味与五脏、五味与功效的联系以及固定配伍格式，代表了早期更为接近本原的中药组方配伍原理[4]。所以，临床药师能够运用“汤液经法图”理论参与临床治疗，开展药学监护。

本课题组前期对于“汤液经法图”开展了识方、解方和审方的研究，并尝试还原其中所展示的以五脏虚实辨证和五味补泻治疗为基础的辨证论治方法学体系，结果表明运用“汤液经法图”所示的五脏虚实辨证与五味补泻原理能够解析经方、时方、验方等各种方剂[5-8]。笔者认为，将“汤液经法图”理论（见图 1）运用到临床，不仅能够协助临床医师精准组方，也能为临床药师参与制定治疗方案、预估处方疗效等提供科学有效的方法。本文在现有的研究基础上，运用“汤液经法图”理论体系，以“收集患者症状信息→确定脏腑虚实→制订治法治则→选定主导药味并配伍组方”这一思路，对 1 例痹证患者开展药学监护及干预。

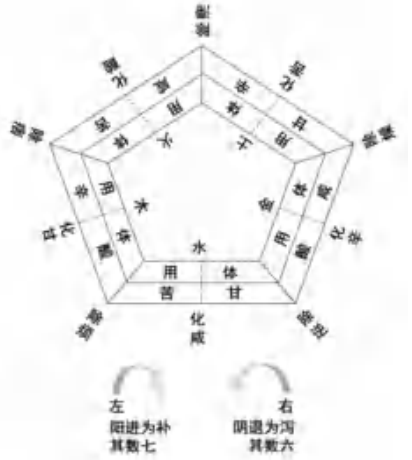


图 1　汤液经法图

Fig 1　Tang-ye-jing-fa map

1　病例概况

患者，女，主因反复腰痛 5 余年，加重伴右下肢麻木 2 个月入院。患者 5 年前因劳累出现腰酸痛，难以俯仰，休息后减轻，当时未予重视，随后腰痛逐渐加重，伴左下肢麻木酸胀，就诊于当地医院，诊断为重度骨质疏松，对症治疗后左下肢麻木基本消失，但腰痛经常反复发作，劳累后加重，间断口服中药（具体药物不详）治疗。2 个月前，患者感染新型冠状病毒后自感腰痛较前明显加重，伴右下肢放射痛、麻木酸胀感，当地医院腰椎 CT 提示：腰椎间盘突出，腰椎管狭窄，予营养神经药及中药汤剂（具体处方不详）治疗效果不明显。入院症见：腰痛，右下肢酸胀痛，麻木，颈部僵硬感，右上肢麻，劳累、受凉后加重，脚底发凉（睡觉穿袜子），头晕，无头痛，心慌，偶有胸闷，平时怕冷，纳可，入睡稍困难，每晚入睡 4 ～ 5 h，二便正常。望：患者精神良好，神志清楚，两目精彩，反应灵敏，面色荣润，呼吸平稳，舌暗红，舌苔薄白；老舌，舌体正常。闻：语音清晰，无咳痰，无呃逆，无特殊气味。切：脉弱，尺沉。中医诊断为：痹证，肝肾不足证。西医诊断为：重度骨质疏松；腰椎间盘突出；腰椎管狭窄。

2　药物治疗经过

患者入院完善检查，结果回报：血常规、凝血功能、急查生化未见明显异常。尿常规、粪便常规未见明显异常。MR 颈椎平扫：① 颈 4/5、5/6 椎间盘后突出；② 颈椎骨质增生。MR 腰椎平扫：① 腰 4/5 椎间盘膨出，继发椎管狭窄；② 腰 4 锥体轻度前滑脱；③ 腰椎骨质增生。颈动脉超声：双侧颈动脉粥样硬化；骨代谢检测：降钙素：0.50 pg • mL^{-1}，总 25- 羟维生素 D：18.14 ng • mL^{-1}；骨密度回示：正位脊柱骨密度 T 值为－ 2.4，关节骨密度 T 值为－ 2.5。

针对此患者，临床采用中西医结合的治法，中药培补肝肾，通筋活络，西药改善骨代谢，促进钙吸收。治疗上予骨化三醇软胶囊 0.25 μg po bid；碳酸钙 D_3 片 1 片 po qd；丹鹿通督片 4 粒 po tid；金天格胶囊 3 粒 po tid；扎冲十三味丸 10 粒 po qd。

同时，给予中药汤剂治疗。中药汤剂以劲骨坚 1 号加减治疗，其组成为骨碎补 15 g、杜仲 12 g、熟地 30 g、山茱萸 10 g、菟丝子 10 g、龟板 15 g、怀牛膝 15 g、枸杞子 10 g。患者希望通过中医药治疗快速改善症状，医师请药师进行联合会诊分析。

药师分析患者病情后，根据“汤液经法图”理论，第一次提出选药组方的药学建议。医师采纳药师建议，将处方完善为：骨碎补 15 g、桂枝 10 g、防风 10 g、秦艽 20 g、川芎 10 g、黄芪 10 g、酒萸肉 20 g、白芍 20 g、生地黄 30 g、醋龟板 10

g、牛膝 15 g、枸杞子 10 g、杜仲 15 g、天麻 10 g、葛根 30 g、煅牡蛎 40 g、蜈蚣 2 条。

患者服药 9 d 后，药师根据患者病情变化，第二次提出药学建议。考虑到中成药多品种联用可能导致补肝肾作用过盛，建议原处方基础上增加酸味、甘味药，以纠正辛味药过盛而导致的补肝作用过强。医师采纳药师意见，将出院带药处方调整为：在原方基础上加入白术 30 g、炒酸枣仁 30 g、百合 30 g、去掉枸杞子 10 g。

患者服药第 15 日（出院第 6 日），药师对患者进行电话回访，患者腰痛、肢体酸胀麻木、脚底凉等症状均未复发（偶有劳累后腰痛，休息后缓解），恶心、口干口黏等症状均有明显好转。

3 运用“汤液经法图”理论体系对患者的用药情况进行分析

与传统的君臣佐使理论不同，“汤液经法图”理论体系是通过五脏虚实辨证和五味补泻治疗来阐释组方配伍原理的，强调五味在处方中的重要性。需要说明的是，“汤液经法图”体系对中药五味的判定来源于中药的五行属性，可能与现有的药味记载不完全相同[8]。本文涉及药味调整的中药见表 1，其中，禹粮土（也称禹余粮）的药味记载来源为《中华本草》第一册（国家中药管理局编委会，1999），珊瑚的药味记载来源为《中华本草》第九册（国家中药管理局编委会，1999）。其余均来源于《中国药典》2020 年版。

表 1 药味调整的中药

Tab 1 Traditional Chinese medicine after taste adjustment

中药	《中国药典》2020 年版记载的药味	“汤液经法图”体系所示主导药味	说明
黄芪	甘	辛、甘	辛补肝，故能用于半身不遂、痹痛麻木；甘补脾，故能用于食少便溏、久泄脱肛
杜仲	甘	苦、辛	苦补肾，故能用于腰膝酸软、筋骨无力；辛补肝，故能用于头晕目眩
丹参	苦	辛、苦	辛补肝，故能用于脘腹胁痛；苦泻心，故能用于热入营血，烦躁不安
鹿角胶	甘、咸	咸	咸润肾，故能用于腰膝酸软、阳痿遗精；咸补心，故能用于精血亏损、阴疽肿痛
禹粮土（禹余粮）	甘*	酸	酸补肺，故能用于涩肠止泻
珍珠	甘、咸	酸	酸收心，故能用于惊悸失眠、惊风癫痫
珊瑚	甘*	酸	酸收心，故能用于惊痫镇心
骨碎补	苦	辛、苦	辛补肝，故能用于筋骨痿软；苦补肾，故能用于肾虚腰痛
生地黄	甘	苦	苦补肾泻心，故能用于热入营血、阴虚发热、骨蒸劳热
龟板（龟甲）	咸、甘	苦、咸	苦补肾，故能用于筋骨痿软；咸补心，故能用于惊悸失眠
枸杞子	甘	苦	苦补肾，故能用于虚劳精亏，腰膝酸痛
蜈蚣	辛	咸、酸	咸补心，故能用于疮疡瘰疬、小儿惊风；酸泻肝，故能用于肝风内动、半身不遂
百合	甘	酸	酸收心，故能用于失眠多梦，精神恍惚

注：*. 来源于《中华本草》。

Note：*means from *Chinese Materia Medica.*

3.1 中成药功效特点的分析

3.1.1 丹鹿通督片 丹鹿通督片是临床上常用的用于治疗腰椎间盘突出症的中成药，具有活血通督、益肾通络的作用。主要成分为黄芪（辛、甘）、杜仲（苦、辛）、丹参（辛、苦）、鹿角胶（咸、辛）、延胡索（辛），用于腰椎管狭窄症（如黄韧带增厚、椎体退行性改变、陈旧性椎间盘突出）属瘀阻督脉型所致的间歇性跛行，腰腿疼痛，活动受限，下肢酸胀疼痛，舌质暗或有瘀斑[9]。

从“汤液经法图”角度分析，丹鹿通督片为“三辛一苦一咸”的配伍结构，主导药味为辛味。其中黄芪辛、甘，补气升阳；延胡索味辛，行气止痛；丹参辛、苦，活血祛瘀；杜仲苦、辛补肝肾强筋骨；鹿角胶咸、辛，益肾填精。辛味药补肝木，苦味药补肾水，咸味药润肾补心，全方以补肝木为主，补肾水为辅（见图 2）。

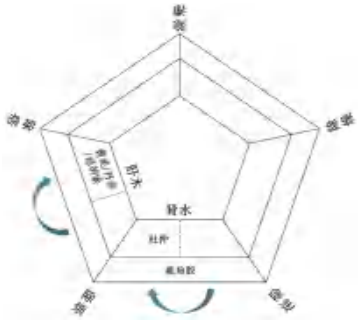


图 2 丹鹿通督片的五味补泻原理示意图

Fig 2 Schematic diagram of Danlu Tongdu tablet

注：箭头方向代表主导功效方向：补肝＋补肾。

Note：The arrow shows the dominant effect：invigorating the liver and the kidney.

3.1.2 扎冲十三味丸 蒙药扎冲十三味丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》（蒙药分册）1998 年版，是由禹粮土（禹余粮）（酸）、制草乌

（辛、苦）、制珍珠（酸）、沉香（辛）、诃子（酸）、煅磁石（咸、酸）、石菖蒲（辛、苦）、制珊瑚（酸）、木香（辛）、麝香（辛）、甘草（甘）、肉豆蔻（辛）、丁香（辛）共 13 味药配伍组成的水丸制剂，具有除“协日乌素”、镇静安神、祛风通窍、舒筋活血的功效，用于左痰右痪、言语不清、手脚麻痹、腿脚不利、口眼歪斜、神经麻痹、半身不遂、筋骨疼痛、关节疼痛、风湿等[10]。

从“汤液经法图”角度分析，扎冲十三味丸为“七辛四酸一咸一甘”的配伍结构，主导药味为辛味。其中制草乌辛、苦，祛风除湿；沉香味辛，行散温通；石菖蒲辛、苦，开窍豁痰；木香味辛，行气止痛；麝香味辛，通经止痛；肉豆蔻味辛，温补脾肾；丁香味辛，补肾助阳；禹粮土味酸，消肿止痛；制珍珠味酸，养阴息风；诃子味酸，开音利咽；制珊瑚味酸，镇静安神；煅磁石味咸、酸，平肝潜阳；甘草味甘，调和诸药。辛味药补肝木，酸味药泻肝收心，甘味药缓肝，咸味药补心火。综合来看，扎冲十三味丸是以补肝兼补心，补泻兼施的治疗方（见图 3）。

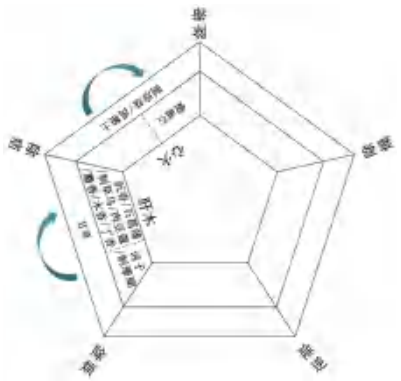


图 3　扎冲十三味丸的五味补泻原理示意图

Fig 3　Schematic diagram of Zhachong Shisanwei pill

注：箭头方向代表主导功效方向：补肝＋补心。

Note：The arrow shows the dominant effect：invigorating the liver and the heart.

3.1.3　金天格胶囊　金天格胶囊的主要成分是人工虎骨粉，具有增加骨密度，提高骨坚韧度的作用，同时还可以有效预防骨质疏松症的发生。由于虎骨被禁止当作药材使用，人工虎骨粉作为虎骨替代用品被研发使用[11]。人工虎骨粉是非保护动物的骨骼，虎骨为猫科动物虎的骨骼，两者的来源不同。《普济方》中记载：“虎骨壮筋骨，强腰脚，祛风寒”。《药品化义》中记载：“《本草》言虎头骨之功与胫同，合养精补血之药，主治精血衰少，腰腿足膝软弱无力，不能行走，或筋骨疼痛，难以屈伸”[11]。从“汤液经法图”角度分析，虎骨药味应以苦味为主，人工虎骨虽与虎骨功能相似，但两者来源有着根本的不同，所以无法对人工虎骨的药味进行判定。

3.2　中药汤剂功效特点的分析

3.2.1　分析病因病机　“汤液经法图”以五脏虚实为辨证框架，以五味补泻为治疗框架[7]。药师以“收集患者症状信息→确定脏腑虚实→制订治法治则→选定药味配伍组方”为思路，首先根据患者症状及四诊信息确定脏腑，再辨脏腑虚实，从而分析出病因病机。患者以腰痛、右下肢酸胀痛麻木、右上肢麻木、脚底发凉、颈部僵硬、头晕、怕冷为主要症状，且在劳累、受凉后加重。《素问·阴阳应象大论》中记载：肾主骨髓。肾藏精，精生骨髓，骨髓充实，骨骼强壮，故骨病在肾。《辅行诀》中记载：“邪在肾，是骨痛，阴痹。虚则腰中痛，大腹小腹痛，尻阴股膝挛，[髀]胻足皆痛”。患者“腰痛、肢体疼痛、颈部僵硬”当属肾水虚病症；兼有头晕、肢体麻木等症，肝为风木之脏，在体合筋，且“诸风掉眩，皆属于肝”，筋失所养，筋急而挛，就会出现腰腿疼痛、四肢麻木等症状，故本患者头晕、肢体麻木等症当属肝木，且虚实夹杂。从藏象学看，肝肾同源，肝为肾之子，肾为肝之母，母病及子，子病及母。故该患者的病因病机为肾虚合并肝虚，同时虚实夹杂之证。

3.2.2　制订治法治则　从“汤液经法图”角度看，五脏虚则补之，实则泻之。《辅行诀》中记载：“肾德在坚，以苦补之，甘泻之，咸润之”“肝德在散，以辛补之，以酸泻之，甘缓之”。本患者肾虚合并肝虚，且虚实夹杂。本着“子能令母实”的原则，该患者当以肝肾同补、补泻兼施的治法治则。处方药味以补肝的辛味药、补肾的苦味药为主导，酸、甘、咸为辅。

3.2.3　汤剂处方分析　“汤液经法图”描述了在脏腑辨证框架下，五味对五脏的补泻作用[11-12]，药师可以运用这一辨证论治体系，先确定疾病脏腑，根据补泻原理，再确定处方主导药味，从而对汤剂处方进行分析。

因此，建议处方结构以辛味药与苦味药为主。医师采纳药师意见，将处方配伍结构完善为“六辛五苦二酸二甘二咸”。辛味药骨碎补、桂枝、防风、秦艽、川芎、黄芪温阳化气行痹、补肝益肾止痛；苦味药生地黄、醋龟板、牛膝、杜仲、枸杞子补肾填精、肝肾同补；酸味药白芍、酒萸肉收敛缓急止痛；甘味药天麻、葛根平肝通络；咸味药牡蛎、蜈蚣通络止痛（见图 4）。患者服用处方 9 d 后，腰痛、右下肢酸胀痛麻木、右上肢麻木、脚底发凉、颈部僵硬、头晕、怕冷等症状均有明显好转。

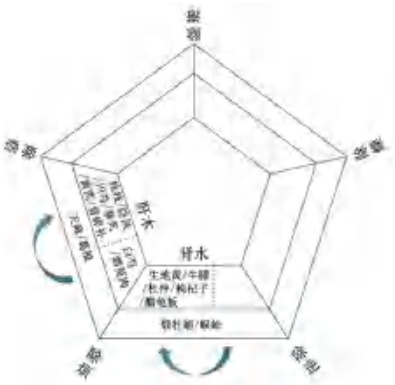


图 4 第一次药学建议处方的五味补泻原理示意图

Fig 4 Schematic diagram of the first pharmaceutical advice

注：箭头方向代表主导功效方向：补肝＋补肾。

Note：The arrow shows the dominant effect：invigorating the liver and the kidney.

第二次药学建议：服用处方 9 d 后，药师发现患者基本症状均好转的同时，舌苔由入院时“舌暗红，舌苔薄白”变为“舌红，舌苔薄黄”，伴口干口黏，大便干。分析其原因主要有三：其一，处方辛苦药味与酸甘药味比例大致为 6∶2，大量的辛苦药味补肝益肾，容易造成其升阳作用过强，这同时也是患者腰腿疼痛麻木等症状好转较快的原因 [13-14]；其二，患者服药第 6 日为二十四节气中的惊蛰，惊蛰节气天气回暖，气温回升迅速，万物进入生长时期，人体的肝阳之气逐步回升 [15]；其三，中成药与汤剂的多品种联用（见图 5）。

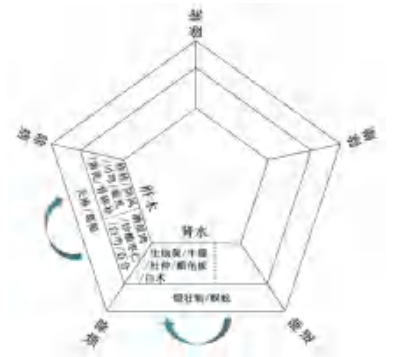


图 5 第二次药学建议处方的五味补泻原理示意图

Fig 5 Schematic diagram of the second pharmaceutical advice

注：箭头方向代表主导功效方向：补肝＋补肾。

Note：The arrow shows the dominant effect：invigorating the liver and the kidney.

综合以上三点，药师建议提升处方中酸甘药味占比，增大酸味药泻肝木、甘味药泻肾水的功效，补泻兼施。医师采纳药师意见，增加酸味药炒酸枣仁、百合，清心安神。同时将苦味药枸杞子更换为白术，润肠通便。

药师电话回访：患者服用汤剂第 15 日（出院第 6 日），对患者进行电话回访，患者腰痛、肢体酸胀麻木、脚底凉等症状均未复发（偶有劳累后腰痛，休息后缓解），恶心、口干口黏等症状均有明显好转。药师电话回访主要内容见表 2。

表 2 药师电话回访主要内容

Tab 2 Content of pharmacist phone follow-up

药师询问内容	患者回答内容
是否规律服用汤剂	是
是否有腰痛、腿疼以及麻木	否
是否有腹痛、胃部不适	否
是否有睡眠障碍	否
脚下有凉风感（睡觉是否穿袜子）	否
是否有口干、口渴	偶有口干
是否有无食欲、恶心欲呕	否
大便状态	香蕉便，1 ～ 2 次 • d^{-1}
其他症状	偶有心慌，1 ～ 2 次 • d^{-1}

4 讨论

4.1 基于“汤液经法图”理论体系的药学监护思路

“汤液经法图”展示了一种严谨的中药复方与适应证的关联关系 [1]。在确定疾病脏腑之后，根据治法治则，结合五味的补泻属性和中药的具体功效，确定全方的主导药味以及药味配伍结构，从而确定处方。有两点值得注意：

第一：“汤液经法图”所记载的五味与五脏的配属关系，不同于我们一般认为的一个药味对应一个脏腑，“汤液经法图”所展示的是三个药味对应一个脏腑，如辛补肝、酸泻肝、甘缓肝，再如咸补心、苦泻心、酸收心。那么一个药味也就对应三个脏腑，如酸味药既能泻肝、收心又能补肺，咸味药既能补心、泻肺又能润肾。这使五味与五脏的关系不再是单一的“一对一”，而是复杂的、立体的并且有规律的。这种严谨的逻辑性展现了全新的五味配伍化合规律，也将五味与五脏之间复杂的联系以公式化的形式展现出来 [12]。

第二：“汤液经法图”中药味的属性与一般认为的药味有出入 [16]，比如《中国药典》2020 年版中，大黄的性味为苦、寒，而在“汤液经法图”体系中，大黄是咸味的。《辅行诀》中的二十五味药精这样记载：“味咸皆属火，旋覆花为之主。大黄为木，泽泻为土，厚朴为金，硝石为水。”由此可见，大黄是咸味的。再比如，本文表 1 中列举的药味调整的中药。

基于“汤液经法图”的配伍理论的独特性以及严谨性，笔者认为，“收集患者症状信息→确定脏腑虚实→制订治法治则→选定主导药味并配伍组方”的方法，可以作为中药临床药师开展药学监护的思路。这一思路可以广泛应用到经方、时方和中成药中，为中药临床药师的药学监护工作提供科学的指导依据。

4.2 “汤液经法图”理论体系推动中药药性理论的发展

中药药性理论是中医学基本理论的重要组成部分，其中的五味又是中药药性理论中不可或缺的一部分。历代医家、学者对药物的功用、归经、寒热、升降都极其重视，而对药味的研究还需进一步深入。“汤液经法图”理论体系是中药药性理论的融合，对药物功用的概括是以药味为首，打破了五味与五脏的单一对应关系，将药物的辛、咸、甘、酸、苦分为“体味”“用味”“化味”，使单一药味赋予三种不同药味属性，根据五脏虚实辨证体系，达到对不同脏腑的补泻作用。这种对于药味属性全新的认识可能更接近古代医家遣方用药的思路，因此，开发学习“汤液经法图”能够完善医家、学者对药味属性的认知，推动中药药性理论的发展。

4.3 “汤液经法图”理论体系的临床应用价值

4.3.1 探究经方组方配伍原则，提高临床疗效

《伤寒杂病论》是我国第一部临床治疗学方面的巨著，对后世医学的发展起到了巨大的推进作用。其经方配伍严谨，方简力宏，至今仍为临床时组方配伍的依据。《辅行诀》中记载：“汉晋以还，诸名医辈，张机、卫汜、华元化、吴普、皇甫玄晏、支法师、葛稚川、范将军等，皆当代名贤，咸师式此《汤液经法》，愍救疾苦，造福含灵”。张机撰《伤寒论》记载：“避道家之称，故其方皆非正名也，但以某药名之，亦推主为识之义耳”。由此可见，《伤寒杂病论》中的经方用药配伍原则，来源于《汤液经法》[17]。因此，笔者认为，深入研究代表《汤液经法》关键原理的“汤液经法图”，有助于医家、学者探究仲景组方之意，从而提高临床疗效。

4.3.2 为临床药师把控处方方向提供理论依据

目前，医院药学服务正处于转型时期，临床药师参与“以病人为中心”的药学专业技术服务已经成为我国临床药学发展的趋势，提升临床药师核心胜任力是亟需解决的问题。临床药师作为医疗团队中的一员，应最大化发挥其作用[18]。开展药学监护是临床药师参与临床的直接着手点，而中药临床药师面对的比较困难的问题就是对中药汤剂处方的整体分析与把控，“汤液经法图”理论体系恰恰提供了这样的科学依据，中药临床药师可以运用“汤液经法图”理论体系所展示出来的五脏虚实辨证体系与五味化合原则，对中药汤剂处方作出分析，并能有效地预估处方疗效、提出合理化建议，真正起到服务临床、服务患者的作用。

参考文献

[1] 杨寿圆，龚宗玉，王华阳，等 . 运用《辅行诀》所载“汤液经法图”理论开展中药汤剂治疗消渴病的药学监护 1 例 [J]. 医药导报，2023，42（4）：496-502.

[2] 赵琳琳，万磊，晋霞 . 临床中药师对 1 例中西医结合治疗骨关节炎患者的药学监护 [J]. 临床合理用药杂志，2022，15（19）：156-159.

[3] 张大昌，钱超尘 . 辅行诀五脏用药法要传承集 [M]. 北京：学苑出版社，2008.

[4] 金锐 .“汤液经法图”系列研究之一：汤液经法图的来历、内容与应用 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2020，22（8）：2954-2960.

[5] 王彬，金锐，刘静，等 . 过敏性鼻炎不同证型治疗方的药味配伍共性特点研究 [J]. 医药导报，2023，42（4）：488-495.

[6] 金锐，李凡 .《辅行诀》所载“汤液经法图”蕴含的中药药性理论新内容探析 [J]. 医药导报，2023，42（4）：479-483.

[7] 王宇光，金锐 .“汤液经法图”系列研究之三：25 味药精五行属性内涵的探索性研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（2）：385-390.

[8] 郭红叶，田佳鑫，张爽等 . 基于《辅行诀》所载“汤液经法图”解析心病治疗的经方时方与医案 [J]. 医药导报，2023，42（4）：472-478.

[9] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：717.

[10] 鲁尔，陈红梅，刘小伟，等 . 蒙药经典方扎冲十三味丸的方解、方源、药理与临床应用 [J]. 世界中医药，2021，16（14）：2177-2182.

[11] 张殿银，刘菲菲 . 金天格胶囊促进骨折术后愈合的临床疗效分析 [J]. 内蒙古中医药，2017，36（17）：13.

[12] 金锐，郭红叶，田佳鑫 .《辅行诀》所载“汤液经法图”体系中五脏虚实辨证的四诊信息库构建和判别模型研究 [J]. 医药导报，2023，42（4）：464-471.

[13] 李万云，殷世鹏，王兴鸿 . 运用敦煌医方大补肾汤治疗肝肾亏虚型腰椎间盘突出症的经验总结 [J]. 中西医结合研究，2020，12（6）：416-417，425.

[14] 叶子丰，匡浩铭，沈琳玲，等 . 基于“阴平阳秘”理论探讨六味地黄丸、肾气丸防治绝经后骨质疏松症 [J]. 风湿病与关节炎，2023，12（1）：47-49，58.

[15] 代金刚，田思玮，张明亮，等 . 基于天人合一理论的二十四节气中医导引法研究 [J]. 中医药学报，2019，47（6）：1-4.

[16] 金锐 . 汤液经法图讲记 [M]. 北京：北京科学技术出版社，2022：12-45.

[17] 金锐 .“汤液经法图”系列研究之二：基于五味补泻理论的 10 首经方配伍原理解析 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2020，22（8）：2961-2968.

[18] 中国医学科学院北京协和医院，美国中华医学基金会，中国医院协会药事专业委员会 . 中国临床药师核心胜任力框架专家共识（2023）[J]. 协和医学杂志，2023，14（2）：257-265.

（收稿日期：2023-11-02；修回日期：2023-12-20）

研究论文

雷公藤甲素调控 nSMase2-Cer 鞘脂代谢信号通路发挥抗胰腺癌的作用及其相关机制研究

唐科[1, 2]，罗余琴[1, 2]，谭亲友[1, 2, 3*]（1. 桂林医学院附属医院临床药学与临床药理学教研室，广西 桂林 541001；2. 桂林医学院药学院，广西 桂林 541199；3. 中美健康与疾病脂质研究中心，广西 桂林 541001）

摘要：目的 探究雷公藤甲素抑制胰腺癌细胞系 PANC-1 细胞增殖的作用机制，揭示其抗胰腺癌的作用与神经鞘脂之间的相互联系。**方法** 用不同浓度梯度的雷公藤甲素处理胰腺癌 PANC-1 细胞后，检测细胞增殖、迁移能力及凋亡情况。通过 PCR array 实验筛选给药后 PANC-1 细胞上有变化的神经鞘脂基因，并通过 q-PCR 和 Western blot 实验验证所筛选基因的转录翻译情况。构建 PANC-1 细胞相关基因的过表达模型并进行细胞功能性实验验证。Western blot 实验检测瞬时转染的 PANC-1 细胞给药前后及不同药物浓度下 nSMase2 蛋白水平的变化及 Caspase-3 蛋白水平的变化。免疫荧光实验检测不同药物梯度和过表达模型下神经酰胺（Cer）含量的变化。建立 BALB/C 裸鼠 PANC-1 皮下成瘤模型，在体内验证雷公藤甲素对裸鼠肿瘤大小的影响。提取肿瘤组织进行 Western blot 实验，肝组织进行 HE 染色实验。**结果** 雷公藤甲素呈浓度梯度抑制 PANC-1 细胞的增殖、迁移能力并促进细胞凋亡。神经鞘脂相关基因 *SMPD3* 与雷公藤甲素抑制 PANC-1 细胞活力相关性最强，且雷公藤甲素可下调其在 PANC-1 细胞中的表达。过表达 *SMPD3* 后 PANC-1 细胞增殖、迁移能力明显增强，细胞凋亡减少。雷公藤甲素可促使 PANC-1 细胞内 Cer 含量的升高，而过表达 *SMPD3* 后是可以降低 PANC-1 细胞内 Cer 的含量，此外，雷公藤甲素还能够促进 PANC-1 细胞 Caspase 家族蛋白 Caspase-3 表达的上调。体内实验表明雷公藤甲素能够下调 SMPD3 蛋白的表达，促进 Caspase-3 活化进而促进肿瘤发生细胞凋亡，发挥抑制裸鼠体内肿瘤生长的作用。**结论** 体内外实验均表明雷公藤甲素通过下调 *SMPD3* 的表达，影响 nSMase2-Cer 信号通路抑制 PANC-1 细胞的生长。

关键词：雷公藤甲素；PANC-1 细胞；中性鞘磷脂酶 2；细胞凋亡
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0598-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.008

Triptolide regulates nSMase2-Cer sphingolipid metabolism signal pathway against-pancreatic cancer and its related mechanism

TANG Ke[1, 2], LUO Yu-qin[1, 2], TAN Qin-you[1, 2, 3*] (1. *Department of Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology*, *Affiliated Hospital of Guilin Medical College*, *Guilin Guangxi* 541001; 2. *School of Pharmacy*, *Guilin Medical College*, *Guilin Guangxi* 541199; 3. *China-US Lipid Research Center for Health and Diseases*, *Guilin Guangxi* 541001)

Abstract: Objective To determine the mechanism of triptolide inhibiting the growth and proliferation of pancreatic cancer (PAC) cell line PANC-1, and to reveal the interaction between triptolide anti-PAC effect and neurosphingolipids. **Methods** Different concentrations of gradients of triptolide were used

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82160765）；广西自然科学基金面上项目（No.2018GXNSFAA050147）；广西研究生教育创新计划项目（No.YCSW2023415）。
作者简介：唐科，男，硕士研究生，主要从事临床药学、体内药物分析及临床药物动力学研究，email：tk051899@126.com *通信作者：谭亲友，男，教授，硕士研究生导师，主要从事中药药理及临床药物动力学研究，email：tqy1013@126.com

to treat PANC-1 cells, and the proliferation, migration and apoptosis of cells were detected after drug treatment. The changes of neurosphingolipid genes in PANC-1 cells after the treatment were screened by PCR array, and the transcription and translation of the genes screened by PCR array were verified by q-PCR and Western blot. The overexpression model of related genes in PANC-1 cells was constructed and verified by cell function experiment. The changes of nSMase2 protein level and Caspase-3 protein level in transiently transfected PANC-1 cells before and after the treatment and at different drug concentrations were detected by Western blot. The changes of ceramide (Cer) with different drug gradients and in the overexpression model were detected by immunofluorescence test. The subcutaneous tumorigenic model of PANC-1 in BALB/C nude mice was established, and the effect of triptolide on the tumor size in nude mice was verified in vivo. The tumor tissue was extracted for Western blot, and the liver tissue was stained with HE. **Results** Triptolide inhibited the proliferation, and migration and promoted the apoptosis of PANC-1 cells in a concentration gradient manner. The inhibition of triptolide on PANC-1 cell viability was most related to *SMPD3* gene, and triptolide down-regulated its expression in PANC-1 cells. After overexpression of *SMPD3*, the proliferation and migration of PANC-1 cells were significantly enhanced, and the apoptosis was decreased. Triptolide promoted the increase of Cer ceramide content in PANC-1 cells, while overexpression of *SMPD3* reduced the content of Cer in PANC-1 cells. In addition, triptolide up-regulated Caspase-3 expression in PANC-1 cells. In vivo experiments showed that triptolide down-regulated the expression of SMPD3 protein to promote the activation of Caspase-3 and further promote tumorigenesis and apoptosis to inhibit the tumor growth in nude mice. **Conclusion** In vivo and in vitro experiments show that triptolide inhibits the growth of PANC-1 cells by down-regulating the expression of *SMPD3* and affecting the neutral sphingomyelin enzyme 2 (nSMase2-Cer) signaling pathway.

Key words: triptolide; PANC-1 cell; neutral sphingomyelin enzyme 2; cell apoptosis

胰腺癌是恶性的肿瘤之一，我国每年超过 33 万人死于胰腺癌 [1]。胰腺癌作为一种恶性程度极高的消化道肿瘤，根治性手术是目前最为有效的治疗手段，但由于早期诊断不易，多数患者确诊时已是晚期，治疗难度极大 [2]。因此，寻找高效低毒的药物及新的治疗靶点是胰腺癌治疗迫切需要解决的问题。

鞘脂被认为是真核生物细胞膜结构的基本组成部分，其中一些在细胞生物学中发挥着关键作用 [3]。目前研究最广泛的生物活性鞘脂包括神经酰胺（Cer）、二氢神经酰胺和鞘氨醇 1- 磷酸等 [4]。神经酰胺是神经鞘脂代谢的中心枢纽，是复杂神经鞘脂的前体，可诱导细胞周期阻滞，促进细胞凋亡和炎症等 [5]。神经酰胺还与多种病理有关，包括肿瘤的发生发展 [6-9]。鞘磷脂酶（sphingophospholipase，SMase）是鞘脂代谢中关键的活性酶之一，根据 pH 值的不同可将 SMase 划分为酸性鞘磷脂酶（acid sphingomyelinase，aSMase）、中性鞘磷脂酶（neutral sphingophospholipase，nSMase）和碱性鞘磷脂酶（alkaline sphingomyelinase，alkSMase）。在这些 SMases 中，nSMase、aSMase 与肿瘤的关系更为密切 [10]，其中 nSMase 有四个亚型，分别是 nSMase1、nSMase2、nSMase3 和线粒体相关 nSMase（mitochondrial related sphingophospholipase，MA-nSMase）。目前，研究报道 *SMPD3* 基因编码的亚型——nSMase2 与肿瘤的发生发展最为密切，是一个具有前景的肿瘤治疗靶点 [11]。

雷公藤甲素（TP）是从中草药雷公藤的根中纯化得到的一种化合物 [12]，具有广谱的生物活性，包括抗肿瘤和免疫抑制作用 [13]。雷公藤甲素已在各种实验模型中表现出良好的抗肿瘤活性 [14]。体外和在体研究表明，雷公藤甲素可通过调控鞘脂代谢来抑制胰腺癌、乳腺癌、胆管癌等多种肿瘤细胞的增殖，促进细胞凋亡 [15-22]，但相关机制尚不清晰。

综上，本探究将深入研究雷公藤甲素对胰腺癌的抑制作用，并深入探讨雷公藤甲素对胰腺癌的抑制作用与神经鞘脂之间的相关机制，以发掘新的靶点。此外，本研究还通过体内裸鼠成瘤实验来进一步验证雷公藤甲素调控鞘脂代谢通路发挥治疗胰腺癌的作用机制。

1　仪器与试药

1.1 仪器

普通离心机、低温超高速离心机（德国 Eppendorf）；蛋白质电泳及转膜装置、Milli-Q 纯水仪、Western blot 凝胶电泳仪、Western blot 转膜仪（Bio-Rad）；37 ℃细胞孵育箱、酶标仪（美国 Thermo 公司）；96 孔 PCR 仪（Applied Biosystems 公司）；流式细胞分析仪（Invitrogen）；二氧化碳细胞培养箱（美国 Thermo Electron）；荧光显微镜（Olympus）。

1.2 试药

DMEM 基础培养基、胎牛血清（Gibico 公司）；二甲基亚砜（DMSO，Sigma-Aldrich 公司）；Permeabilization 缓冲液（10×）、Detection kit FITC 试剂盒（eBioscience 公司）；Anti-Human nSMase2、Anti-Human Caspase-3、ECL 灵敏发光试剂盒（美国 Abcam 公司）；高效逆转录试剂盒 TRIzol（TaKaRa 公司）；小鼠抗 β-actin 单抗、山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗（中杉金桥公司）；四甲基乙二胺（TEMED）、十二烷基硫酸铵（SDS）、甘氨酸（Invitrogen 公司）；过硫酸铵（Aladdin 公司）；彩虹蛋白 Marker（广西卓一生物技术有限公司）；BCA 蛋白定量试剂盒（碧云天公司）。高效逆转录试剂盒 TRIzol、TaKaRa（PerfectReal Time） 和 TaKaRaTB Green Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒（TaKaRa 公司）。

1.3 实验动物

BALB/C 裸鼠（合格证号：430727231100690867），雄性，4 ～ 5 周龄，体重 18 ～ 20 g[江苏集萃药康生物科技股份有限公司，实验遵循广西动物实验伦理会指导原则]。饲养环境：相对湿度为 50% ～ 60%，室温控制在（22±2）℃，昼夜节律光照。

2 方法

2.1 细胞培养

PANC-1 为贴壁细胞购于中科院细胞库，完全培养基（由10% 胎牛血清、1% 青霉素 / 链霉素及 89% 的 DMEM 基础培养基组成）培养，置于 5%CO_2、37 ℃培养箱中培养，2 ～ 3 d 换液。待细胞密度达到 80% 左右且细胞状态良好时用含乙二胺四乙醇（EDTA）的胰酶消化下来用于后续实验。

2.2 细胞增殖实验

将细胞重悬调整密度为每 100 μL 含 1×10^3 个细胞接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，过夜待细胞贴壁后，分别用 0（Control 组）、15、30、60 nmol • L^{-1} 雷公藤甲素处理细胞，溶剂组（DMSO）作为阴性对照，每组设置 4 个复孔。培养 24、48、72 h 后弃含药培养基，加入 100 μL 的含 10% CCK-8 的培养基，酶标仪 $\lambda_{450\,nm}$ 测吸光度。并根据吸光度计算各组的抑制率，确定药物作用的最佳时间与最适给药浓度。

2.3 克隆形成实验

将 PANC-1 细胞以 1×10^3 个细胞每孔的密度接种在 6 孔板中。培养 24 h 后，将培养基改为新鲜的完全培养基后，细胞用不同剂量的雷公藤甲素处理 48 h，然后用新鲜培养基培养两周。两周后 6 孔板每孔用 4% 多聚甲醛固定，并用 0.1% 结晶紫染色观察。

2.4 细胞划痕愈合实验测定 PANC-1 细胞横向迁移能力

将 PANC-1 细胞接种于 6 孔板内，过夜待细胞贴壁长至 95% 左右。用 200 μL 移液枪枪头进行划痕后分别用无血清培养基配制不同浓度的药物并加入相应的处理孔中，并于 0、24 h 显微镜下拍照记录划痕愈合面积。

2.5 Transwell 实验测定 PANC-1 细胞纵向迁移能力及侵袭能力

收集 6 孔板中给药处理过的细胞，用无血清培养基将细胞密度调整为 4×10^5 个 • mL^{-1}，然后在 Transwell 小室下室中加入 20% 血清的完全培养基，上室内每孔取相应组别的细胞悬液缓慢加入。24 h 后将 Transwells 小室用 4% 多聚甲醛固定，结晶紫染色，倒置显微镜拍照，记录实验结果。

2.6 细胞凋亡检测实验

用不同浓度雷公藤甲素处理细胞 48 h 后，收集，离心后弃上清液，每管加入 200 μL 超纯水将 10×Binding buffer 稀释成 1× 的工作液重悬细胞，转移至干净的 1.5 mL 的 EP 管内，1500 r • min^{-1} 离心 3 min；弃上清液，再加入 200 μL 稀释的工作液重悬细胞；加入 5 μL Annexin V-FITC，避光染色 15 min；上机前 5 min 加入 5 μL PI 避光染色。

2.7 PCR 实验

用 30 nmol • L^{-1} 雷公藤甲素作用 48 h 后的 PANC-1 细胞用 Trizol 法提 RNA，并用紫外可见分光光度计测定 RNA 纯度，将质量和纯度合格的 RNA 使用 TaKaRa（Perfect Real Time）和 TaKaRa TB Green Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒进行逆转录。

2.8 q-PCR 实验

将 PCR array 筛选出的变化值大于 4 的相应的鞘脂基因进行逆转录，反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等，以 *GAPDH* 作为对照，采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因 mRNA 的相对表达量，引物序列见表 1。

2.9 Western blot 实验

给药处理后的细胞用 RIPA 缓冲液裂解，通过离心机收集上清液，BCA 试剂盒测定含量。细胞蛋白（50 μg/ 样品）通过 10%SDS-PAGE 分离，并转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% 脱脂乳封闭 1 h，

表 1　q-PCR 引物序列

Tab 1　q-PCR primer sequence

名称	上游引物（5'-3'）	下游引物（3'-5'）
CERS3	GGATCACGATGGACTC-GTCTT	GGTTGCCTTGTGGAAT-GTTTGA
FAAH2	CATAGGCTTAGTAGGC-CGAGC	CTTTCTCTGTCGGAT-CAGCTTG
SMPD3	GCTGCCCTTTGC-GTTTCTC	TCCAGCCGTGAATAGATG-TAGG
ASAH2	GTGCCTTTAACCCCA-GAGTCT	GTGCAGTCAGCTCGTC-CAA
GAPDH	CAGGAGGCATTGCTGAT-GAT	GAAGGCTGGGGCTCATTT

然后与一级抗体在 4 ℃下孵育过夜。用洗涤缓冲液洗涤膜 3 次（每次洗涤 10 min），然后与二级抗体在 37 ℃下孵育 1 h 后使用 ECL 检测系统检测。

2.10　瞬时转染构建过表达的 *SMPD3* 模型

将生长状态良好的 PANC-1 细胞，消化重悬后以密度在 70% 左右（8×10^5 个 • mL^{-1}）接种于 6 孔板内，过夜待细胞贴壁后，使用赛默飞 lip3000 进行转染。待转染 8 ～ 16 h 后，更换含 10%FBS 的培养基，培养 48 h 后进行 q-PCR 和 Western blot 实验验证转染效果。

2.11　免疫荧光检测神经酰胺表达量实验

用 4% 多聚甲醛在 37 ℃下固定细胞 60 min，然后用 0.1%Triton X-100 透化 10 min。用 5% 胎牛血清室温封闭 30 min，然后在 4 ℃下与指示的一级抗体一起孵育过夜。用 TBST 洗净未结合一抗后在 37 ℃下与 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 孵育 1 h。细胞核用 DAPI 复染后，在倒置荧光显微镜下拍摄荧光图像。

2.12　动物模型的建立及给药分组

取雄性 BALB/C 裸鼠，右前肢腋下皮下接种 PANC-1 细胞，每只裸鼠接种的细胞密度为 100 μL 细胞悬液含 2.5×10^6 个细胞，接种剂量为每只裸鼠 100 μL，20 d 左右瘤体长至黄豆体积大小，开始进行药物干预。将成瘤的裸鼠随机分为 3 组，每组 4 只。给药分组为：生理盐水对照组、雷公藤甲素低剂量组（0.4 mg • kg^{-1}）、雷公藤甲素高剂量组（0.8 mg • kg^{-1}）。按照隔日给药的方式进行瘤周皮下注射给药，给药 20 d（10 次）。在第三次给药时，发现高剂量组裸鼠给药部位出现皮肤溃烂的情况，因此第三次给药时低、高浓度组剂量分别调整为 0.3、0.6 mg • kg^{-1}。药物作用 20 d，采用麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠。瘤体组织进行 Western blot 实验，肝脏组织进行苏木精 - 伊红染色实验。最后一次给药途中裸鼠状态不好，有一只死亡，但仍然对其肿瘤组织及肝脏组织进行了 Western blot 及 HE 染色。本研究动物实验均经桂林医学院动物实验伦理会批准，所有动物实验程序符合相关指南和规定。

2.13　数据统计分析

采用统计学软件 SPSS 22.0 进行统计分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组内比较采用单因素方差分析，组间比较采用 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异无统计学意义。

3　结果

3.1　雷公藤甲素浓度依赖性抑制 PANC-1 细胞的增殖及迁移能力

如图 1A 所示，雷公藤甲素呈剂量和时间依赖地抑制了 PANC-1 细胞的增殖。当雷公藤甲素浓度为 30 nmol • L^{-1} 时，作用 48 h 时的抑制率在 50% 左右。因此，后续雷公藤甲素以 15、30、60 nmol • L^{-1} 为给药的低、中、高浓度梯度组，且认为 30 nmol • L^{-1} 为最适药物浓度。如图 1B 所示，随着雷公藤甲素浓度的增加，PANC-1 细胞的克隆形成能力逐渐减弱。如图 1C 和图 1D 所示，雷公藤甲素可呈浓度依赖性抑制 PANC-1 细胞的划痕愈合和迁移能力。

3.2　雷公藤甲素浓度依赖性地促进 PANC-1 细胞凋亡

如图 2 所示，随着雷公藤甲素浓度的增加，PANC-1 细胞凋亡率明显上升，表明雷公藤甲素能够以浓度依赖性促进 PANC-1 细胞凋亡。

3.3　雷公藤甲素下调 *SMPD3* 在 PANC-1 细胞中的表达

雷公藤甲素浓度 30 nmol • L^{-1} 处理 PANC-1 细胞 48 h 后提取 RNA 进行了 PCR 实验，进行鞘脂基因的变化筛选。结果如图 3A 所示，在所有的鞘脂基因中，以 *SMPD3*、*ASAH2*、*CERS3* 和 *FAAH2* 基因相对变化较明显，均出现上调迹象。通过 PubMed 查询上述变化明显的 4 个鞘脂基因的基因 ID，通过 Primer Bank 找到引物序列，设计引物进行 3 次独立平行的 q-PCR 实验，结果如图 3B 所示，*SMPD3* 基因上调变化最为显著。如图 3C 所示，雷公藤甲素可呈剂量依赖性地显著下调 *SMPD3* 在 PANC-1 细胞中的蛋白表达水平。而过表达 *SMPD3* 的 PANC-1 细胞在雷公藤甲素干预下明显抑制了 nSMase2 表达，如图 3D 所示。

3.4　SMPD3 可调节 PANC-1 细胞的增殖、迁移能力

结果如图 4A 所示，*SMPD3* 基因转染细胞株构建成功。如图 4B 和 4C 显示，转染 *SMPD3* 后，细胞的增殖和克隆形成能力增强，且过表达 *SMPD3* 基因后会削弱雷公藤甲素对 PANC-1 细胞的抑制作用。如图 4D 和 4E 所示，过表达 *SMPD3* 后，PANC-1 细胞的划痕愈合及迁移能力也有明显增强。

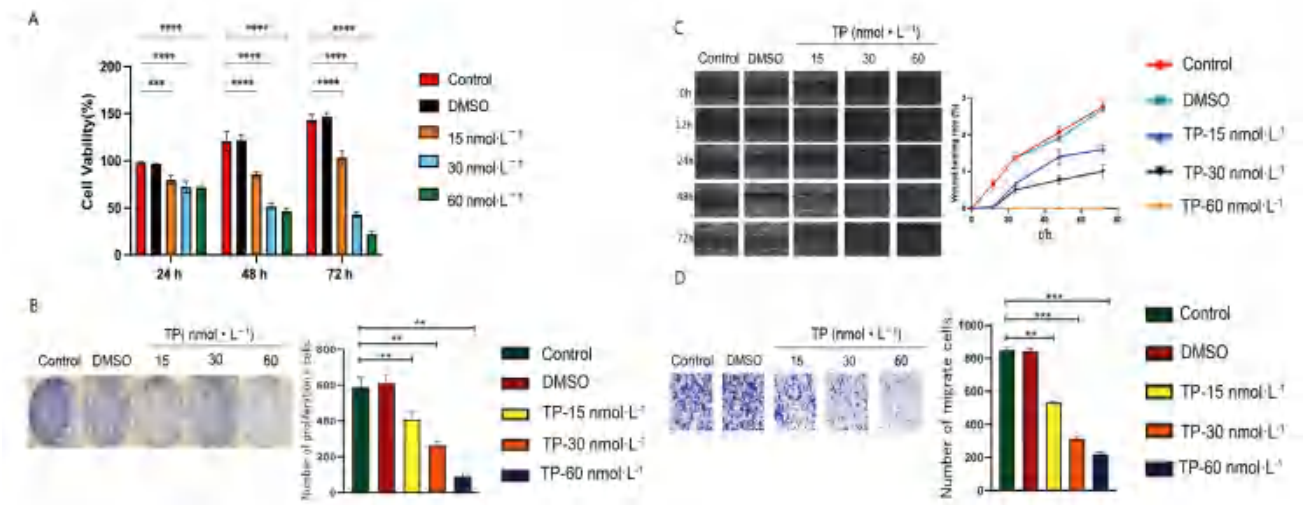


图 1 雷公藤甲素对 PANC-1 细胞增殖、迁移能力的影响（$^{*}P < 0.1$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$）

Fig 1 Effect of triptolide on the proliferation and migration of PANC-1 cells（$^{*}P < 0.1$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$）

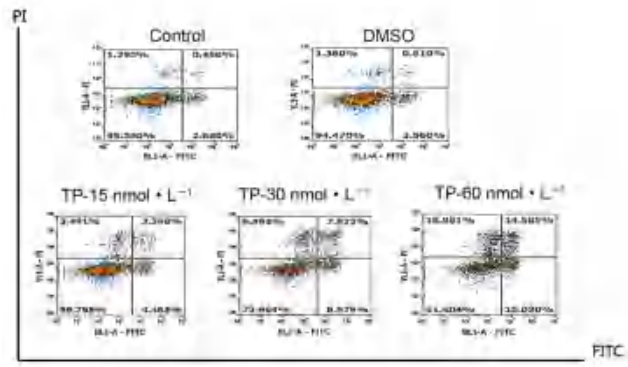


图 2 雷公藤甲素对 PANC-1 细胞凋亡的影响（$^{**}P < 0.01$）

Fig 2 Effect of triptolide on PANC-1 cell apoptosis（$^{**}P < 0.01$）

3.5 *SMPD3* 可抑制雷公藤甲素的促凋亡作用

为了探究 *SMPD3* 与 PANC-1 细胞凋亡的关系，对 PANC-1 细胞进行了 *SMPD3* 过表达后的给药处理。结果如图 5 所示，*SMPD3* 可抑制雷公藤甲素的促凋亡作用。

3.6 *SMPD3* 可下调 PANC-1 细胞内神经酰胺的含量

进一步对给药前后以及过表达模型下给药前后 PANC-1 细胞内神经酰胺含量进行检测，结果如图 6A 和 6B 所示，雷公藤甲素可呈浓度依赖性地上调 PANC-1 细胞内神经酰胺的含量，且过表达 *SMPD3* 后，雷公藤甲素的上调能力减弱。

3.7 *SMPD3* 可下调 PANC-1 细胞内 Caspase-3 的表达

Western blot 实验结果如图 7A 和 7B 所示，雷公藤甲素可呈浓度依赖性地上调 PANC-1 细胞 Caspase-3 的表达，而过表达 *SMPD3* 模型可降低 PANC-1 细胞内 Caspase-3 的水平。

3.8 动物实验结果

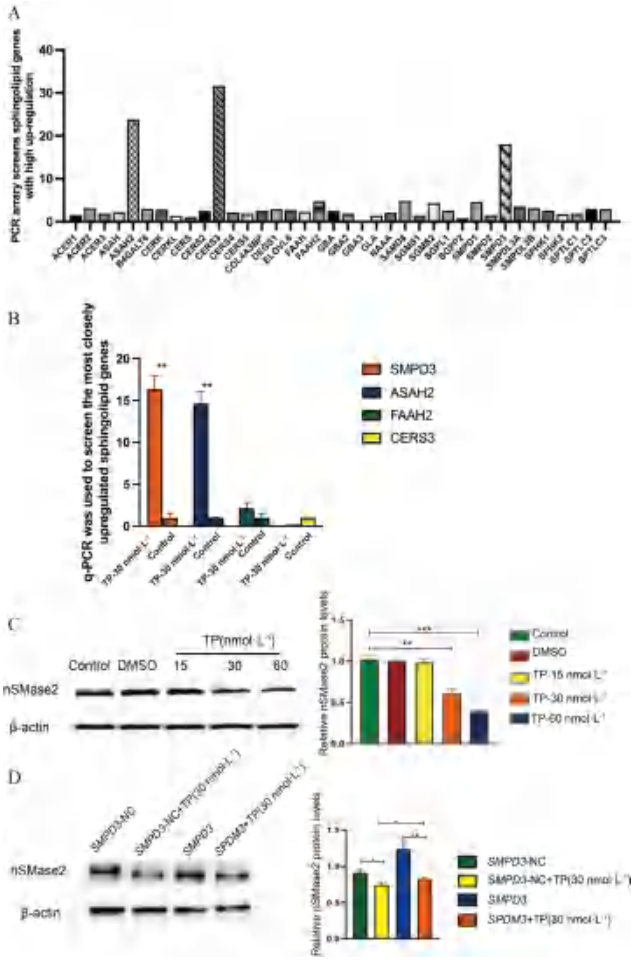


图 3 雷公藤甲素对 PANC-1 细胞相关鞘脂基因变化的影响（$^{*}P < 0.1$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 3 Effect of triptolide on the sphingolipid gene in PANC-1 cells（$^{*}P < 0.1$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

3.8.1 雷公藤甲素对 BALB/C 裸鼠 PANC-1 细胞腋下瘤体的影响

体内裸鼠实验结果显示雷公藤甲素可明显抑制 BALB/C 裸鼠腋皮下瘤体的生

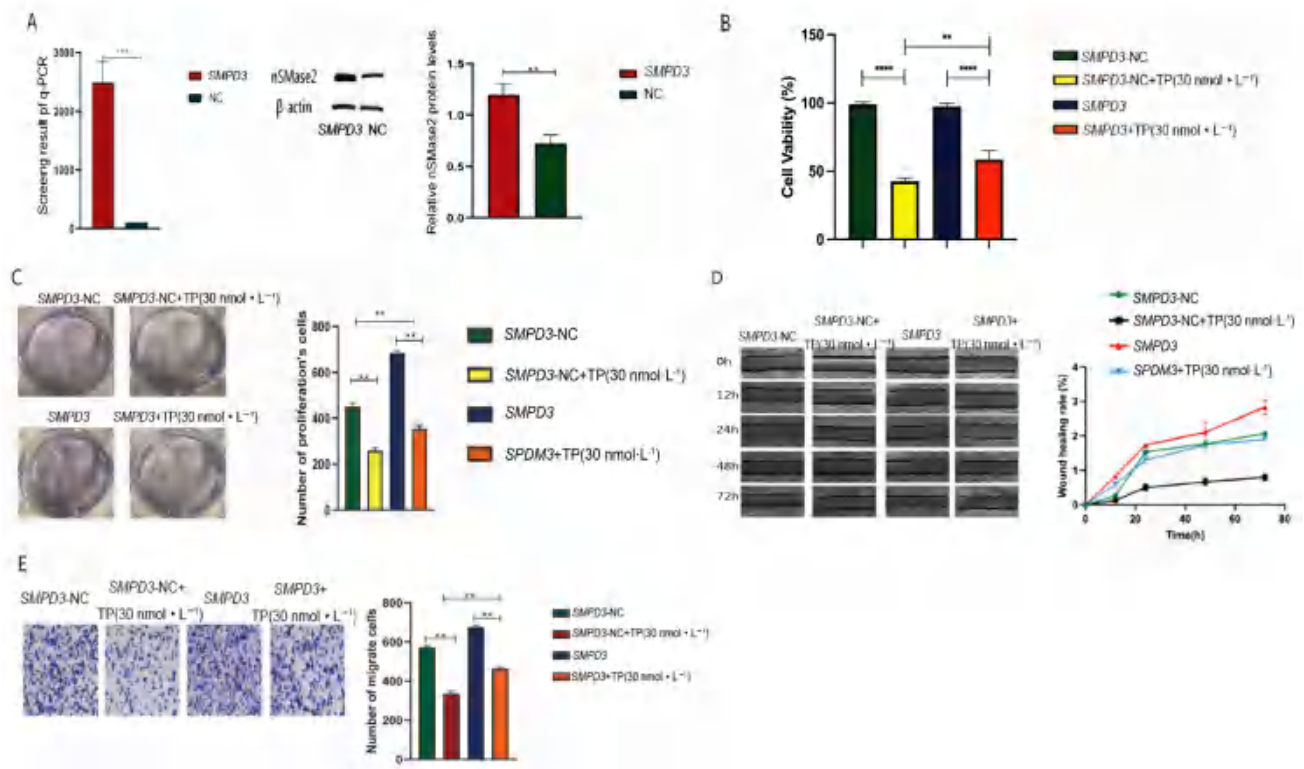


图 4　雷公藤甲素对过表达 *SMPD3* 基因的 PANC-1 细胞增殖、迁移的影响（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 4　Effect of triptolide on the proliferation and migration of PANC-1 cells overexpressing *SMPD3* gene（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

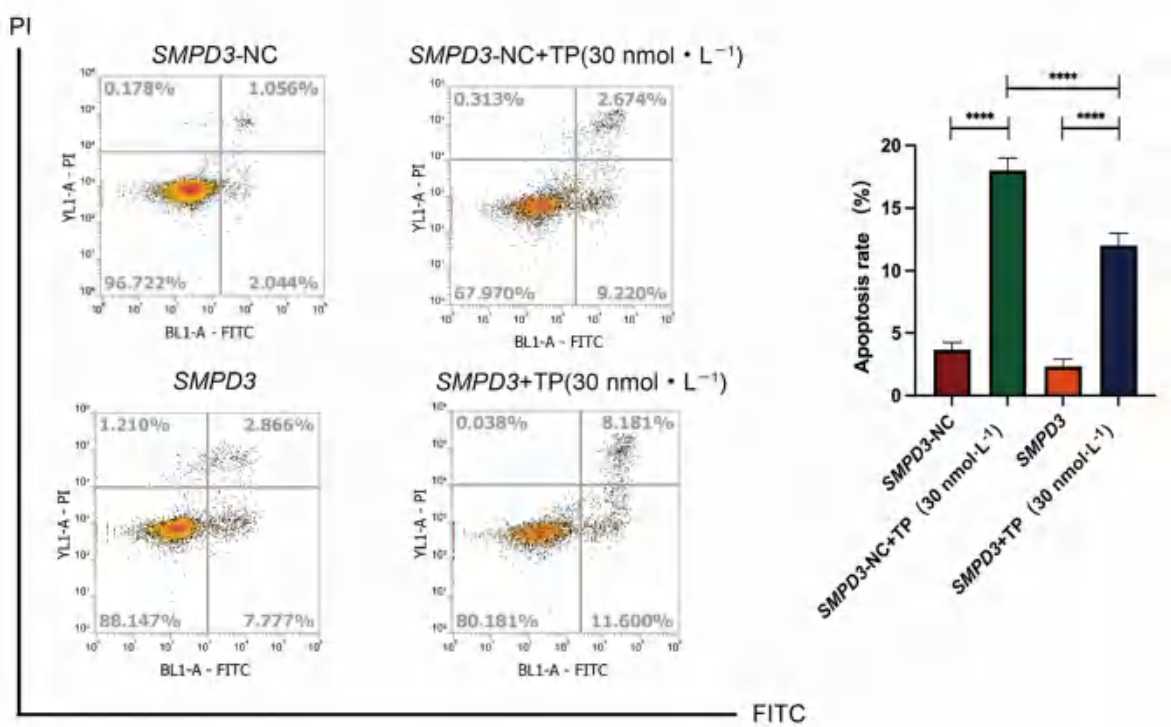


图 5　雷公藤甲素对过表达 *SMPD3* 基因的 PANC-1 细胞凋亡影响（$^{****}P < 0.01$）

Fig 5　Effect of triptolide on the apoptosis of PANC-1 cells overexpressing *SMPD3* gene（$^{****}P < 0.01$）

长，且抑制作用随药物浓度升高而增强，且对裸鼠体重及肝细胞形态无明显影响（见图 8）。

3.8.2　雷公藤甲素对 BALB/C 裸鼠瘤体组织 nSMase2 和 Caspase-3 蛋白的影响　取裸鼠瘤体切块，组织提蛋白法提取蛋白检测 nSMase2 和 Caspase-3 的蛋白表达变化。如图 9A 和 9B 所示，随着雷公藤甲素浓度的增加，nSMase2 表达下调而 Caspase-3 表达上调，且具有剂量依赖性，与体外实验数据趋势一致。

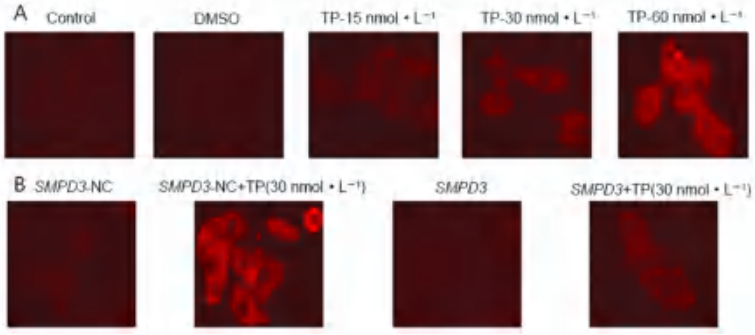


图 6 雷公藤甲素对 PANC-1 细胞及转染 *SMPD3* 基因后的 PANC-1 细胞神经酰胺的影响

Fig 6 Effect of triptolide on the Cer in PANC-1 cells and cells transfected with *SMPD3* gene

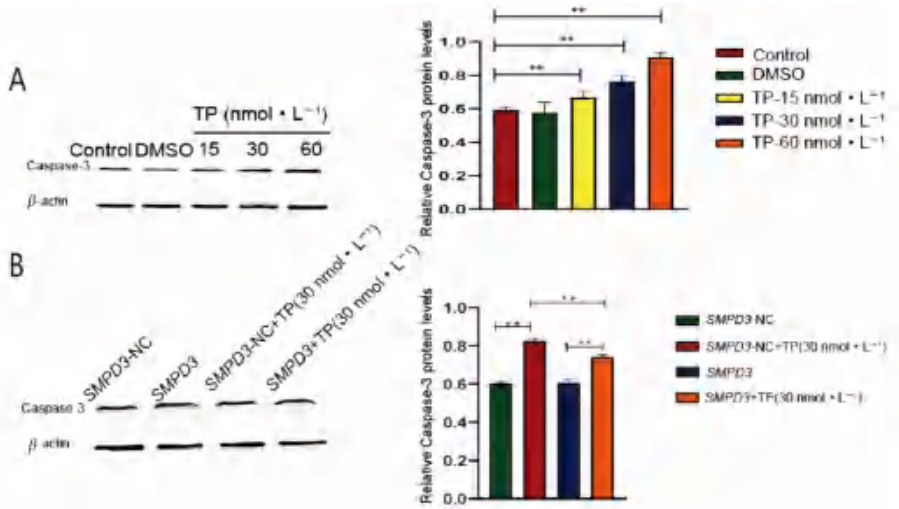


图 7 雷公藤甲素对 PANC-1 细胞以及过表达 *SMPD3* 基因后的 PANC-1 细胞中 Capsae-3 表达影响（$^{**}P < 0.01$）

Fig 7 Effect of triptolide on the Capsae-3 expression in PANC-1 cells and in PANC-1 cells overexpressing *SMPD3* gene（$^{**}P < 0.01$）

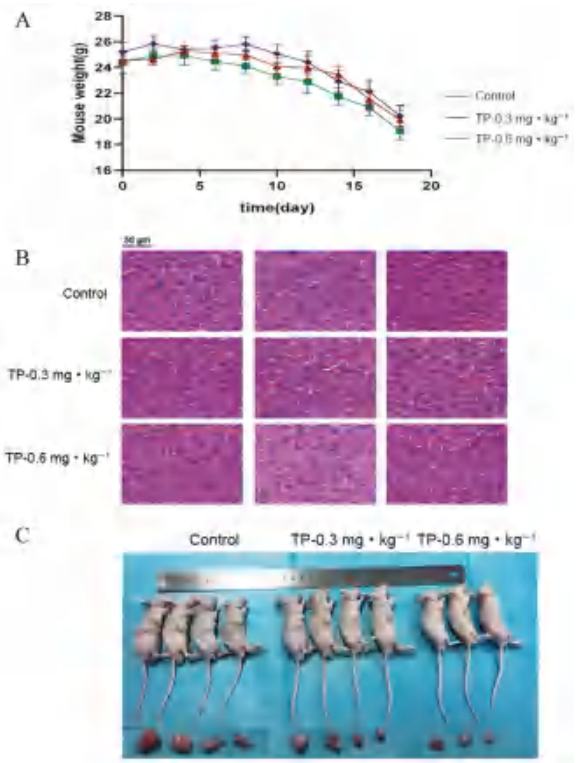


图 8 雷公藤甲素在体内对 PANC-1 细胞的影响

Fig 8 Effect of triptolide on PANC-1 cells in vivo

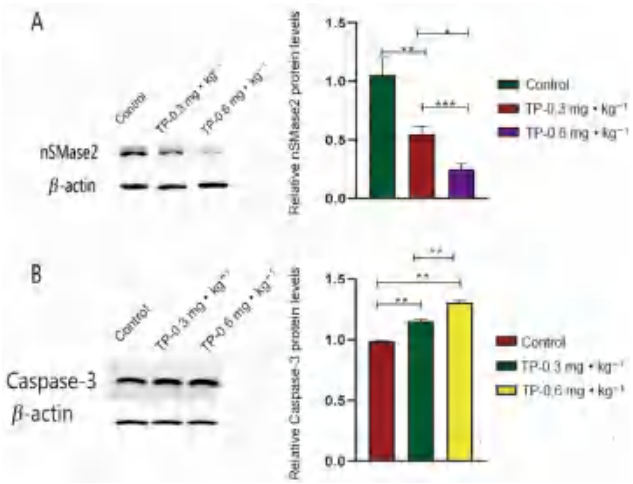


图 9 雷公藤甲素对 PANC-1 细胞荷瘤鼠模型肿瘤组织 nSMase2 及 Caspase-3 蛋白表达影响（$^{*}P < 0.1$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 9 Effect of triptolide on expression of nSMase2 and Caspase-3 protein in PANC-1 tumor bearing mouse model（$^{*}P < 0.1$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

4 讨论

胰腺癌作为一种恶性程度极高的消化道肿瘤，大多数患者确诊时就已处在肿瘤晚期，使得手术预后难以达到预期。越来越多的临床证据表

明，胰腺癌新辅助化疗在改善患者的预后方面效果良好，已成为临床研究的热点课题[1]。雷公藤甲素是一种具有广谱的抗肿瘤作用的天然化合物，且其可以通过多种途径诱导肿瘤细胞发生凋亡。雷公藤甲素在多种肿瘤的治疗上均取得了良好的预期，因此其在发挥抗胰腺癌上也是具有前景的。已有研究表明 nSMase2 是调节炎症、细胞生长和凋亡的重要酶，是治疗肿瘤和神经退行性病变的新靶点。nSMase2 能够发挥抗肿瘤作用的主要原因在于其可导致神经酰胺的产生和 Caspase-3 的活化，促进肿瘤细胞的凋亡。

本研究筛选了雷公藤甲素作用于胰腺癌细胞 PANC-1 后最为密切的鞘脂靶点 *SMPD3*，并对其调控的通路 nSMase-Cer 进行了验证，发现雷公藤甲素能够通过调控 *SMPD3* 影响 nSMase-Cer 通路从而促进 Caspase-3 的激活，进而促进 PANC-1 细胞发生凋亡。此外，本研究还从体内进行了验证，证明了体内外作用及机制的一致性，并且肝脏组织的 HE 染色结果表明，雷公藤甲素没有产生实质性的肝脏组织的损伤，具有一定的安全性。本研究为雷公藤甲素应用于胰腺癌的治疗提供了新的思路，为鞘脂代谢应用于胰腺癌的治疗奠定了基础。

参考文献

[1] Morrison AH，Byrne KT，Vonderheide RH. Immunotherapy and prevention of pancreatic cancer [J]. Trends Cancer，2018，4（6）：418-428.

[2] 奚士航，王小明 . 胰腺癌新辅助化疗的应用现状及进展 [J]. 中国普外基础与临床杂，2020，27（2）：226-231.

[3] Presa N，Gomez LA，Dominguez HA，et al. Role of bioactive sphingolipids in physiology and pathology [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids，2020，1865（4）：158630.

[4] Adan GA，Kartal YM，Iskender G，et al. Novel agents targeting bioactive sphingolipids for the treatment of cancer [J]. Curr Med Chem，2013，20（1）：108-122.

[5] Gomez LA，Das Adhikari U，Aramburu NM，et al. Ceramide metabolism enzymes-therapeutic targets against cancer [J]. Medicina（Kaunas），2021，57（7）：729.

[6] Alonso A，Goñi FM. The physical properties of ceramides in membranes [J]. Annu Rev Biophys，2018，47：633-654.

[7] Duan RD. Alkaline sphingomyelinase（NPP7）in hepatobiliary diseases：a field that needs to be closely studied [J]. World J Hepatol，2018，10（2）：246-253.

[8] Clarke CJ，Mediwala K，Jenkins RW，et al. Neutral sphingomyelinase-2 mediates growth arrest by retinoic acid through modulation of ribosomal S6 kinase [J]. J Biol Chem，2011，286（24）：21565-21576.

[9] Pastukhov O，Schwalm S，Zangemeister WU，et al. The ceramide kinase inhibitor NVP-231 inhibits breast and lung cancer cell proliferation by inducing M phase arrest and subsequent cell death [J]. Br J Pharmacol，2014，171（24）：5829-5844.

[10] Insausti UN，Solsona VE，Garcia RC，et al. Sphingomyelinases and liver diseases [J]. Biomolecules，2020，10（11）：1497.

[11] Airola MV，Shanbhogue P，Shamseddine AA，et al. Structure of human nSMase2 reveals an interdomain allosteric activation mechanism for ceramide generation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2017，114（28）：E5549-E5558.

[12] Huang Y，Wu S，Zhang Y，et al. Antitumor effect of triptolide in T-cell lymphoblastic lymphoma by inhibiting cell viability，invasion，and epithelial-mesenchymal transition via regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Onco Targets Ther，2018，11：769-779.

[13] Wong KF，Yuan Y，Luk JM. Tripterygium wilfordii bioactive compounds as anticancer and anti-inflammatory agents [J]. Clin Exp PharmacolPhysiol，2012，39（3）：311-320.

[14] Wang M，Chen B，Chai L. Triptolide suppresses the proliferation and induces the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells via the PI3K/Akt pathway [J]. Oncol Lett，2019，17（1）：1372-1378.

[15] Lou D，Lou ZJ，Lin YZ，et al. $ATB^{0,+}$-targeted delivery of triptolide prodrugs for safer and more effective pancreatic cancer therapy [J]. Bioorg Med Chem Lett，2021，33：127728.

[16] Zhao X，Liu Z，Ren ZY，et al. Triptolide inhibits pancreatic cancer cell proliferation and migration via down-regulating PLAU based on network pharmacology of Tripterygium wilfordii Hook F [J]. Eur J Pharmacol，2020，880：173225.

[17] Jiang W，Chen MJ，Xiao CC，et al. Triptolide suppresses growth of breast cancer by targeting HMGB1 in vitro and in vivo [J]. Biol Pharm Bull，2019，42（6）：892-899.

[18] He JX，Peng TH，Peng YB，et al. Molecularly engineering triptolide with aptamers for high specificity and cytotoxicity for triple-negative breast cancer [J]. J Am Chem Soc，2020，142（6）：2699-2703.

[19] Gao H，Zhang Y，Dong L，et al. Triptolide induces autophagy and apoptosis through ERK activation in human breast cancer MCF-7 cells [J]. Exp Ther Med，2018，15（4）：3413-3419.

[20] Wang SW，Jiang H，Wang J，et al. Superior in vitro anticancer effect of biomimetic paclitaxel and triptolide co-delivery system in gastric cancer [J]. J Biomed Res，2021，35（4）：327-338.

[21] Qiu HR，Zhang XB，Yu H，et al. Identification of potential targets of triptolide in regulating the tumor microenvironment of stomach adenocarcinoma patients using bioinformatics [J]. Bioengineered，2021，12（1）：4304-4319.

[22] Zhou ZL，Yang YX，Ding J，et al. Triptolide：structural modifications，structure-activity relationships，bioactivities，clinical development and mechanisms [J]. Nat Prod Rep，2012，29（4）：457-475.

（收稿日期：2023-11-02；修回日期：2023-12-26）

漆黄素固体脂质纳米粒的制备及体外释放评价

王浩[1]，孟梦[1]，谢芹芹[1]，何宁[1]，王丹[2]，徐维平[1, 2, 3, 4*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 中国科学技术大学，合肥 230026；3. 安徽省老年医学研究所，中国科学技术大学附属第一医院老年医学科（安徽省立医院），合肥 230001；4. 中国科学技术大学附属第一医院药剂科（安徽省立医院），合肥 230001）

摘要：目的 制备漆黄素固体脂质纳米粒（FIT-SLN），对其进行质量评价并考察其体外释放作用。**方法** 采用乳化蒸发-低温固化法制备 FIT-SLN，利用 Box-Behnken 设计试验优化处方工艺，并制成冻干粉末。考察其外观、粒径、Zeta 电位，并通过差示量热扫描仪判断药物在 FIT-SLN 冻干粉中的存在状态，透析袋法评价制剂在不同介质中的体外释放行为。**结果** FIT-SLN 的最佳制备工艺：漆黄素用量 3 mg、吐温 80 用量 115 μL、双硬脂酸甘油酯（Precirol ATO 5）用量 30 mg、卵磷脂用量 30 mg。所得 FIT-SLN 的粒径、Zeta 电位、包封率分别为（124.53±2.00）nm、（－21.33±1.69）mV、77.89%，体外释放规律与一级动力学方程相符。**结论** 成功制备粒径小、包封率高的 FIT-SLN，其具有一定的缓释能力。

关键词：漆黄素；固体脂质纳米粒；Box-Behnken 设计；体外释放
中图分类号：R283，R943 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0606-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.009

Preparation and in vivo release of fisetin solid lipid nanoparticles

WANG Hao[1], MENG Meng[1], XIE Qin-qin[1], HE Ning[1], WANG Dan[2], XU Wei-ping[1, 2, 3, 4*] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *University of Science and Technology of China*, *Hefei* 230026; 3. *Department of Geriatrics*, *Gerontology Institute of Anhui Province*, *The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China* (*Anhui Provincial Hospital*), *Hefei* 230001; 4. *The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China* (*Anhui Provincial Hospital*), *Hefei* 230001)

Abstract: Objective To prepare fisetin solid lipid nanoparticles (FIT-SLN), evaluate their quality and determine its in vitro release. **Methods** FIT-SLNs were prepared by emulsion evaporation-cryogenic curing method, and the prescription process was optimized with Box-Behnken design experiment and made into lyophilized powder. The appearance, particle size, and Zeta potential were examined, and the presence of the drug in the lyophilized powder of FIT-SLN was determined by differential scanning calorimetry. The in vitro release behavior of the preparation was evaluated by the dialysis bag method. **Results** The optimal preparation of FIT-SLN was as follows: 3 mg fisetin, 115 μL Tween 80, 30 mg Precirol ATO 5, and 30 mg lecithin. The particle size, Zeta-potential, and encapsulation rate of FIT-SLN were (124.53±2.00) nm, (－21.33±1.69) mV, and 77.89%, respectively. The in vitro release was in accordance with the first-order kinetics equation. **Conclusion** FIT-SLN with small particle size and high encapsulation rate are successfully prepared with slowly release.

Key words: fisetin; solid lipid nanoparticle; Box-Behnken design; in vitro release

基金项目：国家自然科学基金项目（No.52072360）。
作者简介：王浩，男，硕士研究生，主要从事药物新制剂及新剂型方面的研究，email：746390812@qq.com *通信作者：徐维平，男，主任药师，博士研究生导师，主要从事药剂学、药理学方面的研究，email：weipingx@ustc.edu.cn

漆黄素（fisetin），又名非瑟酮，属于黄酮类化合物，主要来源于黄栌、漆树等植物中，还分布于草莓、黄瓜等水果蔬菜中[1]。从结构上看，漆黄素的基本骨架是 3- 羟基黄酮，环 B 上特殊的邻苯二酚基团使漆黄素有着更强的药理活性[2-3]，如抗肿瘤[4]、抗衰老[5]、抗炎、抗氧化[6-8]、改善慢性肾损伤[9]、神经保护[10]和心脏保护作用[11]等。虽然漆黄素在多种疾病治疗上表现出一定的潜力，但该药水溶性较差、代谢较快、口服生物利用度低，从而限制了其应用价值。近年来，研究人员为解决漆黄素存在的问题，进行了多种新剂型尝试，如脂质体[12]、纳米混悬剂[13]、固体分散体[14]、包合物[15]等。

固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticles，SLN）是由天然或合成的固体类脂作为载体，将药物包裹或附着于类脂表面而形成的固态胶体给药系统，常用于提高难溶性药物的溶解度[16]。SLN 所用载体多为毒性低、生物相容性好、可降解性优良的类脂，提高了制剂的安全性[17]。同时，SLN 作为以磷脂和固体脂质为主要载体制备的水性纳米分散液，具有更高的稳定性[18]。稳定性的提高有利于药物的持续性释放，同时减少了给药频率及剂量。因此本研究采用乳化蒸发 - 低温固化法制备漆黄素固体脂质纳米粒（FIT-SLN）来改善药物的生物利用度，以透析袋法评价药物的体外释放性质，为未来漆黄素的新剂型开发提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

U3000 型高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技公司）；DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器（上海力辰邦西仪器科技有限公司）；3000HS 型粒径分析仪、3000HS 型粒径分析仪（美国 Malvern Instrument 公司）；HT7700 透射电子显微镜（日本日立公司）；BILON-FD50DE 冷冻干燥机（上海比朗仪器制造有限公司）；DSC 214 Polyma 型差示扫描量热仪（德国耐驰仪器制造有限公司）。

1.2　试药

漆黄素对照品（质量分数＞ 98%，成都埃法生物科技有限公司，批号：AZ21102406）；双硬脂酸甘油酯（法国嘉法师公司馈赠）；大豆卵磷脂（上海源叶生物有限公司，批号：S30807）；吐温 80（批号：T6336）、甘露醇（批号：M813423）（上海麦克林生化科技有限公司）；MD44 透析袋（截留相对分子质量 3500，湖南翊博生物科技有限公司）；纯净水（华润怡宝有限公司）；甲醇为色谱纯；其余试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　FIT-SLN 的制备工艺

精密称量处方量的漆黄素、双硬脂酸甘油酯及大豆卵磷脂溶于 5 mL 无水乙醇中，超声后于 70 ℃水浴中恒温加热，使其完全溶解并形成有机相。另将处方量的吐温 80 溶于 15 mL 双蒸水中，加热 70 ℃构成水相。在 1000 r•min^{-1}磁力搅拌下，将有机相缓慢注入水相，通过搅拌蒸发除去有机溶剂并浓缩至 5 mL 后，迅速添加适量冰水使其体积至 10 mL，并转移至冰水浴中稳定固化 1 h，得 FIT-SLN 分散液。

2.2　漆黄素含量测定方法的建立

2.2.1　色谱条件　色谱柱为依利特 Hypersil ODS2（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇 -0.3% 磷酸水（60∶40）；检测波长 364 nm；柱温 25 ℃；流速 1 mL • min^{-1}；进样量 10 μL。

2.2.2　专属性考察　称取一定量的漆黄素对照品溶液、空白溶液（空白固体脂质纳米粒溶液）以及供试品溶液（FIT-SLN 溶于甲醇并稀释，过 0.45 μm 滤膜）进样 10 μL。色谱图如图 1 所示，漆黄素色谱峰的峰形稳定，空白溶液无干扰，专属性良好。

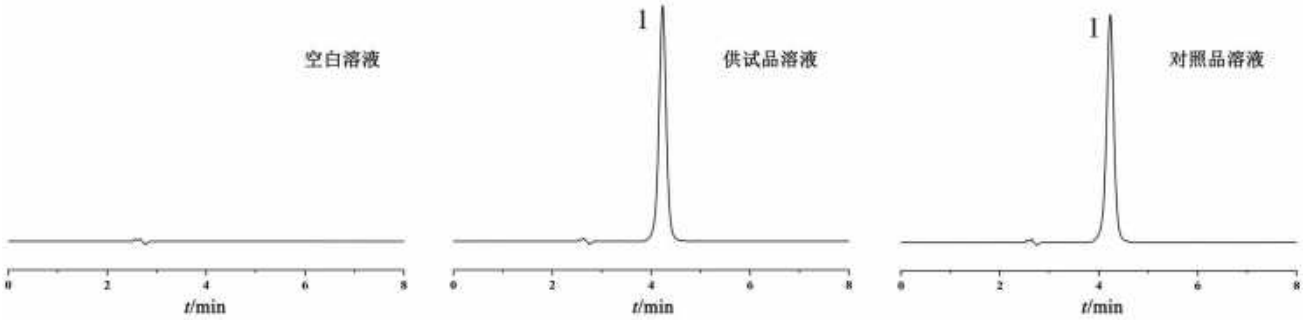


图 1　漆黄素的色谱图

Fig 1　Chromatogram of fisetin

1. 漆黄素（fisetin）

2.2.3 线性关系考察 精密称取适量漆黄素溶于甲醇，并定容使其配制成 100 μg • mL^{-1} 的储备液，取一定量上述储备液用甲醇稀释定容，配制成 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、80.0、100.0 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，过膜后进样测定。以漆黄素质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，得回归方程为 $Y = 0.7061X + 0.0373$（$R^2 = 0.9996$），表明漆黄素在 1.0 ～ 100.0 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 取“2.2.3”项下的 20.0、50.0、80.0 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，于“2.2.1”项色谱条件下，1 d 内连续测定 5 次，测得日内精密度的 *RSD* 值分别为 0.62%、0.67%、0.46%；每日测定 1 次，连续测定 5 d，测得日间精密度的 *RSD* 值分别为 0.88%、0.61%、0.47%，说明该方法精密度良好。

2.2.5 回收试验 取一定量的空白 SLN 分散液，加入适量的漆黄素对照品溶液，制成低（20 μg•mL^{-1}）、中（50 μg•mL^{-1}）、高（80 μg•mL^{-1}）3 个质量浓度的溶液，测得低、中、高 3 个质量浓度的平均加样回收率分别为 99.94%、101.45%、100.39%，*RSD* 值分别为 1.2%、0.32%、0.42%，说明方法回收率符合测定要求。

2.2.6 包封率的测定 采用透析法测定包封率。经前期预试验，确定透析介质为 0.2% 吐温 80 水溶液。精密量取 5 mL FIT-SLN 分散液，将其放入透析袋中，两端密封，然后将透析袋置于含有 150 mL 透析介质的烧杯中。于 37 ℃、100 r • min^{-1} 的摇床中恒温振荡 8 h，取烧杯内介质过 0.45 μm 滤膜，计算游离漆黄素的含量（$W_{游}$），另取透析袋内溶液 1 mL，加 3 mL 甲醇稀释 4 倍后，于“2.2.1”项色谱条件下测定漆黄素的总药量（$W_{总}$）。按下式计算包封率：

包封率（%）＝（$W_{总} - W_{游}$）/$W_{总}$ ×100%。

2.3 FIT-SLN 的处方优化

2.3.1 Box-Behnken 响应面法优化工艺条件 在前期单因素试验考察的基础上，固定了工艺因素及药脂比，本研究选取对 FIT-SLN 包封率影响较大的三个因素吐温 80 用量（A）、双硬脂酸甘油酯用量（B）、卵磷脂用量（C）为考察对象，以包封率（Y）为因变量，采用 Box-Behnken 响应面法设计三因素三水平试验，因素水平、试验设计及结果见表 1 ～ 2。

2.3.2 FIT-SLN 的处方优化 应用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验数据进行模型拟合，最优的拟合方程为：$Y = 75.22 + 2.37A + 9.18B + 0.54C - 0.69AB - 1.38AC - 2.61BC - 6.43A^2 - 6.70B^2 - 3.83C^2$（$R^2 = 0.9872$）。方差分析结果（见表 3）显示：模型的 F 值较高，P 值小于 0.0001，失拟项的 P 值为 0.7217 ＞ 0.05，表明该模型具有良好的拟合程度和预测能力。

表 1 响应面设计的因素水平

Tab 1 Factor and level for response surface design

水平	因素		
	A/μL	B/mg	C/mg
－1	70	15	20
0	105	25	30
1	140	35	40

表 2 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Tab 2 Experimental design and results of Box-Behnken

试验号	A	B	C	包封率 /%
1	1	0	1	66.22
2	0	0	0	75.86
3	0	0	0	72.96
4	1	0	－1	67.45
5	0	－1	－1	52.11
6	0	0	0	77.59
7	－1	0	－1	60.95
8	0	1	1	72.06
9	－1	－1	0	49.81
10	1	－1	0	56.93
11	0	－1	1	57.97
12	1	1	0	72.99
13	0	0	0	75.31
14	－1	0	1	65.23
15	0	0	0	74.38
16	－1	1	0	68.61
17	0	1	－1	76.62

根据 Design-Expert 8.0.6 软件得到的最佳处方方案为吐温 80 用量 115.54 μL、双硬脂酸甘油酯用量 29.05 mg、卵磷脂用量 30.12 mg，各因素与包封率的 3D 曲面图见图 2。

2.3.3 最优处方的验证试验 考虑试验操作的便利性，将最优处方调整为吐温 80 用量 115 μL、双硬脂酸甘油酯用量 30 mg、卵磷脂用量 30 mg。计算实际值与预测值之间的偏差（%）＝（预测值－实际值）/ 预测值 ×100%，模型预测包封率为 78.19%，按照最优处方制备 3 批 FIT-SLN，测得的平均包封率为 77.89%，偏差为 0.38% ＜ 5%，表明模型拟合度良好，包封率较高，重现性较好。

2.4 FIT-SLN 的理化性质

2.4.1 粒径与 Zeta 电位 取一定量新鲜制备的 FIT-SLN，加纯水稀释 10 倍，平行 3 次，测得平均粒径

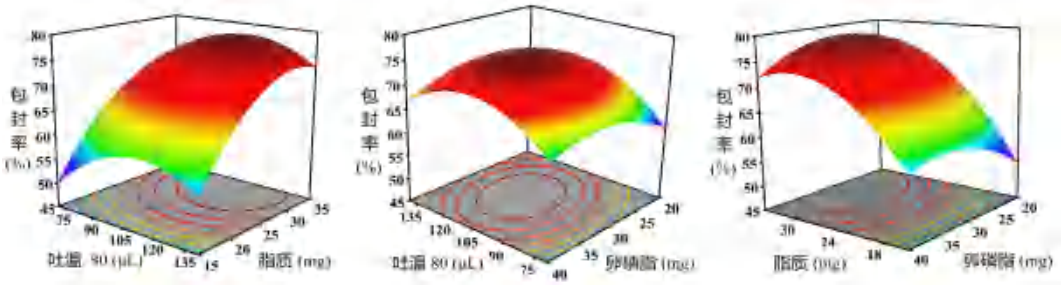


图 2　不同因素对 FIT-SLN 包封率影响的 3D 曲面图

Fig 2　3D surface diagram of the influence of each factor on the encapsulation of FIT-SLN

表 3　方差分析结果

Tab 3　Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	1230.06	9	136.67	59.84	＜ 0.0001
A	45.08	1	45.08	19.73	0.0030
B	674.55	1	674.55	295.32	＜ 0.0001
C	2.37	1	2.37	1.04	0.3427
AB	1.88	1	1.88	0.82	0.3948
AC	7.59	1	7.59	3.32	0.1111
BC	27.14	1	27.14	11.88	0.0107
A^2	174.15	1	174.15	76.24	＜ 0.0001
B^2	189.22	1	189.22	82.84	＜ 0.0001
C^2	61.64	1	61.64	26.99	0.0013
残差	15.99	7	2.28		
失拟项	4.14	3	1.38	0.47	0.7217
纯误差	11.85	4	2.96		
总离差	1246.05	16			

为（124.53±2.00）nm、Zeta 电位为（－ 21.33±1.69）mV（见图 3）、多分散系数（PDI）为 0.25。

2.4.2　形态观察　取适量 FIT-SLN 分散液稀释后滴至铜网上，干燥后置于透射电子显微镜下观察。FIT-SLN 的基本形态为类球形，形态饱满，与所测粒径大小相一致（见图 4）。

2.5　FIT-SLN 冻干工艺考察及表征

2.5.1　冻干保护剂考察　以 FIT-SLN 的外观及再分散性为评价指标，考察冻干保护剂甘露醇的用量（1%、3%、5%、7%）选择。综合评分结果见表 4，最终选择 5% 甘露醇作为 FIT-SLN 的冻干保护剂，此条件下的冻干粉末为淡黄色粉末，饱满、质地疏松均一、无塌陷现象、再分散性好。复溶后的平均粒径为（127.83±0.12）nm、PDI 为（0.269±0.01）。

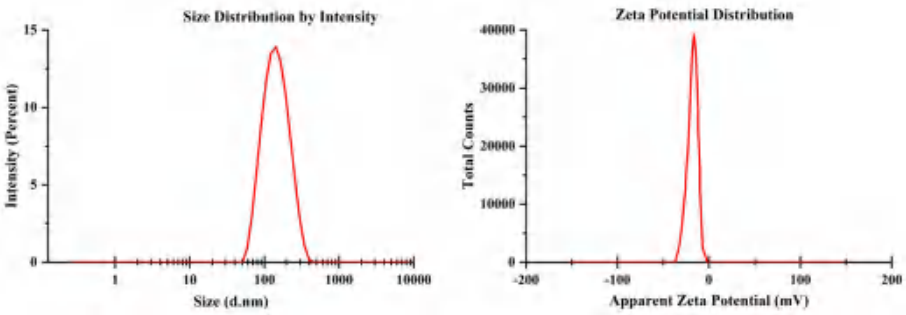


图 3　FIT-SLN 的粒径及 Zeta 电位图

Fig 3　Particle size and Zeta potential distribution of FIT-SLN

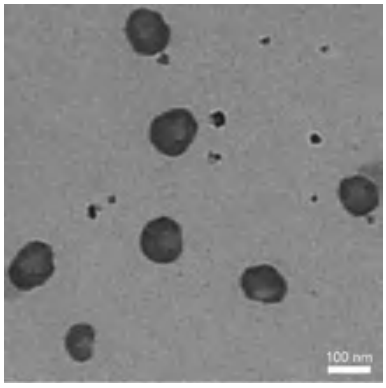


图 4　FIT-SLN 的透射电镜图

Fig 4　Transmission electron microscope image of FIT-SLN

表 4　冻干保护剂含量的选择

Tab 4　Selection of lyophilized protective agent content

甘露醇含量 /%	外观	再分散性
1	皱缩分层、有色差	＞ 30 S
3	皱缩分层、有色差	＞ 30 S
5	致密饱满、均匀	＜ 30 S
7	致密饱满、均匀	＜ 30 S

2.5.2　FIT-SLN 冻干粉的 DSC 分析　将适量的漆黄素原料药、甘露醇、空白 SLN 冻干粉末、物理混合物（漆黄素＋空白辅料）、FIT-SLN 冻干粉末分别放入坩埚中进行 DSC 分析，测试条件以空坩埚为参照物，氮气为保护气，温度为 20 ～ 400 ℃，

升温速度为 10 ℃ • min^{-1}。结果见图 5，漆黄素在 354.17 ℃出现放热峰，对应其熔点。甘露醇在 166.25 ℃处出现熔点峰，物理混合物中漆黄素的熔点峰变弱，且有所偏移。FIT-SLN 的冻干粉末中未出现漆黄素的放热峰，说明漆黄素可能以无定形的形式存在于冻干粉末中。

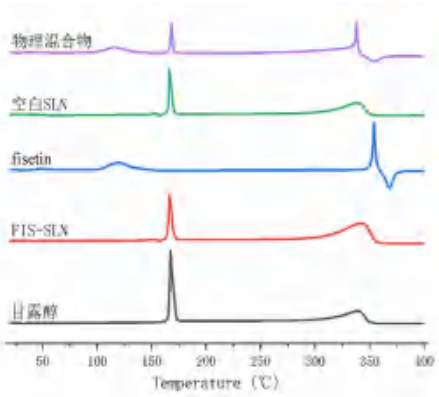


图 5 FIT-SLN 冻干粉的晶型研究（DSC）

Fig 5 Crystal type of FIT-SLN freeze-dried powder（DSC）

2.6 FIT-SLN 体外释药行为研究

考察 FIT-SLN 在 pH 1.2 盐酸水溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液以及生理盐水 3 种释放介质中的释放情况。为满足漏槽条件，在不同释放介质中加入 0.2% 吐温 80。精密量取 5 mL（1.5 mg）漆黄素原料药溶液及 FIT-SLN 分散液置于透析袋中，然后将透袋置于含有 150 mL 释放介质（pH 1.2 盐酸水溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液）的烧杯内，于 37 ℃、100 r•min^{-1} 的摇床中恒温振荡，分别于 1、2、4、6、8、10、12、24 h 取样 2 mL（同时补充等体积的释放介质）。同法考察透析介质为生理盐水的释药情况，取样点增加到 96 h。所有样品均过 0.45 μm 滤膜后于 HPLC 测定，计算漆黄素及 FIT-SLN 分散液的累计释放量。

漆黄素原料药和 FIT-SLN 在不同介质中的释药曲线如图 6 所示，漆黄素原料药在不同介质中均出现突释情况，5 h 已释放约 80%。FIT-SLN 在 pH 1.2 盐酸水溶液中持续少量释放，12 h 仅释放 25.42%。在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液和生理盐水中缓慢释放，24 h 释放量为 64.04% 和 57.03%。FIT-SLN 在不同 pH 的释放介质中，缓释效果均优于漆黄素原料药，且具有一定的耐酸性。

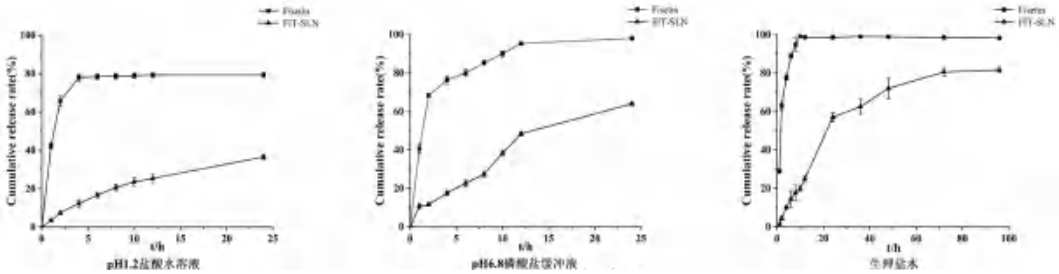


图 6 漆黄素和 FIT-SLN 在不同介质中的体外释放曲线（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

Fig 6 In vitro release curve of fisetin and FIT-SLN in different medium（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

应用 Origin Pro 软件将零级释放方程、一级释放方程对 FIT-SLN 在不同释放介质下的释放曲线进行拟合。结果显示 FIT-SLN 在不同释放介质中均与一级释药模型（见表 5）拟合度最高，表明 FIT-SLN 的体外释放符合一级释放动力学。

表 5 FIT-SLN 的不同释药模型拟合

Tab 5 Fitting of different drug release models of FIT-SLN

释放介质	释放模型	释放方程	R^2
pH 1.2 盐酸水溶液	零级释放模型	$Q = 1.5t + 5.03$	0.901
	一级释放模型	$Q = 41.72(1 - e^{-0.08t})$	0.998
	Higuchi 方程	$Q = 3t^{1/2} + 5.04$	0.901
pH 6.8 磷酸盐水溶液	零级释放模型	$Q = 2.64t + 7.15$	0.926
	一级释放模型	$Q = 85.69(1 - e^{-0.06t})$	0.967
	Higuchi 方程	$Q = 13.57t^{1/2} - 5.18$	0.941
生理盐水	零级释放模型	$Q = 0.92t + 12.85$	0.822
	一级释放模型	$Q = 87.82(1 - e^{-0.03t})$	0.959
	Higuchi 方程	$Q = 10.53t^{1/2} - 8.76$	0.943

3 讨论

SLN 的制备方法有许多，包括薄膜分散法、乳化蒸发 - 低温固化法、高压匀质法、微乳法等 [19]。根据预试验筛选方法的结果来看，采用乳化蒸发 - 低温固化法制备的 FIT-SLN 外观呈现为淡黄色透明液体，粒径均匀、PDI 较小，且该方法工艺简单，操作方便。

包封率是 SLN 质量评价的重要指标之一，用于测量包封率的常用方法有超滤离心法、高速离心法、低速离心法、透析袋法、葡聚糖凝胶柱法等。经试验筛选发现，超滤离心法在使用不同规格的超滤管（10、50、100 kD）时，均不能将游离药物与 SLN 完全分离，导致结果偏高。低速离心法无法将游离药物沉降于离心管底部，葡聚糖凝胶柱法操作烦琐费时。使用透析袋法时，游离药物和制剂 8 h 便能达到完全分离，且回收率

较高，满足试验要求，故选择透析袋法测量 FIT-SLN 的包封率。

在试验过程中发现，粒径、PDI 的大小随着各因素水平改变的变化幅度不大，故本试验以包封率为主要评价指标，根据 Box-Behnken 设计优化处方工艺。最优处方下得到的 FIT-SLN 外观为圆整球形，分布均匀，平均粒径达到（124.53±2.00）nm、PDI 为 0.25，良好的粒径与 PDI 可以提高药物的口服利用度。在 SLN 的储存期间，内核结构的固化及药物在脂质内存在的状态变化常会引起 SLN 出现浑浊、沉淀等不稳定现象 [20]。故本研究对其进行冷冻干燥，DSC 结果显示药物以无定形状态存在于 SLN 中。

综上所述，本研究制备的 FIT-SLN 形态饱满，粒径优良，并在不同 pH 的释放介质中均有一定的缓释作用，同时进一步提高了 SLN 储存的稳定性，为后续进行药效学及药动学评价奠定了基础。

参考文献

[1] Khan N，Syed DN，Ahmad N，et al. Fisetin：a dietary antioxidant for health promotion [J]. Antioxid Redox Signal，2013，19（2）：151-162.

[2] Kubina R，Iriti M，Kabała-Dzik A. Anticancer potential of selected flavonols：fisetin，kaempferol，and quercetin on head and neck cancers [J]. Nutrients，2021，13（3）：845.

[3] Kashyap D，Garg VK，Tuli HS，et al. Fisetin and quercetin：promising flavonoids with chemopreventive potential [J]. Biomolecules，2019，9（5）：174.

[4] Kubina R，Krzykawski K，Kabała-Dzik A，et al. Fisetin，a potent anticancer flavonol exhibiting cytotoxic activity against neoplastic malignant cells and cancerous conditions：a scoping，comprehensive review [J]. Nutrients，2022，14（13）：2604.

[5] Yousefzadeh MJ，Zhu Y，McGowan SJ，et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan [J]. EbioMedicine，2018，36：18-28.

[6] 胡千慧，曹睿，凌云，等 . 漆黄素对高糖诱导视网膜 Müller 细胞氧化应激炎症反应的作用 [J]. 锦州医科大学学报，2022，43（6）：13-20.

[7] Ding HG，Li Y，Chen SL，et al. Fisetin ameliorates cognitive impairment by activating mitophagy and suppressing neuroinflammation in rats with sepsis-associated encephalopathy [J]. CNS Neurosci Ther，2022，28（2）：247-258.

[8] Currais A，Prior M，Dargusch R，et al. Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer’s disease transgenic mice [J]. Aging Cell，2014，13（2）：379-390.

[9] Ren Q，Tao SB，Guo F，et al. Natural flavonol fisetin attenuated hyperuricemic nephropathy via inhibiting IL-6/JAK2/STAT3 and TGF-β/SMAD3 signaling [J]. Phytomedicine，2021，87：153552.

[10] Chuang JY，Chang PC，Shen YC，et al. Regulatory effects of fisetin on microglial activation [J]. Molecules，2014，19（7）：8820-8839.

[11] 李晓丽，周素平，曾淑敏，等 . 漆黄素对血管紧张素Ⅱ诱导心肌成纤维细胞活性的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志，2021，23（11）：1195-1199.

[12] 王蓓蓓，姜亚莉，林郁，等 . 漆黄素脂质体的制备及其质量评价 [J]. 江苏大学学报（医学版），2021，31（6）：522-527.

[13] 毛艳婷，陶兴茹，张胜男，等 . 漆黄素纳米混悬剂和冻干粉末的制备及体外评价 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（4）：393-398.

[14] 冯春来，丁洋洋，李文静，等 . 漆黄素固体分散体的制备 [J]. 中成药，2017，39（12）：2503-2507.

[15] 李燕华，王淑慧，李俊鹏，等 . 漆黄素与 β- 环糊精衍生物的包合行为及性能研究 [J]. 中草药，2021，52（16）：4797-4810.

[16] 杨金枝，崔晓鸽，郝海军 . TPGS 表面修饰岩白菜素固体脂质纳米粒的制备与口服生物利用度研究 [J]. 中草药，2023，54（13）：4144-4156.

[17] Madkhali OA. Perspectives and prospective on solid lipid nanoparticles as drug delivery systems [J]. Molecules，2022，27（5）：1543.

[18] Ji P，Yu T，Liu Y，et al. Naringenin-loaded solid lipid nanoparticles：preparation，controlled delivery，cellular uptake，and pulmonary pharmacokinetics [J]. Drug Des Devel Ther，2016，10（1）：911-925.

[19] Akbari J，Saeedi M，Ahmadi F，et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers：a review of the methods of manufacture and routes of administration [J]. Pharm Dev Technol，2022，27（5）：525-544.

[20] Weber S，Zimmer A，Pardeike J. Solid lipid nanoparticles（SLN）and nanostructured lipid carriers（NLC）for pulmonary application：a review of the state of the art [J]. Eur J Pharm Biopharm，2014，86（1）：7-22.

（收稿日期：2023-08-23；修回日期：2023-10-10）

苏葶宣肺颗粒的制备工艺及初步药效研究

叶晨雨[1]，周丽玲[1]，姜德[2]，兰卫[2]，张海英[3, 4*]（1. 新疆医科大学第四临床医学院，乌鲁木齐 830000；2. 新疆医科大学中医学院，乌鲁木齐 830000；3. 新疆医科大学附属中医医院，乌鲁木齐 830000；4. 新疆中药炮制研究重点实验室，乌鲁木齐 830000）

摘要：目的 优选苏葶宣肺颗粒的最佳提取工艺和成型工艺，并探讨其对气管平滑肌的作用。**方法** 采用 L_9（3^4）正交设计实验法，以迷迭香酸和黄芩苷的含量以及浸膏得率为指标，考察提取次数、提取时间和加水倍量对苏葶宣肺颗粒提取工艺的影响，优选苏葶宣肺颗粒的最佳提取工艺。以制粒情况、成型率、吸湿率、休止角及溶解度为评价指标，对辅料种类和药辅比例等因素进行考察，确定最佳制剂成型工艺。制备大鼠离体气管环后浸泡于 K-H 液，采用 BL-420S 生物机能系统测定其张力变化，分别观察苏葶宣肺颗粒对大鼠正常离体气管和磷酸组胺（His）、乙酰胆碱（ACh）致痉的大鼠离体气管张力的影响，计算解痉率。**结果** 苏葶宣肺颗粒的最佳提取工艺为：加 10 倍量水，浸泡 30 min，提取 2 次，每次提取 60 min。3 批正交验证实验综合评分均数为 92.07，*RSD* 为 0.51%。最佳成型工艺为：浸膏、糊精、淀粉按 3∶2.5∶4 的比例制成软材，用 10 目筛网制成颗粒。苏葶宣肺颗粒对大鼠正常离体气管平滑肌具有舒张作用，对 ACh 和 His 致大鼠离体气管平滑肌收缩均有一定的解痉作用。**结论** 本文建立了苏葶宣肺颗粒稳定可行的制备工艺，为后续的研发、质量控制奠定了基础。苏葶宣肺颗粒对离体气管平滑肌有舒张作用，其机制可能与抗组胺和抑制胆碱受体有关。

关键词：苏葶宣肺颗粒；迷迭香酸；黄芩苷；制备工艺；正交实验；药效研究

中图分类号：R283，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0612-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.010

Preparation and efficacy of Suting Xuanfei granules

YE Chen-yu[1], ZHOU Li-ling[1], JIANG De[2], LAN Wei[2], ZHANG Hai-ying[3, 4*] (1. *College of Fourth Clinical Medical*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000; 2. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000; 3. *Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000; 4. *Xinjiang Key Laboratory of Processing and Research of Traditional Chinese Medicine*, *Urumqi* 830000)

Abstract: Objective To optimize the extraction and molding process of Suting Xuanfei granules, and determine its effect on the tracheal smooth muscle. **Methods** L_9 (3^4) orthogonal design experiment method was used, the content of rosmarinic acid and baicalin, and the extraction rate were used as indicators of the effect of extraction times, extraction time, and water volumn on the extraction of Suting Xuanfei granules, to optimize the optimal extraction process of Suting Xuanfei granules. The granulation condition, molding rate, moisture absorption rate, angle of repose, and solubility were used as the evaluation indicators, to determine the factors such as type of excipients and ratio of drugs to excipients in the optimal formulation molding process. The isolated rat trachea ring was prepared and soaked in K-H solution. The tension changes were measured with the BL-420S biological function system. The effects of Suting Xuanfei granules on the tension of the normal isolated rat trachea and the isolated rat trachea caused by histamine phosphate (His) and acetylcholine (ACh) were observed. The spasmolysis rate was calculated. **Results** The optimal extraction for Suting Xuanfei granules was as follows: adding 10 times of water, soaking for 30 min, and two extractions, each time 60 min. The average score of the three sets

基金项目：国家重点研发计划项目（No.2017YFC1703902）。

作者简介：叶晨雨，女，在读硕士研究生，主要从事中药复方制剂研究，email：424518393@qq.com *通信作者：张海英，女，教授，主任中药师，硕士研究生导师，主要从事中药复方制剂和中药药理学研究，email：1030737878@qq.com

of orthogonal validation experiments was 92.07, and the *RSD* was 0.51%. The optimal molding process was as follows: the extract, dextrin, and starch were mixed at 3∶2.5∶4 to create a soft material. The mixture was then passed through a 10-mesh sieve to obtain granules. Suting Xuanfei granules showed a relaxing effect on the normally isolated tracheal smooth muscle in rats and also certain spasmolytic effect on ACh and His induced contraction of isolated tracheal smooth muscle in rats. **Conclusion** A stable and feasible preparation process route of Suting Xuanfei granules has been established, laying a foundation for subsequent research and development, production, and quality control. Suting Xuanfei granules has a relaxing effect on isolated tracheal smooth muscle, which may be related to antihistamine activity and the inhibition of cholinergic receptors.

Key words: Suting Xuanfei granule; rosmarinus acid; baicalin; preparation process; orthogonal optimization; efficacy study

支气管哮喘是呼吸系统常见的疾病，是一种气道慢性炎症性疾病，由多种细胞包括气道的炎性细胞和结构细胞及细胞组分共同参与[1-2]，该疾病常由上呼吸道的炎症、气候变化或接触过敏原等因素诱发，临床表现为反复的、发作性的喘息，呼吸气急，胸闷或咳嗽[3]。据报道，我国 20 岁以上的人群中约有 4570 万哮喘患者[4]，给医药卫生公共事业造成重大负担。

目前，用于治疗哮喘的一线药物仍然是 β_2 肾上腺素能受体激动剂和糖皮质激素，这些治疗策略存在严重的不良反应，如头痛、震颤、心悸和心脏衰竭[5]，因此有必要开发新的抗哮喘药。中医药治疗哮喘疗效确切，且无明显不良反应，因此具有较大优势。

苏葶宣肺颗粒是新疆医科大学附属中医医院临床在研院内制剂，原剂型为汤剂，由紫苏子、葶苈子、黄芩等 10 味药材组成，该方具有燥湿化痰、宣降肺气的功效，主要在临床上用于治疗支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病等。本方在临床上以传统汤剂的形式使用，但汤剂有着服用量大、不便于携带等缺点，故将其研发为颗粒剂，不但方便携带、存放和使用，而且质量稳定。本实验选择迷迭香酸和黄芩苷作为指标性成分，建立相关的 HPLC 含量测定方法，采用正交实验筛选出最佳的提取工艺，以颗粒的成型率、吸湿率、溶化性和休止角为评价指标，对辅料的种类和用量进行成型工艺的优化，并研究苏葶宣肺颗粒对大鼠离体气管平滑肌张力的影响，以期为临床用药提供参考。

1　材料

1.1　动物

雄性 SD 大鼠 10 只，250 ～ 300 g，购自新疆医科大学动物中心 [许可证号：SCXK（新）2018-0003）]。

1.2　仪器

高效液相色谱仪（型号：e2695-Waters，美国 Waters 公司）；电子天平（型号：MS205DU，瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；超声波清洗器（型号：SK250LHC，上海科导超声仪器有限公司）；电热恒温水浴锅（型号：HHS-24，上海东星建材实验设备有限公司）；电热恒温鼓风干燥箱（型号：GZX-GF101-2-BS-Ⅱ/H，上海跃进医疗器械有限公司）；调温电热套（型号：KDM，山东鄄城光明仪器有限公司）；BL-420S 生物机能系统（成都泰盟软件有限公司）；离体组织灌流装置（型号：ZH-GL，安徽正华生物仪器设备有限公司）。

1.3　试药

迷迭香酸对照品（批号：MUST-20053107，含量：99.02%，成都曼斯特生物科技有限公司）；黄芩苷对照品（批号：110715-200815，含量：95.2%，中国食品药品检定研究院）。甲醇（批号：2007L-21063）、乙腈（批号：2007L-33055）[色谱纯，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]。乙酰胆碱（ACh）、磷酸组胺（His）(新疆赛奥生物医学科技有限公司)。水为超纯水。

中药饮片均购自安徽济善堂中药科技有限公司，均符合 2020 年版《中国药典》的相关要求。

2　方法

2.1　迷迭香酸、黄芩苷含量测定

2.1.1　色谱条件　采用 XTERRAMS C18 分析型色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相采用乙腈（A）和 0.1% 磷酸（B），进行梯度洗脱（0 ～ 5 min，15%A；5 ～ 15 min，15% ～ 25%A；15 ～ 25 min，25%A；25 ～ 30 min，25% ～ 15%A），柱温为 30 ℃，流速为 1.0 mL • min^{-1}，检测波长迷迭香酸为 330 nm，黄芩苷为 280 nm，进样量为 10 μL。

2.1.2　溶液的制备

① 混合对照品溶液的制备：精密称取适量的迷迭香酸、黄芩苷对照品，加甲醇制成每 1 mL 含迷迭香酸 56 μg、黄芩苷 80 μg 的混合对照品溶液。

② 供试品溶液的制备：按照处方量称取所需药材，放入 2000 mL 的圆底烧瓶中，加入 8 倍量的水，浸泡 30 min。随后进行两次回流加热，每次加热 1 h，冷却后进行过滤，并将滤液合并，取其中 5 mL 上清液置于水浴锅中蒸干，蒸干后加入 5 mL 的 50% 甲醇以溶解，最后通过 0.45 μm 的滤膜滤过，定容至 2 mL 的量瓶中，即得。

③ 阴性样品溶液的制备：按照苏葶宣肺颗粒的处方工艺，制备缺紫苏子、黄芩药材的阴性样品，按照上述供试品溶液制备方法，制备阴性样品溶液。

2.1.3 方法学考察

① 专属性试验：分别取“2.1.2”项下各溶液，进样测定，采集色谱图。

② 线性关系考察：精密称定迷迭香酸对照品 1.5 mg，加甲醇溶解并稀释，制成质量浓度分别 为 0.0125、0.025、0.0375、0.05、0.0625、0.075 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。精密称定黄芩苷对照品 10.5 mg，加甲醇溶解并稀释，制成质量浓度分别为 0.175、0.35、0.525、0.7、0.875、1.05 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。分别吸取不同浓度对照品溶液各 10 μL 注入液相色谱，记录峰面积。以色谱峰面积（Y）对浓度（X）进行回归分析，构建标准曲线。

③ 精密度实验：取同一混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录迷迭香酸和黄芩苷的峰面积，并计算 *RSD*。

④ 重复性实验：根据“2.1.2”项下方法，平行制备了 6 份供试品溶液，进样测定。记录迷迭香酸和黄芩苷的峰面积，并计算 *RSD*。

⑤ 稳定性实验：取同一供试品溶液，分别在第 0、2、4、8、12 和 24 h 时进行含量测定，记录迷迭香酸和黄芩苷的峰面积，并计算 *RSD*。

⑥ 加样回收率实验：取已知含量的供试品 6 份，分别加入与其含量相同的对照品，进样测定，记录迷迭香酸和黄芩苷的峰面积，并计算其平均回收率及 *RSD*。

2.2 浸膏得率的测定

精密吸取供试品溶液的上清液 50 mL，放入已恒定质量的蒸发皿（M_1）中，在水浴锅上蒸干，转移至烘箱，105 ℃干燥至恒定重量，取出，置干燥器中冷却至室温后精密称定重量（M_2），计算浸膏得率 [6]。浸膏得率（%）=（$M_2 - M_1$）×V/（m×50）×100%。

2.3 正交实验优化苏葶宣肺颗粒的提取工艺

以提取次数（A）、提取时间（B）和加水倍量（C）为考察因素，采用 L_9（3^4）正交实验法考察 [7-8]，设定迷迭香酸含量、黄芩苷含量和浸膏得率的权重系数分别为 40%、40% 和 20%[9]。正交实验因素与水平见表 1。综合评分＝迷迭香酸含量 / 最大含量 ×40% ＋黄芩苷含量 / 最大含量 ×40% ＋浸膏得率 / 最大浸膏得率 ×20%。

表 1 正交实验因素与水平

Tab 1 Factor and level of orthogonal experiment

水平	因素			
	A/ 次	B/min	C/ 倍	D（空白）
1	1	45	10	1
2	2	60	12	2
3	3	75	14	3

2.4 验证实验

按照处方比例称取 3 份药材，按照筛选出的最佳提取工艺进行 3 次验证实验。

2.5 成型工艺研究

苏葶宣肺颗粒的成型工艺按最佳提取工艺提取，称取紫苏子、黄芩等 10 味药材，加 10 倍量水浸泡 30 min，提取 2 次，每次 60 min，合并 2 次煎煮液，浓缩至相对密度为 1.25 ～ 1.30 的稠浸膏，采用湿法制粒的方法，按比例称取稠浸膏和辅料，制成“手握成团，轻触即散”状态的软材，过 1 号筛制粒，将所制颗粒平铺于托盘且厚度不应超过 3 mm，置于温度为 50 ℃的干燥箱中干燥 30 min，整粒，即得。依据颗粒制作的难易程度、成型率、吸湿性和溶化性为指标，优选苏葶宣肺颗粒的最佳成型工艺。

2.5.1 颗粒评价指标

① 成型率：依照双筛分法 [10]，取所制的颗粒，称重，能通过 1 号筛但不能通过 5 号筛即为合格颗粒，称重，计算成型率。

② 吸湿率：称取颗粒 1.0 g，平铺放入已恒定重量的扁形称量瓶中，精密称重后放入盛有氯化钠饱和水溶液的玻璃干燥器中（25 ℃，称量瓶盖打开），24 h 后称定重量，计算吸湿率。

③ 溶化性：依照可溶颗粒溶化性检查，取 10 g 合格颗粒，加入 200 mL 热水，观察是否于 5 min 内完全溶解。

④ 休止角：采用固定漏斗法测定，取 3 只相同的漏斗固定在铁架台上，底端依次相接，并与桌面保持水平，将漏斗底部距离坐标纸的高度 H 固定为 1 cm，将颗粒沿着顶端漏斗内壁倒入，直至颗粒堆积与底端漏斗口接触，读出圆锥底部的直径 R，计算休止角 α。

2.5.2 辅料种类的筛选 取相对密度为 1.27 的浸膏 10 g 共 5 份，分别加入辅料各 15 g，制粒，计

算成型率和吸湿率，记录颗粒在制备过程中的难易情况和溶化性。

2.5.3 辅料用量考察结果　在预实验中，将稠浸膏与辅料（糊精∶淀粉＝1∶1）等比例混合，得到的软材略干，不易制粒。因此选用不同配比进行考察，并以制粒情况、成型率、吸湿率、休止角和溶化性作为评价指标，选出最佳的药辅比例。

2.6 临界相对湿度

精密称量颗粒剂样品，每份 1.0 g，称取 21 份，放入以恒定重量的扁形称量瓶中，平均分配到 7 种湿度环境中，一周后取出，精密称定，计算吸湿率。

2.7 苏葶宣肺颗粒对大鼠离体气管平滑肌的影响

2.7.1 药液的制备　取苏葶宣肺颗粒 50 g（1 g 颗粒相当于原药材 1.27 g），加水配制成质量浓度为 1 g・mL^{-1} 的药液，放于 4 ℃冷藏备用。

2.7.2 大鼠离体气管环的制备　用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠，迅速将颈部正中央的表皮剪开，分离气管，沿甲状软骨底部至气管下部分叉处截取气管。将截取后的气管放入预先配制的 4 ℃预冷营养液中，除去气管环周围多余组织后，将气管剪切成长度约为 2 ～ 4 mm 的气管环，立即将气管环下端固定在恒温浴槽中，上端固定在张力传感器上，静息张力调节至 1.0 g，使气管环在 20 mL 预热 37 ℃的营养液中平衡 60 min，每间隔 15 min 更换一次预热的营养液，并持续向浴槽内通入混合气体（95%O_2 和 5%CO_2），待气管环张力趋于稳定后再进行后续实验[11-12]。

2.7.3 苏葶宣肺颗粒对大鼠离体气管正常状态下的舒张作用　实验开始，用 BL-420S 生物机能系统记录一段正常曲线，待张力稳定后加入苏葶宣肺颗粒药液，使终质量浓度为 0.20 g・mL^{-1}，观察 30 min 内曲线变化；对照组加入相应体积的蒸馏水。计算苏葶宣肺颗粒的解痉率，解痉率（%）＝（给药前曲线高度－给药后曲线高度）/给药前曲线高度 ×100%。每次加药观察结束后用 K-H 液冲洗 3 次，待张力曲线恢复至平稳状态再开始下一次实验。

2.7.4 苏葶宣肺颗粒对大鼠离体气管 ACh 致痉的舒张作用　在大鼠离体气管环张力稳定后，加入 ACh（0.33×10^{-4} g・mL^{-1}），观察 30 min 内曲线变化，作为 30 min 内 ACh 对离体气管的正常影响（作为对照组），并记录最高点和最低点数值（计算解痉率）。待加入 Ach 张力稳定后，加入苏葶宣肺颗粒药液，观察 30 min 内曲线变化幅度并记录气管收缩曲线。计算苏葶宣肺颗粒的解痉率。

2.7.5 苏葶宣肺颗粒对大鼠离体气管 His 致痉的舒张作用　在大鼠离体气管环张力稳定后，加入 His（0.33×10^{-5} g・mL^{-1}），观察 30 min 内曲线变化，作为 30 min 内 His 对离体气管的正常影响（作为对照组），并记录最高点和最低点数值（计算解痉率）。待加入 His 张力稳定后，加入苏葶宣肺颗粒药液，观察 30 min 内曲线变化幅度并记录气管收缩曲线。计算苏葶宣肺颗粒的解痉率。

2.7.6 统计学方法　数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用 Dunnet-*t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

苏葶宣肺颗粒色谱图见图 1，迷迭香酸和黄芩苷分离良好。迷迭香酸回归方程 $Y = 2.28\times10^{7}X - 4.60\times10^{4}$，$r = 0.9995$，线性范围 0.0125 ～ 0.075 mg・$mL^{-1}$；黄芩苷回归方程 $Y = 1.66\times10^{7}X - 1.89\times10^{5}$，$r = 0.9997$，线性范围 0.175 ～ 1.05 mg・$mL^{-1}$。精密度实验结果表明，迷迭香酸和黄芩苷的峰面积 *RSD* 均为 1.5%（$n = 6$）；重复性实验结果表明，迷迭香酸和黄芩苷的峰面积 *RSD* 分别为 1.6% 和 0.30%（$n = 6$）；稳定性实验结果表明，迷迭香酸和黄芩苷的峰面积 *RSD* 分别为 0.96% 和 0.30%（$n = 6$）。加样回收实验结果表明，迷迭香酸和黄芩苷的平均回收率分别为 99.48%、99.045%，*RSD* 分别为 1.9%、0.20%（$n = 6$）。说明方法考察均符合要求。

3.2 正交实验结果及方差分析

根据表 2、3 结果可知，3 个因素对水提工艺均未见显著影响（$P > 0.05$），各因素的影响程度为 A ＞ B ＞ C，即提取次数对提取效果的影响最大，其次是提取时间，最后是加水倍量。正交实验结果得出的最佳提取工艺为 $A_3B_3C_3$，基于实际生产和成本节约的考虑，最终确定的最佳提取工艺为 $A_2B_2C_1$，即加水倍量为 10 倍，提取次数为 2 次，每次提取 60 min。

3.3 验证实验结果

表 4 的数据显示了按处方比例制备供试品溶液的工艺稳定可行。

3.4 成型工艺研究结果

3.4.1 辅料种类筛选结果　辅料种类筛选见表 5，结果表明糊精成型率偏低，但细粉较多；淀粉成型率较高，但制成软材偏干，不易制粒；糊精∶淀粉（1∶1）混合制软材，软材略干，易成型，不易制粒，成型率也适中，故选用糊精、淀粉混合作为赋形剂。

3.4.2 辅料用量考察结果　辅料用量考察结果见表 6，数据显示，当浸膏∶糊精∶淀粉＝3∶2.5∶4

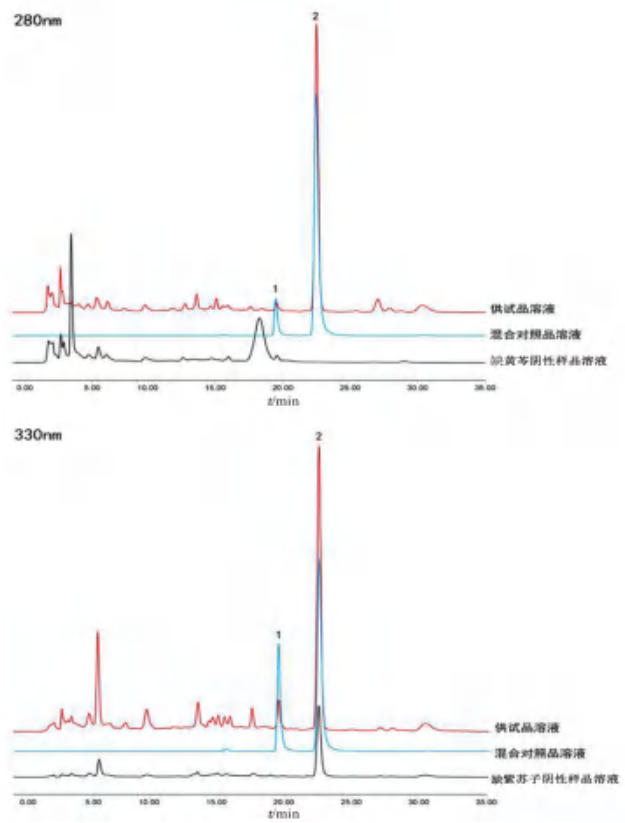


图 1 苏葶宣肺颗粒高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of Suting Xuanfei granules

1. 迷迭香酸（rosmarinic acid）；2. 黄芩苷（baicalin）

时，其评价指标的结果均较好。

3.4.3 临界相对湿度测定结果 由图 2 可知，颗粒剂的临界相对湿度约为 72.5%，故在生产过程中，湿度应控制在 72% 以下。

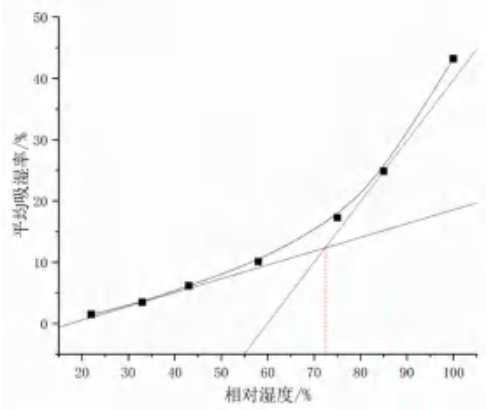


图 2 苏葶宣肺颗粒的临界相对湿度

Fig 2 Critical relative humidity of Suting Xuanfei granules

根据以上实验结果，确定本制剂的最佳成型工艺为：稠浸膏、糊精、淀粉按 3∶2.5∶4 的比例制成软材，用 10 目筛网制成颗粒。在此条件下，制得的颗粒成型率较高，适合批量生产。

3.5 苏葶宣肺颗粒对大鼠离体气管的影响

3.5.1 苏葶宣肺颗粒对大鼠正常状态离体气管环静息张力的影响 结果见图 3A，计算解痉率发现，与空白对照组比较，给予苏葶宣肺颗粒药后，解痉率增大（1.28% *vs* 16.76%，$P < 0.05$），说明苏葶宣肺颗粒对正常状态下的大鼠气管平滑肌有舒张作用。

表 2 苏葶宣肺颗粒提取工艺正交实验及结果

Tab 2 Orthogonal test and results of extraction of Suting Xuanfei granules

实验号	A	B	C	D	迷迭香酸含量 /mg	黄芩苷含量 /（mg·g^{-1}）	浸膏得率 /%	综合评分
1	1	1	1	1	5.46	3.91	12.80	47.45
2	1	2	3	2	6.02	5.17	15.26	57.58
3	1	3	2	3	9.21	5.55	15.36	69.41
4	2	1	1	3	9.70	7.35	17.11	81.35
5	2	2	2	1	9.11	5.23	19.42	71.09
6	2	3	3	2	12.66	8.43	17.29	96.00
7	3	1	2	2	8.83	8.01	20.92	85.28
8	3	2	1	3	11.66	8.08	22.06	95.35
9	3	3	3	1	12.97	7.37	22.72	96.49
k_1	174.44	214.08	224.14	215.03	—	—	—	—
k_2	248.45	224.02	225.79	238.87	—	—	—	—
k_3	277.12	261.91	250.08	246.11	—	—	—	—
R	102.68	47.83	25.94	31.08	—	—	—	—

表 3 方差分析

Tab 3 Variance analysis

方差来源	SS	v	MS	F 值	P 值
A	1871.25	2.00	935.62	10.61	＞0.05
B	424.73	2.00	212.36	2.41	＞0.05
C	140.69	2.00	70.34	0.80	＞0.05
D（误差）	176.42	2.00	88.21	—	—

表 4 验证实验

Tab 4 Verifying the experiment

验证实验	迷迭香酸含量 /mg	黄芩苷含量 /（mg·g^{-1}）	浸膏得率 /%	综合评分
1	12.21	8.03	19.04	92.52
2	11.96	7.96	19.23	91.58
3	12.07	8.05	18.96	92.11
平均值	12.08	8.01	19.08	92.07
RSD/%	1.04	0.59	0.73	0.51

表 5　辅料种类筛选结果

Tab 5　Selection of auxiliary material types

辅料	制软材情况	溶化性	吸湿率 /%	成型率 /%
糊精	略黏，细粉较多，易制粒	易溶解，无可见沉淀物	10.03	91.22
乳糖	黏度太大，无法制软材	—	—	—
可溶性淀粉	偏干，易成型，不易制粒	易溶解，无可见沉淀物	10.88	93.43
微晶纤维素	黏度太大，无法制软材	—	—	—
糊精 - 淀粉（1∶1）	略干，易成型，不易制粒	易溶解，无可见沉淀物	9.57	90.48

表 6　辅料用量考察结果

Tab 6　Inspection of auxiliary material consumption

药辅比	制软材情况	溶化性	吸湿率 /%	成型率 /%	休止角 /°
浸膏:糊精:淀粉（3∶2∶4）	略黏，颗粒易粘连	易溶解，无可见沉淀物	9.67	91.03	21.82
浸膏:糊精:淀粉（3∶2∶4.5）	偏干，细粉较多，不易制粒	易溶解，无可见沉淀物	10.22	86.06	24.33
浸膏:糊精:淀粉（3∶2.5∶4）	软材适中，易制粒，颗粒颜色大小均匀	易溶解，无可见沉淀物	9.43	91.36	22.15
浸膏:糊精:淀粉（3∶2.5∶3.5）	略黏，不易制粒	易溶解，无可见沉淀物	10.96	86.30	26.01

3.5.2　苏葶宣肺颗粒对 ACh 预收缩气管环张力的影响　结果见图 3B，在给予 ACh 张力稳定后，与单独给予 ACh 比较，给予苏葶宣肺颗粒解痉率增大（5.93% *vs* 26.29%，$P < 0.01$），说明苏葶宣肺颗粒能抑制 ACh 引起的大鼠离体气管环收缩。

3.5.3　苏葶宣肺颗粒对 His 预收缩气管环张力的影响　结果见图 3C，给予 His 张力稳定后，与单独给予 His 比较，给予苏葶宣肺颗粒解痉率增大（6.28% *vs* 33.08%，$P < 0.01$），说明苏葶宣肺颗粒能抑制 His 引起的大鼠离体气管环收缩。

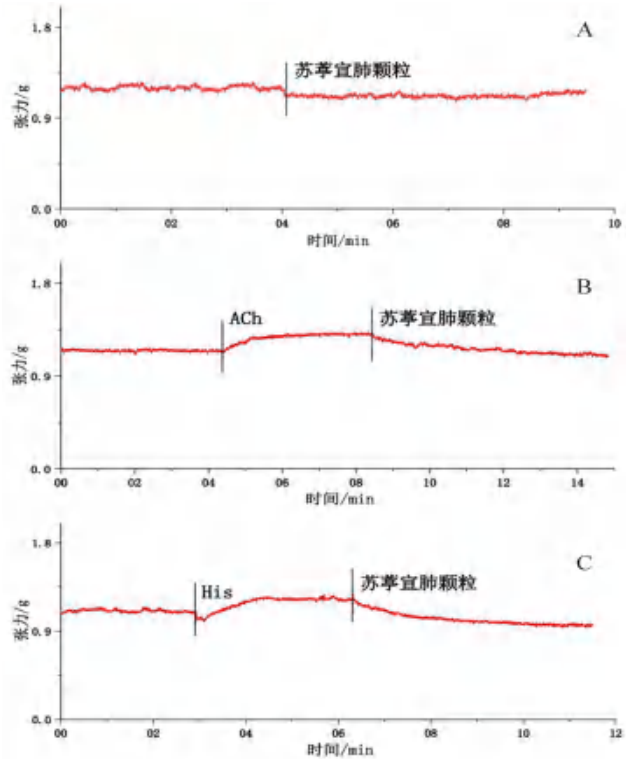


图 3　苏葶宣肺颗粒对不同状态离体气管环张力的影响

Fig 3　Effect of Suting Xuanfei decoction on the tension of isolated tracheal rings in different states

A. 正常状态（normal state）；B.ACh 致痉状态（ACh spasmodic state）；C.His 致痉状态（His spasmodic state）

4　讨论

研究表明，苏葶宣肺颗粒中的君药紫苏子具有泻肺化痰、止咳平喘的功效，常与葶苈子搭配作为药对联合治疗支气管哮喘 [13]。郝佳雪 [14] 通过对紫苏子抗哮喘的活性成分筛选，发现其活性成分为迷迭香酸，并且能够降低哮喘模型大鼠血清中免疫球蛋白 E（Ig E）、抗卵清蛋白免疫球蛋 E（Ova-Ig E）含量，减少肺泡灌洗液中的 Ig E、Ova-Ig E 和嗜酸性粒细胞含量，显著降低炎症因子白细胞介素 4（IL-4）、白细胞介素 5（IL-5）、白细胞介素 13（IL-13）的表达。张桐茂等 [15] 发现葶苈子总黄酮有拮抗血小板激活因子的作用，Kim 等 [16] 发现葶苈子对大鼠气道平滑肌细胞的增殖有抑制作用，林红等 [17] 研究发现南葶苈子提取物可能通过调节肺组织中的 CyclinD1 蛋白和 PI3K mRNA 的表达来发挥其抗哮喘作用。黄芩中的主要有效成分为黄芩苷和黄芩素 [18]，黄芩素可通过上调 miR-625-5p 的表达抑制支气管哮喘小鼠的细胞增殖率、迁移率以及炎性因子水平 [19]。黄芩素还可抑制 JAK2 的激活，抑制 STAT3 的磷酸化和核转位，影响相关基因的表达，从而抑制气道平滑肌细胞的增殖和迁移 [20]。Xu 等 [21] 学者研究发现，黄芩苷通过调节 Th17/Treg 反应的免疫失衡，可有效地预防卵清蛋白联合脂多糖诱导的小鼠过敏性哮喘。Hu 等 [22] 发现，黄芩苷对气道重塑和抑制气道平滑肌细胞（ASMC）增殖的作用可能是通过抑制 RAS 信号通路来实现 [22]。故本实验选择迷迭香酸和黄芩苷作为指标性成分，采用 HPLC 测定其含量 [23-25]。

在优化苏葶宣肺颗粒的提取工艺时，以提取次数、提取时间和加水倍量作为主要影响因素，并以迷迭香酸、黄芩苷的含量和浸膏得率为评价指标进行正交实验来优选出最佳的提取工艺。结果发现三个因素对提取工艺的影响均不显著，综

合考虑生产实际和成本节约的角度，最终确定的最佳提取工艺为：加 10 倍量水浸泡 30 min，提取 2 次，每次 60 min。为节约生产成本，制粒方法选择湿法制粒，稠浸膏加辅料制粒。糊精和淀粉是颗粒剂的常用辅料，可溶性淀粉与浸膏混合，制得的软材偏干，不易制粒；而糊精与浸膏混合，制得的软材稍黏，故将两种辅料混合使用。另外，在实验过程中发现，本品不需要额外添加润湿剂。

药效实验结果表明，苏葶宣肺颗粒对静息状态和 ACh、His 所致气管平滑肌的收缩均有抑制作用，且对 His 所诱导气管收缩的抑制作用更明显。His 通过作用于 H1 受体从而引起支气管平滑肌痉挛，ACh 可与气管平滑肌上的乙酰胆碱受体结合从而引起气管平滑肌收缩 [12]。说明苏葶宣肺颗粒舒张气管平滑肌的作用机制可能与抑制 H1 受体和胆碱受体有关。

综上所述，本实验优选的苏葶宣肺颗粒提取工艺稳定可行，并具有良好的重现性，所制得的颗粒质量稳定，可用于苏葶宣肺颗粒的生产。苏葶宣肺颗粒对静息状态及致痉剂处理的大鼠离体支气管平滑肌具有舒张作用，其作用机制可能与抑制 H1 受体和胆碱受体有关。这为其进一步的研究提供了实验依据，由于离体实验脱离生理环境，有一定局限性，故需经过体内实验进一步验证。

参考文献

[1] Papi A，Brightling C，Pedersen SE，et al. Asthma [J]. Lancet，2018，391（10122）：783-800.

[2] Yang ZC，Qu ZH，Yi MJ，et al. MiR-448-5p inhibits TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by targeting Six1 in asthma [J]. J Cell Physiol，2019，234（6）：8804-8814.

[3] Zhang LX，Ma C，Wang XY，et al. Lipopolysaccha-ride-induced proliferation and glycolysis in airway smooth muscle cells via activation of Drp1 [J]. J Cell Physiol，2019，234（6）：9255-9263.

[4] Huang KW，Yang T，Xu JY，et al. Prevalence，risk factors，and management of asthma in China：a national cross-sectional study [J]. Lancet，2019，394（10196）：407-418.

[5] Zhao P，Liu J，Ming Q，et al. Dandelion extract relaxes mouse airway smooth muscle by blocking VDLCC and NSCC channels [J]. Cell Biosci，2020，10：125.

[6] 迪丽美合日·迪力夏提，杨梅，陈良，等 . 基于熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优选二陈桑贝止咳颗粒提取工艺 [J]. 上海中医药杂志，2022，56（3）：74-79.

[7] 安中原，陈育煌，余巧，等 . 正交实验优选吴茱萸汤提取工艺 [J]. 中国药业，2023，32（12）：62-66.

[8] 崔思娇，汪宇，张大军，等 . 正交设计法优选通脉分散片的水提取工艺 [J]. 当代化工，2023，52（3）：575-578.

[9] 洪博，刘军，林宇，等 . 正交实验优选十枣汤的提取工艺 [J]. 中国药业，2023，32（9）：33-36.

[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：145-146.

[11] 武夏，朱亚飞，马锐，等 . 桑白皮汤对豚鼠离体气管平滑肌的舒张作用 [J]. 宁夏医科大学学报，2020，42（10）：987-990，995.

[12] 董阳，王碧涵，邹一卓，等 . 南、北五味子对离体大鼠气管平滑肌张力的影响 [J]. 北华大学学报（自然科学版），2023，24（3）：300-305.

[13] 魏文海，李兴芳，赵琼，等 . 基于网络药理学探讨紫苏子 - 葶苈子治疗支气管哮喘的作用机制 [J]. 实用中医内科杂志，2022，36（12）：1-4，后插 1- 后插 3.

[14] 郝佳雪 . 紫苏子抗哮喘活性成分的筛选、药效评价及机制研究 [D]. 西安：西北大学，2021.

[15] 张桐茂，刘炜，孔德颖 . 南葶苈子中的指标成分槲皮素 -3-*O*-β-D- 葡萄糖基 -7-*O*-β-D- 龙胆双糖苷对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部免疫功能调节机制研究 [J]. 中草药，2019，50（4）：910-917.

[16] Kim SB，Seo YS，Kim HS，et al. Anti-asthmatic effects of lepidii seu Descurainiae Semen plant species in ovalbumin-induced asthmatic mice [J]. J Ethnopharmacol，2019，244：112083.

[17] 林红，张玲 . 南葶苈子提取物对哮喘大鼠肺组织中 CyclinD1、PI3K 表达的影响 [J]. 中成药，2022，44（9）：3037-3040.

[18] Baradaran Rahimi V，Askari VR，Hosseinzadeh H. Promising influences of Scutellaria baicalensis and its two active constituents，baicalin，and baicalein，against metabolic syndrome：a review [J]. Phytother Res. 2021，35（7）：3558-3574.

[19] 高辉，刘恭，韩仙菊 . 黄芩素上调 miR-625-5p 表达干预支气管哮喘小鼠的机制研究 [J]. 陕西中医，2022，43（7）：838-841.

[20] 余保，申严，卓宋明 . 黄芩素对哮喘小鼠气道平滑肌细胞增殖、迁移及 JAK/STAT 通路的影响 [J]. 广西医科大学学报，2021，38（9）：1692-1697.

[21] Xu L，Li JX，Zhang Y，et al. Regulatory effect of baicalin on the imbalance of Th17/Treg responses in mice with allergic asthma [J]. J Ethnopharmacol，2017，208：199-206.

[22] Hu LL，Li LL，Yan C，et al. Baicalin inhibits airway smooth muscle cells proliferation through the ras signaling pathway in murine asthmatic airway remodeling model [J]. Oxid Med Cell Longev，2023，2023：4144138.

[23] 何艳，胡小祥，张霞，等 . HPLC 测定杜仲降压片中的绿原酸、迷迭香酸和黄芩苷 [J]. 华西药学杂志，2019，34（4）：410-412.

[24] 刘思凡 . HPLC 法同时测定小儿宣肺止咳颗粒中 8 种成分含量 [J]. 中国药师，2019，22（11）：2120-2123.

[25] 孙慧珠，刘晓明，徐乐，等 . 杜仲降压片质量标准的提高与优化 [J]. 药物分析杂志，2020，40（8）：1514-1520.

（收稿日期：2023-10-19；修回日期：2023-11-24）

三种递送体系对麝香草酚在致病菌胞内吸收的影响

徐谭芳[1, 2, 5]，刘军锋[1, 2, 5*]，王平[3, 5]，昝俊峰[1, 5]，杨可[1, 2, 5]，田代志[3, 5]，陈茂华[4, 5*]（1.湖北中医药大学药学院，武汉　430065；2.湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室，武汉　430065；3.湖北中医药大学老年脑健康中医药防护技术与新产品研发教育部工程研究中心，武汉　430065；4.宜昌市中医医院，湖北　宜昌　443000；5. 湖北时珍实验室，武汉　430065）

摘要：目的　研究阳离子 -*β*- 环糊精（C-*β*-CD）、羟丙基 -*β*- 环糊精（HP-*β*-CD）及 10% 乙醇三种药物递送体系对麝香草酚（THY）在大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌内吸收的影响。**方法**　采用倍半稀释法确定 C-*β*-CD-THY、HP-*β*-CD-THY 包合物和 THY 10% 乙醇溶液的最低抑菌浓度（*MIC*），通过生长曲线测定其抑菌活性，并采用高效液相色谱法建立 THY 的测定方法，测定大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌对 C-*β*-CD-THY、HP-*β*-CD-THY 包合物和 THY 10% 乙醇溶液的胞内吸收量。运用扫描电镜分析两种细菌经药物处理后的形态学变化。**结果**　THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 对大肠埃希菌的 *MIC* 分别为 1.66、1.66、2.13 mmol•L^{-1}，对金黄色葡萄球菌的 *MIC* 依次为 0.83、0.83、1.66 mmol • L^{-1}。大肠埃希菌对 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 的胞内吸收量分别为 THY 水溶液组的 2.2 倍和 1.6 倍，金黄色葡萄球菌对 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 的胞内吸收量分别为 THY 水溶液组的 6.5 倍和 5.5 倍。经 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 处理后，菌体表面皱缩凹陷，细胞膜破坏严重，大量细胞丧失完整性。**结论**　环糊精包合物能破坏细菌细胞膜，增加 THY 在大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的胞内浓度，提高其生物利用度，环糊精及其衍生物可代替乙醇作为辅料，以发挥增溶、促透作用，并提高药物安全性。与 HP-*β*-CD-THY 相比，C-*β*-CD-THY 包合物的抑菌效果更佳，可作为更高效的抑菌剂应用于食品药品等领域。

关键词：阳离子 -*β*- 环糊精；羟丙基 -*β*- 环糊精；麝香草酚；包合物；递送体系
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0619-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.011

Effect of 3 delivery systems on the intracellular uptake of thymol in pathogenic bacteria

XU Tan-fang[1, 2, 5], LIU Jun-feng[1, 2, 5*], WANG Ping[3, 5], ZAN Jun-feng[1, 5], YANG Ke[1, 2, 5], TIAN Dai-zhi[3, 5], CHEN Mao-hua[4, 5*] (1. *College of Pharmacy*, *Hubei University of Chinese Medicine*, *Wuhan* 430065; 2. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Compounds*, *Ministry of Education*, *Hubei University of Chinese Medicine*, *Wuhan* 430065; 3. *Engineering Research Center of the Ministry of Education on R&D of TCM Protection Technology and New Products for Elderly Brain Health*, *Hubei University of Chinese Medicine*, *Wuhan* 430065; 4. *Yichang Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Yichang Hubei* 443000; 5. *Hubei Shizhen Laboratory*, *Wuhan* 430065)

Abstract: Objective To determine the effect of cationic-*β*-cyclodextrin (C-*β*-CD), hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin (HP-*β*-CD) and 10% ethanol delivery systems on the absorption of thymol (THY) in *Escherichia coli* (*E.coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). **Methods** The minimum inhibitory concentration (*MIC*) of C-*β*-CD-THY, HP-*β*-CD-THY inclusion complexes and 10% ethanol solution of THY were determined with the doubled-and-half dilution method. The bacteriostatic activity was

基金项目：湖北中医药大学重大项目培育计划（No. 2019ZXZ002）；教育部高等学校博士学科点专项科研基金（No. 20124230120004）。
作者简介：徐谭芳，女，硕士研究生，主要从事药剂学研究，email：1344824282@qq.com　*通信作者：刘军锋，男，副教授，主要从事中药资源与开发研究，email：1105787683@qq.com；陈茂华，男，副主任药师，主要从事药剂学研究，email：79198685@qq.com

determined with growth curve. The intracellular uptake of C-*β*-CD-THY, HP-*β*-CD-THY inclusion complexes and THY 10% ethanol solution by *E.coli* and *S.aureus* were determined by HPLC. Scanning electron microscopy was used to analyze the morphological changes of the two bacteria after the drug treatment. **Results** The *MIC*s of THY 10% ethanol solution, C-*β*-CD-THY and HP-*β*-CD-THY against *E.coli* were 1.66, 1.66, and 2.13 mmol•L^{-1}, respectively, and the *MIC*s against *S.aureus* were 0.83, 0.83, and 1.66 mmol • L^{-1}. The intracellular uptake of C-*β*-CD-THY and HP-*β*-CD-THY by *E.coli* was 2.2 and 1.6 times higher than that of the THY water solution group. The intracellular uptake of C-*β*-CD-THY and HP-*β*-CD-THY by *S.aureus* was 6.5 and 5.5 times higher than that of the THY water solution group, respectively. Scanning electron microscopy revealed that C-*β*-CD-THY and HP-*β*-CD-THY treatment caused severe damage to the bacterial, resulting in crumpling and indentation and loss of cellular integrity. **Conclusion** Cyclodextrin inclusion complexes can disrupt bacterial cell membranes, increase the intracellular concentration of THY in *E.coli* and *S.aureus*, and enhance the bioavailability of THY. Cyclodextrins and their derivatives can be used as solubilizing excipients instead of ethanol to improve drug safety. The C-*β*-CD-THY inclusion complexes have better antimicrobial effect compared with HP-*β*-CD-THY, which can be used as an effective bacteriostatic agent in food and drugs.

Key words: cationic-*β*-cyclodextrin; hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin; thymol; inclusion complex; delivery system

麝香草酚（thymol，THY）是一种单萜酚，是百里香、罗勒、牛至、薄荷等唇形科植物精油的主要成分，因其抗菌和抗真菌特性而被广泛应用于食品、医疗等领域，成为临床抗菌治疗的候选药物[1]。但 THY 因气味特殊、水溶性低、易挥发等缺点限制了其应用[2]。乙醇是中药注射剂及其他制剂中脂溶性活性物质的常用助溶剂，但与头孢类药物联用后可能出现药源性双硫仑样反应（也称为乙醛综合征）[3-4]。其中儿童用药中双硫仑样反应诱发因素隐蔽，更应重视。此外，含醇辅料外用制剂可能对皮肤产生较强的刺激性，影响用药依从性[5]。环糊精作为增溶赋形剂，具有安全环保的特性，环糊精分子可通过非共价相互作用与疏水客体分子形成主 - 客体超分子体系[6]，从而提高药物溶解度和生物利用度，增强药物稳定性，掩盖药物不良气味，减少药物对机体的刺激及不良反应，靶向控释给药[7]，是改善药物溶解度、稳定性、口感等成药性因素的理想材料[8]。羟丙基 -*β*- 环糊精（hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin，HP-*β*-CD）是目前 FDA 批准的仅有的两种可注射用环糊精辅料之一，是环糊精衍生物中毒副作用最小的药用辅料[9]。有研究报道，使用 HP-*β*-CD 包合伏立诺他能提高其溶解度，且包合物溶液角膜渗透能力更强，伏立诺他角膜生物利用度提高了 3 倍以上，结膜生物利用度提高了 2 倍以上[10]。Hassan 等[11]发现 HP-*β*-CD 包合的芦丁纳米晶具有更小的粒径，更高的药物捕获效率、胶体稳定性和药物光稳定性，且在小鼠皮肤中释放和渗透的药物比例明显更高。HP-*β*-CD 安全性高，水溶性强，但对于药物的包合能力弱。阳离子 -*β*- 环糊精（cationic-*β*-cyclodextrin，C-*β*-CD）具有较好的水溶性及包合能力，具有低细胞毒性[12]。Rassu 等[13]以 PC12 和 Caco-2 作为神经元型和上皮型细胞评估阳离子环糊精和其聚合物的细胞毒性，在 5 μmol • L^{-1} 浓度暴露下可认为是无毒的，且对暴露于过氧化氢的细胞具有保护作用。此外，有研究证实具有增溶、光敏及正电荷特性的阳离子环糊精在大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌中展现出广谱抗菌活性[14]。且研究指出，阳离子抗菌剂的抑菌效果来自阳离子，它可以通过扰乱细菌细胞壁的脂质双分子层和增加细胞膜的渗透性来破坏细胞膜[15]。阳离子环糊精超分子体系作为生物材料，可诱使生物体细胞膜损伤，能有效提高致病菌对抗菌药物的敏感度，降低致病菌的耐药性，阳离子季铵基团有助于将阳离子聚合物插入带负电荷的细菌膜中从而导致膜损伤，细菌因胞内物泄漏而死亡[16]。因此，本研究考察 C-*β*-CD、HP-*β*-CD 及 10% 乙醇三种递送系统对 THY 在大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌内吸收特性的影响，以期发掘 C-*β*-CD 和 HP-*β*-CD 两种环糊精衍生物替代乙醇作为增溶辅料的潜力，为 THY 作为抑菌剂应用于医药食品等领域提供依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪、柱温箱、DAD 检测器以及变色龙色谱在线分析软件等 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；JSM-6510LV 扫描电子显微镜（日本电子株式会社）；250A 生化培养箱（金坛市天竟实验仪器厂）；HPY-91R 恒温培养摇床（上海跃进医疗器械有限公司）；VD-850 超净台（上海力辰邦西仪器科技公司）；DSX-24X 立式高压蒸汽灭菌锅（上海申安医疗器械厂）。

1.2　试药

THY（上海阿拉丁科技有限公司，含量：98%，批号：G1329002）；HP-*β*-CD-THY（实验室自制，THY 含量 60.15 mg • g^{-1}），C-*β*-CD-THY 包合物（实验室自制，THY 含量 61.45 mg • g^{-1}）；无水乙醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；戊二醛（上海阿拉丁科技有限公司，含量：50%，批号：D2130144）；金黄色葡萄球菌 CMCC（B）26003（C0306B）、大肠埃希菌 CMCC（B）44102（A1013B）(上海鲁微科技有限公司)；LB 肉汤（青岛海博生物科技有限公司）；营养琼脂（杭州滨河微生物试剂）。

2　方法与结果

2.1　最低抑菌浓度（*MIC*）和最低杀菌浓度（*MBC*）的测定

MIC 的测定参照侯敏娜等 [17] 的方法并加以改进，用 LB 液体培养基将 THY 水溶液、THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY 按倍半稀释法稀释，使其终浓度为 3.33、1.66、0.83、0.41、0.20、0.10、0.05 mmol • L^{-1}，分别与 1×10^6 CFU • mL^{-1} 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌菌悬液混匀；HP-*β*-CD-THY 样品溶液稀释至终浓度为 3.33、1.66、0.83、0.41、0.2、0.1、0.05 mmol•L^{-1} 和 4.26、2.13、1.06、0.53、0.26、0.13、0.07 mmol • L^{-1}，依次与 1×10^6 CFU • mL^{-1} 金黄色葡萄球菌菌和大肠埃希菌菌悬液混匀。每孔载液量为 200 μL，每个浓度设 3 个复孔，阴性对照组为 100 μL 10% 乙醇 / 水和 100 μL 菌悬液，空白对照组为 100 μL 液体培养基和 100 μL 菌悬液，将 96 孔板封口置于 37 ℃培养箱摇床培养 24 h。以无肉眼可见微生物生长（即不产生浑浊的孔）的最低浓度为 *MIC*，从浓度高于 *MIC* 的孔中取 100 μL 培养液涂布于琼脂培养基平板上，37 ℃培养 24 h，以无菌落生长的最低浓度为 *MBC*。实验重复 3 次。

THY 及其包合物对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的 *MIC* 及 *MBC* 测定结果见表 1。结果表明 THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY 及 HP-*β*-CD-THY 对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌均具有抑菌效果，与大肠埃希菌相比，金黄色葡萄球菌对 THY 更敏感。C-*β*-CD-THY 对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌的 *MIC* 与 THY 10% 乙醇溶液相比无明显差异。与 THY 水溶液相比，抑菌效果显著增加，结果表明环糊精能通过提高 THY 的溶解度从而提高其生物利用度。

表 1　THY10% 乙醇溶液、HP-*β*-CD-THY、C-*β*-CD-THY 的 *MIC* 及 *MBC*

Tab 1　*MIC* and *MBC* of THY 10% ethanol solution，HP-*β*-CD-THY and C-*β*-CD-THY

样品	大肠埃希菌 /（mmol • L^{-1}）		金黄色葡萄球菌 /（mmol • L^{-1}）	
	MIC	*MBC*	*MIC*	*MBC*
THY 水溶液	＞ 3.33	＞ 3.33	＞ 3.33	＞ 3.33
THY 10% 乙醇溶液	1.66	1.66	0.83	0.83
HP-*β*-CD-THY	2.13	2.13	1.66	1.66
C-*β*-CD-THY	1.66	1.66	0.83	0.83

2.2　生长曲线的测定

分别取 100 μL THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY、HP-*β*-CD-THY 溶液与 100 μL 菌悬液混匀，使其终浓度分别为 1/2*MIC*、*MIC*、2*MIC*，以每孔载液量 200 μL 加入 96 孔板。37 ℃培养 18 h，每隔 1 h 在 600 nm 处测定其吸光度值，以时间为横坐标，吸光度值为纵坐标绘制生长曲线。每组设置 3 个复孔，实验重复 3 次。

THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY、HP-*β*-CD-THY 对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的生长曲线的影响见图 1，对照组细菌（未经药物处理）在 5 h 前为迟缓期，5 ～ 12 h 期间为对数生长期，12 h 以后生长曲线达到稳定期。在 1/2*MIC* 给药浓度下，细菌受到抑制，但与对照组相比无明显差异。而在 *MIC* 给药浓度下细菌迟缓期明显延长，且细菌数量明显减少。此外，经 2*MIC* 给药浓度处理的两种致病菌其生长增殖完全受到抑制。结果表明 THY 及其包合物对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的生长具有明显抑制作用，且具有浓度依赖性。

2.3　HPLC 法检测 THY 含量

2.3.1　色谱条件　色谱柱：Athena C18-WP（4.6 mm×250 mm，5 μm）；波长：277 nm；柱温：30 ℃；流速：1 mL • min^{-1}；进样量：20 μL；梯度洗脱，程序见表 2，色谱图见图 2。

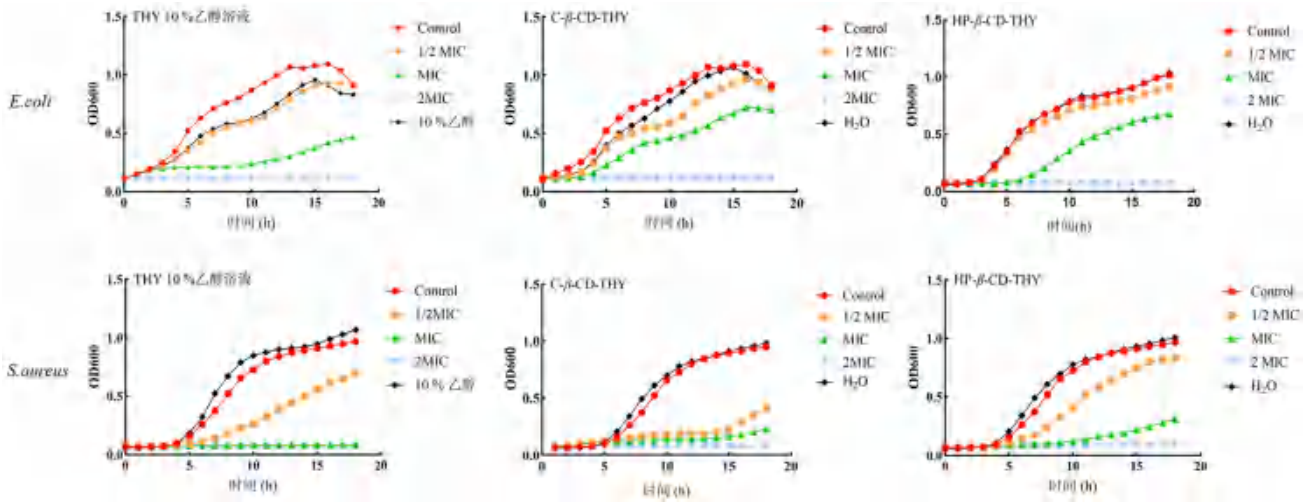


图 1 经不同样品处理后大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的生长曲线图

Fig 1 Growth curves of *E.coli* and *S.aures* after different sample treatments

表 2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

t/min	水 /%	甲醇 /%
0	55	45
3	40	60
10	40	60
12	20	80
25	20	80

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取 THY 对照品 1 mg 于 10 mL 量瓶中，加无水乙醇定容，得到浓度为 0.66 mmol • L^{-1} 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取“2.4”项下制备的上清液，即为供试品溶液。

2.3.4 专属性试验 取乙醇（空白溶剂）、对照品溶液、供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 2，供试品溶液与对照品溶液在相应保留时间处具有相同的色谱峰，且空白溶剂无干扰，表明该方法专属性良好。

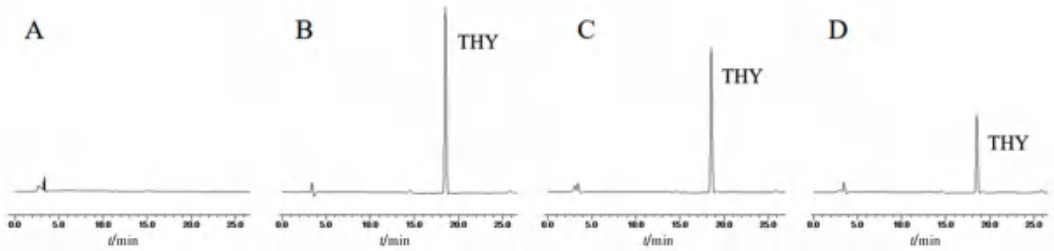


图 2 THY 的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of THY

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 对照品（control）；C. 处理后的 *E. coli* 样品（*E. coli* sample after the treatment）；D. 处理后的 *S. aureus* 样品（*S. aureus* sample after the treatment）

2.3.5 精密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱峰面积。测得 THY 的峰面积 *RSD* 为 0.90%，表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 按“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样分析。测得 THY 的含量 *RSD* 为 1.8%，表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析，记录色谱峰面积。测得 THY 的峰面积 *RSD* 为 1.9%，表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.3.8 线性关系考察 用无水乙醇配制 THY 0.03、0.06、0.13、0.26、0.39、0.53 mmol • L^{-1} 系列标准溶液，分别进样 20 μL，以浓度为横坐标（X，mmol • L^{-1}），峰面积为纵坐标（Y），绘制标准曲线，得其线性回归方程：$Y = 64.99X + 0.3145$，$R^2 = 0.9999$，表明 THY 在 0.03 ～ 0.53 mmol • L^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.3.9 加样回收试验 取 6 份已知含量的供试品溶液，分别加入 THY 对照品溶液，使加入量与供试品含量比为 1∶1，按“2.3.1”项下色谱条件

进样分析。测得平均加样回收率为 99.39%，*RSD* 为 1.7%。

2.4　细菌对 HTY 的摄取研究

细菌的摄取研究参照 Cai 等[18]的方法并稍作改进。取单个菌落于液体培养基中，37 ℃培养 16 ～ 18 h，取 1 mL 菌悬液 6000 r • min^{-1} 离心 10 min，PBS 洗三次后重悬，加入 THY 10% 乙醇溶液、HP-*β*-CD-THY、C-*β*-CD-THY 及 THY 水溶液使其终浓度为 *MIC*，37 ℃避光培养过夜，6000 r • min^{-1} 离心 10 min，弃上清液，加入 1 mL 无水乙醇溶液超声破碎细胞 30 min，静置过夜，6000 r • min^{-1} 离心 10 min，上清液经微孔滤膜过滤后进样分析。每个样品设 3 个平行组，取平均值。

如图 3 所示，THY 水溶液、HP-*β*-CD-THY、C-*β*-CD-THY 及 THY 10% 乙醇溶液在大肠埃希菌的胞内浓度依次为 0.05、0.08、0.12、0.16 mmol • L^{-1}，在金黄色葡萄球菌的胞内浓度依次为 0.01、0.07、0.08、0.11 mmol • L^{-1}。与 THY 水溶液组相比，C-*β*-CD-THY 及 HP-*β*-CD-THY 包合物处理组菌体对 THY 的摄取量明显增加，大肠埃希菌对 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 的胞内吸收量分别为 THY 水溶液组的 2.2 倍和 1.6 倍，金黄色葡萄球菌对 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 的胞内吸收量分别为 THY 水溶液组的 6.5 倍和 5.5 倍。推测环糊精提高了 THY 的水溶性，增强了药物膜渗透性，从而提高了药物生物利用度。

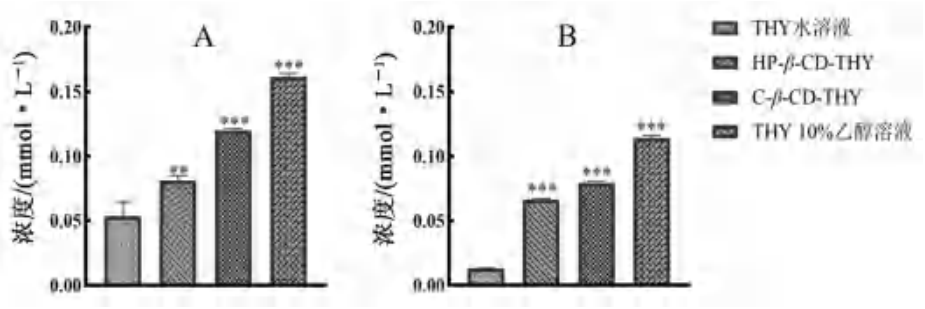


图 3　大肠埃希菌（A）和金黄色葡萄球菌（B）经不同处理后 THY 的胞内含量

Fig 3　Intracellular content of THY in *E.coli*（A）and *S.aureus*（B）after different treatments

注：与 THY 水溶液组比较，$^{**}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the THY water solution group，$^{**}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$.

2.5　细菌形态学分析

将 THY 10% 乙醇溶液、HP-*β*-CD-THY、C-*β*-CD-THY 与菌悬液混匀，样品溶液终浓度为 *MIC*，细菌终浓度为 1×10^6 CFU • mL^{-1}，将上述所有样品于 37 ℃、210 r • min^{-1} 摇床培养 24 h，取出菌液于 8000 r • min^{-1}、4 ℃下离心 10 min，收集菌体，PBS 洗涤两次，加适量体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液固定过夜。于 4 ℃、8000 r • min^{-1} 离心 4 min，加超纯水静置 10 min 后按上述条件再次离心，重复操作 3 次；用体积分数 50%、70%、80%、90% 乙醇溶液对样品进行梯度脱水，静置 15 min，8000 r • min^{-1} 离心 2 min 后加入无水乙醇静置 30 min，再次离心，重复操作 3 次。最后将样品置于通风橱中风干，固定在样品台，通过离子溅射仪喷金后，在扫描电子显微镜下观察细菌的形态特征[15]。

采用扫描电镜观察处理过的大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的微观形态，结果见图 4，处理前的大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌菌体形态饱满完整，THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY 及 HP-*β*-CD-THY 处理过的大肠埃希菌与金黄色葡萄球菌菌体出现凹陷、变形、粘黏聚集等形态变化，结果表明 THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY 及 HP-*β*-CD-THY 破坏了细胞膜完整性，进而改变细菌细胞膜渗透性，与 Al-Kandari 等[19]研究结果一致。

3　讨论

药物渗透性是影响抑菌活性的重要因素，当细菌活性受到影响时会出现外渗行为，而极性大、分子量小或分子量很大的化合物最不易发生外渗[20]，环糊精作为一种增溶辅料，具有暂时掩盖不良理化性质和影响生物膜渗透性的作用[21]。研究表明在环糊精存在下，特地唑胺的溶出速率增加，同时保持高渗透系数和抗微生物活性[22]。THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性均明显优于 THY 水溶液，可归因于 C-*β*-CD 和 HP-*β*-CD 提高了 THY 的溶解度。细菌摄取结果中 THY 10% 乙醇溶液组摄取量最高，大肠埃希菌对 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 的摄取量分别为 THY 水溶液组的 2.2 倍和 1.6 倍，金黄色葡

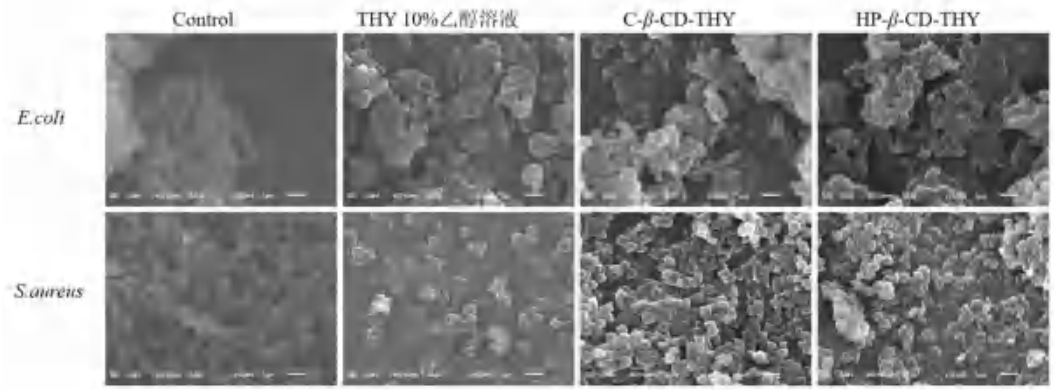


图 4 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌经不同处理的扫描电镜图

Fig 4 Scanning electron micrographs of *E.coli* and *S.aureus* with different treatments

萄球菌对 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 的摄取量分别为 THY 水溶液组的 6.5 倍和 5.5 倍，结果显示 C-*β*-CD 和 HP-*β*-CD 能有效提高 THY 生物膜渗透能力，增加其抑菌活性，进而提高其生物利用度。研究发现含醇辅料药品临床使用广泛，且常与可能发生双硫仑反应的抗菌药物联合应用，这使得临床用药存在潜在的安全隐患，而基于环糊精的纳米载药体系能提高载药系统的生物相容性及靶向性，可进一步深入研究 [23]。

细菌生命周期一般分为迟缓期、对数生长期、稳定期及衰亡期 [24]，生长曲线测试结果表明经 THY 10% 乙醇溶液、HP-*β*-CD-THY、C-*β*-CD-THY 处理后，*MIC* 给药浓度下细菌迟缓期明显延长，能有效抑制细菌生长繁殖，使细菌生长缓慢，数量下降，表明大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的迟缓期和对数生长期受 THY 10% 乙醇溶液、HP-*β*-CD-THY、C-*β*-CD-THY 的抑制作用明显，2*MIC* 浓度下抑菌效果较好，表明其抑菌效果具有浓度依赖性。而 C-*β*-CD-THY 的抑菌效果优于 HP-*β*-CD-THY，推测 C-*β*-CD 的促渗透能力优于 HP-*β*-CD。Rassu 等 [13] 在细胞摄取研究中也发现 C-*β*-CD 的渗透率高于 HP-*β*-CD，且能改善鼻腔药物吸收能力。此外，已有研究证实季铵盐阳离子有效增强了与细菌膜的静电结合作用，引发膜电位稳态失衡及胞内物质凝聚，进而使细菌死亡 [25]。细胞膜含有细菌代谢和维持体内平衡的近三分之一的蛋白质，是抗菌剂最重要的靶点之一，季铵盐类抗菌剂首先通过静电相互作用与细菌表面接触，增加药物在细胞膜的停留时间，改变细胞膜通透性，通过疏水结构与膜的亲和力进一步促进非极性尾部插入细菌细胞膜，促进气孔形成，导致细胞完整性丧失，最终导致细菌死亡 [26]。通过扫描电镜可以直观地观察到 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 处理后的菌体形态出现凹陷、变形、粘黏聚集等显著形态变化，进一步验证 C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 改变了细胞膜的通透性和完整性。

THY 10% 乙醇溶液、C-*β*-CD-THY 和 HP-*β*-CD-THY 对大肠埃希菌的 *MIC* 分别为 1.66、1.66 和 2.13 mmol • L^{-1}，对金黄色葡萄球菌的 *MIC* 依次为 0.83、0.83 和 1.66 mmol • L^{-1}。由 *MIC* 结果可知，THY 及其包合物对金黄色葡萄球菌的生长抑制更加明显。革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌）对 C-*β*-CD-THY 及 HP-*β*-CD-THY 具有较高敏感性可能是因为细菌为单膜结构，而革兰氏阴性菌（大肠埃希菌）具有复杂的双膜结构，包膜作为第一道防线包含多种防御机制，外膜含有各种蛋白质通道，以促进亲水性物质的被动流动，外排泵帮助细菌主动排出特定分子，导致其细胞膜通透性较低，更易产生耐药 [27]。解决抗菌药物渗透性相关问题或许是开发有效针对革兰氏阴性菌的抗菌药物的突破口。

综上所述，基于环糊精及其衍生物的纳米药物递送体系能有效提高疏水性药物的溶解度、药理活性及生物利用度，C-*β*-CD 和 HP-*β*-CD 作为增溶辅料代替乙醇可有效减少不良反应，与 HP-*β*-CD 相比，含有季铵阳离子基团的 C-*β*-CD 作为药物递送体系展现出一定的优势，具有良好的应用前景。

参考文献

[1] Najafloo R，Behyari M，Imani R，et al. A mini-review of thymol incorporated materials：applications in antibacterial wound dressing [J]. J Drug Deliv Sci Technol，2020，60：101904.

[2] Sheorain J，Mehra M，Thakur R，et al. In vitro anti-inflammatory and antioxidant potential of thymol loaded bi-

polymeric（tragacanth gum/chitosan）nanocarrier [J]. Int J Biol Macromol，2019，125：1069-1074.

[3] 缪红，尚晓静，许亮 . 某二级中西医结合医院不良反应事件汇总情况分析 [J]. 中医药管理杂志，2023，31（11）：41-43.

[4] Dang XJ，Wang R，Liu Y. Disulfiram-like reaction with ginaton：a case report and literature review [J]. Clin Ther，2023，45（11）：1151-1154.

[5] 许锦，刘彬，王庆阳，等 . 某三级甲等儿童医院中成药说明书辅料标明情况及风险控制建议 [J]. 中国药师，2018，21（11）：2020-2022.

[6] Sayed M，Pal H. An overview from simple host-guest systems to progressively complex supramolecular assemblies [J]. Phys Chem Chem Phys，2021，23（46）：26085-26107.

[7] 申雨苗，王倩，郭瑜，等 . 基于环糊精及其衍生物的递送体系在食品领域的研究进展 [J]. 食品工业科技，2022，43（24）：496-505.

[8] Varan G，Varan C，Erdoğar N，et al. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles [J]. Int J Pharm，2017，531（2）：457-469.

[9] 卓敏，严忠海，张加慧 . 环糊精及其衍生物在药学应用中的安全性综述 [J]. 转化医学电子杂志，2017，4（6）：77-83.

[10] Yang JJ，Ma Y，Luo Q，et al. Improving the solubility of vorinostat using cyclodextrin inclusion complexes：The physicochemical characteristics，corneal permeability and ocular pharmacokinetics of the drug after topical application [J]. Eur J Pharm Sci，2022，168：106078.

[11] Hassan AS，Soliman GM. Rutin nanocrystals with enhanced anti-inflammatory activity：preparation and ex vivo/in vivo evaluation in an inflammatory rat model [J]. Pharmaceutics，2022，14（12）：2727.

[12] Donoso-González O，Lodeiro L，Aliaga ÁE，et al. Functionalization of gold nanostars with cationic β-cyclodextrin-based polymer for drug co-loading and SERS monitoring [J]. Pharmaceutics，2021，13（2）：261.

[13] Rassu G，Fancello S，Roldo M，et al. Investigation of cytotoxicity and cell uptake of cationic beta-cyclodextrins as valid tools in nasal delivery [J]. Pharmaceutics，2020，12（7）：658.

[14] Ribeiro CPS，Gamelas SRD，Faustino MAF，et al. Unsymmetrical cationic porphyrin-cyclodextrin bioconjugates for photoinactivation of *Escherichia coli* [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther，2020，31：101788.

[15] Cui HY，Zhang XJ，Zhou H，et al. Antimicrobial activity and mechanisms of Salvia sclarea essential oil [J]. Bot Stud，2015，56（1）：16.

[16] 严淑珍 . 基于主客体相互作用的阳离子超分子复合材料的构建及其生物应用 [D]. 天津：天津理工大学，2021.

[17] 侯敏娜，侯少平，胡亚茹，等 . 黄芪总黄酮体外抗氧化性及抑菌活性的研究 [J]. 华西药学杂志，2022，37（4）：380-384.

[18] Cai H，Rose K，Liang LH，et al. Development of a liquid chromatography/mass spectrometry-based drug accumulation assay in Pseudomonas aeruginosa [J]. Anal Biochem，2009，385（2）：321-325.

[19] Al-Kandari F，Al-Temaimi R，Van Vliet AHM，et al. Thymol tolerance in *Escherichia coli* induces morphological，metabolic and genetic changes [J]. BMC Microbiol，2019，19（1）：294.

[20] Tommasi R，Iyer R，Miller AA. Antibacterial drug discovery：some assembly required [J]. ACS Infect Dis，2018，4（5）：686-695.

[21] Loftsson T，Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins：effects on drug permeation through biological membranes [J]. J Pharm Pharmacol，2011，63（9）：1119-1135.

[22] Paczkowska-Walendowska M，Rosiak N，Tykarska E，et al. Tedizolid-cyclodextrin system as delayed-release drug delivery with antibacterial activity [J]. Int J Mol Sci，2020，22（1）：115.

[23] 司晶星，邵世群，申有青，等 . 基于环糊精的纳米载药体系的研究进展 [J]. 高分子通报，2013（11）：1-10.

[24] 常吕恕，王文倩，杨韵，等 . 番茄潜叶蛾幼虫肠道可培养细菌结构组成及对大分子化合物的降解作用研究 [J]. 环境昆虫学报，2022，44（5）：1240-1251.

[25] 林彩红 . 自修复胆酸聚氨酯及其抗菌阳离子衍生物的性能研究 [D]. 广州：华南理工大学，2022.

[26] Dan WJ，Gao JX，Qi XH，et al. Antibacterial quaternary ammonium agents：chemical diversity and biological mechanism [J]. Eur J Med Chem，2022，243：114765.

[27] Winterhalter M，Ceccarelli M. Physical methods to quantify small antibiotic molecules uptake into gram-negative bacteria [J]. Eur J Pharm Biopharm，2015，95（Pt A）：63-67.

（收稿日期：2023-11-25；修回日期：2023-12-25）

松果菊苷下调 Skp2 的表达抑制胶质母细胞瘤上皮间质转化及胶质瘤干细胞干性

吴振德[1]，王兆涛[2]，鞠其超[1]，张波[1*]（1. 厦门长庚医院神经外科，福建 厦门 361028；2. 广州医科大学附属第二医院神经外科，广州 560210）

摘要：目的 研究松果菊苷（ECH）对胶质母细胞瘤（GBM）的上皮间质转化（EMT）及其对GBM干细胞的影响，并探讨其分子机制。**方法** ① 体外实验：将GBM U87和U251细胞以0、5、10和20 μmol·L^{-1} ECH浓度处理24 h。采用CCK-8法评估细胞活性；进行克隆形成实验以测定克隆能力；通过Transwell实验评估迁移和侵袭能力；利用球形成实验评价GBM干细胞的成球能力；通过细胞免疫荧光检测干细胞标志物；使用Western blot分析EMT和干细胞相关蛋白表达。② 体内实验：在裸鼠皮下注射U87细胞，每组5只。实验组腹腔注射ECH，对照组注射等体积溶剂。最后测定肿瘤体积、重量和体重，并用Western blot分析肿瘤中的Skp2、EMT和干细胞相关蛋白表达。**结果** ① 体外实验显示，相较于0 μmol·L^{-1} ECH组，10、20 μmol·L^{-1} ECH处理显著降低了细胞活性（$P < 0.05$）；在5、10和20 μmol·L^{-1} ECH组中克隆形成数量显著减少（$P < 0.05$）；迁移和侵袭能力在5、10 μmol·L^{-1} ECH组中随浓度升高而降低（$P < 0.05$）；成球能力和干细胞标志物表达及Skp2、EMT和干细胞特性相关蛋白表达在5、10 μmol·L^{-1} ECH组中均显著降低（$P < 0.05$）。② 体内实验显示，ECH处理小鼠的肿瘤体积和重量显著小于对照组（$P < 0.05$），且Skp2、EMT（Vimentin、Snail）和干细胞标志物（Sox2、Nestin）的表达显著减少（$P < 0.05$）；两组小鼠体重差异无统计学意义（$P > 0.05$）。**结论** ECH通过降低Skp2表达抑制GBM的EMT和干细胞特性。

关键词：胶质母细胞瘤；松果菊苷；上皮间质转化；干细胞干性；Skp2
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0626-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.012

Echinacoside inhibits Skp2-induced epithelial-mesenchymal transition and stemness in glioblastoma

WU Zhen-de[1], WANG Zhao-tao[2], JU Qi-chao[1], ZHANG Bo[1*] (1. *Department of Neurosurgery*, *Xiamen Chang Gung Hospital*, *Xiamen Fujian* 361028; 2. *Department of Neurosurgery*, *the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University*, *Guangzhou* 560210)

Abstract: Objective To determine the impact of echinacoside (ECH) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and glioma stem cell characteristics in glioblastoma, and to elucidate related molecular mechanism. **Methods** ① In vitro experiments: glioblastoma U87 and U251 cells were cultured and treated with 0, 5, 10, and 20 μmol·L^{-1} ECH for 24 hours; the cell viability was evaluated with the CCK-8 assay; clonogenic capacity was determined by the colony formation assay, migration and invasion by transwell assay, and stem cell potential by sphere formation assay. The expression of stem cell markers was assessed with immunofluorescence; EMT and stemness-related protein expressions were analyzed with Western blot. ② In vivo experiments: U87 cells were subcutaneously implanted into nude mice (five mice in each group). The experimental group was administered daily intraperitoneal injections of ECH, while the control group received a corresponding

基金项目：广东省自然科学基金面上项目（No. 2019A1515010926）。
作者简介：吴振德，男，主治医师，主要从事胶质瘤的发病和药物治疗研究，email：dengyigeta@126.com *通信作者：张波，男，主任医师，主要从事胶质瘤的发病和药物治疗研究，email：283666947@qq.com

volume of the vehicle. At the end of the experiment, tumor volume, mouse weight, tumor weight were measured, and Skp2, EMT, and stemness-related protein expressions in tumors were analyzed by Western blot. **Results** ① In vitro experiments showed that, compared to the 0 μmol • L^{-1} ECH group, the 10 and 20 μmol • L^{-1} ECH groups significantly reduced cell viability ($P < 0.05$); the number of colonies formed was significantly decreased in the 5, 10, and 20 μmol • L^{-1} ECH groups ($P < 0.05$); migration and invasion abilities were reduced in the 5 and 10 μmol • L^{-1} ECH groups ($P < 0.05$); spheroid formation ability and stem cell marker expression, Skp2 and EMT expression, and stem cell characteristic proteins significantly decreased in the 5 and 10 μmol • L^{-1} ECH groups ($P < 0.05$). ② In vivo experiments showed that, tumor volume and weight in mice treated with ECH were obviously smaller than those in the control group ($P < 0.05$), and the expression of Skp2 and EMT markers (Vimentin, Snail), and stem cell markers (Sox2, Nestin) significantly decreased; there was no significant difference in the body weight between both groups. **Conclusion** ECH inhibits the EMT and diminishes stemness in glioblastoma by downregulating Skp2 expression.

Key words: glioblastoma; echinacoside; epithelial-mesenchymal transition; stemness; Skp2

胶质母细胞瘤（GBM）是中枢神经系统中最常见的原发性恶性肿瘤，其关键生物学特性为侵袭性生长和干细胞样性质，导致肿瘤的无限增殖。这些特性是 GBM 手术难以完全切除、术后复发率高和预后差的主要原因。目前，这种侵袭性生长和自我更新复制能力的机制尚未完全阐明[1-3]。研究显示，上皮间质转化（EMT）在胶质瘤的侵袭性生长中扮演重要角色。EMT 是上皮细胞向间质细胞转化的生物学过程，在此过程中，上皮细胞丢失紧密连接，转变为具有高迁移和侵袭性的间质细胞[4]；同时，胶质瘤干细胞（GSCs）的存在使肿瘤具有无限复制和自我更新的能力[5]。这两种机制是肿瘤侵袭、转移、复发的重要原因。EMT 过程和 GSCs 性质受多种信号分子调节，其中 Skp2 的作用尤为重要[6]。因此，通过调控 Skp2 而抑制肿瘤细胞的 EMT 过程及干细胞干性，是治疗胶质瘤的一种有效途径。松果菊苷（echinacoside，ECH）是从白刺菜茎提取的苯乙醇类化合物单体，具有抗炎、抗氧化、改善记忆、免疫调节等功能。近年来的研究发现，ECH 对结肠癌、前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤具有抑制作用，但其在抗胶质瘤中的应用报道较少[7-9]。本研究旨在探讨 ECH 对胶质瘤 EMT 及干细胞性质的抑制作用，并进一步探索其潜在分子机制，以期为改进胶质瘤的治疗提供新思路。

1　材料

ECH（纯度：99.5%，天津士兰生物有限公司），人脑胶质瘤细胞系 U87 和 U251（美国 ATCC 公司），成纤维细胞生长因子（bFGF）和表皮生长因子（EGF）(美国 Peprotech 公司)，1% 谷氨酰胺和 2%B27、高糖 DMEM 培养基、10% 胎牛血清（FBS）、胰蛋白酶、青链双抗（美国 Gibco 公司），CCK-8 检测试剂盒（上海东仁化学研究所），Matrigel 胶、Transwell 小室（美国康宁公司）。兔抗人 Skp2、Snail、Vimentin、Nestin、Sox2 单克隆抗体（美国 CST 公司）；鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体、山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 二抗（北京中杉金桥科技有限公司）。6 ～ 8 周龄的雌性 Balb/c 裸鼠（18 ～ 20 g，南方医科大学动物中心）。

2　方法

2.1　细胞培养

人脑胶质瘤细胞系 U87 和 U251，培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。GSCs 在添加 20 ng • mL^{-1} 基础 bFGF 和 20 ng • mL^{-1} EGF、1% 谷氨酰胺和 2% B27 的神经基础细胞培养基中培养。所有细胞均在 5%CO_2、37 ℃的条件下进行常规培养。

2.2　CCK-8 实验

在细胞对数生长期，使用 0.25% 胰酶消化细胞后，用完全培养基重悬细胞。计数后，细胞接种到 96 孔板中，每孔 4000 个细胞 /100 μL，每组设定 3 个复孔。处理细胞后，向每孔中添加 10 μL CCK-8 试剂，避光条件下孵育 2 h。使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度（*OD*）。细胞存活率计算公式为：细胞存活率（%）＝（$OD_{实验组}$ － $OD_{空白组}$）/（$OD_{对照组}$ － $OD_{空白组}$）×100%。

2.3　克隆形成实验

将 GBM 细胞以每孔 500 个细胞的密度接种到 6 孔板中，在含有不同浓度 ECH 的培养基中培养 7 d，以模拟药物处理环境。实验结束后，

轻柔地移除培养基，使用 4% 的多聚甲醛将细胞固定 10 min，使用结晶紫对细胞染色 10 min，观察。染色完成后，彻底清洗细胞以去除多余的染料，并在显微镜下计数以确定克隆的数量。

2.4 Transwell 迁移和侵袭实验

使用孔径为 8 μm 的 Transwell 小室对 U87 和 U251 细胞的体外迁移和侵袭能力进行检测。U87 和 U251 细胞在含 1%FBS 的 DMEM 中以 2×10^4 个细胞 / 孔的密度接种至上层小室中，体积为 200 μL。下层小室中加入 600 μL 含 20%FBS 的 DMEM，并预先设定相应的 ECH 的浓度。在侵袭实验中，上层小室的膜预先涂覆 10 μL 的 Matrigel。培养 24 h 后，将膜上表面残留的细胞擦去。迁移 / 侵袭至下表面的细胞使用甲醇固定，用 0.2% 的结晶紫染色，并在 100 倍放大率下随机选择 5 个视野进行计数。

2.5 Western blot 分析

GBM 异种移植组织匀浆或细胞系使用 Proprep TM 蛋白提取溶液裂解。每个样本等量的蛋白通过 SDS-PAGE 的 10% 凝胶分离，然后转移到 PVDF 膜上。在含 5% 牛血清白蛋白（BSA）的 1×TBST 中室温下封闭 1 h 后，用一抗（悬浮在 5% BSA 中）在 4 ℃下过夜孵育，隔日再与二抗孵育。条带通过 ECL 化学发光方法检测（美国 Pierce 公司），使用 Image-pro plus 计算条带的灰度。

2.6 干性成球实验

将 GSCs 以 3000 个细胞 / 板的密度接种到 6 cm 的超低黏附培养板中，并在添加了不同浓度 ECH 的神经基础培养基中培养。在标准条件下培养 5 d 后，使用显微镜计数直径大于 50 μm 的球体。实验重复 3 次，每次重复至少评估 3 个视野。

2.7 细胞免疫荧光实验

经过 5 d 5 μmol • L^{-1} 或 10 μmol • L^{-1} ECH 处理的 GSCs 被种植在聚赖氨酸涂层的细胞爬片上。1 h 后用 PBS 洗涤 3 次，然后用含 0.3% Triton X-100 的正常山羊血清在室温下封闭 1 h。之后在含 5%BSA 的 300 μL 溶液中加入抗 Sox2（1∶1000）和抗 Nestin（1∶1000）抗体，在 4 ℃下过夜孵育。接下来用 PBS 清洗幻灯片，并在室温下用荧光素标记的二抗孵育 2 h。再次清洗样品，用 DAPI 对染 10 min，再次洗涤以去除多余的 DAPI，自然干燥。使用共聚焦显微镜成像。

2.8 U87 裸鼠皮下肿瘤模型的建立及治疗方案

小鼠按照厦门长庚医院动物保护委员会发布的机构动物保护指南进行处理。8 周龄大的小鼠在背部接种 U87 细胞（每只小鼠 5×10^6 个细胞）。7 d 后，将小鼠分为 ECH 组和对照组，并分别给予 ECH [20 mg/（kg • d）] 或对照溶剂腹腔注射，总共注射 21 d。每 7 日评估一次动物的肿瘤重量、体积以及体重。实验结束时收获肿瘤进行进一步分析。

2.9 统计学分析

实验数据应用 SPSS 20.0 统计进行软件。计量资料以均数 ± 标准差表示，采用 One-Way ANOVA 方法分析，进一步两两比较采用 LSD 方法，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 ECH 抑制 GBM 的增殖

不同浓度 ECH（0、5、10、20 μmol • L^{-1}）处理后的细胞存活率表现出显著差异（$P < 0.05$）。5 μmol • L^{-1} ECH 处理的 U87 和 U251 细胞生存率与 0 μmol•L^{-1} 组差异无统计学意义（$P > 0.05$），而 10 μmol • L^{-1} 和 20 μmol • L^{-1} 组细胞存活率显著降低（$P < 0.05$）（见图 1 A ～ B）。克隆形成实验显示，随 ECH 浓度增加，U87 和 U251 的克隆数量显著减少（$P < 0.05$）（见图 1C ～ D）。

3.2 ECH 对 GBM 迁移和侵袭的抑制作用

为排除 ECH 对细胞增殖影响，使用不影响细胞增殖的 5 和 10 μmol • L^{-1} 浓度进行实验。结果显示，0、5、10 μmol • L^{-1} ECH 处理的 U87 和 U251 细胞迁移至下室的数量随浓度增加而显著减少（$P < 0.05$）（见图 2A ～ D）。

3.3 ECH 对 GBM Skp2 及 EMT 标志物的下调作用

0、5、10 μmol • L^{-1} ECH 处理的 U87 和 U251 细胞中，随着 ECH 浓度的增加，Skp2 及 EMT 相关蛋白 Snail、Vimentin 的表达量逐渐下降（见图 3）。

3.4 ECH 对 GSCs 生长的抑制作用

5 μmol • L^{-1} 和 10 μmol • L^{-1} ECH 处理的球形体生成实验显示，ECH 以浓度依赖的方式显著减少了干细胞成球数量（$P < 0.05$）（见图 4A ～ B）。

3.5 ECH 对 GSCs 中 Skp2 及干性标志物的下调作用

ECH 处理导致 GSCs 中干细胞标志物 Sox2 和 Nestin 的荧光水平随浓度增加而显著降低（$P < 0.05$）。0、5、10 μmol • L^{-1} ECH 处理的 GSCs 中，Skp2、Sox2 和 Nestin 的表达量也随浓度增加而下调（见图 5）。

3.6 ECH 抑制裸鼠皮下 GBM 的生长

如图 6A 所示，与对照组相比，ECH 处理显著抑制了 21 d 内的肿瘤生长，ECH 处理小鼠的肿瘤体积和重量明显减少（见图 6B 和 6C）；各组小鼠体重没有显著变化（见图 6D）。

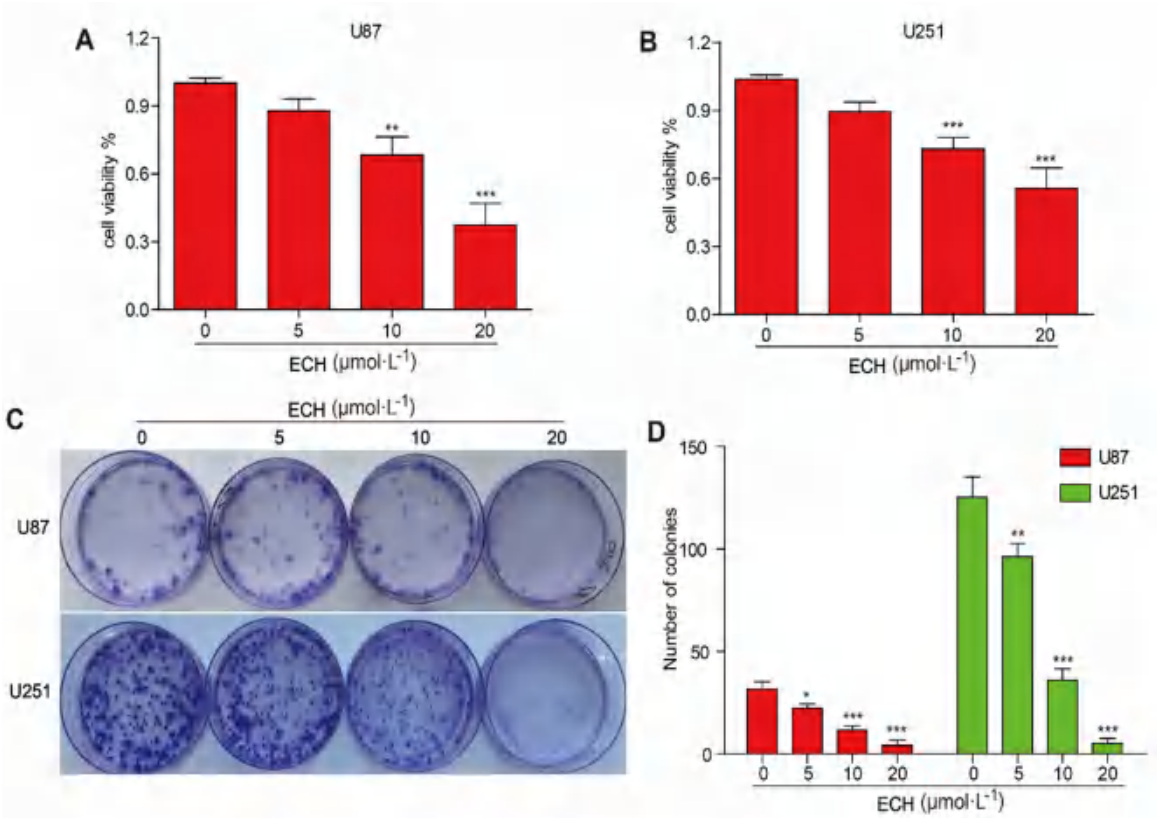


图 1　不同浓度 ECH 处理后 U87 和 U251 细胞的存活率（A ～ B）及克隆形成数量（C ～ D）

Fig 1　Cell viability（A ～ B）and colony formation numbers（C ～ D）of U87 and U251 cells viability after the treatment with different concentrations of ECH

注（Note）：与 0 μmol • L^{-1} 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（*vs* 0 μmol • L^{-1} group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

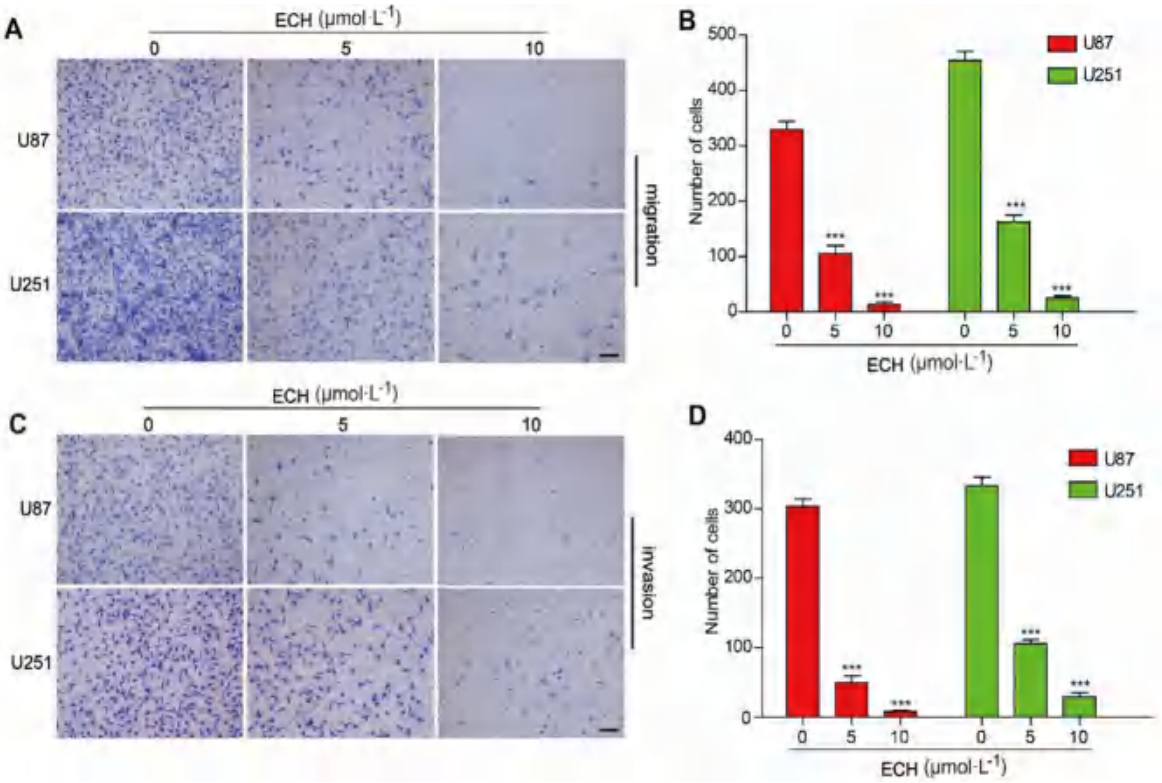


图 2　不同浓度 ECH 处理后 U87 和 U251 细胞的迁移情况（A ～ B）和侵袭数量（C ～ D）

Fig 2　Migration（A ～ B）and invasion numbers（C ～ D）of U87 and U251 cells after the treatment with different concentrations of ECH

注（Note）：与 0 μmol • L^{-1} 组比较，$^{***}P < 0.001$（*vs* 0 μmol • L^{-1} group，$^{***}P < 0.001$）。

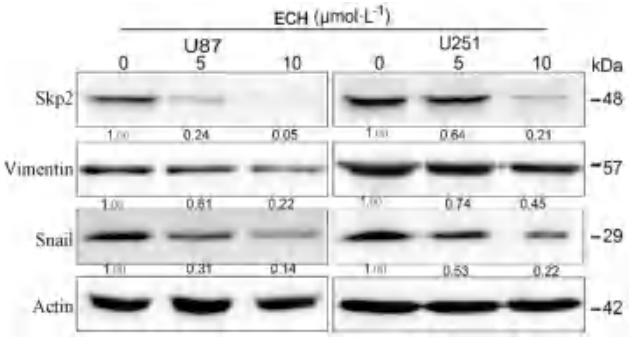


图 3 不同浓度 ECH 处理后 U87 和 U251 细胞 Skp2 及 EMT 标志物的蛋白表达

Fig 3 Protein expression levels of Skp2 and EMT markers in U87 and U251 cells after the treatment with different concentrations of ECH

3.7 ECH 抑制裸鼠皮下 GBM 中目标蛋白的表达

ECH 显著下调了肿瘤组织中的 Skp2、与 EMT 相关的标志物（Vimentin 和 Snail）以及干细胞标志物（Nestin 和 Sox2）(见图 7)。

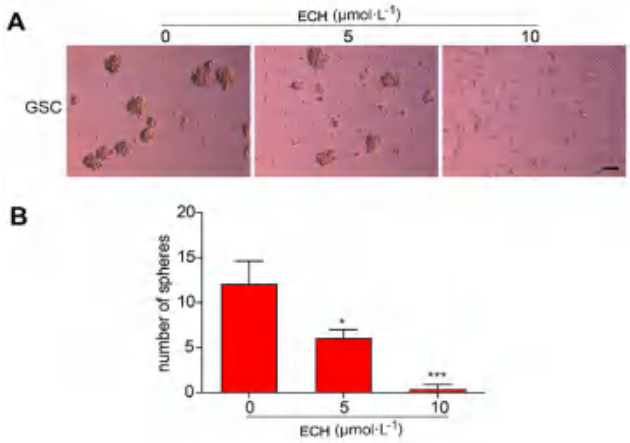


图 4 不同浓度 ECH 处理后 GSCs 干细胞球的成球情况

Fig 4 Spheroid formation of GSCs after the treatment with different concertration of ECH

注（Note）：与 0 μmol • L^{-1} 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（*vs* 0 μmol • L^{-1} group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

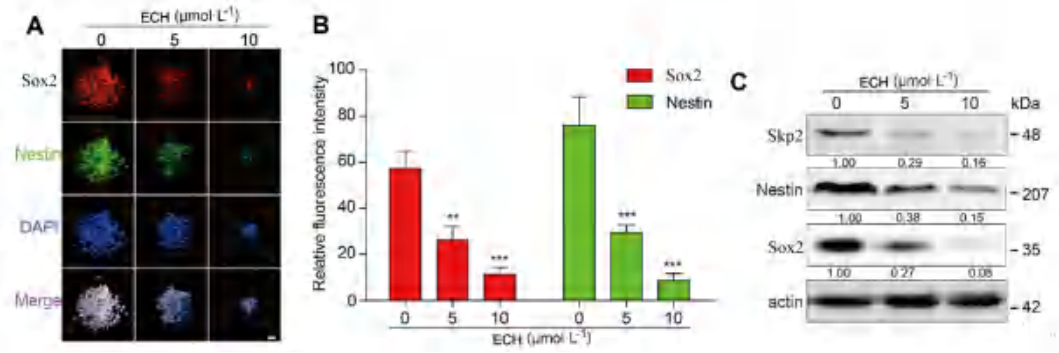


图 5 不同浓度 ECH 处理后 GSCs 中 Skp2 及干细胞标志物的蛋白表达

Fig 5 Protein expression levels of Skp2 and stem cell markers in glioblastoma after the treatment with different concentrations of ECH

注（Note）：与 0 μmol • L^{-1} 组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（*vs* 0 μmol • L^{-1} group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

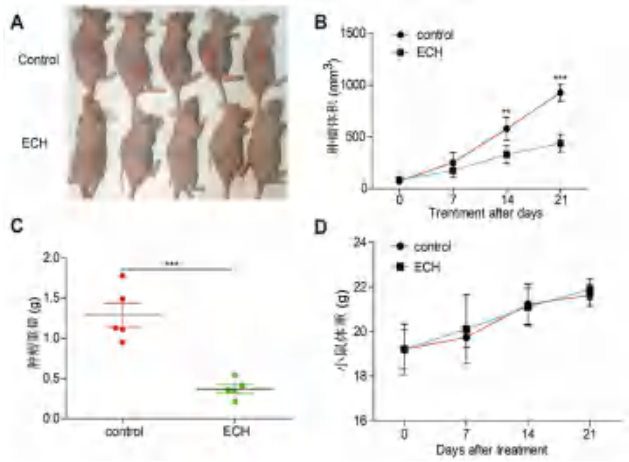


图 6 ECH 对裸鼠皮下 GBM 生长的影响

Fig 6 Effect of ECH on the growth of subcutaneous glioblastoma in nude mice

注（Note）：与 0 μmol • L^{-1} 组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（*vs* 0 μmol • L^{-1} group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

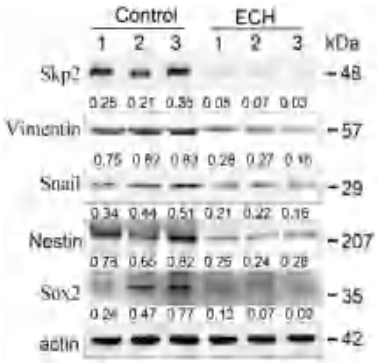


图 7 ECH 对裸鼠皮下肿瘤中目标蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of ECH on the expression of target proteins in subcutaneous glioblastoma in nude mice

4 讨论

作为肿瘤常规化疗药物的替代，传统中药受到了广泛关注。ECH 是显示出抗肿瘤、肝脏保护、神经保护、抗氧化、抗疲劳、抗炎及免疫调节等特性[10-12]。研究表明，ECH 能够通过抑制 Skp2 引起的 EMT 和干细胞的干性，在体外和体内抑

制 GBM 的增殖、迁移和侵袭。

EMT 是细胞从上皮特性向间质特性转变的生物学过程。它在胚胎发育、组织重塑等生理活动中发挥关键作用，并对肿瘤的发展至关重要。通过 EMT，肿瘤细胞获得抵御凋亡、促进迁移和侵袭的能力，分解细胞外基质，促进向远处器官的转移。经历 EMT 的肿瘤细胞还表现出更强的药物抗性和增强的干细胞特性 [13-15]。尽管神经上皮系统不具备类上皮组织的关键成分，EMT 仍是 GBM 发展和恶化的核心机制 [16-17]。Twist 和 Snail 蛋白家族的作用加剧了 GBM 细胞的迁移和侵袭能力，赋予它们典型的间质表型，以 N-cadherin、Zeb1、Snail 和 Vimentin 等间质标志物的升高为特征。经历 EMT 的 GBM 细胞表现出较高的侵略性，并与较差的预后密切相关。研究显示，抑制 EMT 过程可能阻止 GBM 的进一步发展 [18-19]。例如，miRNA-128-3p 的过表达通过下调 EMT 相关蛋白抑制了 GBM 细胞的增殖、迁移和侵袭，并提高了细胞对替莫唑胺的敏感性 [20]。高良姜素通过靶向 Skp2 驱动的 EMT 过程抑制了 GBM 的进展 [21]。在本研究中，ECH 通过降低 Snail 和 Vimentin 的表达，抑制了 GBM 细胞的 EMT，并下调了 Skp2。

癌症的复发与转移常与肿瘤干细胞样细胞（CSCs）有关，这些细胞能在标准化疗和放疗后再生肿瘤。CSCs 存在于包括多形性 GBM 在内的多种癌症中。在 GBM 中这些被称为 GSCs 的 CSCs，显示出多向分化、自我更新和广泛增殖的能力。相关研究指出，GSCs 作为 GBM 增长的核心分子，其清除可能对 GBM 生长产生抑制作用。因此，开发针对 GSCs 的疗法，可为提升胶质瘤治疗效果提供关键途径 [22-24]。本研究表明，ECH 能有效抑制 GSCs 生长，并降低其干细胞性标志物的表达，展现了其作为胶质瘤治疗剂的潜力。

EMT 与 GSCs 之间的密切联系，EMT 过程可增加 GSCs 的干细胞性，而 GSCs 可能通过激发 EMT 促进胶质瘤的侵袭性。此外，这两者还可能共同影响胶质瘤的微环境调节和免疫逃逸，加剧胶质瘤的恶化。了解 EMT 和 GSCs 在胶质瘤恶化中的作用至关重要。深入研究它们的生物特性和相互关系，以及在胶质瘤恶化机制中的作用，可能为胶质瘤治疗提供新的策略和靶点 [25-26]。目前，研究人员正在探索各种治疗方法，如小分子抑制剂、抗体治疗和基因治疗等，以期为胶质瘤患者提供更为有效的治疗方案。课题组前期研究发现，ECH 可以减少 GSCs 的侵袭性，降低与 EMT 相关的蛋白标志物的表达，并抑制 GSCs 的干性特征，提示 ECH 通过抑制胶质瘤中的 EMT 和 GSCs 活动，发挥其抗肿瘤作用。

Skp2 在细胞周期、增殖和凋亡等核心细胞过程中发挥关键作用。在乳腺癌细胞中，Skp2 的上调不仅促进了细胞增殖，还抑制了细胞凋亡。在肺癌细胞中，Skp2 表达的提高通过增加基质金属蛋白酶 -2（MMP-2）和 MMP-9 的水平，促进了细胞的迁移和侵袭 [27]。与正常脑组织相比，GBM 细胞中 Skp2 的过度表达与患者较短的总生存期和不佳的预后紧密相关 [28]。抑制 Skp2 可延缓 GBM 细胞的增殖和肿瘤形成能力，并增加对替莫唑胺的敏感性 [6]。Skp2 的失活在 GBM 细胞系中也已被证实能够抑制 EMT 和增殖 [21]。本研究显示，ECH 在 GSCs 和 GSCs 中降低了 Skp2 的表达，并抑制了 GBM 和 GSCs 细胞的侵袭、迁移和增殖，因此 Skp2 可能是 ECH 治疗胶质瘤的有前途的靶标。

本研究存在一些局限性。虽然研究结果表明 ECH 能够降低 Skp2 的水平，但其确切作用机制尚待进一步探讨。Akt（蛋白激酶 B）途径是 GBM 治疗的已知靶标。Akt 通过调控转录、翻译和磷酸化来上调 Skp2，进而促进 EMT[29]。此外，ECH 在肝癌和卵巢癌细胞中通过抑制 Akt 途径，显示出抗增殖和促凋亡的效果 [7]。因此，ECH 可能通过作用于 Akt 途径，抑制 GBM 细胞中 Skp2 的表达和磷酸化。此外，本研究只对 Skp2 进行了过表达而没有对其进行沉默，未探讨 ECH 在原位胶质瘤中的效果，未对干细胞特征性标志物在基因水平上进行检测，以明确 ECH 对干细胞特性的影响；并且，本研究主要依赖单一的 GBM 细胞系和异种移植模型，缺乏对 GBM 异质性的全面理解。克服这些局限将有助于更全面地评估 ECH 作为 GBM 治疗选择的潜力。

综上所述，本研究初步表明 ECH 通过降低 Skp2、EMT 标志物和干细胞特性标志物的表达，显著抑制了 GBM 细胞在体外和体内的恶性潜能，为 ECH 在临床上的应用提供了基础。

参考文献

[1] Weller M，Wick W，Aldape K，et al. Glioma [J]. Nat Rev Dis Primers，2015，1（1）：1-18.

[2] Bush NAO，Chang SM，Berger MS. Current and future

strategies for treatment of glioma [J]. Neurosurg Rev，2017，40：1-14.
[3] Cohen AL，Colman H. Glioma biology and molecular markers [J]. Cancer Treat Res，2015，163：15-30.
[4] Ning WH，Qiu ZQ，Ji XW，et al. The prognostic value of EMT in glioma and its role in the glioma immune microenvironment [J]. J Mol Neurosci，2020，70：1501-1511.
[5] Gimple RC，Bhargava S，Dixit D，et al. Glioblastoma stem cells：lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer [J]. Genes Dev，2019，33（11-12）：591-609.
[6] Wu J，Su HK，Yu ZH，et al. Skp2 modulates proliferation，senescence and tumorigenesis of glioma [J]. Cancer Cell Int，2020，20（1）：1-11.
[7] Liu J，Tang N，Liu N，et al. Echinacoside inhibits the proliferation，migration，invasion and angiogenesis of ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway [J]. J Mol Histol，2022，53（2）：493-502.
[8] Bian P，Liu C，Hu W，et al. Echinacoside suppresses the progression of breast cancer by downregulating the expression of miR-4306 and miR-4508 [J]. Integr Cancer Ther，2021，20：15347354211062639.
[9] Wei J，Zheng ZM，Hou XX，et al. Echinacoside inhibits colorectal cancer metastasis via modulating the gut microbiota and suppressing the PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol，2024，318：116866.
[10] He WJ，Fang TH，Tu PF. Research progress on pharmacological activities of echinacoside [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi，2009，34（4）：476-479.
[11] Li J，Yu HN，Yang C，et al. Therapeutic potential and molecular mechanisms of echinacoside in neurodegenerative diseases [J]. Front Pharmacol，2022，13：841110.
[12] Liu JJ，Yang LL，Dong YH，et al. Echinacoside，an inestimable natural product in treatment of neurological and other disorders [J]. Molecules，2018，23（5）：1213.
[13] Brabletz T，Kalluri R，Nieto MA，et al. EMT in cancer [J]. Nat Rev Cancer，2018，18（2）：128-134.
[14] Singh M，Yelle N，Venugopal C，et al. EMT：mechanisms and therapeutic implications [J]. Pharmacol Ther，2018，182：80-94.
[15] Pastushenko I，Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. Trends Cell Biol，2019，29（3）：212-226.
[16] Iser IC，Pereira MB，Lenz G，et al. The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma：an updated systematic review and in silico investigation [J]. Med Res Rev，2017，37（2）：271-313.
[17] Kahlert U，Nikkhah G，Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal（-like）transition as a relevant molecular event in malignant gliomas [J]. Cancer Lett，2013，331（2）：131-138.
[18] Iser I，Pereira M，Lenz G，et al. The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma：an updated systematic review and in silico investigation [J]. Med Res Rev，2017，37（2）：271-313.
[19] Majc B，Sever T，Zarić M，et al. Epithelial-to-mesenchymal transition as the driver of changing carcinoma and glioblastoma microenvironment [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res，2020，1867（10）：118782.
[20] Zhao CB，Guo RM，Guan FX，et al. Microrna-128-3p enhances the chemosensitivity of temozolomide in glioblastoma by targeting c-Met and EMT [J]. Sci Rep，2020，10（1）：9471.
[21] Xiong Y，Lai X，Xiang W，et al. Galangin（GLN）suppresses proliferation，migration，and invasion of human glioblastoma cells by targeting Skp2-induced epithelial-mesenchymal transition（EMT）[J]. OncoTargets Ther，2020，13：9235-9244.
[22] Suvà ML，Tirosh I. The glioma stem cell model in the era of single-cell genomics [J]. Cancer Cell，2020，37（5）：630-636.
[23] Wang ZY，Zhang H，Xu SC，et al. The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments [J]. Signal Transduct Target Ther，2021，6（1）：124.
[24] Alves ALV，Gomes IN，Carloni AC，et al. Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance：a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives [J]. Stem Cell Res Ther，2021，12（1）：1-22.
[25] Lu YB，Sun TJ，Chen YT，et al. Targeting the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer stem cells for a better clinical outcome of glioma [J]. Technol Cancer Res Treat，2020，19：1533033820948053.
[26] Takashima Y，Kawaguchi A，Yamanaka R. Promising prognosis marker candidates on the status of epithelial-mesenchymal transition and glioma stem cells in glioblastoma [J]. Cells，2019，8（11）：1312.
[27] Hung WC，Tseng WL，Shiea J，et al. Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells [J]. Cancer Lett，2010，288（2）：156-161.
[28] Cheng ZJ，Cai HQ，Zhang MJ，et al. High s phase kinase-associated protein 2 expression is a potential prognostic biomarker for glioma [J]. Oncol Lett，2020，20（3）：2788-2796.
[29] Wu T，Gu XS，Cui HM. Emerging roles of Skp2 in cancer drug resistance [J]. Cells，2021，10（5）：1147.

（收稿日期：2023-12-07；修回日期：2024-01-22）

鼠尾草酸对产后抑郁小鼠模型的作用研究

兰前清[1, 2]，赵丞[1, 2]，王小青[2]，王宇红[1]，姜德建[1, 2*]（1. 湖南中医药大学科技创新中心&抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室，长沙　410000；2. 湖南省药物安全评价研究中心&新药药效与安全评价湖南省重点实验室，长沙　410331）

摘要：目的　探讨鼠尾草酸对产后抑郁小鼠模型的治疗作用。**方法**　选取雌性 C57BL/6 小鼠 70 只行双侧卵巢去势手术，后激素撤退模拟妊娠制备产后抑郁模型。根据糖水偏爱试验筛选 50 只产后抑郁模型小鼠，随机分为模型对照组，雌激素组（20 μg • kg^{-1}，sc），鼠尾草酸低、中、高剂量组（25、50、100 mg • kg^{-1}，ig）。另取 10 只雌性 C57BL/6 小鼠行假手术作为假手术对照组。给药组每日给药 1 次，连续 28 d，给药体积 20 mL • kg^{-1}。末次给药后进行糖水偏爱、强迫游泳及自主活动等行为学试验评价抑郁样行为，酶联免疫吸附试验（ELISA）检测血清中成纤维生长因子 9（FGF9）、雌二醇（E2）及海马组织中 5- 羟色胺（5-HT）、脑源性神经营养因子（BDNF）含量。Western blot 检测小鼠海马组织中 BDNF、FGF9 蛋白表达。苏木精 - 伊红（HE）染色法观察小鼠海马组织 CA1 区组织病理改变。**结果**　与假手术对照组比较，模型对照组小鼠行为学检测中糖水偏爱指数显著下降（$P < 0.01$），强迫游泳不动时间显著增加（$P < 0.01$），小鼠运动总路程和平均速度显著减少（$P < 0.01$）。海马组织 CA1 区神经元细胞散乱分布，细胞形态异常，神经元碎片化。ELISA 法检测发现血清 E2 及海马组织中 5-HT、BDNF 含量显著下降，FGF9 含量显著上升（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。Western blot 法检测发现 BDNF 蛋白表达下降，FGF9 表达升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。与模型对照组比较，在给予鼠尾草酸治疗后，各组小鼠糖水偏爱指数增加（$P < 0.01$）。雌激素组及鼠尾草酸中、高剂量组小鼠游泳不动时间减少，自主活动的运动总路程和平均速度增加（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；海马组织神经元损伤程度减轻，细胞排列紧密，形态正常化。雌激素组血清 E2 水平显著升高（$P < 0.05$），雌激素组及鼠尾草酸各剂量组海马 5-HT 含量均有不同程度的增加（$P < 0.01$）。雌激素组及鼠尾草酸中、高剂量组能显著降低 FGF9 含量（$P < 0.05$）。雌激素组和鼠尾草酸高剂量能显著增加 BDNF 含量，上调 BDNF 表达水平，下调 FGF9 表达水平（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。**结论**　鼠尾草酸可显著改善产后抑郁小鼠海马神经元损伤和抑郁样行为，其作用机制可能与增加海马 5-HT、BDNF 含量、降低 FGF9 水平有关。

关键词：鼠尾草酸；产后抑郁；作用机制；动物模型

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0633-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.013

Effect of carnosic acid on postpartum depression mouse model

LAN Qian-qing[1, 2], ZHAO Cheng[1, 2], WANG Xiao-qing[2], WANG Yu-hong[1], JIANG De-jian[1, 2*] (1. *Science and Technology Innovation Center of Hunan University of Traditional Chinese Medicine & Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Depressive Diseases*, *Changsha* 410000; 2. *Hunan Key Laboratory of Drug Efficacy and Safety Evaluation & Hunan Drug Safety Evaluation Research Center*, *Changsha* 410331)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of carnosic acid on postpartum depression mouse model. **Methods** Totally 70 female C57BL/6 mice were selected to undergo bilateral ovarian castration surgery, before hormone withdrawal to simulate pregnancy to create a postpartum

基金项目：湖南省企业科技创新创业团队（No.2021）。

作者简介：兰前清，女，在读硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：lqqw2005@163.com　*通信作者：姜德建，男，研究员，主要从事中药药理学研究，email：jiangdejian@hnse.org

depression model. Fifty postpartum depression model mice were screened based on the surgar preference test and randomly divided into a model control group, an estrogen group (20 μg • kg^{-1}, sc), and low, medium, and high dose carnosic acid groups (25, 50, and 100 mg • kg^{-1}, ig). Another 10 female C57BL/6 mice that underwent sham surgery served as the sham-operated control group. The administration group was administered once a day for 28 consecutive days, at 20 mL • kg^{-1}. After the last dose, behavioral tests such as sugar preference, forced swimming, and open field test were conducted to evaluate depression-like behaviors. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the fibroblast growth factor 9 (FGF9) and estradiol (E2) in the serum, and 5-hydroxytryptamine (5-HT) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampal tissue. BDNF and FGF9 expressions in the mice hippocampus tissue of different groups were detected by Western blot. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the CA1 area of the mouse hippocampal tissue. **Results** Compared with the sham-operated control group, the surgar preference rate of the model control group was significantly decreased ($P < 0.01$), the immobility time of forced swimming was increased ($P < 0.01$), and the total distance and average speed of the mice were decreased ($P < 0.01$). The neuronal cells in the CA1 region of the hippocampus were scattered, with abnormal morphology and fragmentation. ELISA showed a significant decrease in the serum E2, 5-HT and BDNF levels in the hippocampal tissue, and a significant increase in the serum FGF9 levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Western blot showed that the expression of BDNF protein decreased and FGF9 increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model control group, after carnosic acid treatment, the surgar preference rate of mice in each group increased ($P < 0.01$). The swimming immobility time in estrogen group and carnosic acid medium and high dose groups decreased, while the total distance and average speed of movement in the open field experiment increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pathological damage of the hippocampus was alleviated, the cells were tightly arranged, with normal morphology. The serum E2 level in the estrogen group increased significantly ($P < 0.05$), and the hippocampal 5-HT content increased to various degrees in the estrogen group and the carnosic acid group ($P < 0.01$). The content of FGF9 in the estrogen group and carnosic acid medium and high dose groups was significantly decreased ($P < 0.05$). The estrogen group and high dose of carnosic acid significantly increased BDNF content, up-regulated the BDNF expression level and down-regulated the FGF9 expression level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Carnosic acid obviously improves the hippocampal tissue damage and depression-like behaviors in postpartum depression mice, whose mechanism may be related to increasing hippocampal 5-HT, BDNF, and reducing FGF9 levels.

Key words: carnosic acid; postpartum depression; mechanism of action; animal model

产后抑郁（postpartum depression，PPD）是产妇产褥期常见的一种精神类疾病，临床主要表现为情绪低落、易怒、失眠等症状，严重者带有强烈的自杀倾向。据流行病学统计分析，产后抑郁在西方国家的发病率为 7% ～ 40%，在我国的发病率为 10%[1]，随着现代社会经济的发展，女性生活压力逐渐增加，产后抑郁的发展每年呈递增的趋势，对家庭和社会都造成了极大的危害。目前抗 PPD 西药在临床使用范围广，但起效慢，不良反应多，且对母乳喂养胎儿造成一定影响，极大地限制了其使用。因此开发抗 PPD 药仍是临床一大需求。

鼠尾草酸（carnosic acid，CA）是唇形科迷迭香中提取的一种酚类二萜成分。作为一种天然药物，不仅能抗菌抗炎，还有镇静安神、止痛等功效。已有研究证明迷迭香及其活性成分具有明显的抗抑郁和改善认知作用[2-4]。本课题组前期研究已证明在慢性束缚应激诱导抑郁模型小鼠的行为学表现中，CA 能增加小鼠自主活动的爬壁时间和活动次数，提高糖水偏爱指数和悬尾活动

比，明显抑制雄性 ICR 小鼠抑郁样行为而发挥抗抑郁作用[5]，其作用机制与降低成纤维生长因子 9（FGF9）/FGFR3 通路有关。近年来，FGFR3 及 FGF9 被认为是抗抑郁药的新靶点之一，在此基础上，本实验采用卵巢去势结合激素撤退的方法建立 PPD 模型，探讨 CA 抗 PPD 的作用机制，旨在为 PPD 临床用药提供参考。

1　材料

1.1　实验动物

雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 70 只，体重（17～19）g[湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物合格证编号：No.430727231100073683]。实验动物饲养于本中心 SPF 级屏障环境内，实验动物使用许可证号：SYXK（湘）2020-0015。

1.2　试药

CA（纯度：90%，今汉药业有限公司，批号：CA95-160401）；舒泰 50（规格：替来他明 125 mg，唑拉西泮 125 mg，法国维克有限公司，批号：8SKGA）；黄体酮注射液、苯甲酸雌二醇注射液（合肥新科信公司，批号分别为 20220201、20220201）；FGF9 抗体（批号：B7901）；脑源性神经营养因子（BDNF）抗体（批号：B9001）（中国 Immunowany 公司）；β-actin 抗体（中国 ABclonal 公司，批号：ab8227）；FGF9 试剂盒（批号：INS-28369）、雌二醇（E2）试剂盒（批号：INS-20231）、5- 羟色胺（5-HT）试剂盒（批号：INS-20010）、BDNF 试剂盒（批号：INS-20520）（黄石市艾恩斯生物科技有限公司）。

1.3　仪器

JL Behv 动物行为视频分析系统（上海吉量软件科技有限公司）；台式高速冷冻离心机（湖南湘立科学仪器公司）；Spectra Max i3x 型多功能酶标仪（上海美谷分子）；低温冷冻研磨仪（上海净信实业公司）；DYY-6D 型电泳仪（北京六一生物）；恒温金属浴（杭州博日公司）；化学发光成像系统（Tanon 公司）；RM2235 型石蜡切片机、CX31 型生物显微镜（德国 Leica）。

2　方法

2.1　PPD 模型制备与评价

雌性小鼠采用卵巢去势加激素撤退法建立 PPD 模型[6-7]。模型组动物腹腔注射舒泰 50（50 mg・kg^{-1}），待小鼠麻醉后，剃毛，碘伏消毒，用圆剪分离皮肤与肌层后，可见球形且凹凸不平的卵巢，摘除卵巢。术后恢复 7 d，存活下来的去卵巢小鼠连续 16 d 每日皮下注射苯甲酸雌二醇（溶于玉米油，20 μg・kg^{-1}）和黄体酮注射液（溶于玉米油，32 mg・kg^{-1}）。然后突然停用黄体酮激素并服用高剂量的苯甲酸雌二醇（400 μg・kg^{-1}）7 d。次日进行糖水偏爱测试筛选出糖水偏爱指数小于 70% 的合格小鼠，验证模型建立是否成功。另取 10 只小鼠为假手术对照组，只进行手术而不摘除卵巢。假手术对照组每日注射等体积的玉米油。

2.2　药物干预

根据糖水偏爱指数筛选 50 只模型组小鼠随机分为模型对照组，雌激素组，CA 低、中、高剂量组（25、50、100 mg・kg^{-1}），每组 10 只。剂量设计参照课题组前期研究剂量使用[5]。假手术对照组及模型对照组给予同体积的羧甲基纤维素钠（CMC-Na）灌胃。雌激素组给予苯甲酸雌二醇注射液（溶于玉米油），皮下给药 20 μg・kg^{-1}，给药体积为 20 mL・kg^{-1}，各组 1 次・d^{-1}，共 28 d。

2.3　指标检测

2.3.1　糖水偏爱试验[8]　实验前进行适应性训练，每笼同时放 2 个水瓶，1 瓶为 1% 蔗糖水，1 瓶为纯净水，训练 24 h。检测前小鼠进行 24 h 的禁水，测试时准确称取相对应的蔗糖水和纯净水放入笼中，测试 1 h 后，记录小鼠消耗的蔗糖水和纯净水的消耗量，并计算小鼠糖水偏爱指数，糖水偏爱指数（%）＝糖水消耗量 / 总液体消耗量 ×100%。

2.3.2　强迫游泳测试　各组小鼠在安静状态下放入装有温水 [（25±1）℃] 的透明玻璃桶中游泳，每只小鼠观察 7 min，用摄像机记录后 5 min 内累计不动时间，结束后将小鼠擦干放回笼子。

2.3.3　自主活动测试　实验在高 30 ～ 40 cm，底边长为 100 cm 的自由探索开放场地中进行，周壁的颜色为黑色。旷场底面被平均分为 25 个 4 cm×4 cm 的小方格。每个场地正上方架有摄像头，视野覆盖整个区域。将小鼠放置在正中央格，同时进行摄像和计时，时间为 5 min。采用 JL Behv 动物行为视频分析系统来分析小鼠的活动总路程、平均速度。

2.3.4　ELISA 法检测血清中 E2、FGF9 含量　给药结束后对各组小鼠进行眼眶采血，于 EP 管中静置 10 min，待血液自然凝固后离心，收集上清液，按照 ELISA 试剂盒相关操作说明进行 FGF9、E2 含量测定（波长范围 450 nm）。

2.3.5　ELISA 法检测海马组织中 5-HT、BDNF 含

量 采血完成后，小鼠麻醉颈椎脱臼处死，在冰上分离暴露出海马组织，用镊子分离周围组织并小心取出海马组织，其中右侧大脑的海马组织放入冻存管中，液氮封闭，－ 80 ℃保存。左侧海马组织放入 10% 甲醛溶液中进行固定。右侧海马组织进行组织匀浆，离心并收集上清液，按照 ELISA 试剂盒相关操作说明进行 5-HT、BDNF 含量测定（波长范围 450 nm）。

2.3.6 Western blot 法检测海马组织 FGF9、BDNF 蛋白表达 将冻存于－ 80 ℃的海马组织取出，称取适量组织并加入蛋白酶抑制剂进行组织匀浆，离心取上清液后进行蛋白变性，检测各组样本 FGF9、BDNF 蛋白浓度。样本等量上样并在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳 2 h，恒压下将所有样本转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，用 5% 脱脂牛奶室温封闭膜 1 h。随后加入目的一抗 FGF9（1∶1000）、BDNF（1∶1000）孵育，4 ℃过夜。TBST 洗膜 3 次，二抗（1∶10 000）孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次。采用 ECL 化学发光成像系统进行显影曝光。蛋白表达量采用目的蛋白与 β-actin 灰度值比值表示。

2.3.7 HE 染色观察海马组织病理影响 将固定在 10% 甲醛溶液的脑组织取出，经脱水、浸蜡、包埋等实验操作。切成 3 ～ 10 μm 的薄片置于 40 ℃左右水浴中，烘干后的切片进行 HE 染色处理，并置于显微镜下进行海马组织病理学检查。

2.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件分析系统进行数据统计，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}$±s）表示，并进行正态性和方差齐性检验。多组间均数比较采用单因素方差分析（ANOVA）分析，并根据方差齐性情况选用 LSD ＋ Dunnet（方差齐）或 Tamhane’s T2（方差不齐）进行比较分析。$P \leqslant 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CA 对 PPD 模型小鼠糖水偏爱指数的影响

与假手术对照组比较，模型对照组糖水偏爱指数显著降低（$P < 0.01$）。与模型对照组比较，雌激素组及 CA 各剂量组糖水偏爱指数均显著增加（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），见表 1。

3.2 CA 对 PPD 模型小鼠强迫游泳实验的影响

与假手术对照组比较，模型对照组强迫游泳不动时间显著增加（$P < 0.01$）。与模型对照组比较，雌激素组及 CA 中、高剂量组小鼠不动时间显著降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），见表 2。

表 1 各组小鼠糖水偏爱指数比较 ($\bar{x}$±s，n = 8)

Tab 1 Surgar preference index of mice in each group ($\bar{x}$±s，n = 8)

组别	糖水偏爱指数 /%
假手术对照组	83.39±6.36
模型对照组	68.10±11.29**
雌激素组	75.94±7.05#
CA 低剂量组	78.50±3.77##
CA 中剂量组	82.99±5.47##
CA 高剂量组	84.80±5.88##

注：与假手术对照组比较，**$P < 0.01$；与模型对照组比较，#$P < 0.05$，##$P < 0.01$。

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

表 2 各组小鼠强迫游泳不动时间比较 ($\bar{x}$±s，n = 8)

Tab 2 Forced swimming immobility time in mice of each group ($\bar{x}$±s，n = 8)

组别	不动时间 /s
假手术对照组	76.94±34.54
模型对照组	139.97±45.00**
雌激素组	71.61±29.61##
CA 低剂量组	127.97±29.84
CA 中剂量组	98.01±26.69#
CA 高剂量组	75.04±50.32##

注：与假手术对照组比较，**$P < 0.01$；与模型对照组比较，#$P < 0.05$，##$P < 0.01$。

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

3.3 CA 对 PPD 模型小鼠自主活动的影响

与假手术对照组比较，模型对照组小鼠运动总路程和平均速度显著降低（$P < 0.01$）。与模型对照组比较，雌激素组及 CA 中、高剂量组小鼠运动总路程和平均速度显著增加（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。结果见图 1 和表 3。

表 3 各组小鼠运动总路程和平均速度比较 ($\bar{x}$±s，n = 8)

Tab 3 Total distance and average speed of movement of mice in each group ($\bar{x}$±s，n = 8)

组别	总路程 /mm	平均速度 /（mm•s^{-1}）
假手术对照组	10 151.91±2610.15	33.84±8.70
模型对照组	6985.08±1447.26**	23.28±4.82**
雌激素组	9170.37±1780.59#	30.57±5.94#
CA 低剂量组	8474.24±1938.39	28.25±6.46
CA 中剂量组	9977.31±2323.35##	33.26±7.75##
CA 高剂量组	10 058.44±2541.91##	33.53±8.47##

注：与假手术对照组比较，**$P < 0.01$；与模型对照组比较，#$P < 0.05$，##$P < 0.01$。

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

3.4 CA 对 PPD 模型小鼠血清中 FGF9、E2 含量的影响

与假手术对照组比较，模型对照组血清 E2

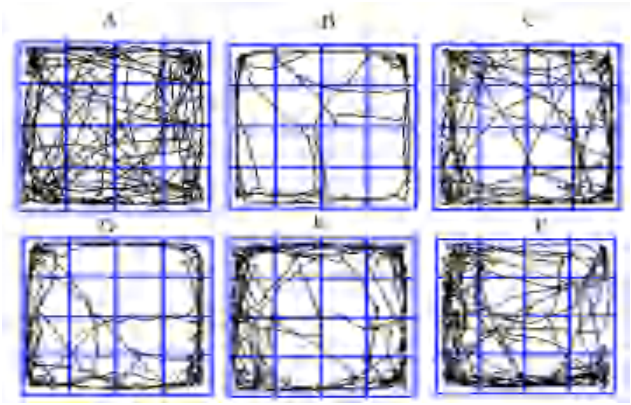


图 1　各组小鼠自主活动运动轨迹图

Fig 1　Movement trajectories of autonomous activities of mice in each group

A. 假手术对照组（sham-operated control group）；B. 模型对照组（model control group）；C. 雌激素组（estrogen group）；D. CA 低剂量组（carnosic acid low-dose group）；E. CA 中剂量组（carnosic acid medium dose group）；F. CA 高剂量组（carnosic acid high dose group）

含量显著下降、FGF9 含量显著上升（$P < 0.01$）。与模型对照组比较，雌激素组 E2 含量显著上升（$P < 0.05$），雌激素组及 CA 中、高剂量组 FGF9 含量显著下降（$P < 0.05$），见表 4。

表 4　各组小鼠血清 E2、FGF9 水平比较 ($\bar{x}\pm s$，$n = 8$)

Tab 4　Serum E2 and FGF9 levels in each group ($\bar{x}\pm s$，$n = 8$)

组别	E2 水平 /（pmol•L^{-1}）	FGF9 水平 /（pg•mL^{-1}）
假手术对照组	81.84±3.79	363.33±21.57
模型对照组	67.71±4.11**	412.67±31.39**
雌激素组	72.57±2.72$^{\#}$	377.37±23.34$^{\#}$
CA 低剂量组	68.39±3.20	389.49±20.95
CA 中剂量组	68.65±4.37	379.68±20.11$^{\#}$
CA 高剂量组	69.39±4.38	365.58±28.59$^{\#}$

注：与假手术对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型对照组比较，$^{\#}P < 0.05$。

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

3.5　CA 对 PPD 模型小鼠海马组织中 5-HT、BDNF 含量的影响

与假手术对照组比较，模型对照组小鼠海马组织 5-HT、BDNF 的含量显著降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。与模型对照组比较，雌激素组及 CA 各剂量组 5-HT 均明显升高（$P < 0.01$），雌激素组和 CA 高剂量组 BDNF 的含量显著增加（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），见表 5。

3.6　CA 对 PPD 模型小鼠海马组织 FGF9、BDNF 蛋白表达影响

与假手术对照组比较，模型对照组小鼠 BDNF 蛋白表达显著降低（$P < 0.01$），FGF9 蛋白表达显著上升（$P < 0.05$）。与模型对照组比较，雌激素组及

表 5　各组小鼠海马组织中 5-HT、BDNF 水平 ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

Tab 5　5-HT and BDNF levels in the hippocampus of mice in each group ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

组别	5-HT/（ng • mL^{-1}）	BDNF/（pg • mL^{-1}）
假手术对照组	10.36±0.43	964.07±13.76
模型对照组	8.33±0.53**	879.72±14.44*
雌激素组	10.40±0.36$^{\#\#}$	969.70±3.01$^{\#}$
CA 低剂量组	9.92±0.37$^{\#\#}$	913.91±66.69
CA 中剂量组	10.28±0.55$^{\#\#}$	931.69±3.56
CA 高剂量组	10.29±0.30$^{\#\#}$	989.21±57.86$^{\#\#}$

注：与假手术对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型对照组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

CA 高剂量组 BNDF 蛋白表达明显升高（$P < 0.05$），FGF9 蛋白表达明显下降（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。结果见表 6 和图 2。

表 6　各组小鼠海马组织中 FGF9、BDNF 蛋白表达量 ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

Tab 6　FGF9 and BDNF protein expression in the hippocampus of mice in each group ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

组别	FGF9	BDNF
假手术对照组	0.50±0.31	0.90±0.33
模型对照组	0.91±0.24*	0.22±0.04**
雌激素组	0.50±0.05$^{\#}$	0.59±0.16$^{\#}$
CA 低剂量组	1.02±0.07	0.23±0.07
CA 中剂量组	0.62±0.23	0.38±0.15
CA 高剂量组	0.32±0.12$^{\#\#}$	0.69±0.28$^{\#}$

注：与假手术对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型对照组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

图 2　各组小鼠海马组织 FGF9、BDNF 条带图

Fig 2　Band maps of FGF9 and BDNF in the hippocampus of mice in each group

A. 假手术对照组（sham-operated control group）；B. 模型对照组（model control group）；C. 雌激素组（estrogen group）；D. CA 低剂量组（carnosic acid low dose group）；E. CA 中剂量组（carnosic acid medium dose group）；F. CA 高剂量组（carnosic acid high dose group）

3.7　CA 对 PPD 小鼠模型海马组织病理学检查的影响

假手术对照组神经元细胞排列整齐，细胞间隙均匀，细胞形态大小正常，清晰可见细胞核。模型对照组神经元细胞排列散乱并出现神经元碎片，细胞间隙大，细胞形态异常且部分细胞核模糊。末次给药结束后，雌激素组及 CA 各剂量组

较模型对照组神经元损伤均有不同程度的减轻。与假手术对照组比较，模型对照组神经元细胞散乱分布，出现明显神经元碎片，细胞间隙增大且形态异常（$P < 0.05$）。与模型对照组比较，雌激素组及 CA 高剂量组神经元排列较紧密，细胞形态趋于正常化（$P < 0.05$）。结果见表 7 和图 3。

表 7 各组小鼠海马组织病理评分比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Tab 7 Pathological scores of hippocampal tissue in mice of each group（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

组别	病理评分
假手术对照组	0.00±0.00
模型对照组	2.33±0.58*
雌激素组	0.33±0.58#
CA 低剂量组	1.67±0.58
CA 中剂量组	1.00±1.00
CA 高剂量组	0.67±0.58#

注：与假手术对照组比较，*$P < 0.05$；与模型对照组比较，#$P < 0.05$。

Note：Compared with the sham-operated control group，*$P < 0.05$；compared with the model control group，#$P < 0.05$.

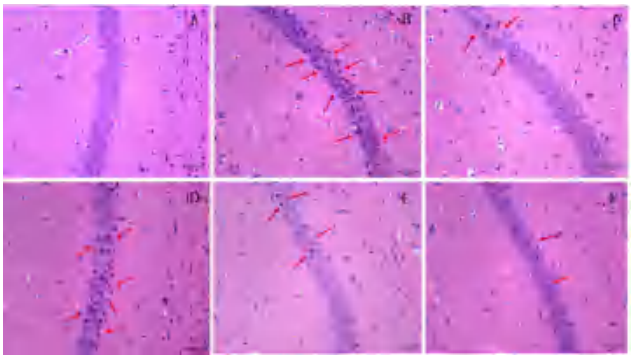


图 3 各组小鼠海马组织 CA1 区组织病理学检查（HE，×100）

Fig 3 Histopathological examination of hippocampal CA1 region in mice of each group（HE，×100）

A. 假手术对照组（sham-operated control group）；B. 模型对照组（model control group）；C. 雌激素组（estrogen group）；D. CA 低剂量组（carnosic acid low dose group）；E. CA 中剂量组（carnosic acid medium dose group）；F. CA 高剂量组（carnosic acid high dose group）

4 讨论

4.1 CA 能够改善 PPD 小鼠抑郁样行为，促进脑组织修复

目前 PPD 发病机制复杂，常见于社会、心理、生物因素等方面。雌激素是一种维持机体正常生理功能的类固醇激素，妊娠和产后期间是女性生殖激素水平急速波动变化阶段。有研究指出产后雌激素水平的急剧下降是 PPD 的病因之一 [9]。本实验采用激素模拟妊娠后停撤激素诱导 PPD 模型，能够更直接地捕获雌激素、孕激素波动而造成的情绪和行为的改变，运用范围广且便于操作，是 PPD 机制研究中较为理想的模型 [10-11]。海马作为调节情感处理和认知行为的重要脑区 [12]，有研究指出，在激素撤退的 PPD 模型中海马区出现神经元结构及细胞形态异常、受损等现象 [13-14]，导致海马结构和功能异常而产生认知障碍。本实验行为学测试结果中，模型对照组小鼠糖水偏爱指数降低，游泳不动时间延长，自主活动运动总路程和平均速度减少，说明小鼠失去对糖水的喜爱度，丧失挣扎的欲望及失去探索兴趣而导致快感缺失、行为绝望。此外脑组织病理检查发现小鼠海马区出现神经元细胞严重受损、形态异常等现象，说明脑组织损伤造成 PPD 小鼠行为异常。这与 PPD 临床现象一致，提示 PPD 造模成功。激素水平的急剧变化是 PPD 的生物学基础。而雌激素水平作为 PPD 的病因之一，临床研究指出，抑郁患者 E2 水平较正常人显著降低 [15]，另在激素撤退诱导的 PPD 动物模型中也证实了该结论 [16]。本实验结果表明，模型对照组小鼠血清 E2 较假手术对照组明显减少，进一步验证 PPD 模型造模成功。前期在慢性不可预知性刺激（CUMS）抑郁模型中发现，CA 能增加自主活动次数及糖水偏爱指数，降低摄食潜伏期和游泳不动时间 [17]，改善抑郁小鼠行为。最近有学者发现 CA 在卵巢切除的围绝经期抑郁模型中改善小鼠抑郁样行为，表现为在强迫游泳和悬尾测试更短的不动时间，蔗糖偏好增强行为 [18]。在本实验中，CA 能够提高 PPD 模型小鼠糖水偏爱指数及小鼠运动总路程和平均速度，缩短小鼠游泳不动时间。脑组织病理结果显示，PPD 小鼠脑组织神经元细胞形态逐渐恢复正常，提示 CA 可修复脑组织损伤而改善 PPD 小鼠抑郁样行为。此外，通过皮下给予 E2，使得雌激素组 E2 含量明显升高而产生抗抑郁作用。在已有的研究中也证实了其抗抑郁作用 [19-20]。而 CA 对 E2 不产生影响，推测可能存在其他因素的参与，具体机制有待进一步研究。

4.2 CA 能够增加海马 5-HT、BDNF，降低 FGF9 水平

目前，单胺类神经递质假说及神经营养因子假说在 PPD 研究机制中发挥着重要作用，该假说认为影响情绪认知障碍的基础是由神经递质紊乱和生长因子失调造成的。海马体相关机制涉及产后情绪和认知功能障碍的发病机制 [21]。海马中的 5-HT 通过与受体接触，影响神经元的发育和神经可塑性调节。同时与抑郁症关系最为密切的是 5-羟色胺受体 1A（5-HT1A），其主要分布在突

触前膜和后膜，参与睡眠、情绪变化和情感活动等多个中枢神经系统反应。BDNF 在海马体及大脑皮层中是主要的神经营养因子，可改变脑内突触联系，对神经元的结构和神经可塑性起重要作用[22-23]。动物研究表明，PPD 模型动物前额叶皮层中 5-HT、BDNF 水平下调[24]。临床 PPD 患者血清结果显示 5-HT、BDNF 水平下降[25-26]。本实验结果显示，模型对照组 PPD 小鼠 5-HT、BDNF 含量显著降低，BDNF 蛋白表达下降，与以上论述一致。基于既往 5-HT、BDNF 相关机制研究[27-28]，BDNF 与 5-HT 之间通过影响神经元可塑性和抑郁易感性而发挥抗抑郁作用，推测 BDNF 可能通过激活原肌球蛋白激酶 B 受体（TrkB）通路来促进 5-HT 能神经元的发育，同样 5-HT1A 的激活导致 cAMP 升高，从而激活蛋白激酶 A（PKA）和 cAMP 反应元件结合蛋白（CREB）来促进 BDNF 上调。此外，邓祥敏等[29]在 CUMS 动物模型中发现，CA 可增加杏仁核 5-HT 和海马 BDNF 含量。也有研究指出 CA 在卵巢切除的抑郁模型小鼠中可以逆转海马 5-HT、BDNF 水平降低趋势[18]。本实验结果中，CA 可提高 PPD 模型小鼠海马组织 5-HT 和 BDNF 含量，促进 BDNF 蛋白水平上调。提示 CA 治疗 PPD 作用机制与海马 5-HT、BDNF 有关。

作为另一种神经营养因子，FGF9 是一类促进细胞存活及有丝分裂的生长因子，其成纤维生长因子（FGF）家族成员在情绪失调和影响髓鞘细胞和轴突交流具有重要作用[30]。目前，针对 FGF9 在抑郁神经系统中的作用的相关基础研究中尚少。临床抑郁患者血清中 FGF9 含量明显升高[17]。另有学者在死后人脑基因表达研究中发现重度抑郁患者海马体中 FGF9 表达上调[31]。与此同时，在慢性社交失败动物模型[32]及慢性应激模型[33]中发现 FGF9 含量明显增加。本实验 PPD 小鼠模型中同样也发现小鼠血清 FGF9 含量升高，海马组织 FGF9 蛋白表达上调。提示 FGF9 可能是多种因素抑郁模型引起的共同因子，是抑郁症产生的另一靶点之一。在前期研究中，我们发现 CA 能降低血清及海马组织中 FGF9 的含量，抑制 FGF9 mRNA 表达上调，而升高海马组织 FGFR3 的表达量[4-5]。本研究结果显示，在激素撤退诱导的 PPD 模型小鼠中，CA 能够减少 PPD 小鼠血清 FGF9 含量，抑制 FGF9 蛋白表达上调，提示 CA 发挥抗 PPD 作用机制与 FGF9 有关。在最近的 FGF9 机制研究中，可推测在疾病发展初期会出现炎症反应，随着炎症因子增加使得少突胶质细胞和髓鞘受损进而促使 FGF9 表达水平升高[34-35]。而 FGF 受体（FGFR）的增加抑制蛋白激酶 B（AKT）、BDNF-TrKB 表达的磷酸化导致髓鞘蛋白 PLP 的减少，从而抑制髓鞘生成和神经再生进而导致抑郁症的产生。具体的机制有待进一步深入研究。

综上所述，本研究采用卵巢切除结合激素撤退方法诱导 PPD 模型，CA 能有效改善产后抑郁小鼠抑郁样行为，增加海马 5-HT、BDNF 含量，下调 FGF9 水平，促进海马神经元的修复而发挥抗产后抑郁作用。

参考文献

[1] 林雪，白芬霞 . 逍遥丸联合帕罗西汀对产后抑郁患者雌激素去甲肾上腺素 5- 羟色胺及多巴胺水平的影响 [J]. 中国妇幼保健，2020，35（22）：4229-4231.

[2] Ghasemzadeh Rahbardar M，Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of rosemary（*Rosmarinus officinalis* L.）and its active constituents on nervous system disorders [J]. Iran J Basic Med Sci，2020，23（9）：1100-1112.

[3] Sasaki K，El Omri A，Kondo S，et al. Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation [J]. Behav Brain Res，2013，238：86-94.

[4] Wang XQ，Tang YH，Zeng GR，et al. Carnosic acid alleviates depression-like behaviors on chronic mild stressed mice via PPAR-γ-dependent regulation of ADPN/FGF9 pathway [J]. Psychopharmacology（Berl），2021，238（2）：501-516.

[5] 邵亚杰 . 鼠尾草酸对慢性束缚应激小鼠模型的影响及机制研究 [D] 长沙：湖南师范大学，2021.

[6] Zhang QY，Huang QW，Yao L，et al. Gestational folic acid administration alleviated maternal postpartum emotional and cognitive dysfunction in mice [J]. Front Pharmacol，2021，12：701009.

[7] 刘梦 . 补虚化瘀法对产后抑郁模型大鼠下丘脑 BDNF、TrkB mRNA 表达水平影响的研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2018.

[8] Li XJ，Qiu WQ，Da XL，et al. A combination of depression and liver Qi stagnation and spleen deficiency syndrome using a rat model [J]. Anat Rec（Hoboken），2020，303（8）：2154-2167.

[9] 宁海燕，谢萍，冯俭，等 . 参归仁合剂对产后抑郁大鼠行为学及雌激素介导下 ERK1/2 通路中 MEK1 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（3）：96-101.

[10] 王晓菲，严语，赵展，等 . 激素模拟妊娠后激素停撤大鼠产后抑郁模型的改进与评价 [J]. 实验动物科学，2022，39（4）：13-17.

[11] 吴玉珊，谢萍，李倩 . 产后抑郁动物模型研究进展 [J]. 实验动物科学，2015，32（2）：48-52.

[12] Korotkova T，Ponomarenko A，Monaghan CK，et al. Reconciling the different faces of hippocampal theta：the role of theta oscillations in cognitive，emotional and innate behaviors [J]. Neurosci Biobehav Rev，2018，85：65-80.
[13] 郑舒，何津，单延红 . 逍遥散联合维生素 D 对产后抑郁大鼠行为学及脑组织形态学的影响 [J]. 陕西中医，2021，42（10）：1333-1337.
[14] 邓竹梅 . 参归仁合剂对产后抑郁模型大鼠额叶神经元形态、数量及 GABA 信号分子表达的影响 [D]. 成都：成都中医药大学，2022.
[15] Tian JS，Qin PF，Xu T，et al. Chaigui granule exerts anti-depressant effects by regulating the synthesis of Estradiol and the downstream of CYP19A1-E2-ERKs signaling pathway in CUMS-induced depressed rats [J]. Front Pharmacol，2022，13：1005438.
[16] Hedges VL，Heaton EC，Amaral C，et al. Estrogen withdrawal increases postpartum anxiety via oxytocin plasticity in the paraventricular hypothalamus and dorsal raphe nucleus [J]. Biol Psychiatry，2021，89（9）：929-938.
[17] 唐娅辉 . ADPN/FGF9 通路在慢性应激致抑郁及其药物治疗中的作用研究 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2021.
[18] Samy DM，Mostafa DK，Saleh SR，et al. Carnosic acid mitigates depression-like behavior in ovariectomized mice via activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. Mol Neurobiol，2023，60（2）：610-628.
[19] Heydarpour P，Salehi-Sadaghiani M，Javadi-Paydar M，et al. Estradiol reduces depressive-like behavior through inhibiting nitric oxide/cyclic GMP pathway in ovariectomized mice [J]. Horm Behav，2013，63（2）：361-369.
[20] Dennis CL，Ross LE，Herxheimer A. Oestrogens and progestins for preventing and treating postpartum depression [J]. Cochrane Database Syst Rev，2008，2008（4）：Cd001690.
[21] Baka J，Csakvari E，Huzian O，et al. Stress induces equivalent remodeling of hippocampal spine synapses in a simulated postpartum environment and in a female rat model of major depression [J]. Neuroscience，2017，343：384-397.
[22] 杨歆科 . 产后抑郁大鼠行为学与激素水平、单胺递质变化及补益心脾法干预机制研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2012.
[23] 吕凯，唐启盛，李小黎，等 . 益肾调气法对产后抑郁大鼠行为及海马 5-HT、5-HT-（1A）R 的影响 [J]. 北京中医药大学学报，2013，36（5）：327-332.
[24] Li H，Wang T，Shi C，et al. Inhibition of GALR1 in PFC alleviates depressive-like behaviors in postpartum depression rat model by upregulating CREB-BNDF and 5-HT levels [J]. Front Psychiatry，2018，9：588.
[25] 陈雪春，陈景洲 . 产后抑郁与分娩前后血清 Hcy、E2、5-HT、催乳素水平的相关性 [J]. 中国妇幼健康研究，2022，33（6）：20-24.
[26] 吉文丽 . 产后抑郁的危险因素分析及血清 BDNF、S100B 和 NPY 水平变化的临床意义 [J]. 检验医学与临床，2022，19（20）：2820-2824.
[27] Galter D，Unsicker K. Sequential activation of the 5-HT1（A）serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype [J]. Mol Cell Neurosci，2000，15（5）：446-455.
[28] Galter D，Unsicker K. Brain-derived neurotrophic factor and trkB are essential for cAMP-mediated induction of the serotonergic neuronal phenotype [J]. J Neurosci Res，2000，61（3）：295-301.
[29] 邓祥敏，朱星宇，李光 . 鼠尾草酸对慢性不可预见性应激模型大鼠抑郁样行为及杏仁核 5-HT、5-HIAA 和海马 BDNF 含量的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2019，28（33）：3668-3671.
[30] 黄磊，郑春美，庞卢伟，等 . 成纤维细胞生长因子 9、神经肽 Y 与双相情感障碍的关系 [J]. 中国现代医生，2022，60（28）：15-19.
[31] Bernard R，Kerman IA，Thompson RC，et al. Altered expression of glutamate signaling，growth factor，and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression [J]. Mol Psychiatry，2011，16（6）：634-646.
[32] Aurbach EL，Inui EG，Turner CA，et al. Fibroblast growth factor 9 is a novel modulator of negative affect [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2015，112（38）：11953-11958.
[33] 吴莉峰，石镇港，曾贵荣，等 . 两种慢性应激对 ICR 小鼠抑郁样行为表现及海马中 FGF2/FGF9 含量的影响 [J]. 中南药学，2019，17（3）：394-398.
[34] Rajendran R，Rajendran V，Giraldo-Velasquez M，et al. Oligodendrocyte-specific deletion of FGFR1 reduces cerebellar inflammation and neurodegeneration in MOG（35-55）-induced EAE [J]. Int J Mol Sci，2021，22（17）.
[35] Thümmler K，Wrzos C，Franz J，et al. Fibroblast growth factor 9（FGF9）-mediated neurodegeneration：implications for progressive multiple sclerosis? [J]. Neuropathol Appl Neurobiol，2023，49（5）：e12935.

（收稿日期：2023-11-02；修回日期：2023-12-20）

基于 SPG 膜乳化法制备熊果酸微球的处方优化与体外释放研究

王振霖[1]，齐娜[1, 2*]（1. 桂林医学院，广西　桂林　541004；2. 南方医科大学中西医结合医院，广州　510315）

摘要：目的　制备熊果酸缓释微球，并考察其粒径、PDI、包封率、载药量以及体外释放。**方法**　以熊果酸为模型药物、聚乳酸 - 羟基乙酸聚合物为载体材料，采用 SPG 膜乳化法制备熊果酸微球，通过单因素方法优化处方；纳米粒度测量仪测定粒径和 PDI；光学显微镜观察形态；紫外 - 可见分光光度法测定熊果酸微球的体外释放率。**结果**　制备的熊果酸微球粒径为（1.09±0.03）μm，PDI 为（0.363±0.006），包封率为（87.19±4.71）%，载药量为（11.37±0.64）%，120 h 体外累计释放率达到（80.53±2.82）%，无明显突释效应。**结论**　熊果酸微球形态圆整，大小均一，包封率与载药量较高，体外无明显突释，工艺重现性好。

关键词：熊果酸；缓释微球；SPG 膜乳化法；体外释放
中图分类号：R94，R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0641-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.041

Formulation optimization and in vitro release of ursolic acid microspheres prepared by SPG membrane emulsification

WANG Zhen-lin[1], QI Na[1, 2*] (1. *Guilin Medical Institute*, *Guilin*　*Guangxi*　541004; 2. *Hospital of Integrated Western Medicine and Traditional Chinese Medicine*, *Southern Medical University*, *Guangzhou*　510315)

Abstract: Objective　To prepare sustained-release microspheres containing ursolic acid and to determine their particle size, PDI, encapsulation efficiency, drug loading capacity, and in vitro release. **Methods**　Ursolic acid microspheres were prepared as the model drug and polylactic acid hydroxyacetic acid polymer as the carrier material, with SPG membrane emulsification, and the formulation was optimized with a single factor method. The particle size and PDI were measured with a nanoparticle size analyzer, and the morphology under an optical microscope observed. The in vitro release rate of ursolic acid microspheres was determined by UV visible spectrophotometry. **Results**　The particle size of ursolic acid microspheres was (1.09±0.03) μm, PDI was (0.363±0.006), entrapment efficiency was (87.19±4.71)%, drug loading was (11.37±0.64)%, and the cumulative release rate in vitro was (80.53±2.82)% after 120 h. **Conclusion**　Ursolic acid microspheres have shape round, uniform size, high entrapment efficiency and drug loading, and are reproducible.

Key words: ursolic acid; sustained-release microsphere; SPG membrane emulsification method; in vitro release

熊果酸（ursolic acid，UA）是一种五环三萜类化合物，主要以游离的形式或者糖苷的形式分布于天然生长的草本植物中，具有保肝、抗肿瘤、抗氧化和抗菌等多种生物活性，可通过多个靶点、多种机制保护器官并改善其功能[1-2]。熊果酸抗肿瘤效果显著，但是存在水溶性差、剂型单一、口服给药吸收差和生物利用度低等问题，限制了其临床应用[3-4]。

基金项目：广东省自然科学基金（No. 2023A1515010570）。
作者简介：王振霖，男，在读硕士研究生，主要从事药物新型递送系统的研究，email：1359132352@qq.com　*通信作者：齐娜，女，博士，副教授，主要从事药物新型递送系统的研究，email：53123453@qq.com

微球是利用微型成球技术将药物分散在载体材料中制备成的微米级实心球体，尺寸一般为 1 ～ 250 μm[5]。聚乳酸 - 羟基乙酸聚合物（PLGA）由乳酸和羟基乙酸聚合而成，可溶于二氯甲烷，可在体内生物降解。现已作为载体材料广泛用于制备肠外缓控释制剂，可递送不同活性的药物成分，如蛋白、多肽和小分子等 [6]。PLGA 具有较好的缓释控释能力，且制备方便、成本低，在国内外已被广泛应用于医药产品生产 [7]。此外，PLGA 纳米微球具有一定靶向性 [8]，可以改善药物在体内的分布，同时发挥缓控释能力，使药物在体内长时间地以一定速率缓慢释放，减少血药浓度波动，有效避免峰谷效应带来的不良反应，提高患者顺应性 [9]。

微球制备技术有乳化溶剂挥发法、相分离法、喷雾干燥法和 SPG 膜乳化法等 [9-11]。SPG 膜乳化法经传统方法改良而来，SPG 膜孔径小且均匀可控，此法具有操作简单、粒径均一和稳定性好等优点，是制备微球常用方法。熊果酸作为脂溶性药物，难溶于水 [10-11]，将其制备成熊果酸微球，可提高其溶解度和生物利用度，为熊果酸今后的临床应用提供依据，现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

SPG 膜乳化制粒仪（MG-20，嘉盛科技有限公司）；电热恒温鼓风干燥箱（101A-2B，杭州市卓驰仪器有限公司）；恒温加热磁力搅拌器（SZCL-2A，巩义市予华仪器有限责任公司）；氮气瓶（CN201M313947，海南佳腾化工气体有限公司）；电子天平（JJ300，常熟市双杰测试仪器厂）；超声清洗器（KQ 218，昆山市舒美超声仪器有限公司）；离心机（TG16，湘潭离心机有限公司）；冻干机（TF-HFD-1，上海拓纷机械设备有限公司）；电子显微镜（SRD-2040，北京世纪科信科学仪器有限公司）；紫外可见分光光度计 [UV1900，让奇（上海）仪器科技有限公司]。

1.2 试药

二氯甲烷（AR，广东光华科技股份有限公司）；熊果酸（AR，阿拉丁试剂有限公司）；聚乙烯醇（PVA）(型号：PVA-1750，上海展云化工有限公司）；PLGA（型号：PLG50-07，深圳市博立生物材料有限公司）。

2 方法与结果

2.1 熊果酸分析方法的建立

精密称取 0.005 g 熊果酸于 50 mL 量瓶中，加入适量乙醇使其溶解，用乙醇缓慢定容，得到 100 μg • mL^{-1} 的熊果酸储备液。取一定量的熊果酸储备溶液，用紫外 - 可见分光光度计在 200 ～ 800 nm 内全波长扫描，得熊果酸最大吸收波长为 204 nm，所以后续实验选择 204 nm 作为熊果酸的检测波长。配制 10、20、30、40、50、60 和 80 μg • mL^{-1} 熊果酸乙醇溶液，在最大吸收波长下测定其吸光度（A），并以熊果酸浓度（C）为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线，得到回归方程：$A = 6.3868C + 0.0413$，$R^2 = 0.9963$，熊果酸在 10 ～ 80 μg • mL^{-1} 与吸光度线性关系良好。取适量熊果酸储液用乙醇稀释，得到低、中、高 3 个浓度组，每个浓度组测定 6 次，通过标准曲线计算 *RSD* 值，评价精密度和回收率。

结果低、中、高浓度精密度 *RSD* 分别为 1.9%、2.3% 和 1.6%，表明方法精密度良好。低、中、高浓度回收率均在 97% ～ 101%，对应的 *RSD* 分别为 1.5%、0.98% 和 0.63%，表明方法回收率良好。

2.2 熊果酸微球的制备

精密称取适量熊果酸和 PLGA，分别溶于乙醇和二氯甲烷，并使两种溶液混合均匀作为分散相，液体缓慢倒入分散相装置中。精密称取适量 PVA 溶解在 60 ℃超纯水中，得到不同浓度的 PVA 连续相。安装乳化膜装置，分散相在氮气压力挤压下通过 SPG 膜进行乳化反应，待产生大量气泡后关闭氮气阀。将得到的乳液放于通风橱中，在适宜的温度下搅拌 5 h，除去乳液中的有机溶剂，得到熊果酸微球混悬液。在 8000 r • min^{-1} 条件下离心 5 min，弃去上清液，用超纯水清洗 3 次，冷冻干燥得到淡黄色粉末。

2.3 熊果酸微球的粒径与分布

取少量熊果酸微球悬浮液用超纯水稀释 10 倍，用纳米粒度测量仪测定其粒径和分散系数。

2.4 熊果酸微球包封率与载药量的测定

首先将 5.0 mg 样品用少量的二氯甲烷溶解，移入 10 mL 量瓶中，加入 90% 的乙醇定容，8000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液按“2.1”项下方法测定并计算熊果酸微球中药物的含量，每组平行测定 3 次，取平均值，计算载药量和包封率。载药量（%）＝微球中所含药物量 / 纳米微球的总重量 ×100%; 包封率（%）＝微球中所含药物量 / 总的投药量 ×100%。

2.5 熊果酸微球的处方优化

2.5.1 不同 SPG 膜孔径对微球粒径的影响　熊果

酸微球制备方法同“2.2”项下，采用孔径为0.6、1.1和3 μm规格的SPG膜进行单因素控制变量试验，考察不同孔径的SPG膜对微球粒径的影响[12]。

结果如图1所示，随着SPG膜孔径的增大，所制备的熊果酸微球的粒径也逐渐增大，PDI呈先减小后增大的趋势。当SPG膜选用0.6 μm时，具有最小的粒径和最大的PDI，分别为0.7 μm和0.6。与3 μm的膜相比，1.1 μm膜制备的熊果酸微球具有较小的粒径和PDI，因此选择1.1 μm的SPG膜进行后续试验。

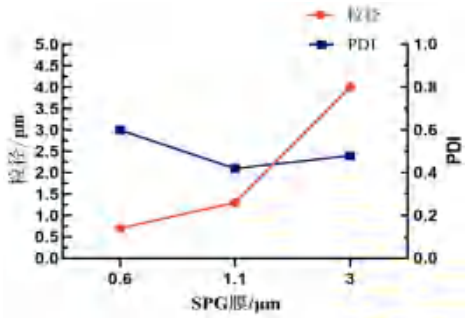


图1　SPG膜孔径对微球粒径和PDI分布的影响

Fig 1　Effect of SPG membrane pore size on particle size and PDI distribution

2.5.2　不同压力对微球粒径的影响　熊果酸微球制备方法同“2.2”项下，选用厚度为1.1 μm的SPG膜，在PVA浓度、转速、油水相比例、熊果酸投药量和PLGA加入量不改变的情况下，考察过膜压力（0.0015、0.0020和0.0025 MPa）对微球的影响。

结果如图2所示，当过膜压力为0.0020 MPa时，微球有较小的粒径和PDI，分别为1.28 μm和0.442，比其他组的分布更为均匀，因此选择过膜压力为0.0020 MPa进行后续试验。

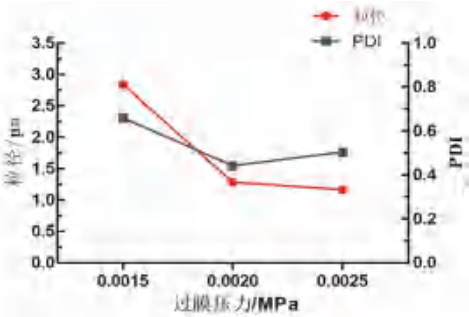


图2　压力对微球粒径和PDI分布的影响

Fig 2　Effect of pressure on particle size and PDI distribution

2.5.3　不同PVA浓度对微球粒径的影响　熊果酸微球制备方法同“2.2”项下，在过膜压力、转速、油水相比例、熊果酸投药量和PLGA加入量不改变的情况下，筛选PVA（0.5%、0.75%和1%）最佳浓度。

结果如图3所示，随着PVA浓度的增加，PDI呈现先减小后增大趋势，粒径呈增大趋势。0.75%PVA与其他两组相比有最小PDI，表明该浓度制备的微球分散较为均匀，并且粒径也较小，与0.5%PVA粒径尺寸无明显差异。0.75%PVA制备得到的微球溶液体系最均匀，因此选择PVA的浓度为0.75%。

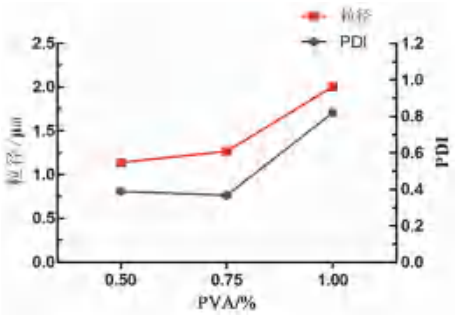


图3　PVA浓度对微球粒径和PDI分布的影响

Fig 3　Effect of PVA concentration on particle size and PDI distribution

2.5.4　不同转速对微球粒径的影响　熊果酸微球制备方法同“2.2”项下，在过膜压力、PVA浓度、油水相比例、熊果酸投药量和PLGA加入量不改变的情况下，将转速分别设为400、500和600 r·min^{-1}，考察不同转速对微球粒径的影响。

结果如图4所示，随着转速的增加，微球的粒径和PDI呈现先减小后增大趋势，以500 r·min^{-1}条件下制备出的微球有最小粒径和PDI，分别为1.20 μm和0.405，因此选择500 r·min^{-1}作为后续试验的转速。

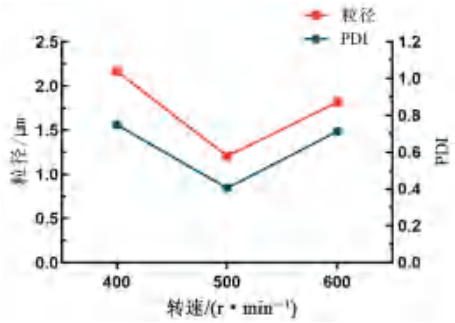


图4　转速对微球粒径和PDI分布的影响

Fig 4　Effect of rotational speed on particle size and PDI distribution

2.5.5　不同油水相比例对微球粒径的影响　熊果酸微球制备方法同“2.2”项下，在过膜压力、PVA浓度、转速、熊果酸投药量和PLGA加入量一定的情况下，将油水相比例分别设为1∶7、1∶9、1∶11考察不同油水相比例对微球粒径的影响。

结果如图5所示，微球粒径和PDI随着水相体积的增大而减小，成负相关。油水相体积比为1∶11时有最小粒径和PDI，分别为1.09 μm和0.378。因此设置油水相体积比为1∶11制备微球。

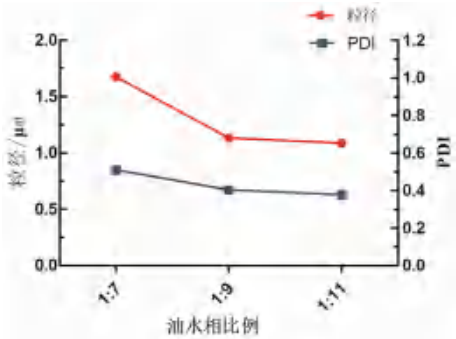


图 5 油水相比例对微球粒径和 PDI 分布的影响

Fig 5 Effect of oil-water ratio on particle size and PDI distribution

2.5.6 不同熊果酸投药量对微球包封率和载药量的影响 熊果酸微球制备与“2.2”项相同，保持过膜压力、PVA 浓度、转速、油水相比例和 PLGA 加入量不变，考察熊果酸投药量分别为 2.5、5 和 10 mg 时对微球包封率和载药量的影响。

结果如图 6 所示，随着熊果酸投药量的增加，包封率呈逐渐减小趋势，载药量呈逐渐增大趋势。熊果酸 2.5 mg 组包封率最大，但其载药量较小。熊果酸 5.0 mg 组与 2.5 mg 组相比，包封率差异不明显，而有较大的载药量。10.0 mg 组包封率最小，不符合 2020 年版《中国药典》规定的包封率不低于 80% 的要求。综合考虑选择熊果酸的投药量为 5.0 mg。

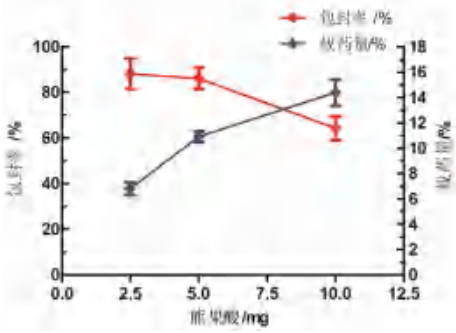


图 6 熊果酸投药量对微球包封率和载药量的影响

Fig 6 Effect of dosage of ursolic acid on entrapment efficiency and drug loading of microspheres

2.5.7 不同 PLGA 加入量对微球包封率和载药量的影响 熊果酸微球制备方法同“2.2”项下，保持过膜压力、PVA 浓度、转速、油水相比例和熊果酸投药量不变，考察 PLGA 投药量为 50、100 和 150 mg 时对微球包封率和载药量的影响。

结果如图 7 所示，随着 PLGA 的加入量的增加，粒径和 PDI 呈先增加后减小趋势，以 100 mg PLGA 制备的微球有最大包封率和载药量，包封率为 87.13%，载药量为 11.37%，选择 100 mg 作为后续试验 PLGA 的用量。

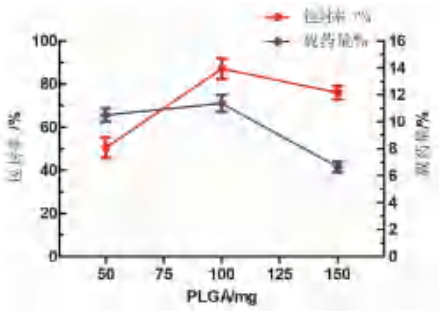


图 7 PLGA 加入量对微球包封率和载药量的影响

Fig 7 Effect of PLGA dosage on entrapment efficiency and drug loading of microspheres

2.6 验证试验

采用 SPG 膜乳化法制备熊果酸微球，根据单因素考察结果，最终选择过膜压力 0.0020 MPa、PVA 的浓度 0.75%、转速 500 r·min^{-1}、油水相体积比设置 1∶11、熊果酸投药量 5.0 mg 和 PLGA 加入量 100 mg 作为熊果酸微球最佳制备处方。以最佳处方制备熊果酸微球，得微球粒径为（1.09±0.03）μm，PDI 为（0.363±0.006），粒径较小、分散性良好（见图 8）。通过光学显微镜观察，微球形态圆整，大小均一，分布均匀且无聚集现象（见图 9）。同时，微球具有较高的包封率和载药量，分别为（87.19±4.71）% 和（11.37±0.64）%。

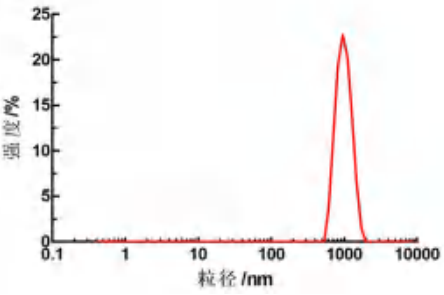


图 8 处方优化后熊果酸微球的粒径分布图

Fig 8 Particle size distribution of ursolic acid microspheres after formulation optimization

图 9 处方优化后熊果酸微球的光学显微图（×400）

Fig 9 Optical micrograph of ursolic acid microspheres after formulation optimization（×400）

2.7　熊果酸微球的体外释放

精密称取 10 mg 冻干微球于 10 mL 西林瓶中，加入 4 mL 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4），在 37 ℃、100 r • min^{-1} 的恒温水浴摇床中匀速振荡。分别在 1、2、4、8、12、24、48、72 和 120 h 时间点取 4 mL 上清液，然后加入等量的新鲜 PBS 溶液继续振荡。将取出来的上层清液通过 8000 r • min^{-1} 离心 5 min，用超纯水稀释，然后使用紫外 - 可见分光光度计测其含量，计算不同时间点熊果酸的释放量。公式如下：

$$Q(\%) = (C_n + C_{n-1} + C_{n-2} + \cdots\cdots + C_1) \times V/(W \times D)$$

式中 C_n 为各时间点取样所测得的熊果酸浓度，V 为释放介质的体积，W 为所取微球的质量，D 为微球中熊果酸的载药量。

体外模拟熊果酸微球释药情况，结果如图 10 所示。熊果酸微球在 1 h 时累计释放熊果酸 7.55%，释放量较低，没有出现明显的突释反应，表明其与普通片剂相比，微球减慢了药物的释放。熊果酸在前 12 h 内累计释放率为 43.19%，在 120 h 基本完全释放，累计释放率达到（80.53±2.82）%。

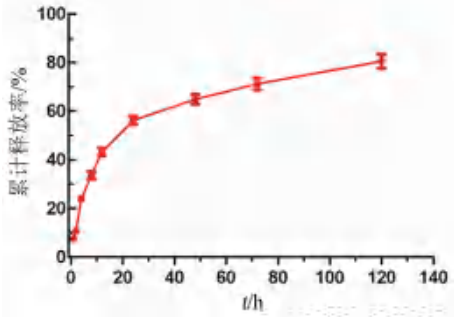


图 10　熊果酸微球体外释放曲线

Fig 10　Release curve of ursolic acid microspheres in vitro

3　讨论

3.1　微球制备方法的考察

当过膜压力小时，由于氮气流不稳定和分散相与连续相之间存在较大的界面张力等原因，导致乳液滴体积较大，从而使微球粒径和 PDI 较大 [13-14]。过膜压力过大时，连续相流速不变，剪切力不变，分散相流速过快，粒径变小但是分散不均匀。PVA 浓度对微球粒径和 PDI 影响较大，其原因是在临界点前增加 PVA 浓度，形成的表面张力会随之减小，有机相在水相中分布更加均匀，形成一层亲水膜，可以减小微球间的聚集，使得粒径和 PDI 减小。但是 PVA 浓度过高时，体系中会产生较多层结构，影响了单一体系的稳定性，外水相的黏稠度也会增大，剪切力变小，乳滴脱离速度减慢，形成的乳滴体积就会变大，粒径和 PDI 就会增大 [15]。

在乳化过程中，乳滴是由于流动相不断搅拌产生剪切力的结果，其转速越高，动能越大。根据能量守恒定律，一部分动能转化为比表面能，使得乳滴体积减小，分散均匀。随着转速的增大，达到一定转速后粒子碰撞频率增大，又使得粒径变大，500 r • min^{-1} 时最佳搅拌速度。当水相体积减小，油相体积不变时，两相碰撞概率减少，乳滴形成速度减慢，导致形成的乳滴增大，粒径随之增大。相反，粒径和 PDI 指数减小 [16]。

3.2　投药量对微球包封率和载药量的影响

微球固化过程中，随着熊果酸投药量的增加，载药量会逐渐上升，而包封率会随之降低 [17-18]。熊果酸包封率降低，一方面可能是载体材料的过饱和，导致外水相中游离的药物增多；另一方面是投药量较大，会导致微球表面和内部空洞增多 [19]，药物在渗透压差下从内部向表面扩散增多，从而降低了包封率 [20]。保持熊果酸投药量不变，随着 PLGA 加入量的增大，熊果酸包封率上升，而载药量却减小，其原因是 PLGA 内部空间增大，熊果酸被高效包载于微球的内部，减少了外水相游离的药物，包封率增加。但是 PLGA 质量会增大，微球总质量相应增加，从而使得载药量减小 [21]。

3.3　熊果酸微球的缓释特性

有关研究表明，水溶性药物如蛋白和多肽类物质等大多吸附在微球表面，脂溶性药物一般镶嵌于微球内部，随着载体材料的分解而释放 [22]。熊果酸水溶性差，属于脂溶性药物，推测其吸附在表面的相对较少，主要分散在实体球中，释药过程大致分为三个时期，分别为药物突释期、快速期和缓慢释放期 [23]。本试验制备的熊果酸微球，在 1 h 后药物释放（7.55±0.67）%，前 4 h 累计释放（23.96±1.06）%，此时为初始释放，熊果酸释放速率较快，主要原因可能有两方面：一是吸附在微球表面的熊果酸释放，二是微球表面粗糙、跨度大、缝隙率高，在释放介质内外压差下球体浅表层的熊果酸释放 [24]。随后熊果酸释放速率减慢，此过程主要是存在于微球内部熊果酸通过与外界相连亲水孔道释放到介质中 [25]，在 24 h 药物累计释放了 50% 左右，释放量略高，但在合理范围内。24 h 后药物随着微球降解从内部扩散出来，释放速率慢，且平稳释放直至释放完全，在 120 h 累计释放达到（80.53±2.82）%，表明试

验制备的熊果酸微球具有缓释特性。

4 结论

本文采用 SPG 膜乳化法制备熊果酸微球，通过处方优化筛选得到的微球，粒径均一，分散均匀，形态圆整，具有较高的包封率和载药量，体外释放平缓，说明 SPG 膜乳化法制备的熊果酸微球工艺重现性好。

参考文献

[1] Guo WQ，Xu B，Wang XX，et al. The analysis of the anti-tumor mechanism of ursolic acid using connectively map approach in breast cancer cells line MCF-7 [J]. Cancer Manag Res，2020，12（1）：3469-3476.

[2] 包艳红，王强，张文龙，等 . 沙棘熊果酸通过调节线粒体 - 细胞色素 c 抑制酒精性肝病大鼠模型肝细胞凋亡的作用分析 [J]. 临床肝胆病杂志，2023，39（7）：1617-1626.

[3] 齐娜，刘广，廖迎，等 . 熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（2）：28-31.

[4] 方敏，李家明，李宁，等 . 熊果酸纳米制剂的研究进展 [J]. 药学研究，2019，38（6）：359-369.

[5] 孙为刚，施峰，孙从永，等 . 抗肝肿瘤天然活性成分的聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物纳米粒 / 微球制备及应用研究进展 [J]. 中国药房，2021，32（23）：2941-2944.

[6] Sheikhlou MG，Ravari NS，Behrouzi M，et al. Engineered PLGA microspheres for extended-release of naltrexone：in vitro，in vivo，and IVIVR [J]. Pharm Dev Technol，2023，28（2）：190-199.

[7] 王玉静，孙秀芝，徐丽，等 . 微球制剂的研究进展及前景分析 [J]. 生物化工，2017，3（2）：80-83.

[8] 张皓 . 熊果酸载药纳米微球的制备及其体内外抗肿瘤的效果评价 [D]. 南京：南京医科大学，2018.

[9] 张佳毅，刘华钢 . PLGA 缓释微球的制备及其缓释性能的研究进展 [J]. 临床合理用药杂志，2019，12（1）：174-175.

[10] 邵陇龙，甄平 . 乳化溶剂挥发法制备 PLGA 微球影响因素的研究进展 [J]. 甘肃医药，2017，36（12）：1007-1010.

[11] 陈剑，马思萌，金鑫，等 . 注射用利培酮微球的研制及体外释放的研究 [J]. 中国处方药，2023，21（4）：23-26.

[12] 郑业灿 . 膜乳化法制备 PLGA-PGA 载药微球 [D]. 长春：长春工业大学，2012.

[13] 贾琦琦 . 聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物田蓟苷微球的研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2021.

[14] 罗永梅，郭喆霏，钟晨，等 . SPG 膜乳化法制备粒径均一可控的载蛋白缓释微球 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（10）：911-915.

[15] 许俊 . 5- 氟尿嘧啶的纯化及其用聚乳酸微球包埋和缓释过程的研究 [D]. 咸宁：湖北科技学院，2023.

[16] 张尚前，周先泰，覃秋宜，等 . SPG 膜乳化法制备槲皮素缓释微球的工艺优化与表征及体外释放研究 [J]. 医药导报，2021，40（4）：502-508.

[17] 赵彩凤，王麟奇，王荣荣，等 . 阿奇霉素羧甲基壳聚糖微球的处方优化及质量评价 [J]. 沈阳药科大学学报，2023，40（1）：9-17.

[18] 杨梦琪 . SPG 膜乳化法制备 PLGA 微球 [D]. 广州：广东药学院，2015.

[19] 郭喆霏，罗永梅，罗宇燕，等 . 投药量对 SPG 膜乳化法制备载蛋白微球性质的影响 [J]. 今日药学，2017，27（11）：725-728.

[20] Huang XZ，Li N，Wang DJ，et al. Quantitative three-dimensional analysis of poly（lactic-co-glycolic acid）microsphere using hard X-ray nano-tomography revealed correlation between structural parameters and drug burst release [J]. J Pharm Biomed Anal，2015，112（1）：43-49.

[21] 万斯斯，杨琪，钟晨，等 . SPG 膜乳化法制备载 BSA 的 PLGA 微球的工艺考察 [J]. 广东药学院学报，2016，32（5）：550-554.

[22] 邱晓明，甄平，李松凯 . 聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物载药微球制备工艺研究进展 [J]. 中国组织工程研究，2018，22（10）：1599-1604.

[23] 陈剑，马思萌，金鑫，等 . 注射用利培酮微球的研制及体外释放的研究 [J]. 中国处方药，2023，21（4）：23-26.

[24] Zhai J，Wang YE，Zhou X，et al. Long-term sustained release poly（lactic-co-glycolic acid）microspheres of asenapine maleate with improved bioavailability for chronic neuropsychiatric diseases [J]. Drug Deliv，2020，27（1）：1283-1291.

[25] Qi F，Wu J，Yang TY，et al. Mechanistic studies for monodisperse exenatide-loaded PLGA microspheres prepared by different methods based on SPG membrane emulsification [J]. Acta Biomater，2014，10（10）：4247-4256.

（收稿日期：2023-09-28；修回日期：2023-11-23）

基于网络药理学和体外实验探究天麻抗抑郁的作用机制

杨淑贤[1]，刘树森[2]，韩雯[3]，李草[1]，赵志刚[1*]（1. 首都医科大学附属北京天坛医院 药学部，北京　100070；2. 哈尔滨商业大学药学院，哈尔滨　150076；3. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所，北京　100193）

摘要：目的　基于网络药理学、分子对接技术及体外实验，预测及验证天麻抗抑郁的作用机制。**方法**　首先采用网络药理学方法预测天麻抗抑郁的关键成分及潜在靶点，然后采用分子对接技术进行初步验证，最后采用经典的抑郁症体外模型验证关键成分天麻素的药效及作用靶点。**结果**　网络药理学分析显示，共收集到 101 个天麻活性成分和 549 个关键靶点，整合后进一步得到 10 个核心靶点，包括丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 1（AKT1）、肿瘤坏死因子（TNF）、白细胞介素 6（IL6）、脑源性神经营养因子（BDNF）等，并且天麻关键成分（天麻素、4- 羟基苄醇、香草醛）与这些核心靶点均有较好结合力。天麻抗抑郁的关键通路主要富集在磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B（PI3K-AKT）、环磷酸腺苷（cAMP）、低氧诱导因子 -1（HIF-1）等通路。体外实验结果显示，与模型组相比，天麻素能显著促进 PC12 细胞存活，增加 BDNF 和 p-AKT/AKT 蛋白的表达水平，并显著抑制促炎细胞因子 IL-6 和 TNF-α 的表达。**结论**　天麻可通过多成分、多靶点、多途径干预抑郁症。

关键词：天麻；抑郁症；网络药理学；分子对接；天麻素；分子机制
中图分类号：R285.6　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0647-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.015

Mechanism of antidepressant effect of *Gastrodia elata* Bl. based on network pharmacology and in vitro experiments

YANG Shu-xian[1], LIU Shu-sen[2], HAN Wen[3], LI Cao[1], ZHAO Zhi-gang[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Beijing Tiantan Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing*　100070; 2. *College of Pharmacy*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin*　150076; 3. *Institute of Medicinal Plant Development*, *Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, *Beijing*　100193)

Abstract: Objective　To predict and verify the anti-depression mechanism of *Gastrodia elata* Bl. based on network pharmacology, molecular docking and in vitro experiments. **Methods**　The key components and potential targets of *Gastrodia elata* Bl. were predicted by network pharmacology, and then molecular docking was used for the preliminary verification. The efficacy and targets of gastrodia (GAS) were verified by classical in vitro depression models. **Results**　Network pharmacological analysis showed that 101 active ingredients and 549 key targets were collected, and 10 core targets were further obtained after the integration, including serine/thronine protein kinase 1 (AKT1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL6), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), etc. The key components of *Gastrodia elata* Bl. (GAS, 4-hydroxybenzyl alcohol, and vanillin) had good binding force with these core targets. In addition, the key pathways of the antidepression effect of *Gastrodia elata* Bl. mainly concentrated in phosphoinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-AKT), cyclic adenosine phosphate (cAMP), and hypoxic-inducing-factor-1 (HIF-1). The in vitro experiments showed that GAS significantly promoted the survival of PC12 cells and increased the expression level of BDNF and p-AKT/AKT protein, but inhibited the expression of pro-inflammation cytokines IL-6 and TNF-α. **Conclusion**　*Gastrodia elata*

基金项目：北京市医院管理局临床医学发展专项扬帆计划（No.ZYLX201827）。
作者简介：杨淑贤，女，药师，主要从事中药神经精神药理及中药/天然产物抗肿瘤药理药效与分子机制研究，email：yangshuxianlove@163.com　*通信作者：赵志刚，男，教授，博士研究生导师，主要从事医院药事管理、临床药理研究，email：1022zzg@sina.com

Bl. can intervene depression via multi-components, multi-targets and multi-pathways.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; depression; network pharmacology; molecular docking; gastrodia; molecular mechanism

抑郁症是一种持续性的慢性精神性疾病，其主要临床特征不仅包括精神症状，如持续抑郁、兴趣丧失、自卑等，还包括身体症状，如缺乏精力、疲劳、失眠等[1-2]。近年来，在经济负担、工作压力、情感问题等各种因素影响下，抑郁症的发病率逐年上升，我国抑郁症的发病率高达4.2%[3-4]。此外，抑郁症也是人类自杀死亡的主要因素，这给社会造成了严重的负担，因此，抑郁症的治疗刻不容缓。目前，药物治疗是抑郁症患者的最主要选择，常使用的抗抑郁药主要包括选择性5-羟色胺再摄取抑制剂（SSRIs）、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂（SNRIs）、单胺氧化酶抑制剂（MAOIs）等。这些药物虽然疗效较为确切，但多数存在起效慢、不良反应严重、停药后易复发等一系列弊端[5-6]。因此，需要开发能够治疗抑郁症的替代药物或补充药物。中药因其有多成分、多效应、多环节、多靶点和毒副作用小的优势而成为抗抑郁研究中的热点。

天麻是我国名贵中药，最早被记载于《神农本草经》[7]。天麻来源于兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥茎块，具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络之功效。现代药理学研究表明，天麻可产生抗惊厥、改善学习记忆、神经保护及抗抑郁等神经系统药理作用[8-9]。在抗抑郁方面，天麻具有潜在的治疗价值，例如，天麻提取物在抑郁大鼠模型中通过调节血清素能系统和多巴胺能系统发挥抗抑郁作用[10]；天麻乙醇提取物可缩短小鼠强迫游泳和悬尾实验不动时间，发挥抗抑郁作用[11]。但天麻抗抑郁症的关键活性成分及潜在作用机制尚未明确。因此，本研究拟探究天麻抗抑郁作用的药效物质基础及潜在机制，从而推动天麻的临床应用、挖掘治疗抑郁症的中药活性成分。

1 材料

1.1 试药

天麻素（CAS 号：62499-27-8，批号：G299059，上海阿拉丁有限公司）；皮质酮（CORI，批号：C104537，阿拉丁试剂有限公司）；CCK-8（批号：NQ646，东仁化学科技有限公司）；DMEM 高糖培养基、RIPA 高效裂解液、BCA 试剂盒（批号：11995、R0010、PC0020，北京索莱宝公司）；胎牛血清（批号：10099141，Gibco 公司）；PVDF 膜（批号：ISEQ00010，美国 Millipore 公司）；GAPDH、BDNF、p-AKT、AKT 及羊抗兔 IgG 抗体（批号：2118S、60071S、4060S、4691S、7074P2，美国 CST 公司）；白细胞介素（IL）-6（批号：K009639P，索莱宝）；肿瘤坏死因子（TNF）-α 抗体（批号：60291-1，Proteintech 公司）。

1.2 仪器

CO_2 细胞培养箱（日本 Panasonic 公司，型号 MCO-18AC），倒置显微镜（日本 Olympus 公司，型号 1X71），电泳仪及转膜仪（上海天能公司，型号 EPS-300），离心机（湖南湘仪科技公司，型号 TGL-16M），酶标仪（Thermo 公司，型号 Multiskan FC），电子天平（梅特勒托利多仪器有限公司，型号 AL104），凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司，型号 ChemiDoc XRS），水平摇床（太仓市科技器材厂，型号 ZD-9556）。

2 方法与结果

2.1 网络药理学

2.1.1 天麻活性成分的收集及潜在靶点的筛选　以“天麻”为关键词，在中医综合数据库 TCMID、本草组鉴 HERB、中医药百科全书数据库 ETCM、中医药整合药理学平台 HIT、TCMIP 中检索收集天麻的化学成分，并检索中国知网、PubMed 等网站文献作补充，得到天麻的活性成分 101 个。进一步借助 SwissTargetPrediction 平台及 TCMSP 获取天麻活性成分的作用靶点，整理删除重复靶点后，运用 Uniprot 数据库获得标准化基因名称，获得天麻有效成分的预测靶标 2077 个。以“depression”作为关键词，分别在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、DrugBank 数据库、TTD 数据库、DisGeNET 数据库中检索与抑郁症相关的疾病蛋白靶点，共得到 1625 个抑郁症相关靶点。

2.1.2 天麻和抑郁症交集靶点的获取　将天麻活性成分潜在靶点与抑郁症靶点取交集作为预测天麻对治疗抑郁症可能的作用靶点，输入到 Venny 2.1.0 绘制韦恩图可视化展示，获得 549 个药物与疾病的交集靶点。随后将交集靶点导入到 Cytoscape 3.10.0 软件，构建天麻 - 活性成分 - 疾病靶点网络，进行药物化学成分与交集靶点关系可视化，发现香草醛、天麻素和 4-羟基苄醇分别作用于 25 个、21 个和 13 个靶点。《中国药典》指出天麻素是天麻质量评价的指标性成分之一，且

有相关文献报道天麻素、4- 羟基苄醇和香草醛均有改善小鼠抑郁的作用[12-13]，因此，我们推测香草醛、天麻素和 4- 羟基苄醇可能是天麻发挥治疗作用的关键活性化合物。

2.1.3　蛋白质 - 蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）及核心靶点网络构建　将上述对的交集靶点基因导入 STRING 网站，选择蛋白种类为“Homo sapiens”，设置 minimum required interaction score 为 highest confidence（0.900），并去除游离节点，在线预测各基因间的相互联系。然后，利用 Cytoscape 软件中的 CytoNCA 插件对 PPI 网络的 Degree 等拓扑参数进行分析计算，筛选出排名前 10 的节点网络作为核心靶点网络。结果见图 1 和表 1。

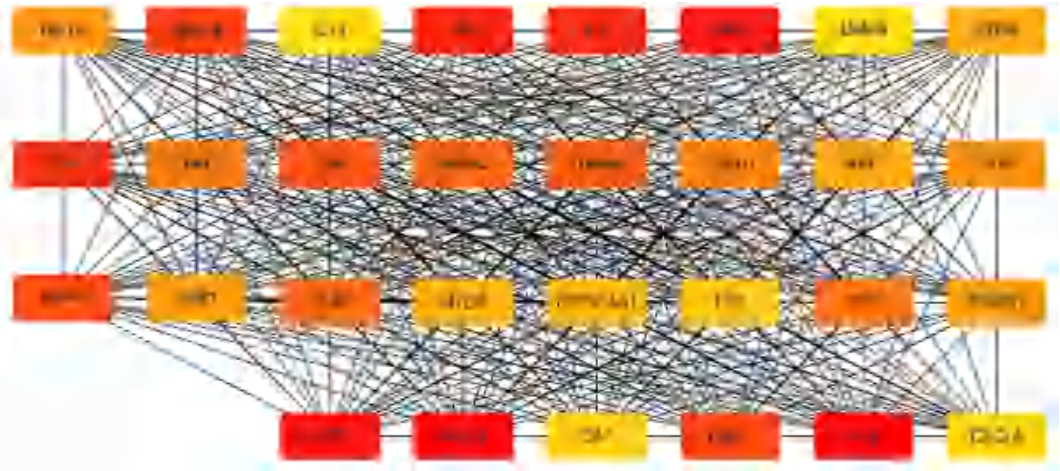


图 1　天麻和抑郁症排名前 30 的交集靶点的 PPI 网络

Fig 1　Top 30 PPI network of the intersection targets for *Gastrodia elata* Bl. and depression

表 1　天麻治疗抑郁症核心靶点的拓扑学分析结果

Tab 1　Topological analysis of core targets of *Gastrodia elata* Bl. for depression

序号	名称	英文全称	度值
1	ACTB	Actin beta	276
2	ALB	Albumin	276
3	AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	269
4	INS	Insulin	267
5	TNF	Tumor necrosis factor	237
6	IL6	Interleukin 6	235
7	TP53	Tumor protein p53	215
8	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	203
9	BDNF	Brain derived neurotrophic factor	201
10	EGFR	Epidermal growth factor receptor	200

2.1.4　基因本体（gene ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）富集分析　将交集靶点输入 Metascape 网站，物种设置为人类，设置富集分析的筛选阈值为 $P < 0.01$，分别进行交集靶点的 GO 生物学过程（biological process，BP）、细胞组分（cellular component，CC）和分子功能（molecular function，MF）分析和 KEGG 信号通路富集分析。结果天麻治疗抑郁症中从生物学过程方面主要富集在化学突触信号传导、神经元死亡调控、细胞外刺激应答、营养水平反应、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）级联的正向调控、钙离子稳态等；在细胞组分中涉及到突触前 / 后膜、神经元胞体、远端轴突、神经元投射端、轴突末端、谷氨酸能突触等；在分子功能上涉及信号受体激活剂活性、受体配体活性、神经递质受体活性、谷氨酸受体活性、生长因子活性等（见图 2）。

KEGG 通路分析得到了天麻对治疗抑郁症的 20 条核心通路。根据通路富集的基因数目值对各通路排序，富集到基因的数目越多，该通路的排名越靠前。如图 3 所示，天麻发挥抗抑郁的关键通路主要包括神经活性配体 - 受体相互作用、磷酸肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B（phosphoinositol 3-kinase/protein kinase B，PI3K-AKT）、钙信号、环磷酸腺苷（cyclic adenosine phosphate，cAMP）、缺氧诱导因子 1（hypoxic-inducing-factor-1，HIF-1）、MAPK 等信号通路。

2.1.5　分子对接验证　从 RCSB PDB 下载核心靶点的蛋白质晶体结构，选择分辨率较高（Å < 2.50）的晶体结构进行对接。从 PubChem 获取天麻抗抑郁关键组分的三维结构。将化学成分的结构进行优化处理，并使用 Open Babel 2.4.1 将其从自然格式转换为 pdbqt 格式。然后，使用 Autodock Vina 1.2.0[14] 进行分子对接研究。对接过程使用遗传算法进行计算，所有对接运行选项均为默认设置。如表 2、图 4 所示，香草醛、

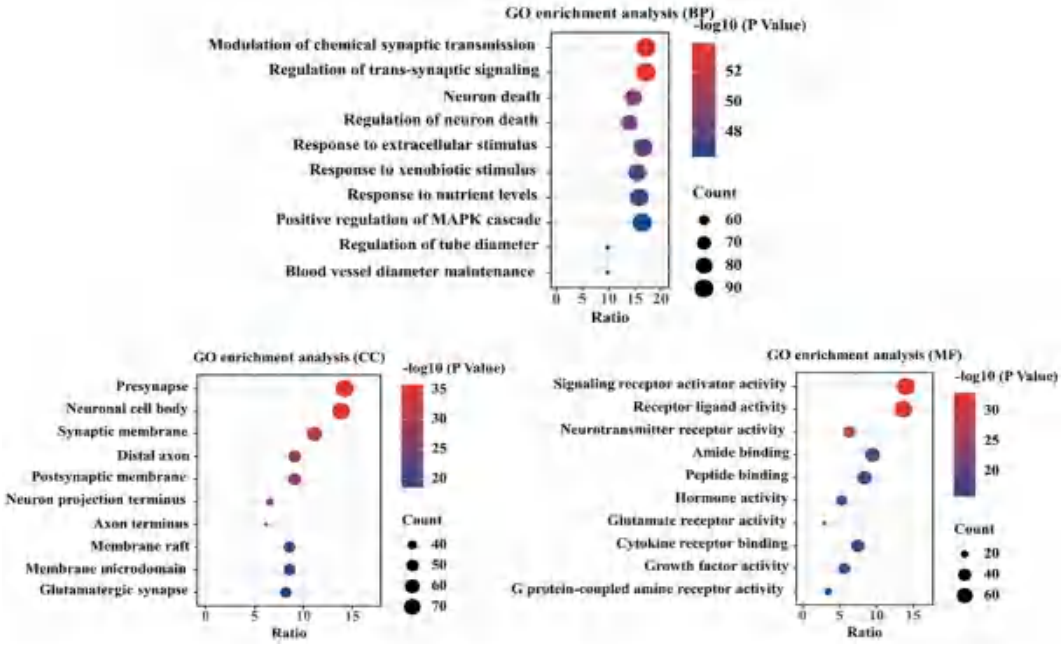


图 2 天麻治疗抑郁症的 GO 生物功能富集分析

Fig 2 GO biological function enrichment analysis for *Gastrodia elata* Bl. and depression

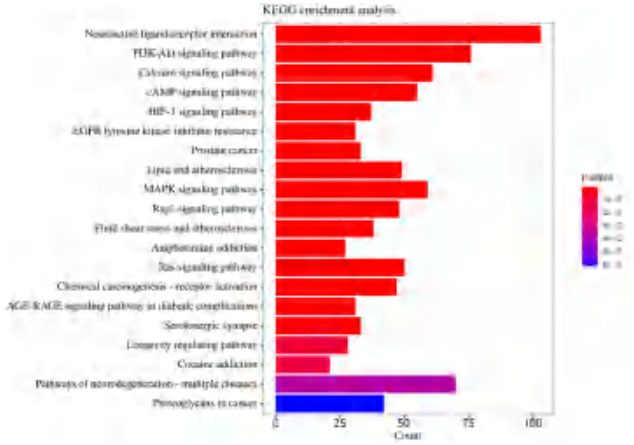


图 3 天麻治疗抑郁症的 KEGG 信号通路富集分析

Fig 3 KEGG signaling pathway enrichment analysis for *Gastrodia elata* Bl. and depression

天麻素及 4-羟基苄醇与核心靶点均可亲和，尤其是天麻素成分与各靶点的结合能均小于－25 kJ • mol^{-1}，是 3 个成分中结合最为显著的，说明天麻素成分可能在抗抑郁中起到了关键作用。另外，3 个成分均能与 BDNF 靶点自发结合，结合能分别为－35、－27、－27 kJ • mol^{-1}，说明 BDNF 极可能是天麻发挥抗抑郁作用的关键靶点。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养及 CCK8 实验 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞由国家生物医学实验细胞库提供，使用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基培养。消化、离心收集对数生长期的 PC12 细胞，制备 1×10^5 • mL^{-1} 的细胞悬液，取 100 μL 接种于 96 孔板。12 h 后给药组用不同终浓度的天麻素（GAS）(3.125、6.25 和 12.5 μmol•L^{-1}）作用 12 h，随后，模型组和给药组再用 CORT（200 μmol • L^{-1}）处理 12 h。作用结束后每孔加入 20 μL CCK8 溶液孵育 2 h。最后用酶标仪测定吸光度（*A*）并计算细胞存活率。

结果如图 5A 所示，随着皮质酮浓度的增加，细胞活力逐渐降低，当 CORT 浓度为 200 μmol • L^{-1} 时，细胞存活率为 60% 左右，故选择该浓度进行后续的实验。如图 5B 所示，模型组细胞存活率为 50%，与模型组比较，天麻素组（6.25 μmol • L^{-1} 和 12.5 μmol • L^{-1}）的细胞存活率显著升高至 60% 和 68%，且呈剂量依赖性，说明天麻素能有效改善 CORT 引起的细胞损伤。此外，还检测了当天麻素浓度为 3.125 ～ 12.5 μmol • L^{-1} 时，对 PC12 细胞活性无影响（见图 5C）。以上结果说明，CORT 降低 PC12 细胞活力，而天麻素给药后可显著提高细胞存活率，从而保护 PC12 细胞，促进 PC12 细胞存活。

2.2.2 Western blot 实验 将 PC12 细胞置于 100 mm 培养皿中，设置对照组、模型组及给药组（GAS 12.5 μmol • L^{-1}）。处理结束后收集所有细胞，用 RIPA 裂解液在冰上裂解 40 min。裂解结束之后，4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 20 min，收集的上清液即为蛋白样品。随后 BCA 法定量并调整样品浓度均为 10 μg • μL^{-1}，沸水煮 5 min 使蛋白变性。配胶上样，电泳 2 h，低温环境电转 1 h，5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h，加入一抗 4 ℃中过夜，1×TBST 洗 3 次，每次 15 min，再

表 2　天麻活性成分与核心靶点的结合能

Tab 2　Binding affinities of active compounds of *Gastrodia elata* Bl. with core targets

化合物	结合能 /（kJ・mol^{-1}）									
	ALB	ACTB	AKT1	INS	TNF	IL6	TP53	VEGFA	BDNF	EGFR
天麻素	－37	－34	－27	－31	－35	－29	－30	－31	－35	－34
4- 羟基苄醇	－26	－22	－23	－23	－26	－22	－27	－22	－27	－24
香草醛	－27	－26	－23	－24	－25	－22	－24	－22	－27	－25

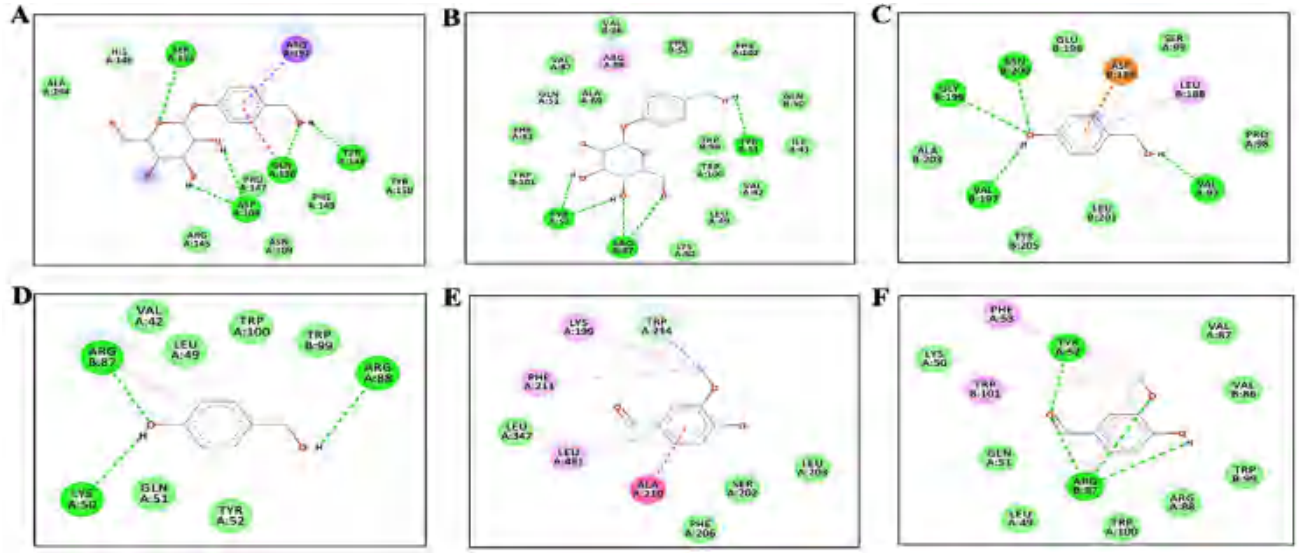


图 4　分子对接模式图

Fig 4　Molecular docking mode diagram

A. 天麻素 -ALB（gastrodin-ALB）；B. 天麻素 -BDNF（gastrodin-BDNF）；C. 4- 羟基苄醇 -TP53（4-hydroxybenzyl alcohol-TP53）；D. 4- 羟基苄醇 -BDNF（4-hydroxybenzyl alcohol-BDNF）；E. 香草醛 -ALB（vanillin-ALB）；F. 香草醛 -BDNF（vanillin-BDNF）

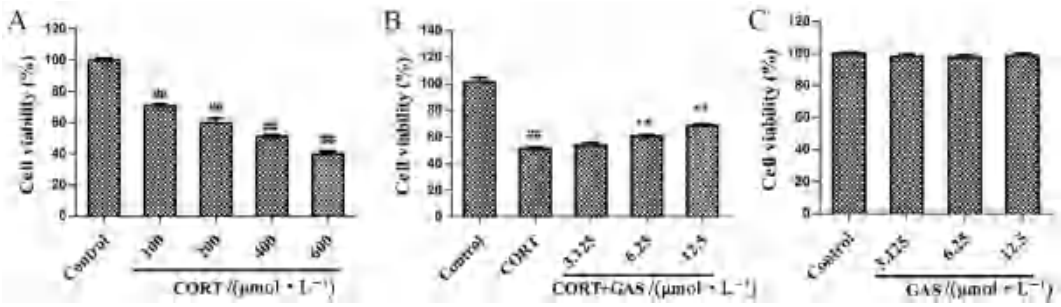


图 5　皮质酮及天麻素对 PC12 细胞活力的影响

Fig 5　Effect of corticosterone and gastrodin on the activity of PC12 cells

注（Note）：与 Control 组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与 CORT 组比较，$^{**}P < 0.01$（compared with the Control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the CORT group，$^{**}P < 0.01$）。

加入二抗（1∶2000）室温孵育 1.5 h，TBST 洗膜后用凝胶成像仪检测条带，并以 GAPDH 作为内参，进行相对定量。

结果如图 6 所示，与对照组相比，CORT 造模组中 BDNF 和 p-AKT/AKT 蛋白表达水平明显降低；与模型组相比，天麻素给药组能够显著增加 BDNF 的蛋白表达水平和 AKT 的磷酸化，提示天麻素可激活 BDNF/AKT 信号通路。另外，与对照组相比，CORT 造模组中 IL-6 和 TNF-α 表达明显增加，但天麻素可显著降低 IL-6 和 TNF-α 的表达水平，显著改善炎性因子的表达异常，减轻神经炎症。

2.3　统计分析

实验结果以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，使用 SPSS（SPSS，Chicago，IL）进行统计分析，如果数据服从正态分布，则采用单因素方差分析（One-Way ANOVA）进行比较，然后使用 Tukey 检验进行组间两两比较；如果数据不符合正态分布，则用 Kruskal-Wallis 检验。当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

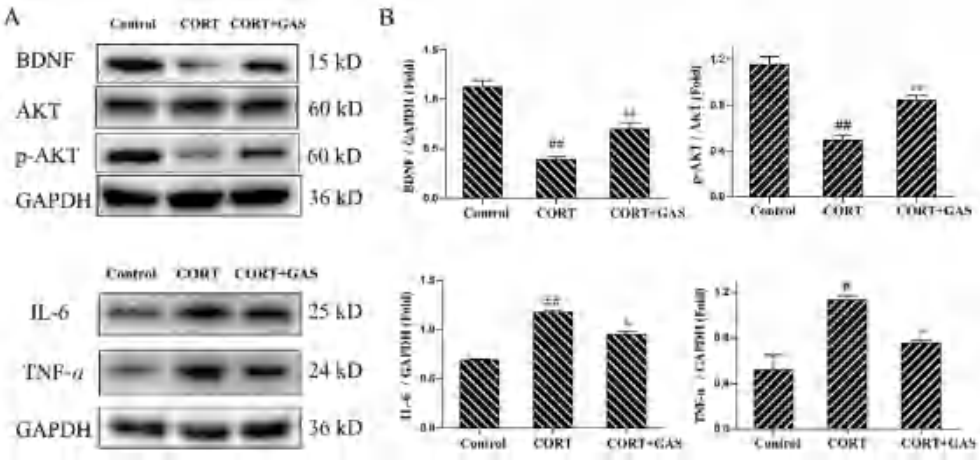


图 6 天麻素对核心蛋白表达的影响

Fig 6 Effect of gastrodin on the protein expression of core protein

注：与 Control 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与 CORT 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3 讨论

研究显示，全球抑郁症患者已达 3.2 亿，几乎每 7 个成年人中就有 1 个抑郁症患者，因此，抑郁症被称为精神病学中的感冒，是 21 世纪最严重的精神障碍之一 [15]。目前应用的西药多阻断单一靶点，有明显耐药性，且易引起不良反应。因此，亟须探索新的治疗药物。近年来，中医药在抑郁症治疗领域越来越有潜力，例如已上市的解郁除烦胶囊、舒肝解郁胶囊和乌灵胶囊等，另外，天麻、川芎、西红花、丹参和郁金等单味中药也被广泛用于临床实践 [16]。值得注意的是，以天麻为主要成分的抗抑郁制剂发明专利有 64 种，说明天麻在抗抑郁方面有潜在临床价值。然而，目前有关天麻抗抑郁的关键成分及分子机制的研究仍然相对薄弱，也尚未明确。

综上，本研究首先利用网络药理学获得了天麻与抑郁症相关的关键靶点 549 个，通过构建天麻成分 - 疾病靶点网络发现天麻发挥抗抑郁作用的主要活性成分为香草醛、天麻素和 4- 羟基苄醇。查阅文献后发现，天麻素是天麻的特征和主要活性成分之一，天麻素在 PC12 细胞中可降低单胺氧化酶 A 活性，产生单胺调节作用 [17]。有研究显示，ICR 小鼠经灌胃给药 4- 羟基苄醇和香草醛 40 mg • kg^{-1} 28 d 后发现 BDNF 及其受体表达升高 [18]。由以上提示，天麻素、4- 羟基苄醇和香草醛可能是天麻发挥抗抑郁作用的关键药效物质基础。

PPI 网络核心查找显示，ALB、ACTB、AKT1、INS、TNF、IL6、TP53、VEGFA、BDNF、EGFR，可能是天麻治疗抑郁症的核心靶点。已有研究表明，BDNF 作为一种神经营养因子，参与多种类型神经细胞的生长和发育，可修复神经元损伤、抑制神经元变性和死亡 [19]。研究发现，诊断为抑郁症的患者血清 BDNF 水平降低 [20]，大鼠在 BDNF 敲低后可诱发抑郁样行为 [21]。同时，BDNF 还可调节下游的 AKT 活性，通过抑制海马神经元凋亡、促进脑血管新生等过程参与抗抑郁治疗 [22]。另外，IL-6、TNF-α 是抑郁症患者中可靠的炎症标志，当小鼠注射脂多糖诱发炎症后，海马内 TNF-α、IL-1β 升高并产生抑郁样行为 [23]。综上推测，天麻治疗抑郁症的关键靶点可能是 AKT1、BDNF 及炎症因子。同时，KEGG 分析发现神经活性配体 - 受体相互作用、PI3K-AKT、钙信号、cAMP、HIF-1 等为关键的作用通路。这些文献及网络分析结果充分说明，天麻可通过多成分、多靶点、多通路协同发挥治疗抑郁症的作用。

香草醛、天麻素和 4- 羟基苄醇与核心靶点都能自发结合，在一定程度验证了网络药理学的结果。同时，天麻素成分和各靶点蛋白的亲和力最强，且天麻素为天麻的主要活性成分，提示天麻素可能在天麻抗抑郁方面贡献较大。另外，3 个关键成分与 BDNF 靶点均可显著结合，提示 BDNF 在天麻抗抑郁作用中发挥重要作用。目前研究最多的中医药抗抑郁信号通路以 cAMP、MAPK、PI3K-AKT 及钙调依赖性蛋白激酶Ⅱ（calmodulation-dependent protein kinase Ⅱ，CaMK Ⅱ）等通路为主 [19]。因此，以上结果强烈提示，天麻极有可能通过 BDNF 关键靶点作用于显著富集的 PI3K-AKT、cAMP 及 MAPK 通路而发挥抗抑郁作用，并且还很可能影响炎症因子。

在网络药理学及分子对接实验结果的基础上，进一步进行体外验证实验。CORT 能够诱导

细胞毒性导致神经元损伤而促进抑郁症的发生，常被用来建立体外抑郁症细胞模型。PC12 细胞具有典型的神经元特征并表达丰富的糖皮质受体，经常被用于神经生理及药理学研究，因此在本研究中，采用 CORT 诱导 PC12 细胞建立经典的抑郁症体外模型进行更深入的探究 [24]。体外细胞实验显示，天麻素能够显著逆转 CORT 诱导的 PC12 细胞活力降低，并且天麻素能激活 BDNF/AKT 信号通路从而促进 PC12 细胞存活，另外，天麻素还显著改善炎性因子（IL-6 和 TNF-α）的表达异常，减轻神经炎症。这些结果进一步佐证了分子对接的结果。

综上所述，天麻可通过多成分、多靶点和多途径来治疗抑郁症。然而，本研究的探索仍然不足，仅仅初步探究了天麻治疗抑郁症的有效成分及可能的分子机制，针对本研究的结果，后期将以天麻素等活性物质为先导化合物开发获得活性更优的衍生物，同时，也将进一步通过更多的实验探究相关分子机制，从而推动天麻治疗抑郁症的临床应用。

参考文献

[1] McCarron RM，Shapiro B，Rawles J，et al. Depression [J]. Ann Intern Med，2021，74（5）：ITC65-ITC80.

[2] He MC，Feng R，Wang J，et al. Prevention and treatment of natural products from traditional Chinese medicine in depression：potential targets and mechanisms of action [J]. Front Aging Neurosci，2022，14：950143.

[3] Marwaha S，Palmer E，Suppes T，et al. Novel and emerging treatments for major depression [J]. Lancet，2023，401（10371）：141-153.

[4] Herrman H，Patel V，Kieling C，et al. Time for united action on depression：a lancet-world psychiatric association commission [J]. Lancet，2022，399（10328）：957-1022.

[5] Skånland SS，Cieślar-Pobuda A. Off-label uses of drugs for depression [J]. Eur J Pharmacol，2019，865：172732.

[6] Fathinezhad Z，Sewell RDE，Lorigooini Z，et al. Depression and treatment with effective herbs [J]. Curr Pharm Des，2019，25（6）：738-745.

[7] 魏富芹，黄蓉，何海艳，等 . 天麻的药理作用及应用研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2021，30（11）：72-76.

[8] Heese K. *Gastrodia elata* Blume（Gastrodiae Rhizoma）：hope for brain aging and dementia [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020：8870148.

[9] 黄红，刘新民，吕光华 . 天麻防治神经精神疾病的研究进展 [J]. 中草药，2018，49（9）：2188-2194.

[10] Chen PJ，Hsieh CL，Su KP，et al. The antidepressant effect of gastrodia elata bl. on the forced-swimming test in rats [J]. Am J Chin Med，2008，36（1）：95-106.

[11] Lin YE，Chou ST，Lin SH，et al. Antidepressant-like effects of water extract of gastrodia elata Blume on neurotrophic regulation in a chronic social defeat stress model [J]. J Ethnopharmacol，2018，215：132-139.

[12] 付亚轩，孟宪钰，李明超，等 . 天麻抗抑郁药效物质及其作用机制研究进展 [J]. 中草药，2020，51（21）：5622-5630.

[13] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：59-60.

[14] Eberhardt J，Santos-Martins D，Tillack AF，et al. Auto Dock Vina 1.2. 0：new docking methods，expanded force field，and python bindings [J]. J Chem Inf Model，2021，61（8）：3891-3898.

[15] Kandola A，Ashdown-Franks G，Hendrikse J，et al. Physical activity and depression：towards understanding the antidepressant mechanisms of physical activity [J]. Neurosci Biobehav Rev，2019，107：525-539.

[16] 史敏，孟霜，马小娟，等 . 中医药治疗抑郁症作用机制研究进展 [J]. 临床心身疾病杂志，2021，27（2）：129-133.

[17] Lin YE，Lin SH，Chen WC，et al. Antidepressant-like effects of water extract of gastrodia elata Blume in rats exposed to unpredictable chronic mild stress via modulation of monoamine regulatory pathways [J]. J Ethnopharmacol，2016，187：57-65.

[18] Cho JH，Park JH，Ahn JH，et al. Vanillin and 4-hydroxybenzyl alcohol promotes cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of mice via the increase of brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin-related kinase B [J]. Mol Med Rep，2016，13（4）：2949-2956.

[19] Colucci-D’Amato L，Speranza L，Volpicelli F. Neurotrophic factor BDNF，physiological functions and therapeutic potential in depression，neurodegeneration and brain cancer [J]. Int J Mol Sci，2020，21（20）：7777.

[20] Kishi T，Yoshimura R，Ikuta T，et al. Brain-derived neurotrophic factor and major depressive disorder：evidence from meta-analyses [J]. Front Psychiatry，2018，8：308.

[21] Lin CC，Huang TL. Brain-derived neurotrophic factor and mental disorders [J]. Biomed J，2020，43（2）：134-142.

[22] 吴丹，高耀，向欢，等 . PI3K/Akt 信号通路在抑郁症及抗抑郁中药作用机制研究中的进展 [J]. 中草药，2019，50（18）：4461-4469.

[23] Taniguti EH，Ferreira YS，Stupp IJV，et al. Atorvastatin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in mice [J]. Brain Res Bull，2019，146：279-286.

[24] 邢玉琦，李妍，王扬，等 . 抑郁症细胞模型的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报，2023，45（7）：1097-1103.

（收稿日期：2023-09-25；修回日期：2023-11-28）

藏菖蒲提取工艺优化及抑菌和抗氧化活性研究

牛航迪，马迎红，谢青贵，马玉花*（青海民族大学药学院，青海省青藏高原植物化学重点实验室，青海省现代藏药创制工程技术研究中心，西宁 810007）

摘要：目的 优化藏菖蒲的提取工艺，并进行模型诊断和工艺验证，并对其醇提物和水提物进行抗菌和抗氧化活性测定。**方法** 运用 Design-Expert 12 软件设计响应面法优化提取工艺，并进行模型诊断和工艺验证；利用平板扩散法和二倍稀释法测定抑菌效果；利用 DPPH 法、超氧阴离子法和总还原力的测定表达其抗氧化能力。**结果** 藏菖蒲醇提物的最优提取工艺为乙醇浓度 55.53%、料液比 1∶40.04（g/mL）、提取时间 58.39 min（实验调整为 60 min）。藏菖蒲醇提物对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、石膏样小孢子菌、红色毛癣菌都有较好的抑菌效果，藏菖蒲水提物仅对金黄色葡萄球菌有较好的抑菌作用。藏菖蒲醇提物和水提物对 DPPH•、超氧阴离子、总还原能力的半数清除浓度（IC_{50}）值分别为 0.25、2.72、0.30 mg•mL^{-1} 和 0.32、2.77、0.33 mg•mL^{-1}，具有较好的抗氧化活性。**结论** 该优化工艺有效可行，藏菖蒲醇提物具有抗菌作用和较强的抗氧化活性。本研究为藏菖蒲资源的开发利用提供了一定的理论依据。

关键词：藏菖蒲；响应面设计；提取工艺；抑菌活性；抗氧化活性

中图分类号：R932 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0654-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.016

Extraction optimization and antibacterial and antioxidant activities of Acorus calamus

NIU Hang-di, MA Ying-hong, XIE Qing-gui, MA Yu-hua* (*Key Laboratory for Tibet Plateau Phytochemistry of Qinghai*, *Qinghai Engineering Research Center of Modern Tibetan Medicine Development*, *School of Pharmacy*, *Qinghai Minzu University*, *Xining* 810007)

Abstract: Objective To optimize the extraction of Acorus calamus by single factor experiment and response surface method, followed by model diagnosis and process verification, and to determine the antimicrobial and antioxidant activities of ethanol and water extracts from Acorus calamus. **Methods** The response surface method was used with Design-Expert 12 software to optimize the extraction, followed by model diagnosis and process verification. The antibacterial effect was evaluated through plate diffusion and double dilution methods. Antioxidant capacity was assessed with DPPH assay, superoxide anion assay, and total reducing power assay. **Results** The optimal extraction conditions of ethanol extract of Acorus calamus included ethanol concentration 55.53%, solid-liquid ratio 1∶40.04 (g/mL), and extraction for 58.39 min (adjusted to 60 min). The ethanolic extract of Acorus calamus exhibited obvious antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Microsporum gypseum*, and *Trichophyton rubrum*. In contrast, the aqueous extract only showed good antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*. The IC_{50} values of the ethanol extract and water extract of Acorus calamus were 0.25, 2.72, 0.30 mg • mL^{-1} and 0.32, 2.77, 0.33 mg • mL^{-1} for DPPH •, superoxide anion, and total reducing power, respectively, indicating good antioxidant activity. **Conclusion** The optimization proves to be effective and feasible. The alcohol extract of Acorus calamus exhibits notable antibacterial properties and demonstrates strong

基金项目：青海省重点研发与转化计划（No.2022-SF-141）；青海民族大学研究生创新项目（No.42M2022003）。

作者简介：牛航迪，女，在读硕士研究生，主要从事中药活性及药剂学研究，email：1076691042@qq.com *通信作者：马玉花，女，教授，主要从事中药制剂及药代动力学研究，email：yuhuama612@163.com

antioxidant activity. This study lays a solid theoretical foundation for the development and utilization of Acorus calamus resources.

Key words: Acorus calamus; response surface design; extraction technology; in vitro antibacterial; in vitro antioxidant

藏菖蒲，别名为白菖蒲、臭菖蒲、大菖蒲和泥菖蒲。藏菖蒲（*Acorws calamus* L.）为天南星科植物，藏族习用其干燥根茎入药。藏菖蒲中含有单萜、倍半萜、生物碱类、蒽醌类、芳香族类挥发油、黄酮等化学成分，其中以单萜、倍半萜类成分居多[1-3]。藏菖蒲多以藏药复方的形式在临床使用，如二十五味儿茶丸、茜草丸等。藏菖蒲性温、燥、锐，味苦、辛，具有温胃、消炎止痛的功效[4-5]，主治消化不良、食物积滞、白喉和炭疽等，具有杀虫、镇静、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用[6-9]。Yao 等[10]从菖蒲根醇提物中分离得到 12 个化合物，其中 tatanan A 的抗登革病毒能力最强，可显著减轻登革病毒引起的细胞病变和细胞毒作用，半数效应浓度（EC_{50}）为 3.9 μmol • mL^{-1}。Nithya 等[11]发现菖蒲正己烷粗提物使埃及伊蚊的死亡率较高。目前对藏菖蒲的研究主要集中在藏菖蒲精油的成分及抗氧化活性，且对藏菖蒲提取物的驱虫、抗病毒活性研究较多。为了全面了解藏菖蒲的生物活性，本文以乙醇为溶剂提取藏菖蒲，通过单因素实验和响应面法优选最佳提取工艺，将活性成分含量最大化；其次在相同提取工艺条件下，改变提取溶剂，将藏菖蒲醇提物和水提物抗菌作用和抗氧化作用进行对比研究，确定活性成分物理特征，以便后续对藏菖蒲进行系统的活性成分及药理机制研究，更好地开发利用藏菖蒲资源。

1　材料

藏菖蒲（根茎）购于青海省西宁市康乐药材市场，由青海民族大学叶菊教授鉴定；无水乙醇、焦性没食子酸（天津市凯通化学试剂有限公司）；市售中药洗液（四川恩威制药有限公司）；营养琼脂、沙氏琼脂（北京奥博星生物技术有限责任公司）；1，1- 二苯基 -2- 苦基肼自由基（DPPH•，梯希爱化成工业发展有限公司）；三羟甲基氨基甲烷（Tris，上海山浦化工有限公司）；浓盐酸（临沂茂兴化工有限公司）；铁氰化钾（天津市北展方正试剂厂）；三氯化铁（上海展云化工有限公司）；三氯乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠（天津市致远化学试剂有限公司）；金黄色葡萄球菌（bio-52504）、大肠埃希菌（bio-52502）、铜绿假单胞菌（bio-52545）、红色毛癣菌（bio-68036）、石膏样小孢子菌（bio-68027）（西宁宝信生物科技有限公司）。

HH-6 数显恒温水浴锅（金坛市杰瑞尔电器有限公司）；KQ-800E 数控超声波清洗机（昆山洁力美超声仪器有限公司）；EYELASB-1100 旋转蒸发仪（上海爱朗仪器有限公司）；SW-CJ-2F 超净无菌操作台（苏州安泰空汽技术有限公司）；HWS 恒温培养箱（宁波市科技园区新江南仪器有限公司）；SMSX-CJ-2F 压力蒸汽灭菌器（北京永光明医疗器械有限公司）；752N 紫外分光光度计（上海仪电分析仪器有限公司）；TDL-5-A 低速离心机（上海安亭科学仪器厂）。

2　方法

2.1　藏菖蒲提取工艺优化

2.1.1　提醇工艺流程　藏菖蒲→粉碎过 80 目筛→加乙醇溶剂→热回流提取→过滤浓缩→复溶→称重测定→计算藏菖蒲提取率。

2.1.2　操作要点　准确称取 5.00 g 藏菖蒲粉末于磨口锥形瓶中，按照设定的料液比加入一定浓度的乙醇溶液[12]，热回流提取，按照设定的参数进行提取，冷却后进行抽滤，蒸发浓缩至浸膏状态，加少量蒸馏水进行超声，使其转移到离心管中，加蒸馏水至 10 mL 刻度线，称量。与同一个装有 10 mL 蒸馏水的离心管质量相减，得到提取物质量，计算提取率。每组平行 3 次。

2.1.3　藏菖蒲水提物　在藏菖蒲醇提物最优提取工艺条件下，将乙醇替换为蒸馏水，与藏菖蒲醇提物提取方法一致，得到藏菖蒲水提物。

2.1.4　单因素实验　根据预实验的结果，设定乙醇浓度、料液比、提取时间为单因素条件，在两个因素固定条件下，控制一个因素变量条件，在此基础上研究乙醇浓度分别为 50%、60%、70%、提取时间分别为 30、60、90 min 和料液比分别为 1∶30、1∶40、1∶50（g/mL）时对藏菖蒲提取率的影响。

2.1.5　响应面优化藏菖蒲提取工艺　根据单因素实验结果，以料液比（A）、乙醇浓度（B）、提取时间（C）为因素，以藏菖蒲提取率为响应值，进行响应面分析，因素与水平编码表见表 1。

表 1 藏菖蒲响应面分析因素水平

Tab 1 Factor and level of response surface design for Acorus calamus

水平	因素		
	A 料液比（g/mL）	B 乙醇浓度 /%	C 提取时间 /min
＋1	50	70	90
0	40	60	60
－1	30	50	30

2.2 藏菖蒲抗菌活性研究

2.2.1 抑菌圈测定 抑菌圈的测定采用打孔法[13]。将培养基倒入培养皿中，静置冷却凝固。采用涂布法[14]，吸取 1×10^8 cfu • mL^{-1} 菌悬液或孢子悬液 100 μL 于培养基中，用无菌涂布棒将菌悬液或孢子悬液分别均匀地涂布在培养基内，然后用 6 mm 无菌打孔器垂直打孔。将培养皿正置于 37 ℃恒温培养箱培养 12 h 后测定对细菌的抑菌圈直径；28 ℃恒温培养箱培养 4 d 后测定对真菌的抑菌圈直径。设置无菌生理盐水作阴性对照，并以 10 μg 青霉素作阳性对照，市售中药洗液（四川恩成制药有限公司）作对比。

2.2.2 最低抑菌浓度（*MIC*）和最低杀菌浓度（*MBC*）测定 采用二倍稀释法[14-16]，将藏菖蒲提取物（质量浓度为 0.5 g • mL^{-1}）用无菌水稀释至 500、250、125、62.50、31.25、15.62、7.81、3.90 mg • mL^{-1}。分别加入无菌 MH 肉汤培养基 100 μL 和 100 μL 不同浓度样品溶液最后得到共 8 个浓度梯度（提取物浓度分别为 250、125、62.50、31.25、15.62、7.81、3.90、1.95 mg • mL^{-1}）。阳性对照孔细菌生长，呈浑浊状，阴性对照孔无细菌生长，呈澄清、透明状。观察其他各孔情况，如果孔内澄清、透明，则没有细菌生长。没有细菌生长的最低稀释度即为 *MIC*。以 *MIC* 测定结果为基础，从＞ *MIC* 浓度起，取各孔溶液 100 μL 分别涂布于营养琼脂培养基上，将培养皿倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中，培养 24 h 后观察菌落生长情况，菌落少于 5 个的浓度视为 *MBC*。每组做 3 个平行实验。

2.3 藏菖蒲抗氧化测定

2.3.1 DPPH • 清除率测定 量取 1 mg • mL^{-1} 藏菖蒲醇提物溶液和水提物溶液，分别用蒸馏水稀释成质量浓度为 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mg • mL^{-1} 的藏菖蒲提取物溶液。取不同浓度的藏菖蒲提取物溶液 2.00 mL 于试管中，加入 2.00 mL 0.10 mmol • L^{-1} 的 DPPH • 溶液，摇匀，避光反应 30 min 后于 517 nm 处测得吸光度 A_1。用无水乙醇替换 DPPH • 溶液，即得对照品溶液，测得吸光度 A_2。用蒸馏水替换藏菖蒲提取物溶液，即得空白对照溶液，测得吸光度 A_0[17-20]。以槲皮素为对照，计算 DPPH • 清除率[21]：DPPH • 清除率（%）＝（$A_0 - A_1 + A_2$）/A_0×100%。

2.3.2 超氧阴离子（O_2^- •）清除能力测定 取藏菖蒲醇提物和水提物配制成 10 mg • mL^{-1} 的溶液，分别用蒸馏水稀释成 1、2、3、4、5 mg•mL^{-1} 的溶液。把 50 mmol • L^{-1} 的 Tris-HCl（pH 8.2）缓冲溶液在 25 ℃水浴锅中加热 20 min，分别取不同浓度藏菖蒲提取物溶液 1.00 mL 于试管中，加入 3.0 mL Tris-HCl（pH 8.2）缓冲溶液，再加入 1.00 mL 浓度为 3 mmol • L^{-1} 的邻苯三酚溶液，摇匀，25 ℃水浴锅中反应 8 min，加入 1.00 mL 浓度为 10 mmol • L^{-1} 的 HCl 溶液，终止反应后于 320 nm 处测吸光度 A_1[22-25]。A_2 为蒸馏水代替邻苯三酚溶液的吸光度，A_0 为蒸馏水代替样品溶液的吸光度。以槲皮素为对照，计算 O_2^- • 清除率（%）＝[（$A_0 - A_1 + A_2$）/A_0]×100%。

2.3.3 总还原能力测定 量取 1 mg • mL^{-1} 藏菖蒲醇提物溶液和水提物溶液分别用蒸馏水稀释成质量浓度为 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mg • mL^{-1} 的藏菖蒲提取物溶液，分别取 2.00 mL 于试管中，加入 2.00 mL 浓度为 0.20 mol • mL^{-1} 的磷酸缓冲溶液（pH 6.86），加 1% 的铁氰化钾溶液 2.00 mL，混匀，置于 50 ℃水浴锅中加热 20 min。然后加 10% 的三氯乙酸溶液 2.00 mL，3000 r • min^{-1} 离心 10 min 后，取上清液 2.00 mL，再加 0.1% 的氯化铁溶液 0.50 mL，在 50 ℃水浴锅中加热 10 min 后于 700 nm 处测得吸光度 A_1。用蒸馏水替换藏菖蒲提取物溶液，测得吸光度 A_0。以槲皮素为对照，计算样品总还原能力[26-30]：总还原能力＝$A_1 - A_0$。

2.4 数据处理

实验数据以平均值 ± 标准差表示。采用 GraphPad prism 9 进行整理和绘图；同时利用 Design-Expert 12 软件中的 Box-Behnken 法进行回归模型方程的建立及方差分析。

3 结果与分析

3.1 藏菖蒲提取工艺优化结果

3.1.1 单因素实验 平行 3 组实验后得到在乙醇浓度为 60% 时，平均提取率为 17.52%，达到最高；在料液比为 1∶40 时，平均提取率为 18.42%，达到最高；在提取时间为 60 min 时，平均提取率为 18.23%，达到最高；故选择乙醇浓度 60%，料液比为 1∶40，提取时间为 60 min 为基础进行后续实验设计。

3.1.2 响应面实验及验证 以料液比（*A*）、乙醇浓度（*B*）、提取时间（*C*）为实验因素，藏菖蒲提取率（*Y*）为评价指标，运用 Design-Expert V12.0 Box-behnken 进行响应面设计，其实验设计及结果见表 2。对表 2 中数据进行回归分析，得到二次回归模型如下：$Y = 18.55 + 0.8838A - 0.2450B + 2.82C - 0.7775AB - 0.5500AC + 2.62BC - 1.66A^2 - 3.08B^2 - 6.72C^2$。

表 2　响应面优化设计实验结果

Tab 2　Response surface optimization design

序号	*A*	*B*/%	*C*/min	提取率 /%
1	1∶30	70	60	10.77
2	1∶50	50	60	18.40
3	1∶40	60	60	18.55
4	1∶50	60	30	8.74
5	1∶50	70	60	10.46
6	1∶30	60	90	12.69
7	1∶40	50	30	6.14
8	1∶30	60	30	5.35
9	1∶40	60	60	18.55
10	1∶30	50	60	15.60
11	1∶40	70	90	16.60
12	1∶40	70	30	6.30
13	1∶40	60	60	18.55
14	1∶40	60	60	18.55
15	1∶40	60	60	18.55
16	1∶50	60	90	13.88
17	1∶40	60	60	18.55

对回归模型的有效性进行方差分析，结果见表 3，该模型的 F 为 3.98，$P < 0.05$，可见，建立的模型对本实验有较高的拟合度。由表中 F 值可知，各因素对藏菖蒲总提取率的影响大小为：提取时间＞料液比＞乙醇浓度。

表 3　响应面优化醇提工艺方差分析

Tab 3　ANOVA of response surface optimization of alcohol extraction process

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型 Model	362.35	9	40.26	3.98	0.0410
A	6.25	1	6.25	0.6182	0.4575
B	0.4802	1	0.4802	0.0475	0.8337
C	63.79	1	63.79	6.31	0.0403
AB	2.42	1	2.42	0.2392	0.6397
AC	1.21	1	1.21	0.1197	0.7395
BC	27.51	1	27.51	2.72	0.1430
A^2	11.64	1	11.64	1.15	0.3188
B^2	39.94	1	39.94	3.95	0.0872
C^2	190.28	1	190.28	18.83	0.1134
残差	70.75	7	10.11		
失拟项	70.75	3	23.58		
净误差	0.000	4	0.000		
总误差	433.10	16			

对不同因素交互影响藏菖蒲提取率进行响应面分析，如图 1 所示。所有响应面开口均向下，回收率与三个考察因素呈明显的二次抛物关系，随着各因素值增大，响应值逐渐升高，随后呈现不同斜率的下降，各曲面均有稳定点，即为极大值 [31]。通过对二次抛物线函数模型进行极值分析，得到藏菖蒲提取的最佳工艺条件为：料液比 1∶40.04，乙醇浓度 55.53%，提取时间 58.39 min。

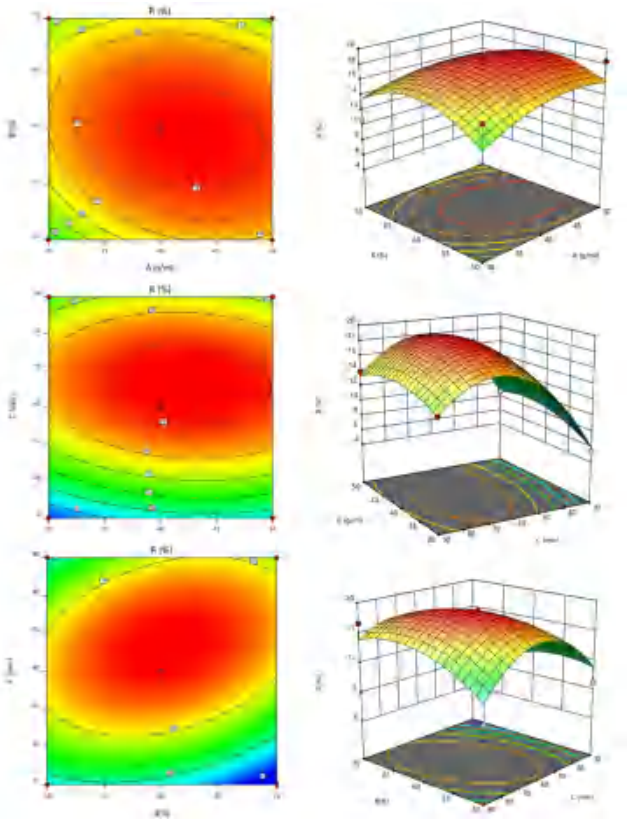


图 1　各因素交互作用对藏菖蒲总提取率的影响

Fig 1　Effect of the interaction of various factors on the total extraction rate of Acorus calamus

利用 Design Expert 12.0 软件，在各个单因素的基础上，采用响应面法对藏菖蒲用热回流法提取的最佳醇提工艺进行了优化，对最优提取工艺条件进行验证。因考虑到实际操作，所以工艺条件采用乙醇浓度 55%，料液比为 1∶40，提取时间 60 min，在此工艺条件下得到的藏菖蒲总提取率为 18.91%，*RSD* 值为 1.83%。

3.2　藏菖蒲提取物抑菌效果及 *MIC*

3.2.1　藏菖蒲提取物抑菌效果　由表 4 可知藏菖蒲醇提物对细菌和真菌都有抑菌效果。藏菖蒲醇提物对金黄色葡萄球菌、石膏样小孢子菌、红色毛癣菌的效果较好，而对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的抑菌作用较弱。藏菖蒲水提物对金黄色葡萄球菌和石膏样小孢子菌有抑菌作用。

3.2.2　藏菖蒲的 *MIC* 和 *MBC*　由表 5 可知藏菖蒲醇提物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 *MIC* 分别为：3.91、3.91、15.62 mg • mL^{-1}。藏菖蒲醇提物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 *MBC* 分别为：7.81、7.81、31.25 mg • mL^{-1}。藏菖蒲醇提物对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑制作用较强，对铜绿假单胞菌抑制作用较弱。

3.3　藏菖蒲提取物抗氧化活性分析

表 4 藏菖蒲醇提物和水提物的抑菌效果

Tab 4 Bacteriostatic effect of alcohol and water extracts of Acorus calamus

组别	抑菌圈直径 /mm				
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	石膏样小孢子菌	红色毛癣菌
藏菖蒲醇提物	16.48±0.37	9.33±0.23	8.19±0.24	17.05±0.32	17.22±0.34
藏菖蒲水提物	9.37±0.27	—	—	8.8±0.12	—
中药洗液	17.70±0.12	13.20±0.27	10.77±0.19	17.21±0.46	16.71±0.26
青霉素	40.49±0.29	16.00±0.34	—	—	—
无菌生理盐水	—	—	—	—	—

注："—" 表示无抑菌效果。

Note："—" indicates without antibacterial effect。

表 5 藏菖蒲醇提物对供试菌种的 *MIC* 和 *MBC*

Tab 5 *MIC* and *MBC* of ethanol extract of Acorus calamus

供试菌种	*MIC* /（mg • mL^{-1}）	*MBC*/（mg • mL^{-1}）
金黄色葡萄球菌	3.91	7.81
大肠埃希菌	3.91	7.81
铜绿假单胞菌	15.62	31.25

3.3.1 DPPH • 清除率 如图 2 所示，质量浓度为 0.50 mg • mL^{-1} 时，藏菖蒲醇提物的 DPPH • 清除率为（76.11±0.33）%，接近槲皮素的 DPPH • 清除率（81.88±1.67）%。藏菖蒲醇提物和水提物对 DPPH • 清除率的半数清除浓度（IC_{50}）分别为 0.25、0.32 mg • mL^{-1}，随着藏菖蒲提取物浓度的增加，清除自由基能力逐渐上升，呈浓度依赖性。藏菖蒲醇提物相比于水提物能明显地清除 DPPH •，具有较强的抗氧化能力。

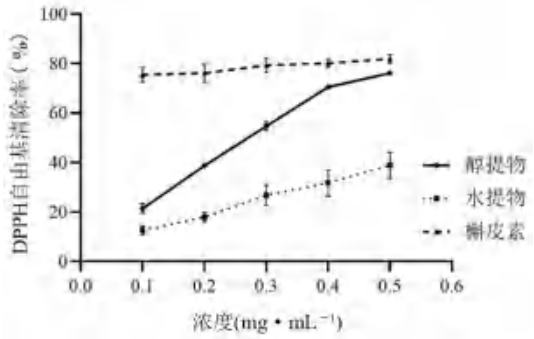


图 2 藏菖蒲不同提取物对 DPPH • 的清除能力

Fig 2 DPPH • scavenging activity of different extracts from Acorus calamus

3.3.2 超氧阴离子（O_2^- •）清除能力 从图 3 可以看出，质量浓度在 1 ～ 5 mg • mL^{-1} 时，藏菖蒲醇提物的清除率为（18.74±1.76）% ～（74.57±1.65）%，藏菖蒲水提物的清除率为（9.64±0.11）% ～（38.22±0.76）%。藏菖蒲醇提物和水提物对超氧阴离子的清除率的 IC_{50} 值分别为 2.72、2.77 mg • mL^{-1}，醇提物的清除率大于水提物，可能是由于醇提物中有效物质含量更多。

3.3.3 总还原能力 随着藏菖蒲醇提物和水提物浓度不断增大总还原能力也逐渐增大，IC_{50} 值分别为 0.30、0.33 mg • mL^{-1}。质量浓度在 0.10 ～ 0.60 mg • mL^{-1} 时，藏菖蒲水提物总还原力为（0.08±0.01）～（0.41±0.04），藏菖蒲醇提物总还原力为（0.16±0.01）～（0.75±0.03），相比之下醇提物的总还原力大于水提物（见图 4）。

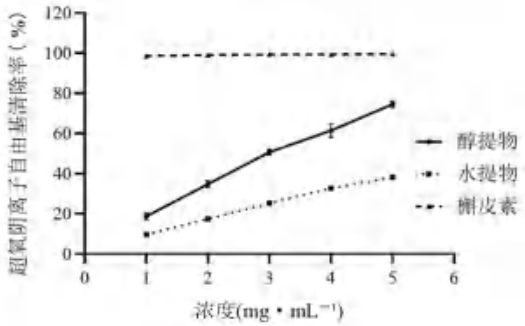


图 3 藏菖蒲不同提取物对 O_2^- • 的清除能力

Fig 3 Scavenging capacity of O_2^- • from different extracts of Acorus calamus

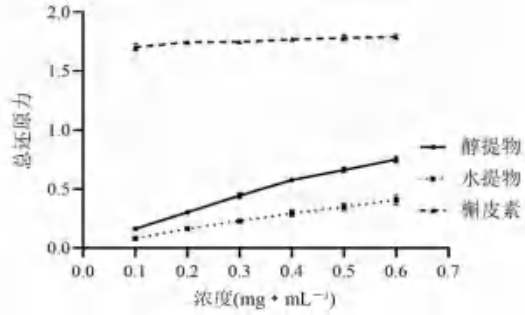


图 4 藏菖蒲不同提取物总还原能力

Fig 4 Total reducing capacity of different extracts from Acorus calamus

4 讨论

本实验优化了藏菖蒲乙醇提取物的提取工艺，最终得到藏菖蒲提取的最佳工艺条件下，实际得率（18.91%）与理论得率（18.96%）之间的偏差仅为 0.05%（＜ 5%），误差较小，模型拟合度高，实验可行性高。藏菖蒲醇提物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌都有抑菌作用，其中对金黄色葡萄球菌、石膏样小孢子菌、红色毛癣菌有显著的抑制作用，与市售中药洗液对比发现其抗菌效果相当，所以藏菖蒲醇提物有较高的药用价值和广泛的应用前景。而藏菖蒲水提物仅对

金黄色葡萄球菌有较好的抑菌作用，总体上醇提物抑菌效果强于水提物，但对其抗菌活性成分及抗菌机制还有待具体研究。藏菖蒲醇提物的DPPH·、O_2^-·的清除能力，总还原力强于水提物，并且抗氧化活性与其浓度呈现出一定的量效关系。藏菖蒲醇提物抗菌和抗氧化能力较好，对后续深入研究其有效成分、化学结构、理化性质以及确定构效关系具有一定的指导意义。

参考文献

[1] 朱平，刘效栓，王红丽，等. 三种菖蒲的比较研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2021，30（2）：59-62.

[2] 李占强，李润乐，苏姗姗，等. 藏菖蒲挥发油对多房棘球蚴的体外杀伤活性 [J]. 中国高原医学与生物学杂志，2020，41（3）：188-191.

[3] 母茂君，赵辉，伍七林. 藏菖蒲化学成分及生理活性研究进展 [J]. 安徽农业科学，2020，48（15）：9-12.

[4] 欧小群，罗晓红，江吉村，等. 藏药藏菖蒲挥发油成分GC-MS分析 [J]. 成都中医药大学学报，2014，37（3）：13-15.

[5] Nasir O. Protective effect of Acorus calamus on kidney and liver functions in healthy mice [J]. Saudi J Biol Sci，2021，28（5）：2701-2708.

[6] Balakrishnan R，Cho D，Kim I，et al. Molecular mechanisms and therapeutic potential of α-and β-asarone in the treatment of neurological disorders [J]. Antioxidants，2022，11（2）：281.

[7] 孙传伯，李道远，刘枫，等. 藏菖蒲药材的特异性PCR鉴别 [J]. 时珍国医国药，2021，32（4）：886-890.

[8] Mikami M，Takuya O，Yoshino Y，et al. Acorus calamus extract and its component α-asarone attenuate murine hippocampal neuronal cell death induced by l-glutamate and tunicamycin [J]. Biosci Biotechnol Biochem，2021，85（3）：493-501.

[9] Verma R，Kumar D，Nagraik R，et al. Mycorrhizal inoculation impact on *Acorus calamus* L.-An ethnomedicinal plant of western Himalaya and its in silico studies for anti-inflammatory potential [J]. J Ethnopharmacol，2021，265：113353.

[10] Yao XG，Ling Y，Guo SX，et al. Tatanan A from the *Acorus calamus* L. root inhibited dengue virus proliferation and infections [J]. Phytomedicine，2018，42：258-267.

[11] Nithya K，Bhuvaragavan S，Sruthi K，et al. Purification，characterization and larvicidal activity of a potent bioactive compound asarone from leaves of *Acorus calamus* against the culician larval mosquitoes [J]. Parasitol Int，2022，90：102620.

[12] Li J，Zhao JP，Wang W，et al. New acorane-type sesquiterpene from *Acorus calamus* L [J]. Molecules，2017，22（4）：529.

[13] 陈炳智，杨立志，郑丽珠，等. 长裙竹荪抑菌活性物质的分离纯化及其抑菌效果 [J]. 菌物学报，2020，39（8）：1568-1579.

[14] 黄梅，沈建英，杜成成，等. 青蒿素及其衍生物的抗菌活性初步研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（9）：1946-1952.

[15] Wan F，Peng F，Xiong L，et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of Patchouli alcohol from Pogostemon cablin [J]. Chin J Inte Med，2021，27（2）：125-130.

[16] 张海霞，包良. 紫色马铃薯花青素的抑菌性及其对草莓保鲜效果的研究 [J]. 食品工业科技，2021，42（24）：293-298.

[16] 王洪斌，陈云舒，严守雷，等. 菱角梗、菱角壳提取物抑菌活性及其活性成分分析 [J]. 食品工业科技，2021，42（3）：61-67.

[18] 叶晓楠，曾慧慧，刘思琦，，等. 酸枣提取物的抗氧化及抗衰老作用 [J]. 食品工业科技，2022，43（9）：389-395.

[19] Mei XY，Yang WJ，Huang GL，et al. The antioxidant activities of balsam pear polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol，2020，142：232-236.

[20] Hu Q，Liu ZG，Guo YJ，et al. Antioxidant capacity of flavonoids from Folium Artemisiae Argyi and the molecular mechanism in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Ethnopharmacol，2021：114398.

[21] 庄远杯，魏爱红，陈堪彬，等. 番石榴不同部位乙醇提取物的抗氧化、降血糖及酪氨酸酶抑制活性 [J]. 食品工业科技，2022，43（8）：365-371.

[22] Zhang T，Liu HP，Bai XY，et al. Fractionation and antioxidant activities of the water-soluble polysaccharides from *Lonicera japonica* Thunb [J]. Int J Biol Macromol，2020，151：1058-1066.

[23] Cheng H，Huang GL. Extraction characterisation and antioxidant activity of *Allium sativum* polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol，2018，114：415-419.

[24] 周新宇，吕重宁，秦汝兰. 刺玫果中花色苷提取工艺优化及抗氧化性分析 [J]. 食品工业科技，2022，43（4）：178-186.

[25] 李爽，赵宏，王宇亮，等. 蒲公英多糖乙酰化修饰、体外抗氧化及抑菌作用研究 [J]. 食品工业科技，2022，43（3）：18-25.

[26] Chen J，Huang GL. Antioxidant activities of garlic polysaccharide and its phosphorylated derivative [J]. Int J Biol Macromol，2019，125：432-435.

[27] Yuan FF，Gao Z，Liu WB，et al. Characterization，antioxidant，anti-aging and organ protective effects of sulfated polysaccharides from *Flammulina velutipes* [J]. Molecules，2019，24（19）：3517.

[28] 温红瑞，贾英健，李晓双，等. 槲皮万寿菊素抗氧化性的研究 [J]. 饲料工业，2022，43（5）：51-54.

[29] 黄晓月，毕思远，区家豪，等. 木瓜蛋白酶法制备抗氧化活性壳寡糖的工艺优化 [J]. 生物学杂志，2022，39（1）：104-109.

[30] 冯艳钰，臧延青. 三种小麦麸皮总黄酮的体外抗氧化活性 [J]. 食品与发酵工业，2021，47（9）：16-24.

[31] 牛鹤丽. 响应面法优化大蓟根总黄酮纯化工艺及其纯化前、后的抑菌活性比较 [J]. 食品工业科技，2021，42（19）：211-217.

（收稿日期：2023-10-06；修回日期：2023-11-16）

雷公藤甲素双向调控 Nrf2/p65 产生毒 / 效作用的机制研究

刘灵[1, 2]，张慧民[2]，郭林[2]，杨艳[3]，曹蓉[1, 2]，罗欢[4]，邹攀[5]，龚慧[2]，江志超[1, 4*]，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. 梧州市工人医院，广西 梧州 543001；4. 湖南省直中医医院，湖南 株洲 410016；5. 广西壮族自治区南溪山医院，广西 桂林 541002）

摘要：目的 探索雷公藤甲素（TP）双向调控 Nrf2/p65 产生毒性与保护的双重作用及机制。**方法** 通过小分子与蛋白质对接模拟，分析 TP 与 Nrf2/p65 的潜在作用关系。在细胞实验里，采用不同浓度的 TP 分别干预人正常肝脏细胞（L02）与小鼠肝库普弗细胞（KC），采用 MTT 法检测细胞存活率，Western blot 检测 Nrf2、HO1、p65、IL-6 的蛋白表达；在动物实验里，采用 TP 干预糖尿病肾病（DN）模型大鼠，HE 染色法检测大鼠肾脏病理，靛酚蓝比色法检测血清 BUN，ELISA 法检测血清炎症因子 TNF-α、IL-6 与 IL-1β 的含量变化，RT-qPCR 检测肾组织中 p65、podocin 和 Kim-1 的 mRNA 水平，Western blot 检测肾组织中 p65 的蛋白表达，免疫组化法观察肾组织细胞 p65 与 Nrf2 的蛋白表达情况。**结果** 分子对接结果表明，TP 与 Nrf2 及 p65 具有良好结合活性；体外实验表明，TP 可以降低 L02 细胞存活率，呈剂量和时间依赖性降低 Nrf2 蛋白表达，降低 KC 细胞存活率，抑制 Nrf2 及其下游 HO-1 的表达，上调 p65 及 IL-6 的表达；动物实验表明，TP 对 DN 大鼠有明显保护作用，降低大鼠肾组织中 p65 的 mRNA 及蛋白的表达，上调 Nrf2 蛋白的表达，下调血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 炎症因子水平。**结论** TP 可以通过下调 Nrf2 蛋白表达，上调 p65 蛋白的表达对肝细胞造成毒性损伤；同时也可以上调 Nrf2 蛋白表达，下调 p65 蛋白与 mRNA 的表达而对 DN 大鼠产生保护作用，即对 Nrf2/p65 分子产生双向调控而表现毒性或药性。

关键词：双向调控；分子对接；雷公藤甲素；p65；Nrf2

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0660-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.017

Bidirectional regulation of triptolide on Nrf2/P65 and related toxic/therapeutic effects

LIU Ling[1, 2], ZHANG Hui-min[2], GUO Lin[2], YANG Yan[3], CAO Rong[1, 2], LUO Huan[4], ZOU Pan[5], GONG Hui[2], JIANG Zhi-chao[1, 4*], YAN Miao[2*] (1. *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 2. *The Second Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410011; 3. *Wuzhou Gongren Hospital*, *Wuzhou Guangxi* 543001; 4. *Hunan Province Directly Affiliated TCM Hospital*, *Zhuzhou Hunan* 410016; 5. *Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region*, *Guilin Guangxi* 541002)

Abstract: Objective To determine the dual role of triptolide (TP), in regulating both the toxicity and protection through the Nrf2/P65 pathway and related mechanism. **Methods** Molecular docking simulations were performed to analyze the potential interaction between TP and Nrf2/P65. In the cell experiments, different concentrations of TP were used to intervene human normal liver cells (L02) and mouse Kupffer cells (KC). The cell viability was assessed with the MTT assay, and the protein expression of Nrf2, HO1, P65, and IL-6 was examined by Western blot. In the animal experiments, TP was administered for model rats with diabetic nephropathy. The kidney pathology was evaluated with HE staining, the serum BUN level was measured by indophenol blue colorimetric method, and

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：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；江志超，男，主任医师，主要从事中医药基础与临床研究，email：912015107@qq.com

changes in the serum levels of inflammatory cytokines TNF-α, IL-6, and IL-1β were determined by ELISA. The mRNA levels of P65, podocin, and Kim-1 in the kidney tissue were measured with RT-qPCR, and protein expression of P65 in the kidney tissue with Western blot. Immunohistochemistry was performed to observe the protein expression of P65 and Nrf2 in the kidney tissue. **Results** The molecular docking showed good binding between TP with Nrf2 and P65. In vitro experiments demonstrated that TP reduced the cell viability in L02 cells, decreased Nrf2 protein expression in a dose-and time-dependent manner, reduced the cell viability in KC cells, inhibited the expression of Nrf2 and its downstream target HO-1, and upregulated the expression of P65 and IL-6. The animal experiments showed that TP had obvious protective effect on DN rats, namely reducing the mRNA and protein expression of P65 in the kidney tissue, upregulating Nrf2 protein expression, and downregulating the levels of inflammatory cytokines TNF-α, IL-6, and IL-1β in the serum. **Conclusion** TP can induce toxic damage to liver cells by downregulating Nrf2 protein expression and upregulating P65 protein expression. Meanwhile, it can also exert a protective effect on DN rats by upregulating Nrf2 protein expression and downregulating the expression of P65 protein and mRNA. Therefore, TP can exert dual regulation on the Nrf2/P65 pathway, displaying either toxicity or therapeutic effects.

Key words: bidirectional regulation; molecular docking; triptolide; P65; Nrf2

雷公藤又名“断肠草”，为卫矛科雷公藤属多年生藤本植物雷公藤（*Tripterygium Wilfordii* Hook. f.）的干燥根，味苦、性寒，有大毒，具祛风除湿、活血通络、消肿止痛、杀虫解毒之功效，在治疗类风湿关节炎、红斑狼疮及各种原发性和继发性肾炎等疾病方面，效果显著[1]。但雷公藤有严重的毒副作用，尤其是肝肾毒性[2]，引起国内外研究者对其安全性的疑虑，限制了其临床应用。本课题组前期对雷公藤制剂临床应用进行了详细的调研和分析，发现雷公藤总苷片应用于糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）治疗，疗效确切，且肝肾毒性相对较少[3-5]；前期研究还发现雷公藤对正常大鼠有剂量相关的肾毒性，但在一定剂量范围内对肾功能损伤病理状态大鼠却有保护作用[6-7]。如何正确理解雷公藤的这种保护和损伤的双向作用并阐明其机制，以指导临床合理用药，成为迫切需要解决的难题。目前对雷公藤的作用研究多集中于雷公藤甲素（TP）[8-9]、雷公藤红素[10]、雷公藤总苷[11]。且仅限于一些常规的细胞分子生物学药理实验，其进入体内对氧化 / 化学应激防御通路 Nrf2/ARE 所致内源性物质变化的影响暂未见报道。本研究结合分子对接技术，在体外实验中明确 TP 对库普弗细胞（KC）细胞及人正常肝脏细胞（L02）细胞的活性影响及毒性机制；以 DN 为动物疾病模型，探讨 TP 对 DN 大鼠的治疗作用与机制，初步探讨 TP 通过双向调控特定生物标志物而产生毒效作用的分子机制，为科学评价雷公藤的量 - 效 / 毒关系及临床合理、安全用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 分子对接

利用 PubChem 数据库获得 Triptolide 的“3D.mol2”结构，通过 PDB 数据库（Protein Data Bank，https：//www.rcsb.org/）下载 p65（PDB code：1VKX）和 Nrf2（PDB code：6QMC）的蛋白质晶体结构文件。使用分子对接软件 Maestro 13.5 的 Protein preparation 组件对上述文件进行准备，利用 LigPrep 组件对 Triptolide 文件进行处理；采用 Receptor Grid Gener 组件对结合位点进行定义，使用 Ligand Docking 组件对小分子与蛋白质进行对接模拟，最后使用 PyMol 软件对结果进行可视化分析。

1.2 实验动物及细胞

L02 细胞（上海中乔新舟生物科技有限公司），KC 细胞（北京北纳创联生物技术研究院）。Sprague Dawley（SD）雄性大鼠 [湖南斯莱克景达动物实验公司，许可证号：SCXK（湘）2021-0002，实验动物合格证号：No.430727201101263973]，6 ～ 8 周，体重 160 ～ 170 g，饲养在中南大学实验动物学部无特定病原体级动物房内，温度控制在（23±2）℃，湿度（55±10）%，暗 / 光周期为 12/12 h（光照时间 8：00—20：00），该研究通过中南大学实验动物伦理委员会批准（批件号：No.2019sydw0150）。

1.3 试药与仪器

TP、MTT、TRIzol Reagent、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、柠檬酸盐缓冲液、ELISA 试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）；RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基（Gibco）；胎牛血清（北京中生奥邦生物科技有限公司）；p65、Podocin、Kim-1、*β*-actin 引物（北京擎科生物科技股份有限公司）；Nrf2、p65、HO-1、TNF-*α*、IL-6、IL-1*β* 抗体、兔单抗与鼠单抗（爱博泰克生物）；链脲佐菌素（STZ，Sigma）。全波长酶标仪（Thermo）；ChemiDoc 成像系统（BIORAD）；PCR 仪（Eppendorf）；荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems）。

1.4 动物模型构建与取样

将 26 只健康雄性 SD 大鼠随机分成对照组（NC，$n = 6$）与模型组（$n = 20$）。模型组给予高脂饮食 4 周，NC 组给予常用的维持饲料。造模前 12 h 大鼠禁食不禁水，第 2 日给予一次性腹腔注射 1% STZ 35 mg • kg^{-1}，NC 组注射等量柠檬酸缓冲液。STZ 注射 7 日后经尾静脉采血检测血糖值，以随机血糖≥ 16.7 mmol • L^{-1}，确认糖尿病造模成功。若随机血糖＜ 16.7 mmol • L^{-1}，则再次注射 1% STZ 35 mg • kg^{-1}，1 周后测随机血糖，血糖值达标，再结合肾功能血尿素氮（BUN）、肾脏损伤病理变化、肾损因子等提示 DN 模型造模成功。成功造模 12 只大鼠，将模型大鼠分为 DN 组及 DN ＋ TP 组，每组 6 只，DN ＋ TP 组腹腔注射 TP 剂量为 0.5 mg • kg^{-1}，DN 组和 NC 组灌胃给予含 0.4% 二甲基亚砜（DMSO）的水溶液，每日给药，连续 4 周，给药结束后取血、肾组织留样。组织置于 4% 多聚甲醛溶液中，经固定脱水浸蜡等步骤，常规包埋并制成石蜡切片备用。

1.5 MTT 法检测药物对细胞活性的影响

取对数生长期 L02、KC 细胞，制成每 100 μL 含 4000 个细胞的悬液，种于 96 孔板中，置于 37 ℃、5%CO_2 湿度饱和培养箱中培养，待细胞贴壁后弃原培养基，每孔加入 200 μL 不同浓度 TP（0、25、50、75、100、125 nmol • L^{-1}）的培养基，每个浓度设至少 3 个复孔，干预一定时间后弃原培养液，每孔加入 50 μg • mL^{-1} MTT 溶液 100 μL，继续孵育 4 h 后于酶标仪测 490 nm 处吸光度，重复 3 次。

1.6 ELISA 法检测药物对炎症因子的影响

用 0.05 mol • L^{-1} pH 9 碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为 1 ～ 10 μg • mL^{-1}。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 mL，4 ℃过夜。次日，弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液洗 3 次，每次 3 min。加一定稀释的待检样品 0.1 mL 于上述已包被的反应孔中，置 37 ℃孵育 1 h，然后洗涤；于各反应孔中，加入新鲜稀释的酶标抗体（经滴定后的稀释度）0.1 mL，37 ℃孵育 0.5 ～ 1 h，洗涤；于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 mL，37 ℃孵育 10 ～ 30 min；于各反应孔中加入 2 mol • L^{-1} 硫酸 0.05 mL。在酶标仪上，于 450 nm 测各孔 *OD* 值，实验重复 3 次。

1.7 RT-PCR 验证药物对 mRNA 表达水平的影响

参照 RNAfast 200 试剂盒（艾科瑞生物）步骤提取 mRNA，novoprotein 逆转录试剂盒（艾科瑞生物）制备 cDNA。以 GAPDH 作为内参进行 RT-PCR，QuantStudio 5 定量 PCR 仪上机检测各组织中的 mRNA 表达水平。反应条件为 95 ℃预处理 1 min 循环 1 次，95 ℃变性 20 s，60 ℃退火 1 min，共循环 40 次。各组均设 3 个复孔，以 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法表示各自基因的相对表达量，实验重复 3 次，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

引物名称	引物序列（5'-3'）
p65- 正向	GGGATGGCTTCTATGAGGCTGAAC
p65- 反向	CTTGCTCCAGGTCTCGCTTCTTC
podocin- 正向	GGAGAGCGAGCGACCAGAGG
podocin- 反向	ATCAGGGAGGAGAGGACAAGAAGC
Kim-1- 正向	GGTCTGTATTGTTGCCGAGTGGAG
Kim-1- 反向	GCCTTGTGGTTGTGGGTCTTGTAG
GAPDH- 正向	GCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH- 反向	GGCATGGACTGTGGTCATA

1.8 Western blot 法检测药物对蛋白表达水平的影响

取药物处理的细胞或组织蛋白，加入 RIPA 裂解液，经冰上裂解、离心后，获得总蛋白提取液，采用 BCA 蛋白定量试剂盒，酶标仪测定蛋白浓度，采用 SDS-PAGE 进行蛋白电泳，半干法将膜转印到 PVDF 膜上，将 PVDF 膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中封闭 1 h，加入一抗，4 ℃摇床过夜，洗膜后加入二抗，37 ℃孵育 1 h，洗膜后，用 ChemiDoc 成像系统并分析蛋白表达，实验重复 3 次。

1.9 统计方法

采用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行分析。数据以均值 ± 标准差表示。首先采用单因素方差分析（ANOVA）进行组间比较，再用 LSD 检验进行两两比较。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1　TP 与 p65 和 Nrf2 的分子对接结果

分子对接结果表明，TP 与 p65 的关键氨基酸 LYS37、LYS122 及 GLN132 可形成氢键作用力，对接分数为－4.326；TP 与 Nrf2 的关键氨基酸 ARG415 及 ARG483 可形成氢键作用力，对接分数为－5.105；结合能力均较好，其能较好地结合于 p65、Nrf2 的活性口袋中，见图 1。

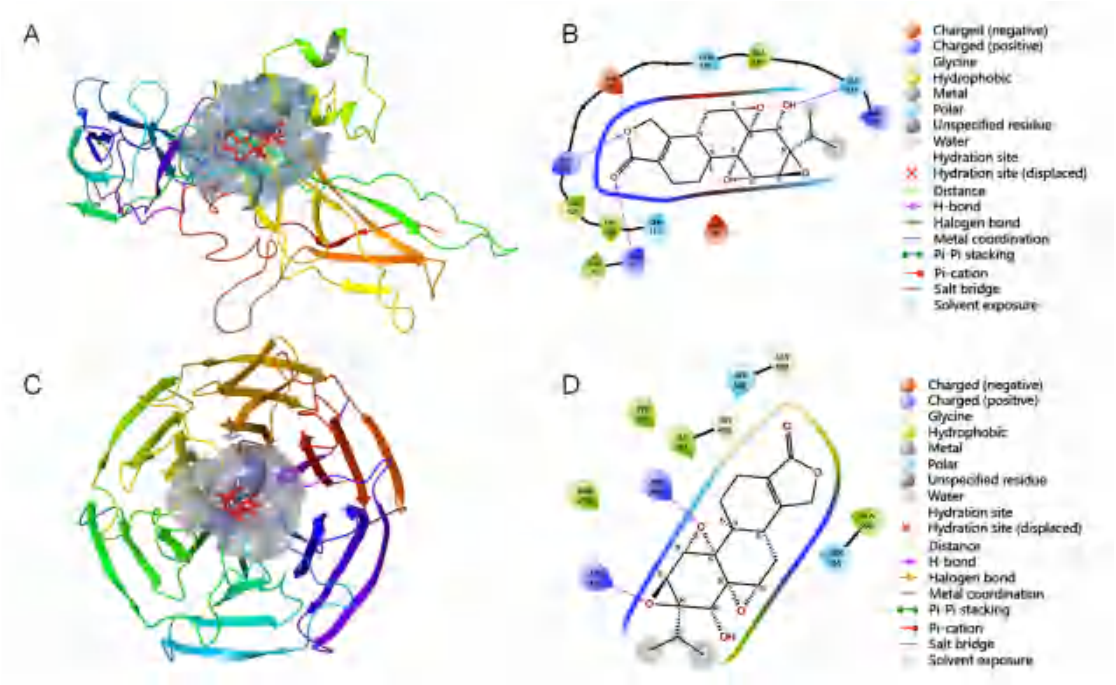


图 1　TP 与 p65 和 Nrf2 的分子对接图

Fig 1　Molecular docking of TP with P65 and Nrf2

A. TP-p65 3D 结合（TP-p65 3D combination）；B. TP-p65 2D 结合（TP-p65 2D combination）；C. TP-Nrf2 3D 结合（TP-Nrf2 3D combination）；D. TP-Nrf2 2D 结合（TP-Nrf2 2D combination）

2.2　TP 对 L02 细胞生长及 Nrf2 蛋白表达的影响

与空白组（未加 TP）比较，25 nmol • L^{-1} TP 药物处理 24 h 后，对细胞生长有一定抑制，但差异无统计学意义，而 50、75、100、125 nmol • L^{-1} 组的 L02 细胞增殖指数均显著降低，见图 2。

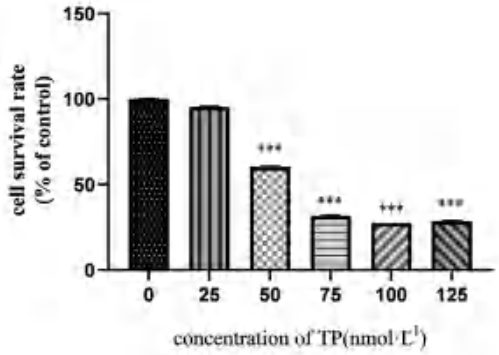


图 2　TP 对 L02 细胞生长的影响

Fig 2　Effect of TP on the growth of L02 cells

注：与空白组比较，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the blank group，$^{***}P < 0.001$.

观察不同浓度 TP 干预 L02 细胞 24 h 后 Nrf2 蛋白的表达情况，结果发现，与空白组比较，当 TP 浓度在 50 ～ 125 nmol • L^{-1} 时，Nrf2 的表达水平均下降，且呈浓度依赖性，125 nmol • L^{-1} 的 TP 下调 Nrf2 蛋白表达能力最强。而当 TP 浓度为 25 nmol • L^{-1} 时，Nrf2 蛋白的表达水平上调，说明高浓度的 TP 对 Nrf2 蛋白的表达有抑制作用，而低浓度的 TP 对 Nrf2 蛋白的表达有诱导作用，结果见图 3A。使用 25 nmol • L^{-1} 的 TP 对 L02 细胞干预，观察不同时间点对 Nrf2 蛋白表达的影响，发现当干预时间小于 8 h 时，TP 对 Nrf2 产生诱导作用；大于 8 h 后，其诱导作用减弱，甚至呈现抑制的趋势（见图 3B）。上述结果表明 TP 可通过下调 Nrf2 蛋白的表达损伤 L02 细胞，且 TP 对 Nrf2 蛋白的作用呈双向调控。

2.3　TP 对 KC 细胞生长和蛋白的影响

采用 0、4.5、9、18、36、72、120、200 nmol • L^{-1} 的 TP 干预 KC 细胞，分别于 4、8、12、24、48 h 观察 KC 细胞活性，结果 36 nmol • L^{-1} 以内的 TP 在 8 h 前对 KC 细胞没有抑制作用，而 36 nmol • L^{-1} 以上的 TP 在 8 h 后对 KC 细胞生长均有抑制作用，见图 4。

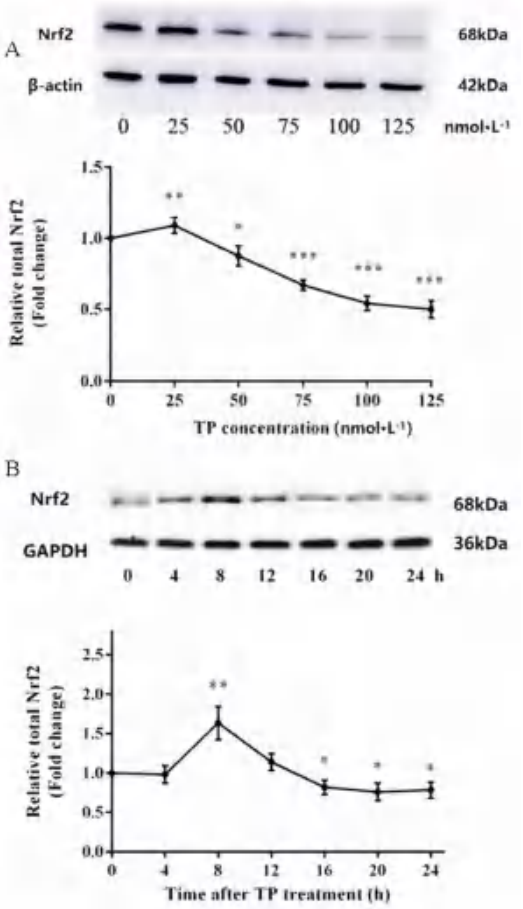


图 3 TP 对 L02 细胞中 Nrf2 蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of TP on the expression of Nrf2 protein in L02 cells

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

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

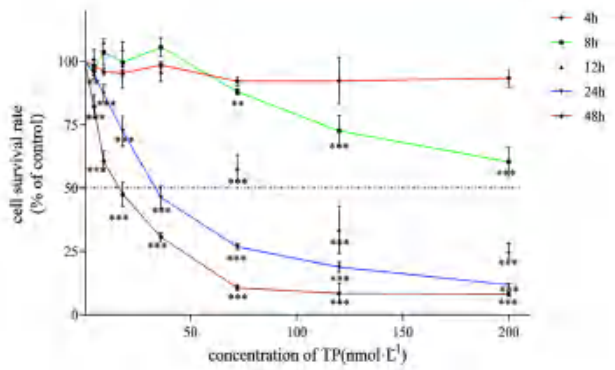


图 4 TP 对 KC 细胞生长的影响

Fig 4 Effect of TP on the growth of KC cells

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

观察 0、7.5、15、30、40 nmol • L^{-1} 浓度的 TP 干预 KC 细胞 48 h 后细胞中 Nrf2、HO-1、p65、IL-6 蛋白的表达情况。结果发现，与对照组比较，Nrf2 及其下游 HO-1 蛋白表达被明显抑制，而 p65 与 IL-6 蛋白的表达明显上调，见图 5。结果显示 TP 可以通过下调 Nrf2、HO-1 的表达，上调 p65 与 IL-6 蛋白的表达对 KC 细胞造成损伤。

2.4 TP 对 DN 大鼠的治疗作用

2.4.1 TP 对 DN 大鼠肾组织病理的影响 构建 DN 模型大鼠，分为 NC 组、DN 组及 DN + TP 组，对各组大鼠肾组织进行 HE 染色，结果显示 NC 组肾小管结构基本正常，肾小球未见细胞增生，基底膜无增厚；DN 组肾小管中度变性、轻

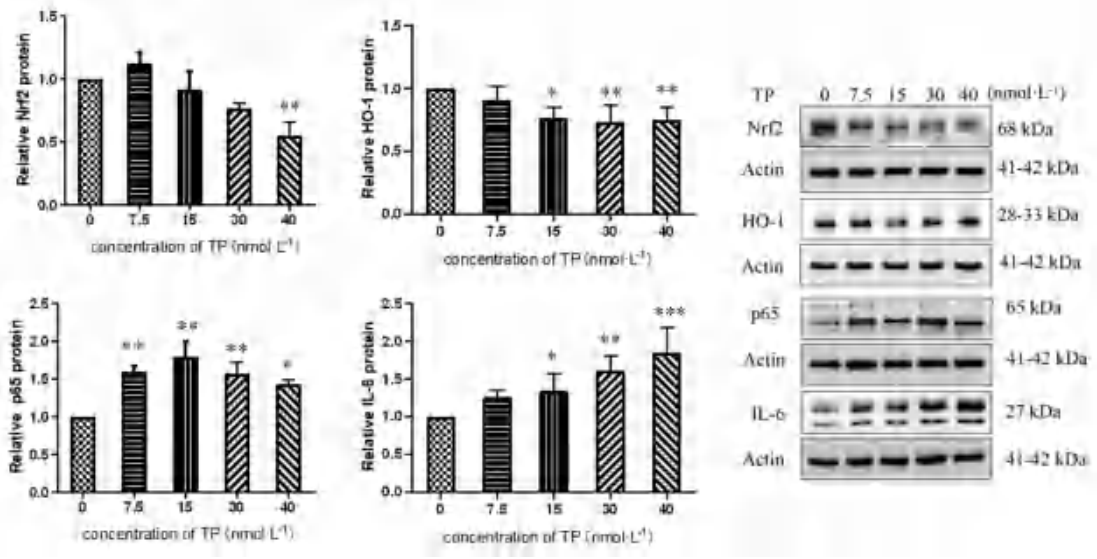


图 5 TP 对 KC 细胞蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of TP on the protein expression of KC cell

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

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

度扩张，肾小球较NC组体积变大，肾小球分叶状改变，系膜细胞增生，肾小囊腔变大；而DN ＋ TP组肾小管轻度变性，未见扩张，与DN组相比，肾小管损伤程度减轻，肾小囊腔变小，如图6所示，结果提示DN组存在肾损伤，而DN ＋ TP组可逆转此损伤。

2.4.2　TP对DN大鼠血清BUN及炎症因子的影响　相较于NC组，DN组血清BUN、TNF-α水平显著上升，血清IL-6与IL-1β水平有上调趋势；与DN组比较，DN ＋ TP组血清BUN、TNF-α水平显著下降（见图7A、7B），IL-6与IL-1β水平均有下调趋势（见图7C与7D）。

2.4.3　TP对大鼠肾组织中mRNA的影响　相较于NC组，DN组p65 mRNA水平上调、podocin mRNA水平下调；与DN组比较，DN ＋ TP组p65 mRNA水平下调、podocin mRNA水平上调。相较于NC组，DN组肾小管损伤基因Kim-1 mRNA水平上调；与DN组比较，DN ＋ TP组Kim-1 mRNA水平有上调趋势（见图8）。

2.4.4　TP对DN大鼠肾组织中Nrf2和p65蛋白的影响　免疫组化阳性物质为分布于细胞质或细胞核中的棕黄色区域，蓝色为细胞核。Nrf2蛋白免疫组化结果如图9A、9B与9C所示，相比于NC组，DN组棕黄色区域明显减少，相比于DN组，DN ＋ TP组棕黄色区域明显增多。p65蛋白免疫组化结果如图9D ～ F，相比于NC组，DN组棕黄色区域明显增加，相比于DN组，DN ＋ TP组棕黄色区域明显减少。Western blot结果显示，相比于NC组，DN组p65蛋白表达明显上调，相比于DN组，DN ＋ TP组p65蛋白表达明显下调（见图9G）。

3　讨论

研究表明，Nrf2信号通路是诸多信号通路中具有重要防御功能的通路之一，主要编码表达多种重要的细胞保护因子，包括解毒酶、抗氧化蛋白、转运体、抗炎因子以及其他的应激反应因子[12]。Yamamoto等[13]发现，在肝脏或肾脏等因外界条件造成损伤时，Nrf2通过调节细胞对毒物的代谢排泄、细胞凋亡以及在应激状态下细胞的抗炎抗氧化进程而发挥作用[14]，本课题组前期研究发现诱导Nrf2通路能保护雷公藤所致的肝毒性[15-16]。p65是NF-κB家族成员之一，参与NF-κB信号通路的传导与调控，并参与许多生物学过程，例如炎症、免疫、分化、细胞生长、肿瘤发生和凋亡等，p65蛋白的表达升高通常与炎症损伤密切相关[17]。在刺激因素的影响下，由激酶调节的抑制分子IκB的磷酸化和p65的磷酸化会导致NF-κB的活化，活化的NF-κB由细胞质进入细胞核调节与炎症相关靶基因的转录，促进下游IL-1β、IL-6和TNF-α等促炎因子的生成[18-19]。有研究表明雷公藤多苷可通过抑制NOD2/NF-κB通路活性减轻DN大鼠的肾损伤[20]。Yang等[21]报道雷公藤内酯三醇可通过激活Nrf2通路和抑制NF-κB通路对脂多糖（LPS）诱导的急性肝损伤小鼠产生肝保护作用，提出Nrf2、NF-κB通过交互方式调节氧化应激和炎症反应。Nrf2调控的氧化应激和NF-κB调控的炎症应答是维持细胞氧化还原平衡的关键信号通路[22-23]，两者交互的分子机制多元复杂，贯穿通路激活的各个阶段。从启动激活由胞质入核，到共激活蛋白促进与DNA结合，再到调控下游靶蛋白HO-1等[24]，即Keap1是启动激活环节的首要枢纽，HO-1靶蛋白是Nrf2抑制NF-κB的核心枢纽[25]。

本研究发现Nrf2只是TP毒效作用的参与通路之一，以p65作为核心分子的NF-κB通路也发挥着重要作用。我们通过分子对接发现TP与p65和Nrf2有良好的结合能，从分子水平上预测TP与p65和Nrf2的潜在作用关系；体外实验发现TP可以通过下调Nrf2与HO-1蛋白，上调p65与IL-6蛋白的表达对肝细胞造成毒性损伤；体内实验发现TP也可以上调Nrf2，下调p65蛋白或mRNA的表达，下调下游炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β，而对DN大鼠产生保护作用。

综上，本研究结合分子对接和体内外实验，初步验证TP可双向调控Nrf2与p65分子水平，并可以调节炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β等，从而发挥保护作用或毒性损伤作用，结果提示，在正常或应激状态下，雷公藤可能通过Nrf2和NF-κB信号通路调节氧化应激和炎症反应导致器官产生药效或毒性，研究数据和结果将为雷公藤的应用和进一步研究提供数据和参考。但本研究只进行了体内外实验的初步探讨，还存在不足，例如在动物实验上暂未发现同等剂量的TP既可在肾脏上呈现保护作用又在肝脏上呈现毒性作用，且并未确定TP是直接调控Nrf2与p65还是通过其他途径间接调控，Nrf2与NF-κB信号通路之间的交互作用，是否影响药物的毒效转化，以上皆需进一步阐明。课题组后续将继续深入研究，以期为阐明雷公藤的毒效机制，推广雷公藤临床应用提供参考。

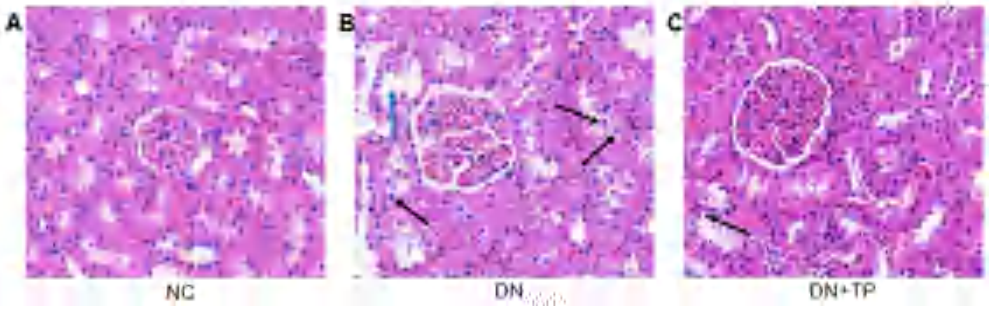


图 6 TP 对 DN 大鼠肾组织病理的影响（×400）

Fig 6 Effect of TP on the renal tissue pathology of DN rats（×400）

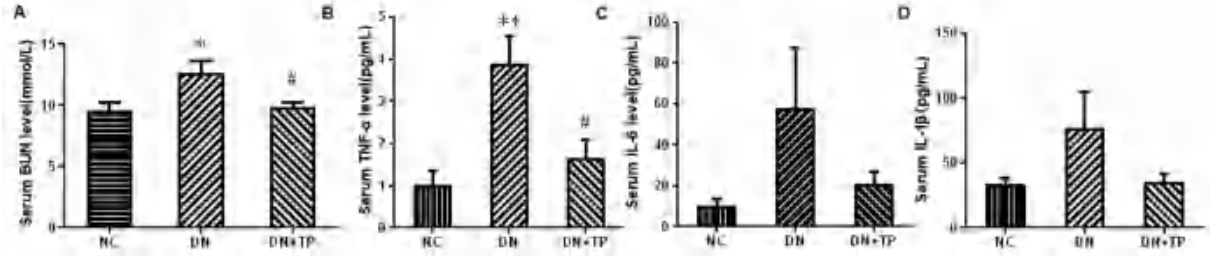


图 7 TP 对 DN 大鼠血清 BUN 及炎症因子的影响

Fig 7 Effect of TP on the serum BUN levels and inflammatory factors of DN rats

注：与 NC 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DN 组比较，$^{\#}P < 0.05$。

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

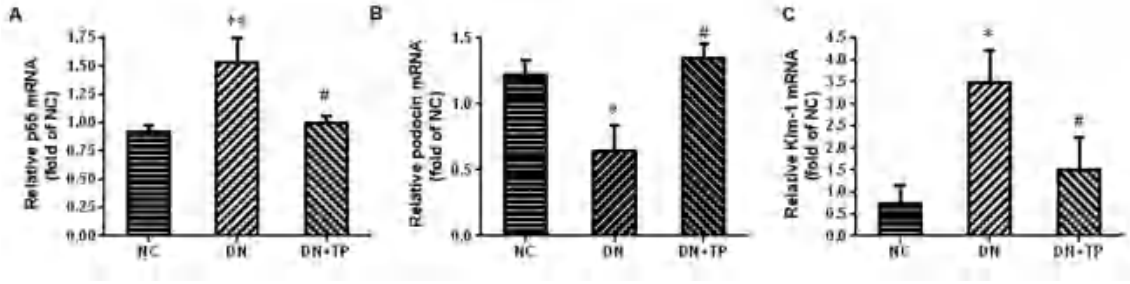


图 8 TP 对 DN 大鼠肾组织中 p65、podocin 和 Kim-1 的 mRNA 水平影响

Fig 8 Effect of TP on the mRNA levels of p65，podocin，and Kim-1 in the renal tissue of DN rats

注：与 NC 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DN 组比较，$^{\#}P < 0.05$。

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

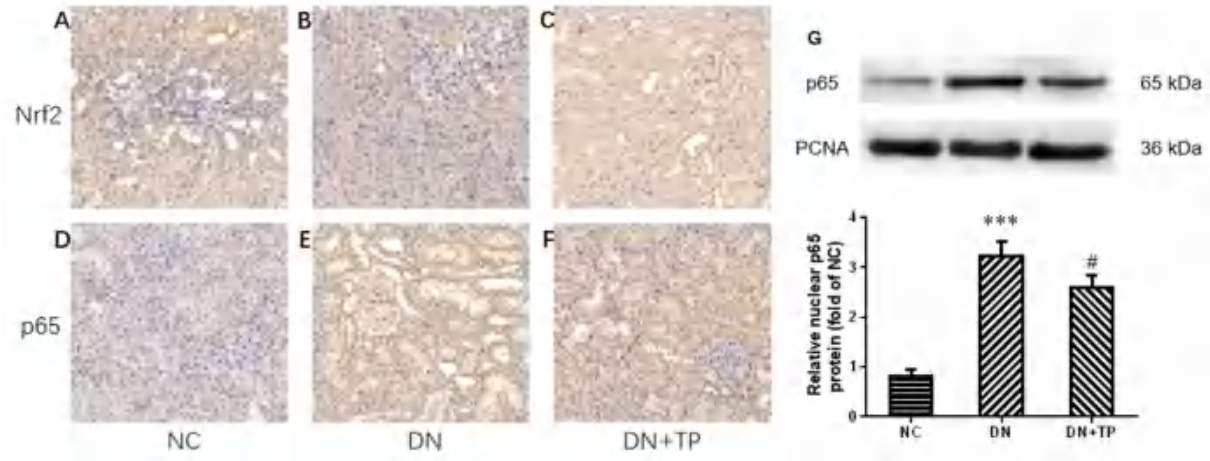


图 9 TP 对 DN 大鼠肾组织中 Nrf2 和 P65 蛋白的影响（×200）

Fig 9 Effect of TP on the Nrf2 and P65 protein levels in the renal tissue of DN rats（×200）

注：与 NC 组比较，$^{***}P < 0.001$；与 DN 组比较，$^{\#}P < 0.05$。

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

参考文献

[1] 周国梁，宿树兰，华永庆，等. 雷公藤肝毒性机制及配伍减毒研究进展[J]. 中草药，2023，54（24）：8263-8272.

[2] 杨立国，乌日拉嘎，萨其拉吐，等. 中药肾毒性成分及其毒性机制研究进展[J]. 中草药，2023，54（23）：7934-7952.

[3] 张敏，颜苗，樊新荣，谢辉，等. 雷公藤红素对糖尿病大鼠的肾脏保护作用[J]. 中医药导报，2018，24（24）：85-87，91.

[4] 赵程程，邓小云，钟燕，等. 2012—2016 年中南大学湘雅二医院雷公藤多苷片应用分析[J]. 中国医院用药评价与分析，2017，17（3）：292-296.

[5] 曹玲娟，颜苗，李焕德，等. 雷公藤致肝损伤及与甘草配伍减毒机制的研究进展[J]. 中国中药杂志，2015，40（13）：2537-2541.

[6] 张琴，李健和. 基于“有故无殒”思想的雷公藤对肾小管 S1 和 S2 段保护与损伤的“双向作用”[J]. 中国医药导报，2016，13（36）：53-57，194.

[7] 张琴，欧阳林旗，胡炜航，等. 基于“有故无殒”思想的雷公藤肾毒性研究[J]. 中国药业，2016，25（20）：25-29.

[8] 王春强，云阳，梁马丹，等. 雷公藤甲素诱导自噬促进人肾小管上皮 HK-2 细胞凋亡[J]. 中国药理学通报，2023，39（11）：2133-2140.

[9] 张维钲，祁晓鸣，左玉芹，等. 黄芪-当归配伍调节 Keap1/Nrf2/PGC-1α 信号抑制雷公藤甲素肝脏毒性的作用及机制[J]. 中国中药杂志，2023，48（23）：6378-6386.

[10] 陈铭，张翔珂，董雨萌，等. 雷公藤红素纳米结构脂质载体的抗肿瘤作用研究[J]. 中南药学，2023，21（1）：50-57.

[11] 罗金国，苏小惠，刘霏，等. 中药雷公藤多苷辅助治疗对糖尿病肾病患者糖脂代谢及肾功能的影响[J]. 糖尿病新世界，2023，26（17）：8-11.

[12] Li BT，Xiu MH，He L，et al. Protective effect of San Huang Pill and its bioactive compounds against ulcerative colitis in Drosophila via modulation of JAK/STAT，apoptosis，Toll，and Nrf2/Keap1 pathways [J]. J Ethnopharmacol，2024，322：117578.

[13] Yamamoto M，Kensler TW，Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system：a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis [J]. Physiol Rev，2018，98（3）：1169-1203.

[14] Dodson M，de la Vega MR，Cholanians AB，et al. Modulating NRF2 in disease：timing is everything [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol，2019，59：555-575.

[15] Hou ZY，Chen L，Fang PF，et al. Mechanisms of triptolide-induced hepatotoxicity and protective effect of combined use of isoliquiritigenin：possible roles of Nrf2 and hepatic transporters [J]. Front Pharmacol，2018，9：226.

[16] Cao L，Yan M，Ma YX，et al. Isoliquiritigenin protects against triptolide-induced hepatotoxicity in mice through Nrf2 activation [J]. Pharmazie，2016，71（7）：394-397.

[17] Tian XC，Liu F，Wang ZJ，et al. Modified Biejia Jianwan decoction restrains PD-L1-mediated immune evasion through the HIF-1α/STAT3/NF-κB signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol，2024，322：117577.

[18] 刘毓，杨钊田，孙理军. 基于 TLR4、NF-κB 信号通路探讨当归拈痛汤治疗痛风性关节炎的作用机制[J]. 中南药学，2023，21（10）：2606-2615.

[19] He SM，Jiang XH，Yang J，et al. Nicotinamide mononucleotide alleviates endotoxin-induced acute lung injury by modulating macrophage polarization via the SIRT1/NF-κB pathway [J]. Pharm Biol，2024，62（1）：22-32.

[20] 陈晨晨，宋丹，宋纯东，等. 基于 NOD2/NF-κB 通路研究雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠的影响[J]. 中医学报，2023，38（10）：2162-2167.

[21] Yang YQ，Yan XT，Wang K，et al. Triptriolide alleviates lipopolysaccharide-induced liver injury by Nrf2 and NF-κB signaling pathways [J]. Front Pharmacol，2018，9：999.

[22] Tanase DM，Gosav EM，Anton MI，et al. Oxidative stress and NRF2/KEAP1/ARE pathway in diabetic kidney disease（DKD）：new perspectives [J]. Biomolecules，2022，12（9）：1227.

[23] Stenvinkel P，Chertow GM，Devarajan P，et al. Chronic inflammation in chronic kidney disease progression：role of Nrf2 [J]. Kidney Int Rep，2021，6（7）：1775-1787.

[24] Younis NS，Ghanim A. The protective role of celastrol in renal ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2/HO-1，PI3K/AKT signaling pathways，modulating NF-κB signaling pathways，and inhibiting ERK phosphorylation [J]. Cell Biochem Biophys，2022，80（1）：191-202.

[25] Gao W，Guo L，Yang Y，et al. Dissecting the crosstalk between Nrf2 and NF-κB response pathways in drug-induced toxicity [J]. Front Cell Dev Biol，2022，9：809952.

（收稿日期：2023-12-13；修回日期：2024-01-25）

处方和工艺对盐酸美金刚片含量均匀度的影响

肖颖，黄引，钟莹，蔡国伟，王健松*（广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂/ 广东省化学药原料与制剂关键技术研究企业重点实验室，广州 510515）

摘要：目的 研究处方中的辅料及工艺对盐酸美金刚片含量均匀度的影响。**方法** 采用粉末直接压片工艺，通过单因素试验，考察处方中填充剂种类及型号、混合工艺对含量均匀度的影响。**结果** 盐酸美金刚与5倍量的硅化微晶纤维素90加入混合机中预混10 min，再加入剩余的物料，8 r • min^{-1} 混合 30 min，能实现最佳的含量均匀度。**结论** 本研究筛选出了适合粉末直压工艺填充剂硅化微晶纤维素 90，考察了混合工艺，优选了 2 次混合法，获得了良好含量均匀度。

关键词：盐酸美金刚片；直接压片；含量均匀度

中图分类号：R927，R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0668-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.018

Effect of prescription technology on the content uniformity of memantine hydrochloride tablets

XIAO Ying, HUANG Yin, ZHONG Ying, CAI Guo-wei, WANG Jian-song* (*Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Baiyunshan Pharmaceutical General Factory/Guangdong Provincial Key Laboratory for Key Technologies of Chemical Pharmaceutical Raw Materials and Preparations*, *Guangzhou* 510515)

Abstract: Objective To determine the effect of excipients and prescriptions technology on the content uniformity of memantine hydrochloride tablets. **Methods** The effect of types, models of fillers, and mixing process on the content uniformity was determined by single factor experiments by direct powder compression. **Results** The optimal process with the best content uniformity was to pre-mix memantine hydrochloride with 5 times of silicified microcrystalline cellulose 90 for 10 min, and then adding the remaining materials, mixing for 30 min at 8 r • min^{-1}. **Conclusion** This study silicified microcrystalline cellulose 90 as a filler and two-step mixing method, help achieve good content uniformity.

Key words: memantine hydrochloride tablet; direct tablet pressing; content uniformity

盐酸美金刚（memantine hydrochloride）由德国 Merz 公司研发[1]，1989 年正式在德国上市，为最新一代对帕金森综合征、中枢性强直症和痴呆综合征有显著疗效的药物，被美国 FDA 及欧盟批准为治疗中重度至重度阿尔茨海默病的首选有效药物。它是一种非竞争性的 *N*- 甲基 -D- 天冬氨酸（NMDA）受体拮抗剂[2-4]，通过作用于 NMDA 受体而改善神经信号的传递，延缓兴奋性神经递质谷氨酸盐的释放，从而增强脑记忆功能。文献报道的盐酸美金刚的剂型主要为缓释片[5-6]，缓释胶囊[7]，缓释微丸[8-10]和口崩片[11]。盐酸美金刚片的规格为 10 mg，规格小。粉末直接压片工艺简单易行，节能且高效，但辅料差异、工艺不适均会一定程度上导致物料分层，影响含量均匀度，进而对产品质量产生影响[12]，尤其对小规格的制剂。

本研究中片重参考参比制剂拟订为 0.24 g，原料在片剂中占比约 4.2%。本研究主要采用粉末直接压片工艺制备盐酸美金刚片，考察处方工艺对小剂量药物含量均匀度的影响。

基金项目：广东省粤澳科技创新联合资助项目（No.2021A0505080010）。

作者简介：肖颖，女，硕士，高级工程师，主要从事药物研发，email：xiaoy@byszc.com *通信作者：王健松，男，博士，正高级工程师，主要从事药物研发，email：wangjs@byszc.com

1 仪器与试药

1.1 仪器

电子天平（日本 AND，型号：GF-300，感量：1 mg）；电子计重秤（广州市中兴电子衡器厂，型号：ACS-6）；实验室料斗混合机（浙江小伦制药机械有限公司，型号：HLS-50）；旋转式压片机（上海天祥健台制药机械有限公司，型号：ZPS008）；高效包衣机（浙江小伦制药机械有限公司，型号：BGB-10C），气相色谱仪（美国安捷伦，型号：GC 7890A/GC 7890B），MSX（SGEA）分析天平（感量：0.001 mg）、CPA 225D 分析天平（感量：0.01 mg）（德国赛多利斯），GR-200 分析天平（日本 AND，感量：0.1 mg），Milli-Q 实验室超纯水系统（Merck Millipore 公司）。

1.2 试药

盐酸美金刚（广州白云山医药集团股份有限公司白云山化学制药厂，批号：MGB1601001，湿品含量：100.5%），微晶纤维素 102（JRS，批号：5610251409），微晶纤维素 302（日本旭化成，批号：62B3），微晶纤维素 12（JRS，批号：6601241132），硅化微晶纤维素 50（JRS，批号：P5S3074X），硅化微晶纤维素 90（JRS，批号：P9S3428），微粉硅胶（EVONIK，批号：153030914），滑石粉（广西龙胜华美滑石开发有限公司，批号：1703074），硬脂酸镁（贵州省桐梓县彩王辅料有限公司，批号：20170602），盐酸美金刚对照品（USP，批号：R044E0，含量：99.3%），盐酸金刚烷胺对照品（TRC，批号：5-BLL-53-1，含量：98%），氢氧化钠（分析纯，广州化学试剂厂），正庚烷（色谱纯，美国 Merck 公司）。

2 方法与结果

2.1 片剂的制备

先将原、辅料过 80 目筛；原料与部分填充剂加入混合机中预混；再加入剩余的物料，进行第二次混合；将混合好的物料用高速压片机进行压片；然后包衣，包装即得成品。

2.2 色谱条件

安捷伦色谱柱 DB-5（30 m×0.32 mm，0.25 μm）；升温至 50 ℃，维持 2 min，20 ℃ • min^{-1} 升温至 140 ℃，再 30 ℃ • min^{-1} 升温至 200 ℃，维持 5 min；载气为氦气；进样口温度 210 ℃；氢火焰离子化检测器（FID）；检测器温度 300 ℃。

2.3 对照品溶液的配制

取盐酸美金刚对照品约 10 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解，再精密加入内标溶液（取盐酸金刚烷胺 500 mg，用水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 500 μg 的溶液）20 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 20 mL，振摇 5 min，待分层，取正庚烷层作为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的配制

取本品 1 片，置 100 mL 量瓶中，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解，再精密加入内标溶液（取盐酸金刚烷胺 500 mg，用水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 500 μg 的溶液）20 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 20 mL，振摇 5 min，待分层，取正庚烷层作为供试品溶液。

2.5 含量均匀度测定

参照美国药典含量测定[13]项下方法测定，按 A ＋ 2.2S 计算含量均匀度。

2.6 系统适用性试验

取对照品溶液连续进样 5 针，记录色谱图，主峰与内标物峰的分离度大于 2.0，拖尾因子均小于 2.0，主峰与内标物峰峰面积比值的 *RSD* 小于 2.0%。空白溶剂及空白辅料对检测均无干扰。色谱图见图 1。

2.7 专属性试验

① 取本品 1 片，置 100 mL 棕色量瓶中，加入 0.1 mol • L^{-1} 盐酸 5 mL，60 ℃水浴加热 4 h，用 0.1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液中和，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解，再精密加入内标溶液 20 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 20 mL，振摇 5 min，待分层，取正庚烷层作为酸破坏供试品溶液。② 取本品 1 片，置 100 mL 棕色量瓶中，加入 5 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 5 mL，室温放置 24 h，用 5 mol • L^{-1} 盐酸中和，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解，再精密加入内标溶液 20 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 20 mL，振摇 5 min，待分层，取正庚烷层作为碱破坏供试品溶液。③ 取本品 1 片，置 100 mL 棕色量瓶中，60 ℃加热 4 h，取出，放冷，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解，再精密加入内标溶液 20 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 20 mL，振摇 5 min，待分层，取正庚烷层作为高温破坏供试品溶液。④ 取本品 1 片，置 100 mL 棕色量瓶中，加入 30% 过氧化氢 5 mL，室温放置 4 h，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解，再精密加入内标溶液 20 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 20 mL，振摇 5 min，待分层，取正庚烷层作为氧化破坏供试品溶液。⑤ 取本品 1 片，置 100

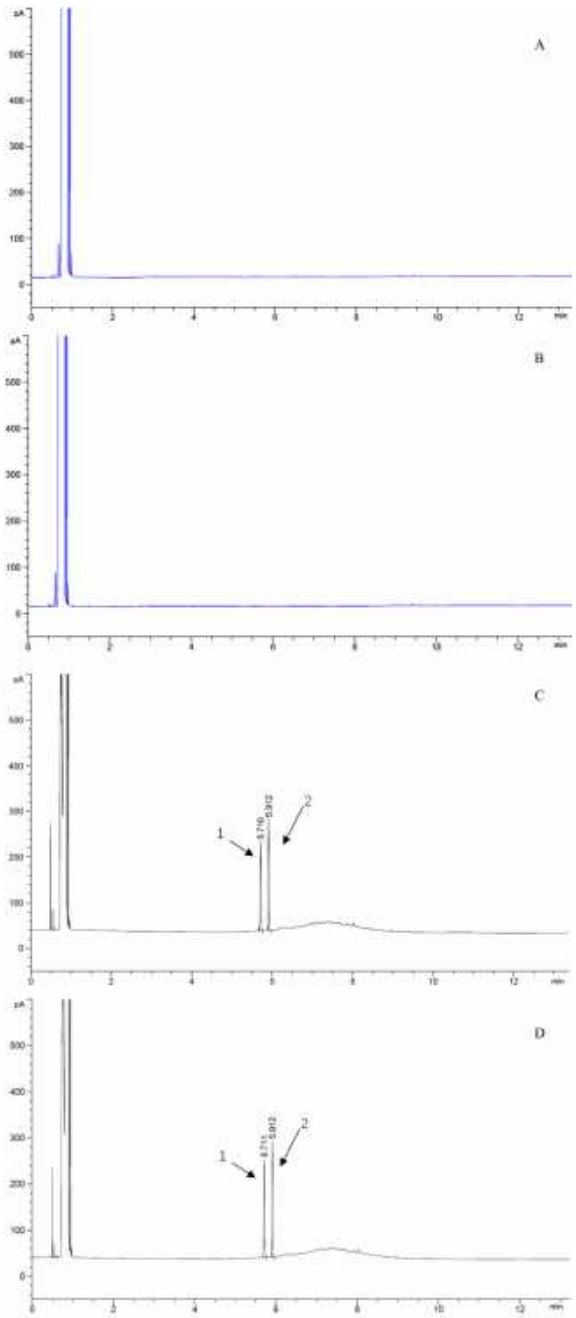


图 1 盐酸美金刚含量测定系统适用性色谱图

Fig 1 Chromatograms of system suitability for memantine hydrochloride tablet

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 空白辅料（blank excipient）；C. 对照品溶液（reference solution）；D. 供试品溶液（test solution）；1. 金刚烷胺（内标）[amantadine（internal standard）]；2. 美金刚（memantine）

mL 透明量瓶中，在 5000 lx 条件放置 20 d，取出，放冷，加 1 mol•L^{-1} 氢氧化钠溶液 20 mL 使溶解，再精密加入内标溶液 20 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 20 mL，振摇 5 min，待分层，取正庚烷层作为光照破坏供试品溶液。上述处理方法均平行配制空白对照溶液。将破坏后的样品溶液和空白对照溶液分别进行测定，色谱图见图 2。盐酸美金刚在酸、碱、高温、氧化和光照破坏条件下稳定性均良好，产生的极少量降解产物与主峰和内标物峰均能达到良好的分离，空白对照无干扰，说明该方法专属性良好。

2.8 线性关系考察

以主峰浓度为横坐标（x），主峰峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标（y）作回归曲线，结果盐酸美金刚的线性方程为 $y = 2.4333x - 0.0002$，线性范围为 0.0115 ～ 0.92338 mg•mL^{-1}，r 为 1.0000。

2.9 定量限和检测限

精密量取“2.3”项下对照品溶液适量，用正庚烷稀释制成合适浓度的溶液作为定量限和检测限试验溶液。按信噪比（*S/N*）10∶1 计算定量限，按 *S/N* 3∶1 计算检测限。结果定量限为 2 μg • mL^{-1}，检测限为 0.5 μg • mL^{-1}。

2.10 准确度

取本品 9 份，每份各 1 片，平均分成 3 组，分别置于 200 mL 量瓶中，每组分别加入精密盐酸美金刚原料 8、10 和 12 mg，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 40 mL 使溶解，再精密加入内标溶液 40 mL，振摇 1 min，再精密加入正庚烷 40 mL，振摇 5 min，待分层，分别取正庚烷层作为 80%、100%、120% 的溶液，按“2.2”项下条件测定主成分的含量，计算回收率。结果显示，美金刚的平均回收率在 98.3% ～ 104.2%，*RSD* ＜ 2.0%。

2.11 重复性试验

取同一批盐酸美金刚片，照“2.4”项下方法配制 6 份供试品溶液，进样测定，按内标法计算样品含量，结果 6 份样品的平均含量为 100.5%，*RSD* 为 1.2%，表明方法重复性良好。

2.12 稳定性试验

样品溶液在 4 ℃条件下，分别于 0、2、4、8、10、24 h 进样，各时间点主峰峰面积与内标峰面积的比值与 0 h 比较，回收率在 99.6% ～ 100.6%，结果表明样品溶液在 4 ℃条件下放置 24 h 稳定。

2.13 处方对含量均匀度的影响

2.13.1 处方研究 在粉末直接压片工艺中，辅料的种类、型号以及配比等均对混合均匀性及含量均匀度有很大的影响，尤其是填充剂和润滑剂。本研究采用单因素法考察不同种类、型号的填充剂，不同种类的润滑剂对含量均匀度的影响，结果显示填充剂为硅化微晶纤维素 90 和 50 均能使本品的含量均匀度符合要求，填充剂为硅化微晶纤维素 90，润滑剂为硬脂酸镁和滑石粉等比应用时含量均匀度最优，具体结果见表 1。

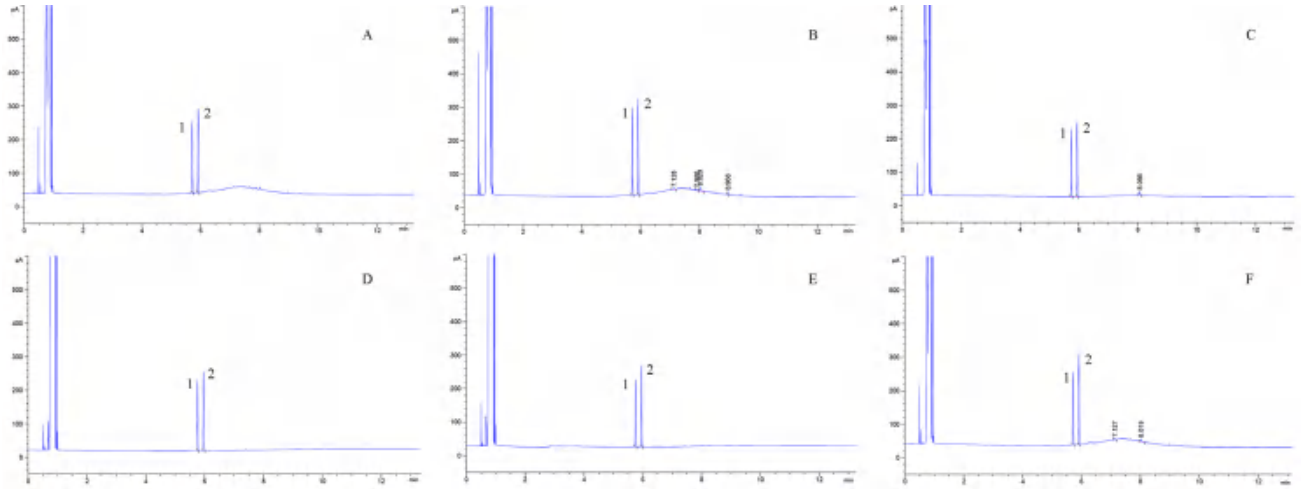


图 2　专属性试验色谱图

Fig 2　Chromatograms of specificity test

A. 未破坏（undestroyed）；B. 高温破坏（high temperature degradation）；C. 光照破坏（illumination degradation）；D. 碱破坏（alkaline degradation）；E. 酸破坏（acid degradation）；F. 氧化破坏（oxidative degradation）；1. 金刚烷胺（内标）[amantadine（internal standard）]；2. 美金刚（memantine）

表 1　盐酸美金刚片处方对含量均匀度的影响

Tab 1　Effect of prescription on content uniformity of memantine hydrochloride tablet

处方（1000 片）	用量 /g										含量均匀度（A＋2.2S≤15.0）
	盐酸美金刚	微晶纤维素 102	微晶纤维素 302	微晶纤维素 12	硅化微晶纤维素 50	硅化微晶纤维素 90	交联羧甲基纤维素钠	微粉硅胶	滑石粉	硬脂酸镁	
T1	10	210.8	—	—	—	—	9.6	4.8	2.4	2.4	15.7
T2	10	—	210.8	—	—	—	9.6	4.8	2.4	2.4	17.2
T3	10	—	—	210.8	—	—	9.6	4.8	2.4	2.4	17.8
T4	10	210.8	—	—	—	—	10.2	—	2.4	2.4	15.9
T5	10	—	—	—	—	215	10.2	—	2.4	2.4	6.3
T6	10	—	—	—	215	—	10.2	—	2.4	2.4	12.8

2.13.2　最优处方　经上述考察后，确定最优处方见表 2。

表 2　盐酸美金刚片最优处方

Tab 2　Optimal prescription of memantine hydrochloride tablet

处方（1000 片）	用量 /g	作用
盐酸美金刚	10	主成分
硅化微晶纤维素 90	215	填充剂
交联羧甲基纤维素钠	10.2	崩解剂
滑石粉	2.4	润滑剂
硬脂酸镁	2.4	润滑剂

2.14　工艺对含量均匀度的影响

2.14.1　混合次数、时间的考察　混合次数和时间均能影响混合均匀性，从而影响片剂的含量均匀度。本研究在固定物料的加入量及混合转速 8 $r \cdot min^{-1}$ 的前提下考察混合次数及混合时间的影响，结果见表 3。混合时间和混合次数均对含量均匀度有一定的影响，总混合时间同为 40 min，混合 2 次和混合 3 次，混粉压片后含量均匀度指标 A ＋ 2.2S ≤ 15.0，符合要求。但混合次数为 2 次，第一次时间 10 min，第二次时间为 30 min 的含量均匀度指标最好，且节省工序。

表 3　混合次数、时间对盐酸美金刚片含量均匀度的影响

Tab 3　Effect of mixing times and time on content uniformity of memantine hydrochloride tablet

混合工艺	第 1 次混合时间 /min	第 2 次混合时间 /min	第 3 次混合时间 /min	含量均匀度标准（A＋2.2S≤15.0）
工艺 1	5	10	20	15.6
工艺 2	10	10	20	13.5
工艺 3	10	20	20	16.2
工艺 4	10	30	0	7.1

2.14.2　物料加入方式的考察　物料的加入方式对混合有一定的影响。本研究固定混合次数为 2 次，考察最多物料硅化微晶纤维素的加入顺序及加入量，结果见表 4。第一次混合物料的加入量直接影响混合均匀性，以 5 倍量为最佳，混粉压出的片剂含量均匀度最好。

表 4 物料加入方式对盐酸美金刚片含量均匀度的影响

Tab 4 Effect of material addition methods on content uniformity of memantine hydrochloride tablet

混合工艺	第 1 次混合填充剂加入量（原料的倍数）	第 2 次混合填充剂加入量	含量均匀度标准（A＋2.2S≤15.0）
工艺 1	3	剩余量	13.8
工艺 2	5	剩余量	7.1
工艺 3	8	剩余量	15.9
工艺 4	10	剩余量	16.5

2.15 优选的工艺

本品最终优选的工艺为粉末直接压片工艺：盐酸美金刚与 5 倍量的硅化微晶纤维素 90 加入混合机中预混 10 min；再加入剩余的物料，混合 30 min，2 次混合的转速均为 8 r • min^{-1}；混合好的物料用高速压片机进行压片。

2.16 处方工艺的重现性

采用优选的处方工艺进行了 3 批处方工艺重现性试制，含量均匀度结果均符合要求，见表 5。

表 5 盐酸美金刚片处方工艺重现性结果

Tab 5 Reproducibility of prescription process of memantine hydrochloride tablet

批号	批量 / 片	含量均匀度标准（A ＋ 2.2S ≤ 15.0）
180301	10 000	6.3
180302	10 000	7.1
180303	10 000	6.7

3 讨论

混合和压片是化学药物口服固体制剂生产工艺的关键工艺步骤，如何使混合物料的混合均匀度和中控剂量单位均匀度满足生产需求，确保每个单位剂量的物料中含有均等的活性物质，是实现成品含量均匀的前提。

盐酸美金刚片中主成分占比小于 5%，混合不均匀的风险高，将直接影响成品的含量均匀度，目前国内尚无关于盐酸美金刚片含量均匀度方面的文献报道。本研究对粉末直接压片工艺中影响含量均匀度的处方和混合工艺参数进行系统的研究，优选出填充剂的种类、型号，润滑剂的种类以及混合工艺参数，通过精准把控预混填充剂的量以及混合的时间，解决了小剂量药物，尤其是药物含量在 5% 以下的药物直接压片时存在的含量均匀度的问题。

研究中还发现硅化微晶纤维素 90 作为填充剂能显著改善小规格片剂的含量均匀度，其在粉末直接压片工艺中显示出良好的流动性、混合性能和可压性，与其他填充剂相比，更有利于提高小规格片剂的含量均匀度，可能源于它是通过喷雾干燥使粒子由短棒状变为更利于流动的类圆形颗粒从而可以提高其流动性能。

本研究优选出的二次混合工艺操作简单，能获得良好的成品含量均匀度，且相对于传统的等量递增混合方法，省时省力，易于实现产业化大生产。本研究中优选的处方工艺生产出的制剂中盐酸美金刚的含量均匀度 A ＋ 2.2S 值小于 8，与市售的原研产品——丹麦灵北制药的盐酸美金刚片（易倍申）的含量均匀度（研究测得 A ＋ 2.2S 为 9.1）相当甚至更优，且处方组成更加简单，避免了其他辅料可能对主药产生的不良影响，为含量均匀度的研究提供了一些新的参考和思路。

参考文献

[1] Farlow MR. NMDA receptor antagonists. A new therapeutic approach for Alzheimer’s disease [J]. Geratrics，2004，59（6）：22-31.

[2] 郭杰，伍忆，梁伟，等 . HPLC 测定盐酸美金刚片的含量和溶出度 [J]. 广东化工，2022，49（14）：174-176.

[3] 张靖 . 顶空毛细管气相色谱法测定盐酸美金刚中有机溶剂的残留量 [J]. 海峡药学，2021，33（3）：82-84.

[4] 黄引，蔡国伟，钟莹，等 . HPLC-MS 法检测盐酸美金刚片中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的含量 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1407-1411.

[5] 潘裕生，张金梁，崔梦锁，等 . 盐酸美金刚缓释片的制备及其药物释放影响因素考察 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1449-1454.

[6] 谢向阳，李旸，李银科，等 . 盐酸美金刚缓释片的制备及其体外释放度考察 [J]. 西北药学杂志，2014，29（2）：177-180.

[7] 曹莹，王文萍，王华伟，等 . 盐酸美金刚缓释胶囊在中国健康受试者的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2023，39（9）：1302-1306.

[8] 李正刚，杨俊，谢俊，等 . 星点设计 - 效应面法优化盐酸美金刚缓释微丸处方 [J]. 药学与临床研究，2017，25（3）：190-194.

[9] 顾琼艳，吴美媛 . 盐酸美金刚缓释微丸的制备及体外释放度考察 [J]. 中国药师，2015，18（2）：233-237.

[10] 王健松，肖颖，席龙，等 . Box-Behnken 效应面法优化盐酸美金刚缓释微丸处方工艺 [J]. 中国药师，2017，20（5）：837-841.

[11] 姚西玲 . 盐酸美金刚口腔崩解片的制备 [J]. 齐鲁药事，2011，30（8）：440-441.

[12] Augsburger LL，Hoag SW. Pharmaceutical dosage forms-tablets [M]. 3rd ed. New York：Informa Healthcare USA，Inc.，2008.

[13] 美国药典委员会 . 美国药典：USP 40 [S]. 2016：5000-5003.

（收稿日期：2023-08-03；修回日期：2023-10-16）

大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠重复给药的毒性研究

杨鹏飞[1]，吴梦瑶[2*]，邓友田[1]，卢素云[1]，白璐[2]，赵毅[2]，王志远[1]，蒋飞荣[1]，陈磊[1]，龚云[2]，左之文[2]，魏云[1]，黄魏[3]，刘翔[4*]（1. 湖南安生美药物研究院有限公司，长沙　410125；2. 株洲千金药业股份有限公司，湖南　株洲　412003；3. 湖南师范大学医学院，长沙　410205；4. 湖南省药品审核查验中心，长沙　410001）

摘要：目的　观察 SD 大鼠连续 3 个月经口灌服不同剂量大叶千斤拔干膏粉和蔓性千斤拔干膏粉的毒性反应与差异，为临床用药提供参考。**方法**　选用检疫合格的 SD 大鼠 150 只，雌雄各半，按性别、体重随机分为空白对照组，大叶千斤拔低、高剂量组（7.6、61.0 g 生药 • kg^{-1}），蔓性千斤拔低、高剂量组（6.9、60.6 g 生药 • kg^{-1}），共 5 组，每组 30 只动物，各给药组按 10 mL • kg^{-1} 灌胃给药，每日一次，连续 90 d（3 个月）。给药期末及恢复期末分别观测各组动物的体重、摄食量、血液学、血液生化、凝血、尿液及组织病变情况。**结果**　与同期空白对照组比较，大叶千斤拔和蔓性千斤拔各剂量组动物体重、摄食量、血常规、血液生化、凝血、尿液指标及组织病理学检查均未见与药物相关的毒理学异常。SD 大鼠经口灌服千斤拔 3 个月，大叶千斤拔和蔓性千斤拔未见明显毒性反应剂量（NOAEL）分别为 61.0 g 生药 • kg^{-1}（相当于成人临床拟用剂量的 22.6 ～ 67.8 倍）、60.6 g 生药 • kg^{-1}（相当于成人临床拟用剂量的 22.4 ～ 67.3 倍）。**结论**　大叶千斤拔和蔓性千斤拔安全性较好。

关键词：大叶千斤拔；蔓性千斤拔；重复给药毒性；未见明显毒性反应剂量；大鼠
中图分类号：R965　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0673-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.019

Toxicity of repeated dose of *Flemingia macrophylla* (Willd.) Prain and *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe in rats

YANG Peng-fei[1], WU Meng-yao[2*], DENG You-tian[1], LU Su-yun[1], BAI Lu[2], ZHAO Yi[2], WANG Zhi-yuan[1], JIANG Fei-rong[1], CHEN Lei[1], GONG Yun[2], ZUO Zhi-wen[2], WEI Yun[1], HUANG Wei[3], LIU Xiang[4*] (1. *Hunan Anshengmei Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd.*, *Changsha* 410125; 2. *Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd.*, *Zhuzhou Hunan* 412003; 3. *College of Medicine*, *Hunan Normal University*, *Changsha* 410205; 4. *Hunan Drug Inspection Center*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To observe the toxic reactions and differences in SD rats after oral administration of different doses of *Flemingia macrophylla* (Willd.) Prain *and Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe extract for 3 months, and to provide reference for clinical medication. **Methods** Totally 150 SD rats (75 males and 75 females) were randomly divided into 5 groups based on gender and body weight: a control group, a low-and a high-dose group of *Flemingia macrophylla* (Willd.) Prain (7.6 and 61.0 g crude drug • kg^{-1}), and a low-and a high-dose group of *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe (6.9 and 60.6 g crude drug • kg^{-1}), with 30 rats in each group. Rats in each treatment group were given 10 mL • kg^{-1} orally once daily for 90 consecutive days. The body weight, food intake, hematology, blood biochemistry, blood coagulation, urine and histopathology were examined at the end of the administration and the end of the recovery. **Results** Compared with the control group in the same period, the body weight, food intake, hematology, blood biochemistry, blood coagulation, urine and histopathology did not show any toxicity related to drugs. Under the conditions of this experiment, SD rats were orally administered *Flemingia macrophylla* (Willd.)

基金项目：湖南省科药联合基金（No.S2022JJ80054）。
作者简介：杨鹏飞，男，硕士，主要从事中药药理及毒理研究，email：hnayypf@126.com　*通信作者：吴梦瑶，女，硕士，主要从事中药药理研究，email：wmyao1995@qq.com；刘翔，男，硕士，主要从事中药质量控制，email：79775121@qq.com

Prain and *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe for 3 months, and the no observed adverse effect level (NOAEL) of *Flemingia macrophylla* (Willd.) Prain was 61.0 g crude drug • kg^{-1} (equivalent to 22.6 ～ 67.8 times that of adult dose). The NOAEL dose of the *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe was 60.6 g crude drug • kg^{-1} (equivalent to 22.4 ～ 67.3 times that of adult dose). **Conclusion** *Flemingia macrophylla* (Willd.) Prain and *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe are safe.

Key words: *Flemingia macrophylla* (Willd.) Prain; *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe; repeated dose toxicity; NOAEL; rat

千斤拔为豆科千斤拔属植物蔓性千斤拔（*Flemingia philippinensis* Merr.et Rolfe）、大叶千斤拔 [*Flemingia macrophylla*（Willd.）Prain] 或锈毛千斤拔（*Flemingia ferruginea Grah*. ex Wall）的干燥根，功能主治为祛风利湿、强筋壮骨、活血解毒 [1-2]。现代药理研究表明，千斤拔具有抗炎镇痛、保肝、抗氧化、抑制血栓形成和抗疲劳等作用 [3-4]。目前，大叶千斤拔和蔓性千斤拔作为千斤拔药材的主要基原，广泛用于妇科炎症、风湿痹痛、四肢痿软等疾病的治疗 [5]。前期研究表明，大叶千斤拔的给药剂量为 160.1 g 生药 • kg^{-1} 时，昆明种小鼠体重增长正常，未见明显毒副作用 [6]；饶伟文等 [7] 采用昆明种小鼠比较了蔓性千斤拔、大叶千斤拔、宽叶千斤拔水煎液的急性毒性作用，发现 3 种千斤拔均属于无毒类中草药，且三者所含成分大致相似，药理作用无明显差异，认为可等同入药。近年来千斤拔的肾脏毒性引起了广泛的社会关注，但尚未见千斤拔的重复给药毒性研究的相关报道。鉴于千斤拔的广泛应用，本研究采用 SD 大鼠开展大叶千斤拔和蔓性千斤拔 3 个月重复给药毒性研究，并重点关注其是否具有肝肾毒性，以期为大叶千斤拔和蔓性千斤拔的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 试药

大叶千斤拔干膏粉（25.4 g 生药 • g^{-1}，批号：ZS20210501），蔓性千斤拔干膏粉（17.3 g 生药 • g^{-1}，批号：ZS20210601），大叶千斤拔和蔓性千斤拔临床拟用剂量（生药量）均为 10 ～ 30 g 生药 • d^{-1}（株洲千金药业股份有限公司）。大鼠肾损伤分子 1（Kim-1）ELISA 试剂盒（江苏晶美生物科技有限公司），大鼠尿微量白蛋白（MAU/ALB）与 β2 微球蛋白（β2-MG）ELISA 检测试剂盒（上海源桔生物科技中心），尿蛋白（UTP）定量测定试剂盒（CBB 法）（南京建成生物工程研究所）。血液学检测所需试剂（深圳市帝迈生物技术有限公司）；活化部分凝血活酶时间（PT）、凝血酶原时间（TT）测定试剂盒（上海长岛生物技术有限公司）；血液生化相关指标测定试剂盒（深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司）；电解质测定试剂（梅州康立高科技有限公司）；动物尿试纸条（桂林优利特医疗电子有限公司）。

1.2 仪器

BC-5000 Vet 兽用全自动血液细胞分析仪、BS-430 型全自动生化分析仪（深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司）；C3100 型全自动凝血分析仪（北京普利生仪器有限公司）；URIT-150Vet 型动物尿液分析仪（桂林优利特医疗电子有限公司）；DNM-9606 型酶标分析仪（北京普朗新技术有限公司）；TU-1810 型紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）。

1.3 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 150 只，雌雄各半，体重 180 ～ 220 g [实验动物质量合格证号：No.43072-7211101475728，湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（湘）2019-0004]，饲养于湖南安生美药物研究院有限公司屏障环境中 [实验动物使用许可证号：SYXK（湘）2018-0004]，本研究由湖南安生美药物研究院有限公司实验动物管理（伦理）委员会审查、批准后实施（伦理审批号：IACUC-2021010CTS2）。

2 方法 [8]

SD 大鼠适应性喂养后，按性别、体重随机分为 5 组，每组 30 只。大叶千斤拔高（0.24 g 干膏粉 • mL^{-1}，61.0 生药 • kg^{-1}）、低剂量组（0.03 g 干膏粉 • mL^{-1}，7.6 g 生药 • kg^{-1}），分别约相当于成人临床拟用剂量的 22.6 ～ 67.8、2.8 ～ 8.4 倍（按体表面积换算成大鼠等效剂量为 0.90 ～ 2.70 g 生药 • kg^{-1}）；蔓性千斤拔高（0.35 g 干膏粉 • mL^{-1}，60.6 生药 • kg^{-1}）、低剂量组（0.04 g 干膏粉 • mL^{-1}，6.9 g 生药 • kg^{-1}），分别约相当于成人临床拟用剂量的 22.4 ～ 67.3、2.6 ～ 7.7 倍（按体表面积换算成大鼠等效剂量为 0.90 ～ 2.70 g 生药 • kg^{-1}），同时设空白对照组（纯水），各组均按 10 mL • kg^{-1} 灌胃给予相应药物，每日 1 次，连续给药 91 d。每周对大鼠称量一次体重；每笼每周 3 ～ 4 d（每周 2 次）添加

一定量的饲料并做好相应记录，每周称量记录一次剩余饲料量，每周计算一次摄食量。在给药第 13 周及恢复期第 4 周对大鼠进行尿常规及尿液生化检查；给药期末（第 13 周末）及恢复期末（第 17 周末）解剖大鼠并进行指标检测（包括血液学、凝血、血液生化及电解质等）。

统计学分析选用 SPSS 23.0 软件，计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，系统解剖及组织病理学采用定性指标判断结果。计量资料进行正态性和方差齐性检验，如果满足正态性，用单因素方差分析（ANOVA）进行统计分析，并根据方差齐性情况选用 LSD ＋ Dunnet（方差齐）或 Tamhane’s T_2（方差不齐）进行比较分析。如果不满足正态性（$P < 0.05$），则用 Kruskal-Wallis 检验，并用 Mann-Whitney 检验进行两两比较分析。以 $\alpha = 0.05$，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义，评价时考虑其生物学意义。

3　结果

3.1　检测指标

3.1.1　体重与摄食量　每周称量并记录一次大鼠体重与摄食量。给药期间及恢复期间，所有动物的外观体征、行为活动、各腔道分泌物、排泄物及动物的一般状况等未发现明显异常。与同期空白对照组比较，大叶千斤拔和蔓性千斤拔各剂量组大鼠体重、平均摄食量均未见明显差异（见图 1）。

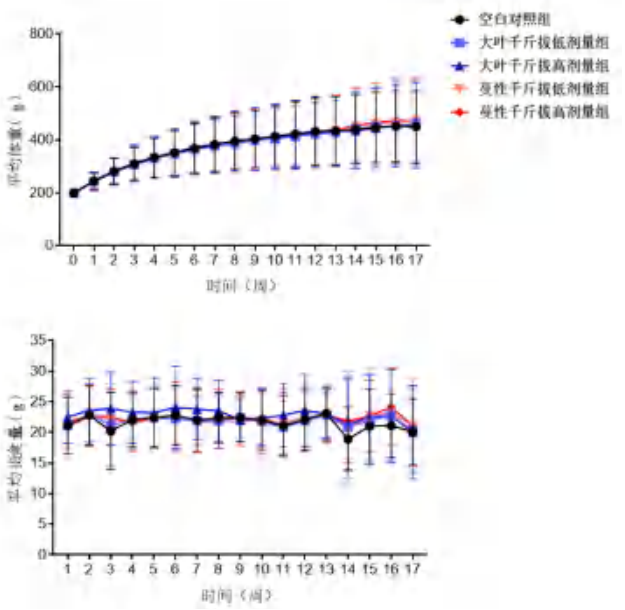


图 1　大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠平均体重与摄食量的影响

Fig 1　Effect of *Flemingia macrophylla* and *Flemingia pedunculata* on average body weight and food intake of rats

3.1.2　血液学和凝血　给药期末及恢复期末按照仪器操作要求和试剂盒说明书，检测各组动物的血液学和凝血指标。与同期空白对照组比较，给药期末大叶千斤拔和蔓性千斤拔各剂量组大鼠血液学指标和凝血指标差异均未见统计学意义（见表 1 和表 2）。

表 1　大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠血液学的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of *Flemingia macrophylla* and *Flemingia pedunculata* on hematology of rats ($\bar{x}\pm s$)

阶段	组别	白细胞数（WBC）/（$\times10^9\cdot L^{-1}$）	红细胞数（RBC）/（$\times10^{12}\cdot L^{-1}$）	血红蛋白（HGB）/（$g\cdot L^{-1}$）	红细胞压积（HCT）/%	血小板计数（PLT）/（$\times10^9\cdot L^{-1}$）	网织红细胞计数（RET）/%
给药期末	空白对照组	7.81±3.15	7.23±0.40	148±7	36.5±1.7	758±63	4.75±0.92
（$n = 20$）	大叶千斤拔低剂量组	8.62±3.36	7.32±0.46	147±6	36.4±1.2	750±87	4.33±0.91
	大叶千斤拔高剂量组	7.81±2.76	7.12±0.51	144±9	35.8±2.2	799±69	4.39±0.89
	蔓性千斤拔低剂量组	7.80±3.83	7.39±0.61	149±11	37.0±2.3	728±61	5.35±0.61
	蔓性千斤拔高剂量组	6.30±1.85	7.28±0.48	146±7	36.3±1.5	766±60	5.41±0.59
恢复期末	空白对照组	8.97±4.07	7.18±0.47	144±7	35.2±1.4	805±99	3.34±0.79
（$n = 10$）	大叶千斤拔低剂量组	7.05±3.78	7.34±0.47	146±6	35.6±1.6	764±115	3.27±1.01
	大叶千斤拔高剂量组	7.38±3.29	7.15±0.31	145±6	35.6±1.5	736±69	3.03±0.89
	蔓性千斤拔低剂量组	7.29±3.63	7.40±0.37	148±8	36.3±2.1	735±57	3.16±0.78
	蔓性千斤拔高剂量组	6.26±2.53	7.45±0.55	150±8	36.5±1.9	702±61	3.64±0.51

3.1.3　血液生化和电解质　给药期末及恢复期末按照仪器设备操作要求和试剂盒说明书，检测各组动物的血液生化和电解质指标。与同期空白对照组比较，大叶千斤拔和蔓性千斤拔各剂量组大鼠肝功能、肾功能以及糖脂代谢相关血清生化指标差异均未见统计学意义（见表 3）；钾、钠、氯离子等电解质指标差异亦未见统计学意义（见表 4）。

3.1.4　尿常规和尿液生化　给药期末及恢复期末按照仪器操作要求和试剂盒说明书，检测各组动物的尿常规和尿液生化指标。与同期空白对照组比较，给药期末蔓性千斤拔高剂量组大鼠尿常规指标蛋白质（PRO）（赋值）增加（$P < 0.05$）、尿比重（SG）降低（$P < 0.05$），各剂量组大鼠其余尿常规指标 [葡萄糖（GLU）、隐血（BLD）] 和尿液生化指标差异均未见统计学意义（见表 5 和表 6）。

3.2　组织病理学检查

给药期末及恢复期末对心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃肠道、生殖器官等主要脏器进行

表 2 大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠凝血指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of *Flemingia macrophylla* and *Flemingia pedunculata* on the coagulation indexes in rats ($\bar{x}\pm s$)

阶段	组别	APTT/s	PT/s
给药期末	空白对照组	23.95±3.33	13.22±1.32
(n = 20)	大叶千斤拔低剂量组	22.04±3.30	13.26±1.45
	大叶千斤拔高剂量组	23.55±3.89	13.05±0.99
	蔓性千斤拔低剂量组	24.56±2.96	13.14±1.04
	蔓性千斤拔高剂量组	22.92±3.01	13.30±1.10
恢复期末	空白对照组	22.20±4.43	13.30±2.33
(n = 10)	大叶千斤拔低剂量组	24.08±3.91	12.37±1.11
	大叶千斤拔高剂量组	24.24±2.13	12.67±0.79
	蔓性千斤拔低剂量组	23.98±4.99	12.99±1.04
	蔓性千斤拔高剂量组	23.29±3.15	12.82±0.68

常规固定、包埋、切片、染色及镜检，病变结果以病变样本数 / 总样本数表示。给药期末及恢复期末空白对照组，大叶千斤拔低、高剂量组，蔓性千斤拔低、高剂量组解剖的动物脏器表面与切面颜色、大小、质地肉眼观察均未见明显改变。

3.2.1 肝脏主要病变 给药期末：肝脏局灶性小坏死灶（空白对照组：4/20，大叶千斤拔高剂量组：3/20，蔓性千斤拔高剂量组 2/20）；肝脏肝细胞空泡变性（空白对照组：3/20，大叶千斤拔高剂量组：3/20，蔓性千斤拔高剂量组 2/20）；恢复期末：肝脏局灶性小坏死灶（空白对照组：4/10，大叶千斤拔高剂量组：3/10，蔓性千斤拔高剂量组：2/10）；肝脏肝细胞空泡变性（空白对照组：2/10，大叶千斤拔高剂量组：1/10，蔓性千斤拔高剂量组：2/10）。

表 3 大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of *Flemingia macrophylla* and *Flemingia pedunculata* on the serum biochemical indexes of rats ($\bar{x}\pm s$)

阶段	组别	谷丙转氨酶（ALT）/（U·L^{-1}）	谷草转氨酶（AST）/（U·L^{-1}）	总蛋白（TP）/（g·L^{-1}）	白蛋白（ALB）/（g·L^{-1}）	肌酐（Cr）/（μmol·L^{-1}）
给药期末	空白对照组	36.5±7.6	90.4±17.9	63.1±4.9	36.3±3.1	38.8±6.2
(n = 20)	大叶千斤拔低剂量组	35.8±7.4	85.3±20.6	61.8±5.3	35.5±3.0	39.4±5.9
	大叶千斤拔高剂量组	33.1±8.3	90.2±24.6	60.6±3.4	34.8±1.6	37.6±5.1
	蔓性千斤拔低剂量组	40.1±11.7	104.5±29.0	64.2±6.3	36.7±3.2	40.8±5.7
	蔓性千斤拔高剂量组	36.0±8.8	90.7±22.2	62.4±3.8	35.9±2.0	39.5±5.5
恢复期末	空白对照组	41.3±14.9	109.8±42.5	64.1±7.6	37.4±3.9	38.9±5.7
(n = 10)	大叶千斤拔低剂量组	38.9±5.2	102.4±23.7	63.9±6.8	37.2±3.7	37.0±5.0
	大叶千斤拔高剂量组	35.7±9.8	100.1±25.6	64.2±5.9	36.8±3.4	37.2±5.3
	蔓性千斤拔低剂量组	38.5±3.4	94.1±12.9	61.7±3.8	35.3±2.3	34.7±3.9
	蔓性千斤拔高剂量组	35.9±7.6	100.1±21.2	63.5±4.4	36.9±2.3	37.0±4.1

阶段	组别	尿素氮（BUN）/（mmol·L^{-1}）	总胆固醇（CHO）/（mmol·L^{-1}）	葡萄糖（GLU）/（mmol·L^{-1}）	三酰甘油（TG）/（mmol·L^{-1}）
给药期末	空白对照组	6.74±1.21	1.90±0.43	8.16±1.93	0.78±0.22
(n = 20)	大叶千斤拔低剂量组	6.98±1.20	2.01±0.52	7.92±1.17	0.76±0.34
	大叶千斤拔高剂量组	6.33±1.18	1.89±0.46	7.68±1.76	0.89±0.33
	蔓性千斤拔低剂量组	6.63±1.16	1.96±0.49	7.36±1.61	0.64±0.22
	蔓性千斤拔高剂量组	6.65±1.77	1.85±0.38	7.39±1.36	0.79±0.26
恢复期末	空白对照组	5.99±1.02	2.45±1.05	7.97±0.99	0.97±0.30
(n = 10)	大叶千斤拔低剂量组	5.88±1.00	2.55±0.90	7.67±0.95	1.22±0.79
	大叶千斤拔高剂量组	5.92±1.02	2.13±0.60	7.62±1.41	0.96±0.41
	蔓性千斤拔低剂量组	5.84±0.87	1.99±0.50	7.27±0.81	0.88±0.23
	蔓性千斤拔高剂量组	5.45±0.77	2.08±0.43	6.83±1.03	0.89±0.26

3.2.2 心脏主要病变 给药期末：心脏心肌灶性炎症细胞浸润（空白对照组：1/20，大叶千斤拔高剂量组：0/20，蔓性千斤拔高剂量组 1/20）。恢复期末：动物心脏未出现病理性变化。

3.2.3 肾上腺和肾脏主要病变 给药期末：肾上腺皮质束状带细胞空泡变性（空白对照组：0/20，大叶千斤拔高剂量组：2/20，蔓性千斤拔高剂量组 1/20）；肾盂黏膜下层炎症细胞浸润（空白对照组：0/20，大叶千斤拔高剂量组：1/20，蔓性千斤拔高剂量组 1/20）。恢复期末：动物肾上腺和肾脏未出现病理性变化。

3.2.4 前列腺主要病变 给药期末：前列腺间质炎症细胞浸润（空白对照组：2/10，大叶千斤拔高剂量组：2/10，蔓性千斤拔高剂量组 0/10）。恢复期末：动物前列腺未出现病理性变化。

以上病变见图 2、3。各给药组动物主要脏器病变数与病变程度，与空白对照组比较，均未见与药物相关的病理改变，为动物的背景性病理改变。

4 讨论

千斤拔作为民间用药有着悠久的历史，被广泛应用于食疗及跌打损伤、风湿痹痛、慢性肾炎、

表 4　大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠电解质指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of *Flemingia macrophylla* and *Flemingia pedunculata* on the electrolyte indexes of rats ($\bar{x}\pm s$)

阶段	组别	K^+/（mmol・L^{-1}）	Na^+/（mmol・L^{-1}）	Cl^-/（mmol・L^{-1}）
给药期末（n = 20）	空白对照组	4.15±0.24	143.78±1.15	100.67±1.24
	大叶千斤拔低剂量组	4.19±0.28	144.27±0.88	101.45±1.56
	大叶千斤拔高剂量组	4.32±0.72	143.51±0.98	100.46±1.62
	蔓性千斤拔低剂量组	4.41±1.21	144.30±2.91	101.75±2.07
	蔓性千斤拔高剂量组	4.16±0.25	143.76±1.07	100.97±1.16
恢复期末（n = 10）	空白对照组	4.53±0.40	143.17±0.99	101.61±1.18
	大叶千斤拔低剂量组	4.48±0.37	142.67±0.75	101.28±0.66
	大叶千斤拔高剂量组	4.52±0.36	143.58±1.77	101.29±1.89
	蔓性千斤拔低剂量组	4.41±0.42	142.74±0.74	102.40±1.23
	蔓性千斤拔高剂量组	4.42±0.27	143.98±0.84	102.54±0.90

表 5　大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠尿常规指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Effect of *Flemingia macrophylla* and *Flemingia pedunculata* on the urine routine indexes of rats ($\bar{x}\pm s$)

阶段	组别	PRO 赋值	GLU 赋值	BLD 赋值	SG	pH
给药期末（n = 20）	空白对照组	2±1	1±0	1±1	1.014±0.004	7.9±0.3
	大叶千斤拔低剂量组	2±1	1±0	1±0	1.016±0.004	7.7±0.4
	大叶千斤拔高剂量组	2±1	1±0	1±1	1.014±0.004	7.8±0.3
	蔓性千斤拔低剂量组	2±1	1±0	1±1	1.016±0.004	7.8±0.4
	蔓性千斤拔高剂量组	2±1	1±0	1±1	1.016±0.005	7.6±0.4
恢复期末（n = 10）	空白对照组	1±1	1±0	1±1	1.017±0.003	8.1±0.2
	大叶千斤拔低剂量组	1±0	1±0	1±0	1.016±0.002	7.8±0.3
	大叶千斤拔高剂量组	2±1	1±0	1±1	1.016±0.005	7.9±0.2
	蔓性千斤拔低剂量组	1±1	1±0	2±1	1.016±0.002	7.9±0.3
	蔓性千斤拔高剂量组	3±1*	1±0	1±0	1.011±0.006*	7.9±0.5

注（Note）：与空白对照组比较，$^*P < 0.05$（Compared with the blank control group，$^*P < 0.05$）。

表 6　大叶千斤拔和蔓性千斤拔对大鼠尿液生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 6　Effect of *Flemingia macrophylla* and *Flemingia pedunculata* on the biochemical indexes of urine in rats ($\bar{x}\pm s$)

阶段	组别	肾损伤分子 -1（Kim-1）/（pg・mL^{-1}）	白蛋白尿（MAU）/（μg・mL^{-1}）	β2- 微球蛋白（β2-MG）/（ng・mL^{-1}）	尿总蛋白（UTP）/（mg・L^{-1}）
给药期末（n = 20）	空白对照组	11.9±2.6	328.7±37.8	133.3±21.6	431.6±237.5
	大叶千斤拔低剂量组	11.7±2.7	333.2±52.8	132.8±17.7	463.5±219.7
	大叶千斤拔高剂量组	12.6±2.6	319.3±37.5	125.8±15.3	452.9±203.4
	蔓性千斤拔低剂量组	12.6±2.6	324.0±60.2	131.7±29.4	442.6±218.6
	蔓性千斤拔高剂量组	12.0±2.4	320.3±39.6	126.6±28.2	441.8±202.6
恢复期末（n = 10）	空白对照组	12.5±1.4	231.5±30.9	120.0±13.3	372.3±175.0
	大叶千斤拔低剂量组	13.8±1.6	239.1±24.9	112.1±21.4	397.5±164.6
	大叶千斤拔高剂量组	13.3±1.2	239.0±26.3	125.8±16.8	378.3±184.1
	蔓性千斤拔低剂量组	13.9±1.6	229.3±22.3	125.5±14.5	374.5±162.5
	蔓性千斤拔高剂量组	13.1±1.3	235.1±34.6	110.2±12.6	391.1±168.1

支气管炎及妇科疾病等的治疗，作为主要药味已应用于妇科千金片、金鸡胶囊、壮腰健肾丸、舒筋健腰丸等多个中成药[4-9]。目前对千斤拔属植物的化学成分及药理作用已进行了广泛研究[10-12]，亦有实验研究表明千斤拔有增强免疫力作用及抗氧化能力[13]，蔓性千斤拔具有抑菌活性并对大鼠血栓具有防治作用[14]。然而关于千斤拔安全性的报道仍相对匮乏，目前仅能查阅到小鼠急性毒性研究[6]。有研究通过数据库分析毒性成分、毒性靶点、毒性反应、毒性剂量、禁忌人群等信息，筛选出千斤拔等多种中药具有肾毒性[15]，而千斤拔潜在的肾脏毒性此前亦已引起了广泛关注，但未见关于千斤拔肾毒性的相关实验及临床报道。此外，亦有学者考证蔓性千斤拔无毒[16]。在此背景下本研究开展了大叶千斤拔和蔓性千斤拔的 3 个月重复给药毒性研究并重点关注其对肾脏的影响，以期为千斤拔的临床应用提供实验依据。

长期毒性实验结果表明，个别动物的部分脏器可见组织病理学改变，如肝脏局灶性小坏死灶、肝脏肝细胞空泡变性、心脏心肌灶性炎症细胞浸润、肾上腺皮质束状带细胞空泡变性、肾盂黏膜下层炎症细胞浸润、前列腺间质炎症细胞浸

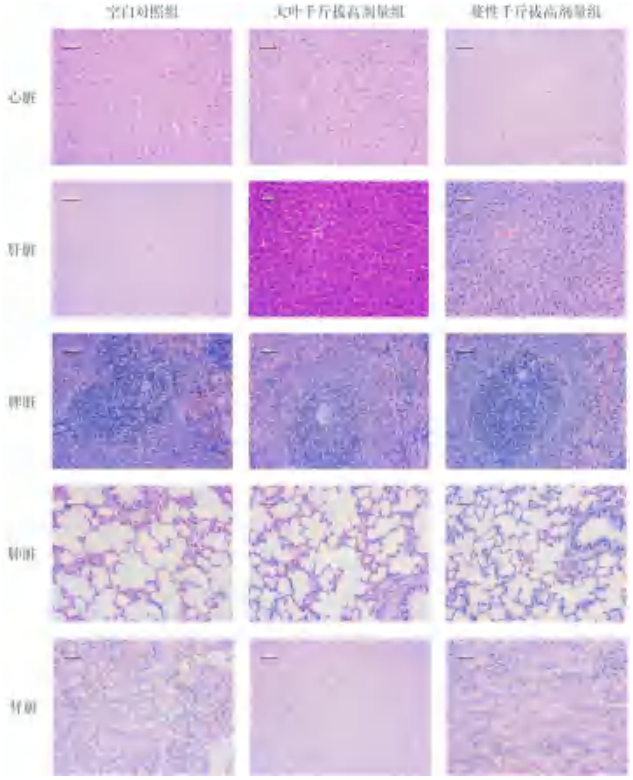


图 2 给药末期各组大鼠主要脏器 HE 染色图（×200）

Fig 2 HE staining of main organs of rats in each group at the end of drug administration（×200）

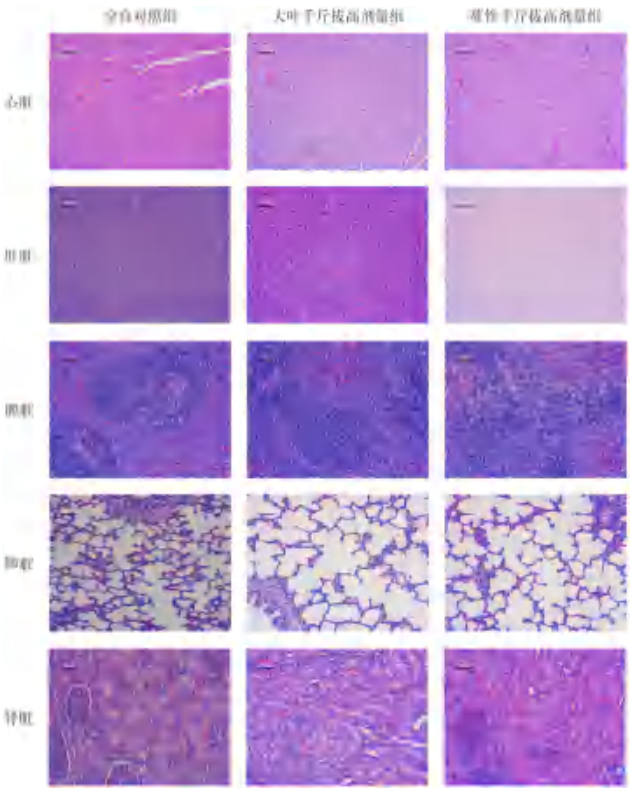


图 3 恢复期末各组大鼠主要脏器 HE 染色图（×200）

Fig 3 HE stain of main organs of rats in each group at the end of recovery period（×200）

润等。但与空白对照组比较，大叶千斤拔高剂量组、蔓性千斤拔高剂量组病变类型及病变动物数量、病变程度均未见明显差异，判定为大鼠背景性病理改变，与大叶千斤拔和蔓性千斤拔无关。

综上所述，在本实验条件下，未发现 SD 大鼠经口重复给予大叶千斤拔和蔓性千斤拔 3 个月后有毒性意义的病理改变。大叶千斤拔未见明显毒性反应剂量（NOAEL）为 61.0 g 生药 • kg^{-1}（相当于成人临床拟用剂量的 22.6 ～ 67.8 倍）；蔓性千斤拔未见明显毒性反应剂量（NOAEL）为 60.6 g 生药 • kg^{-1}（相当于成人临床拟用剂量的 22.4 ～ 67.3 倍）。

参考文献

[1] 山西省食品药品监督管理局 . 山西省中药材中药饮片标准 [S]. 第一册 . 北京：科学出版社，2017：1-9.

[2] 湖南省药品监督管理局 . 湖南省中药饮片炮制规范 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2021：275-276.

[3] 彭开锋，张鹏，阳苗，等 . 千斤拔药理作用研究进展 [J]. 中国医院用药评价与分析，2016，16（S1）：251.

[4] 梁莹，韦坤华，乔柱，等 . 大叶千斤拔的研究概况 [J]. 广西中医药，2017，40（2）：5-8.

[5] 宾彬，邓学易，陆海旺，等 . 壮药千斤拔研究进展 [A]// 首届男性大健康中西医协同创新论坛暨第三届全国中西医结合男科青年学术论坛论文集 [C]. 2019：472-477.

[6] 曾春兰，钟正贤，卢文杰，等 . 大叶千斤拔的药理作用研究 [J]. 中医药导报，2011，17（7）：79-81.

[7] 饶伟文，黄建楷，温志芳，等 . 千斤拔的品种调查与质量研究 [J]. 中草药，1999，30（3）：219-222.

[8] 国家药品监督管理局 . 药物重复给药毒性试验技术指导原则 [S]. 2014.

[9] 任朝琴，戴先芝，刘圆 . 千斤拔药材资源开发与利用的调查报告 [J]. 西南民族大学学报（自然科学版），2011，37（4）：610-613.

[10] 严东，夏伯候，李春，等 . 千斤拔属药用植物的研究进展 [J]. 中草药，2016，47（24）：4456-4471.

[11] 乔雪，卓燊，杨子明，等 . 千斤拔属植物化学成分及药理作用的国内外研究进展 [J]. 环球中医药，2015，8（12）：1546-1550.

[12] 郑元青，张鹏，何娟娟，等 . 大叶千斤拔药材等级评价研究 [J]. 湖南中医药大学学报，2022，42（2）：200-205.

[13] 卓燊，秦海洸，陈君，等 . 千斤拔对小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 时珍国医国药，2014，25（11）：2641-2643.

[14] 王明煜 . 蔓性千斤拔有效组分提取分离及其抑菌、防治血栓作用 [D]. 长春：吉林大学，2008.

[15] 谢伯添 . 中药毒性数据库的构建及应用研究 [D]. 广州：华南理工大学，2022

[16] 广西壮族自治区革命委员会卫生管理服务站 . 广西中草药（第 2 册）[M]. 南宁：广西人民出版社，1970：294.

（收稿日期：2023-09-05；修回日期：2023-11-08）

秦皮乙素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解的影响

贾绍华，郭浩，丁海鑫，孙萌遥（哈尔滨商业大学药学院（药物工程技术研究中心），哈尔滨　150076）

摘要：目的　探讨秦皮乙素（AES）对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解的影响及相关机制。**方法**　采用 MTT 法检测细胞增殖活性；采用划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力；葡萄糖摄取量测定和乳酸含量测定实验检测细胞糖酵解情况；Western blot 法检测迁移、侵袭及糖酵解相关蛋白的表达水平。**结果**　AES 能够抑制 SGC-7901 细胞的增殖活力，且这种抑制效果与 AES 的剂量成正相关。随着 AES 剂量的梯度增加，SGC-7901 细胞的迁移、侵袭及糖酵解能力逐渐降低（$P < 0.05$）。AES 可以下调 SGC-7901 细胞 HIF-1*α*、MMP-2、MMP-9、GLUT1、LDHA 蛋白的表达水平（$P < 0.05$）。**结论**　AES 对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖活性及迁移、侵袭能力有抑制作用，通过抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的葡萄糖摄取及乳酸生成降低糖酵解水平。AES 可能通过影响缺氧诱导因子 *HIF-1α* 抑制 SGC-7901 细胞迁移、侵袭及有氧糖酵解过程。

关键词：秦皮乙素；人胃癌 SGC-7901 细胞；增殖；迁移；侵袭；糖酵解
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0679-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.020

Effect of aesculetin on the proliferation, migration, invasion and glycolysis of human gastric cancer SGC-7901 cells

JIA Shao-hua, GUO Hao, DING Hai-xin, SUN Meng-yao (*School of Pharmacy* (*Engineering Research Center for Medicine*), *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076)

Abstract: Objective To determine the effect and mechanism of aesculetin (AES) on the proliferation, migration, invasion and glycolysis of human gastric cancer SGC-7901 cells. **Methods** The cell proliferation was detected by MTT assay. The cell migration and invasion were detected by scratch test and transwell test. Glucose uptake test and lactic acid content test were used to detect the glycolysis of cells. The expression level of migration, invasion and glycolytic related proteins were detected by Western blot. **Results** AES inhibited the proliferation of SGC-7901 cells in a dose-dependent manner. The migration, invasion and glycolysis of SGC-7901 cells decreased gradually with the gradient increase of AES doses ($P < 0.05$). AES down-regulated the protein expression of HIF-1*α*, MMP-2, MMP-9, GLUT1 and LDHA in SGC-7901 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** AES can inhibit the proliferation, migration and invasion of human gastric cancer SGC-7901 cells, and reduce the glycolysis level by inhibiting the glucose uptake and lactic acid production of human gastric cancer SGC-7901 cells. AES may inhibit the migration, invasion and aerobic glycolysis of SGC-7901 cells by influencing hypoxia-inducing factor *HIF-1α*.

Key words: aesculetin; human gastric cancer SGC-7901 cell; proliferation; migration; invasion; glycolysis

基金项目：黑龙江省自然科学基金重点项目（No.ZD2018016）。
作者简介：贾绍华，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事抗肿瘤药物活性筛选及机制研究，email：shaohuajiacn@163.com

胃癌是最习见的恶性肿瘤之一，其发病率、死亡率高且逐年上升[1]。现有的治疗方式存在预后较差、易复发等问题。因此，寻求新型抗肿瘤药物显得尤为重要。秦皮乙素（又称七叶内酯，aesculetin，AES），如图 1，分子式 $C_9H_6O_4$，分子量 178.14，是中药秦皮的有效活性成分[2]，具有降糖[3]、抗菌[4]、抗炎症[5]、抗病毒[6]、抗氧化[7]等多种药理作用。随着研究的深入，发现秦皮乙素还具有显著的抗肿瘤活性，对黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肝癌、肺癌及胃癌等均有治疗作用[8-13]。由于恶性肿瘤病变时，细胞新陈代谢增强，处于相对缺氧状态，从而激活缺氧诱导因子 *HIF-1α* 及其下游信号转导通路，进而调控肿瘤细胞的迁移、侵袭和糖酵解过程[14-15]。本研究以人胃癌 SGC-7901 细胞株为研究对象，探究秦皮乙素对其的抑制作用及相关机制，以期为其肿瘤治疗提供实验依据。

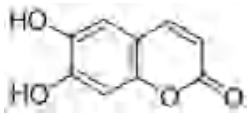


图 1 秦皮乙素的化学结构

Fig 1 Chemical structure of aesculetin

1 材料

人胃癌细胞 SGC-7901（上海富衡生物科技有限公司），人脐静脉内皮细胞 HUVEC（哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心）。秦皮乙素（纯度≥ 98%，APE×Bio 公司）；RPMI 1640 溶液（Solarbio 公司）；MTT（Alphabio 公司）；胰蛋白酶、BCA 试剂盒（Beyotime 公司）；胎牛血清（FBS，浙江天杭生物科股份有限公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，Biosharp 公司）；乳酸生成试剂盒（南京建成生物工程研究所）；2-NBDG 葡萄糖摄取试剂盒（Abnova 公司）；兔抗 HIF-1*α* 多克隆抗体（万类生物）；ECO-170P-230 培养箱（美国 NBS 公司）；CKX-41-32 型倒置显微镜（日本 OLYMPUS 公司）；Transwell 小室（美国康宁公司）；Azure c500 激光近红外成像系统（上海科端生物科技有限公司）；垂直电泳仪（北京六一生物科技有限公司）。

2 方法和结果

2.1 MTT 实验

取对数生长期的 SGC-7901 细胞及 HUVEC 细胞（37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养），经胰酶消化制成细胞悬液。以每孔约 5000 个细胞铺在 96 孔板内，培养 24 h 后，实验组分别加入 0.05、0.10、0.20、0.40 和 0.80 mmol • L^{-1} 的秦皮乙素，空白对照组加入含 12%FBS 的 RPMI 1640 培养基。48 h 后，弃去培养基，加入 0.5 mg • mL^{-1} 的 MTT 溶液 100 μL，培养 4 h 后迅速倾倒，避光加入 150 μL 二甲基亚砜（DMSO），充分振摇 10 min。于 570 nm 处重复 3 次测定各孔 *OD* 值，计算细胞存活率。

结果如图 2 所示，各剂量秦皮乙素对 SGC-7901 细胞具有显著的抑制作用，随着剂量的增加，存活率均明显下降（$P < 0.01$）。0.2、0.4、0.8 mmol•L^{-1} 的秦皮乙素明显抑制 HUVEC 细胞活性。经计算，秦皮乙素处理 SGC-7901 细胞 48 h 后的 IC_{50} 值为 0.144 mmol • L^{-1}。0.144 mmol • L^{-1} 秦皮乙素对 HUVEC 细胞也没有明显的细胞毒性作用，因此后续实验浓度的选取为秦皮乙素对 SGC-7901 细胞的 IC_{50} 值及以下的非细胞毒性浓度。

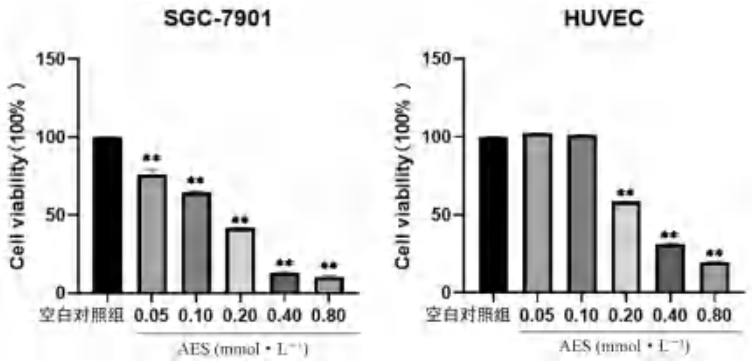


图 2 秦皮乙素对 SGC-7901 细胞和 HUVEC 细胞增殖作用的影响（$n = 6$）

Fig 2 Effect of aesculetin on the proliferation of SGC-7901 cells and HUVEC cells（$n = 6$）

注：与空白对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

2.2 划痕实验

取生长状态良好的 SGC-7901 细胞传代并制备密度为 6×10^5 个 • mL^{-1} 的细胞悬液，以每孔 1.5 mL 细胞悬液（约 9×10^6 个细胞）平铺于 6 孔板中，培养 24 h 后用黄枪头（移液枪 45° 倾斜）和直尺划一条线，加入 1 mL PBS 溶液清洗细胞，重

复 2 次操作后进行给药处理。给药分为 4 组：空白对照组（Control 组，含 12%FBS 的 RPMI 1640 培养基），秦皮乙素低剂量组（AES-L 组，0.072 mmol • L^{-1}）、秦皮乙素中剂量组（AES-M 组，0.096 mmol•L^{-1}）、秦皮乙素高剂量组（AES-H 组，0.144 mmol • L^{-1}）。每孔加入 2 mL 含不同浓度的秦皮乙素培养基，于光学显微镜下拍照后放入培养箱中继续培养 48 h，拍照记录，计算迁移率。实验结果见图 3。与空白对照组相比，秦皮乙素各剂量组的 SGC-7901 细胞迁移率降低（$P < 0.01$）。

2.3 Transwell 实验

细胞培养及给药处理方法同“2.2”项下。将 Matrigel 胶用无酚红 RPMI 1640 以 1∶6 稀释，吸取 60 μL 均匀涂抹在 Transwell 小室的上室后放入培养箱。24 h 后下室加入 30 μL 的纤维粘连蛋白（FN），上室加入 200 μL 的 0.1% 牛血清白蛋白（BSA）水化基质胶。待基质胶凝固，Transwell 小室的上室加入 200 μL 的细胞悬液（约 5×10^4 个细胞），下室加入 600 μL 含 12%FBS 的培养基。培养 48 h 后，使用甲醇溶液将细胞固定 10 min，用 200 μL 的 0.1% 结晶紫溶液涂抹每个下室，染色 15 min，显微镜下拍照后计数。结果如图 4 所示，与空白对照组相比，随着秦皮乙素剂量的增加，SGC-7901 细胞的侵袭率降低（$P < 0.01$）。说明秦皮乙素可以抑制 SGC-7901 细胞的侵袭能力。

2.4 葡萄糖摄取实验

细胞培养及给药处理方法同“2.2”项下。将 SGC-7901 细胞悬液以每孔 1 mL（约 2.5×10^4 个细胞）加入 24 孔板内，培养 24 h 后给药处理，继续培养 48 h。吸弃各孔液体后，每孔加入 300 μL 的 2-NBDG 溶液，20 min 后吸弃溶液，取 200 μL Assay Buffer Ⅰ 充分清洗细胞一次后加入 200 μL Assay Buffer Ⅱ，于荧光显微镜下观察。

结果如图 5 所示。与空白对照组相比，秦皮乙素中、高剂量组葡萄糖摄取量减少（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。表明秦皮乙素可以有效地降低 SGC-7901 细胞对葡萄糖的摄取能力。

2.5 乳酸含量测定

细胞培养及给药处理方法同“2.2”项下。用移液枪转移 6 孔板中的培养液于冰水浴的 EP 管中待用。按照乳酸试剂盒说明书进行实验操作，于 530 nm 处测定各组 *OD* 值，通过下述公式计算乳酸含量。乳酸含量（mmol • L^{-1}）＝（$A_{测定}$—$A_{空白}$）/（$A_{标准}$—$A_{空白}$）×$C_{标准}$（3 mmol • L^{-1}）。

结果如图 6 所示。与空白对照组相比，秦皮乙素各剂量组乳酸含量出现明显的降低趋势且伴有一定的剂量依赖性（$P < 0.01$）。表明秦皮乙素可以有效地减少乳酸的生成，并且作用效果与剂量相关。

2.6 Western blot 实验

细胞培养及给药处理方法同“2.2”项下。提取各组细胞蛋白后，电泳并转膜，将 NC 膜牛奶封闭 2 h 后一抗孵育过夜，TBST 清洗 3 次，二抗孵育 2 h，进行 ECL 显色及成像处理。

结果如图 7 所示，与空白组相比，秦皮乙素各剂量组中 HIF-1*α*、基质金属蛋白酶 -2（MMP-2）、乳酸脱氢酶 A（LDHA）、基质金属蛋白酶 -9（MMP-9）、GLUT1 蛋白表达均降低（$P < 0.01$），且呈剂量依赖性。

2.7 统计学分析

数据分析采用 GraphPad Prism 软件进行处理。各组结果以（$\bar{x}\pm s$）表示，多样本均数比较采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

胃癌具有早期症状不明显、治疗方法单一、肿瘤预后不理想且高复发率等弊端 [16]。因此不断探索有针对性和有效性的治疗方法是当前抗胃癌研究中的重点。近年来，中医药在抗肿瘤研究中取得了一定的进展 [17]。秦皮乙素是一种香豆素的衍生物，其抗肿瘤作用包括抑制细胞增殖，增敏减毒，诱导细胞凋亡，调节肿瘤微环境等 [18]。罗祥力等 [19] 研究发现秦皮乙素抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭，可能与 *FLVCR1-AS1* 基因的表达降低相关。Wang 等 [20] 研究发现秦皮乙素可以促进胃癌 MGC803 细胞凋亡。此外秦皮乙素对丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）也具有很强的作用，秦皮乙素可激活 p38-MAPK、JNK、ERK，诱导线粒体跨膜电位的下降且与时间相关 [21]。另有研究证实，秦皮乙素对 Nrf2-ARE[22-23]、PERK/EIF2*α*/ATF6[23]、Wnt/*β*-catenin[24-26]、STAT3[27]、NF-*κ*B[12] 信号通路均有一定的作用。然而秦皮乙素是否通过 *HIF-1α* 途径发挥抗肿瘤作用目前还不明确。

本研究结果发现，秦皮乙素能够抑制 SGC-7901 细胞增殖活性、迁移和侵袭能力及糖酵解过程。Wen 等 [28] 研究发现肌球蛋 1b 可通过刺激 ERK/HIF-1*α* 通路及其下游糖酵解相关基因来调节宫颈癌的糖酵解、迁移和侵袭。在肿瘤细胞中，葡萄糖不能通过细胞膜的脂双层结构自由进入细胞，因此需要载体来辅助这种作用。葡萄糖转运

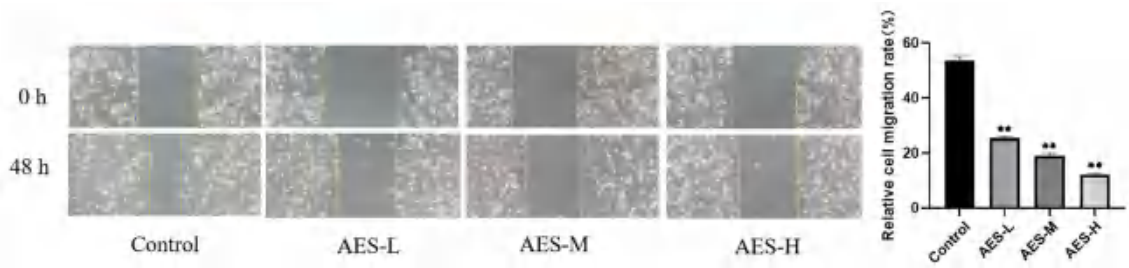


图 3 秦皮乙素对 SGC-7901 细胞迁移能力的影响（×40）（$n = 3$）

Fig 3 Effect of aesculetin on the migration ability of SGC-7901 cells（×40）（$n = 3$）

注：与空白对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

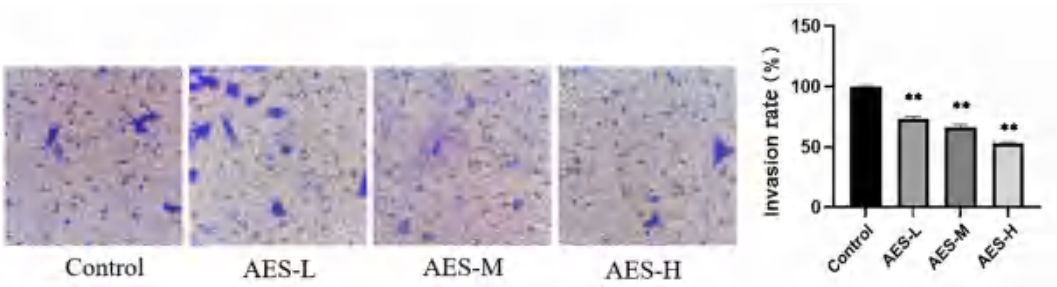


图 4 秦皮乙素对 SGC-7901 细胞侵袭能力的影响（×20）（$n = 3$）

Fig 4 Effect of aesculetin on the invasion ability of SGC-7901 cells（×20）（$n = 3$）

注：与空白对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

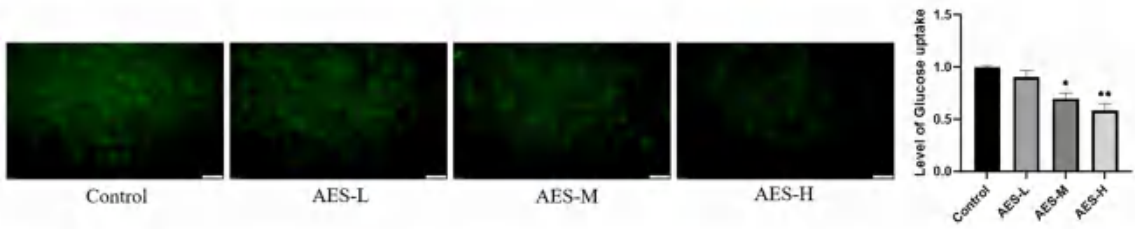


图 5 秦皮乙素对 SGC-7901 细胞中葡萄糖摄取的影响（×20）（$n = 3$）

Fig 5 Effect of aesculetin on the glucose uptake in SGC-7901 cells（×20）（$n = 3$）

注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

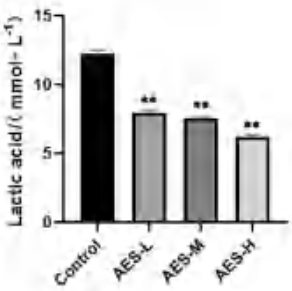


图 6 秦皮乙素对 SGC-7901 细胞中乳酸含量的影响（$n = 3$）

Fig 6 Effect of aesculetin on the lactic acid production in SGC-7901 cells（$n = 3$）

注：与空白对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

蛋白 1（GLUT1）是研究较为透彻的载体之一，位于细胞膜上，在肝癌、胃癌、胰腺癌等恶性肿瘤中常伴有异常高表达[29]。血清中高含量的乳酸脱氢酶（LDH）也是恶性肿瘤的预测指标之一，它包括 LDHA 和乳酸脱氢酶 B（LDHB）。*LDHA* 基因在小细胞肺癌、胃癌、结肠癌中异常活跃[30-34]，肿瘤中的 *LDHA* 与患者的不良预后和放化疗效果抵抗有很大的关联。为溶解并穿过细胞外基质屏障，肿瘤细胞可以通过分泌一些特异性的蛋白水解酶以促进后续侵袭过程。MMP-2、MMP-9 可重塑细胞外基质，研究发现其在胃癌、口腔鳞状细胞癌、非小细胞肺癌等多类肿瘤中参与转移和侵袭[34-36]。Western blot 法检测出秦皮乙素能够抑制 HIF-1α、MMP-2、MMP-9、GLUT1、LDHA 蛋白的表达，猜测其可能通过抑制缺氧诱导因子 *HIF-1α* 进而抑制 SGC-7901 细胞迁移、侵袭及糖酵解过程。

综上所述，秦皮乙素可以抑制人胃癌 SGC-

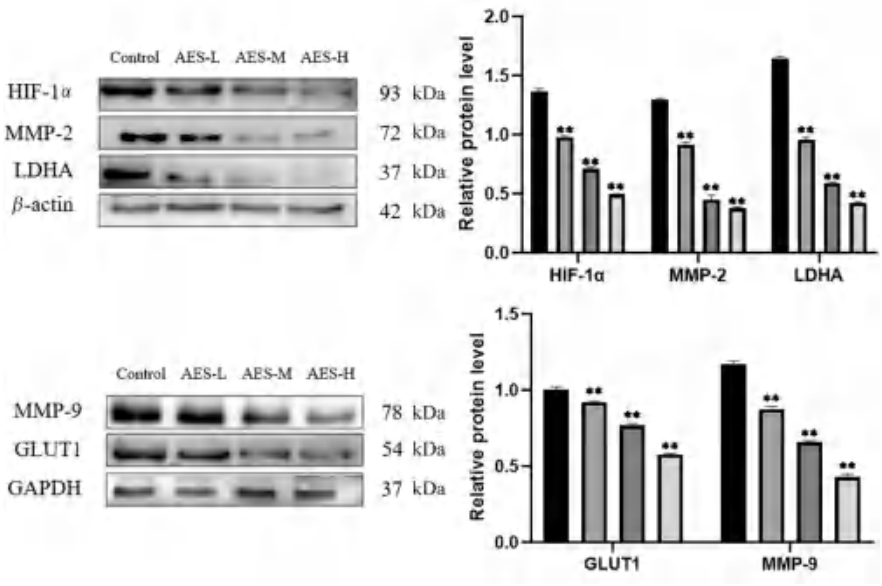


图 7　秦皮乙素对 SGC-7901 细胞迁移、侵袭、糖酵解蛋白表达的影响（$n = 3$）

Fig 7　Effect of aesculetin on the migration，invasion and glycolytic protein expression of SGC-7901 cells（$n = 3$）

注：与空白对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

7901 细胞的增殖活性，迁移侵袭能力和糖酵解过程。同时可能通过抑制缺氧诱导因子 *HIF-1α* 的表达抑制迁移、侵袭及糖酵解相关蛋白，达到抑制肿瘤的目的，为进一步探索秦皮乙素对恶性肿瘤的影响提供了新的实验基础。然而本研究仅证明了体外实验中秦皮乙素对 SGC-7901 细胞的抑制作用及相关机制，但对于迁移侵袭与糖酵解之间的关系，及秦皮乙素是否在体内发挥相关作用仍需要进一步的探究。

参考文献

[1] 中国抗癌协会胃癌专业委员会 . 胃癌诊治难点中国专家共识（2020 版）[J]. 中国实用外科杂志，2020，40（8）：869-904.

[2] 梁承远，张诗韵，毛跟年，等 . 秦皮乙素及其衍生物的合成与药理学研究进展 [J]. 陕西科技大学学报（自然科学版），2015，33（2）：126-133.

[3] Rzodkiewicz P，Gąsi ń ska E，Gajewski M，et al. Esculetin reduces leukotriene B4 level in plasma of rats with adjuvant-induced arthritis [J]. Reumatologia，2016，54（4）：161-164.

[4] 刘爽，谢鲲鹏，邹丹，等 . 秦皮素对大肠埃希菌作用机制的初步研究 [J]. 中国微生态学杂志，2014，26（10）：1123-1126.

[5] Wang SK，Chen TX，Wang W，et al. Aesculetin exhibited anti-inflammatory activities through inhibiting NF-κB and MAPKs pathway in vitro and in vivo [J]. J Ethnopharmacol，2022，296：115489.

[6] 聂安政，林志健，张冰 . 秦皮化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药，2016，47（18）：3332-3341.

[7] Jung WK，Park SB，Yu HY，et al. Antioxidant efficacy of esculetin against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in HEK293 cells [J]. Curr Issues Mol Biol，2022，44（12）：5986-5994.

[8] Rubio V，García-Pérez AI，Herráez A，et al. Esculetin modulates cytotoxicity induced by oxidants in NB4 human-leukemia cells [J]. Exp Toxicol Pathol，2017，69（8）：700-712.

[9] Chang HT，Chou CT，Lin YS，et al. Esculetin，a natural coumarin compound，evokes Ca^{2+} movement and activation of Ca^{2+} -associated mitochondrial apoptotic pathways that involved cell cycle arrest in ZR-75-1 human breast cancer cells [J]. Tumour Biol，2016，37（4）：4665-78.

[10] Han L，Li PW，Fu X，et al. Aesculetin inhibits proliferation and induces mitochondrial apoptosis in bladder cancer cells by suppressing the MEK/ERK signaling pathway [J]. Anticancer Agents Med Chem，2023，23（4）：478-487.

[11] 贾绍华，刘冰洁，张道勇，等 . 秦皮乙素诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡机制的研究 [J]. 黑龙江医药，2012，25（3）：4.

[12] Zhu XY，Gu JP，Qian HX. Esculetin attenuates the growth of lung cancer by downregulating Wnt targeted genes and suppressing NF-κB [J]. Arch Bronconeumol（Eng1 Ed），2018，4（3）：128-133.

[13] 姬剑，伟忠民 . 秦皮乙素对人肝癌 BEL-7402 细胞体外增殖的影响 [J]. 中药药理与临床，2015，31（3）：38-41.

[14] Rashid M，Zadeh LR，Baradaran B，et al. Up-down regulation of HIF-1α in cancer progression [J]. Gene，2021，798（1）：145796.

[15] Wu T，Yang Y，Zhang B，et al. EDDM3A drives gastric cancer progression by promoting HIF-1α-dependent aerobic glycolysis [J]. Oncogenesis，2022，11（1）：3.

[16] Joshi SS，Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：264-279.

[17] Yang C，Li D，Ko CN，et al. Active ingredients of traditional Chinese medicine for enhancing the effect of tumor immunotherapy [J]. Front Immunol，2023，14：1133050.

[18] 李朝燕，李佳，丁亚杰，等 . 秦皮乙素抗肿瘤相关信号通路的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志，2019，46（10）：2230-2233.

[19] 罗祥力，蔡芃夷，唐文 . 秦皮乙素对宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及机制 [J]. 广西医学，2021，43（20）：2430-2435.

[20] Wang GJ，Lu ML，Yao YS，et al. Esculetin exerts antitumor effect on human gastric cancer cells through IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol，2017，814：207-215.

[21] Kim AD，Han X，Piao MJ，et al. Esculetin induces death of human colon cancer cells via the reative oxygen species-mediated mitochondrial apoptpsis pathway [J]. Environ Toxicol Pharmacol，2015，39（2）：982-989.

[22] Arora R，Sawney S，Saini V，et al. Abstract B160：esculetin induces antiproliferative and apoptotic response in PANC-1 cells by directly binding to Keap1 [J]. Mol Cancer，2016，15（1）：64.

[23] Kim AD，Hewage SRKM，Piao MJ，et al. Esculetin induced apoptosis in human colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Biochem Funct，2015，33（7）：9-21.

[24] Fan XF，Du HY，Sun YG，et al. Suppression of the Wnt signaling pathway may contribute to the inhibition of proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells by esculetin [J]. Oncol Lett，2017，14（2）：1731-1736.

[25] Lee SY，Lim TG，Chen H，et al. Esculetin suppresses proliferation of human colon cancer cells by directly targeting β-catenin [J]. Cancer Prev Res，2013，6（12）：1356.

[26] Li T，Zhang L，Huo XK. Inhibitory effects of aesculetin on the proliferation of colon cancer cells by the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Oncol Lett，2018，15（5）：7118-7122.

[27] Kimura Y，Sumiyoshi M. Antitumor and antimetastatic actions of dihydroxycoumarins（esculetin or fraxetin）through the inhibition of M2 macrophage differentiation in tumor-associated macrophages and/or G1 arrest in tumor cells [J]. Eur J Pharmacol，2015，746（3）：115-125.

[28] Wen LJ，Hu XL，Li CY，et al. Myosin 1b promotes migration，invasion and glycolysis in cervical cancer via ERK/HIF-1α pathway [J]. Am J Transl Res，2021，13（11）：12536-12548.

[29] Dang CV. Links between metabolism and cancer [J]. Genes Dev，2012，26（9）：877-890.

[30] Mazurek S，Zwerchke W，Jansen-Durr P，et al. Effects of the human papilloma virus HPV-l6 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis：role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex [J]. Biochem J，2001，356：247-256.

[31] Feron O. Pyruvate into lactate and back：from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells [J]. Radiother Oncol，2009，92（3）：329-333.

[32] Xian ZY，Liu JM，Chen QK，et al. Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer [J]. Tumour Biol，2015，36（10）：8093-8100.

[33] Qiu H，Jackson AL，Kilgore JE，et al. JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer [J]. Oncotarget，2015，6（9）：6915-6930.

[34] 李向阳，任磊，梁瑞 . 血清基质金属蛋白酶 -9、基质金属蛋白酶 -2 水平对胃癌腹膜转移及预后的预测价值 [J]. 陕西医学杂志，2023，52（2）：166-170.

[35] Binlateh T，Uppatcha N，Thepchai J，et al. Cordycepin attenuates migration and invasion of HSC-4 oral squamous carcinoma cells through autophagy-dependent FAK/Akt and MMP2/MMP9 suppression [J]. J Dent Sci，2022，17（4）：1677-1688.

[36] Laronha H，Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases [J]. Cells，2020，9（5）：1076.

（收稿日期：2023-09-05；修回日期：2023-11-02）

金 / 多壁碳纳米管修饰玻碳电极检测盐酸曲美他嗪

崔紫瑞，李帅晴，许晴，李聪瑞，赵硕*（华北理工大学化学工程学院，河北省环境光电催化材料重点实验室，河北　唐山　063210）

摘要：目的　建立金 / 多壁碳纳米管（Au/MWCNTs）修饰的玻碳电极检测人尿液中盐酸曲美他嗪（TMZ）的电化学方法。**方法**　采用微流控法，以氯金酸为金源、抗坏血酸为还原剂合成了金微粒（AuMPs，110 nm），并用 Au/MWCNTs 修饰玻碳电极检测 TMZ，对 pH 和扫描速度等条件进行优化。**结果**　优化条件为 pH 3.0，扫描速度 135 mV • s^{-1}。TMZ 在 8×10^{-8} ～ 8×10^{-6} mol • L^{-1} 与响应信号电流值呈现良好的线性关系，检测限为 8×10^{-9} mol • L^{-1}。并实现了人体尿液中的盐酸曲美他嗪的加标检测。**结论**　本方法可用于兴奋剂的检测。

关键词：微流控；金微粒；修饰电极；盐酸曲美他嗪
中图分类号：O657.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0685-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.021

Determination of trimetazidine hydrochloride by Au/MWCNTs modified glassy carbon electrode

CUI Zi-rui, LI Shuai-qing, XU Qing, LI Cong-rui, ZHAO Shuo* (*College of Chemical Engineering*, *Hebei Key Laboratory for Environment Photocatalytic and Electrocatalytic Materials*, *North China University of Science and Technology*, *Tangshan Hebei* 063210)

Abstract: Objective To establish an electrochemical method to detect trimetazidine hydrochloride (TMZ) in human urine with a gold/multi-walled carbon nanotubes (Au/MWCNTs) modified glassy carbon electrode. **Methods** Gold nanoparticles (AuMPs, 110 nm) were synthesized with chloroauric acid as the gold source and ascorbic acid as the reducing agent via microfluidic method. The Au/MWCNTs modified glassy carbon electrode was used to detect TMZ, and the pH and scan rate were optimized. **Results** The optimized conditions were pH 3.0 and a scan rate of 135 mV•s^{-1}. The concentration of TMZ at 8×10^{-8} to 8×10^{-6} mol•L^{-1} showed a good linearity with the response current value, with the detection limit of 8×10^{-9} mol•L^{-1}. The method was successfully applied to the spiked detection of TMZ in human urine. **Conclusion** This method can be used in the detection of stimulants.

Key words: microfluidic; gold nanoparticles (AuMPs); modified electrode; trimetazidine hydrochloride

盐酸曲美他嗪（TMZ）是一种哌嗪类衍生物，属于激素及代谢调节剂类兴奋剂 [1-3]，能提升心肌能量生理代谢，进而提升体育运动员的最大运动量，以此提高体育竞赛成绩。但其使用中受到选择性和特异性脂肪酸氧化抑制 [4]，会导致人的机体紊乱，如头晕、失眠、内分泌紊乱等。在 2014 年，曲美他嗪被列入世界反兴奋剂机构的禁用清单，该物质被归类为 S6b 特定兴奋剂组 [5]，属于比赛中禁止使用的物质，而且使用兴奋剂的行为违反了体育运动比赛的公平性原则，因此需要对生物体液中 TMZ 进行定性和定量分析。目前 TMZ 的分析方法有分光光度法 [6-8]、高效液相色谱法 [9-11] 和电化学方法 [12-14] 等。分光光度法操作简便，但其测试周期较长，精密度较低；高效液相色谱法分离效率高、选择性好，但样品前处理较为复杂，并且依赖于大型仪器，成本相对较高；电化学法成本低、灵敏度高、操作简单、选择性和稳定性好，并且可以现场监测。多壁碳纳米管（MWCNTs）修饰的电极 [15-16]，具有

基金项目：博士启动金项目（No.28423299）；大创基金项目资助（No.XX20233523）。
作者简介：崔紫瑞，女，主要从事微流控环境分析，email：1412156336@qq.com　*通信作者：赵硕，女，讲师，主要从事微流控环境分析，email：zhaoshuo@ncst.edu.cn

良好的生物相容性和较高的选择性，已成为药物分析领域重要的分析方法。金（Au）具有优良的导电能力、较好的生物相容性以及催化活性，在众多电极材料中脱颖而出[17]。采用微流控方法制备 Au 颗粒[18-20]，由于通道具有微米尺度，可以减少试剂的浪费，具有成本低、操作灵活、分析时间短等优势，并在催化、传感等领域得到应用[21-25]。

本文采用微流控技术，以氯金酸为金源，抗坏血酸为还原剂，制备了粒径为 110 nm 的金微粒（AuMPs）。用 MWCNTs 和所合成的 AuMPs 修饰玻碳电极（GCE），并以其作为工作电极，Ag/AgCl 电极为参比电极，铂电极为对电极，对 TMZ 进行分析，报道如下。

1 仪器与试药

JSM-IT100（A）扫描电子显微镜（SEM，日本电子株式会社）；D8 AdvancX 射线衍射仪 e（XRD，德国布鲁克公司）；CHI 820D 电化学工作站（上海辰华仪器公司）；玻碳电极（GCE，φ = 3 mm）、Ag/AgCl 电极、铂电极（上海辰华仪器公司）；微流控注射泵（苏州讯飞科学仪器有限公司）；熔融石英毛细管（φ_{id} 250 μm；φ_{od} 360 μm，河北永年）；铁氰化钾（$K_3[Fe(CN)_6]$）、磷酸二氢钠（NaH_2PO_4）、磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）、尿酸（UA）（上海浩鸿生物医药科技有限公司）；无水乙醇、氯金酸（$HAuCl_4$）（国药集团化学试剂公司）；TMZ、羧基化多壁碳纳米管（MWCNTs-COOH）、L-抗坏血酸（AA）、盐酸多巴胺（DA）、乙腈（上海麦克林公司）。

2 方法

2.1 GCE 预处理

将 GCE 用 0.3 μm 的氧化铝粉末在鹿皮上打磨至镜面，用蒸馏水冲洗干净，烘干。在 5 mmol • L^{-1} $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行循环伏安（CV）扫描，扫描电位－ 0.2 ～ 0.8 V。

2.2 微流控法制备 AuMPs

取 10 mL 1.77 mmol • L^{-1} 的 $HAuCl_4$ 溶液和 5 mL 10 mg • mL^{-1} AA 为还原剂，放入到进样器中，连接好微流控系统，调节温度控制仪为 35 ℃，待温度达到设定值时调节进样器的流速，微流控装置 Y 型反应通道中，两管道流速均为 0.1 mL • min^{-1}，使金属前驱体和还原剂溶液流过微流控毛细管系统，并用离心管收集产物。如图 1 所示。其中 Y 型反应通道，可以提高两液体相互作用的表面积，加速混合过程[26-28]。反应器的加热长度为 70 cm，冷却长度为 30 cm。反应结束后，收集产物，离心分离，乙醇洗涤 3 次后，室温干燥。

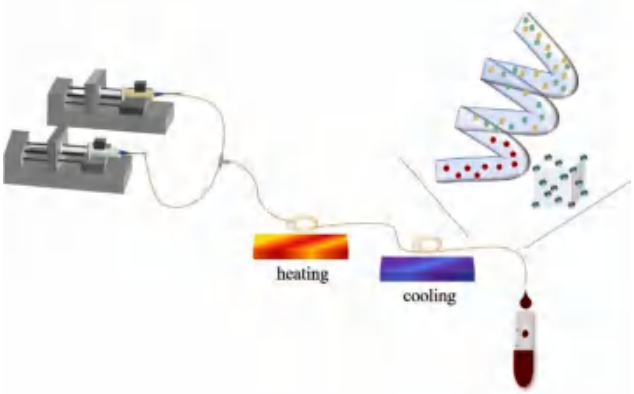


图 1 微流控合成 AuMPs 的装置示意图

Fig 1 Device diagram of AuMPs synthesized by microfluidic

2.3 Au/MWCNTs 修饰电极及其电化学行为检测

移取 2 μL 0.1 mg • mL^{-1} MWCNTs 的无水乙醇分散液于 GCE 表面，烘干；再滴 2 μL 所制备的 AuMPs 分散液（0.1 mg • mL^{-1}）于 GCE 表面，烘干，得到 Au/MWCNTs 电极，备用。在 0.2 mol • L^{-1} PBS 缓冲液（pH 3.0，采用磷酸二氢钠配制，盐酸调 pH 至 3.0），采用 CV 法测试 Au/MWCNTs 修饰的电极对 TMZ 的电化学行为。

2.4 实际样品检测

选用健康人体尿液进行测试。分别取尿液 3.6 mL，加入乙腈 5.4 mL 沉淀尿液中的蛋白质。以 4500 r • min^{-1} 离心 10 min，收集上清液，加入 TMZ 标准样品，用 PBS 缓冲液稀释至 1×10^{-6}、5×10^{-7}、1×10^{-7} mol • L^{-1}，调 pH 为 3.0，用差分脉冲伏安（DPV）法进行检测。

3 结果与讨论

3.1 AuMPs 的 XRD 和 SEM 表征

用扫描电子显微镜和 X 射线衍射仪对 AuMPs 进行检测。AuMPs 的 XRD 如图 2 所示，可以清楚地观察到 5 个衍射峰，其衍射角度分别为 38.18°、44.39°、64.58°、77.55° 以及 81.72°，与 Au 的标准卡片 AuPDF#04-0784 中峰的位置相一致，说明 AuMPs 成功合成。

图 3a 和图 3b 分别为不同放大倍数下的 AuMPs 的 SEM 图，可以看出，AuMPs 的粒径分布均匀，图 3c 和图 3d 为不同放大倍数下的 Au/MWCNTs 的 SEM 图，可以看出，AuMPs 均匀负载在多壁碳纳米管上。由图 4 的粒径统计分析可知，AuMPs 的粒径为 115 nm。

3.2 修饰电极的电化学表征

分别采用 GCE、MWCNTs、AuMPs 以及 AuMPs/MWCNTs 4 种电极，对 TMZ 在 PBS 缓冲液（pH 3.0）中的电化学行为进行分析。由图

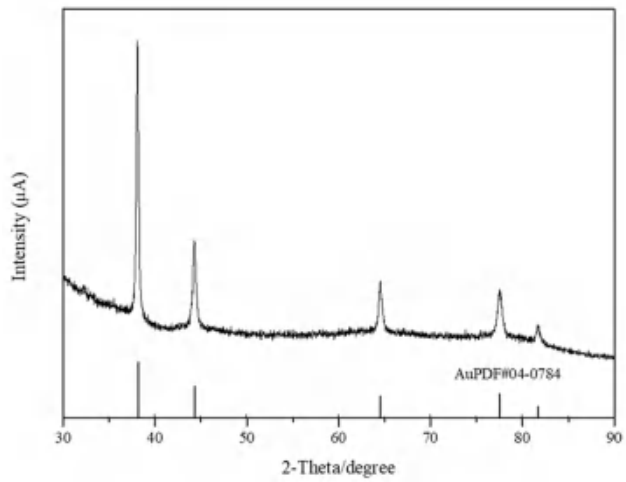


图 2　AuMPs 的 XRD 图

Fig 2　XRD images of AuMPs

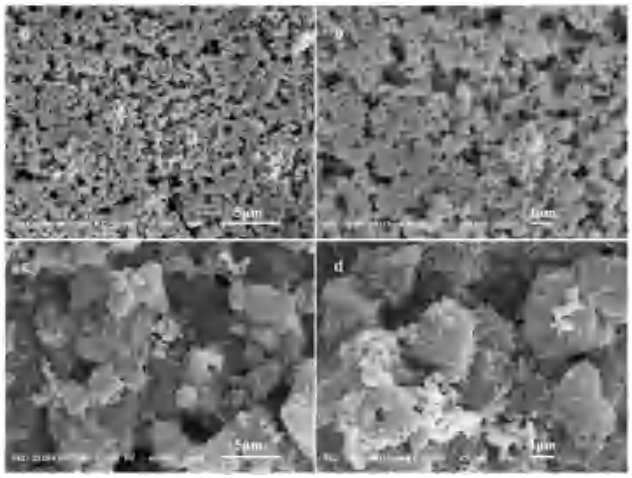


图 3　AuMPs、AuMPs/MWCNTs 的 SEM 图

Fig 3　SEM images of AuMPs and AuMPs/MWCNTs

a. AuMPs（×5000）；b. AuMPs（×10 000）；c. AuMPs/MWCNTs（×5000）；d. AuMPs/MWCNTs（×10 000）

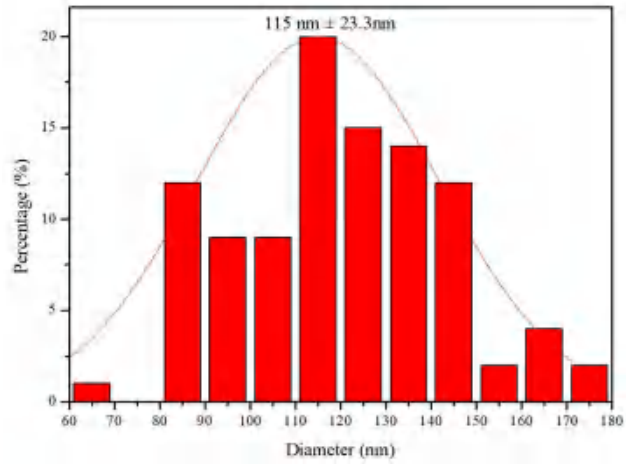


图 4　AuMPs 的粒径分布图

Fig 4　Particle size distribution of AuMPs

5 可以看出，MWCNTs 和 AuMPs 修饰的电极都可以增大峰电流，且两者共同修饰的电极的峰电流最高，说明电极表面修饰 Au/MWCNTs 可以促进 TMZ 的氧化还原反应。AuMPs 具有高导电性，MWCNTs 具有中空并且多孔结构、壁薄的特性，可以增加电极表面的有效面积，提高电子传递速率，进而加速 TMZ 氧化还原反应的动力学过程。

3.3　Au/MWCNTs 修饰电极检测 TMZ 的条件优化

优化实验在 TMZ 浓度为 5×10^{-6} mol • L^{-1}，0.2 mol • L^{-1} PBS 缓冲液中进行。采用 DPV 法检测 TMZ[29-30]。

3.3.1　缓冲溶液的 pH　在 pH 2.7 ～ 7.6 内的 PBS 溶液中对 TMZ 进行了 DPV 检测，结果如图 6 所示。当 pH ＜ 3.0 时，H^+浓度增加，有利于质子化反应的进行，因此峰电流不断变大。而质子化的增加对峰值电流有相反的作用，因为质子化会增加 TMZ 在水中的溶解度，这可能导致 MWCNTs 对 TMZ 的吸附量的减少，导致峰电流变小。当 pH ≥ 3.0 时，MWCNTs-COOH 上的羧基可能发生电离而带正电荷，对 TMZ 的吸附能力减小，峰电流也随之减小。pH ＝ 3.0 时，在 1.0、1.3 V 附近出现 2 个氧化峰，且峰电流最高，因此本实验选择 3.0 为最佳 pH。

3.3.2　CV 法扫描速度　在 pH 3.0 的 PBS 缓冲液中，在 60 ～ 150 mV • s^{-1} 内对 TMZ 进行 CV 测定。如图 7a 所示，随着扫描速度的增加，峰电流不断增大；由图 7b 可知，当扫描速度达到 135 mV • s^{-1} 后，峰电流增加的速度有变缓趋势，说明电极反应是一个受吸附控制过程，当扫描速度继续增大时，吸附作用达到饱和，峰电流不再升高，因此在 135 mV • s^{-1} 为最佳扫描速度。

3.4　标准曲线及检测限

在最优条件下，采用 DPV 法分别对 8×10^{-6}、4×10^{-6}、2×10^{-6}、8×10^{-7}、2×10^{-7}、8×10^{-8} mol • L^{-1} 的 TMZ 进行检测，结果如图 8 所示。由图 8a 可以看出，随着被测物浓度增大，峰电流不断增加；由图 8b 可知峰电流值（μA）与 TMZ 浓度（μmol • L^{-1}）的线性良好，峰 1 的拟合方程为 $y = 10.2293x + 66.6245$，$R^2 = 0.9702$；峰 2 的拟合方程为 $y = 9.1504x + 54.0353$，$R^2 = 0.9269$，以信噪比 $S/N = 3$ 为检测限，结果检测限为 8×10^{-9} mol • L^{-1}。

3.5　Au/MWCNTs 修饰电极的重现性以及抗干扰能力

在最佳条件下，用同一根玻碳电极，对其表面重复 7 次修饰，对 1×10^{-6} mol • L^{-1} TMZ 进行了 7 次 DPV 检测，结果如图 9 所示，得到该 Au/MWCNTs 修饰电极的峰电流值，7 次重复实验所得的峰 1 和峰 2 相对标准偏差（*RSD*）分别为 5.5%

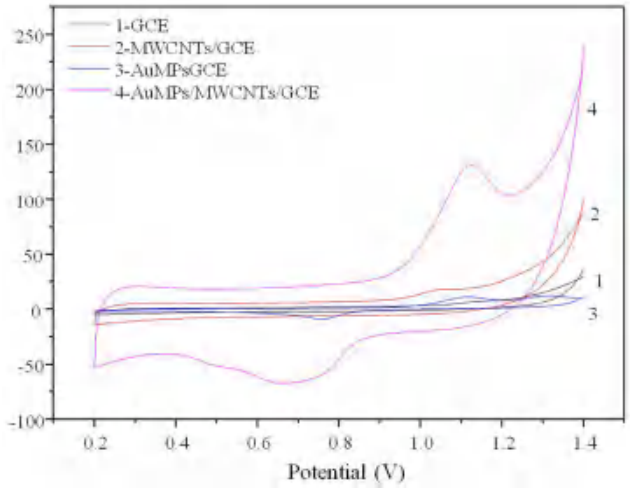


图 5 不同修饰电极在 TMZ 溶液中的循环伏安曲线

Fig 5 Cyclic voltammetry curves of different electrodes in TMZ solution

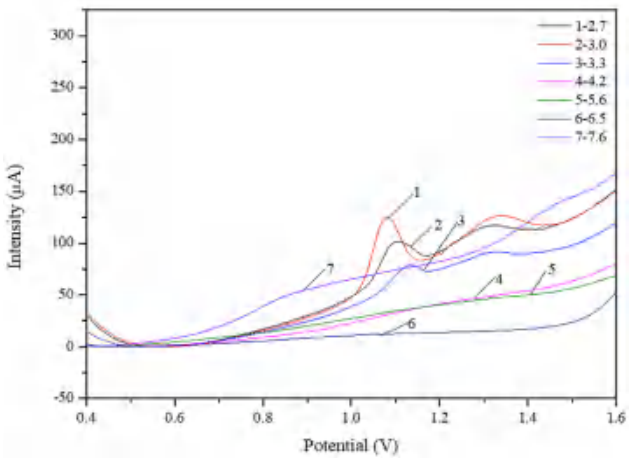


图 6 缓冲溶液不同 pH 下的 DPV 图

Fig 6 DPV curves at different pH of buffer solution

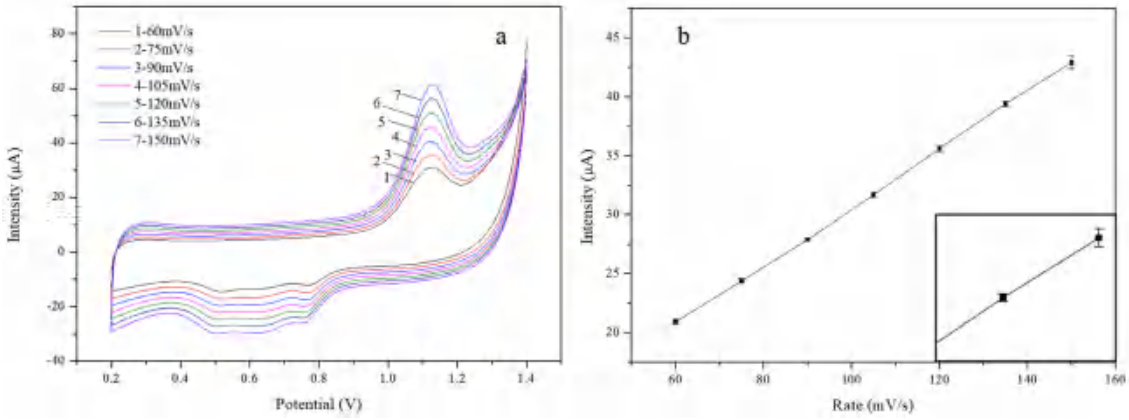


图 7 不同扫描速度下的循环伏安图（a）及扫描速度和峰电流的折线图（b）

Fig 7 Cyclic voltammetry diagram at different sweep speeds（a）and line diagram of sweep speed and peak current（b）

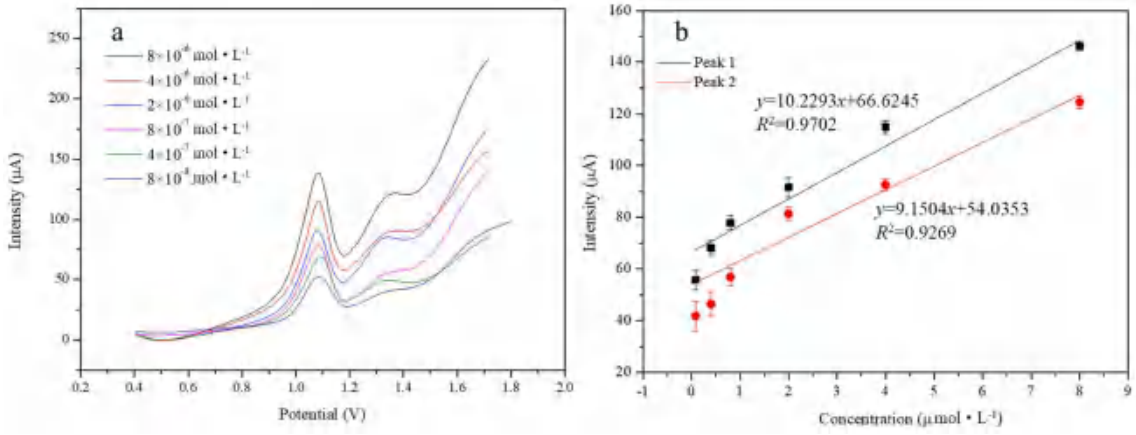


图 8 不同浓度的差分脉冲曲线图（a）以及标准曲线图（b）

Fig 8 Differential pulse curves of different concentrations（a）and standard curves（b）

和 4.8%。表明所制备的电极具有良好的重现性。

实验研究了在 AA、DA 和 UA 等存在下，该电极的抗干扰能力。加入样品浓度 50 倍浓度的 AA、DA 和 UA，进行检测。结果如图 10a 所示，AA 在 0.2 V 左右出峰，DA 在 0.4 V 左右出峰，UA 在 0.6 V 左右出峰，4 种物质的峰分离完全。在改变 UA 浓度时，TMZ 在 1.1 V 左右出峰，UA 的峰电流随着其浓度的增大而增大，TMZ 的峰电流强度基本保持不变，这表明该电极具有良好的抗干扰能力，见图 10b。

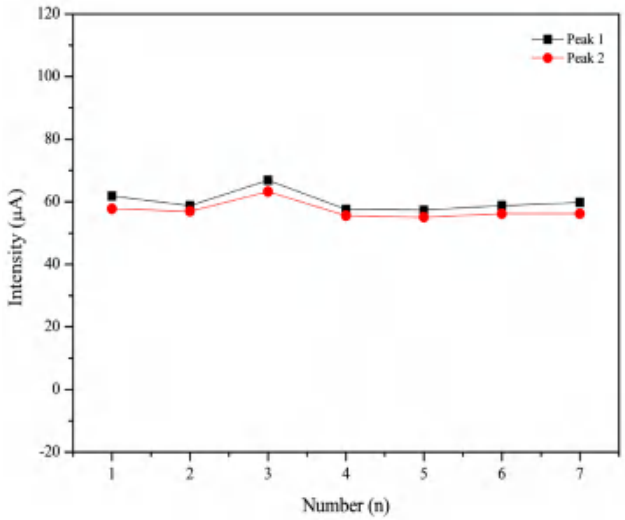


图 9　1×10^{-6} mol・L^{-1} TMZ 的 7 次 DPV 测试

Fig 9　7 DPV tests for 1×10^{-6} mol・L^{-1} TMZ

3.6　实际样品检测

如表 1 和图 11 所示，所得加标回收率为 100.5% ～ 105.4%，表明采用该电极检测人体尿液中的 TMZ 具有可行性。

表 1　加标检测人体尿液中的 TMZ

Tab 1　Detection of TMZ in human urine by spiking

样品	加标浓度 /（μmol・L^{-1}）	测得浓度 /（μmol・L^{-1}）	回收率 /%	*RSD*/%
尿液 1	1.000	1.054	105.4	1.2
尿液 2	0.500	0.510	102.0	3.2
尿液 3	0.100	0.1005	100.5	3.8

4　结论

本文采用微流控方法制备了 AuMPs，该方法的试剂损失少，操作简便快速。并制备了一种新型的检测 TMZ 的电化学传感器，该传感器对质分离效果明显。用该电极对人体尿液进行检测，加标回收率在 100.5% ～ 105.4%，其可应用于实际样品中 TMZ 含量的测定，有望推广用于兴奋剂的检测。

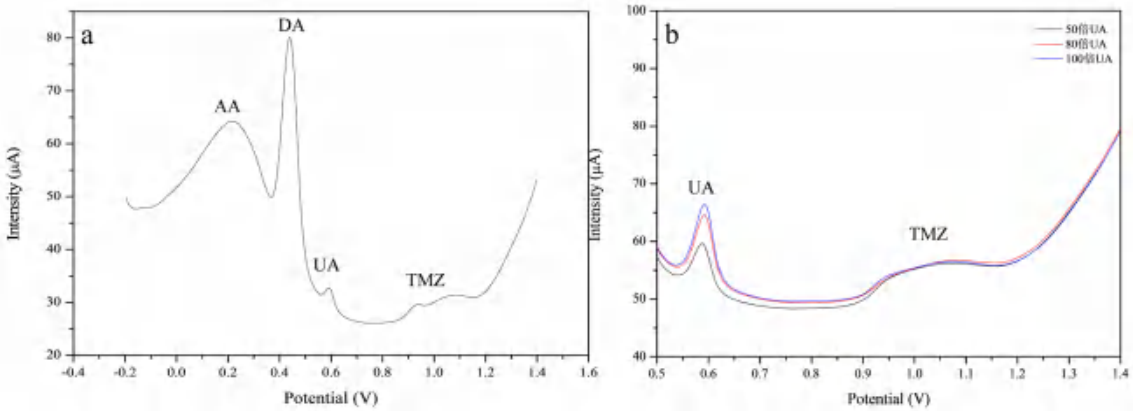


图 10　修饰电极在 AA、DA、UA 中的抗干扰能力测试

Fig 10　Anti-interference ability of modified electrode in AA，DA and UA

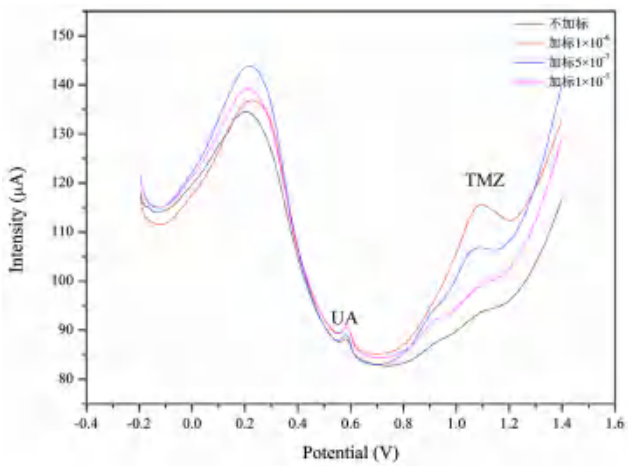


图 11　健康人体尿液中 TMZ 检测

Fig 11　Detection of TMZ in healthy human urine

TMZ 检测的灵敏度高，且浓度与相应信号值表现出良好的线性关系，检测限低。在所优化的最佳条件下进行了修饰电极的重现性和选择性能力测试。该电极具有强选择性，对于加入的抗干扰物

参考文献

[1] Fan S，Ji L，Mao GL，et al. Voltammetric behavior of trimetazidine hydrochloride at preanodized carbon paste electrode and its determination in pharmaceutical formulations [J]. Int J Electrochem Sci，2021，16（2）：32.

[2] Kallistratos MS，Poulimenos LE，Giannitsi S，et al. Trimetazidine in the prevention of tissue ischemic conditions [J]. Angiology，2019，70（4）：291-298.

[3] Okano M，Miyamoto A，Ota M，et al. Doping control analysis of trimetazidine in dried blood spot [J]. Drug Test Anal，2022. doi: 10.1002/dta.3414.

[4] 张祥，朱汀 . 曲美他嗪辅助治疗冠心病合并心力衰竭的前瞻性随机研究 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志，2023，7（3）：17-20.

[5] Anna J，Marzena W，Dorota K，et al. The prevalence

of trimetazidine use in athletes in Poland：excretion study after oral drug administration [J]. Drug Test Anal，2014，6：1191-1196.

[6] 柴利萍，苗培果 . 分光光度法在药物分析中的应用研究 [J]. 化工时刊，2021，35（1）：21-23.

[7] Issa YM，Abou-Attia FM，Abdel-Gawad FM，et al. Utility of some π-acceptors for the spectrophotometric determination of trmetazidine gydrochloride [J]. Anal Lett，2002，35（2）：451-461.

[8] Jain HK，Deore DD. Development and validation of spectrophotometric method for determination of trimetazidine hydrochloride in bulk and tablet dosage form [J]. Res J Pharm Pharmacol，2016，9（9）：1457-1460.

[9] 王静，曹鲁娜，赵蕊蕊，等 . 高效液相色谱法在药品安全检验中的应用 [J]. 中国标准化，2022，611（7）：128.

[10] Zou JJ，Dai L，Wang GJ，et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of trimetazidine in human plasma [J]. Arzneim-Forsch，2008，58（9）：429-434.

[11] Jeoung MK，Kim KS，Kim CS，et al. An HPLC determination of trimetazidine in human plasma using liquid - liquid extraction for sample clean-up [J]. J Liq Chromatogr Related Technol，2005，28（9）：1299-1309.

[12] Dindar CK，Kabir Z，Uslu B. Green electrochemical sensor for drug analysis [J]. ACS Symp Ser，2023，1437（13）：307.

[13] Guerraf AE，Bakirhan NK，Jadi SB，et al. PEDOT for sensitive electrochemical detection of trimeta-zidine hydrochloride in biological fluids：synthesis，characterization and mechanism insights [J]. J Electrochem Soc，2021，167（16）：167525.

[14] 李堃，苏敏，杨倩，等 . 电化学制备碳纳米管负载镍 - 铁氢氧化物电极检测尿素 [J]. 分析试验室，2022，41（7）：808.

[15] Yang C，Hu KK，Wang DC，et al. Cavity carbon-nanopipette electrodes for dopamine detection [J]. Anal Chem，2019，91（7）：4618-4624.

[16] Xv LL，Jiao XY，Shi C. Single-walled carbon nanotube/copper core-shell fibers with a high specific electrical conductivity [J]. ACS Nano，2023，17（10）：9245-9254.

[17] Muhamed S，Aparna RK，Karmakar A. Immobilization of gold nanoparticles on postsynthetically modified NU-1000 for hydrogen evolution reaction [J]. Inorg Chem，2023，62（19）：7195-7202.

[18] 许瑞呈，叶思远，尤蓉蓉，等 . 微流控制备纳米药物载体的研究进展 [J]. 传感器与微系统，2021，40（10）：1-4，9.

[19] 田启凯，郑海萍，张少斌，等 . 混合增强的微流控通道进展 [J]. 化工进展，2023，42（4）：1677-1687.

[20] Yang JH，Chng LL，Yang XF，et al. Multiply-twinned intermetallic AuCu pentagonal nanorods [J]. Chem Commun，2014，50（9）：1141-1143

[21] Singh V，Singh RJ. Voltage-driven microfluidic synthesis of magnetite and gold nanomaterials [J]. J Flow Chem，2022，12（3）：255-261.

[22] Xia H，Li JY，Man J，et al. Recent progress in preparation of functional microparticles based on microfluidic technique [J]. Mater Today Commun，2021，8（29）：102740.

[23] Meeseepong M，Ghosh G，Shrivastava S，et al. Fluorescence-enhanced eicrofluidic biosensor platform based on magnetic beads with highly stable ZnO nanorods for biomarker detection [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2023，15（18）：21754-21765.

[24] Xiang XR，Song MH，Xu XW. Microfluidic Biosensor integrated with signal transduction and enhancement mechanism for ultrasensitive noncompetitive assay of multiple mycotoxins [J]. Anal Chem，2023，95（20）：7993-8001.

[25] 许贺，滕军，黄金烨，等 . 聚罗丹明 B/ 碳纳米管修饰玻碳电极对亚硝酸盐的灵敏检测 [J]. 分析测试学报 . 2018，37（4）：427-433.

[26] 蒋疆，庄启钊，邓诗婷，等 . 碳量子点 / 纳米金 @ 碳纳米管修饰电极同时检测鸟嘌呤和腺嘌呤 [J]. 分析试验室，2021，40（12）：1419-1424.

[27] Liu GJ，Yang XH，Li Y，et al. Continuous flow controlled synthesis of gold nanoparticles using pulsed mixing microfluidic system [J]. Adv Mater Sci Eng，2015，1155（10）：160819.

[28] Boken J，Kumar D，Dalela S. Synthesis of nanoparticles for plasmonics applications：a microfluidic approach [J]. Synth React Inorg M，2015，45（8）：1211-1223.

[29] 孙伯禄，蔡金颖，李玳，等 . 用于毛蕊异黄酮痕量分析的电化学传感器研究 [J]. 分析化学，2019，47（2）：271-280.

[30] 杨莉莉，王婷婷，鲍昌昊，等 . 线状纳米金修饰碳纤维超微电极检测芦荟大黄素 [J]. 分析测试学报，2020，39（3）：401-405.

（收稿日期：2023-08-24；修回日期：2023-10-11）

基于 HPLC-Q-Exactive-MS 技术定性分析冠心七味片的化学成分

刘成东[1]，郭俊英[2]，李君[1]，李雨欣[3]，陆景坤[3]，布仁[1]，郑海英[4]，王跃武[1*]（1. 内蒙古医科大学药学院，呼和浩特　010010；2. 武警内蒙古自治区总队医院药剂科，呼和浩特　010010；3. 内蒙古医科大学基础医学院，呼和浩特　010010；4. 内蒙古医科大学附属医院心内科，呼和浩特　010010）

摘要：目的　采用高效液相色谱 - 四极杆 / 静电场轨道阱高分辨质谱（HPLC-Q-Exactive-MS）技术对冠心七味片的主要成分进行快速、全面的定性分析。**方法**　采用 Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm），流动相为甲醇（A）-0.5% 甲酸水（B），流速为 1.0 mL • min^{-1}，柱温 35 ℃，进样量 10 μL，质谱采用正、负离子扫描模式，扫描范围 *m/z* 110 ～ 1200。基于化合物的精确质荷比、二级质谱裂解碎片，结合自建数据库比对所含成分进行分析鉴定。**结果**　在冠心七味片中共鉴定出 67 个化合物，包括 30 个黄酮类、18 个有机酸类、8 个萜类、5 个木脂素类、4 个香豆素类、2 个其他类化合物。**结论**　该 HPLC-Q-Exactive-MS 方法能够对冠心七味片化学成分进行全面、快速定性分析，为其质量控制、药效物质基础研究提供基础。

关键词：冠心七味片；化学成分；定性分析

中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0691-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.022

Qualitative analysis of chemical constituents of Guanxin Qiwei tablets based on HPLC-Q-Exactive-MS technique

LIU Cheng-dong[1], GUO Jun-ying[2], LI Jun[1], LI Yu-xin[3], LU Jing-kun[3], BU Ren[1], ZHENG Hai-ying[4], WANG Yue-wu[1*] (1. *School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010010; 2. *Department of Pharmacy, Armed Police General Hospital in Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot* 010010; 3. *School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010010; 4. *Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010010)

Abstract: Objective　To rapidly and comprehensively determine the main components of Guanxin Qiwei tablets by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbit-trap high resolution mass spectrometry (HPLC-Q-Exactive-MS). **Methods**　The chromatography was performed on an Agilent ZORBAX SB-Aq column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of methanol (A)-0.5% formic acid water (B) at 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 35 ℃ and the sample size was 10 μL. Positive and negative ion scanning modes were used for the mass spectrometry. Scanning range of *m/z* was 110 to 1200. Based on the precise mass charge ratio and secondary mass spectrometry of the compounds, the analysis and identification of the components were conducted with the self-built database. **Results**　Totally 67 compounds, including 30 flavonoids, 18 organic acids, 8 terpenoids, 5 lignans, 4 coumarins and 2 other compounds were identified in Guanxin Qiwei tablets. **Conclusion**　The HPLC-Q-Exactive-MS method can rapidly and comprehensively analyze the chemical components in Guanxin Qiwei tablets, which provides

基金项目：内蒙古自治区科技计划项目（No. 2023YFHH0082）；内蒙古医科大学面上项目（No.YKD2024MS015）；内蒙古自治区蒙医药协同创新中心成果转化培育项目（No.MYYXTPY202306）；内蒙古自然科学基金项目（No. 2020MS08045）。

作者简介：刘成东，男，硕士研究生，主要从事中药质量控制方法研究，email：2858209687@qq.com　*通信作者：王跃武，男，博士，主要从事抗肿瘤蒙药和心血管蒙药的医院制剂研究开发，email：wywimmu@163.com

reference for the quality control and research on pharmacodynamic substances.

Key words: Guanxin Qiwei tablet; chemical composition; qualitative analysis

冠心七味片由丹参、檀香、降香、山柰、肉豆蔻、广枣和沙棘 7 味药材组成[1]，蒙药名为乌兰·温都顺片[2]，主治活血化瘀、强心止痛，临床用于冠心病、心烦心悸、心绞痛的治疗[3]。方中丹参药性苦寒，归心、肝经，有活血化瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈的基本功效，为“调理血分之首药”和“调经产后要药”[4]；檀香、降香、肉豆蔻、山柰、广枣、沙棘均为辛温药，有化瘀止血、温中行气活血、理气止痛等功效[5-10]。现代药理学研究表明，丹参主要成分为丹参酮和丹酚酸，具有抗凝血、抗血栓形成、改善微循环等多种药理作用[11]；檀香具有缓解静脉曲张、增强免疫功能功效[12]；降香、山柰、肉豆蔻中的挥发油成分，具有镇静、镇痛、抗炎、抗肿瘤多种药理作用[13-15]；广枣和沙棘等含有黄酮类成分，具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂等作用[16-17]。

目前，对冠心七味片化学成分的研究仅限于单味药材，尚无相关文献对其化学成分进行系统研究。HPLC-Q-Exactive-MS 技术具有高分辨率、高灵敏度、高效性、高选择性等优点[18]，广泛应用于传统制剂定性与定量分析等领域。鉴于此，本研究采用 HPLC-Q-Exactive-MS 技术对冠心七味片所含化学成分进行系统分析，根据色谱峰、一级质谱、二级碎片离子等信息，通过 TCMSP 数据库、PubChem 数据库、文献数据、对化学成分的结构进行鉴定分析，为今后该制剂的质量评价、药效物质基础研究提供系统的数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

HPLC-Q-Exactive 型高效液相色谱 - 质谱联用系统仪 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；AP135 W 型十万分之一电子天平（日本 Shimadzu 公司）；DS-7510DTH 型数控超声波清洗器（上海生析超声仪器有限公司）。

1.2 试药

冠心七味片（包头中药有限公司，批号：20210907，规格：0.31 g/ 片）；木犀草素（批号：DSTDM003201，纯度 ≥ 98.0%，成都德思特生物科技有限公司）；槲皮素（批号：100081-201610，纯度 ≥ 99.1%）、丹参酮 ⅡA（批号：110766-202323，纯度 ≥ 99.5%）、丹参酮 Ⅰ（批号：110867-201607，供鉴别用）、阿魏酸（批号：110773-201915，纯度 ≥ 99.4%）、原儿茶酸（批号：110809-202207，纯度 ≥ 97.5%）对照品（中国食品药品检定研究院），甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯；水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法

2.1 色谱 - 质谱条件

色谱柱为 Agilent ZORB-AX SB-Aq（4.6 mm× 150 mm，5 μm），流动相为甲醇（A）-0.1% 甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，5%A；5 ～ 12 min，5% → 34%A；12 ～ 16 min，34% → 65%A；16 ～ 20 min，65% → 70%A；20 ～ 25 min，70% ～ 85%A；25 ～ 35 min，85% ～ 95%A；35 ～ 40 min，95%A），流速为 1.0 mL • min^{-1}，柱温为 35 ℃，进样量为 10 μL。

采用电喷雾离子源（ESI），在正负离子检测模式下检测，检测方式为 Full MS/dd-MS^2，Full MS 分辨率为 70 000，dd-MS^2 分辨率为 17 500，扫描范围为 *m/z* 110 ～ 1200，碰撞能量设置为 30 eV，喷雾电压：3.80 kV（＋）和 3.20 kV（－），离子传输管温度 300 ℃（＋）和 400 ℃（－），辅助气温度 320 ℃，辅助气流速 30 L • min^{-1}。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 6 个对照品适量，置于不同 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容，配制成丹参酮 Ⅰ、丹参酮 ⅡA、槲皮素、原儿茶酸、木犀草素、阿魏酸质量浓度分别为 351.00、326.00、427.00、520.00、360.00、420.00 μg • mL^{-1} 的母液，分别精密量取上述母液各 100 μL 置于同一 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释，得到质量浓度分别为 3.51、3.26、4.27、5.20、3.60、4.20 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，4 ℃储存备用。

2.3 供试品溶液制备

取冠心七味片研磨成粉，过四号筛，称取 2.000 g 置 50 mL 锥形瓶中，加入 90% 甲醇 10 mL，密封，超声 30 min（功率 200 W，频率 50 kHz），待冷却至室温，90% 甲醇补重，摇匀，过 0.22 μm 滤膜过滤即得。

2.4 数据处理与分析

通过万方、中国知网、TCMSP、PubChem 等数据平台查找冠心七味片中丹参、檀香、降香、

山柰、肉豆蔻、广枣、沙棘的化学成分、质谱碎片信息，并创建包括化合物名称、分子式、多级质谱碎片等信息的数据库。在此基础上，对冠心七味片溶液在正、负离子模式下获得的总离子流数据进行峰提取并拟合精确相对分子质量，通过与数据库进行比对，选择误差（δ）在 ±10 ppm（1 ppm ＝ 1×10^{-6}）以内的化合物，初步对冠心七味片中的化合物进行指认，其中 6 个成分经对照品比对进一步得到确认。

3　结果

3.1　冠心七味片化学成分鉴定

取“2.3”项下的样品溶液，在“2.1”项条件下进样分析，得到冠心七味片样品溶液正、负离子模式下总离子流图（见图 1），根据在“2.4”项下方法对所得样品数据进行分析，结果在冠心七味片中鉴别得到 67 个化学成分，包括 30 个黄酮类、18 个有机酸类、8 个萜类、5 个木脂素类、4 个苯丙素类和 2 个其他类，结果见表 1[19-25]。

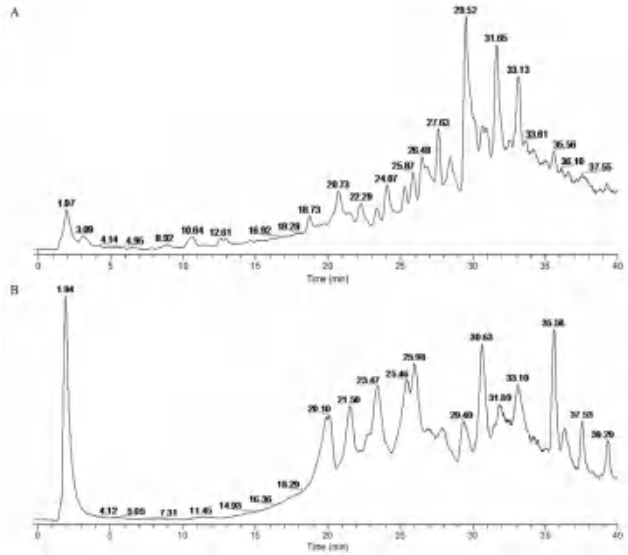


图 1　冠心七味片 HPLC-Q-Exactive-MS 正离子模式（A）和负离子模式（B）的总离子流图

Fig 1　Total ion flow diagram of HPLC-Q-Exactive-MS of Guanxin Qiwei tablets in positive ion mode（A）and in negative ion mode（B）

3.2　有机酸类成分

冠心七味片中共鉴定出 18 个有机酸类化合物，此类化合物有酚羟基、羟基、羧基等取代基，经过能量碰撞后容易丢失 OH、H_2O、CO 等碎片，以 **4** 号化合物（奎宁酸）为例进行说明：**4** 号化合物在负离子模式下可见 $[M-H]^-$ *m/z* 191.0552 准分子离子峰，Xcalibur 3.0 软件拟合其分子式为 $C_7H_{12}O_6$，主要碎片离子有 *m/z* 127.0387$[M-H-2H_2O-CO]^-$、*m/z* 93.0331$[M-H-2H_2O-CO-2OH]^-$，即准分子离子峰失去两个 H_2O 和一个 CO 得到 *m/z* 127.0387 碎片离子，进一步失去两个 OH 获得 *m/z* 93.0331，通过化合物的裂解规律、文献比对[23，26]，确认 **4** 号化合物为奎宁酸，其 MS^2 图及可能的裂解途径见图 2。

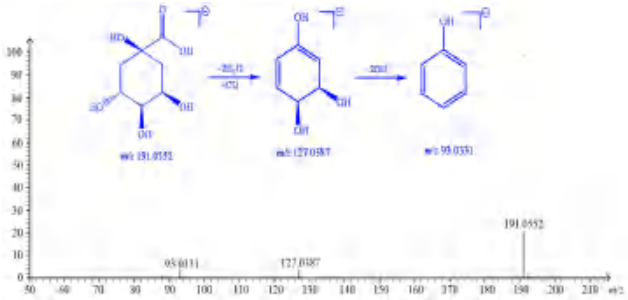


图 2　负离子模式下化合物 **4** 的 MS^2 图及可能的裂解途径

Fig 2　MS^2 diagram of compound **4** in negative ion mode and its possible fragmentation pathway

3.3　黄酮类成分

冠心七味片中鉴定出了 30 个黄酮类成分。黄酮类化合物多为结晶性固体，少数为无定形粉末（黄酮苷类）。黄酮化合物的母核易发生逆狄尔斯 - 阿德尔反应（RDA）裂解，其中黄酮分子经能量碰撞后产生的碎片质量与黄酮 A、B 环上的取代基有很大的关系，黄酮分子离子峰丢失 H_2O、CO_2、CO 等碎片的丰度也主要受 A、B 环上取代基的影响。以 **22** 号化合物（木犀草素）为例进行说明：**22** 号化合物在负离子模式下可见 $[M-H]^-$ *m/z* 285.0406 准分子离子峰，其分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$，主要碎片离子有 *m/z* 241.0494$[M-H-CO]^-$、*m/z* 151.0025$[M-H-C_7H_4O_4]^-$、*m/z* 133.0280$[M-H-C_8H_6O_2]^-$，即准分子离子峰通过 RDA 反应得到 *m/z* 151.0025 和 *m/z* 133.0280 碎片离子。该准分子离子峰失去一个 CO 得到 *m/z* 241.0494 碎片离子，通过化合物的裂解规律、文献比对[23，27]，确认 **22** 号化合物为木犀草素，其 MS^2 图及可能的裂解途径见图 3。

3.4　萜类化合物

冠心七味片中鉴定出了 8 个萜类成分，萜类物质的结构里主要有羰基、酰基、羟基等取代基，经过能量碰撞后容易丢失 CH_3、H_2O、CO 等碎片。以 **66** 号化合物（丹参酮 ⅡA）为例进行说明：**66** 号化合物在正离子模式下可见 $[M+H]^+$ *m/z* 295.1312 准分子离子峰，Xcalibur 3.0 软件拟合其分子式为 $C_{19}H_{18}O_3$，以 *m/z* 280.1075$[M+H-CH_3]^+$、*m/z* 277.1207$[M+H-H_2O]^+$、*m/z* 266.0923$[M+H-CHO]^+$、*m/z* 262.0982[M ＋

表 1 冠心七味片化学成分的 HPLC-Q-Exactive-MS 分析结果

Tab 1 HPLC-Q-Exactive-MS analysis of Guanxin Qiwei tablets

No.	化合物	分子式	t_R/min	离子模式	理论值	实测值	$\delta/\times10^{-6}$	碎片离子	分类	来源
1	苹果酸 [23]	$C_4H_6O_5$	1.78	$[M-H]^-$	133.0142	133.0129	−2.03	71.0123，73.9950，115.0022	有机酸类	GZ
2	柠檬酸甲酯 [23]	$C_7H_{10}O_7$	2.01	$[M-H]^-$	205.0354	205.0342	−0.19	87.0073，111.0073，143.0336，173.0085	有机酸类	GZ
3	柠檬酸三乙酯 [23]	$C_8H_{12}O_7$	2.02	$[M-H]^-$	219.0510	219.0500	0.42	87.0072，111.0073，157.0493，173.0077	有机酸类	GZ
4	奎宁酸 [23]	$C_7H_{12}O_6$	2.30	$[M-H]^-$	191.0561	191.0552	0.87	93.0331，127.0387	有机酸类	GZ
5	没食子酸 [23]	$C_7H_6O_5$	2.40	$[M-H]^-$	169.0142	169.0130	−0.77	78.9576，125.0230	有机酸类	GZ
6	5-羟甲基糠醛 [23]	$C_6H_6O_3$	2.94	$[M+H]^+$	127.0390	127.0384	−4.41	81.0336，109.0280	其他	GZ
7*	原儿茶酸 [23]	$C_7H_6O_4$	9.89	$[M-H]^-$	153.0193	153.0181	−0.69	81.0331，91.0175，108.0202，109.0281	有机酸类	GZ
8	2-异丙基苹果酸 [23]	$C_7H_{12}O_5$	13.67	$[M-H]^-$	175.0612	175.0603	0.91	85.0645，113.0595，115.0387	有机酸类	GZ
9	咖啡酸 [19]	$C_9H_8O_4$	14.70	$[M-H]^-$	179.0350	179.0340	0.70	135.0439，179.0340	有机酸类	DS
10	丹参素 [19]	$C_9H_{10}O_5$	15.88	$[M-H]^-$	197.0455	197.0447	1.37	135.0441，179.0339，197.0447	有机酸类	DS
11	二氢非瑟素 [24]	$C_{15}H_{12}O_6$	16.75	$[M-H]^-$	287.0561	287.0560	3.54	109.0281，121.0282，135.0438，149.0231，163.0024，225.0549，241.0512，259.0603，269.0455，287.0560	黄酮类	JX
12	丹酚酸 G[19]	$C_{18}H_{12}O_7$	17.97	$[M-H]^-$	339.0510	339.0499	−0.09	267.0653，295.0609，311.0913，339.0499	有机酸类	DS
13	东莨菪素 [23]	$C_{10}H_8O_4$	18.51	$[M+H]^+$	193.0495	193.0486	−5.10	122.0643，133.0642，150.0240，178.0254	苯丙素类	GZ
14	山柰酚 [25]	$C_{15}H_{10}O_6$	19.12	$[M+H]^+$	287.0550	287.0531	−6.57	153.0538，165.0563，258.0841，286.0769，287.0531，289.1380	黄酮类	SN
15	7，3'，4-trihydroxyflavone [24]	$C_{15}H_{10}O_5$	20.08	$[M-H]^-$	269.0455	269.0457	4.46	133.0286，135.0439，159.0439，213.0549，241.0503，269.0457	黄酮类	JX
16	鞣花酸 [25]	$C_{14}H_6O_8$	20.16	$[M-H]^-$	300.9990	300.9988	3.05	185.0233，229.0143，257.0089，283.0610	有机酸类	SN
17*	槲皮素 [23]	$C_{15}H_{10}O_7$	20.51	$[M+H]^+$	303.0499	303.0483	−5.44	107.0487，121.0284，151.0380，179.0331	黄酮类	GZ
18	漆黄素 [24]	$C_{15}H_{10}O_6$	20.56	$[M-H]^-$	285.0405	285.0406	4.30	121.0283，135.0439，149.0233，163.0022，211.1123，239.0704，239.0704，257.0459，285.0406	黄酮类	JX
19	甘草素 [24]	$C_{15}H_{12}O_4$	20.66	$[M-H]^-$	255.0662	255.0660	3.27	119.0489，135.0076，255.0660	黄酮类	JX
20*	阿魏酸 [23]	$C_{10}H_{10}O_4$	20.77	$[M-H]^-$	193.0506	193.0502	3.44	134.0360，178.0263，193.0502	有机酸类	GZ
21	染料木素 [24]	$C_{15}H_{10}O_5$	20.79	$[M-H]^-$	269.0455	269.0456	4.24	133.0282，135.0439，159.0442，201.0562，224.0472，269.0456	黄酮类	JX
22*	木犀草素 [24]	$C_{15}H_{10}O_6$	20.86	$[M-H]^-$	285.0405	285.0406	4.41	133.0280，151.0025，241.0494	黄酮类	JX
23	紫铆因 [24]	$C_{15}H_{12}O_5$	20.97	$[M-H]^-$	271.0612	271.0615	5.24	134.0313，135.0439，271.0615	黄酮类	JX
24	瑞斯蒂酮 [24]	$C_{16}H_{14}O_5$	21.12	$[M-H]^-$	285.0768	285.0768	3.61	134.0363，135.0439，149.0233，227.1073，241.0490，270.0536，285.0768	黄酮类	JX
25	豌豆查耳酮 B[24]	$C_{16}H_{12}O_5$	21.13	$[M-H]^-$	283.0612	283.0613	4.28	135.0075，195.0442，211.0398，224.0472，240.0422，268.0376，283.0613	黄酮类	JX
26	melanettin[24]	$C_{16}H_{12}O_5$	21.13	$[M-H]^-$	283.0612	283.0613	4.28	195.0442，196.0524，211.0398，224.0472，239.0353，240.0422，267.1028，268.0376，283.0613	苯丙素类	JX
27	myrisfrageal B[21-22]	$C_{19}H_{18}O_6$	21.22	$[M+H]^+$	343.1176	343.1167	−2.58	107.0489，123.0436，133.1036，163.0381，325.1050，343.1167	木脂素类	RDK

续表 1

No.	化合物	分子式	t_R/min	离子模式	理论值	实测值	$\delta/\times10^{-6}$	碎片离子	分类	来源
28	olibergin A[24]	$C_{17}H_{14}O_7$	21.33	[M-H]$^-$	329.0667	329.0664	2.43	135.0075，193.1018，227.1072，243.0298，255.1021，299.0202，314.0440，329.0664	黄酮类	JX
29	2，2'，5-trihydroxy-4-methoxybenzophenone[24]	$C_{14}H_{12}O_5$	21.37	[M-H]$^-$	259.0612	259.0607	2.43	171.0804，187.0388，243.0290，244.0374，259.0607	有机酸类	JX
30	2，4-dihydroxy-5-methoxybenzophenone[24]	$C_{14}H_{12}O_4$	21.58	[M-H]$^-$	243.0663	243.0654	0.92	199.1333，243.0654	有机酸类	JX
31	melannoin[24]	$C_{14}H_{12}O_5$	21.91	[M-H]$^-$	259.0612	259.0615	5.48	109.0283，123.0074，137.0233，151.0025，165.0184，244.0372	有机酸类	JX
32	（3*R*）-3'，8-dihydroxy vestitol[24]	$C_{16}H_{16}O_6$	22.11	[M-H]$^-$	303.0874	303.0883	6.42	109.0281，123.0072，137.0234，150.0311，151.0389，165.0545，270.0533，288.0644，303.0882	黄酮类	JX
33	2-2-（2，4-dimethoxyphenyl）-2-oxoethoxy-4-hydrobenzoic acid[24]	$C_{17}H_{16}O_7$	22.30	[M-H]$^-$	331.0823	331.0817	1.33	124.0154，139.0387，176.0102，191.0339，255.0281，273.0783，301.0327，316.0579，331.0817	有机酸类	JX
34	大豆苷 [24]	$C_{15}H_{10}O_4$	22.36	[M-H]$^-$	253.0506	253.0504	3.34	117.0336，135.0076，223.0274，225.0550，253.0504	黄酮类	JX
35	异荭草素 [24]	$C_{21}H_{20}O_{11}$	22.57	[M-H]$^-$	447.0933	447.0942	4.46	149.0595，177.0184，447.0942	黄酮类	JX
36	2，3-dimeth oxyxanthone[24]	$C_{15}H_{12}O_4$	22.60	[M-H]$^-$	255.0663	255.0662	3.78	137.0230，181.0647，193.0659，209.0603，211.0760，227.0714，237.0554，240.0422，255.0662	黄酮类	JX
37	3'-*O*-methylviolanone[24]	$C_{18}H_{18}O_6$	22.70	[M-H]$^-$	329.1031	329.1037	5.18	135.0075，148.0155，161.0231，284.0664，299.0199，314.0432，329.1037	黄酮类	JX
38	紫苜蓿酮 [24]	$C_{17}H_{16}O_5$	22.94	[M-H]$^-$	299.0925	299.0923	3.08	135.0075，161.0234，241.1425，269.0456，283.0601，299.0923	黄酮类	JX
39	5，7-dihydroxy-2'，3'，4'-trimethoxyisoflavanone[24]	$C_{18}H_{18}O_7$	23.00	[M-H]$^-$	345.0980	345.0979	2.87	135.0074，151.0390，177.0181，295.0586，315.0489，330.0746，345.0979	黄酮类	JX
40	（3*R*）-7，3'-dihydroxy-6，2'，4'-trimethoxyisoflavanone[24]	$C_{18}H_{18}O_7$	23.26	[M-H]$^-$	345.0950	345.0981	3.39	149.3323，150.0315，271.0608，285.1492，301.1809，315.0504，330.0741，345.0981	黄酮类	JX
41	3-hydroxyvestitone[24]	$C_{16}H_{14}O_6$	23.36	[M-H]$^-$	301.0718	301.0714	2.38	135.0440，151.0026，168.0055，286.0473，301.0714	黄酮类	JX
42	高圣草酚 [24]	$C_{16}H_{14}O_6$	23.75	[M-H]$^-$	301.0718	301.0710	1.15	121.0282，135.0440，149.0236，177.0139，178.9976，211.0396，240.0419，268.0369，283.1693	黄酮类	JX
43	3'-hydroxy-8-methoxy vestitol[24]	$C_{17}H_{18}O_6$	23.91	[M-H]$^-$	317.1031	317.1036	5.19	124.0152，136.0154，150.0311，165.0546，269.0469，287.0569，302.0797，317.1036	黄酮类	JX
44	4，7，2'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavanol[24]	$C_{16}H_{16}O_5$	24.17	[M-H]$^-$	287.0925	287.0924	3.62	135.0439，137.0236，150.0308，165.0546，211.0404，229.0832，240.0406，257.0692，272.0676，287.0924	黄酮类	JX
45	2'-methoxyisoliquiritigenin[24]	$C_{16}H_{14}O_4$	24.20	[M-H]$^-$	269.0819	269.0819	4.11	135.0439，226.0263，239.0345，254.0581，269.0819	黄酮类	JX
46	瑞斯蒂酚（±）[24]	$C_{16}H_{16}O_4$	24.74	[M-H]$^-$	271.0976	271.0975	3.74	109.0282，123.0438，135.0440，149.0597，197.0598，241.0492，256.0733，271.0975	黄酮类	JX

续表 1

No.	化合物	分子式	t_R/min	离子模式	理论值	实测值	$\delta/\times10^{-6}$	碎片离子	分类	来源
47	异鼠李素[25]	$C_{16}H_{12}O_7$	24.98	$[M-H]^-$	315.0510	315.0514	4.73	107.0131，151.0024，272.0319，283.0247，300.0277，301.0312	黄酮类	SN
48	pterolinus B[24]	$C_{16}H_{14}O_4$	25.16	$[M-H]^-$	269.0819	269.0820	4.22	221.9995，225.0528，239.0338，253.0463，254.0583，269.0820	其他	JX
49	2'，4'-dihydroxychalcone[24]	$C_{15}H_{12}O_3$	25.79	$[M-H]^-$	239.0714	239.0710	3.09	135.0075，197.0600，239.0710	黄酮类	JX
50	生松素[24]	$C_{15}H_{12}O_4$	26.7	$[M-H]^-$	255.0663	255.0661	3.47	107.0125，145.0646，151.0026，171.0439，185.0579，213.0553，255.0661	黄酮类	JX
51	7，8-dihydroxyflavanone[24]	$C_{15}H_{12}O_4$	27.69	$[M-H]^-$	255.0663	255.0661	3.70	107.0126，123.0076，151.0025，164.0097，185.0598，213.0551，227.0706，255.0661	黄酮类	JX
52	galbacin[21-22]	$C_{20}H_{20}O_5$	28.35	$[M+H]^+$	341.1384	341.1364	−5.69	151.0744，163.0734，203.1053	木脂素类	RDK
53	methyl eugenol[21]	$C_{11}H_{14}O_2$	28.49	$[M+H]^+$	179.1067	179.1056	−5.79	119.0849，151.0744，164.0821，179.1056	苯丙素类	RDK
54	丹参隐螺内酯[19]	$C_{18}H_{22}O_3$	28.56	$[M-H]^-$	285.1496	285.1495	3.57	239.1441，257.1539，285.1495	萜类	DS
55	肉豆蔻醚[21-22]	$C_{11}H_{12}O_3$	28.71	$[M+H]^+$	193.0859	193.0849	−5.55	105.0696，133.0642，165.0899，193.0849	苯丙素类	RDK
56	*α*-姜黄烯[21]	$C_{15}H_{22}$	28.75	$[M+H]^+$	203.1794	203.1783	−1.15	81.0700，95.0855，109.1009，147.1159，203.1783	萜类	TX
57*	丹参酮Ⅰ[19-20]	$C_{18}H_{12}O_3$	29.11	$[M+H]^+$	277.0859	277.0844	−5.56	178.0766，193.1002，203.0847，221.0947，231.0791，234.0660，249.0895	萜类	DS
58	myrisfrageal A[21-22]	$C_{18}H_{16}O_5$	29.32	$[M+H]^+$	313.1071	313.1040	−9.84	158.2093，203.1064，295.1301，314.1070	木脂素类	RDK
59	丹参新醌甲[19]	$C_{18}H_{16}O_4$	29.38	$[M-H]^-$	295.0976	295.0974	3.24	277.0872，295.0974	萜类	DS
60	丹参素 B[19]	$C_{18}H_{16}O_4$	29.38	$[M-H]^-$	295.0976	295.0974	3.24	262.0626，277.0872，295.0974	有机酸类	DS
61	dehydrodiisoeugenol[21]	$C_{20}H_{22}O_4$	29.38	$[M+H]^+$	327.1591	327.1571	−5.95	137.0590，171.0793，203.1054，314.0761，329.0991	木脂素类	RDK
62	丹参酮Ⅱ B[19-20]	$C_{19}H_{18}O_4$	30.43	$[M+H]^+$	311.1278	311.1265	−4.26	247.1102，250.0604，275.1050，293.1154，311.1265	萜类	DS
63	machilin A[21-22]	$C_{20}H_{22}O_4$	31.19	$[M+H]^+$	327.1591	327.1574	−5.03	137.0590，151.0745，171.0795，203.1054	木脂素类	RDK
64	隐丹参酮[19-20]	$C_{19}H_{20}O_3$	31.60	$[M+H]^+$	297.1485	297.1468	−5.73	279.1364，297.1468	萜类	DS
65	熊果酸[23]	$C_{30}H_{48}O_3$	32.22	$[M+H]^+$	457.3676	457.3717	8.98	81.0700，107.0851，135.1161，179.0696，293.1512	有机酸类	GZ
66*	丹参酮Ⅱ A[19-20]	$C_{19}H_{18}O_3$	33.34	$[M+H]^+$	295.1329	295.1312	−5.66	249.1258，262.0982，266.0923，277.1207，280.1075，295.1312	萜类	DS
67	次甲二氢丹参[19]	$C_{18}H_{16}O_3$	34.73	$[M-H]^-$	279.1027	279.1030	5.12	261.1351，279.1030	萜类	DS

注：*对照品验证的化合物；DS. 丹参；RDK. 肉豆蔻；GZ. 广枣；JX. 降香；SN. 山柰；TX. 檀香。

Note：*Compounds verified by reference；DS. *Salvia miltiorrhiza*；RDK. *Myristicae Semen*；GZ. *Fructus Choerospondiatis*；JX. *Dalbergia odorifera*；SN. *Rhizoma Kaempferiae*；TX. *Santalum album Linn.*

$H-H_2O-CH_3]^+$、*m/z* 249.1258$[M+H-H_2O-CO]^+$为主要离子峰，即准分子离子峰失去一个 H_2O 得到 *m/z* 277.1207 碎片离子，进一步失去一个 CO 和一个 CH_3 中性分子分别获得 *m/z* 249.1258 和 *m/z* 262.0982 碎片离子，该准分子离子峰还失去一个 CHO 和一个 CH_3 中性分子分别得到 *m/z* 266.0923 和 *m/z* 280.1075 碎片离子，*m/z* 280.1075 进一步失去一个 H_2O 得到 *m/z* 262.0982，通过化合物的裂解规律、文献比对[19，20，28]，确认 **66** 号化合物为丹参酮ⅡA，其 MS^2 图及可能的裂解途径见图 4。

3.5 苯丙素类化合物

冠心七味片中鉴定出了 9 个苯丙素类成分，其中有 5 个木脂素和 4 个香豆素。香豆素类化合物的

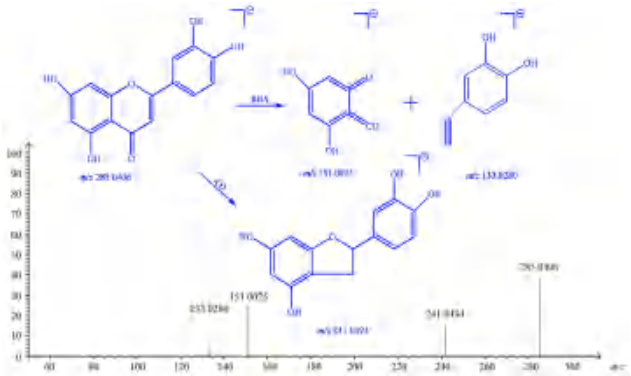


图 3　负离子模式下化合物 **22** 的 MS^2 图及可能的裂解途径

Fig 3　MS^2 diagram of compound **22** in negative ion mode and its possible fragmentation pathway

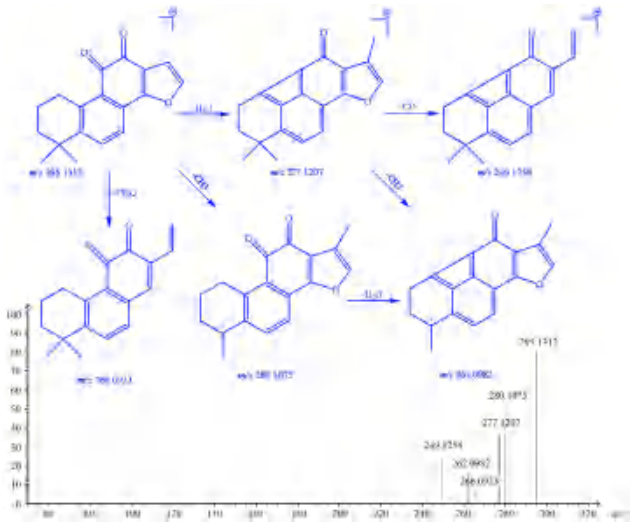


图 4　正离子模式下化合物 **66** 的 MS^2 图及可能的裂解途径

Fig 4　MS^2 diagram of compound **66** in positive ion mode and its possible fragmentation pathway

母核为苯骈 *α*-吡喃酮，经过能量碰撞后容易丢失 CH_3、CH_4、CO 等碎片形成呋喃酮、过氧键等，此类化合物的鉴定过程 **13** 号化合物（东莨菪素）为例进行说明：**13** 号化合物在正离子模式下可见 $[M+H]^+$ *m/z* 193.0486 准分子离子峰，分子式为 $C_{10}H_8O_4$，主要碎片离子有 *m/z* 178.0254$[M+H\text{-}CH_3]^+$、*m/z* 150.0240$[M+H\text{-}CH_3\text{-}CO]^+$、*m/z* 133.0642$[M+H\text{-}CO\text{-}CH_4]^+$、*m/z* 122.0643$[M+H\text{-}CH_3\text{-}2CO]^+$，即准分子离子峰失去一个 CH_3 得到 *m/z* 178.0254 碎片离子，进一步分别失去两个 CO 和一个 CO 分别获得 *m/z* 122.0643 和 *m/z* 150.0240 碎片离子，*m/z* 150.0240 进一步失去一个 CO 获得 *m/z* 122.0643 碎片离子。该准分子离子峰还同时失去一个 CO_2 和 CH_4 得到 *m/z* 133.0642 碎片离子，通过化合物的裂解规律、文献比对[23]，确认 **13** 号化合物为东莨菪素，其 MS^2 图及可能的裂解途径见图 5。

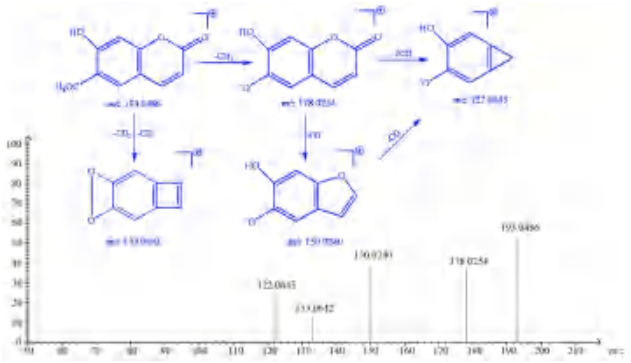


图 5　正离子模式下化合物 **13** 的 MS^2 图及可能的裂解途径

Fig 5　MS^2 diagram of compound **13** in positive ion mode and its possible fragmentation pathway

3.6　其他化合物

冠心七味片中共鉴定出 2 个其他化合物，以 **6** 号化合物（5-羟甲基糠醛）为例进行说明：**6** 号化合物在正离子模式下可见 $[M+H]^+$ *m/z* 127.0384 准分子离子峰，其分子式为 $C_6H_6O_3$，主要碎片离子有 *m/z* 109.0280$[M+H\text{-}OH]^+$、*m/z* 81.0336$[M+H\text{-}OH\text{-}CO]^+$，即准分子离子峰失去一个 OH 得到 *m/z* 109.0280 碎片离子，进一步失去一个 CO 获得 *m/z* 81.0336，通过化合物的裂解规律、文献比对[23]，确认 **6** 号化合物为 5-羟甲基糠醛，其 MS^2 图及可能的裂解途径见图 6。

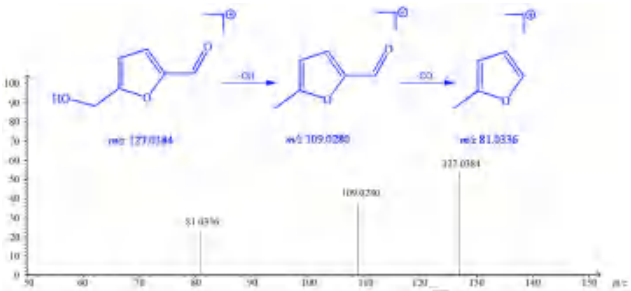


图 6　正离子模式下化合物 **22** 的 MS^2 图及可能的裂解途径

Fig 6　MS^2 diagram of compound **22** in positive ion mode and its possible fragmentation pathway

4　讨论

冠心七味片作为已经上市的复方制剂，在临床上有明确的治疗方向和效果，但其药味多成分复杂，为全面表征其成分，本研究前期考察了不同流动相对化学成分的表征效果，结果以甲醇和 0.5% 甲酸水作为流动相进行梯度洗脱时，各成分的分离效果、质谱丰度和峰形优于其他条件，但在误差 $\pm 10.00\times 10^{-6}$ 条件内，仍有少数化合物的实际的质荷比和理论的质荷比大于此范围，说明此条件还有优化的空间。不同成分在不同离子模式下的离子化和裂解程度有所不同，本研究发现此方中的大部分成分在负离子模式下响应度更高。

本研究采用 HPLC-Q-Exactive-MS 技术结合 Xcalibur 3.0 软件分析，相比于其他分析技术，具有高灵敏，高分辨率、高效性等特性。在这过程中结合特征离子、裂解规律和文献参考进行成分鉴定，很大程度上改变了数据处理过程的烦琐、低效性质，提高了准确性以及效率，为研究复方制剂成分的鉴定提供了一种高效的方法。运用此方法从冠心七味片中快速分析鉴定出 67 个化学成分，并举例说明了代表性成分的裂解规律。但是，HPLC-Q-Exactive-MS 技术对于易挥发性成分的离子碎片响应度低难以检测，后续将采用 GC-MS 技术对其挥发性成分进行系统表征。以期为冠心七味片的质量控制指标的选择、药物化学、药物代谢动力学以及药理作用机制等研究提供数据支撑，为药效物质基础研究提供参考。

参考文献

[1] 包顺茹，李妍，林燕，等 . 冠心七味片的含量测定及挥发性成分特征图谱的研究 [J]. 中国民族民间医药，2021，30（1）：20-25.

[2] 张寅，康跃，薛妍，等 . 冠心七味片提取工艺优化研究 [J]. 北方药学，2021，18（12）：7-11.

[3] 陈路遥 . 蒙药安神补心六味丸组方理论研究及临床应用回顾性分析 [D]. 北京：北京中医药大学，2021.

[4] 洪艺勤，唐炳华，陈旭，等 . 丹参提取物对大鼠心肌缺血后血管新生的保护作用研究 [J]. 环球中医药，2023（11）：2186-2193.

[5] 张艺 . 中药穴位贴敷治疗气虚血瘀型冠心病不稳定型心绞痛的临床疗效分析 [J]. 中国现代药物应用，2023，17（18）：140-143.

[6] 李佳文，刘洋洋，弓宝，等 . 中药降香的本草考证 [J]. 中国现代中药，2023，25（1）：178-191.

[7] 萨仁额日登，关乌日汉，斯钦毕力格，等 . 基于蒙药清心沉香八味散组方对慢性心力衰竭的作用机制探讨 [J]. 中国民族医药杂志，2023，29（7）：68-70.

[8] 包欣欣，吴国华，包明兰，等 . 蒙药传统验方阿木日 -6 味散的本草考证 [J]. 中国民族民间医药，2023，32（17）：41-44.

[9] 戈雅倩，谢和兵，尼玛次仁，等 . 电子束辐照对广枣药材及水提液灭菌效果的影响 [J]. 亚太传统医药，2023，19（8）：41-46.

[10] 唐克，吴雨蹊，王蕊，等 . 东北黑土区沙棘杂交品种（系）果实性状及营养成分比较 [J]. 经济林研究，2023，41（3）：286-295.

[11] 马婧，陈茜，边亚倩，等 . 基于系统中药学的丹参活血化瘀功效标志物研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（14）：3259-3265.

[12] 何志凌，龙文杰，招煦杰 . 檀香提取物调控 miR-199a-3p 对大鼠心肌细胞缺氧 / 复氧损伤的作用 [J]. 山西医科大学学报，2021，52（7）：840-847.

[13] 马元胜，苏和，张瑞芬，等 . 蒙药当贡 -3 对急性心肌梗死大鼠心肌组织 SOD、CAT、GSH-Px 及 MDA 表达的影响 [J]. 中国中医急症，2022，31（12）：2088-2091.

[14] 杨丽，曾业达，张丹雁，等 . 降香及其伪品的挥发油标志性差异成分分析 [J]. 中药材，2023，46（8）：1969-1975.

[15] 文娟，刘小伟，王徽，等 . 蒙药七味广枣丸方解、方源和临床应用研究概况 [J]. 中国医院用药评价与分析，2022，22（10）：1273-1276.

[16] 宝鲁尔，陈红梅，吴杰斯，等 . 一测多评法同时测定蒙药扎冲十三味丸中 4 种成分的含量 [J]. 中国药学杂志，2022，57（1）：69-75.

[17] 王欣欣，陈小艳，李思佳，等 . 沙棘果油对超抗原诱导的特应性皮炎小鼠激素抵抗的干预作用及机制 [J]. 中国药房，2023，34（17）：2079-2084.

[18] 张丽华，刘大勇，关卫东 . HPLC 测定冠心七味片中丹参素的含量 [J]. 中国药师，2006，9（7）：638-639.

[19] 杨娜，黄玮，单兰兰，等 . UPLC-Q-TOF/MS 结合数据后处理快速分类及鉴定丹参成分 [J]. 时珍国医国药，2019，30（10）：2408-2412.

[20] 屠燕，孙连娜，董志颖，等 . 基于 UPLC-QTOF-MS 技术分析不同产地丹参药材化学成分的差异 [J]. 中药材，2021，44（6）：1337-1342.

[21] 梁方圆，布仁，杨利，等 . 基于谱效关联分析的广枣在三味檀香散中的作用研究 [J]. 中国现代中药，2023，25（6）：1218-1226.

[22] 肖娟兰，赵鹿，张东旭，等 . 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的蒙药安神补心六味丸化学成分辨识 [J]. 中药材，2021，44（7）：1656-1667.

[23] 杨璐萌，杨凌鉴，贾璞，等 . 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 的广枣果肉化学成分分析 [J]. 第二军医大学学报，2016，37（2）：159-166.

[24] 孟晓伟，朱清，张妮，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速鉴定降香中化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（10）：107-118.

[25] Zheng WH，Bai HY，Han S，et al. Analysis on the constituents of branches，berries，and leaves of *Hippophae rhamnoides* L. by UHPLC-ESI-QTOF-MS and their anti-inflammatory activities [J]. Nat Prod Commun，2019，14（8）：141-145.

[26] 范鑫宇，任晓蕾，霍金海，等 . 基于液质联用技术的满山红化学成分分析 [J]. 中国中医药科技，2023，30（3）：470-477，507.

[27] 张志，云鹭，侯冰燕，等 . UPLC-Q-ExactiveOrbitrap-MS 法分析光果甘草地上部分黄酮类成分 [J]. 天津中医药大学学报，2023，42（3）：339-346.

[28] 陈嘉慧，张雅心，刘孟华，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的丹参水提液全成分分析 [J]. 广东药科大学学报，2020，36（1）：1-9.

（收稿日期：2023-10-30；修回日期：2023-12-05）

基于肠道菌群探讨黄诺玛苷对脾虚泄泻小鼠肠道功能的影响

阿卜力克木·买买提吐尔逊，古力孜热木·艾尼瓦尔，骆新*（新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830011）

摘要：目的　基于肠道菌群探讨黄诺玛苷对脾虚泄泻小鼠肠道功能的影响。**方法**　将小鼠随机分为空白组和造模组，造模组采用大黄水煎液灌服结合潮湿环境法建立脾虚泄泻模型；随后造模组随机分为模型组、黄诺玛苷组、阳性对照组，空白组和模型组灌服蒸馏水，给药组分别灌服相应药物。观察小鼠一般体征指标和结肠组织病理学变化，测定炎症因子水平，16S 基因测序技术分析肠道菌群，利用 ^{1}H-NMR 技术检测小鼠粪便短链脂肪酸（SCFA）水平。**结果**　黄诺玛苷会上调脾虚泄泻小鼠 Bacteroidota、*Muribaculaceae*、*Eubacterium-coprostanoligenes-group* 等肠道优势有益菌群的丰度及肠道菌群多样性和丰富度，下调 Firmicutes、Proteobacteria、Campilobacterota、*Helicobacter*、*Ruminococcus-torques-group*、*Colidextribacter* 等肠道优势有害菌群的丰度，使肠道优势菌群丰度趋于空白组小鼠。肠道优势有益菌群跟脾虚泄泻小鼠血清白细胞介素 6（IL-6）、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、血管活性肠肽（VIP）成负相关，与白细胞介素 10（IL-10）、胃泌素（GAS）成正相关；肠道优势有害菌群跟之相反。**结论**　黄诺玛苷可能是通过调节脾虚泄泻小鼠肠道微生态平衡，发挥抑制血清和肠道炎症、保护及修复肠黏膜、提升免疫功能、改变肠道 SCFA 水平作用，有效抑制小鼠脾虚泄泻的发生与恶化。

关键词：两色金鸡菊；黄诺玛苷；脾虚泄泻；肠道功能；肠道菌群
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0699-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.023

Effect of flavanomarein on the intestinal function in mice with spleen deficiency diarrhea based on intestinal flora

Abulikemu Maimaituerxun, Guliziremu Ainiwaer, LUO Xin* (*College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011)

Abstract: Objective To explore the effect of flavanomarein on the intestinal function in mice with spleen deficiency diarrhea based on intestinal flora. **Methods** Mice were randomly divided into a blank group and a modeling group, the modeling group was orally given rhubarb decoction combined with a humid environment method to establish a spleen deficiency diarrhea model. Subsequently, the modeling group was randomly divided into a model group, a flavanomarein group and a positive control group. The blank group and the model groups were given distilled water by gavage, while the treatment groups were given corresponding drugs by gavage. The general physical signs and pathological changes in the colon tissue of mice were observed, the levels of inflammatory factors were measured, the intestinal flora were analyzed with 16S gene sequencing technology, and the levels of short chain fatty acids (SCFA) in mouse feces were detected with ^{1}H-NMR technology. **Results** Flavanomarein upregulated the abundance of beneficial intestinal flora, the diversity and richness of intestinal flora in mice with spleen deficiency diarrhea, such as Bacteroidota, *Muribalactaceae* and *Eubacterium coprostanogenes group*. It also downregulated the abundance of harmful intestinal flora, such as Firmicutes, Proteobacteria, Campilobacterota, *Helicobacter*, *Ruminococcus-torques-group* and *Colidextribacter*, adjusting the abundance of dominant intestinal flora towards that of the blank group. The beneficial intestinal flora were negatively correlated with the serum inter leukin (IL)-6, tumor necrosis factor α (TNF-α), and vasoactive peptide (VIP) in mice

基金项目：新疆维吾尔自治区重点研发项目（项目编号：2023B02010-6）。
作者简介：阿卜力克木·买买提吐尔逊，男，硕士研究生，主要从事胃肠道病研究及新药研发，email：1667519974@qq.com
*通信作者：骆新，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事糖尿病药理及新药研发，email：455246245@qq.com

with spleen deficiency diarrhea, but positively correlated with IL-10, and gastin (GAS). The opposite was true for the harmful intestinal flora. **Conclusion** Flavanomarein may regulate the intestinal flora balance in mice with spleen deficiency diarrhea, inhibit the serum and intestinal inflammation, protect and repair intestinal mucosa, enhance immune function, and change intestinal SCFA levels, effectively inhibiting the occurrence and deterioration of spleen deficiency diarrhea in mice.

Key words: *Coreopsis tinctoria* Nutt.; flavanomarein; spleen deficiency diarrhea; intestinal function; intestinal flora

腹泻（diarrhea）在中医上称为泄泻，小儿泄泻以脾虚泄泻多见，泄泻的病变部位在胃肠，主要病机为脾虚湿盛[1]，也有医家认为脾虚是慢性腹泻的主证，是慢性腹泻病情发生、发展的关键病机[2]。现代研究表明脾虚泄泻与胃肠道黏膜屏障功能受损及肠道菌群失调密切相关[3]。肠道微生态平衡是肠黏膜发挥正常功能的基础，肠道菌群的多样性及结构研究是复杂微生态系统分析的基础，通过分析脾虚泄泻小鼠肠道菌群的变化，可明确脾虚泄泻与肠道菌群之间的关系[4]，也有研究[5-6]表明短链脂肪酸（SCFA）是肠道微生物重要的代谢产物之一，其作为信号分子在肠道微生物、膳食和宿主之间的相互作用中发挥着重要作用，肠道菌群对机体营养物质的消化吸收有很大的影响。

两色金鸡菊（*Coreopsis tinctoria* Nutt.），为菊科金鸡菊属一年生草本植物，国内生长在新疆南部海拔 3000 米以上的喀喇昆仑山和昆仑山，因此又名雪菊，也主要分布于新疆和田、喀什等地区，当地居民将其头状花序浸泡当花茶饮用，新疆各中医院也将其作为药材使用[7]，具有一系列的药理活性，如抗氧化、抗炎、免疫调节、抗菌、肝脏保护等[8-9]，并具有清热解毒、抗炎消肿、健脾胃等功效[10]。两色金鸡菊中的主要活性成分为黄酮类化合物，且其中黄诺玛苷（flavanomarein）是主要的黄酮类单体组分，课题组前期研究发现两色金鸡菊乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位黄诺玛苷含量较高[11-13]。黄酮类物质具有改善胃肠功能的作用，但是黄酮类单体化合物对胃肠道功能的影响研究很少[14]。课题组前期研究发现黄诺玛苷的生物活性可能跟调节肠道菌群有关[15]。

因此，本研究在课题组前期研究及现有相关研究文献的基础上，通过给脾虚泄泻小鼠模型黄诺玛苷给药后观察小鼠的一般体征、免疫功能、细胞因子、SCFA 和肠道菌群等水平，多方面探究黄诺玛苷对脾虚泄泻小鼠肠道功能的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级昆明种小鼠，体重 20 ～ 25 g，雌雄各半，由新疆医科大学动物实验中心提供，SPF 级实验动物使用许可证号：SYXK（新）2018-0003。

1.2 仪器

F80 型高速万能粉碎机（北京永光明医疗仪器厂）；HH-S4 型数显恒温水浴锅（金坛市医疗仪器厂）；EYELA 型旋转蒸发仪（上海爱朗仪器有限公司）；DHC-9055A 型电热鼓风干燥箱、DHP-9082 型电热恒温培养箱（上海一恒科技有限公司）；KDC-160HR 型高速冷冻离心机（科大创新股份有限公司中佳分公司）；Inova600 型核磁共振波谱仪（美国 Varian 公司）；核磁管（上海欣鹏玻璃仪器有限公司）；Multiskan GO 型全波长酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公 司）；Eclipse Ni-U 型 显微镜（日本 Nikon 公司）；聚酰胺薄膜（浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂）；1260 Infinity Ⅱ型高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司）。

1.3 试药

两色金鸡菊（新疆雪菊生物科技有限公司，经新疆医科大学中医学院毛新民教授鉴定为菊科金鸡菊属植物两色金鸡菊干燥的花）；黄诺玛苷对照品（自制，纯度＞ 99%）[16]；大黄（百草堂医药股份有限公司）；芦丁对照品（批号：wkq23010503，四川省维克奇圣物科技有限公司，纯度＞ 98%）；乳酸菌素片（黑龙江康麦斯药业有限公司）；其余试剂（天津市致远化学试剂有限公司）。聚酰胺（浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂）；2- 氨基乙基联苯基硼酸酯（2-APB）、聚乙二醇 400（PEG 400）（上海麦克林生化科技有限公司）；肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 6（IL-6）、白细胞介素 10（IL-10）、胃泌素（GAS）、血管活性肠肽（VIP）ELISA 试剂盒（上海优选生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 黄诺玛苷的提取与鉴定

黄诺玛苷的制备：按文献方法提取分离[13]，将分离得到的浓缩液经 TLC 法[17]和 HPLC 法[16]鉴定并计算含量和纯度。取适量黄诺玛苷对照品用乙醇溶解，将对照品溶液和样品溶液分别点于聚酰胺膜上，以展开剂二甲苯∶乙酸乙酯∶甲酸∶乙醇

（4∶3∶3∶4）展开，以甲醇为溶剂配制 1% 2-APB 和 5% PEG 400 作为显色剂，显色时先喷 2-APB，晾干再喷 PEG 400，分别于 254 nm 和 366 nm 荧光下进行检测。称取适量黄诺玛苷对照品溶于色谱甲醇制成对照品溶液，同样取适量样品溶液，进行 HPLC 分析。

2.2 动物分组、造模和给药

将 24 只小鼠随机分为两组：空白组 6 只，造模组 18 只。空白组用蒸馏水灌服，造模组按朱妍锦[18]的方法将大黄加入 5 倍体积蒸馏水浸泡 30 min，再微煮 1 h，静置冷却之后过滤，将滤液浓缩制备成大黄水煎液（1 g • mL^{-1}），予小鼠灌服，定时禁食 8 h，自由饮水，另外因湿邪是脾虚泄泻的主要原因之一[19]，因此再将小鼠隔两日置于潮湿的环境 24 h，灌服量均按 0.01 mL•g^{-1}，2 次•d^{-1}，连续 10 d，若出现大便溏稀、肛门污秽、食欲减退、神态萎靡、毛发竖立无光泽、消瘦、畏寒倦怠、蜷缩聚堆等现象，即表示造模成功[18, 20]。随后造模组随机分为模型组、阳性对照组 [乳酸菌素片 1.2 g/（kg • d）][21] 和黄诺玛苷 [50 mg/（kg • d）] 组[15]，每组 6 只。空白组和模型组小鼠均予蒸馏水灌服，给药组给予对应的药物，灌服量均按 0.01 mL•g^{-1}，2 次 • d^{-1}，连续 9 d。

2.3 一般状态和指标观察测定

2.3.1 腹泻程度评分 每日早上给药前观察各组小鼠腹泻程度相关变化并统计每组的腹泻等级。腹泻等级评分标准：0 分表示无腹泻；1 分表示有腹泻发生，粪便仅黏附于肛周；2 分表示有腹泻发生，粪便黏附肛周及大腿部位；3 分表示有腹泻发生，粪便黏附于肛周、腿部及腹部[22]。

2.3.2 粪便含水率的测定 首次给药前和末次给药后提前 12 h 将各组小鼠置于代谢笼中，禁食不禁水，无菌 EP 管收集新鲜粪便称重，105 ℃干燥 5 h 后再次称重，计算粪便含水率。粪便含水率（%）＝（粪便湿质量－粪便干质量）/ 粪便湿质量 ×100%。

2.3.3 生长性能的测定 在首次给药前和末次给药后将各组小鼠禁食不禁水 12 h 空腹称重，计算平均日增重。平均日增重（g•d^{-1}）＝（终末总体重－初始总体重）/（实验天数 × 实验只数）。

2.3.4 食物利用率的测定 首次给药前将饲料称重，末次给药结束后称量剩余饲料，计算食物利用率。食物利用率（%）＝体重增加量 / 食物摄入量 ×100%。

2.3.5 脾脏和胸腺指数的测定 处死动物时分离胸腺和脾脏，去除附带脂肪组织，用滤纸吸干水分后称量，计算脾脏及胸腺指数。胸腺指数（%）＝胸腺质量（mg）/ 体重（g）×100%，脾脏指数（%）＝脾脏质量（mg）/ 体重（g）×100%。

2.4 血清的生化指标的测定

各组小鼠处理前 12 h 禁食不禁水，摘眼球取血，血液静置 2 h 后离心取血清。按照 ELISA 说明书对血清中 TNF-α、IL-6、IL-10、GAS、VIP 进行测定。

2.5 结肠组织病理学观察

取结肠组织用生理盐水冲洗，洗去内容物及表面残留的血液与杂质，用滤纸吸掉表面水分，置于有固定液的离心管中固定 24 h，做常规石蜡包埋及切片，按照标准方法进行 HE 染色和 PAS 染色，于显微镜下观察各组小鼠结肠织病理学改变。

2.6 菌群 16S 多样性测序

采用 MagPure Soil DNA LQ Kit（Magan）试剂盒依照说明书对粪样的基因 DNA 进行提取进行 PCR 扩增。PCR 产物再纯化、定量和均一化后，做文库构建并经过 Qubit 定量，调整浓度使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行测序，测序由上海欧易生物技术有限公司完成。

2.7 粪便 SCFA 检测

2.7.1 粪样制备 末次给药后收集到的新鲜粪样称取 50 mg 于离心管中，加入 500 μL 重水配制的 0.1 mol • L^{-1} 磷酸盐缓冲液，涡旋混匀，液氮中反复冻融 3 次，冻融物匀浆，匀浆液于 4 ℃、10 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取出上清液，沉淀物同方法再提取 2 次，将 3 次上清液合并再离心 10 min，取上清液 500 μL 至核磁管中，进行核磁共振（NMR）检测[23]。

2.7.2 NMR 数据采集和图谱处理 用 Inova600 型核磁共振波谱仪检测粪样 ^{1}H-NMR 谱。所有粪样测试完成后，将所有数据导入 MestRenova 6.1.0 软件进行基线校正及相位调整，选择 δ 为 0.1 ～ 9.0 的区域将图谱进行分段并积分。根据积分值区分粪便样品代谢物之间的差异并筛选差异代谢物。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件分析试验结果，数据以平均值 ± 标准差（$\bar{x}$±s）表示，多组间均数比较采用单因素方差检验，总体有差异再进行两两比较，两组间比较采用独立样本 t 检验（Student’s test）。以 P ＜ 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄诺玛苷的提取与鉴定

TLC 板在 366 nm 和 254 nm 荧光下显示，黄诺玛苷对照品与样品溶液比移值一致，见图 1，可初步推定样品中主成分为黄诺玛苷。HPLC 分析结果可见，黄诺玛苷对照品在 3.728 min 处出高峰，样品在 3.719 min 处出高峰，样品出峰位置跟对照品

基本一致，见图 2，因此可确定样品溶液中的主成分是黄诺玛苷，通过面积归一化法计算样品溶液中黄诺玛苷含量为 5.22 μg・μL^{-1}，纯度为 87.8%。

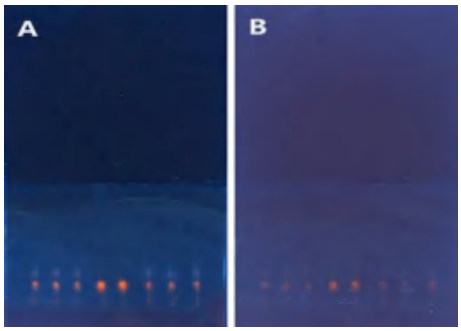


图 1 366 nm（A）和 254 nm（B）下的 TLC 视检图

Fig 1 Thin layer chromatogram under 366 nm（A）and 254 nm（B）

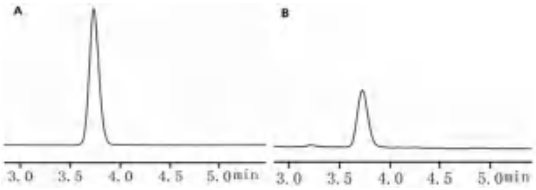


图 2 黄诺玛苷对照品（A）及样品（B）的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatogram of flavanomarein reference（A）and sample（B）

3.2 一般状态及指标观察测定

3.2.1 一般状态观察及腹泻程度评分 与空白组小鼠对比，模型组小鼠精神萎靡、眯眼拱背、畏寒扎堆蜷缩、摄食量及活动减少、毛发枯黄、大便稀溏、肛周污秽、体重增加不明显。与模型组小鼠对比，给药组小鼠毛发有光泽、摄食量增加、活动增加、体重增加明显、大便基本成形、腹泻程度减轻，造模期和给药期各组腹泻程度见图 3A ～ 3B。

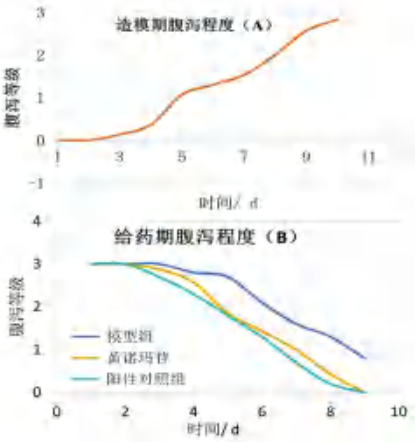


图 3 造模期（A）和给药期（B）腹泻程度趋势图

Fig 3 Trend of diarrhea severity during modeling period（A）and administration period（B）

3.2.2 粪便含水率 与空白组比较，给药前造模组粪便含水率均显著升高。与模型组比较，黄诺玛苷组和阳性对照组粪便含水率均显著降低（见表 1）。

3.2.3 生长性能测定 与空白组比较，模型组平均日增重显著降低；与模型组比较，给药组平均日增重均显著升高（见表 1）。

3.2.4 食物利用率测定 与空白组比较，模型组食物利用率显著降低；与模型组比较，给药组食物利用率均显著升高（见表 1）。

3.2.5 脾脏和胸腺指数 与空白组比较，模型组小鼠脾脏指数和胸腺指数显著降低；与模型组比较，给药组脾脏和胸腺指数均升高，除黄诺玛苷组胸腺指数，其他组差异均有统计学意义（见表 1）。

表 1 小鼠一般体征指标水平

Tab 1 General body index levels in mice

组别	粪便含水率 /%		平均日增重 /（g・d^{-1}）	食物利用率 /%	脾脏指数 /%	胸腺指数 /%
	给药前	给药后				
空白组	1.58±0.41	1.28±0.23	0.89±0.04	8.29±0.78	0.38±0.01	0.38±0.01
模型组	7.47±0.50$^{\#}$	4.99±0.37$^{\#}$	0.23±0.01$^{\#}$	2.68±0.33$^{\#}$	0.24±0.04$^{\#}$	0.23±0.04$^{\#}$
黄诺玛苷组	7.82±0.44$^{\#}$	3.45±0.16*	0.65±0.10*	7.71±0.87*	0.29±0.05*	0.28±0.04
阳性对照组	7.81±1.21$^{\#}$	2.61±0.86*	0.9±0.14*	10.2±0.07*	0.29±0.05*	0.28±0.02*

注（Note）：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$（Compared with the blank group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$）。

3.3 血清生化指标测定

ELISA 结果显示，与空白组比较，模型组血清中 TNF-*α*、IL-6 和 VIP 水平均显著升高，IL-10 和 GAS 水平显著降低。与模型组比较，给药组血清中 TNF-*α*、IL-6、VIP 水平均降低；IL-10 和 GAS 水平均升高，详见表 2。

表 2 小鼠血清 TNF-*α*、IL-6、IL-10、VIP 和 GAS 水平 (pg・mL^{-1})

Tab 2 TNF-*α*、IL-6、IL-10、VIP and GAS levels in mouse serum (pg・mL^{-1})

组别	TNF-*α*	IL-6	IL-10	VIP	GAS
空白组	222.02±10.20	33.24±4.18	165.93±9.73	65.8±2.24	27.71±4.27
模型组	269.9±29.89$^{\#}$	41.89±2.55$^{\#}$	145.2±7.81$^{\#}$	84.02±4.56$^{\#}$	21.11±1.49$^{\#}$
黄诺玛苷组	220.96±14.68*	34.49±3.04*	156.85±18.36	80.41±10.70	26.32±3.29*
阳性对照组	222.57±11.30*	33.78±3.68*	158.7±13.99	76.8±8.66	27.9±1.63*

注（Note）：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$（Compared with the blank group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$）。

3.4　结肠组织 HE 染色和 PAS 染色观察

结肠组织 HE 染色结果见图 4，空白组组织结构清晰，肠腺数量丰富，柱状上皮细胞排列规则，未见炎性细胞浸润，未见明显病变；模型组组织结构清晰，肠腺数量丰富，分布不均，柱状上皮细胞损伤崩解、排列紊乱（黑色箭头），间质内可见大量炎性细胞浸润（黄色箭头）；黄诺玛苷组组织结构清晰，肠腺数量丰富，柱状上皮细胞排列规则，间质内可见零散炎性细胞浸润（黄色箭头）；阳性对照组组织结构清晰，肠腺数量丰富，少量柱状上皮细胞损伤、排列不规则（黑色箭头），间质内可见零散炎性细胞浸润（黄色箭头）。结肠组织 PAS 染色结果见图 4，模型组阳性面积占比高于空白组及给药组，给药组阳性面积占比低于模型组但也略高于空白组，黄诺玛苷组跟阳性对照组没有明显差异。

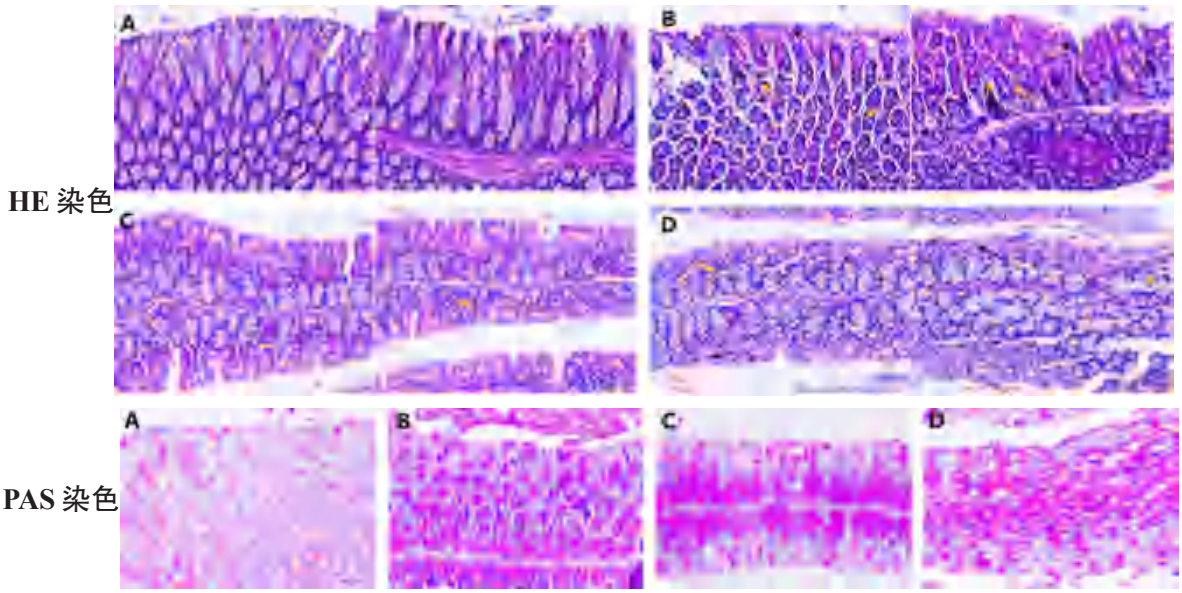


图 4　结肠组织 HE 及 PAS 染色（×200）

Fig 4　HE and PAS staining of colon tissue（×200）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 黄诺玛苷组（flavanomarein group）；D. 对照组（control group）

3.5　菌群 16S 多样性测序

3.5.1　测序数据质量评估　物种累积曲线（Specaccum）用于抽样量充分性判断以及物种丰富度估计，由图 5A 可知各组 Specaccum 曲线趋于平缓，表明此环境中的物种不会随样本量的增加而显著增多，即抽样充分。观察和对比各组的 Simpson 指数稀释曲线和 Good’s Coverage 指数稀释曲线发现，各组稀释曲线随着抽取序列数的增加而趋于平缓。说明物种分布均匀，本测序深度充分，覆盖绝大多数生物物种，测序数据量合理，所检测样品物种丰富程度足以满足后续的研究分析，见图 5B ～ 5C。

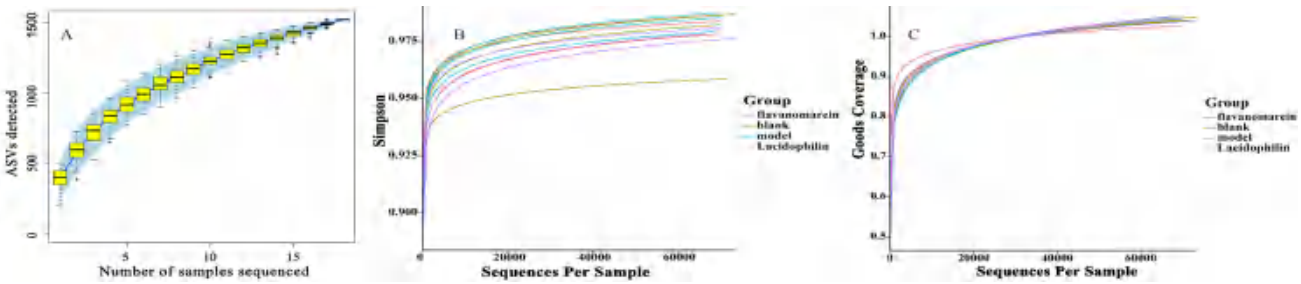


图 5　物种累积曲线（A）、Simpson 指数稀释曲线（B）和 Good’s Coverage 指数（C）图

Fig 5　Figure of species accumulation curve（A），Simpson index dilution curve（B）and Good’s Coverage index dilution curve（C）

3.5.2　群落结构分布

① 门水平上肠道微生物丰度分析：各组小鼠肠道微生物根据分类学门水平上的构成丰度排序前 15 的物种见图 6A，处于前 5 位的菌依次为：拟杆菌门（Bacteroidota）、厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）、弯曲杆菌门（Campilobacterota）、放线菌门（Actinobacteriota）。通过筛选与比较，在各组差异显著的优势菌群是 Proteobacteria、Campilobacterota，见图 6B，另外 Bacteroidota 和 Firmicutes 为在门水平丰度最大的菌门，也是门水

平上的优势菌。与空白组比较，模型组下调了 Bacteroidota 丰度，上调了 Firmicutes、Proteobacteria、Campilobacterota 丰度。与模型组比较，黄诺玛苷组上调了 Bacteroidota 丰度，同时下调了 Firmicutes、Proteobacteria、Campilobacterota 丰度，而且上调 Bacteroidota 丰度的差异比下调 Firmicutes 丰度的差异更为显著，即黄诺玛苷组拟杆菌门 / 厚壁菌门值（B/F 值）有升高的趋势。

② 属水平上肠道微生物丰度分析：各组小鼠肠道微生物根据分类学属水平上的构成丰度排序前 15 的物种见图 7A，处于前 5 位的菌依次为：*Muribaculaceae*、拟杆菌属（*Bacteroides*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）、拟普雷沃菌属（*Alloprevotella*）、副拟杆菌属（*Parabacteroides*）。通过筛选与比较，在各组差异显著且在属水平上的优势菌群丰度排序前 10 位菌属见图 7B，其中前 5 位依次是 *Muribaculaceae*、螺杆菌属（*Helicobacter*）、瘤胃球菌属组（*Ruminococcus-torques_group*）、真杆菌属组（*Eubacterium-coprostanoligenes-group*）、大肠埃希菌属（*Colidextribacter*）。与空白组比较，模型组下调了 *Muribaculaceae*、*Eubacterium-coprostanoligenes-group* 丰度，上调了 *Helicobacter*、*Ruminococcus-torques-group*、*Colidextribacter* 丰度。与模型组比较，黄诺玛苷组上调了 *Muribaculaceae*、*Eubacterium-coprostanoligenes-group* 丰度，同时下调了 *Helicobacter*、*Ruminococcus-torques-group*、*Colidextribacter* 丰度。

3.5.3 多样性分析

① *α*- 多样性：与空白组比较，模型组 Simpson 指数和 Good’s coverage 指数降低。与模型组比较，黄诺玛苷组 Good’s coverage 指数明显升高，而 Simpson 指数无明显差异，见图 8A ～ 8B。表明模型组的肠道微生物丰富度和多样性降低，而黄诺玛苷给药后肠道菌群有显著变化。

② *β*- 多样性：结合 PCoA 分析结果显示模型组点完全分开聚集在同一区域，空白组及黄诺玛苷组跟模型组距离较远且均集中在空白组周围，PC1 和 PC2 对总体方差解释的百分比分别为 48.14% 和 19.52%。表明黄诺玛苷组小鼠肠道菌群结构明显改善，有向空白组小鼠区域靠近的趋势，见图 8C。

3.6 粪便 SCFA 检测

利用 ^{1}H-NMR 技术检测各组小鼠粪样 SCFA 含量并定量分析发现，与空白组比较，模型组小鼠粪便中乙酸、戊酸、异丁酸、异戊酸含量显著升高，丙酸和丁酸含量相对较高，但差异无统计学意义。与模型组比较，黄诺玛苷组小鼠粪样中乙酸、戊酸、异丁酸、异戊酸含量显著降低，丁酸含量显著升高；阳性对照组乙酸、戊酸、异丁酸、异戊酸含量均显著降低，丙酸、丁酸含量均显著升高。粪样 ^{1}H-NMR 图谱 SCFA 定位见图 9，粪样 SCFA 检测结果见表 3。

表 3 粪便样本 SCFA 测定结果

Tab 3 Content of SCFA in fecal samples

组别	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸	异丁酸	异戊酸
空白组	1784.52±6.36	346.9±19.12	296.37±7.31	443.38±17.65	293.89±34.8	122.12±5.98
模型组	8570.07±7.07$^{\#}$	384.81±9.21	308.47±7.33	611.95±33.67$^{\#}$	526.05±23.4$^{\#}$	262.59±5.80$^{\#}$
黄诺玛苷组	2181±6.17*	315.63±30.61	349.66±7.05*	389.42±18.82*	428.85±12.50*	109.66±6.69*
阳性对照组	3496.46±4.95*	454.31±3.75*	372.14±6.81*	454.31±3.75*	294.65±28.98*	191.03±6.53*

注（Note）：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$（Compared with the blank group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$）。

4 讨论

脾虚泄泻，即西医所称的“肠易激综合征”，是指因脾阳气虚而致运化失常、作泻，表现为腹泻、泻下不消化物、消瘦、乏力，因此小鼠一般状态、粪便稠度、粪便含水量、体重增加量和食物利用率可用于评价腹泻程度的指标。随着人们饮食结构、生活环境的改变及工作压力的增加，胃肠道疾病的发病率呈攀升的趋势，特别是脾虚泄泻较为明显，受到了临床的高度重视。在本研究中脾虚泄泻小鼠灌服黄诺玛苷可有效改善小鼠腹泻病症。

脏器指数直接反映免疫功能的改变，脾脏是机体最大的外周免疫器官，胸腺是人体重要的中枢性免疫器官，脾脏指数以及胸腺指数的变化能很好地反映小鼠免疫功能强弱及脾虚泄泻的轻重程度，是小鼠脾虚研究中的关键指标之一 [24]。本研究结果表明黄诺玛苷可能对脾虚泄泻小鼠的免疫功能具有增强作用，可有效缩短脾虚泄泻小鼠恢复正常状态的时间，改善脾虚泄泻小鼠腹泻症状。

细胞因子可分为促炎性、抗炎性两类，促炎细胞因子损伤肠道黏膜屏障、增加上皮通透性、提高病原菌易感性。TNF-*α*、IL-6 等均在炎症初期很快产生，属于前炎因子，也是一种免疫调节细胞因子，可以由不同类型的细胞分泌，在炎症反应和自身免疫性疾病等方面发挥重要作用，是细胞增殖和凋亡的关键 [24-26]。IL-10 是一种免疫细胞分泌的抗炎细胞因子，其主要生物学功能是限制和停止炎症反应，在维持胃肠道稳态中起着至关重要的作用 [27]。本研究发现黄诺玛苷可提高脾虚

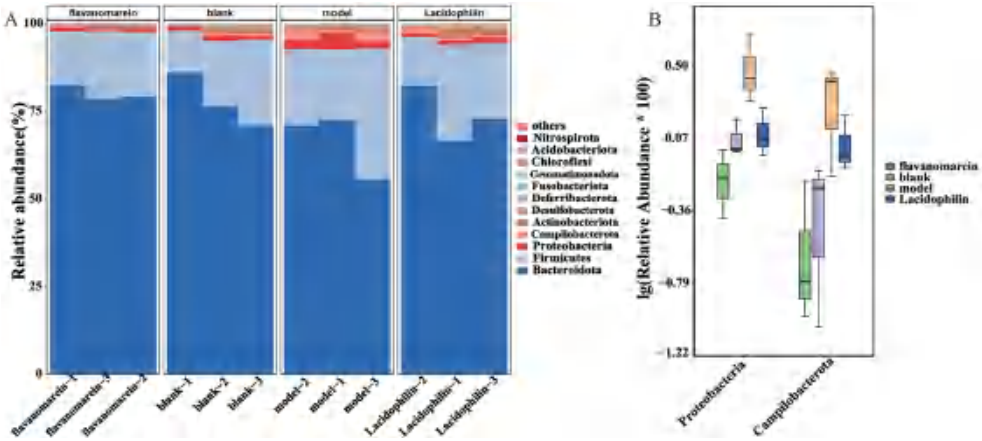


图 6　门水平上的物种相对丰度（TOP 15）（A）及差异显著物种（B）

Fig 6　Relative abundance of species（TOP 15）（A）and species with significant difference（B）at the phylum level

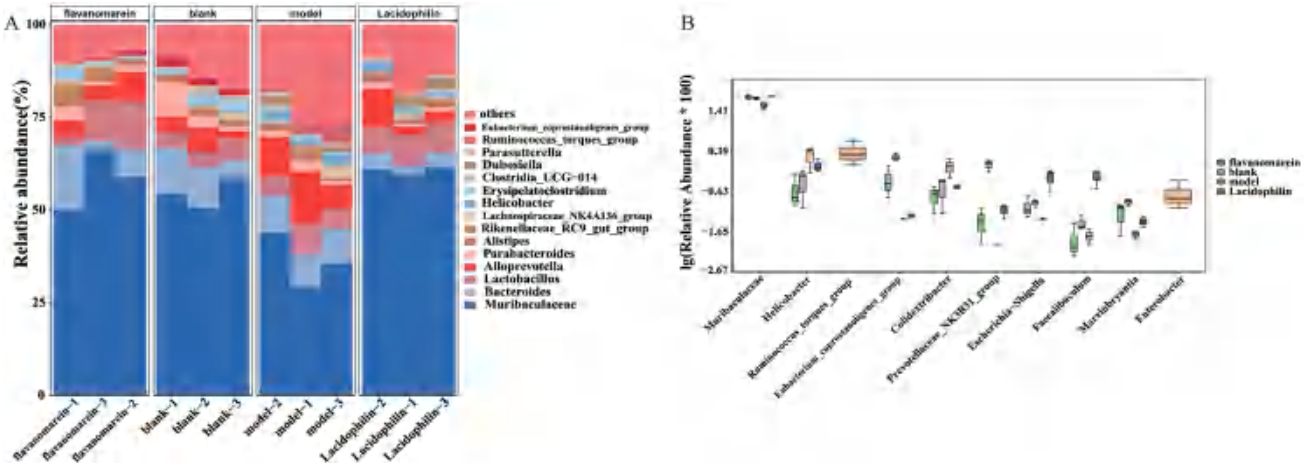


图 7　属水平上的物种相对丰度（TOP 15）（A）及差异显著物种（TOP10）（B）

Fig 7　Relative abundance of species（TOP15）（A）and species with significant differences（TOP10）（B）at the genus level

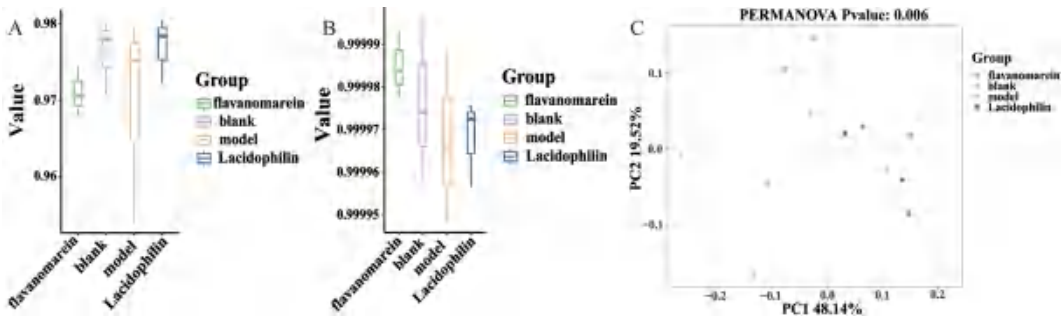


图 8　Simpson 指数（A）、Good’s Coverage 指数（B）及 PCoA 分析图

Fig 8　Image of Simpson index（A），Good’s Coverage index（B）and PCoA analysis image（C）

泄泻小鼠的 IL-10，降低 TNF-α、IL-6，抑制脾虚泄泻引起的肠道黏膜炎症发生和组织损伤，这与本实验中结肠组织 HE 染色和 PAS 染色结果一致。VIP 具有抑制胃肠道内平滑肌和小肠水电解质吸收的作用[28]，本研究中脾虚泄泻小鼠血清 VIP 水平显著升高使胃肠道动力和分泌功能紊乱，引起腹痛、腹泻，表现为扎堆蜷缩、摄食量及活动减少、毛发暗淡、大便稀溏、消瘦等现象，致粪便含水率升高，日增重及食物利用率降低。GAS 可刺激胃酸、胰液和胆汁的分泌，并对胃底、胃体运动和胃部排空具有延缓抑制作用[29]，本研究中黄诺玛苷可提升脾虚泄泻小鼠血清 GAS 水平而延缓胃排空，提高胃肠道化学消化吸收能力，使胃肠黏膜血流加强，促进胃肠道的运动，此结果跟脾虚泄泻小鼠免疫功能的增强和结肠组织黏膜的修复有密切关系。

肠道中的 SCFA 是肠道菌群主要代谢产物，包括丙酸、丁酸、己酸等，其在很大程度上受到肠道菌群构成的影响[30]。SCFA 是肠道菌群和免疫系统之间交流的媒介，它们产生的信号通过游离脂肪酸

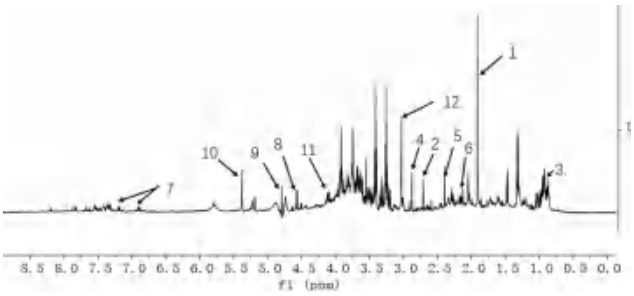


图 9 粪便样本 ^{1}H-NMR 图谱中 SCFA 定位

Fig 9 Localization of SCFA in the ^{1}H-NMR diagram of fecal samples

1. 乙酸（acetic acid）；2. 丙酸（propanoic acid）；3. 丁酸（butyric acid）；4. 戊酸（valeric acid）；5. 异丁酸（isobutyric acid）；6. 异戊酸（isovaleric acid）；7. 酪氨酸（tyrosine）；8. 木糖（xylose）；9. 葡萄糖（glucose）；10. 尿嘧啶（uracil）；11. 核糖（ribose）；12. 赖氨酸（lysine）

受体在免疫细胞中传递，进而抑制炎症参与免疫反应[31]。粪样的检测结果不仅可以反映代谢物的变化，还可了解肠道菌群的状态。本研究中黄诺玛苷可改变小鼠粪便 SCFA 水平，另外脾虚泄泻小鼠粪便中乙酸水平的升高可能是诱发脾虚泄泻的主要原因之一，还有待进一步探究验证。

中医药多靶点、多成分等特性与肠道微生态多样性具有相似之处，肠道菌群对机体营养物质的消化吸收起着重要作用，其寄于宿主体内参与机体生理病理的整个过程决定着宿主的健康状况，其数量庞大、种类繁多，被称为机体的“第二器官”，具有促进消化吸收、免疫调节、能量代谢等作用[32-33]。本研究从门水平与属水平上对肠道微生物进行了分析，结果在门水平上肠道优势菌群与炎症因子的相关性分析中发现，脾虚泄泻小鼠 Firmicutes、Proteobacteria、Campilobacterota 与血清 TNF-*α*、IL-6、VIP 成正相关，与 IL-10、GAS 水平成负相关；Bacteroidota 与血清 TNF-*α*、IL-6、VIP 成负相关，与 IL-10、GAS 成正相关。在属水平上的肠道优势菌群较多，本研究结果在属水平上以丰度排序前 5 的肠道优势菌群与炎症因子之间相关性分析发现，脾虚泄泻小鼠 *Muribaculaceae*、*Eubacterium-coprostanoligenes-group* 与血清 IL-6、TNF-*α* 成负相关，与 IL-10 成正相关；脾虚泄泻小鼠肠道 *Helicobacter*、*Ruminococcus-torques-group*、*Colidextribacter* 与血清 IL-6、TNF-*α*、VIP 成正相关，与 IL-10、GAS 成负相关。研究表明 B/F 值降低会改变肠道免疫活性[34]，*Colidextribacter* 和 *Helicobacter* 是人和动物肠道中主要的一种细菌之一，另外我国居民胃癌发病率很高的主要原因之一是 *Helicobacter* 的高感染，马刚等[35]研究指出 *Helicobacter* 调控固有和适应性免疫应答，脾虚泄泻小鼠 B/F 值降低、*Colidextribacter* 和 *Helicobacter* 丰度过度表达导致肠道菌群结构的失衡、脾脏指数和胸腺指数的降低会形成免疫抑制微环境以致免疫力下降，表现为小鼠精神萎靡、毛发枯黄、消瘦、活动减少等，引起腹泻的发生。Proteobacteria 是胃肠道中一类适应性强，具有潜在致病性的常见菌门，包括很多病原菌，Campilobacterota 也是一种病原体，*Eubacterium-coprostanoligenes-group* 是人类和动物胃肠道正常菌群的组成部分[36]，而 *Muribaculaceae* 是肠道黏蛋白单糖的主要利用者，研究证实其丰度增加能够竞争性占据致病菌的生态位，进而有效抑制致病菌的丰度[37]，另外，*Eubacterium-coprostanoligenes-group* 会稳定肠道屏障，它们的稳态失调引起内源性感染，以至于脾虚泄泻小鼠血清和肠道出现大量炎症、免疫功能和肠道消化吸收功能下降，从而导致损伤肠道组织破坏完整性，同时降低肠道对 SCFA 的吸收，会出现摄食量减少、大便稀溏、消瘦等症状，导致腹泻的发生及脾虚泄泻的恶化。脾虚泄泻小鼠灌服黄诺玛苷后可降低肠道有害菌门及菌属的丰度，同时会升高肠道有益菌门及菌属的丰度。对肠道菌群 *α*- 多样性和 *β*- 多样性分析发现，与空白组小鼠相比，脾虚泄泻小鼠肠道菌群多样性和丰富度明显降低，肠道菌群结构存在差异。经黄诺玛苷给药后脾虚泄泻小鼠肠道优势菌群的丰度趋于空白组水平，肠道微生物群落的多样性、丰富度和均匀度增加，同时会上调肠道菌群多样性、丰富度和均匀度，有利于肠道菌群结构及丰度的恢复，维持肠道微生态的平衡。

综上，黄诺玛苷会上调脾虚泄泻小鼠 Bacteroidotame、*Muribaculaceae*、*Eubacterium-coprostanoligenes-group* 等肠道优势有益菌群的丰度和肠道菌群多样性及丰富度，下调 Firmicutes、Proteobacteria、Campilobacterota、*Helicobacter*、*Ruminococcus-torques-group*、*Colidextribacter* 等肠道优势有害菌群的丰度，调节肠道微生态的失衡使优势菌群趋于空白组小鼠。肠道优势有益菌群跟脾虚泄泻小鼠血清 IL-6、TNF-*α*、VIP 成负相关，与 IL-10、GAS 成正相关；肠道优势有害菌群与之相反。黄诺玛苷可能通过调节脾虚泄泻小鼠肠道优势菌群丰度和上调菌群多样性、丰富度和均匀度来维持肠道微生态平衡，从而抑制内源性感染和肠道炎症、修复及改善肠道黏膜、提升免疫功能、改变肠道 SCFA 水平，进而有效抑制并改善小鼠脾虚泄泻的发生与恶化，但是具体的作用机制有待继续研究。本研究可为后续黄诺玛苷调节肠道动力机制研究、临床应用及天然药物的开发提供部分依据。但是本研究也存在一些不足之处，如造模期较短致病理改变不够明显，检测粪样中肠道菌群及 SCFA 时难以确保各组取粪样量在同一水平。

参考文献

[1] 赵先惠，郑亮 . 郑亮辨治泄泻病经验 [J]. 江西中医药，2023，54（9）：36-39.

[2] 王静 . 小建中汤对脾虚泄泻幼鼠肠道菌群及肠黏膜免疫功能影响的研究 [D]. 泸州：西南医科大学，2021.

[3] 许静 . 基于肠道菌群与 TLR4/NF-κB 通路研究苍术苷 A 对脾虚泄泻小鼠的药效机制 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2022.

[4] 刘峰，严晶，卢冬雪 . 肠道微生态研究与中医本质探索 [J]. 中医学报，2019，34（9）：1859-1863.

[5] 杨雪，高亚男，王加启，等 . 短链脂肪酸的功能研究进展 [J]. 食品科学，2023，44（13）：408-417.

[6] Marcon L，Fernando D，Cruz B，et al. Yacon（Smallanthus sonchifolius）-based product increases fecal short-chain fatty acids and enhances regulatory T’cells by downregulating RORyt in the colon of BALB/c mice [J]. J Funct Foods，2019，55：333-342.

[7] 克迪热亚 • 卡地尔，祖力皮亚 • 阿布拉，马红梅，等 . 基于 PERK-ATF4-CHOP 通路探讨马里苷对高糖高脂诱导胰岛 β 细胞损伤的影响 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1316-1321.

[8] Begmatov N，Li J，Bobakulov K，et al. The chemical components of *Coreopsis tinctoria* Nutt. and their antioxidant，antidiabetic and antibacterial activities [J]. Nat Prod Res，2020，34（12）：1772-1776.

[9] Shen J，Hu M，Tan W，et al. Traditional uses，phytochemistry，pharmacology，and toxicology of *Coreopsis tinctoria* Nutt.：a review [J]. J Ethnopharmacol，2021，269（1）：113690.

[10] 郝海燕，沙爱龙 . 两色金鸡菊提取物对运动小鼠抗疲劳和耐缺氧作用的研究 [J]. 动物医学进展，2019，40（2）：65-68.

[11] Dong Y，Ruan J，Ding Z，et al. Phytochemistry and comprehensive chemical profiling study of flavonoids and phenolic acids in the aerial parts of Allium Mongolicum Regel and their intestinal motility evaluation [J]. Molecules，2020，25（3）：577.

[12] 麦麦提亚森 • 多力昆，依米妮古丽 • 麦麦提，古丽那孜 • 别克达吾来提，等 . 转录组测序分析昆仑雪菊醇提物黄诺玛苷对胰岛素抵抗小鼠小肠类器官的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（10）：142-151.

[13] 张永威，王敬伟，李新霞，等 . 两色金鸡菊中黄诺玛苷的提取分离及抗血小板聚集作用研究 [J]. 医药导报，2020，39（4）：427-431.

[14] Mendel M，Chłopecka M，Latek U，et al. Evaluation of the effects of Bidens tripartita extracts and their main constituents on intestinal motility-an ex vivo study [J]. J Ethnopharmacol，2020，259：112982.

[15] 辛家良，宋志鹏，张旭华，等 . 马里苷、黄诺玛苷对 db/db 小鼠肠道菌群的影响及相关性 [J]. 中国微生态学杂志，2021，33（6）：640-644，650.

[16] 张永威，李新霞，王敬伟，等 . 两色金鸡菊中马里苷和黄诺玛苷的制备及其均匀性研究 [J]. 新疆医科大学学报，2020，43（3）：340-343.

[17] 王敬伟 . 两色金鸡菊黄酮成分奥卡宁标准样品制备及对血小板聚集影响 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2019.

[18] 朱妍锦 . 太子参对脾虚型大鼠肠道微生态的调节作用研究 [D]. 福州：福建中医药大学，2023.

[19] 许楷斯，倪晓良，许尤佳 . 罗笑容治疗岭南地区小儿泄泻经验探析 [J]. 中国中医基础医学杂志，2020，26（8）：1177-1179.

[20] 李亚欢，张冬梅，王淑艳，等 . 脾虚证动物模型研制概况 [J]. 中医药导报，2019，25（1）：100-102.

[21] 詹扬，万建华，李颖萌，等 . 乳酸菌素片对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国乳品工业，2021，49（8）：4-9，36.

[22] 郭晓明，徐珊，郭锦瑞，等 . 温运合剂对脾虚泄泻小鼠的肠道功能及肠道菌群的保护作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志，2014，23（16）：1711-1714，1720.

[23] 王霞，徐灿，吴秀园，等 . 核磁共振代谢组学研究狼毒大戟对大鼠粪便代谢物的影响 [J]. 分析化学，2019，47（5）：669-677.

[24] 孙祥瑞，高家荣，汪庆飞，等 . 补骨脂 - 肉豆蔻醇提物对脾虚泄泻小鼠水通道蛋白及结肠中细胞因子的影响 [J]. 蚌埠医学院学报，2018，43（2）：152-155，159.

[25] Akhter S，Irfan HM，Alamgeer，et a1. Nerolidol：a potential approach in rheumatoid arthritis through reduction of TNF-α，IL-1β，IL-6，NF-kB，COX-2 and antioxidant effect in CFA-induced arthritic model [J]. Inflammopharmacology，2022，30（2）：537-548.

[26] 张欣，高洁，张慧勤，等 . 血清 IL-6，IL-10 与非小细胞肺癌患者免疫治疗皮肤毒性的相关性分析 [J]. 中南药学，2022，20（9）：2195-2198.

[27] 马岩，王中江，杨靖瑜，等 . 动物双歧杆菌乳亚种 XLTG11 对克林霉素诱导的抗生素相关性腹泻的改善作用 [J]. 食品科学，2023，44（3）：170-178.

[28] 张艳霞，赵蓉，吕双然，等 . 腹泻型肠易激综合征中医证候分布与 VIP、SP、5-HT 动态变化的相关性分析 [J]. 河北中医药学报，2022，37（1）：17-20.

[29] 吕新，孙建之，刘姝静，等 . 龙胆苦寒伤胃的表现及酒炙的缓和作用 [J]. 中南药学，2018，16（2）：145-148.

[30] 杨瑰桃，马继登，李学伟，等 . 短链脂肪酸调控骨骼肌生理功能研究进展 [J]. 中国畜牧兽医，2023，50（6）：2286-2295.

[31] Lymperopoulos A，Suster MS，Borges JI. Short-chain fatty acid receptors and cardiovascular function [J]. Int J Mol Sci，2022，23（6）：3303.

[32] 苏钢，杨光勇，张庚鑫，等 . 基于 16S rRNA 测序探究葛根芩连汤对抗生素相关性腹泻肠道菌群结构的影响 [J]. 现代食品科技，2023，39（1）：11-19.

[33] Sittipo P，Lobionda S，Lee YK，et al. Intestinal microbiota and the immune system in metabolic diseases [J]. J Microbiol，2018，56（3）：154-162.

[34] 蔡莹，李翠茹，吴仪，等 . 五苓散对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国微生态学杂志，2023，35（8）：917-923.

[35] 马刚，张汝鹏，梁寒 . 幽门螺杆菌与胃癌相关的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床，2023，50（1）：44-48.

[36] 丁双双，胡振华，吉丽娟，等 . 扭曲真杆菌血流感染 1 例 [J]. 中国感染与化疗杂志，2019，19（2）：204-206.

[37] Pereira FC，Wasmund K，Cobankovic I，et al. Rational design of a microbial consortium of mucosal sugar utilizers reduces Clostridiodes difficile colonization [J]. Nat Commun，2020，11（1）：5104.

（收稿日期：2023-11-02；修回日期：2023-12-20）

综述

基于化学成分、药理作用和网络药理学的没食子质量标志物预测分析

丁艳，白姣姣，萨巴海提·阿不力米提，木巴拉克·伊明江*（新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011）

摘要：没食子为没食子蜂科（瘿蜂科）昆虫没食子蜂的幼虫寄生于壳斗科植物没食子树幼枝上产生的一种虫瘿。药用历史悠久，具有涩肠、固精、止咳、止血、敛疮之功效，用于久泻久痢、遗精、盗汗、咳嗽、创伤出血、口疮等病症。基于中药质量标志物（Q-Marker）核心理论，从没食子中医药理论中药性和功能主治、现代医学药效和药理作用、化学成分三个方面进行Q-Marker初步预测。通过文献的收集、整合和分析，对没食子Q-Marker的来源进行定位，基于网络药理学对成分进行有效性分析，确定多酚类、酚酸酯类成分中鞣质、没食子酸、鞣花酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯等化合物可作为没食子的主要Q-Marker，为临床前实验研究建立科学标准的质量控制体系提供参考依据。

关键词：没食子；质量标志物；多酚类；鞣质；没食子酸
中图分类号：R284.1，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0708-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.024

Prediction of quality markers for *Quercus Infectoria* Galls based on chemical composition, pharmacological effect and network pharmacology

DING Yan, BAI Jiao-jiao, Sababaiti Abulimiti, Mubarak Iminjan* (*College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011)

Abstract: *Quercus Infectoria* Galls is a gall from the larvae of Gallapidae insects on the young branches of the gallic tree of the Fagaceae. It has a long history in medicine, with effect in diarrhea prevention, congrolling nocturnal emission, preventing cough and bleeding, and healing sores. It is used for chronic diarrhea, spermatorrhea, night sweat, cough, trauma bleeding, stomatitis and other diseases. Based on the core theory of traditional Chinese medicine quality marker (Q-Marker), Q-Markers were predicted from three aspects: medicinal properties and functional indications, medicinal effect and pharmacological effect of modern medicine, and chemical compositions. Through literature analysis, the source of Q-Markers of gallstones was located, and the effectiveness of components was analyzed by network pharmacology. Compounds such as ellagic acid, gallic acid, ellagic acid, methyl gallate, ethyl gallate and other compounds in the polyphenolic and phenolic acid ester components can be used as the main Q-Markers of *Quercus Infectoria* Galls, providing references for standard quality control.

Key words: *Quercus Infectoria* Galls; Q-Marker; polyphenol; tannin; gallic acid

没食子（*Quercus Infectoria* Galls）为没食子蜂科（瘿蜂科）昆虫没食子蜂的幼虫寄生于壳斗科植物没食子树幼枝上所产生的一种虫瘿，在国内没有分布记录，主要从印度进口。没食子为民间习用药材，收载于《中国医学百科全书-维吾尔医学卷》[1]和《中华本草-维吾尔药卷》[2]，性质二级寒、三级干[3]。经过多年的中药传承探索，目前针对中药活性成分的药效和机制研究较为丰

作者简介：丁艳，女，硕士研究生，主要从事天然药物制剂学研究，email：3332404025@qq.com *通信作者：木巴拉克·伊明江，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物临床前研究，email：896612093@qq.com

富，而针对靶标的研究却很少[4]。本文对没食子相关文献进行归纳总结，根据没食子中医药理论中药性和功能主治、现代医学药效和药理作用、化学成分三个方面对没食子 Q-Markers 进行初步预测分析，并通过网络药理学进一步预测，为建立科学标准的质量控制体系提供参考依据。

1　传统功效和药理作用

1.1　基于传统医学的功能主治

没食子干寒、味涩而苦、性温，入肺、脾、肾经，具生干生寒、燥湿收敛、清热消炎、止泻止痢等功效[5]。没食子最早记载于《药性论》中：治大人小儿大腹冷、滑利不禁。《唐本草》记载主赤白利，肠滑，生肌肉。中医认为没食子具有涩肠、固精、止咳、敛疮之功效，临床用于咽喉肿痛、疮疡腐烂、伤口不愈、泻痢不止等湿热性疾病的治疗[6]。

1.2　基于现代医学药效的药理作用

现代医学证明没食子物质基础与其具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等诸多作用有关[7-8]。

1.2.1　抗氧化作用　没食子酸烷基酯是没食子酸（gallic acid，GA）一类的衍生物，常用于食品的抗氧化剂[9]。研究发现 GA 有较好的抗氧化作用，从没食子中提取没食子单宁馏分比没食子粗提物及合成的纯没食子单宁具有更高的抗氧化活性[10-11]。Kaur 等[12]用没食子提取物预处理巨噬细胞，发现没食子具有抗氧化活性。

1.2.2　抗炎作用　刘国卿等[13]实验结果表明，GA 对大鼠足跖肿胀有良好的抗炎效果。Kaur 等[14]研究表明没食子提取物能够显著抑制大鼠足水肿反应，提示没食子具有良好的抗炎作用。

1.2.3　抗肿瘤作用　Ishihara 等[15]研究发现 GA 能够抑制人白血病细胞的活性。Saleem 等[16]研究发现 GA 对 HOS-1 细胞系产生杀伤作用。GA 被证实能够降低人类癌细胞系的存活率[17]，具有良好的抗肿瘤作用[18]。Zhang 等[19]研究发现没食子提取物可以抑制结肠癌细胞的活性。研究还发现 GA 可抑制胰腺癌、肺癌、皮肤癌和其他肿瘤的生长[20]。

1.2.4　防治获得性免疫缺陷综合征（AIDS）作用　水解类 GA 的单体和低聚物经常用作抗人类免疫缺陷综合征的活性物质[21]。没食子单宁是目前用于抗人类免疫缺陷病毒（HIV）药物研究的重要种类之一。

1.2.5　抑菌、抗病毒作用　GA 对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、奈瑟氏球菌、伤寒杆菌等均有较强的抑制作用。Sawangjaroen 等[22]研究发现没食子甲醇提取物能够降低小鼠盲肠壁的病变程度，具有抗阿米巴病的潜力。Kheirandish 等[23]研究发现没食子甲醇提取物对利什曼菌具有高度抑制作用。Tabibzadeh 等[24]发现没食子水醇提取物对伴放线菌团聚杆菌有抗菌作用。Mohammadi-Sichani 等[25]测定没食子提取物抗菌活性，结果表明没食子是抗菌剂的潜在来源。

1.2.6　抗菌药物增敏剂　徐岩等[26]发现没食子酸丙酯与两性霉素 B 联合应用时，对茄病镰刀菌抗菌活性增加 8 倍，对黄曲霉菌抗菌活性增加 2 倍，有明显的抗真菌协同作用，与特比奈芬联合应用时对茄病镰刀菌抗菌活性增加 32 倍，对黄曲霉菌抗菌活性增加 2 倍，有效抑制眼部的丝状真菌，说明没食子烷基酯对抗菌药物具有增敏作用。

1.2.7　自由基清除剂　没食子酸酯是良好的自由基清除剂，能够减慢机体的衰老，抑制肝脏的脂质过氧化，保护线粒体，保护三硝基甲苯所致的肝损伤[27]。

1.2.8　保肝、保心作用　卜丽梅等[28]研究发现 GA 能明显提高内源性抗氧化酶活性保护心肌缺血再灌注损伤。Anand 等[29]研究发现相较于四氯化碳处理动物，GA 和四氯化碳联合处理后，脂质过氧化受到抑制，微粒体药物代谢酶含量增加，对血清谷丙转氨酶（GPT）和谷草转氨酶（GOT）具有保护作用，说明 GA 具有保肝作用。

1.2.9　抗糖尿病作用　曹俊伟[30]研究发现，GA 可能通过抑制 *α*- 淀粉酶和胰蛋白酶的活性，调节糖和脂肪代谢。Hwang 等[31]从没食子甲醇提取物中分离得到的 3-*O*-digalloyl-1，2，4，6-tetra-*O*-galloyl-*β*-D-glucose 对蔗糖酶、麦芽糖酶等糖苷酶具有显著的抑制作用，其抑制活性与降血糖药阿卡波糖相当。

2　化学成分

没食子含有多种化学成分，主要包括多酚类、黄酮类、萜类、甾醇类、微量元素、挥发油和糖等多种成分[32-33]，其中主要有效成分有鞣质和 GA。

2.1　多酚类

没食子的主要成分是多酚类化合物，见图 1 和表 1。

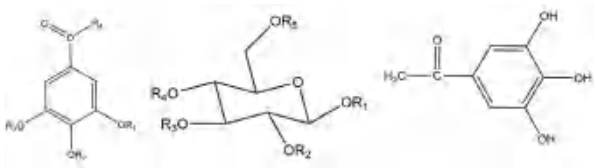


图 1　没食子多酚类化合物母核、取代基

Fig 1　Parent nucleus and substituents of gallate polyphenols

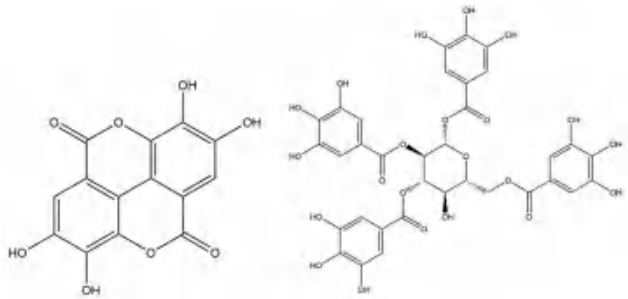
2.1.1　鞣质类　主要包含可水解鞣质和鞣花酸类鞣质，结构式见图 2。

2.1.2　酚酸及其酯类　GA 含量为 2% ～ 4%[35]，可以与糖结合成鞣质类化合物或聚合成小分子低聚物，少许以游离状态存在，结构式见图 3。

表 1 没食子中的多酚类化合物

Tab 1 Polyphenolic compounds in *Quercus Infectoria* Galls

序号	化合物	母核	R1	R2	R3	R4	R5	文献
1	没食子酸	a	H	H	H	OH	—	[34]
2	间双没食子酸	a	H	G	H	OH	—	[35]
3	丁香酸	a	CH_3	H	CH_3	OH	—	[36]
4	没食子酸甲酯	a	H	H	H	CH_3	—	[37]
5	1，2，6-tri-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	G	H	H	G	[35]
6	1，3，6- 三没食子酰葡萄糖	b	G	H	G	H	G	[7]
7	1，2，3，6- 四 -*O*- 没食子酰 -*β*-D- 葡萄糖	b	G	G	G	H	G	[35]
8	没食子酸乙酯	a	H	H	H	CH_2CH_3	—	[35]
9	没食子酸丙酯	a	H	H	H	$CH_2CH_2CH_3$		[38]
10	1-*O*- 没食子酰基葡萄糖	b	G	H	H	H	H	[39]
11	1，6-digalloyl glucopyranose	b	G	H	H	H	G	[39]
12	1，3，4，6-tetra-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	H	G	G	G	[35]
13	2，6-bis-*O*-digalloyl-1，3-di-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	GG	G	H	GG	[35]
14	6-*O*-digalloyl-1，2，3-tri-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	G	G	H	GG	[35]
15	2-*O*-digalloyl-1，3，4，6-tetra-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	GG	GG	G	G	[35]
16	3-*O*-digalloyl-1，2，4，6-tetra-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	G	G	G	G	[35]
17	4-*O*-digalloyl-1，2，3，6-tetra-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	G	G	GG	G	[35]
18	6-*O*-trigalloyl-1，2，3-tri-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	G	G	H	GGG	[35]
19	6-*O*-digalloyl-1，2，3，4-tetra-*O*-galloyl-*β*-D-glucose	b	G	G	G	G	GG	[35]
20	1，2，3，4，6- 五没食子酰葡萄糖	b	G	G	G	G	G	[35]
21	digalloyl-glucoside	b	G	G	H	H	H	[40]
22	1，2，3-trigalloyl-glucopyranose	b	G	G	G	H	H	[40]
23	tetragalloyl-glucoside	b	G	G	G	G	H	[40]
24	hexagalloyl-glucoside	b	G	G	G	G	GG	[40]
25	儿茶酚	—	—	—	—	—	—	[42]
26	咖啡因	—	—	—	—	—	—	[42]



鞣花酸　　1，2，3，6- 四 -*O*- 没食子酰基 -*β*-D- 葡萄糖

图 2 没食子中鞣质类化合物结构

Fig 2 Structure of tannin compounds in *Quercus Infectoria* Galls

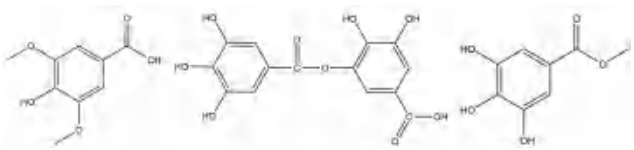
2.2 黄酮类

目前没食子中的黄酮类成分研究相对较少，文献报道药材中有穗花杉双黄酮、异柳酸双黄酮两个化合物[41-47]，见图 4；类黄酮类成分有柚皮苷、芦丁、迷迭香酸、槲皮苷和槲皮素[40]等化合物。

2.3 萜类及甾醇类

没食子中所含的三萜类化合物有栎樱酸、夜花酸、齐墩果酸甲酯、桦木酸甲酯[45]；甾体类有 *β*- 谷甾醇[46]、维生素 A 和维生素 C（见图 5）。

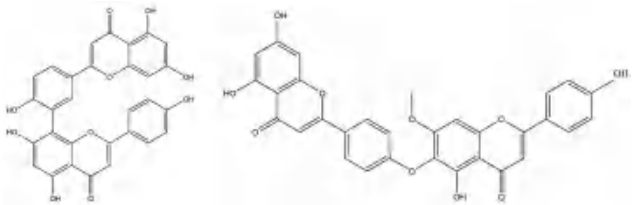
2.4 其他类



丁香酸　　间双没食子酸　　没食子酸甲酯

图 3 没食子中酚酸酯类化合物结构

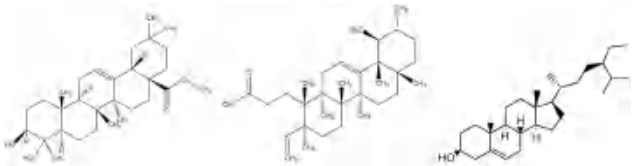
Fig 3 Structure of phenolic acid esters in *Quercus Infectoria* Galls



穗花杉双黄酮　　异柳酸双黄酮

图 4 没食子中黄酮类化合物结构

Fig 4 Structure of flavonoid compounds in *Quercus Infectoria* Galls

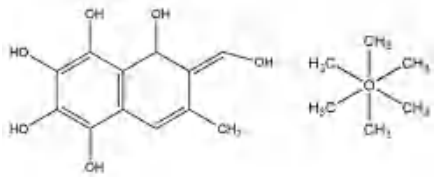


齐墩果酸甲酯　　栎樱酸　　*β*- 谷甾醇

图 5 没食子中萜类及甾醇类化合物结构

Fig 5 Structure of terpenoids and sterols in *Quercus Infectoria* Galls

没食子中含有大量的矿物质元素、挥发油、糖和其他成分[47-48]，如钙、钾、镁、六甲基醚、鞣花酸糖苷等，见图 6。



2- 甲基 -3- 羟甲基 -4，5，6，7，8- 五羟基萘　　六甲基醚

图 6　没食子中其他类化合物结构

Fig 6　Structures of other compounds in *Quercus Infectoria* Galls

3　没食子 Q-Marker 的初步预测分析

中药 Q-Marker 理论由刘昌孝院士[49-52]首次提出，其核心内容是将中药功能属性密切相关的化学物质作为反映中药安全性和有效性的标志性物质进行质量控制[53]。因此，通过文献分析和 Q-Marker 预测对没食子质量进行评价，有利于建立科学标准的质量控制方法。

3.1　基于中医药理论的 Q-Marker 预测分析

在中药药性理论中，寒属阴，能够减轻或消除温热病证，具有清热泻火、泻热通便等作用；苦能泄、能燥、能坚，即具有清泄火热、通泄大便、泻火存阴[54]的作用。现代化学研究表明，鞣质、酚酸类、皂苷、甾醇及微量元素等是中药苦味的主要来源[55-58]。涩味主要由水溶性酚类化合物产生，称为鞣质[59]。综上分析，没食子中鞣质、酚酸类、皂苷、甾醇及微量元素等成分应是其苦、涩的主要来源，可作为没食子 Q-Marker 的筛选参考。

3.2　基于现代医学的 Q-Marker 预测分析

现代医学研究显示，没食子具有抗氧化[12]、抗炎[14]、抑菌、抗病毒、抗肿瘤[18-19]、保肝保心的作用。药理学实验结果显示，没食子鞣质类成分具有抗氧化、抑菌、抗病毒、抗肿瘤[60]的功能；GA 类成分具有抗氧化[10]、抗炎[13]、抗病毒、抗肿瘤[15-17]、抑菌、保肝、降糖等作用，上述成分可为没食子 Q-Marker 的筛选及药效物质基础的研究奠定基础。

3.3　基于化学成分可测性的 Q-Marker 预测分析

《中国药典》2020 年版中以鞣质、GA 为主要成分对其进行分析。龙飞等[40]采用 LC-MS 指纹图谱分析不同产地没食子化学成分，通过相似度评价分析和聚类分析，发现各产地没食子的图谱无明显差别，大多数没食子药材的相似度均大于 0.900。欧亮苗[61]采用薄层色谱指纹图谱对不同批次没食子化学成分含量进行分析，结果表明 GA、没食子酸甲酯和鞣花酸在不同产地没食子中存在显著差异（$P \leqslant 0.05$）。上述研究说明，类似没食子这样具有多种功效和药理作用的传统药材不应只用一种成分作为 Q-Marker，而应从多种物质基础组成入手分析 Q-Marker 以反馈其内在质量。

4　基于网络药理学的没食子 Q-Marker 进一步预测分析

4.1　没食子 Q-Marker 的来源定位

没食子的主要药效物质鞣质类、酚酸类成分是其主要的化学标志物及活性成分，故将鞣质类、酚酸类化学成分作为没食子 Q-Marker 的来源定位。

4.2　基于网络药理学的没食子 Q-Marker 预测分析

4.2.1　没食子鞣质类及酚酸类活性成分筛选　通过文献及数据库查询没食子化学成分，利用 Swiss ADME（http：//www.swissadme.ch/）对所得成分进行筛选，得到 3 个酚酸类（GA、鞣花酸、丁香酸）和 2 个鞣质类（没食子酸甲酯、没食子酸乙酯）成分，共计 5 个活性成分。

4.2.2　靶点预测及蛋白互作（PPI）网络构建　运用 Swiss Target Prediction（http://swisstargetprediction.ch/）预测活性成分的靶点信息，得到 277 个与有效成分有关的蛋白。将获得的目标蛋白导入到 STRING 11.5 软件（https：//cn.string-db.org），物种选择为“homo sapiens”，绘制 PPI 网络图，该网络图中有 268 个节点、839 条边，见图 7。运用 Cytoscape3.8.2 软件对 PPI 靶点进行拓扑分析，共涉及核心靶点 30 个。PPI 网络的核心靶点主要有雌激素受体（ESR1）、表皮生长因子受体（EGFR）、酪氨酸激酶受体 2（ERBB2）、丝裂原活化蛋白激酶 8（MAPK8）、BCL2L1、CTNNB1 等靶点。这 30 个靶点与 GA、鞣花酸、丁香酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯 5 个成分有关。

4.3　通路注释和功能分析

4.3.1　基因本体（GO）功能富集分析　利用 Metascape 数据库（http：//metascape.org/gp/index.html）对 30 个核心靶点所对应的基因功能中的作用进行 GO 富集分析。选择 GO 中生物过程（BP）、分子功能（MF）和细胞组成（CC）3 个模块对基因进行功能注释（$P < 0.01$，最小计数为 3，富集因子＞ 1.5）。确定了 883 个 GO 条目，其中 BP 相关 770 条，主要涉及蛋白质磷酸化、酶联受体蛋白信号通路、程序性细胞死亡的正调节、细胞内信号转导的负调节、凋亡信号通路、免疫系统过程的负调节等过程；MF 相关 57 条，主要涉及蛋白结构域特异性结合、氧化还原酶活性、蛋白激酶活性、激酶结合等过程；CC 相关 56 条，主要富集在膜筏、细胞质的核周区域、髓鞘、含胶原蛋白的细胞外基

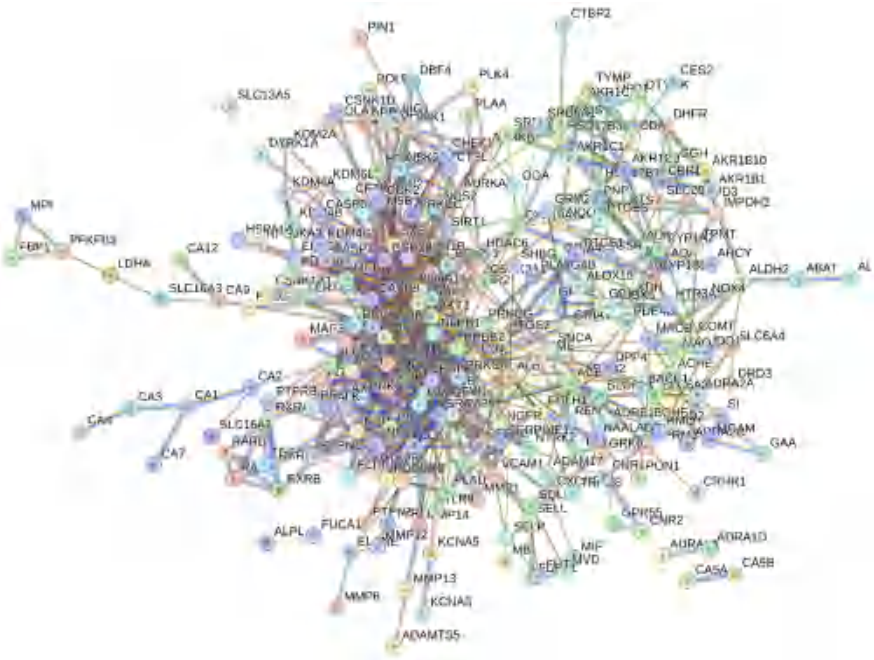


图 7 没食子活性成分 - 靶点网络

Fig 7 *Quercus Infectoria* Galls active ingredient-target network

质等。

4.3.2 基因组百科全书（KEGG）富集分析 利用 DAVID 数据库（http：//david.ncifcrf.gov）对 30 个核心靶点进行 KEGG 富集分析，限定检索类型为“人类基因”，筛选出 131 条通路，主要包括 PI3K-Akt、ErbB、IL-17、HIF-1、MAPK、结直肠癌、JAK-STAT、Toll 样受体等信号通路，结果提示没食子可能是通过调控这些通路从而实现疾病干预的目的，见图 8。

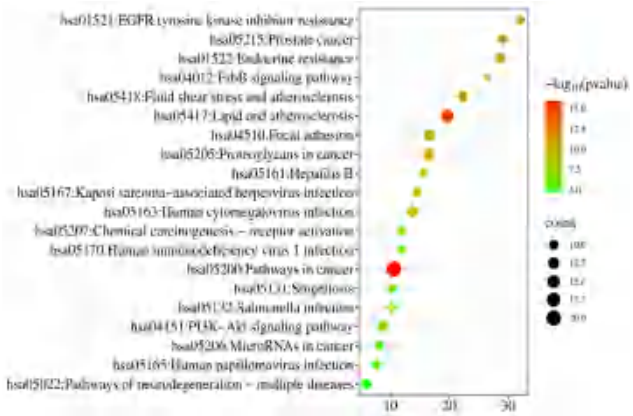


图 8 没食子核心靶点的 KEGG 富集分析

Fig 8 KEGG enrichment analysis of *Quercus Infectoria* Galls core targets

4.4 “成分 - 靶点 - 通路”网络构建

运用 Cytoscape3.8.2 软件根据筛选得到的 5 个成分、30 个靶点和 131 条通路，建立“成分 - 靶点 - 通路”网络图，见图 9。以化合物、靶点、信号通路的交联度为依据，对网络图进行分析。结果提示鞣花酸、GA、没食子酸乙酯化合物可能是没食子发挥药效的主要活性物质。AKT1、MAPK8、EGFR、GSK3B、BCL2、CASP8、SRC 等靶点的交联度是比较高的，提示这些可能是没食子中有效部位多酚类、酚酸酯类化合物发挥作用的关键靶点。

5 结语

没食子作为传统药使用历史悠久，具有较高的开发利用前景。龙飞 [62] 对没食子的化学成分和药理作用进行归纳总结，分析指出没食子药材的质量标准体系尚未完善。

没食子具有多种药理作用，现代医学研究较为宽泛，但某一药理作用的深入研究与其功能主治的关联性不足，有待进一步探索以期达到最佳疗效；目前，对没食子的化学成分研究充分，但没有有关粗提物或药材中的定量研究，这是目前中药材质量标准难以统一的瓶颈问题，应就其化学成分含量与中药材的质量开展进一步的研究。

本文对没食子的药效标志性成分进行系统的整理，依据中医药理论结合 Q-Marker 进行分析，再根据没食子中医药理论中药性和现代医学研究与化学成分的相关性对没食子 Q-Marker 进行分析，最后通过网络药理学分析，发现鞣花酸、GA、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、丁香酸等化合物可通过 MAPK8、EGFR、AKT1、BCL2、CASP8、GSK3B、SRC 等靶点发挥药理作用。后续还需依据没食子 Q-marker 的预测分析与液质联用、代谢组学等前沿技术相结合，对其质量开展深入研究，以便筛选并确定没食子的 Q-Marker，为没食子的质量控制与评价提供更加全面的参考

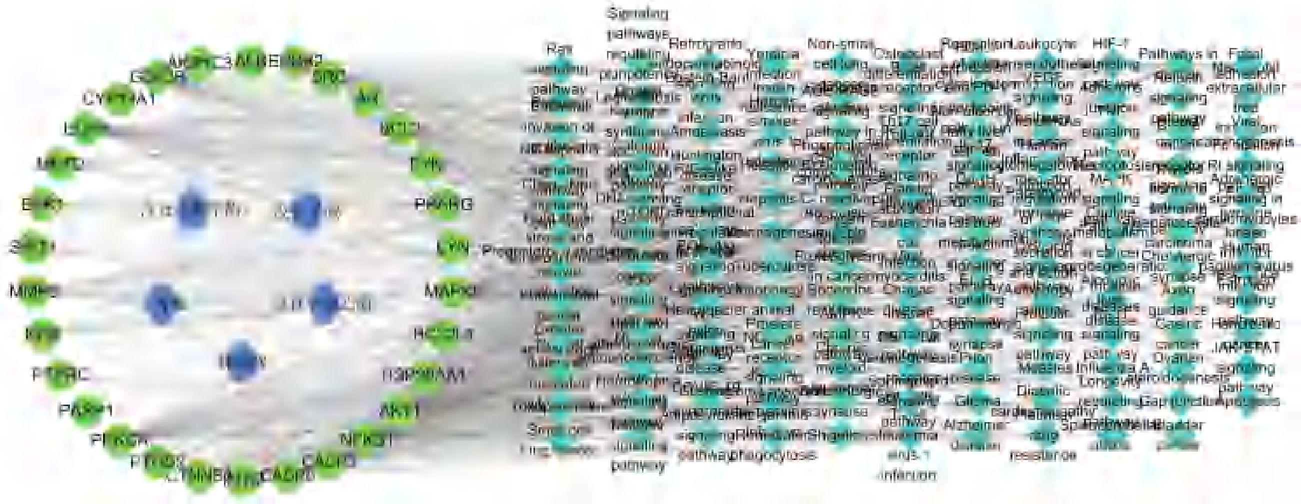


图 9　没食子“成分 - 靶点 - 通路”网络

Fig 9　“Component-target-pathway” network of *Quercus Infectoria* Galls

依据，从而建立没食子质量控制及溯源体系。

参考文献

[1] 中国医学百科全书编辑委员会 . 维吾尔医学 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2005：217.

[2] 国家中医药管理局中华本草编委会 . 中华本草 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2005：161-162.

[3] 新疆维吾尔自治区卫生厅 . 维吾尔药材标准 - 上册 [M]. 乌鲁木齐：新疆科技卫生，1993：157-158.

[4] 赵玉男，谢伟东，邢东明，等 . 中药有效成分作用靶点研究的策略与实践 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2016，18（6）：1005-1011.

[5] 木巴拉克 • 伊明江 . 溃结安抗溃疡性结肠炎作用机制研究及其稳定性、毒性评价 [D]. 长沙：中南大学，2014.

[6] 塔布斯•马那尔，苏来曼•哈力克 . 没食子质量标准研究 [J]. 中国现代中药，2022，24（7）：1246-1252.

[7] 龚晶 . 没食子物质基础及其主要活性成分的药代动力学研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2017.

[8] 木艾塔尔 • 努尔麦麦提，夏木西努尔 • 艾克拜尔，吐尼沙汗 • 买提卡斯木 . 维药中没食子酸的药理作用研究进展 [J]. 中国民族医药杂志，2015，21（11）：53-54.

[9] 刘延麟 . 没食子单体化合物分离鉴定及其药理活性研究 [D]. 长春：吉林大学，2009.

[10] Stupans L，Tan HW，Kirlich A，et al. Inhibition of CYP3A-mediated oxidation in human hepatic microsomes by the dietary derived complex phenol，gallic acid [J]. J Pharm Pharmacol，2002，54（2）：269-275.

[11] Kamarudin NA，Nik Salleh NNH，Tan SC. Gallotannin-enriched fraction from *Quercus infectoria* Galls as an antioxidant and inhibitory agent against human glioblastoma multiforme [J]. Plants（Basel），2021，10（12）：1-14.

[12] Kaur G，Athar M，Alam MS. *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages [J]. Chem Biol Interact，2008，171（3）：272-282.

[13] 刘国卿，王秋娟，杨宏健 . 野葡萄成分没食子酸的药理研究 [J]. 南京药学院学报，1983（2）：43-47.

[14] Kaur G，Hamid H，Ali A，et al. Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of Quercus infectoria [J]. J Ethnopharmacol，2004，90（2-3）：285-292.

[15] Ishihara M，Sakagami H. Application of semiempirical method to estimate the cytotoxic activity of gallic acid and its related compounds [J]. Anticancer Res，2003，23（3B）：2549-2552.

[16] Saleem A，Husheem M，Härkönen P，et al. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of Terminalia chebularetz. fruit [J]. J Ethnopharmacol，2002，81（3）：327-336.

[17] Lee IR，Yang MY. Phenolic compounds from Duchesne a chrysanthemum and their cytotoxic activities in human cancer cell [J]. Arch Pharm Res，1994，17（6）：476-479.

[18] 梁爽 . 没食子酸抗肿瘤作用研究进展 [J]. 广西医学，2017，39（7）：1068-1072.

[19] Zhang H，Wang YB，Liu JY，et al. Traditional Uyghur medicine *Quercus infectoria* galls water extract triggers apoptosis and autophagic cell death in colorectal cancer cells [J]. BMC Complement Med Ther，2020，20（1）：371-383.

[20] Zheng XH，Yang J，Yang YH. Research progress on pharmacological action of gallic acid [J]. Chin J Hosp Pharm，2017，94-98.

[21] 毕良武，吴在嵩 . 单宁在抗艾滋病研究中的应用 [J]. 林产化工通讯，1998（2）：11-15.

[22] Sawangjaroen N，Sawangjaroen K，Poonpanang P. Effects of Piper longum fruit，Piper sarmentosum root and *Quercus infectoria* nut gall on caecal amoebiasis in mice [J]. J Ethnopharmacol，2004，91（2-3）：357-360.

[23] Kheirandish F，Delfan B，Mahmoudvand H，et al. Antileishmanial，antioxidant，and cytotoxic activities of *Quercus infectoria* Olivier extract [J]. Biomed Pharmacother，2016，82：208-215.

[24] Tabibzadeh NZ，Tabatabaei RM，Hakemi VM，et al. Evaluation of the antibacterial effect of hydroalcoholic extract of the galls of *Quercus infectoria* on Aggregatibacter actinomycetemcomitans [J]. J Adv Periodontol Implant Dent，2023，15（1）：35-41.

[25] Mohammadi-Sichani M，Karbasizadeh V，Dokhaharani SC. Evaluation of biofilm removal activity of *Quercus infectoria* galls against *Streptococcus mutans* [J]. Dent Res J（Isfahan），2016，13（1）：46-51.
[26] 徐岩，庞广仁，吕雪芳 . 没食子酸丙酯对抗真菌药体外抗丝状真菌活性的影响 [J]. 中华眼科杂志，2006（4）：309-312.
[27] 李中，杨建会，史霖 . 没食子酸丙酯对三硝基甲苯所致肝损伤的保护作用 [J]. 卫生毒理学杂志，1998（3）：23-24.
[28] 卜丽梅，关凤英，乔萍 . 没食子酸对大鼠缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究 [J]. 中国实验诊断学，2010，14（11）：1693-1697.
[29] Anand KK，Singh B，Saxena AK，et al. 3，4，5-Trihydroxy benzoic acid（gallic acid），the hepatoprotective principle in the fruits of *Terminalia beleric a-bioassay* guided activity [J]. Pharmacol Res，1997，36（4）：315-321.
[30] 曹俊伟 . 没食子酸酯基多酚对淀粉消化酶的抑制作用 [D]. 咸阳：西北农林科技大学，2021.
[31] Hwang JK，Kong TW，Baek NI，et al. alpha-Glycosidase inhibitory activity of hexagalloylglucose from the galls of *Quercus infectoria* [J]. Planta Med，2000，66（3）：273-274.
[32] 龚晶，陈国平，李琳，等 . 液相色谱 - 离子阱 - 飞行时间质谱法分析没食子的化学成分 [J]. 中药新药与临床药理，2020，31（10）：1227-1232.
[33] 马尚智，秦惠玉，龙飞 . 没食子多酚类化合物的鉴定及其在 UPLC-MS/MS 中的裂解规律研究 [J]. 中草药，2017，48（22）：4632-4638.
[34] 任源 . 没食子化学成分及溃结安灌肠剂的研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2005.
[35] Nishizawa M，Yamagishi T，Nonaka G，et al. Tannins and related compounds. Isolation and characterization of polygalloylglucoses from Turkish galls（*Quercus infectoria*）[J]. J Chem Soc，1983：961-965.
[36] Vermani A，Navneet，Chauhan A，et al. Physico-chemical analysis of ash of some medicinal plants growing in Uttarakhand，India [J]. Nat Sci，2010，8（6）：88-91.
[37] Redwane A，Markouk M，et al. Larvicidal activity of extracts from *Quercus lusitania* var. *infectoria galls*（Oliv.）[J]. J Ethnopharmacol，2002，79：261.
[38] Nonaka GI，Sakai T，Nakayama S，et al. Tannins and related compounds，101. isolation and structures of c-glycosyl hydrolyzable tannins from Turkish Galls [J]. J Nat Prod，1990，53（5）：1297-1301.
[39] Ikram M，Nowshad F. Constituents of *Quercus infectoria* [J]. Planta Med，1977，31：286-287.
[40] 龙飞，马尚智，于玮，等 . LC-MS 指纹图谱结合一测多评法评价没食子药材质量 [J]. 石河子大学学报（自然科学版），2017，35（4）：479-485.
[41] Onal A，Sari A，Soylak M. Ellagic acid from gallnut（*Quercus infectoria*）：extraction and determination of its dyeing conditions for natural fibres [J]. J Sci Ind Res，2005，64：491-495.
[42] Mekseepralard C，Kamkaen N，Wilkinson JM. Antimicrobial and antioxidant activities of traditional Thai herbal remedies for aphthous ulcers [J]. Phytother Res，2010，24（10）：1514-1519.
[43] Rukayadi Y，Yong D，Hwang JK. In vitro anticandidal activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb [J]. J Antimicrob Chemother，2006，57（6）：1231-1234.
[44] Hamid H，Kaur G，Abdullah ST，et al. Two new compounds from the galls of *Quercus infectoria* with nitric oxide and superoxide inhibiting ability [J]. Pharm Biol，2005，43（4）：317-323.
[45] Dar MS，Ikram M，Fakouhi T. Pharmacology of *Quercus infectoria* oliv [J]. J Pharm Sci，1976，46（6）：1791-1794.
[46] Hameed IH，Jasim H，Kareem MA，et al. Alkaloid constitution of *Nerium oleander* using gas chromatography-mass spectroscopy（GC-MS）[J]. Res J Medicinal Plant，2015，9（9）：326-334.
[47] Hassan HF. Study the effect of *Quercus infectoria* galls extracts on growth of Candida albicans and Candida glabrata in vitro which isolated from vaginal swabs [J]. Iraqi J Vet Med，2011，35（2）：85-94.
[48] Soon LK，Hasni E，Law KS，et al. Ultrastructural findings and elemental analysis of *Quercus infectoria* oliv [J]. Ann Microbiol，2007，7：32-37.
[49] 刘昌孝 . 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. 中草药，2017，48（18）：3669-3676.
[50] 刘昌孝 . 发展中药质量标志物（Q-marker）理论方法和策略，研究提升中药科学技术水平 [J]. 药学学报，2019，54（6）：185-186.
[51] 刘昌孝 . 中药质量标志物（Q-Marker）研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药，2021，52（9）：2511-2518.
[52] 张铁军，白钢，刘昌孝 . 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报，2019，54（2）：187-196，186.
[53] 刘昌孝，陈士林，肖小河 . 中药质量标志物（Q-Marker）：中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药，2016，47（9）：1443-1457.
[54] 周祯祥，唐德才 . 中药学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2020.
[55] 刘群，杨晓农 . 中药四气五味的现代认识 [J]. 西南民族大学学报（自然科学版），2006（5）：981-985.
[56] 韩学超，孙坤坤，徐琬梨 . 苦味中药的归经及临床应用 [J]. 山东中医药大学学报，2022，46（4）：463-466.
[57] 张静雅，曹煌，刘昌孝，等 . 中药苦味药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药，2016，47（2）：187-193.
[58] 吴安芝，张引拖 . 论述苦味药的药性特征及其配伍作用 [J]. 内蒙古中医药，2011，30（7）：85-86.
[59] Xue PY，Zhang GJ，Zhang J，et al. Synergism of ellagic acid in combination with radiotherapy and chemotherapy for cancer treatment [J]. Phytomedicine，2022，99：153998.
[60] 韩雪，郑玉，谢兴亮，等 . 中药多酚涩味的内涵认识与掩蔽方法研究进展 [J]. 中国中药杂志，2022，47（20）：5443-5451.
[61] 欧亮苗 . 维药没食子质量控制及对变异链球菌抑制作用的研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2016.
[62] 龙飞 . 没食子化学成分的分离及化合物鉴定研究 [D]. 石河子：石河子大学，2017.

（收稿日期：2023-08-10；修回日期：2023-12-05）

共晶改善黄酮类化合物成药性能的研究进展

尹苗苗[1]，尚海花[2]，侯越[2]，陶铭[3]，李祎亮[2*]，侯文彬[2*]（1. 天津中医药大学，天津　301617；2. 北京协和医学院&中国医学科学院放射医学研究所，天津市放射医学与分子核医学重点实验室，天津　300192；3. 沈阳药科大学，辽宁　本溪　117004）

摘要：黄酮类化合物是一类天然有机化合物，种类和数量众多，因具有广泛的药理活性而备受关注，已经成为国内外天然药物开发和研究的热点。然而，黄酮类化合物本身存在着水溶性差、生物利用度低和在体内不稳定等问题，限制了其临床应用。由于黄酮类化合物中通常缺乏可电离的基团，共晶策略是提高这些化合物的溶解度和生物利用度的有效方法。笔者对近年来成功制备的黄酮类化合物共晶对其原料药物溶解度、溶出速率、渗透性、生物利用度等方面的影响进行综述，并简要介绍其改变机制，以期为黄酮类化合物共晶产品的进一步开发与深入研究提供参考。

关键词：黄酮类化合物；共晶；成药性能；改变机制

中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0715-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.025

Research progress in cocrystal improvement of druggable properties of flavonoids

YIN Miao-miao[1], SHANG Hai-hua[2], HOU Yue[2], TAO Ming[3], LI Yi-liang[2*], HOU Wen-bin[2*] (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine*, *Institute of Radiation Medicine*, *Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences*, *Tianjin* 300192; 3. *Shenyang Pharmaceutical University*, *Benxi Liaoning* 117004)

Abstract: Flavonoids are natural organic compounds with many types and quantities. They have attracted much attention due to their extensive pharmacological activities, and have become a hot spot in the development and research of natural drugs at home and abroad. However, flavonoids also have problems such as poor water solubility, low bioavailability and instability in vivo, which limit their clinical application. Because flavonoids usually lack ionizable groups, cocrystal strategy is often an effective way to improve the solubility and bioavailability of these compounds. The effects of flavonoids cocrystal successfully prepared in recent years on the solubility, dissolution rate, permeability and bioavailability of raw materials were reviewed and its mechanism was briefly introduced to provide reference for further development and in-depth research of flavonoids cocrystal products.

Key words: flavonoid; cocrystal; druggable property;mechanism of change

黄酮类化合物（flavonoids）是一类广泛分布于植物中的天然有机化合物，种类和数量众多，具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化作用和雌激素样作用等广泛的药理活性而备受瞩目[1-2]，已经成为国内外天然药物开发和研究的热点。黄酮类化合物大多是结晶性固体，游离的黄酮苷元一般难溶或不溶于水，存在水溶性差、生物利用度低和在体内不稳定等问题，限制了黄酮类化合物的临床应用，进而影响了其临床疗效的发挥，并成为制约其应用的瓶颈之一[3]。

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82104012，No.82202950）；中国医学科学院医学与健康科技创新工程国家医学健康科技战略平台与体系建设专项项目资助（No.2022-I2M-2-003）；天津市自然科学基金项目（No.22JCQNJC00690）；中央高校基本科研业务费专项资金（No.3332022063）。

作者简介：尹苗苗，女，在读硕士研究生，主要从事中药新药研发，email：1169741663@qq.com　*通信作者：侯文彬，男，研究员，主要从事中药新药研发，email：houwenbin@irm-cams.ac.cn；李祎亮，男，研究员，主要从事药物化学研究，email：liyiliang@irm-cams.ac.cn

而黄酮苷中存在糖，与苷元相比，它们通常具有较高的水溶性。提高难溶性药物口服递送的生物利用度一直以来都是药学研究的难点和挑战。基于晶体工程学理论的药物共晶能够在不改变药物化学结构的基础上改善药物的溶解度、溶出速率、稳定性、熔点等诸多理化性质（见图 1），因而受到越来越多的关注 [4]。

共晶是由两种或两种以上不同的分子或离子化合物组成的单相材料，通常按一定的化学计量比组成，由非共价相互作用结合，主要是氢键，既不是溶剂化物也不是简单的盐 [5]。由于黄酮类化合物中通常缺乏可电离的基团，但其大多数结构中含有许多酚羟基，可用作质子受体和质子供体，从而可以与共晶配体（cocrystal former, CCF）形成氢键，共晶策略往往是提高这些化合物的溶解度和生物利用度的有效方法。本文综述了共晶在黄酮类化合物中的研究应用进展，概述了近年来文献中成功制备的黄酮类化合物共晶对其原料药物的成药性能（溶解性、生物利用度、药理活性、渗透性、吸湿稳定性、压片性能等）的影响（见图 1），并简要介绍其改变机制，以期为黄酮类化合物共晶产品的进一步开发与深入研究提供参考与借鉴。

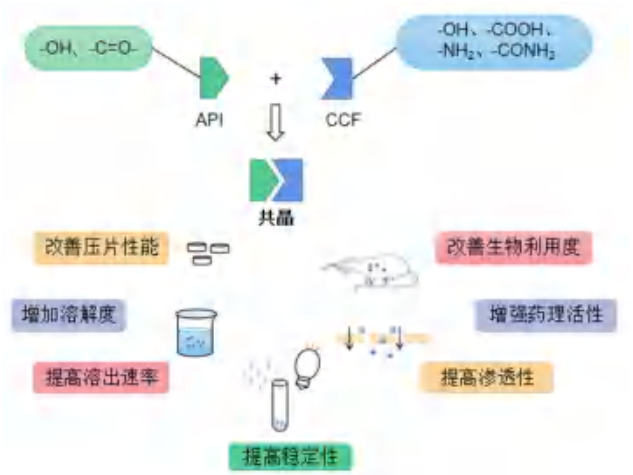


图 1 共晶在改善黄酮类化合物成药性能中的应用

Fig 1 Application of cocrystal in improving the druggable properties of flavonoids

1 共晶改善黄酮类化合物成药性能的研究

药物共晶的极性和表面电荷分布状态等不同于原有药物，可为人为调控药物活性成分的成药性能提供一个很好的途径。近年来，药物共晶在改善黄酮类药物的理化性质和药理活性等方面取得了很大进展。

1.1 改善溶解性

共晶最突出的应用是提高活性药物分子（API）的溶解性。溶解性是药物的重要属性之一，现阶段很多药物由于溶解性差而不易在人体内被吸收利用，难以用于临床 [6]。溶解度是评价药物共晶理化性质的重要参数之一 [7]，药物共晶的溶解度一般都优于原料药。截至目前，研究人员已经设计合成了许多黄酮类药物共晶，成功改善了药物的溶解性能。检索 PubMed 和 CNKI 数据库，发现有 32 篇文献报道了共晶溶解度提高程度的具体数据，其中大多数黄酮化合物共晶溶解度表现出 1 ～ 10 倍的增强。共晶与原料药的溶解度之比统计结果见图 2。在 3 篇文献报告中，共晶的溶解度甚至比原料药提高了 50 倍以上 [8-10]。

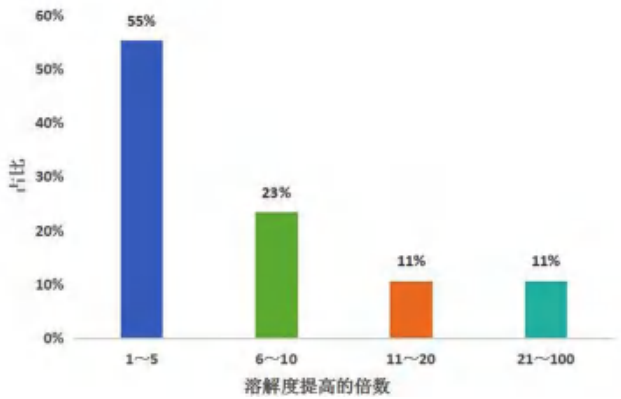


图 2 32 篇文献中报告的溶解度提高程度统计图

Fig 2 Statistical chart of the degree of solubility improvement in 32 literatures

1.1.1 黄酮类化合物 游离黄酮类化合物为平面型分子，分子与分子间排列紧密，分子间引力较大，故通常水溶性较差。黄芩素（baicalein，BE）是一种天然生物活性黄酮类化合物，主要来自黄芩的根部，它被广泛用作抗氧化剂，还可以抗病毒、抗菌、抗炎和抗过敏 [11]。作为典型的游离黄酮类化合物，其水溶性只有 16.82 μg • mL^{-1}，因此治疗效果和口服生物利用度受到高度限制 [12]。Li 等 [13] 研究在黄芩素结构中引入水溶性较好的茶碱作为共晶配体，通过优化黄芩素与茶碱的比例制备出了黄芩素 - 茶碱（BE-TH）共晶。溶出度测试表明，与黄芩素原料药相比，BE-TH 共晶显著提高了黄芩素的溶出速率，并且在盐酸缓冲液（pH ＝ 1.2）和磷酸盐缓冲液（pH ＝ 6.8）中，BE-TH 共晶 6 h 时的溶出度分别是原料药黄芩素的 2.2 倍和 7.1 倍。

1.1.2 黄酮醇类化合物 游离黄酮醇类化合物与黄酮类化合物类似，分子间引力较大，难溶于水。Hong 等 [14] 研究了杨梅素（myricetin，MYR）及其共晶 MYR-CAF（咖啡因）、MYR-NIC（烟酰胺）、MYR-INM（异烟酰胺）和 MYR-CAY（4- 氰基吡

啶）粉末在 pH 1.2 盐酸水溶液、pH 4.5 乙酸盐缓冲液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中的溶解性能，结果表明，4 种共晶在每种介质中的溶解度和溶出速率均高于 MYR，溶解度相较 MYR 增加了约 3 ～ 8 倍，达到峰值的时间减少到仅 10 ～ 20 min。在 pH 1.2、4.5、6.8 3 种溶出介质中，MYR 的溶解度，分别从原料药 MYR 的 1.5 μg • mL^{-1} 以下提高到 11.9、10.9、9.8 和 7.1 μg • mL^{-1}，表明共晶是提高 MYR 溶解度的有效方法。

1.1.3 二氢黄酮类化合物 游离的二氢黄酮类化合物均为非平面型分子，分子与分子间排列不紧密，分子间引力降低，在水中溶解度稍大，但仍不足以达到良好的口服吸收 [15]。Liu 等 [16] 尝试用共晶改善橙皮素（hesperetin，HES）的理化性质，以提高其亲水性。在人工模拟胃肠液中不同时间的溶出测试表明，原料药 HES 的溶解度为 23.13 μg • mL^{-1}（pH 1.2）和 21.12 μg • mL^{-1}（pH 6.8），共晶形成后，HES 在 pH 1.2 和 pH 6.8 的缓冲液中溶解度分别提高到 44.89 μg • mL^{-1} 和 41.55 μg • mL^{-1}，虽然溶出达到峰值后，HES 的浓度开始下降，但仍然稳定地接近原料药 HES 所表现出的水平。这种溶解行为的原因是长时间暴露于水介质时共晶分解为起始原料药和配体，这种被称为降落伞效应的特殊效应提供了一个周期窗口，足以使共晶在释放活性成分之前被吸收到体循环中 [17]。

1.1.4 二氢查耳酮类化合物 根皮素（phloretin，Phl）是一种天然二氢查耳酮类化合物，属于生物制药分类系统（BCS）Ⅱ类，其特点是溶解度低，渗透性高。其与异烟肼（Inz）形成共晶后，相比原料药溶解度显著提高，Phl 的平衡溶解度约为 4.38 μg • mL^{-1}（pH 1.2）和 21.39 μg • mL^{-1}（pH 6.8），共晶形成后在两种缓冲液中的溶解度明显提高，分别为 46.84 μg • mL^{-1}（pH 1.2）和 477.24 μg • mL^{-1}（pH 6.8）[18]。

1.1.5 异黄酮类化合物 异黄酮结构中 B 环受吡喃环羰基的立体阻碍，分子呈平面型，分子间引力降低，虽相较于游离黄酮、黄酮醇类化合物水溶性略大，但其溶解性能仍有待于提高。有研究证明葛根素（puerarin，PUE）可以通过与 L- 脯氨酸（PRO）形成共晶提高溶解度 [19]。通过重结晶方法合成共晶，得到了 PUE-PRO 共晶的两种不同形式，即无溶剂化形式 [PUE][PRO]（Ⅰ）和溶剂化形式 $[PUE]_2[PRO] \cdot EtOH \cdot (H_2O)_2$（Ⅱ）。与 PUE 原料药相比，Ⅰ和Ⅱ在水中（pH 7.0）、pH 1.2 和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中的溶解度几乎均增加了 2 倍，溶出速率也都大幅提高，其中，Ⅱ表现出比Ⅰ和 PUE 原料药更高的溶出速率。

1.2 提高生物利用度

生物利用度是指药物被吸收进入全身血液循环的速度与程度，反映了所给药物进入全身血液循环的药量比例。药物的生物利用度并不是单一的指标，它与药物的稳定性、溶解度和溶出速率有密切关系 [20]。形成共晶以后，通常会使 API 的生物利用度得到提高，所以，利用共晶来改善 BCS Ⅱ类和 BCS Ⅳ类药物的口服吸收一直是近年来研究的重点。检索 PubMed 和 CNKI 数据库，有 15 篇文献报道了黄酮类化合物共晶药代动力学实验的具体数据，分析发现文献中制备的共晶血浆药物浓度时间的曲线下面积（*AUC*）较原料药均表现出 1 ～ 10 倍的增强，其中 20% 的共晶提高了 6 ～ 10 倍，80% 的共晶提高了 1 ～ 5 倍。

1.2.1 黄酮醇类化合物 槲皮素（quercetin），是常见的黄酮醇，也是研究最多的黄酮类化合物之一。有研究人员报道口服给药后只有不到 1% 的槲皮素在胃肠道中被吸收 [21]。为了提高槲皮素的生物利用度，Wu 等 [22] 设计合成了槲皮素 - 烟酰胺共晶，药代动力学实验结果表明大鼠口服含与槲皮素原料药等量的槲皮素 - 烟酰胺共晶后，槲皮素的血药浓度明显高于单独服用槲皮素原料药。最大血药浓度（C_{max}）是槲皮素原料的 1.3 倍，血浆药物浓度曲线下面积 $AUC_{0\sim12\,h}$ 明显升高，提高了近 4 倍。这些结果表明槲皮素 - 烟酰胺共晶可以增强槲皮素的口服吸收，有效提高槲皮素的生物利用度。

橙皮素和胡椒碱共晶的药代动力学实验结果表明，橙皮素原料药的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 分别为 0.12 μg • mL^{-1} 和 0.53 μg/（mL • h），而橙皮素和胡椒碱物理混合物的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 分别为 0.19 μg • mL^{-1} 和 1.17 μg/（mL • h），共晶的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 分别为 0.61 μg•mL^{-1} 和 3.23 μg/（mL•h），橙皮素在共晶中的生物利用度明显高于橙皮素原料药 [16]。这说明当与胡椒碱共同给药时，橙皮素的口服生物利用度可以大大提高。与橙皮素原料药相比，橙皮素共晶较高的血浆浓度和生物利用度可能是由于共晶的溶解度更好，这使得肠道细胞容易吸收药物。另外，这一结果与胡椒碱是一种生物增强剂的报道一致，即其有助于改善体内不溶性药物的吸收 [23]。

1.2.2 二氢黄酮类化合物 Cui 等 [24] 制备出了柚皮素（naringenin）共晶，并对其进行了溶解度和药代动力学的研究。血浆浓度 - 时间曲线显示，柚皮素的口服吸收极差，C_{max} 仅为 0.51 μg•mL^{-1}（出现在 2.2 h）。而柚皮素 - 异烟酰胺共晶的 C_{max} 可达

3.39 μg • mL^{-1}（出现在 0.083 h），这可能是由于其溶解速率较快；柚皮素 - 烟酰胺和柚皮素 - 咖啡因共晶，两者的 C_{max} 分别出现在 0.083 h 和 0.40 h，达到 2.91 μg • mL^{-1} 和 1.65 μg • mL^{-1}；此外，柚皮素 - 甜菜碱共晶，C_{max} 比柚皮素原料药高 3.35 倍，$AUC_{0\sim24\,h}$ 更是高出 4.91 倍。这些结果的发现将为柚皮素的开发提供新的机会，并且为通过共晶策略提高药物的生物利用度开辟新的途径。

1.2.3 查尔酮类化合物 异甘草素（isoliquiritigenin，ISL）是一种丰富的膳食类黄酮，从甘草、乌拉尔甘草、中华黄芪等植物的根中分离出来，具有多种药理活性[25]。然而，异甘草素在人体吸收不良，临床使用受限。Xu 等[26]报道了 ISL 的两种新共晶的合成 [异甘草素 - 烟酰胺（ISL-NIC）共晶和异甘草素 - 异烟酰胺（ISL-INM）共晶]。与 ISL 原料药相比，两种共晶都表现出更好的药代动力学行为，ISL-INM 共晶改变了吸收曲线的整体形状，t_{max} 缩短，C_{max} 和 $AUC_{0\sim24\,h}$ 分别增加了 2.00 倍和 1.90 倍。与 ISL-INM 共晶相比，ISL-NIC 共晶对原始 ISL 口服生物利用度改善的程度略低，ISL-INM 共晶对生物利用度的较大增强效应与溶解速率的研究相一致，其中 ISL-INM 共晶的溶解速率快于 ISL-NIC 共晶。由此可见，共晶可以提高 ISL 在大鼠体内的口服生物利用度，特别是 ISL-INM 共晶。

1.3 增强药理活性

优越的临床疗效是药物开发和改性的最终目标，良好的生物学特性是药物临床应用的先决条件。近年来文献中对于黄酮类化合物共晶的药理活性评价集中于抗肿瘤以及抗氧化。

1.3.1 黄酮类化合物 以往报道显示，芹菜素（apigenin）对乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、肝癌等多种肿瘤具有预防、治疗或化疗增敏作用[27]。生立嵩等[28]运用晶体工程学方法，设计制备了芹菜素与哌嗪的共晶，进一步提高了芹菜素的体外抗肿瘤药效。将共晶与物理混合物在不同肿瘤细胞系中的体外抗肿瘤药效进行比较，结果发现在 U87 细胞系、MDA-MB-231 细胞系以及 A549 细胞系中，相同芹菜素浓度的共晶，肿瘤抑制率较物理混合物明显更高。共晶 48 h 时 IC_{50} 在 5 μmol • L^{-1} 左右，物理混合物 IC_{50} 则大于 40 μmol • L^{-1}。这说明共晶可显著提高芹菜素的药理活性。

1.3.2 二氢黄酮类化合物 有研究发现，小鼠口服给药柚皮素 - 甜菜碱共晶后，与单给柚皮素原料药（对照组）相比，柚皮素在小鼠肝脏中的分布显著增加，柚皮素 - 甜菜碱共晶对 C57 BL/6J PNPLA3 I148M 转基因小鼠高脂血症模型（模型组）表现出更好的抗高脂血症作用[24]。此外，对照组和模型组小鼠血清中的三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平，差异显著（$P < 0.05$），口服给药后，柚皮素 - 甜菜碱共晶给药组的血脂水平低于模型组，血液中 TC 水平降低的程度大于柚皮素 - 甜菜碱物理混合物和柚皮素原料组。

1.3.3 二氢黄酮醇类化合物 由两种或多种活性药物成分组成的药物 - 药物共晶已发展成为一类新的固体形式的 API，将理化性质互补且具有相似药理活性的药物制备成共晶后，不仅可以显著改善两种药物理化性质的不足，还可以实现联合用药，使其具有更好的药理活性[29]。二氢杨梅素（dihydromyricetin，DMY）是一种具有多种治疗效果的黄酮类化合物，特别适用于保护肝脏；已酮可可碱（pentoxifylline，PTX）是一种甲基黄嘌呤药物，可以增强一些化学药物的抗肿瘤活性。Liu 等[30]用绿色浆料法将 DMY 与 PTX 制备成共晶（DMY-PTX•H_2O），并以人 HepG2 肝癌细胞系为体外模型，研究了共晶和两种原料药的抗肿瘤活性。结果 PTX 在不同浓度下的平均细胞生长抑制率较低，表明该药物对肿瘤细胞的抑制作用不明显。与 PTX 不同，增加共晶和 DMY 的浓度会导致抑制速率的浓度依赖性增加。共晶和 DMY 对 HepG2 癌细胞系的 IC_{50} 分别为（68.82±2.75）μmol • L^{-1} 和（111.28±5.62）μmol • L^{-1}。在药物浓度为 100 μmol • L^{-1} 时，共晶的肿瘤细胞抑制率明显高于 DMY 和 PTX，表明形成共晶后两种药物在该浓度下对 HepG2 细胞的生长抑制具有协同作用（$P < 0.01$）。

1.3.4 二氢查尔酮类化合物 Lu 等[18]通过 DPPH 和 ABTS 自由基清除率评价了 Phl-Inz 共晶和 Phl 原料药的体外抗氧化活性。在 20 ～ 100 μg•mL^{-1}，各化合物的 DPPH 自由基清除率和 ABTS 自由基清除率均随着质量浓度的增加而增加，成正相关。当质量浓度为 100 μg • mL^{-1} 时，Phl-Inz 共晶的 DPPH 自由基清除率达到 88.7%，而 Phl 原料药仅为 48.8%，Phl-Inz 共晶的 ABTS 自由基清除率达到 98.6%，而 Phl 原料药为 87.7%。Phl-Inz 共晶的 DPPH 和 ABTS 自由基清除活性分别比 Phl 原料药提高了近 82% 和 12%。

1.4 提高渗透性

渗透性指药物分子通过某个生物膜屏障的速度，它是药物小肠吸收、通过血液 - 器官屏障、透过进入含治疗靶标的细胞以及肝和肾清除的必要过程[31]。Huang 等[32]采用简单的 Franz 扩散池比较了共晶和对应的黄酮化合物原料的药渗透性。

结果显示，原料药的累积渗透量和共晶的扩散量随着时间的推移逐渐增加，每个样品的通量在 1 h 内迅速增加。1 h 后芹菜素 - 茶碱共晶的通量达到平台期，而大豆苷元 - 茶碱共晶的通量随时间缓慢减小。与黄酮类化合物原料药相比，芹菜素 - 茶碱共晶和大豆苷元 - 茶碱共晶都表现出扩散速率增加和通量增加。

1.5　改善吸湿稳定性

在药物质量控制中，稳定性是很重要的质量指标，关系到原料的制备、制剂的生产以及产品的包装和贮存。近年来，在黄酮类化合物共晶的稳定性研究中吸湿稳定性研究颇多。吸湿性是指药物容易在潮湿环境中吸收水分的性质，如果药物的吸湿稳定性差，则容易在潮湿环境中吸湿后发生结块、潮解或水合反应等现象，从而缩短药物的贮藏时间，减弱药物疗效 [33]。研究发现共晶的形成可以有效地降低原料的吸湿性，通过选用合适的配体改变 API 的稳定性。

桑色素（morin，MOR），又称桑黄素，是一类重要的天然生物黄酮醇类化合物，贾军龙 [34] 发现 MOR 与异烟碱（IS）形成共晶后，吸湿稳定性进一步提高，采用动态蒸气吸附仪（DVS）测试了 MOR • 0.5H_2O 以及共晶 MOR-IS 的动态水分吸附情况，并用 X- 射线粉末衍射（PXRD）监测 DVS 测试过程中可能发生的相变。发现原料药 MOR • 0.5H_2O 随着湿度的增加缓慢吸湿增重，在 95% 湿度（RH）吸湿增重 2.11%，而 MOR-IS 随着湿度的增加缓慢吸湿增重，在 95%RH 吸湿增重仅 0.94%，测试结束后测试 PXRD，显示以上过程中晶型均未发生改变。这表明 MOR-IS 共晶针对湿度变化具有较好的稳定性。吕文婷 [35] 在山柰酚（kaempferol，KAE）与 5- 氟尿嘧啶（5-FU）的共晶稳定性研究中发现，在所有相对湿度水平下，5-FU-KAE 共晶的吸水量略高于 5-FU，但比 KAE • 0.5H_2O 显著降低，DVS 测试结果显示共晶无吸湿性，在 95%RH 最大吸水量是 0.18%，相比 KAE 在 95%RH 的最大吸水量 1.80%，吸湿性有明显改善，可以认为是非吸湿性的。此外，在 40 ℃ /75%RH 下进行 KAE • 0.5H_2O 和 5-FU-KAE 共晶的稳定性测试，并用 PXRD 监测样品的相变。结果表明在第 3 个月 KAE • 0.5H_2O 出现新的衍射峰而 5-FU-KAE 共晶一直保持不变，证明 5-FU-KAE 共晶的稳定性更好。

1.6　改善药物的可压片性

可压片性是指药物粉末在一定压强下转化为片剂的能力。因为片剂的生产过程较简单，运输储存较为方便，患者易于服用等优点，是目前应用最广泛的一种药物剂型，药物的可压片性在药物片剂制剂中至关重要。MOR 与 IS 形成共晶后，MOR-IS 的抗张强度整体较 MOR • 0.5H_2O 更高。从晶体结构来看，MOR-IS 具有小波浪状结构，容易形成滑动面，可以改善可压片性 [34]。白杨素属于 5，7-二羟基黄酮，牛慧慧 [36] 研究发现其机械性能较差，充填和压实过程中往往会出现一些困难，在压片过程中有明显粘连，表现出极差的成片性且片剂较脆，不易压缩成片剂；而制备成白杨素 - 对苯二胺共晶后，成片性明显增强，表面光滑，无破损，表明此共晶易压缩成片剂。

2　成药性能的改变机制（见表 1）

2.1　溶解度

2.1.1　溶剂亲和力和晶格强度改变　目前，形成共晶后溶解度增加的机制并不完全清楚。溶解度主要取决于溶剂亲和力和晶格强度，共晶具有改善溶剂亲和力和降低晶格强度的能力 [44]。

2.1.2　配体溶解度影响　文献中的大量研究将共晶的溶解度与配体的溶解度联系起来，配体会影响共晶的溶剂化势垒，这是共晶的溶剂化势垒降低到与纯 API 成比例的程度的结果 [45]。共晶溶解度与配体溶解度的关系证实了高配体溶解度等同于高共晶溶解度。Good 等 [46] 的报告表明，共晶溶解度取决于溶液中配体的浓度。共晶在溶液中的解离用溶度积（K_{sp}）来描述，K_{sp} 被定义为药物和配体溶液浓度的乘积 [47]。这类似于由药物离子和反离子浓度的乘积定义的盐的 K_{sp}。K_{sp} 是一个常数，反映了药物和配体的共晶固态相互作用相对于与溶剂相互作用的强度 [48]。共晶溶解度也是溶度积的函数，使得高 K_{sp} 值等同于高共晶溶解度 [49]。

2.1.3　API 晶体结构改变　API 的分子内和分子间氢键、C-H…π 相互作用和堆积相互作用构成了晶体结构的疏水区，通过共晶技术引入适当的配体分子，使 API 形成新的结构、空间排列和亲水区域，从而提高其水溶性 [49]。

2.2　生物利用度

2.2.1　体外溶解度增强　药物分子需要首先从制剂中释放、溶解，再通过胃肠屏障与受体分子结合才能发挥药效。对于 BCS Ⅱ、BCS Ⅳ类药物，溶解度低可能是药物生物利用度低的主要原因，所以利用共晶增溶对于提高口服吸收改善生物利用度具有重要意义。Shan 等 [50] 分析了共晶溶解度与药代动力学（PK）参数的相关性，结果发现，对于 BCS Ⅱ类药物的共晶，体外溶解度数据与 *AUC* 之间存在很强的正相关关系。

2.2.2　过饱和状态影响　某些共晶在溶解时溶出速率大于 API，并可以长时间维持过饱和状态，

表 1 成药性能改善的黄酮类化合物共晶示例

Tab 1 Example of flavonoids cocrystal with improved druggable properties

改善性能	API	BCS 分类	共晶配体	氢键类型	性能评价	文献
溶解度和溶出速率	黄芩素	Ⅱ	茶碱	未报道	溶出速率显著提高，并且 BE-TH 共晶 6 h 时的溶出度分别是原料药黄芩素的 2.2 倍和 7.1 倍	[13]
	杨梅素	Ⅱ	咖啡因	O-H…N O-H…O	共晶在 pH 1.2、4.5、6.8 的介质中溶解度和溶出速率均大于杨梅素，溶解度增加约 3 ～ 8 倍	[14]
	根皮素	Ⅱ	异烟肼	O-H…N O-H…O N-H…O C-H…O	共晶在 pH 1.2 和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中的平衡溶解度较原料药分别增加 10.6 和 22.3 倍	[18]
	葛根素	Ⅳ	L- 脯氨酸	N-H…N N-H…O O-H…N O-H…O	共晶在水（pH 7.0）、pH 1.2、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中溶解度和溶解速率较原料药几乎均增加 2 倍	[19]
	大豆苷元	Ⅳ	茶碱	未报道	共晶在乙醇 - 水（1∶1）体系中的表观溶解度是大豆黄素原料药的 1.97 倍，溶出速率较原料药提高 2.27 倍	[32]
	芒柄花素	Ⅱ	4，4'- 联吡啶	O-H…N	共晶在 0.5%SDS 缓冲液中溶解度较原料药提高 2.6 倍	[37]
	白杨素	Ⅱ	盐酸硫胺素	O-H…N	共晶在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中溶解度较原料药增加 4 倍	[38]
	染料木素	Ⅱ	4，4'- 联吡啶	O-H…N O-H…O	共晶在模拟胃液中溶解度较原料药提高 1.5 倍，且溶出速率有极大改善	[39]
	黄腐酚	/	乙酰胺	N-H…O O-H…N O-H…O	共晶改善了黄腐酚溶解曲线，溶解度增加 2.6 倍	[40]
	漆黄素	Ⅳ	烟酰胺	N-H…O O-H…N O-H…O	共晶溶解度为漆黄素原料药的 2.57 倍	[41]
生物利用度	橙皮素	Ⅱ	胡椒碱	O-H…O	共晶的生物利用度高于橙皮素原料药的 6 倍	[16]
	槲皮素	Ⅱ	烟酰胺	未报道	共晶 C_{max} 是槲皮素原料药的 1.3 倍，$AUC_{0\sim12\,h}$ 提高近 4 倍	[22]
	柚皮素	Ⅱ	异烟酰胺	N-H…O O-H…N O-H…O	共晶的 C_{max} 比原料药柚皮素提高 6.6 倍	[24]
	异甘草素	/	异烟酰胺	N-H…O O-H…N O-H…O	ISL-INM 共晶的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim24\,h}$ 与异甘草素原料药相比分别增加了 2.00 倍和 1.90 倍	[26]
	白杨素	Ⅱ	盐酸硫胺素	O-H…N	白杨素口服吸收得到显著改善，C_{max} 和 $AUC_{0\sim8\,h}$ 均提高 2 倍	[38]
	木犀草素	/	哌嗪	未报道	共晶的 C_{max} 为其物理混合物的 3.5 倍，且达峰时间更快	[42]
药理活性	根皮素	Ⅱ	异烟肼	O-H…N O-H…O N-H…O C-H…O	共晶的 DPPH 和 ABTS 自由基清除活性分别比根皮素原料药提高了近 82% 和 12%	[18]
	柚皮素	Ⅱ	甜菜碱	O-H…N O-H…O	共晶对血液中总胆固醇水平的降低的程度大于物理混合物组和柚皮素原料组，药物在小鼠肝脏中的分布显著增加	[24]
	芹菜素	Ⅱ	哌嗪	未报道	在 U87 细胞系、MDA-MB-231 细胞系和 A549 细胞系中，共晶肿瘤抑制率大于物理混合物，共晶 48 h 的 IC_{50} 在 5 μmol • L^{-1} 左右，物理混合物 IC_{50} 则大于 40 μmol • L^{-1}	[28]
	二氢杨梅素	Ⅳ	己酮可可碱	O-H…N O-H…O	药物浓度为 100 μmol • L^{-1} 时，共晶的抑制率明显高于 DMY 和 PTX；共晶和 DMY 对 HepG2 癌细胞系的 IC_{50} 分别为（68.82±2.75）μmol • L^{-1} 和（111.28±5.62）μmol • L^{-1}	[30]
	（＋）儿茶素	/	抗坏血酸	O-H…H O-H…O	共晶的抗氧化性能较原料药显著提高，总酚含量增加 3 倍以上，总抗氧化活性增加近 5 倍	[43]
渗透性	芹菜素	Ⅱ	茶碱	未报道	共晶较原料药表现出扩散速率增加和通量增加	[32]
	大豆苷元	Ⅳ	茶碱	未报道	共晶较原料药表现出扩散速率增加和通量增加	[32]

续表 1

改善性能	API	BCS 分类	共晶配体	氢键类型	性能评价	文献
吸湿稳定性	桑色素	/	异烟碱（异烟酰胺）	N-H…O O-H…O	在 95% RH 下，桑色素原料药吸湿增重 2.11%，共晶吸湿增重 0.94%	[34]
	山柰酚	Ⅱ	5- 氟尿嘧啶	O-H…O N-H…O	共晶无吸湿性，在 95% RH 最大吸水量是 0.18%，相比山柰酚原料药在 95% RH 的最大吸水量 1.80%，吸湿性有明显改善	[35]
可压片性	桑色素	/	异烟碱（异烟酰胺）	N-H…O O-H…O	制成共晶后，抗张强度整体都较桑色素原料药高，共晶具有小波浪状结构，容易形成滑动面，改善了可压片性	[34]
	白杨素	Ⅱ	对苯二胺	O-H…N O-H…O N-H…O C-H…O	制成共晶后，成片性明显增强，表面光滑，无破损	[36]

过饱和状态将持续给肠吸收提供驱动力，这有利于提高生物利用度[51]。

2.2.3　肠道血流改变和体外排泵被抑制　一些共晶配体可能通过改变肠道血流和抑制外排泵等途径与药物的口服吸收相互作用，改变共晶药物的 PK 参数[52]。

2.3　药理活性

共晶的特点之一是药物活性成分到达药理活性位点之前与配体大量分离，所以共晶不会改变药物本身的药理活性，只会起到增强或减弱的效果。BCS Ⅱ和 BCS Ⅳ类药物的低溶解度或渗透性的限制极大地限制药物的治疗效果，共晶通过提高药物的溶解性、渗透性、生物利用度等性质，可以增强药理活性[53]。

2.4　渗透性

2.4.1　过饱和度水平提高　制备成共晶后药物渗透性可以得到提高的原因有：溶液中药物的高过饱和度水平导致浓度梯度增加，进而导致药物渗透速率增加[54]。

2.4.2　晶体堆积效率和密度降低　共晶中的异合子相互作用也可以通过增加热力学活性来提高渗透性，这一特征可归因于与同质合子相比，异合子的堆积效率降低，因此晶体的堆积效率和密度降低[55]。

2.4.3　脂质单层跨上皮电阻值（TEER）降低　配体或共晶能够降低脂质单层的 TEER，从而损害其紧密连接，并促进药物通过以改善其渗透性[56]。

2.5　吸湿稳定性

2.5.1　游离氢键位点被占据　API 在储存期间水合状态的任何变化都会导致产品质量下降。共晶可以降低吸湿性，提高 API 的稳定性，同时保持其水溶性，这是共晶的一个主要优点。吸湿性 API 主要通过分子间氢键与水分子相互作用，在其化学结构中通常具有几个氢键供体或受体，这些供体或受体与大气水分子形成氢键，从而促进吸附和水分子进入这些分子的晶格。游离氢键位点会引起水分吸收，而在共晶中，氢键位点被占据，因此可以提高 API 分子的吸湿性[57]。

2.5.2　能垒提高　形成共晶后，化合物具有超分子合成子组成的致密氢键网络稳定晶体结构，共晶想要与水分子结合，则必须克服这些相互作用，较高的能垒可以防止共晶吸湿[45]。

2.6　可压片性

晶体堆积模式和结构改变：API 与共晶配体（CCF）之间通过非共价键相互作用，改变了原料药的晶体堆积模式和晶体结构，共晶的形成可以调节固体药物的致密性，如果形成平面层状晶体结构，则可在压片过程中可提供滑移面，加强药物的可压缩性，是改善药物的可压片性的重要方法[53]。

3　总结与展望

由于生物利用度低，许多候选药物在药物开发过程中的临床前阶段失败。提高水溶性差、渗透性差的黄酮类药物的生物利用度对于提高药物疗效十分必要。利用共晶技术，在不改变黄酮类化合物成分结构的同时引入新的药学上可以接受的共晶配体，能有效改善黄酮类化合物的成药性能，在过去二十年中，共晶已显示出其应用于改善成药性能差的药物的溶解性、稳定性、可压片性和生物利用度等性质的潜力，逐渐成为新药开发过程中的重要组成部分，并对药物开发过程提供助力。目前，许多共晶的设计、筛选、合成、理化性质等研究已充分开展，但在人体内的作用过程及其毒理药理作用还有待更深入的研究[58]。

虽然药物共晶具有广阔的应用前景和价值，但目前还存在一些亟待解决的问题，如共晶配体的选择、过饱和状态的不稳定、体内吸收机制尚不明确、规模化生产、产品的在线检测、质量标准的制订等[59]。目前，虽然国内外已有许多对黄酮类化合物共晶的研究，但是这些研究选择的配体大都为咖啡因、烟酰胺、异烟酰胺、吡啶等小分子化合物，在一定程度上限制了药学工作者

对黄酮类化合物共晶的研究，因此，寻找更多有潜力的共晶配体已成为黄酮共晶研究中的重要任务。并且目前黄酮类化合物共晶的获得还仅局限于实验室试验条件下，与剂型相结合的药物共晶研究相对较少，还没有走向临床试验或上市的黄酮类共晶药物。

药物共晶技术已经在一些国家、一些企业中得到了使用。因此，如何将这一技术更好地应用到国内更多企业的生产中，是药学工作者未来的研究方向，期待研究者共同努力把共晶技术推广应用。

参考文献

[1] Shen N，Wang TF，Gan Q，et al. Plant flavonoids：classification，distribution，biosynthesis，and antioxidant activity [J]. Food Chem，2022，383：132531.

[2] Wen KM，Fang XC，Yang JL，et al. Recent research on flavonoids and their biomedical applications [J]. Curr Med Chem，2021，28（5）：1042-1066.

[3] 黄珊，蔡挺 . 黄酮类化合物共晶的研究进展 [J]. 现代医药卫生，2019，35（24）：3791-3795.

[4] Panzade PS，Shendarkar GR. Pharmaceutical cocrystal：an antique and multifaceted approach [J]. Curr Drug Deliv，2017，14（8）：1097-1105.

[5] Malamatari M，Steven AR，Douroumis D，et al. Experimental cocrystal screening and solution based scale-up cocrystallization methods [J]. Adv Drug Deliv Rev，2017，117：162-177.

[6] Kuminek G，Cao F，Bahia de Oliveira da Rocha A，et al. Cocrystals to facilitate delivery of poorly soluble compounds beyond-rule-of-5 [J]. Adv Drug Deliv Rev 2016，101：143-166.

[7] Anna K，Maria M，Kyriakos K. Pharmaceutical cocrystals：new solid phase modification approaches for the formulation of APIs [J]. Pharmaceutics，2018，10（1）：18.

[8] Pi JX，Wang SY，Li W，et al. A nano-cocrystal strategy to improve the dissolution rate and oral bioavailability of baicalein [J]. Asian J Pharm Sci，2019，14（2）：154-164.

[9] Huang YT，Zhang BW，Gao Y，et al. Baicalein-nicotinamide cocrystal with enhanced solubility，dissolution，and oral bioavailability [J]. J Pharm Sci，2014，103（8）：2330-2337.

[10] 李金阳 . 以改善黄酮类化合物药学活性和降低抗结核药物肝毒性为目的的共晶研究 [D]. 聊城：聊城大学，2022.

[11] Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones：the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents wogonin，baicalein and baicalin [J]. Cancer Treat Rev，2009，35（1）：57-68.

[12] Sato D，Kondo S，Yazawa K，et al. The potential anticancer activity of extracts derived from the roots of Scutellaria baicalensis on human oral squamous cell carcinoma cells [J]. Mol Clin Oncol，2013，1（1）：105-111.

[13] Li W，Pi JX，Ying Z，et al. A strategy to improve the oral availability of baicalein：the baicalein-theophylline cocrystal [J]. Fitoterapia，2018，129：85-93.

[14] Hong C，Xie Y，Yao YS，et al. A novel strategy for pharmaceutical cocrystal generation without knowledge of stoichiometric ratio：myricetin cocrystals and a ternary phase diagram [J]. Pharm Res，2015，32（1）：47-60.

[15] Panche AN，Diwan AD，Chandra SR. Flavonoids：an overview [J]. J Nutr Sci，2016，5：e47.

[16] Liu YJ，Yang F，Zhao XL，et al. Crystal structure，solubility，and pharmacokinetic study on a hesperetin cocrystal with piperine as coformer [J]. Pharmaceutics，2022，14（1）：94.

[17] Bavishi DD，Borkhataria CH. Spring and parachute：how cocrystals enhance solubility [J]. Prog Cryst Growth Charact Mater，2016，62（3）：1-8.

[18] Lu ZY，Chen HK，Mo JX，et al. Cocrystal of phloretin with isoniazid：preparation，characterization，and evaluation [J]. RSC Adv，2023，13（16）：10914-10922.

[19] Inam M，Liu L，Wang JW，et al. Enhancing the physiochemical properties of puerarin via L-Proline Co-Crystallization：synthesis，characterization，and dissolution studies of two phases of pharmaceutical Co-Crystals [J]. Int J Mol Sci，2021，22（2）：928.

[20] Rocha B，de Morais LA，Viana MC，et al. Promising strategies for improving oral bioavailability of poor water-soluble drugs [J]. Expert Opin Drug Discov，2023，18（6）：615-627.

[21] Berger LM，Wein S，Blank R，et al. Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin [J]. J Dairy Sci，2012，95（9）：5047-5055.

[22] Wu N，Zhang Y，Ren J，et al. Preparation of quercetin-nicotinamide cocrystals and their evaluation underin vivoandin vitroconditions [J]. RSC Adv，2020，10（37）：21852-21859.

[23] Singh DV，Godbole MM，Misra K. A plausible explanation for enhanced bioavailability of P-gp substrates in presence of piperine：simulation for next generation of P-gp inhibitors [J]. J Mol Model，2013，19（1）：227-238.

[24] Cui WX，He ZH，Zhang YT，et al. Naringenin cocrystals prepared by solution crystallization method for improving bioavailability and anti-hyperlipidemia effects [J]. AAPS PharmSciTech，2019，20（3）：115.

[25] Elseweidy MM，Mohamed HE，Elrashidy RA，et al. Inhibition of aortic calcification by policosanol in dyslipidemic rabbits is enhanced by pentoxifylline：potential role of PCSK9 [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther，2018，23（6）：551-560.

[26] Xu J，Huang YT，Ruan SD，et al. Cocrystals of isoliquiritigenin with enhanced pharmacokinetic performance [J]. CrystEngComm，2016，18（45）：8776-8786.

[27] Bauer D，Mazzio E，Hilliard A，et al. Effect of apigenin on whole transcriptome profile of TNFα activated MDAMB468 triple negative breast cancer cells [J]. Oncol Lett，2020，19（3）：2123-2132.

[28] 生立嵩，任利文，杨世颖，等 . 芹菜素 - 哌嗪共晶的制备、表征及体外抗肿瘤药效研究 [J]. 中国新药杂志，2022，31（7）：679-684. .
[29] 王洁 . 替莫唑胺与黄酮类化合物药物 - 药物共晶的制备表征及性质研究 [D]. 天津：天津理工大学，2021.
[30] Liu L，Li YG，Zhang M，et al. A drug-drug cocrystal of dihydromyricetin and pentoxifylline [J]. J Pharm Sci，2022，111（1）：82-87.
[31] Berben P，Bauer-Brandl A，Brandl M，et al. Drug permeability profiling using cell-free permeation tools：overview and applications [J]. Eur J Pharm Sci，2018，119：219-233.
[32] Huang S，Xue Q，Xu J，et al. Simultaneously improving the physicochemical properties，dissolution performance，and bioavailability of Apigenin and Daidzein by Co-Crystallization with theophylline [J]. J Pharm Sci，2019，108（9）：2982-2993.
[33] Ng LH，Ling JKU，Hadinoto K. Formulation strategies to improve the stability and handling of oral solid dosage forms of highly hygroscopic pharmaceuticals and nutraceuticals [J]. Pharmaceutics，2022，14（10）：2015.
[34] 贾军龙 . 通过共晶技术改善抗肿瘤活性成分瑞戈非尼和桑色素的溶解性 [D]. 天津：天津理工大学，2021.
[35] 吕文婷 . 乐伐替尼、奥拉帕尼的共晶以及 5- 氟尿嘧啶 - 山奈酚药物 - 药物共晶的研究 [D]. 天津：天津理工大学，2021.
[36] 牛慧慧 . 几种药物共晶的设计合成、表征及性质研究 [D]. 兰州：西北师范大学，2021.
[37] 房政钰，王雪，邢逞，等 . 芒柄花素 -4，4’- 联吡啶共晶的制备表征及溶解性能 [J]. 医药导报，2022，41（5）：616-620.
[38] Chadha R，Bhalla Y，Nandan A，et al. Chrysin cocrystals：characterization and evaluation [J]. J Pharm Biomed Anal，2017，134：361-371.
[39] 殷和美 . 多羟基黄酮类天然药物共晶的合成及其性质研究 [D]. 佳木斯：佳木斯大学，2017.
[40] Budziak I，Arczewska M，Kami ń ski DM. Formation of prenylated chalcone xanthohumol cocrystals：single crystal X-ray diffraction，vibrational spectroscopic study coupled with multivariate analysis [J]. Molecules，2019，24（23）：4245.
[41] Michał Sowa,a Katarzyna Ślepokurab，Ewa Matczak-Jon，et al. Improving solubility of fisetin by cocrystallization [J]. Cryst Eng Comm，2014，16（46）：10592-10601.
[42] 燕柳艳，生立嵩，宋俊科，等 . 木犀草素与哌嗪共晶的表征及初步药动学研究 [J]. 医药导报，2022，41（5）：621-625.
[43] Spizzirri UG，Carullo G，De Cicco L，et al. Synthesis and characterization of a（＋）-catechin and L-（＋）-ascorbic acid cocrystal as a new functional ingredient for tea drinks [J]. Heliyon，2019，5（8）：e02291.
[44] Serajuddin A. Salt formation to improve drug solubility [J]. Adv Drug Deliv Rev，2007，59（7）：603-616.
[45] Guan DY，Xuan BF，Wang CG，et al. Improving the physicochemical and biopharmaceutical properties of active pharmaceutical ingredients derived from traditional Chinese medicine through cocrystal engineering [J]. Pharmaceutics，2021，13（12）：2160.
[46] Good DJ，Rodríguez-Hornedo N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals [J]. Cryst Growth Des，2009，9（5）：2252-2264.
[47] Nehm SJ，Rodríguez-Spong B，Rodríguez-Hornedo N. Phase solubility diagrams of cocrystals are explained by solubility product and solution complexation [J]. Cryst Growth Des，2006，6（2）：592-600.
[48] Stahl PH，Wermuth CG. Monographs on acids and bases [J]. 2002.
[49] Cao F，Amidon GL，Rodríguez-Hornedo N，et al. Mechanistic basis of cocrystal dissolution advantage [J]. J Pharm Sci，2018，107（1）：380-389.
[50] Shan N，Perry ML，Weyna DR，et al. Impact of pharmaceutical cocrystals：the effects on drug pharmacokinetics [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol，2014，10（9）：1255-1271.
[51] 孙晶晶，贾丽娜，林波，等 . 药物 - 药物共晶的研究进展 [J]. 化工学报，2021，72（2）：828-840.
[52] Emami S，Siahi-Shadbad M，Adibkia K，et al. Recent advances in improving oral drug bioavailability by cocrystals [J]. Bioimpacts，2018，8（4）：305-320.
[53] Guo MS，Sun XJ，Chen JH，et al. Pharmaceutical cocrystals：a review of preparations，physicochemical properties and applications [J]. Acta Pharm Sin B，2021，11（8）：2537-2564.
[54] Sanphui P，Devi VK，Clara D，et al. Cocrystals of hydrochlorothiazide：solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions [J]. Mol Pharm，2015，12（5）：1615-1622.
[55] Dai XL，Voronin AP，Gao W，et al. Intermolecular interactions and permeability of 5-fluorouracil cocrystals with a series of isomeric hydroxybenzoic acids：a combined theoretical and experimental study [J]. CrystEngComm，2019，21（34）：5095-5105.
[56] Mannava MKC，Garai A，Nangia AK. Diffusion and flux improvement of drugs through complexation [J]. Mol Pharm，2023，20（5）：2293-2316.
[57] Dhondale MR，Thakor P，Nambiar AG，et al. Co-Crystallization approach to enhance the stability of moisture-sensitive drugs [J]. Pharmaceutics，2023，15（1）：189.
[58] 黄雨婷，徐嘉，迟宗良，等 . 药物共晶筛选技术的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2016，43（4）：682-687.
[59] 王礼丽，高紫尧，刘书好 . 药物共晶的研究新进展 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（7）：10.

（收稿日期：2023-08-12；修回日期：2023-10-13）

中药抗电离辐射药理作用及机制研究进展

王帅[1]，李航[1]，王闯闯[1]，赵孟楠[1]，李祎亮[2]，侯文彬[2*]，周福军[3*]（1. 天津中医药大学，天津 301617；2. 北京协和医学院&中国医学科学院放射医学研究所，天津市放射医学与分子核医学重点实验室，天津 300192；3. 天津药物研究院，天津 300462）

摘要：中药具有高效、低毒、多靶点、特异性强等特点，其在辐射防护方面有着独特的优点。基于辐射对机体中免疫系统、造血系统和生殖系统的相关细胞及其通路损伤，以及 DNA 损伤和抗氧化应激，本文论述了近十年来中药及其复方抗辐射药理作用及机制的研究进展，并提出现有研究存在的问题，以期为后续新型辐射防护剂的中药产品开发提供参考。

关键词：中药；抗辐射；药理作用；作用机制；研究进展

中图分类号：R979.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0724-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.026

Research progress in pharmacological action and mechanism of Chinese medicine against ionizing radiation

WANG Shuai[1], LI Hang[1], WANG Chuang-chuang[1], ZHAO Meng-nan[1], LI Yi-liang[2], HOU Wen-bin[2*], ZHOU Fu-jun[3*] (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine*, *Institute of Radiation Medicine*, *Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences*, *Tianjin* 300192; 3. *Tianjin Institute of Pharmaceutical Research*, *Tianjin* 300462)

Abstract: Traditional Chinese medicine is characterized by its high efficiency, low toxicity, multiple targets and strong specificity, as well as its unique advantages in radiation protection. Based on radiation damage to cells and their pathways in the immune system, hematopoietic system and reproductive system, as well as DNA damage and antioxidant stress, this paper reviewed recent research progress in the pharmacological action and mechanism of anti-radiation in traditional Chinese medicine. Chinese medicine compounds over the past decades are reviewed and the existing problems are presented to provide a reference for the development of new radiation protection agents in Chinese medicine products.

Key words: traditional Chinese medicine; anti-radiation; pharmacological action; mechanism of action; research progress

随着时代的进步，科技的发展，电离辐射（IR）不仅存在于核能源产业中，越来越多的电离辐射新技术被应用于与人们密切相关的农业食品、医疗健康以及航空航天中。例如农业辐照培育新品种，研究表明使用γ射线辐射可以对未充分利用的植物品种进行遗传改良，不仅能够促进品种产生新的价值，还能够为粮食和农业生产提供多种可能[1]。在医疗检查中的 X 射线透视、电子计算机断层扫描以及肿瘤治疗过程中的放射疗法都对人体有一定的电离辐射损伤。人们接触电离辐射的机会越来越多，包括但不局限于医疗上疾病的诊断与检测，癌症患者的放射治疗，核电泄漏以及可能的核战争的辐射隐患，还有我国载人航天事业的蓬勃发展，宇航员在太空中遭遇的

基金项目：国家自然科学基金项目资助（No.82104012，No.82202950）；中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目资助（No.2021-I2M-1-042）

作者简介：王帅，男，硕士研究生，主要从事中药新药研发，email：wangshuaizy1126@163.com *通信作者：周福军，女，研究员，主要从事中药新药研发，email：fujun_zhou@126.com；侯文彬，男，研究员，主要从事中药新药研发，email：houwenbin@irm-cams.ac.cn

空间辐射等[2-3]。在辐射被广泛应用的同时，辐射防护剂的研究也在不断进行。目前已上市的辐射防护剂有氨磷汀、帕利夫明、沙格司亭、普鲁士蓝胶囊、碘化钾等，这些防护剂主要在抵抗辐射对健康机体的损伤、修复受损细胞和清除活性氧（ROS）自由基等方面发挥作用。但这些化学合成的辐射防护剂都具有一定的毒副作用，可引起恶心、呕吐、腹泻、低血压、肾毒性和神经毒性等不良症状，不能长期服用，且存在给药途径局限、给药窗口期短、成本高等缺点[4]。因此寻求毒副作用小，辐射防护效果好的药物备受关注。

中药在辐射损伤治疗中的应用一直备受关注。中医中药治疗辐射，在提高机体免疫、增强机体造血功能、改善辐射引起的症状、提高生活质量及延长生存期等方面，具有独特的优势。现有研究已发现了大量的中药及复方对于电离辐射具有有效的防护作用，因此在辐射防护药物的研究中，中药及其复方有着巨大的潜力[5]。本文综述了电离辐射对人体的危害及其作用机制，总结了近十年来具有抗辐射作用的中药及其复方的药理作用和作用机制，以期为中药抗辐射药物的研究与开发提供参考。

1　辐射及其损伤机制

剂量过大的电离辐射会对机体造成严重损伤，其损伤机制可以分为三种：直接损伤、间接损失以及旁观者效应[6]。直接损伤的关键靶点是DNA，电离辐射可以导致DNA碱基损伤、DNA单链断裂或双链断裂以及DNA蛋白质交联。间接损伤被认为是电离辐射对机体造成损伤的最大因素，电离辐射和体内含氧小分子（包括水）之间相互作用会产生ROS，产生的ROS可以与DNA、脂质膜和蛋白质发生反应，对各种细胞结构造成损伤和功能障碍，即通过多种损伤机制诱导细胞死亡，影响机体各个系统产生功能性障碍，进而对脏器组织造成损伤[7-8]。旁观者效应是指被辐射的细胞或组织释放的因子对未暴露于辐射中机体的其他部分产生影响，旁观者细胞产生DNA损伤影响细胞的功能与存活，是旁观者效应中最关键的环节之一[9]。受辐射的细胞会释放信号，其形式包括细胞因子、生长因子、膜透性反应物质（如H_2O_2和NO）和其他不确定的可溶性因子，这些信号分子会通过跨膜间隙连接通道直接转移到旁观者细胞，从而使细胞内长期产生ROS，ROS或其他机制会诱导一系列的DNA突变、染色体畸变、微核等，这些DNA损伤和持续的氧化应激也会启动和维持旁观者因子的生产/分泌和基因组不稳定，因此旁观者细胞诱导的影响甚至会传播到次要旁观者及其后代[10-11]。辐射损伤机制见图1。

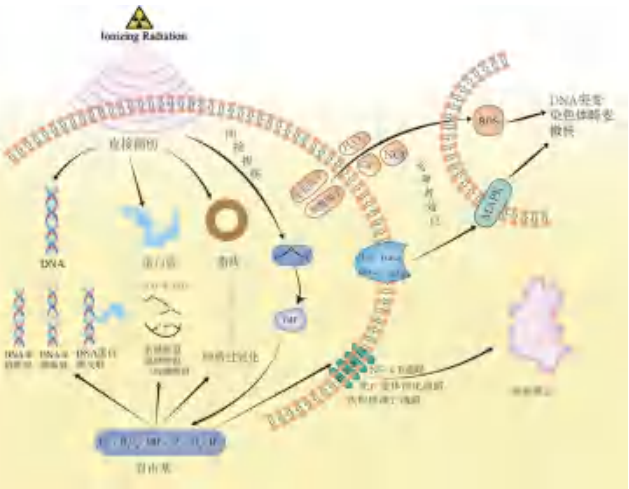


图1　辐射损伤途径

Fig 1　Pathway of radiation damage

2　中药抗辐射药理作用及作用机制

近年来，随着科技的发展，接触辐射的机会增多，而人们对辐射防护知识的匮乏，造成辐射损伤的风险逐渐加大。机体免疫系统、造血系统、生殖系统对电离辐射较为敏感，可能导致机体内多个系统中细胞及其细胞通路紊乱，严重者出现多系统功能障碍，甚至危及生命。随着中医药的发展，中医药在各个领域疾病的治疗中均取得了显著疗效。在辐射防护产品开发中，相较于其他抗辐射产品，中药及其复方具有多成分、多层次、多途径、多靶点发挥疗效的优势，且中药及其复方在抗辐射中效果显著，具有低毒、高效、成本低等特点，有望成为良好的辐射防护剂。

2.1　免疫系统

机体免疫系统是辐射损伤的敏感系统，免疫淋巴细胞及其参与免疫调节的脏器，如骨髓、脾脏、胸腺等都是高放射敏感细胞群。辐射损伤造成的免疫功能紊乱，表现为免疫细胞数量减少，抗体形成紊乱，细胞因子调节失常，免疫器官功能减低，从而影响机体特异及非特异性免疫功能[12-13]。冬虫夏草、当归、枸杞、柴胡、黄芩、枳壳等中药及归芪益元膏、凉血固元汤等复方大多均具有温补元气、清热解毒、调理气机的功效，可以通过提高免疫器官脏器指数，调节免疫平衡，恢复免疫功能障碍，从而保护免疫系统，减轻辐射损伤。

冬虫夏草和当归都是补虚药，均有抗辐射

免疫调节的作用。Wei 等[14]研究冬虫夏草水提物对 γ 辐照小鼠的适应性免疫调节作用，发现冬虫夏草水提物的适应性免疫调节的可能机制是恢复辐照小鼠血清中免疫球蛋白的消耗和抑制促炎细胞因子的浓度，上调抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达，抑制促凋亡基因 *Bax* 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -3（caspase-3）表达，进而抑制线粒体通路的激活，降低辐射诱导的细胞凋亡。王磊等[15]实验证明当归多糖低、中、高剂量组大鼠血清中谷丙转氨酶（ALT）活性、谷草转氨酶（AST）活性降低，肝脏组织中丙二醛（MDA）和过氧化脂（LPO）含量降低，以及肝脏组织中超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性增加使大鼠肝脏组织中核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）蛋白表达下调。

银杏作为植物界的“活化石”，不仅极具观赏性和经济价值，其果实还可食用，而且果实和银杏叶均具有极好的药用价值。李秋菊等[16]通过建立辐射剂量 4 Gy 辐射源 γ 射线辐射模型小鼠，发现银杏叶提取物可以使小鼠脾脏细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平升高，促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3 表达下降，通过调控血清中核转录因子（NF-κB）信号通路，进而对免疫器官进行辐射保护。

不仅单味中药可以对电离辐射致机体免疫系统损伤起到保护作用，而且中药复方也能有效改善损伤。张朝宁等[17]通过研究发现归芪益元膏（由黄芪、当归、熟地、麦冬、人参、枸杞子、五味子组成）可以调控单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（AMPK/mTOR）信号通路及自噬蛋白 p62、自噬效应蛋白（Beclin1）表达，抑制自噬，从而发挥对辐射诱发体内旁效应损伤的防护作用。其他中药及复方也被发现具有抗辐射药理作用，中药及复方对辐射致机体免疫系统损伤的保护作用详见表 1。

表 1 中药及复方对辐射致机体免疫系统损伤的保护作用

Tab 1 Protective effect of traditional Chinese medicine and compounds on immune system damage induced by radiation

名称	活性部位 / 成分	给药剂量	辐射剂量	模型	作用机制	参考文献
冬虫夏草	冬虫夏草水提物	312.5、625、1250 mg • kg^{-1}	8 Gy ^{60}Co-γ	C57BL/6 小鼠	抗凋亡作用和调节适应性免疫	[14]
当归	当归多糖	63.5、127、254 mg • kg^{-1}	6 Gy X 射线	SD 大鼠	减少肝脏组织中自由基形成，并提高肝脏组织清除自由基的能力	[15]
银杏叶	银杏叶提取物	5、10、20 mg • kg^{-1}	4 Gy γ 射线	ICR 小鼠	通过调控 NF-κB 信号通路拮抗辐射造成的机体损伤	[16]
核桃仁	核桃寡肽	0.22、0.44、0.88 g • kg^{-1}	3.5 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	增强了抗氧化防御系统，并加快造血恢复	[18]
柴胡	柴胡皂苷 -d	3 μg • mL^{-1}	X 射线直线加速器照射	肝癌细胞 SMMC7721、MHCC97L	通过抑制 mTOR 磷酸化，促进自噬，增加辐射诱导的肝癌细胞凋亡	[19]
枸杞	枸杞果实提取物	1、3、9 g • kg^{-1}	6.5 Gy γ 射线	Balb/c 小鼠	通过免疫调节及肠道微生物群和相关代谢产物协同调节	[20]
黄芩	黄芩苷	25 ng • mL^{-1}	UVB	HSFs 细胞	通过上调 AMPK 磷酸化和下调 mTOR 磷酸化诱导自噬进行防护	[21]
芦荟	芦荟多糖	50 mg • kg^{-1}	5 Gy ^{60}Co-γ	瑞士白化小鼠	上调免疫系统，诱导造血细胞增殖	[22]
薏苡仁	薏苡仁水提液	0.22、0.44、0.88 g • kg^{-1}	3 Gy ^{60}Co-γ	昆明小鼠	通过增强自由基清除、抗辐射和免疫保护调节	[23]
刺梨	刺梨黄酮	30、60 mg • kg^{-1}（50、100 μg • mL^{-1}）	6 Gy ^{60}Co-γ	KM 小鼠和胸腺细胞	通过抑制 Bcl-2（Ca^{2+}）/caspase-3/PARP-1 信号通路，减少胸腺细胞凋亡	[24]
狗枣猕猴桃	狗枣猕猴桃多酚	50、100、200 mg • kg^{-1}	6 Gy ^{60}Co-γ	昆明小鼠	保护造血系统、提高机体免疫力	[25]
枳壳	枳壳多糖	100、200、400 mg • kg^{-1}	3 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	通过抗氧化和免疫调节系统起到抗辐射作用	[26]
归芪益元膏	复方膏剂	3.28、6.56 g • kg^{-1}	8 Gy X 射线	SD 大鼠	调控 AMPK/mTOR 信号通路及自噬蛋白 p62、Beclin1 表达，抑制自噬	[17]
参芪扶正注射液	复方注射液	20 mL • kg^{-1}	20 Gy CRT	C57BL/6J 小鼠	通过抑制 NF-κB 信号通路和小胶质细胞的激活，减轻辐射所致脑损伤	[27]
芩丹颗粒	颗粒剂水溶液	10 mL • kg^{-1}	2450 MHz	Wistar 大鼠	调整大鼠下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴部分生物活性肽及激素的合成与释放	[28]
当归补血汤	复方汤剂	3.125、6.25、12.5 g • kg^{-1}	15 Gy X 射线	Wistar 大鼠	干预 FasL/TNF-α 表达，抑制心肌细胞凋亡	[29]
凉血固元汤	复方汤剂	9、36 g • kg^{-1}	11 Gy ^{60}Co-γ	SD 大鼠	抑制 Bax 与 caspase-3 表达，降低 Bax /Bcl-2，从而抑制细胞凋亡	[30]

2.2　造血系统

造血系统对辐射具有高度敏感性，全身照射可导致多器官功能障碍综合征，损害人体的造血系统，其中造血干细胞、粒系祖细胞、红系祖细胞是辐射攻击的主要靶细胞，常造成骨髓抑制、微循环障碍、白细胞（WBC）下降及造血微环境破坏等损伤。何首乌、鸡血藤、五倍子、卷柏、地榆等中药及清热解毒凉血方、益气养阴方等复方大多具有补益精血、活血通络的功效，可以通过保护造血微环境，影响造血细胞周期，促使其进入增殖周期并抑制其凋亡，促进骨髓造血功能恢复等，从而对辐射造成的造血系统损伤起到修复作用[31-33]。

据报道何首乌与鸡血藤都对电离辐射造成的造血系统损伤具有良好的防护作用。黄伟哲等[34]通过研究发现何首乌提取物能增加辐照小鼠骨髓行巨核细胞集落（CFU-MK）和骨髓基质细胞集落（CFU-F）计数，显著提高小鼠骨髓中血小板（PLT）和 WBC 数量，改善造血干细胞及巨核细胞周围的造血微环境，从而增强照射小鼠骨髓造血功能。谭潇等[35]通过实验研究表明，鸡血藤醇提取物能通过提高骨髓造血祖细胞内在增殖活力促进造血，促进辐射小鼠外周血常规的恢复，改善造血微环境，增强免疫器官胸腺和造血器官脾脏的脏器指数，提高血清抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性、降低 MDA 水平、减少脂质过氧化物产生，增加骨髓腔内细胞数量，抑制骨髓细胞凋亡，抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著上调，裂解半胱天冬酶 -3（cleaved caspase-3）和促凋亡蛋白 Bax 表达下调，对亚急性辐射损伤小鼠有明显的保护作用。

清热解毒凉血方是由水牛角、生地黄、元参、麦冬、丹参、黄连、金银花、连翘、淡竹叶组成。通过动态观察清热解毒凉血方改善急性辐射损伤大鼠凝血功能及微循环状态的作用机制，发现辐射打破了血栓素 B2（TXB2）与 6- 酮 - 前列腺素 F1α（6-Keto-PGF1α）之间的平衡，增强血小板（PLT）聚集黏附功能，加速血小板源促凝物质释放，使血液逐渐趋于高凝状态，血栓易于形成而引起微循环堵塞，引发出血。给药后期可以降低 TXB2，调整 TXB2 与 6-Keto-PGF1α 的平衡，通过抑制 PLT 的聚集黏附，减少微血管中血栓的形成，改善血液高凝状态引起的微循环堵塞，发挥止血作用[36]。中药及复方对辐射致机体造血系统损伤的保护作用详细见表 2。

表 2　中药及复方对辐射致机体造血系统损伤的保护作用

Tab 2　Protective effect of traditional Chinese medicine and compounds on hematopoietic system damage induced by radiation

名称	活性部位 / 成分	给药剂量	辐射剂量	模型	作用机制	参考文献
何首乌	何首乌提取物	125 mg • kg^{-1}	3.5 ^{137}Cs-γ	Balb/c 小鼠	刺激骨髓基质细胞增殖，改善造血微环境，提升外周血 PLT 数量	[34]
鸡血藤	鸡血藤醇提物	10、20、40 g • kg^{-1}	6 Gy ^{60}Co-γ	ICR 小鼠	作用机制是通过促造血、抗氧化、抗凋亡	[35]
沙棘	沙棘黄酮	20 mL • kg^{-1}	4 Gy 直线加速器照射	Balb/c 小鼠	降低 G_0/G_1 期细胞比例，促进造血功能恢复	[37]
五倍子	五倍子酸	100、200 mg • kg^{-1}	4 Gy 和 8 Gy ^{60}Co-γ	ICR 小鼠和 Balb/c 小鼠	通过保护造血系统和减轻细胞凋亡	[38]
卷柏	卷柏穗花杉双黄酮	0.24、1.2、6 mg • kg^{-1}	3 Gy 和 7.5 Gy ^{60}Co-γ	C57BL/6 小鼠	通过促进造血系统恢复及减弱辐射诱导氧化应激	[39]
血竭	血竭提取物	0.375、0.075、0.15、0.3 g • kg^{-1}	4 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	抗氧化及抗炎	[40]
灵芝	灵芝多糖	14 mg • kg^{-1}	X 射线直线加速器照射	Balb/c 小鼠	改善小鼠血清中相关潜在生物标志物表达和相关代谢途径	[41]
地榆	地榆总皂苷、地榆皂苷Ⅰ、地榆皂苷Ⅱ	0.4、0.8、1.6 mg • kg^{-1}	3.5 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	通过局部粘着斑激酶（FAK）和人丝裂原活化蛋白激酶 1/2（Erk1/2）激活调节骨髓中细胞因子的产生来改善造血	[42]
苜蓿	苜蓿皂苷	25、50、100 mg • mL^{-1}	4 Gy X 射线	昆明小鼠	缓解造血系统和染色体损伤	[43]
清热解毒凉血方	复方汤剂	1.42 g • mL^{-1}	11 Gy ^{60}Co-γ	SD 大鼠	改善急性辐射损伤所导致的凝血功能，抑制微血管血栓，改善微循环	[36]
益气养阴方	复方汤剂	5、15、45g • kg^{-1}	7.5 Gy ^{137}Cs-γ	ICR 小鼠	降低造血细胞中 ROS 水平，改善骨髓抑制	[44]
健脾补肾方	复方汤剂	1、2 g • mL^{-1}	6 Gy X 射线直线加速器照射	昆明小鼠	加快外周血细胞及免疫器官功能的恢复	[45]

2.3 生殖系统

睾丸的正常生殖功能是维持雄性生育能力的根本，是机体的浅表器官，其对电离辐射较为敏感。辐射可以造成睾丸组织体积明显减小，生精小管管径变小，精原细胞层明显变薄，精原细胞数量减少，精子数量减少，精子活力降低等。枸杞及五子衍宗丸和六味地黄丸等复方均具有滋补肝肾的功效，而金银花和山楂分别具有清热解毒和行气散瘀、消食健胃、化浊降脂的功效，可以通过抑制生精细胞凋亡及促进生精过程中相关因子表达，增强生精细胞增殖、分化，从而改善生殖系统损伤 [46]。

金银花具有清热解毒、疏散风热的作用。杨明建等 [47] 研究金银花提取物对紫外线 B（UVB）辐射致雄性小鼠生殖系统损伤的保护作用，发现金银花提取物能通过显著升高睾丸组织中 SOD 活力来增强小鼠的抗氧化能力，通过降低 MDA 含量来改善 UVB 辐射所致的小鼠氧化损伤。

五子衍宗丸由枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子组成。Ji 等 [48] 通过研究五子衍宗丸对辐射小鼠睾丸的影响，发现辐射组睾丸重量明显降低，精子计数和活力显著减少，且精子异常数增加，经五子衍宗丸治疗 3 周后，小鼠精子数量以及活力显著增加，MDA 水平和氧化应激指数（OSI）显著降低，表明五子衍宗丸对辐射诱导的睾丸损伤具有一定的治疗作用。中药及复方对辐射致机体生殖系统损伤的保护作用详见表 3。

表 3 中药及复方对辐射致机体生殖系统损伤的保护作用

Tab 3 Protective effect of traditional Chinese medicine and compounds on radiation-induced damage in the reproductive system damage

名称	活性部位 / 成分	给药剂量	辐射剂量	模型	作用机制	参考文献
金银花	金银花提取物	200、400、600 mg • kg^{-1}	UVB	雄性小鼠	增强小鼠抗氧化能力	[47]
山楂	山楂黄酮	0.25、0.5、1 g • kg^{-1}	4 Gy X 射线直线加速器照射	昆明小鼠	抑制 ROS/NOD 样受体 3（NLRP3）信号通路调控睾丸细胞中促炎症细胞因子水平	[49]
枸杞	枸杞多糖	0.25、1 g • kg^{-1}	3 Gy X 射线	昆明小鼠	增强抗氧化能力	[50]
五子衍宗丸	颗粒剂水溶液	0.25、1 g • kg^{-1}	4 Gy X 射线	昆明小鼠	增强抗氧化能力	[48]
益气解毒汤	复方汤剂	5.8、11.6、23.2 g • kg^{-1}	4 Gy ^{60}Co-γ	SD 大鼠、GC-2SPD 细胞	抗氧化，促进 DNA 修复损伤，调节炎症	[51]
六味地黄丸	六味地黄丸混悬液	10 mL • kg^{-1}	900 MHz	SD 大鼠	降低睾丸组织氧化损伤，减少细胞凋亡	[52]

2.4 DNA 损伤

DNA 是电离辐射对机体造成损伤的关键靶点，电离辐射损伤可以导致 DNA 单链和双链断裂、DNA 碱基损伤以及 DNA 蛋白质交联，间接破坏化学键，增加体内 ROS。DNA 损伤后其修复途径磷脂酰肌醇 3- 激酶（PI3K）及毛细血管扩张性共济失调突变基因（ATM）会对其进行修复，DNA 修复错误则会以突变形式传播，可能会导致基因组不稳定、癌变等 [53-54]。

紫苏性温，味辛，具有解表散寒、行气和胃的功效。Lee 等 [55] 研究发现 UVB 能显著诱导人类永生化表皮细胞（HaCaT）DNA 断裂和集落形成，而紫苏叶提取物能抑制 UVB 诱导的 DNA 断裂和集落形成，增强 DNA 损伤修复和角质形成细胞集落形成能力，并通过上调磷酸化的检查点激酶 1（pCHK1）蛋白水平来增加角质形成细胞的增殖，且紫苏叶提取物能有效降低 ROS 水平，具有抗氧化作用，因此，紫苏提取物可能是一种有效的预防 UVB 诱导的角质形成细胞衰老的药物。

桔梗具有宣肺、利咽、祛痰、排脓的疗效。桔梗皂苷 D 可呈剂量依赖性降低人肝癌细胞（HepG2、SMMC-7721）的活力，且可显著降低细胞周期 G_2/M 期的比例，以及增加磷脂酰肌醇 -3- 激酶（p-PI3K）、蛋白激酶 B（Akt）与 NF-κB 蛋白的表达，降低人磷酸化 IκB 激酶 -α（p-IκBα）的表达。结果表明，桔梗皂苷 D 可提高 HepG2 或 SMMC-7721 细胞的放射敏感性，其机制是通过抑制 PI3K/Akt 和 NF-κB 通路的激活发挥辐射防护作用 [56]。中药及复方对辐射致机体 DNA 损伤的保护作用详见表 4。

2.5 抗氧化应激

氧化应激是电磁辐射致机体损伤的重要机制之一。当机体所受电磁辐射达到一定剂量后，线粒体膜去极化产生 ROS。机体 ROS 水平升高、抗氧化酶活性降低，导致脂质过氧化物增多，过量的 ROS 也可导致 DNA 氧化损伤、膜磷脂和蛋白质氧化损伤、线粒体膜电位下降、细胞膜通透性增加、细胞结构和功能改变，进而引起机体功

表 4　中药及复方对辐射致机体 DNA 损伤的保护作用

Tab 4　Protective effect of traditional Chinese medicine and compounds on DNA damage induced by radiation

名称	活性部位 / 成分	给药剂量	辐射	模型	作用机制	参考文献
紫苏	紫苏提取物	0.1 μg • mL^{-1}	UVB	HaCaT 细胞	降低 ROS 水平，增强抗氧化	[55]
桔梗	桔梗皂苷 D	5 μg • mL^{-1}	X 射线	肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721	抑制细胞凋亡 PI3K/Akt 和 NF-κB 通路的激活	[56]
肉苁蓉	毛蕊花糖苷	50 μg • mL^{-1}	16 Gy X 射线	HSFs 细胞	增强抗氧化能力及调节丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路	[57]
山楂	山楂多酚	5、10 μg • mL^{-1}	UVB	HaCaT 细胞	增强抗氧化性能，抑制线粒体凋亡途径多种组分	[58]
三七	三七总皂苷	50、100、200 mg • kg^{-1}	8 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	通过调节骨形成和再吸收抑制辐射诱导的骨质疏松	[59]
四君子汤	四君子汤水提物	0.06、0.24、0.95 mg • mL^{-1}	4 Gy ^{60}Co-γ	人小肠上皮细胞 HIEC-6	调控细胞周期进程，减少细胞凋亡，促进 DNA 损伤修复	[60]

能障碍，损害组织器官。人参、西洋参、灵芝、甘草、葛根、黄芪等中药及滋肾育胎丸等中药复方，大多均具有温补元气、益气培元、行气、安神等功效，可以通过清除体内多余 ROS，抑制脂质过氧化反应，从而起到抗致氧化应激的作用 [61-62]。

人参与西洋参均属五加科植物，都是补气药。电离辐射会引起脂肪性改变，而 4- 羟基壬烯醛（4-HNE）信号是脂质过氧化的有效标志，Kim 等 [63] 建立高剂量 X 射线辐射小鼠模型，实验证实小鼠经过人参提取物预处理后，4-HNE 信号减少，肝组织中总 ROS 水平、MDA 含量和三酰甘油（TG）水平显著降低，谷胱甘肽（GSH）水平和谷胱甘肽还原酶（GSH-RD）活性、过氧化氢酶（CAT）活性以及 SOD 活性显著升高；血清中 ALT 活性和碱性磷酸酶（ALP）活性显著降低，肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）和白细胞介素（IL）-6 的蛋白水平显著降低；肝组织细胞中促凋亡蛋白 P53、Bax 表达降低，抗凋亡蛋白 BcL-2 和 BcL-xL 表达升高，提示人参提取物可以显著改善辐射诱导的小鼠肝细胞凋亡。赵兰婷等 [64] 通过探究西洋参防护 X 射线对小鼠肺的过氧化损伤，结果显示西洋参水煎液能够降低 X 射线辐照引起的小鼠肺指数升高，减轻小鼠肺组织损伤程度，升高肺组织中 SOD 含量，降低 MDA 含量，下调 Nrf2 蛋白表达，从而提高西洋参对 X 射线辐射所致小鼠肺过氧化损伤的防护作用。

此外绞股蓝、蛹虫草和鱼腥草也有良好的抗氧化作用。南瑛等 [65] 通过研究发现绞股蓝皂苷可以显著降低小鼠血清和脏器肝脏中的 MDA 含量，提高抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性及 GSH 和总抗氧化能力（T-AOC）的水平，提高 Nrf2 蛋白水平，相应地提高其调控的下游血红素加氧酶 1（HO-1）、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基（GCLC）和谷氨酸半胱氨酸连接酶（GCLM）的蛋白水平，对辐射引起的氧化损伤具有良好的保护作用。蛹虫草抗氧化肽灌胃预处理 ^{60}Co-γ 辐射的小鼠氧化损伤模型，结果蛹虫草抗氧化肽能显著升高血液中 WBC、淋巴细胞（LYM）的数量，提高 SOD 的活性，降低 MDA 含量，提示蛹虫草抗氧化肽对小鼠因辐射引起的血常规变化及氧化损伤具有修复作用 [66]。鱼腥草提取物可以通过减弱 UVB 诱导的细胞中 IL-6、IL-8、环氧合酶 2（COX-2）和诱导型一氧化氮合酶（iNOS）炎症介质水平，减弱 ROS 水平，增加 HO-1 和 SOD 水平，从而保护角化细胞免受 UVB 诱导的氧化损伤和炎症 [67]。中药及复方对辐射致机体氧化应激损伤的保护作用详见表 5。

3　小结与展望

辐射往往会同时引发机体内免疫、造血、生殖等系统的一系列损伤，中医认为电离辐射致病具有热象偏重、起病急、转变快、易燥化伤阴、耗血动血、易内陷生变等特点。因此，治疗辐射选用的单味中药及中药复方，大多数均具有清热解毒、补气生血、益气生津、滋补肝肾、健脾和胃的功效。其作用机制主要是通过清除自由基，增强抗氧化能力，促进 DNA 修复，减轻氧化应激损伤，改善造血微环境，促进造血系统恢复，减少细胞凋亡，增强机体免疫调节系统等来促进辐射损伤后的机体恢复。

中药因其所含活性成分众多、抗辐射效果显著、无毒或低毒且大多数价格低廉易获取等优点拥有广阔的新型抗辐射药物的研发前景，但依旧存在着一些局限性：① 中药数量众多且抗辐射成分复

表 5 中药及复方对辐射致机体氧化应激损伤的保护作用

Tab 5 Protective effect of traditional Chinese medicine and compounds on radiation-induced oxidative stress injury

名称	活性部位 / 成分	给药剂量	辐射剂量	模型	作用机制	参考文献
人参	人参提取物	25、50、100 mg • kg^{-1}	15 Gy X-ray	C57BL/6N 小鼠	调节氧化应激、炎症反应和细胞凋亡	[63]
西洋参	西洋参水煎剂	455、910、1365 mg • kg^{-1}	20 Gy X-ray	昆明小鼠	增强抗氧化能力	[64]
绞股蓝	绞股蓝皂苷	50、100、200 mg • kg^{-1}	5 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	激活 Nrf2 抗氧化信号通路	[65]
蛹虫草	蛹虫草抗氧化肽	40、80 mg • kg^{-1}	8 Gy ^{60}Co-γ	昆明小鼠	抗氧化	[66]
鱼腥草	鱼腥草提取物	100 μg • mL^{-1}	UVB	HaCaT 细胞	调节 MAPKs 和 Akt 信号传导	[67]
灵芝	灵芝总三萜	50、100 mg • kg^{-1}	4 Gy ^{60}Co-γ	瑞士白化小鼠	恢复抗氧化酶活性和 GSH 水平	[68]
甘草	甘草次酸	1、10 μg • mL^{-1}	4 Gy X-ray	BV2 细胞	抑制细胞凋亡，增强抗氧化能力	[69]
葛根	葛根素	15 mg • kg^{-1}	12 Gy X-ray	SD 大鼠	促进紧密连接蛋白表达，减轻氧化应激损伤	[70]
川芎	川芎提取物	100、200、400 mg • kg^{-1}	5 Gy ^{60}Co-γ	昆明小鼠	抗氧化及增强免疫	[71]
黄芪	黄芪多糖	50、100、200 mg • kg^{-1}	5 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	抑制辐射诱导的氧化应激反应	[72]
沙苑子	沙苑子黄酮	100、200、400 mg • kg^{-1}	6 Gy ^{60}Co-γ	昆明小鼠	提高抗氧化能力，保护细胞及组织的正常形态和功能	[73]
刺五加	刺五加功能成分	235.7 mg • kg^{-1}	4 Gy ^{60}Co-γ	昆明小鼠	增强免疫	[74]
丹参	丹参酸 A	0.1、1、10 μg • mL^{-1}	4 Gy ^{60}Co-γ	人胚胎肝 L-02 细胞	减少 DNA 损伤，提高抗氧化酶活性	[75]
红景天	红景天苷	100 mg • kg^{-1}	8 Gy ^{60}Co-γ	Balb/c 小鼠	提高抗氧化作用，加速造血恢复和 DNA 修复以及调节凋亡和修复信号通路	[76]
滋肾育胎丸	滋肾育胎丸混悬液	100、200、400 mg • kg^{-1}	900 MHz	SD 大鼠	调节卵巢组织最终的氧化失衡，发挥对卵巢辐射损伤的防治作用	[77]
补肾解毒方	复方汤剂	13.5 g • kg^{-1}	2、4 Gy γ-ray	C57BL/6J 小鼠	预防和修复胎盘组织氧化损伤	[78]
复方苦参注射液	复方注射液	5 mg • mL^{-1}	2 Gy X-ray	HSF 细胞	清除氧自由基	[79]

杂，目前对中药有效成分、作用机制的研究仍较少且不够深入；② 中药抗辐射作用是其多成分相互作用的结果，现有研究大多只是对其单一活性成分进行探讨，而忽视了多成分之间相互协同作用的关系；③ 中药在体内要经过各种代谢，从而产生代谢产物，而发挥药效作用的到底是药物分子本身还是在体内产生的代谢产物，尚不明确。

基于上述局限性，可以加强以下研究：① 基于中药传统功效，加强对抗辐射作用的研究；② 基于药代动力学加强对中药多成分在体内协同作用的研究，从而探索中药提取物在体内过程的影响，揭示中药多成分协同作用规律及组分配伍的合理性；③ 通过药代动力学研究药物进入体内后的各有效部位之间，有效部位和代谢产物之间，各代谢产物之间以及整体综合的情况，进而揭示中药的药效物质基础。希望随着研究开发的不断深入，具有高效低毒、防治兼备的中药辐射防护药能够很快应用于临床。

参考文献

[1] María RF，Jorge CI，Lucero RP，et al. Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties [J]. Plants（Basel），2022，11（9）：1161.

[2] 刘力源，陈敏，赵海田，等 . 天然产物抗辐射活性研究进展 [J]. 食品科学，2018，39（17）：269-274.

[3] 韩楚，刘媛媛，戴荣继，等 . 中药在空间辐射防护领域的应用前景 [J]. 生命科学仪器，2021，19（1）：12-20.

[4] 喻滟翔，田红旗 . 辐射防护剂临床应用的研究进展 [J]. 山东医药，2022，62（1）：111-114.

[5] 张军帅，刘培勋 . 基于四气五味的中药抗辐射防护作用机理探讨 [J]. 中国中医药信息杂志，2012，19（9）：96-99.

[6] Wang WJ，Xue CH，Mao XZ. Radioprotective effects and mechanisms of anima，plant and microbial polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol，2020，153：373-384.

[7] Lachumy SJ，Oon CE，Deivanai S，et al. Herbal remedies for combating irradiation：a green anti-irradiation approach [J]. Asian Pac J Cancer Prev，2013，14（10）：5553-5565.

[8] Smith TA，Kirkpatrick DR，Smith S，et al. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation [J]. J Transl Med，2017，15（1）：232.

[9] 龚玉华，徐中叶 . 放射诱导旁观者效应的研究进展 [J]. 医疗装备，2019，32（1）：201-203.

[10] Varès G，Wang B，Tanaka K，et al. Mutagenic adaptive response to high-LET radiation in human lymphoblastoid cells exposed to low doses of heavy-ion radiation [J]. Mutat Res，2011，712（1-2）：49-54.

[11] Hamada N，Matsumoto H，Hara T，et al. Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects [J]. J Radiat Res，2007，48（2）：87-95.

[12] Ito R，Hale LP，Geyer SM，et al. Late effects of exposure to ionizing radiation and age on human thymus morphology

and function [J]. Radiat Res，2017，187（5）：589-598.
[13] Kapoor V，Collins A，Griffith K，et al. Radiation induces iatrogenic immunosuppression by indirectly affecting hematopoiesis in bone marrow [J]. Oncotarget，2020，11（19）：1681-1690.
[14] Wei SS，Peng WB，Zhang CX，et al. Cordyceps sinensis aqueous extract regulates the adaptive immunity of mice subjected to ^{60}Co γ irradiation [J]. Phytother Res，2021，35（9）：5163-5177.
[15] 王磊，许小敏，卢志伟，等 . 当归多糖防护 X 线辐射对大鼠肝脏损伤的研究 [J]. 中草药，2017，48（20）：4284-4288.
[16] 李秋菊，李荣杭，张妍，等 . 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠脾脏细胞凋亡和 NF-κB 信号通路的影响 [J]. 国际中医中药杂志，2019（4）：375-380.
[17] 张朝宁，余臣祖 . 归芪益元膏通过 AMPK/mTOR 自噬信号通路对辐射旁效应损伤大鼠的保护作用及其机制 [J]. 临床医学研究与实践，2023，8（4）：5-8.
[18] Zhu N，Liu R，He LX，et al. Radioprotective effect of Walnut Oligopeptides against gamma radiation-induced splenocyte apoptosis and intestinal injury in mice [J]. Molecules，2019，24（8）：1582.
[19] Wang B，Min W，Lin S，et al. Saikosaponin-d increases radiation-induced apoptosis of hepatoma cells by promoting autophagy via inhibiting mTOR phosphorylation [J]. Int J Med Sci，2021，18（6）：1465-1473.
[20] Zheng Y，Pang X，Zhu XX，et al. Lycium barbarum mitigates radiation injury via regulation of the immune function，gut microbiota，and related metabolites [J]. Biomed Pharmacother，2021，139：111654.
[21] Zhang JA，Luan C，Huang D，et al. Induction of autophagy by baicalin through the AMPK-mTOR pathway protects human skin fibroblasts from ultraviolet B radiation-induced apoptosis [J]. Drug Des Devel Ther，2020，14：417-428.
[22] Kumar S，Tiku AB. Immunomodulatory potential of acemannan（polysaccharide from Aloe vera）against radiation induced mortality in Swiss albino mice [J]. Food Agr Immunol，2015，27（1）：72-86.
[23] 李启杰，吴苹，夏增亮，等 . 薏苡仁水提液抗辐射损伤作用机制的研究 [J]. 华西医学，2013，28（8）：1211-1214.
[24] Xu P，Cai XH，Zhang WB，et al. Flavonoids of Rosa roxburghii Tratt exhibit radioprotection and anti-apoptosis properties via the Bcl-2（Ca^{2+}）/Caspase-3/PARP-1 pathway [J]. Apoptosis，2016，21（10）：1125-1143.
[25] 左丽丽，李昱奇，富校轶，等 . 狗枣猕猴桃多酚对 ^{60}Coγ 射线辐射损伤小鼠免疫系统保护作用的研究 [J]. 中国兽医杂志，2020，56（1）：107-112，115，149.
[26] 舒尊鹏，杨燕妮，王毅，等 . 枳壳多糖对辐射损伤小鼠的防护作用研究 [J]. 中国药理学通报，2018，34（5）：670-674.
[27] Zhang J，Tong F，Cai Q，et al. Shenqi fuzheng injection attenuates irradiation-induced brain injury in mice via inhibition of the NF-κB signaling pathway and microglial activation [J]. Acta Pharmacologica Sin，2015，36（11）：1288-1299.
[28] 管兰芳，李亚巍，徐俊杰，等 . 芩丹颗粒对微波辐射大鼠 POMC 衍生肽含量及海马 CA1 区结构的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2016，36（4）：471-475.
[29] 赵信科，汪鸣，邱勇玉，等 . 基于 FasL/TNF-α 信号通路的当归补血汤对放射性心肌损伤凋亡反应的影响探讨 [J]. 时珍国医国药，2020，31（6）：1312-1314.
[30] 王毓国，冯剑，窦永起 . 基于 Bax、Bcl-2、与 Caspase-3 探讨凉血固元汤对大鼠急性胃辐射伤的作用机制 [J]. 环球中医药，2019，12（11）：1625-1630.
[31] Kiang JG，Olabisi AO. Radiation：a poly-traumatic hit leading to multi-organ injury [J]. Cell Biosci，2019，9：25.
[32] 王莉，李微，彭小春，等 . 中药在造血系统中的辐射防护作用研究进展 [J]. 时珍国医国药，2022，33（6）：1423-1427.
[33] Patyar RR，Patyar S. Role of drugs in the prevention and amelioration of radiation induced toxic effects [J]. Eur J Pharmaco，2018，819：207-216.
[34] 黄伟哲，肖大伟，杨默，等 . 何首乌提取物对放射线照射小鼠血小板生成的保护作用 [J]. 汕头大学医学院学报，2013，26（1）：9-12，2.
[35] 谭潇，董宪喆，郭代红，等 . 鸡血藤醇提物及其活性成分儿茶素抗辐射作用及机制研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（9）：1718-1724.
[36] 冯剑，王毓国，许成勇，等 . 清热解毒凉血法改善急性辐射损伤大鼠凝血功能及微循环状态的作用机制研究 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（1）：355-358.
[37] 卫守喆，刘伟，杨宏昕 . 沙棘黄酮对辐射损伤小鼠造血系统的保护作用及其机制 [J]. 山西医科大学学报，2021，52（1）：93-96.
[38] 孙会娟，索婷婷，任东青，等 . 五倍子酸对辐射损伤小鼠造血系统的防护作用 [J]. 中国辐射卫生，2019，28（3）：228-231，234.
[39] Qu XY，Li QJ，Zhang XJ，et al. Amentoflavone protects the hematopoietic system of mice against γ-irradiation [J]. Arch Pharm Res，2019，42（11）：1021-1029.
[40] Ran YY，Wang R，Hasan M，et al. Radioprotective effects of dragon’s blood and its extracts on radiation-induced myelosuppressive mice [J]. J Ethnopharmacol，2014，154（3）：624-634.
[41] Yu CM，Fu JQ，Guo LD，et al. UPLC-MS-based serum metabolomics reveals protective effect of Ganoderma lucidum polysaccharide on ionizing radiation injury [J]. J Ethnopharmacol，2020，258：112814.
[42] Chen X，Li B，Gao Y，et al. Sanguisorba officinalis saponins from improve hematopoiesis by promoting survival through FAK and Erk1/2 activation and modulating cytokine production in bone marrow [J]. Front Pharmacol，2017，8：130.
[43] 张明，李志威，刘建宇，等 . 苜蓿皂苷对 X 射线照射小鼠造血系统的影响 [J]. 中国农业大学学报，2021，26（7）：78-84.
[44] Zhang JL，Li HY，Lu L，et al. The Yiqi and Yangyin Formula ameliorates injury to the hematopoietic system induced by total body irradiation [J]. J Radiat Res，2017，58（1）：1-7.
[45] 何东初，肖静静，张梦云，等 . 健脾补肾方对辐射损伤小鼠全血细胞及免疫器官的影响研究 [J]. 现代中西医结合杂

志，2022，31（22）：3067-3073，3105.
[46] 杨娟，曾慧红，邵立健 . 电离辐射对睾丸生殖功能的影响 [J]. 临床与病理杂志，2022，42（9）：2274-2283.
[47] 杨明建，郑燕，陈建中，等 . 金银花提取物对中波紫外线辐射致雄性小鼠生殖系统损伤的保护作用 [J]. 食品工业科技，2016，37（24）：366-368，385.
[48] Ji HJ，Wang DM，Wu YP，et al. Wuzi Yanzong pill，a Chinese polyherbal formula，alleviates testicular damage in mice induced by ionizing radiation [J]. BMC Complement Altern Med，2016，16（1）：509.
[49] 郭娜，孙云朝，孙春霞，等 . 山楂黄酮通过抑制 ROS/NLRP3 信号通路对辐射损伤小鼠睾丸的保护作用 [J]. 中成药，2023，45（1）：258-263.
[50] 唐霖，吴立新，汪俊，等 . 枸杞多糖对电离辐射小鼠睾丸组织损伤的保护作用 [J]. 中成药，2015，37（8）：1846-1848.
[51] Zhang XM，Chen XY，Wang L，et al. Protective effects of Yiqi jiedu decoction on ionizing radiation-induced spermatogenic cell injury [J]. J Ethnopharmacol，2022，299：115681.
[52] 马惠荣，曹晓慧，马雪莲，等 . 六味地黄丸降低手机频率电磁辐射对大鼠睾丸组织的损伤 [J]. 中华男科学杂志，2015，21（8）：737-741.
[53] Santivasi WL，Xia F. Ionizing radiation-induced DNA damage，response，and repair [J]. Antioxid Redox Signal，2014，21（2）：251-259.
[54] 辛佳芸，魏艳平，丁倩倩，等 . 中药抗辐射活性成分及其作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2023，41（7）：166-172，276，277.
[55] Lee H，Park E. Perilla frutescens extracts enhance DNA repair response in UVB damaged HaCaT cells [J]. Nutrients，2021，13（4）：1263.
[56] 朱超纲，张磊善 . 桔梗皂苷 D 对人肝癌细胞株放射敏感性的影响及其相关机制 [J]. 中华肝脏病杂志，2017，25（6）：458-462.
[57] Yang JH，Yan Y，Liu HB，et al. Protective effects of acteoside against X-ray-induced damage in human skin fibroblasts [J]. Mol Med Rep，2015，12（2）：2301-2306.
[58] Liu SW，Sui QQ，Zou J，et al. Protective effects of hawthorn（Crataegus pinnatifida）polyphenol extract against UVB-induced skin damage by modulating the p53 mitochondrial pathway in vitro and in vivo [J]. J Food Biochem，2019，43（2）：e12708.
[59] Du WX，Duan SF，Yu XL，et al. Panax notoginseng saponins suppress radiation-induced osteoporosis by regulating bone formation and resorption [J]. Phytomedicine，2015，22（9）：813-819.
[60] 王成芳，邵帅，曲功霖，等 . 四君子汤对人小肠上皮细胞辐射损伤的保护作用 [J]. 辐射防护，2020，40（5）：456-461.
[61] 门俊琦，姚斌伟，郭家彬，等 . 电磁辐射防护抗氧化药物研究进展 [J]. 军事医学，2022，46（10）：792-797.
[62] Alkis ME，Akdag MZ，Dasdag S. Effects of low-intensity microwave radiation on oxidant-antioxidant parameters and DNA damage in the liver of rats [J]. Bioelectromagnetics，2021，42（1）：76-85.
[63] Kim HG，Jang SS，Lee JS，et al. Panax ginseng Meyer prevents radiation-induced liver injury via modulation of oxidative stress and apoptosis [J]. J Ginseng Res，2017，41（2）：159-168.
[64] 赵兰婷，昝香怡，高莉萍，等 . 西洋参防护 X 线辐射对小鼠肺的过氧化损伤 [J]. 中成药，2017，39（12）：2576-2579.
[65] 南瑛，赵美娜，常晋瑞，等 . 绞股蓝皂苷对辐射致小鼠氧化损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中南药学，2018，16（7）：935-938.
[66] 杨淑芳，张春杨，钱琨，等 . 蛹虫草抗氧化肽的发酵制备及对小鼠辐射氧化损伤的防护作用 [J]. 蚕业科学，2017，43（3）：496-501.
[67] Charachit N，Sukhamwang A，Dejkriengkraikul P，et al. Houttuynia cordatahyperoside and quercitrin in extract attenuate UVB-induced human keratinocyte cell damage and oxidative stress via modulation of MAPKs and Akt signaling pathway [J]. Antioxidants（Basel），2022，11（2）：221.
[68] Smina TP，Joseph J，Janardhanan KK. Ganoderma lucidum total triterpenes prevent γ-radiation induced oxidative stress in Swiss albino mice in vivo [J]. Redox Rep，2016，21（6）：254-261.
[69] 黎珊，蓝瑞隆，潘晓娴，等 . 甘草次酸干预对 X 射线照射后小胶质细胞生物学行为的影响 [J]. 中国实用神经疾病杂志，2022，25（6）：668-673.
[70] 左振魁，韩佳瑞，计树灵，等 . 葛根素减轻辐射诱发的大鼠急性肠黏膜损伤的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志，2021，31（6）：41-47.
[71] 唐文诚，李敏，罗芳芳，等 . 川芎提取物对辐射损伤小鼠的保护作用研究 [J]. 中国药业，2018，27（20）：1-3.
[72] Liu Y，Liu F，Yang Y，et al. Astragalus polysaccharide ameliorates ionizing radiation-induced oxidative stress in mice [J]. Int J Biol Macromol，2014，68：209-214.
[73] 齐琳，吴文倩，陈韶华，等 . 沙苑子黄酮对辐射损伤的抗氧化保护作用 [J]. 上海中医药杂志，2011，45（5）：73-77.
[74] 李思佳 . 刺五加中改善辐射小鼠脑损伤的功能成分研究 [D]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学，2019
[75] Guo J，Zhang YJ，Zeng LH，et al. Salvianic acid A protects L-02 cells against γ-irradiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive oxygen species [J]. Environ Toxicol Pharmacol，2013，35（1）：117-130.
[76] Feng T，Wang LB，Zhou N，et al. Salidroside，a scavenger of ROS，enhances the radioprotective effect of ExRAD® via a p53-dependent apoptotic pathway [J]. Oncol Rep，2017，38（5）：3094-3102.
[77] 刘云肖，马惠荣，陈景伟，等 . 滋肾育胎丸对电磁辐射大鼠卵巢组织氧化损伤和 Nrf2 蛋白表达的影响 [J]. 中国药房，2016，27（4）：470-473.
[78] 高庆，李延晖，谭德慧，等 . 中药补肾解毒方对辐射后孕鼠胎盘损伤的防护作用及氧化应激的影响 [J]. 世界中医药，2022，17（22）：3154-3157，3161.
[79] 郑剑霄，薛晓光，戴振晖，等 . 复方苦参注射液对 X 射线辐射后人皮肤成纤维细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 广州中医药大学学报，2018，35（6）：1070-1073.

（收稿日期：2023-08-07；修回日期：2023-09-17）

丹参调控糖脂代谢作用研究进展

黄傲[1, 2]，方晓洋[1, 2]，何维维[1, 3]，文馨月[1, 2]，成飞[3]，徐琳本[2*]，曾宏亮[1, 2*]（1. 湖南中医药大学湖南省中医药研究院，长沙　410208；2. 湖南省中医药研究院医学实验动物中心，长沙　410013；3. 湖南省中医药研究院中药资源研究所，长沙　410013）

摘要：丹参（Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma）是唇形科、鼠尾草属多年生直立草本植物，其干燥根和根茎常用于心血管疾病的治疗，为我国传统医学中的常见药材。研究结果表明，丹参提取物及主要活性成分丹酚酸、丹参酮等通过调节炎症、过氧化等多靶点多信号途径改善糖脂代谢。本文梳理了近年来的研究成果，总结丹参及其活性物质调控糖脂代谢的作用与机制研究进展，以期为丹参应用于糖尿病与肥胖等代谢性疾病的防治提供参考。

关键词：丹参；糖代谢；脂代谢；信号通路；研究进展

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0733-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.027

Research progress in Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma) in regulation of glucose and lipid metabolism

HUANG Ao[1, 2], FANG Xiao-yang[1, 2], HE Wei-wei[1, 3], WEN Xin-yue[1, 2], CHENG Fei[3], XU Lin-ben[2*], ZENG Hong-liang[1, 2*] (1. *Hunan Academy of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208; 2. *Center of Medical Laboratory Animals, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha* 410013; 3. *Institute of Chinese Medicine Resources, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha* 410013)

Abstract: Danshen (Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma) is a perennial upright herb belonging to the genus *Salvia* and Labiatae. Its dry roots and rhizomes are medicinal materials in traditional Chinese medicine, commonly used for cardiovascular diseases. Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma extract and its main active components, such as salvianolic acid and tanshinone, could improve the glucose and lipid metabolism by regulating the inflammation, peroxidation related targets and signaling pathways. This paper reviewed the research in recent years, summarized the progress in the effect and mechanism of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and its active substances in regulating the glucose and lipid metabolism, to provide reference for the application of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma in the treatment of diabetes and obesity.

Key words: Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; glucose metabolism; lipid metabolism; signaling pathway; research progress

丹参为唇形科植物丹参（*Salvia miltiorrhiza* Bge.）的干燥根和根茎。按其色泽、形态、功效不同，丹参又名赤参、山参、奔马等[1]。丹参是我国大宗中药材品种之一，年产量近 20 000 吨[2]。其在中医临床需求量大，全球年消耗量已超过 2000 万公斤，常以其根及根茎入药[3-4]。《神农本草经》记载丹参“主心腹邪气，肠鸣幽幽如走水，寒热积聚，破徵除瘕，止烦满，益气”，因

基金项目：湖南省自然科学基金面上项目（No.2021JJ30416）；湖南省中医药科研计划项目（No.202023）；湖南省重点领域研发计划项目（No.2020SK2141）；湖南省高新技术产业科技创新引领计划（No.2020SK2051）。

作者简介：黄傲，女，在读硕士研究生，主要从事药理学研究，email：2275929053@qq.com　*通信作者：曾宏亮，男，副研究员，主要从事抗代谢性疾病药物发现与机制研究，email：zenghl155@163.com；徐琳本，女，副研究员，主要从事药理毒理学研究，email：13637495612@163.com

此，中医临床常以丹参治疗胸痹心痛、脘腹胁痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、心烦不眠、月经不调、痛经经闭、疮疡肿痛等[5]。丹参具有增加冠脉流量、降低心肌兴奋性和传导性、保护心肌缺血性损伤、抗血栓、抗炎、抗氧化、改善肾功能等药理作用。研究表明，现已报道从丹参中提取分离获得百余个单体成分，包括丹参酮类 22 个，酚酸类 41 个，含氮类 9 个，内酯类 8 个，生物碱类 7 个以及多糖、黄酮、甾体等多种生物活性物质[6-7]。

糖脂代谢紊乱性疾病是由遗传、环境、精神等多种因素参与的疾病，以神经内分泌失调、胰岛素抵抗、氧化应激、炎症、肠道菌群失调为核心病因，以高血糖、肥胖、血脂失调、非酒精性脂肪肝、高血压及动脉粥样硬化等单一或合并出现为主要临床表现特点，其中医病机表现为“浊”，根据发病原因不同，可分为“湿、痰、瘀、热”诸浊[8]。这与丹参的中医疗效表现有很多关联之处。因此，丹参可用于糖尿病、高血脂、动脉粥样硬化等代谢性疾病。随着生活水平的提高和饮食结构的变化，糖尿病和肥胖已成为世界上最流行的代谢性疾病。基于此，本文通过总结国内外相关文献报道，对丹参调控糖脂代谢的作用进行系统归纳总结与分析，为更好地利用丹参治疗糖脂代谢紊乱性疾病提供理论支持。

1 丹参及其活性成分对糖代谢的影响

糖代谢异常与糖尿病及糖尿病并发症密切相关。已有大量研究基于多种诱因导致的糖尿病模型探讨丹参提取物及其所含单体成分调控糖代谢紊乱性疾病的作用及机制。丹参调控糖代谢作用主要与其强大的抗炎和抗氧化作用有关。

1.1 丹参提取物调节糖代谢

丹参根、茎、叶的水提取物及醇提取物对糖尿病肾病大鼠模型的糖代谢具有改善作用，可能是通过抑制 Wnt4、*β*-catenin 和转化生长因子 *β*（TGF-*β*）信号通路改善糖代谢异常所致的肾损伤[9]。丹参总酚酸提取物同样可通过降低小鼠空腹血糖（FBG）、血清肌酐（Scr）和血清尿素氮（BUN）水平，改善 2 型糖尿病肾病小鼠模型体内糖代谢紊乱以及肾脏损伤[10]。在高糖诱导的代谢紊乱果蝇模型中，丹参水提物能通过影响组氨酸代谢、甘油磷脂代谢、戊糖和葡糖醛酸盐相互作用代谢通路发挥调节糖代谢功效作用，使血糖水平恢复正常[11]。丹参对链脲佐菌素（STZ）诱导的糖尿病血管损伤亦具有显著改善作用，其水提物可通过降低烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4（NOX4）来源的氧化应激反应，抑制糖尿病主动脉蛋白的表达，改善糖尿病小鼠血管损伤[12]。除此之外，丹参水提取物还能通过抑制 Krüppel 样转录因子 10（KLF10）的表达，促进血红素加氧酶 -1（HO-1）的上调，进而降低活性氧（ROS）的生成，调节血糖水平，改善血管平滑肌细胞损伤，主要与其抗炎抗氧化作用有关[13]。

1.2 丹参单体成分调节糖代谢

1.2.1 丹酚酸 A　丹酚酸 A 是从丹参中发现的一种重要的生物活性多酚酸，具有抗糖尿病[14]、抗氧化[15]、抗炎[16]等多种药理活性，可用于治疗糖代谢紊乱。近年来，大量临床前研究发现丹酚酸 A 对糖尿病及其并发症有一定的预防作用。丹酚酸 A 可通过降低尿白蛋白、抑制晚期糖基化终末产物 - 糖基化终末产物受体（AGE-RACE）信号传导、减轻 AGEs 诱导的氧化应激来改善 2 型糖尿病大鼠肾小球内皮细胞的高渗性，预防早期糖尿病肾病[17]。丹酚酸 A 还可通过抑制血清脂蛋白相关磷脂酶 A2（Lp-PLA2）活性和抑制肾组织中 Lp-PLA2 的表达改善 2 型糖尿病大鼠肾微循环和肾组织炎症，发挥抗糖尿病肾病作用[18]。此外，丹酚酸 A 也被证实对糖尿病心肌病[19]、糖尿病动脉粥样硬化[20]、糖尿病线粒体功能障碍[21]和糖尿病周围神经病变[22]等糖尿病并发症具有调节作用。

1.2.2 丹酚酸 B　丹酚酸 B 为丹参的主要水溶性成分之一，具有潜在的抗糖尿病活性，临床上常用于心血管疾病、肺纤维化和恶性肿瘤等疾病的治疗。在 STZ 诱导的 2 型糖尿病大鼠模型中，丹酚酸 B 可通过抑制 *Ras* 同源基因家族成员 A/Rho 相关蛋白激酶信号通路，下调 *α* 平滑肌肌动蛋白（*α*-SMA）、Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原蛋白表达，对糖尿病所致心血管疾病发挥保护作用[23]。其可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 *α*（PPAR*α*）改善 2 型糖尿病小鼠的心肌肥厚[24]以及保护胰岛 *β* 细胞免受化学损伤而发挥抗 2 型糖尿病作用[25]。有学者采用自发性 2 型糖尿病动物模型评价丹酚酸 B 的体内药效作用，结果表明其能通过激活腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）途径预防和治疗 2 型糖尿病[26]。丹酚酸 B 还可以下调内皮细胞的凋亡和有丝分裂吞噬，改善糖尿病诱导的内皮细胞和线粒体功能障碍[27]；通过抑制肝脏内质网应激改善 ob/ob 小鼠的胰岛素抵抗等[28]。此外，丹酚酸 B 能通过破坏骨形态发生蛋白 -4（BMP4）和 ROS 循环来改善糖尿病血管内皮功能障碍[29]。

1.2.3 丹参酮ⅡA　丹参酮ⅡA 是丹参的主要脂溶性成分，具有广泛的抗炎和抗氧化活性。研究证实丹参酮ⅡA 可通过核转录因子 -*κ*B（NF-*κ*B）

诱导的 AMPK 信号通路改善 2 型糖尿病小鼠的胰岛素抵抗[30]。根据 Li 等[31]的研究，丹参酮ⅡA 能阻断蛋白磷酸酶 2A-A（PP2A-A）从细胞质到细胞膜的易位，减少 PP2A-A/ 内皮一氧化氮合酶（eNOS）相互作用，从而通过 eNOS/ 一氧化氮（NO）级联阻止 eNOS 去磷酸化调控糖代谢，治疗糖尿病。丹参酮ⅡA 能通过抑制糖代谢异常诱导的内质网应激和上调沉默信息调节因子 1（SIRT1）表达来改善糖尿病心肌病[32]；还能通过 Nrf2 调节糖酵解酶果糖二磷酸醛缩酶 C（ALDOC）的表达和促进 HT-22 细胞糖酵解，对海马神经元放射性损伤起到保护作用[33]。此外，丹参酮ⅡA 通过提高超氧化物歧化酶（SOD）活性，抑制蛋白激酶 R 样内质网激酶（PERK）途径激活胶原表达，调控糖尿病肾病大鼠糖代谢，降低血糖水平[34-35]。

1.2.4 隐丹参酮 隐丹参酮（CTS）是丹参酮的一种单体，是丹参中的脂溶性化合物，CTS 已被证实有降血糖、减肥的作用。Wang 等[36]的研究证实了 CTS 对妊娠糖尿病大鼠模型的高血糖具有改善作用，其作用机制可能为 CTS 通过降低胎盘和血液中的氧化应激，抑制 NF-κB 信号通路，减轻炎症反应，进而改善胰岛素抵抗，增加糖代谢速率，从而有效地改善妊娠糖尿病和 2 型糖尿病。在多囊卵巢综合征（PCOS）大鼠模型中，隐丹参酮改善 PCOS 大鼠糖耐量异常、大鼠胰岛素抵抗状态、降低胰岛素及大鼠促卵泡激素（FSH）等的水平，从而改善 PCOS 大鼠糖代谢[37]。此外，CTS 还可通过激活胰岛素信号、调节葡萄糖转运蛋白，逆转地塞米松诱导的小鼠卵巢胰岛素抵抗，治疗 PCOS 排卵功能障碍[38]。

1.2.5 其他 丹参酮Ⅰ是丹参的主要活性成分之一，具有抗炎和心脑血管保护等药理活性。有研究发现，丹参酮Ⅰ可通过降低胰岛素受体底物 -1（IRS-1）中白细胞介素 -6（IL-6）和肿瘤坏死因子 α（TNF-α）的水平，减少 NF-κB 的核转位和丝氨酸 307（Ser307）的磷酸化，调节 AMPK 信号通路改善 2 型糖尿病 db/db 小鼠的胰岛素抵抗[39]。丹参乙酸镁是丹参可溶性提取物中含量最丰富的多酚化合物，已有研究证明其能与锌离子或镁离子复合，恢复或缓解血脂和糖代谢延迟以及胰岛素水平升高等代谢紊乱，改善脂肪肝、胰岛素抵抗等异常生理状态，进而改善高脂饮食诱导代谢综合征大鼠的代谢变化[40]。丹参提取物及单体成分调控糖代谢的作用详见表 1。

上述研究表明降低机体胰岛素水平、增加胰岛素敏感性，减少氧化应激，缓解炎症反应等可能是丹参对糖代谢紊乱引起的不同疾病发挥保护作用的重要共性机制之一，一定程度上体现了丹参中多成分协同调控糖代谢的功能特点。然而，丹参中除酚酸、丹参酮类的其他类型成分是否有调控糖代谢作用仍需进一步深入挖掘。

2 丹参及其活性成分对脂代谢的影响

血浆胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）等血浆脂质成分的异常高值或低值以及组织中各种脂质的潴留将导致脂代谢紊乱，脂代谢紊乱是诱发肥胖、血脂异常、非酒精性脂肪肝、动脉粥样硬化等疾病的重要危险因素。丹参调控脂代谢作用主要与其降低 TC、TG 等脂质代谢指标有关。

2.1 丹参提取物调节脂代谢

丹参水提物能提高高脂饮食喂养的去卵巢大鼠模型血清中的 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）活性，减少丙二醛（MDA）含量，上调肝脏低密度脂蛋白受体（LDLR）和胆固醇 7- 羟化酶（CYP7A1）的 mRNA 和蛋白质表达水平，同时，下调 3- 羟基 -3- 甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶（HMGCR）的 mRNA 和蛋白质水平，从而促进血清低密度脂蛋白的清除，抑制 TC 的合成[41]。研究报道，经过高静压技术处理的丹参提取物通过自噬激活减少泡沫细胞的形成，起抗动脉粥样硬化作用[42]。信号转导器和转录激活器 3（STAT3）是参与调节高脂饮食中脂质代谢的重要因子，对高脂饮食中肝脏的脂质代谢具有重要的调节作用[43]。丹参水溶性成分丹酚酸能通过抑制卵巢切除和高糖诱导的信号转导子及 STAT-3 磷酸化，缓解脂质代谢紊乱[44]。

2.2 丹参单体成分调节脂代谢

2.2.1 丹酚酸 A 丹酚酸 A 可通过降低 TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平，抑制 NOD 样受体蛋白 3（NLRP3）炎症体和 NF-κB 信号激活，改善雄性 ZDF 大鼠的血脂水平[45]。丹酚酸 A 可以参与硫氧还蛋白互作蛋白（TXNIP）/ NLRP3 和 TXNIP/ 碳水化合物反应元件结合蛋白（ChREBP）通路的调控，减少肝脏脂质累积，降低炎症反应，改善高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝病变[46]。丹酚酸 A 还可以参与 AMPK 及 SIRT1 蛋白的激活，抑制棕榈酸诱导肝细胞内 TG 含量的增加，降低细胞内脂滴含量，有效改善脂毒性诱导的肝细胞损伤[47]。Wang 等[48]学者证实，丹酚酸 A 能降低 ZDF 大鼠血清 FFA、肝脏 TC 和 TG 水平，维持大鼠肠道菌群平衡，改善脂质代谢。此外，丹酚酸 A 通过增加 AMPK 磷酸化和 SIRT1 表达，促进白色脂肪组织褐变，调控脂质代谢[49]。

表 1 丹参提取物及单体成分调控糖代谢的作用

Tab 1 Regulate-glucose metabolism effects of extracts and monomer components of Danshen

丹参提取物及单体成分	诱导因素	动物模型 / 细胞系	作用途径	主要结果	文献
丹参根、茎、叶的水、醇提取物	高糖高脂	SD 大鼠	Wnt/β-catenin，TGF-β 信号通路	糖化血清蛋白↓，Scr↓，BUN↓，胱抑素 C↓，血清 β_2 微球蛋白↓，肾脏指数↓	[9]
丹参总酚酸（醇）提取物	高糖高脂	雄性 db/db 小鼠	—	FBG↓，Scr↓，BUN↓	[10]
丹参茎、叶醇提取物	高糖	果蝇	组氨酸、甘油磷脂、戊糖和葡糖醛酸盐相互作用、甘油酯代谢通路	葡萄糖↓	[11]
丹参水提取物	STZ	雄性 SD 大鼠	降低 NOX4 产生的氧化应激	血清胰岛素↓，NO↓，糖化血红蛋白↓，SOD↑，CAT↑，过氧化氢↓，MDA↓，可溶性细胞间黏附分子 1↓	[12]
丹参水提取物	高糖高脂	雄性 db/db 小鼠	抑制 KLF10 表达	ROS↓，HO-1↑	[13]
丹酚酸 A	STZ	雄性 SD 大鼠	AGE-RAGE 信号通路	血糖↓，尿白蛋白肌酐比值↓	[17]
丹酚酸 A	高糖	雄性 ZDF 大鼠	Lp-PLA2	BUN↓，微量白蛋白↓，视黄醇结合蛋白↓	[18]
丹酚酸 A	STZ	雄性 SD 大鼠	IRE1-CRYAB 信号通路	乳酸脱氢酶（LDH）↓，谷草转氨酶（AST）↓，肌酸激酶同工酶↓	[19]
丹酚酸 A	STZ	雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠	PKM2/ PKR 通路	乳酸↓，NLRP3↓，ASC↓	[20]
丹酚酸 A	STZ	大鼠	AMPK-PGC1α-Sirt3	AMPK 磷酸化率↑，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1α↑，沉默信息调节因子 3↑，神经型一氧化氮合成酶↑，SOD↑，血清 MDA↓，AGEs↓	[21]
丹酚酸 A	高糖	RSC96 细胞系	Nrf2	ROS↓，MDA↓，氧化谷胱甘肽↓	[22]
丹酚酸 B	STZ	雄性 SD 大鼠	RhoA/ROCK1 信号通路	α-SMA↓，胶原蛋白Ⅰ↓，胶原蛋白Ⅲ↓，RhoA↓，ROCK1↓	[23]
丹酚酸 B	STZ	C57BL /6J 小鼠	上调 PPARα 表达	胰岛素抵抗↓，HW/Tibial length↓，^{3}H- 亮氨酸参入率↓	[24]
丹酚酸 B	STZ	雄性白化 Wistar 大鼠	保护胰腺 β 细胞免受化学损伤	血糖↓，血清胰岛素↑，MDA↓，GSH↑	[25]
丹酚酸 B	高糖	雄性 C57BL/KsJ-db/db 小鼠	AMPK 途径	血糖↓，血清胰岛素↓，磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶↓，p-AMPK、PPARα、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶↑	[26]
丹酚酸 B	高糖	雄性 db/db 小鼠	—	血糖↓，胰岛素抵抗↓，FBG↓，血清 FINS↓	[27]
丹酚酸 B	瘦蛋白缺陷	雄性 ob/ob 小鼠	JNK/IRS-1 通路	血糖↓，ALT↓，AST↓，碱性磷酸酶↓，IRS-1 丝氨酸磷酸化↓	[28]
丹酚酸 B	高糖	雄性 db/db 小鼠、HUVECs 细胞	p38 MAPK/JNK/caspase 3	ROS↓，应激活化蛋白激酶（JNK）↓，胱天蛋白酶 3（Caspase-3）↓	[29]
丹参酮ⅡA	STZ ＋高脂	雄性 SD 大鼠	NF-κB 诱导的 AMPK 信号通路	BUN↓，Scr↓，非酯化游离脂肪酸↓	[30]
丹参酮ⅡA	STZ	SD 大鼠	—	eNOS↑，环磷酸鸟苷，亚硝酸盐↑，NO↑	[31]
丹参酮ⅡA	高糖高脂	雄性 C57BL/6J 小鼠	抑制 ERS 和上调 SIRT1 表达	胰岛素抵抗↓，葡萄糖耐受不良↓，血糖↓	[32]
丹参酮ⅡA	STZ	雄性 SD 大鼠	PERK 信号通路	BUN↓，SOD↑，血小板反应蛋白 -1↓，增强子结合蛋白同源蛋白↓	[34]
丹参酮ⅡA	STZ ＋高脂高糖	雄性 SD 大鼠	—	血糖↓，BUN↓，增殖细胞核抗原蛋白↓，IL-6↓，MDA↓，Caspase-3↓，SOD↑	[35]
隐丹参酮	—	C57BL 小鼠	NF-κB 通路	血糖↓，血清胰岛素↑，MDA↓，IL-6↓，SOD↑	[36]
隐丹参酮	脱氢表雄甾酮（DHEA）	雌性 SD 大鼠	—	空腹胰岛素↓，FSH↓，促黄体生成素（LH）↓	[37]
隐丹参酮	地塞米松	小鼠	PI3K 信号通路	雌激素↓，丝氨酸 / 苏氨酸激酶 2↑，细胞色素 P450 同工酶 11（CYP11）、细胞色素 P450 同工酶 17（CYP17）↓	[38]
丹参酮Ⅰ	STZ	SD 大鼠	IRS-1 途径	游离脂肪酸（FFA）↓，IL-6↓，TNF-α↓	[39]
丹参乙酸镁	高脂	雄性 SD 大鼠	—	AST 和 ALT 酶活性↓，MDA↓	[40]

注：“↑”表示上升，“↓”表示下降，“—”表示文献未提及。

Note：“↑” means rising，“↓” means falling，“—” means the literature does not mention.

2.2.2　丹酚酸 B　丹酚酸 B 在脂肪细胞中具有多种功能，主要表现为通过 β3- 肾上腺素受体（β3-AR）和细胞外信号调节激酶（ERK）信号通路诱导白色脂肪细胞褐变并促进其分解代谢从而调控脂质代谢 [50]。在高脂饮食诱导的低密度脂蛋白受体基因敲除 LDLR$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化模型中，丹参酚酸 B 可显著降低小鼠 TC、TG、LDL-C 水平，发挥抗动脉粥样硬化作用 [51]。丹酚酸 B 可以通过促进抗炎来缓解动脉粥样硬化，其可通过抑制 MAPK/NF-κB 信号通路，降低 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平，下调血管细胞黏附分子和诱导型一氧化氮合酶（iNOS）蛋白表达 [52]。研究发现丹酚酸 B 通过调节甘油磷脂、鞘脂和花生四烯酸代谢，减轻氧化应激诱导的损伤和脂质过氧化作用，对高脂饮食大鼠冠心病具有保护作用 [53]。综上所述，丹酚酸 B 具有抗氧化、抗炎等作用，对脂代谢异常引起的血管疾病具有保护作用。

2.2.3　丹酚酸 C　丹酚酸 C 是一种水溶性成分，具有抗氧化和抗肿瘤活性。羟甲戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶是生物体内 TC 合成代谢的限速酶，是血脂调节的重要作用靶点。据报道，丹酚酸 C 可通过抑制人类 HMG-CoA 还原酶活性，减少 TC 合成，调节脂质水平 [54]。此外，丹酚酸 C 可抑制过量对乙酰氨基酚（APAP）引起的肝功能受损小鼠血清中 AST、谷丙转氨酶（ALT）、总胆红素（TBil）水平的升高，降低血清 TC 和 TG 水平，抑制血脂代谢异常，保护对乙酰氨基酚诱导的肝损伤，改善生化参数，降低脂质氧化 [55]。

2.2.4　丹参酮ⅡA　研究表明，丹参酮ⅡA 能下调 CCAAT 增强子结合蛋白 α（C/EBPα）、CCAAT 增强子结合蛋白 β（C/EBPβ）和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）等细胞因子发挥抗脂肪生成作用 [56]；还能通过抑制高脂血症大鼠模型肝脏中微小 RNA-33a（miR-33a）基因的表达，上调固醇反应元件结合蛋白 -2（SREBP-2）和前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（PCSK9）等基因的表达，调节 miR-33a/SREBP-2/PCSK9 信号通路，调控脂质代谢 [57]。亦有研究表明丹参酮ⅡA 能在不减少食物摄入量的情况下，改善 HFD 大鼠模型血浆和肝脏脂质水平，抑制肝脏中 TG、血清总胆固醇（CHOL）、FFA 和 LDL-C 水平的升高，上调高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）水平，同时刺激 PPARγ，下调 Toll 样受体 4（TLR4）表达，预防脂肪性肝疾病 [58]。其调节脂质代谢功能对动脉粥样硬化同样具有保护作用，能明显降低 CHOL、TG 和 LDL-C 等血脂相关因子水平，提高 HDL-C 水平，减少粥样硬化病变内膜区脂质沉积和斑块大小，其作用机制可能与 TGF-β/PI3K/Akt/eNOS 通路的激活有关 [59]。此外，丹参酮ⅡA 还能下调 TLR4/MyD88/NF-κB 途径中的关键蛋白表达，发挥稳定动脉粥样硬化斑块的作用 [60]。

2.2.5　其他　丹参酮Ⅰ可显著提高葡萄糖利用率，改善胰岛素敏感性，预防高脂饮食诱导的肥胖 [61]。隐丹参酮也被发现对治疗肥胖有效，其可抑制 C/EBPα、C/EBPβ 和 PPARγ 及靶脂肪细胞特异性基因 *aP2*、脂联素、第四型葡萄糖转运蛋白（GLUT4）的表达，激活抗成脂基因，从而显著减少脂质积累 [62]。隐丹参酮还能通过诱导磷酸化并激活 AMPKα 和 p38-MAPK 信号通路，诱导 C3H10T1/2 细胞的棕色脂肪生成，从而促进肥胖的治疗 [63]。丹参二醇 C 是从丹参根中分离得到的一种用于治疗多种心血管疾病的传统中药活性成分，参与吞噬细胞对 LDL-C 的摄取过程，减少细胞内的脂质，调节动脉粥样硬化泡沫细胞的形成 [64]。紫草酸镁 B 是丹参的活性化合物，对饮食诱导的肥胖啮齿类动物的胰岛素抵抗和代谢异常具有有益作用，进一步的研究表明其能促进脂肪组织中的脂肪分解和产热，改善脂质代谢异常 [65]。丹参提取物及单体成分调控脂代谢的作用见表 2。

上述研究表明丹参提取物及单体成分调控脂代谢的机制主要与调控脂肪生成基因、降低脂肪积聚、改善氧化应激及降低炎性反应等相关。除了酚酸类、丹参酮类已被证实体内调控脂代谢的有效性，丹参中的多糖、丹参乙酸镁等含量较高的大分子类物质，也被证实具有调控脂代谢作用。说明丹参通过多成分、多通路、多靶点来影响机体脂代谢。

3　结语与展望

丹参及其活性成分对糖尿病、糖尿病并发症、肥胖、动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝等疾病中的糖脂代谢紊乱都有良好的改善作用。其中，关于丹参对糖尿病及肥胖改善作用的研究最多。从已报道的实验研究结果来看，丹参中含量较高的单体成分如丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹参酮ⅡA 等都具有较好的调控糖脂代谢紊乱作用。丹参调节糖代谢的作用机制主要是通过调控 AMPK、TGF-β、PI3K 等信号通路；其调节脂代谢的作用机制主要是通过调控 AMPK/SIRT1、PI3K/AKT、STAT-3 等信号通路。体现了丹参多成分、多环节及多信号通路调控糖脂代谢的作用优势。针对各种糖脂代谢紊乱引起的疾病，丹参的作用机制有

表 2 丹参提取物及单体成分调控脂代谢的作用

Tab 2 Regulate-lipid metabolism effects of extracts and monomer components of Danshen

提取物或单体	诱导因素	动物模型 / 细胞系	作用指标	主要结果	文献
丹参水提物	高脂	SD 大鼠	—	TC↓，TG↓，LDL-C↓，ALT↓，AST↓，MDA↓	[41]
丹参水提物	高胆固醇	ApoE$^{-/-}$小鼠	—	TG↓，DiI-oxLDL↓	[42]
丹参总酚酸（水）提取物	双侧卵巢摘除	雌性 SD 大鼠	STAT-3/SREBP1 信号	TG↓，TC↓，SREBP1、脂肪酸合酶（FAS）、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶↓	[44]
丹酚酸 A	高脂、维生素 D_3 注射	雄性 ZDF 大鼠	NLRP3 炎症体和 NF-κB 信号	CHOL↓，TG↓，LDL-C↓，Hs-CRP↓	[45]
丹酚酸 A	高脂	雄性 SD 大鼠	TXNIP/NLRP3 和 TXNIP/ChREBP 通路	ALT↓，AST↓，TG↓，TC↓，NEFA↓	[46]
丹酚酸 A	棕榈酸	AML12 肝细胞	激活 AMPK 及 SIRT1 的表达	LDH↓，ROS↓，TG↓	[47]
丹酚酸 A	—	雄性 ZDF 大鼠	—	FFA↓，TC↓，TG↓，IL-6↓，TNF-α↓	[48]
丹酚酸 A	高脂	雄性小鼠	AMPK/SIRT1 途径	线粒体棕色脂肪解偶联蛋白 1↑，肥胖率、白色脂肪脂肪细胞营养不良和增生↓	[49]
丹酚酸 B	乙醇	雄性 LDLR$^{-/-}$小鼠	促进细胞胞葬作用	TC↓，TG↓，LDL-C↓，受体酪氨酸激酶↑	[51]
丹酚酸 B	高脂	雄性 LDLR$^{-/-}$小鼠	MAPKs/NF-κB 信号通路	TC↓，TG↓，AST↓，ALT↓，IL-6↓，iNOS↓，JNK↓，p38↓，IkappaB↓	[52]
丹酚酸 B	维生素 D_3 注射液＋高脂	雄性 SD 大鼠	甘油磷脂代谢、鞘磷脂代谢和花生四烯酸代谢	TG↓，TC↓，LDL-C↓，LDH↓，CK↓，HDL-C↑	[53]
丹酚酸 C	对乙酰氨基酚	雄性 ICR 小鼠	Keap1/Nrf2/HO-1	AST↓，ALT↓，TBil↓，TC↓，TG↓，MDA↓，CYP2E1↓	[55]
丹参酮ⅡA	二苯基甲烷二异氰酸酯	3T3-L1 细胞	C/EBP-α、PPAR-γ、FAS、外脂素 A 和 STAT-3/5	TG↓，脂滴↓	[56]
丹参酮ⅡA	高脂	雄性 SD 大鼠	miR-33a、SREBP-2/PCSK9	TG↓，TC↓，LDL-C↓，HDL-C↑	[57]
丹参酮ⅡA	高脂	雄性 SD 大鼠	PPAR-γ、TLR4	TG↓，HDL-C↑，ALT↓，AST↓	[58]
丹参酮ⅡA	高脂	雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠	TGF-β/PI3K/Akt/eNOS 途径	HDL-C↑，TC↓，TG↓，LDL-C↓	[59]
丹参酮ⅡA	高脂	雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠	激活 PI3K/AKT 信号，抑制 TLR4/NF-κB 信号	脂质面积↓，胶原含量↑，MMP-9 蛋白表达↓	[60]
丹参酮Ⅰ	高脂	雄性 C57BL /6 小鼠	PI3K/Akt、AMPK	TG↓，TC↓，NEFA↓	[61]
隐丹参酮	地塞米松、胰岛素	3T3-L1 小鼠前脂肪细胞	STAT3	TG↓，PPARγ↓，C/EBPα↓	[62]
隐丹参酮	骨形态发生蛋白 4	C3H10T1/2 小鼠间充质干细胞	AMPK、p38-MAPK	TG↑，核转录辅助激活因子、PR 结构域蛋白 16↑	[63]
丹参乙酸镁	双酚 A	SD 大鼠	—	TC↓，TG↓	[65]

注：“↑”表示上升，“↓”表示下降，“—”表示文献未提及。

Note：“↑” means rising，“↓” means falling，“—” means the literature does not mention.

所不同，但均可产生明显保护效果，表明其在调控糖脂代谢方面具有光明的前景。

目前对丹参调控糖脂代谢作用研究虽取得了一定进展，但仍存在以下问题：① 目前对于丹参临床疗效的报道主要是以各种高糖高脂动物模型以及离体培养的细胞为试验对象，不能完全代表中草药的临床疗效；② 丹参活性成分的安全性和其量效关系的临床研究较少；③ 目前，中国食品药品监督管理局已经批准了 300 多种与丹参有关的制剂的使用。在联合应用方面，丹参与瑞舒伐他汀钙片联合治疗不稳定型心绞痛有效且安全；复方丹参注射液联合黄芪注射液可有效改善患者心功能及血清指标，对老年慢性充血性心力衰竭急性发作期患者的治疗效果较好等。然而现有丹参对调控糖脂代谢疾病的研究还局限于丹参提取物及其单体的研究。因此，后续还应对丹参进行相关的安全性评价、量效关系研究和临床试验研究。并考虑将丹参不同单体成分配伍使用或者与其他降糖降脂药物联合使用，充分发挥中医药多组分、多靶点、多途径的治疗特点，探索它们可能的协同作用效果。已有的研究表明丹参及其活性成分对糖脂代谢紊乱具有明确的调控效果，因此开发丹参保健产品及中成药物具有极高价值与广阔的应用前景。

参考文献

[1] 邓爱平，郭兰萍，詹志来，等 . 丹参本草考证 [J]. 中国中药杂志，2016，41（22）：4274-4279.

[2] 郑艳萍，袁琪，李伟东，等 . 丹参药渣的功能组分及体外抗氧化活性 [J]. 生物加工过程，2021，19（3）：263-270，273.

[3] 田宇红，王喆之 . 丹参组织培养及植株再生研究 [J]. 陕西师范大学学报（自然科学版），2003，18（1）：99-102.

[4] Pang HQ，Wu L ，Tang YP，et al. Chemical analysis of the herbal medicine Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma（Danshen）[J]. Molecules（Basel，Switzerland），2016，21（1）：51-79.
[5] 单晓晓，洪帮振，刘洁，等 . 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志，2021，46（21）：5496-5511.
[6] 万新焕，王瑜亮，周长征，等 . 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药，2020，51（3）：788-798.
[7] 张紫茹 . 丹参化学成分研究及丹酚酸 B 对血栓闭塞性脉管炎大鼠的药效学评价 [D]. 济南：山东大学，2018.
[8] 郭姣，肖雪，荣向路，等 . 糖脂代谢病与精准医学 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2017，19（1）：50-441.
[9] Xiang X，Cai HD，Su SL，et al. Salvia miltiorrhiza protects against diabetic nephropathy through metabolome regulation and wnt/β-catenin and TGF-β signaling inhibition [J]. Pharmacol Res，2019，139（2）：26-40.
[10] 徐卓，项想，尚尔鑫，等 . 丹参茎叶总酚酸对 2 型糖尿病肾病小鼠肠道菌群和短链脂肪酸的调节作用 [J]. 药学学报，2021，56（4）：1035-1048.
[11] 俞辰亚代，于金高，顾俊菲，等 . 丹参茎叶提取物对高糖诱导的果蝇代谢紊乱模型的糖脂代谢的调节作用及其机制 [J]. 中国中药杂志，2018，43（7）：1484-1491.
[12] Zhao WW，Yuan Y，Zhao HY，et al. Aqueous extract of Salvia miltiorrhiza Bunge-Radix Puerariae herb pair ameliorates diabetic vascular injury by inhibiting oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Food Chem Tox-icol，2019，129（9）：97-107.
[13] Zhou J，Zhang L，Zheng B，et al. Salvia miltiorrhiza bunge exerts anti-oxidative effects through inhibiting KLF10 expression in vascular smooth muscle cells exposed to high glucose [J]. J Ethnopharmacol，2020，262（11）：203-208.
[14] Qiang GF，Yang XY，Shi LL，et al. Antidiabetic effect of salvianolic acid A on diabetic animal models via ampk activation and mitochondrial regulation [J]. Cell Physiol Biochem，2015，36（1）：395-408.
[15] Yu XY，Zhang L，Yang XY，et al. Salvianolic acid A improves intestinal motility in diabetic rats through antioxidant capacity and upregulation of nNOS [J]. J Dig Dis，2016，17（7）：441-447.
[16] Feng S，Cong H，Ji L. Salvianolic acid A exhibits anti-inflammatory and antiarthritic effects via inhibiting NF-κB and p38/MAPK pathways [J]. Drug Des Devel Ther，2020，14（17）：71-89.
[17] Hou BY，Qiang GF，Zhao YR，et al. Salvianolic acid A protects against diabetic nephropathy through ameliorating glomerular endothelial dysfunction via inhibiting AGE-RAGE signaling [J]. Cell Physiol Biochem，2017，44（6）：2378-2394.
[18] 陈姣姣，陈小真，郁晨，等 . 丹酚酸 A 对 ZDF 大鼠肾脏的保护作用和抑制脂蛋白相关磷脂酶 A2 的研究 [J]. 中国比较医学杂志，2019，29（2）：25-31.
[19] Gong DF，Sun SC，Wang RR，et al. Salvianolic acid A improve mitochondrial respiration and cardiac function via inhibiting apoptosis pathway through CRYAB in diabetic cardiomyopathy [J]. Biomed Pharmacother，2023，160（3）：13-28.
[20] Zhu J，Chen H，Le YF，et al. Salvianolic acid A regulates pyroptosis of endothelial cells via directly targeting PKM2 and ameliorates diabetic atherosclerosis [J]. Front Ph-armacol，2022，13（7）：309-552.
[21] Sun JL，Leng P，Li X，et al. Salvianolic acid A promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes through regulation of the AMPK-PGC1α signalling pathway [J]. Adipocyte，2022，11（1）：562-571.
[22] Xu CY，Hou BY，He P，et al. Neuroprotective effect of salvianolic acid A against diabetic peripheral neuropathy through modulation of Nrf2 [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020（6）：431-459.
[23] Zhang X，Fu LJ. The study of salvianolic acid B on the improvement of myocardial fibrosis in diabetic rats by RhoA/ROCK1 pathway [J]. Chinese Pharmacol Bull，2022，38（10）：1487-1491.
[24] 臧慧梅，苏磊，陈家政，等 . 丹酚酸 B 通过 PPARα 抑制 2 型糖尿病小鼠心肌肥厚 [J]. 中国药理学通报，2018，34（1）：97-102.
[25] Raoufi S，Baluchnejadmojarad T，Roghani M，et al. Antidiabetic potential of salvianolic acid B in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes [J]. Pharm Biol，2015，53（12）：1803-1809.
[26] Huang MQ，Zhou CJ，Zhang YP，et al. Salvianolic acid B ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in db/db mice through the AMPK pathway [J]. Cell Physiol Biochem，2016，40（5）：933-943.
[27] Xiang J，Zhang CL，Di TT，et al. Salvianolic acid B alleviates diabetic endothelial and mitochondrial dysfunction by down-regulating apoptosis and mitophagy of endothelial cells [J]. Bioengineered，2022，13（2）：3486-3502.
[28] Shi YN，Pan D，Yan LH，et al. Salvianolic acid B improved insulin resistance through suppression of hepatic ER stress in ob/ob mice [J]. Biochem Biophys Res Commun，2020，526（3）：733-737.
[29] Liu J，Zhang Y，Qu D，et al. Salvianolic acid B ameliorates vascular endothelial dysfunction through influencing a bone morphogenetic protein 4-ROS cycle in diabetic mice [J]. Life Sci，2021，286（1）：120039-120039.
[30] Yuan FY，Zhang M，Xu P，et al. Tanshinone Ⅱ A improves diabetes mellitus via the NF-κB-induced AMPK signal pathway [J]. Exp Ther Med，2018，16（5）：4225-4231.
[31] Li YH，Xu Q，Xu WH，et al. Mechanisms of protection against diabetes-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation by tanshinone Ⅱ A [J]. Biochim Biophys Acta，2015，1850（4）：813-823.
[32] Wu S，Lu DC，Gajendran B，et al. Tanshinone Ⅱ A ameliorates experimental diabetic cardiomyopathy by inhibiting endoplasmic reticulum stress in cardiomyocytes via SIRT1 [J]. Phytother Res，2023，37（8）：3543-3558.
[33] 任陈，李璐，徐艳侠，等 . 丹参酮Ⅱ A 通过 Nrf2 调节 ALDOC 减轻海马神经元放射性损伤的机制 [J]. 实用医学杂志，2019，35（13）：2040-2044.

[34] Xu SJ，He LJ，Ding KK，et al. Tanshinone ⅡA ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy，partly by attenuating PERK pathway-induced fibrosis [J]. Drug Des Devel Ther，2020，14（57）：73-82.
[35] 岳薇薇，阿克拜尔·乌普，王卫群 . 丹参酮ⅡA 磺酸钠联合达格列净对糖尿病大鼠肾损伤的改善作用及其机制研究 [J]. 中南药学，2020，18（12）：1966-1971.
[36] Wang N，Dong XJ，Shi DD，et al. Cryptotanshinone ameliorates placental oxidative stress and inflammation in mice with gestational diabetes mellitus [J]. Arch Pharm Res，2020，43（7）：755-764.
[37] 王娜梅 . 隐丹参酮对多囊卵巢综合征大鼠糖脂代谢及性激素的影响 [J]. 中国妇幼保健，2015，30（20）：3490-3493.
[38] Huang YG，Li W，Wang CC，et al. Cryptotanshinone reverses ovarian insulin resistance in mice through activation of insulin signaling and the regulation of glucose transporters and hormone synthesizing enzymes [J]. Fertil Steril，2014，102（2）：589-596.
[39] Wei Y，Gao JQ，Qin LL，et al. Tanshinone I alleviates insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats through IRS-1 pathway [J]. Biomed Pharmacother，2017，93（35）：2-8.
[40] Hsieh SK，Lin NH，Chen YJ，et al. Therapeutic effects of lithospermate B complexed with Mg^{2+} or Zn^{2+} on metabolic syndrome induced in rats fed with high-fat diet [J]. Molecules，2020，25（4）：120-127.
[41] 李春梅 . 丹参、川芎提取物对高脂喂养去卵巢大鼠血脂和骨的作用及机制研究 [D]. 广州：华南理工大学，2013.
[42] Ko M，Oh GT，Park J，et al. Extract of high hydrostatic pressure-treated danshen（Salvia miltiorrhiza）ameliorates atherosclerosis via autophagy induction [J]. BMB Rep，2020，53（12）：652-657.
[43] Zeng ZH，He W，Jia Z，et al. Lycopene improves insulin sensitivity through Inhibition of STAT3/Srebp-1c-mediated lipid accumulation and inflammation in mice fed a high-fat diet [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes，2017，125（9）：610-617.
[44] Chen J，Yue J，Liu J，et al. Salvianolic acids improve liver lipid metabolism in ovariectomized rats via blocking STAT-3/SREBP1 signaling [J]. Chin J Nat Med，2018，16（11）：838-845.
[45] Ma QX，Yang QQ，Chen JJ，et al. Salvianolic acid A ameliorates early-stage atherosclerosis development by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in zucker diabetic fatty rats [J]. Molecules，2020，25（5）：1089-1094.
[46] Ding CC，Zhao Y，Shi X，et al. New insights into salvianolic acid A action：regulation of the TXNIP/NLRP3 and TXNIP/ChREBP pathways ameliorates HFD-induced NAFLD in rats [J]. Sci Rep，2016，6（28）：73-74.
[47] 赵芳卿，杨雯雯，殷玉杰，等 . 丹酚酸 A 激活 AMPK 及 SIRT1 减轻棕榈酸诱导的肝细胞脂毒性 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2021，26（3）：241-249.
[48] Wang XF，Sun XJ，Abulizi A，et al. Effects of salvianolic acid A on intestinal microbiota and lipid metabolism disorders in Zucker diabetic fatty rats [J]. Diabetol Metab Syndr，2022，14（1）：135-138.
[49] Lai JF，Qian QY，Ding QC，et al. Activation of AMP-activated protein kinase-sirtuin 1 pathway contributes to salvianolic acid A-induced browning of white adipose tissue in high-fat diet fed male mice [J]. Front Pharmacol，2021，28：12.
[50] 童晓东，方小云，彭敏 . 多指标综合评价法优选慢前康颗粒剂的提取工艺 [J]. 湖北中医药大学学报，2022，24（1）：49-53.
[51] Zhang YF，Ding J，Du M，et al. Effects of salvianolic acid B on atherosclerosis and efferocytosis of macrophages of mice and their mechanisms [J]. J Jilin Univ Med Ed，2022，48（3）：561-567.
[52] Zhang YF，Han XH，Liu P. Salvianolic acid B reduces liver inflammation in mice with atherosclerosis by inhibiting MAPKs/NF-kappaB signaling pathway [J]. Chinese Pharmacol Bull，2022，38（4）：525-530.
[53] Li YP，Wang CY，Shang HT，et al. A high-throughput and untargeted lipidomics approach reveals new mechanistic insight and the effects of salvianolic acid B on the metabolic profiles in coronary heart disease rats using ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry [J]. RSC Adv，2020，10（29）：17101-17113.
[54] Lin SH，Huang KJ，Weng CF，et al. Exploration of natural product ingredients as inhibitors of human HMG-CoA reductase through structure-based virtual screening [J]. Drug Des Devel Ther，2015，9（33）：13-24.
[55] Wu CT，Deng JS，Huang WC，et al. Salvianolic acid C against acetaminophen-induced acute liver injury by Attenuating inflammation，oxidative stress，and apoptosis through inhibition of the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling [J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019（90）：56-63.
[56] Park YK，Obiang-Obounou BW，Lee J，et al. Anti-adipogenic effects on 3T3-L1 cells and zebrafish by tanshinone ⅡA [J]. Int J Mol Sci，2017，18（10）：245-251.
[57] Jia LQ，Song N，Yang GL，et al. Effects of tanshinone ⅡA on the modulation of miR-33a and the SREBP-2/Pcsk9 signaling pathway in hyperlipidemic rats [J]. Mol Med Rep，2016，13（6）：4627-4635.
[58] Huang L，Ding W，Wang MQ，et al. Tanshinone ⅡA ameliorates non-alcoholic fatty liver disease through targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma and toll-like receptor 4 [J]. J Int Med Res，2019，47（10）：5239-5255.
[59] Wang JY，He XY，Chen WN，et al. Tanshinone ⅡA protects mice against atherosclerotic injury by activating the TGF-β/PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. Coron Artery Dis，2020，31（4）：385-392.
[60] Wang ND，Zhang XF，Ma Z，et al. Combination of tanshinone ⅡA and astragaloside Ⅳ attenuate atherosclerotic plaque vulnerability in $ApoE^{-/-}$ mice by activating PI3K/AKT signaling and suppressing TRL4/NF-κB signaling [J]. Biomed Pharmacother，2020，123（10）：97-103.
[61] Jung DY，Kim JH，Jung MH. Anti-obesity effects of tanshinone I from Salvia miltiorrhiza Bunge in mice fed a high-fat diet through inhibition of early adipogenesis [J]. Nutrients，2020，12（5）：41-49.
[62] Rahman N，Jeon M，Song HY，et al. Cryptotanshinone，

a compound of Salvia miltiorrhiza inhibits pre-adipocytes differentiation by regulation of adipogenesis-related genes expression via STAT3 signaling [J]. Phytomedicine，2016，23（1）：58-67.

[63] Imran KM，Rahman N，Yoon D，et al. Cryptotanshinone promotes commitment to the brown adipocyte lineage and mitochondrial biogenesis in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells via AMPK and p38-MAPK signaling [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids，2017，1862（10 Pt A）：1110-1120.

[64] Yang YY，Li XY，Peng LY，et al. Tanshindiol C inhibits oxidized low-density lipoprotein induced macrophage foam cell formation via a peroxiredoxin 1 dependent pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2018，1864（3）：882-890.

[65] Huang WC，Liao KY，Hsieh SK，et al. Magnesium lithospermate B supplementation improved prenatal Bisphenol A exposure-induced metabolic abnormalities in male offspring [J]. Environ Toxicol，2021，36（9）：1932-1943.

（收稿日期：2023-08-23；修回日期：2023-10-24）

外用药物制剂体外释放试验技术要求概况

殷连珍[1]，李慧敏[2*]，苏梅[1]，肖群[1]，潘宪伟[1*]（1. 江苏柯菲平医药股份有限公司，南京　210016；2. 南京正大天晴制药有限公司，南京　210046）

摘要：外用药物制剂具有复杂的药物递送途径，通常局部起效，辅料成分复杂，处方组成和制备工艺参数的微小差异就有可能导致产品的质量特性不同，从而影响药物的安全性和有效性。体外释放试验（IVRT）可用于表征一个产品批次的稳态药物释放速率，表征某些工艺、配方和/或生产的变更对药品的影响，在某些情况下，可用于论证产品批量放大或上市后变更的等效性。尽管 IVRT 不能模拟体内性能情况，但其仍是一项关键质量属性，应订入产品放行和货架期质量标准。本文参考国内外相关技术指导原则及文献，对皮肤外用制剂的 IVRT 研究技术要求概况进行综述，以期为业内人士提供参考。

关键词：外用药物制剂；经皮给药；体外释放试验；一致性评价

中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0741-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.028

Technical requirements of in vitro release test studies for topical drug products

YIN Lian-zhen[1], LI Hui-min[2*], SU Mei[1], XIAO Qun[1], PAN Xian-wei[1*] (1. *Jiangsu Carephar Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing* 210016; 2. *Nanjing Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing* 210046)

Abstract: Due to the complex delivery of topical drug products, involving local action, and complexity of certain formulations, small differences in prescription compositions and preparation parameters may lead to different quality characteristics of products, thus affecting the safety and effectiveness of drugs. In vitro release test (IVRT) can be used to characterize the steady-state drug release rate of a product batch, and the influence of certain processes, formulations, and/or manufacturing changes on a drug product. Comparing the steady-state drug release rate of the postchange (test) and prechange (reference) products, typically in the context of scale-up or post-

作者简介：殷连珍，女，高级工程师，主要从事药物新剂型及新技术的研究，email：yinlianzhen@kfpyy.com　*通信作者：李慧敏，女，工程师，主要从事药物研发及质量控制研究，email：huiminli1129@126.com；潘宪伟，男，高级工程师，主要从事药物研发分析及质量控制研究，email：qimeng_8@126.com

approval changes for an approved drug product, helps demonstrate equivalence of drugs in certain situations. Though IVRT does not simulate the in vivo performance, as a critical quality attribute, the release rate should be specified in the approval of finished products and shelf life specification, unless otherwise justified. This paper reviews the technical requirements of IVRT studies of topical drug products by referring to relevant technical guidelines and literatures.

Key words: topical drug product; transdermal drug delivery; in vitro release test (IVRT); consistency evaluation

外用药物制剂相较于口服、注射剂等给药方式具有许多优势：① 避免肝脏的首过效应；② 药物吸收不受胃肠道内 pH 值、食物及其他药物等因素的影响；③ 具有控释效果；④ 维持恒定的有效血药浓度，避免因吸收过快导致血药浓度过高引起不良反应；⑤ 给药方便，安全性高，患者顺应性好 [1]。已成为现代医学中重要的组成部分，同时具有较好的发展前景。

外用药物制剂是一类发挥局部或全身治疗作用的制剂，剂型包括软膏剂、乳膏剂、凝胶剂、散剂、乳剂、糊剂、混悬剂、喷雾剂、气雾剂、溶液和其他半固体和 / 或液体剂型 [2-3]。其中，乳膏剂、软膏剂及凝胶剂处方组成复杂，多为半固体制剂，涉及油相、水相及油包水 / 水包油等热力学不稳定体系，使用多种不同性质的辅料（油相、水相、表面活性剂、矫味剂、清凉剂、抑菌剂等）。相对于传统的注射剂和片剂等，其制备和稳定性过程中的动力学和热力学影响因素众多，在设计、制造、储存和运输等多个环节均存在较大的挑战。

对于该类制剂，药物在体外释放的速率和程度是其性能的综合体现，主要用于产品的药学质量控制，也可用于药品开发过程中处方工艺的筛选研究。虽然不能根据体外释放试验（IVRT）释放速率的差异预测药物在体内的生物利用度的变化 [4]，但其具有潜在反应制剂中药物生物学特性变化的能力，而这种特性的变化可能与以下因素有关，如处方中的活性或非活性组分、制剂的物理化学特性、生产工艺的变更、运输和储存条件、产品的放置时间长短和其他对终产品质量特性具有关键作用的因素等 [5]。

基于制剂的定性（Q1）、定量（Q2）以及物理化学和结构特性（Q3），Shah 等 [6] 于 2015 年提出了外用药物分类系统（TCS），该系统将皮肤外用制剂分为 4 类。如果仿制药和参比制剂（RLD）之间的 Q1、Q2 和 Q3 都相同，则仿制药可能实现生物等效性豁免（TCS 1 类）。在 TCS 理念中，某些辅料可能在药物传递、发挥作用和随之产生的疗效中起到积极作用。但总体来看，许多辅料是惰性的。如果仿制药和参比制剂之间 Q1、Q2 不同，但在充分评估辅料的安全性和功效后，可进行 IVRT 评价，若仿制药和参比制剂一致，则可以实现生物等效性豁免（TCS 3 类）。

欧洲药品管理局（EMA）允许通过证明 Q3 及 IVRT 的等效性，用于支持单相的溶液剂、凝胶剂、软膏剂等简单的配方制剂与参比制剂相比的治疗等效性，以代替等效性临床试验 [7]。美国食品药品监督管理局（FDA）要求，对于外用半固体制剂，如果仿制药的 Q3 与对照标准制剂相同，仅需提供有限的其他证据（如体外、in silico 和 / 或体内），即可支持生物等效性论证 [8]，如根据 2022 年 10 月之后 FDA 更新的特定药品指南，在 Q1、Q2 和 Q3 一致的基础上，阿达帕林凝胶 [9]、乳酸铵乳膏 [10]、盐酸布替萘芬乳膏 [11]、磷酸克林霉素凝胶 [12] 和酒石酸溴莫尼定凝胶 [13] 等仅需要论证 IVRT 等效，即可豁免临床等效性研究。日本医药食品局（PMDA）可通过 IVRT 研究对已上市半固体制剂和贴剂的 B 水平处方变更进行论证 [14-15]。

综上可知，IVRT 研究在外用药物制剂处方开发、生物等效性论证以及上市后变更中的重要性，因此对 IVRT 研究进行合理设计，确保其结果准确可靠十分重要。虽然 FDA、EMA 和 PMDA 均有发布关于 IVRT 研究的相关指南，但目前国内暂无统一的技术要求规范，且各国技术要求亦不统一，因此本文对 IVRT 研究相关技术要求概况进行总结，期望为业内人士提供参考。

1 国内外政策法规

2018 年国家药品监督管理局药品审评中心（CDE）发布的《新注册分类的皮肤外用仿制药的技术评价要求（征求意见稿）》提出可参照 FDA SUPAC-SS 指南 [16] 进行 IVRT 研究 [17]，但在 2021

年发布的《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）》中，建议参考 FDA、EMA 和 PMDA 相关指导原则开展相关研究工作。

1997 年 FDA 发布 SUPAC-SS 指南中首次对 IVRT 研究的相关参数及数据统计进行了阐述，包括上样量（300 mg）、上样方式（闭环）、接收介质（水性缓冲液或水醇混合溶液）、合成膜、试验时长和取样点（至少 5 个取样点）等。2016 年发布的《阿昔洛韦指南草案》[18] 是第一份关于 IVRT 方法验证及接受标准的指南，但其部分参数（如线性与范围、专属性）的接受标准相对 2022 年 10 月 FDA 发布 IVRT 指南 [3] 较为宽松，目前已被 FDA IVRT 指南替代。2022 年 5 月美国药典（USP）发布的《PF 48（3）＜ 1724 ＞ Semisolid drug products-performance tests》（以下简称 USP ＜ 1724 ＞）是现有国内外药典或指南中对 IVRT 的研究设计最为全面的法规指南 [4]，而 FDA IVRT 指南是专门阐述 IVRT 方法验证的相关指南。

2010 年 PMDA 发布的《皮肤局部适用制剂（半固体制剂和贴剂）处方变更生物等效性研究指南》中对 IVRT 的研究设计和数据统计进行了阐述，但未说明 IVRT 各参数的可接受标准，亦未对方法验证内容进行说明 [14]。

2018 年 EMA 发布的《外用制剂质量和等效性指南草案》中亦对 IVRT 研究设计的相关参数进行了阐述，但未明确膜惰性的可接受标准、接收介质的组成，且在方法验证模块仅要求对区分力、精密度和耐用性进行评估 [7]。

USP、FDA、EMA 和 PMDA 对 IVRT 研究设计的技术要点如表 1 所示。

表 1　USP、FDA、EMA 及 PMDA 对外用半固体制剂 IVRT 试验的技术要求

Tab 1　Technical requirements of IVRT of topical drug products by USP，FDA，EMA and PMDA

机构	设备	膜	分析方法	上样量及上样方式	接收介质	试验时长和取样	重复次数	膜温度
USP 和 FDA	立式扩散池、浸没池	合成膜（如混合纤维素酯膜、尼龙膜、聚丙烯膜、聚醚砜膜），不允许采用生物膜或模拟生物膜开发的合成膜；惰性（回收率 95% ～ 105%）	高效液相色谱仪，采用多点校正曲线法（6 ～ 8 个）	伪无限剂量（通常大于 300 mg，剂量消耗低于 30%）、闭环上样	水和醇或有机溶剂混合液，要求药物在接收介质中的溶解度应超过 IVRT 研究中最高样品浓度，理想情况下是一个数量级；同时需证明，采用 150% 规格的配方制剂，也可达到稳态药物释放	试验时长通常为 4 ～ 6 h，每小时至少取样一次（至少 5 个取样点）；实际采样时间应在预定采样时间的 ±15 min 或 ±2%，取较窄的时间误差范围	第一阶段 6 个剂量单位；第二阶段 12 个剂量单位	（32±1）℃ [内用制剂为（37±1）℃，如直肠和阴道用品]
EMA	扩散池	不应限制活性成分释放，不与活性成分结合	/	伪无限剂量，确保上样量在目标上样的 ±5%	接收介质中活性物质的最大浓度不应超过在该接收介质中活性物质最大溶解度的 30%；应尽量减少接收介质的反向扩散，以避免药物产品的转化。在整个释放测试期间，应使接收介质的 pH 值保持恒定	试验时长应足以表征释放曲线，理想情况下，释放量至少为活性物质的 70%。在药物释放曲线的线性部分至少选取 6 个时间点，包括扩散达到稳态后的第一个取样时间点	在首次进行方法验证或等效性评估时，最少需要 12 个剂量单位。放行检测时每个批次至少 6 个剂量单位	（32±1）℃
PMDA	浆碟法，扩散池法	非匀速渗透	/	根据释放和渗透的药物量变化率确定	pH 值 5 ～ 7 的缓冲液（离子强度约为 0.05）；如果 24 h 的平均释放量小于 20%，可以改变离子强度，如添加表面活性剂、改变 pH。在不影响制剂形变的情况下，可以采用水和醇或有机溶剂混合液	试验时长应确保标准制剂的释放曲线达到平台期或释放量超过 70%，但最长应不超过 24 h；从试验结束时间点回溯 4 个取样点，即包括最终取样时间点在内的至少 5 个取样点，取样时间点的个数应足以表征释放曲线	至少 12 个剂量单位	（32±0.5）℃

2　研究设计

2.1　设备

在 IVRT 研究中，可用的设备包括立式扩散池（VDC）、浸没池、USP 装置 4（流通池）、

USP 装置 5（浆碟法）和浆式提取法 [19]。其中，USP ＜ 1724 ＞收载 3 种型号的 VDC 和 2 种型号的浸没池，PMDA 可以采用 VDC 和浆碟法进行试验，EMA 则没有明确说明。

采用浆碟法时，不需要使用膜，因此需评估配方制剂溶解于接收介质的可能性 [20]。浆式提取法是将欧洲药典（Ph.Eur）通则 2.9.4 中的提取池 [21] 与 USP 装置 2 组合使用（见图 1）。虽然，也可以采用浸没池和流通池，目前国内外最常用的设备仍是 VDC。

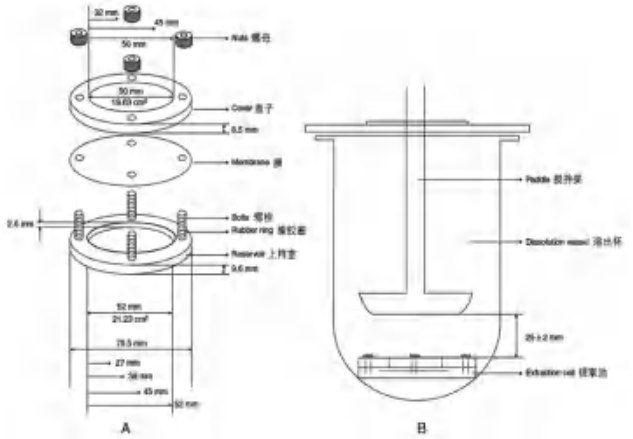


图 1 提取池（A）及 USP 装置 2（B）组合使用

Fig 1 Extraction cell（A）assembled in USP apparatus 2

对于 VDC，应根据实验室的风险承受能力和生产商的建议，在 6 ～ 12 个月的周期内对其进行再确认，确认内容包括但不限于：① 确认供给室和接收室的孔口直径在规定值的 ±5%；② 将所有组件组装后测定接收室的体积（精确到 0.01 mL），在实际计算过程中，采用测定的体积替代标称体积；③ 温度达到平衡后，确认膜表面温度的稳定性（在目标温度的 ±1 ℃）；④ 搅拌速率（通常在 400 ～ 600 r • min $^{-1}$）。

在研究期间，应监控和报告实验室环境的温度和湿度。如适用，建议将温度控制在（21±2）℃、湿度控制在（50%±20%），避免将设备置于空调的通风口之下及暴露在直射阳光中。工作台要保持水平，建议倾斜度≤ 1° [22]。

2.2 合成膜

除浆碟法和浆式提取法外，其他类型的扩散池都需要采用一种膜来防止接收介质的搅拌对样品的机械扰动。在 IVRT 研究中，应选择具有适当的惰性和商业化的人工膜（如聚丙烯膜、聚醚砜膜、醋酸纤维素 / 尼龙混合酯膜、聚四氟乙烯膜、尼龙膜、聚砜膜等），但不宜采用生物膜或模拟生物膜开发的合成膜，因为这些膜可能会不恰当地影响药物释放的表观速率 [4，16]。

EMA 要求膜不应限制活性成分释放，PMDA 要求膜呈非匀速渗透。通常情况下，商业化的合成膜有不同的厚度、孔径和物理性质，在 IVRT 研究中常用的膜厚度为 70 μm、孔径为 0.45 μm。对于脂溶性药物和亲脂性基质，可采用较大孔径的膜（如 1.2 μm），此外可能还需要将膜预先在适当的溶剂（如肉豆蔻酸异丙酯）中浸泡，以赋予膜亲脂性，提高药物从亲脂性基质中扩散的速率。

纤维素膜在制造时通常会添加增塑剂（如甘油），以保持膜的柔软性，使用前需去除增塑剂，如可在接收介质中浸泡 30 min[23]。在测试亲脂性基质的软膏时，使用预先浸泡的膜可以确保恒定的体外测试条件。此外，接收介质和配方制剂不应影响膜的物理完整性，Realdon 等 [24] 使用不同类型的软膏，在进行 IVRT 研究期间和之后采用“气泡点（bubble point）”测试来评估膜的完整性，这个测试也可以帮助决定是否需要对膜进行浸泡处理。

膜的非匀速渗透，可通过采用不同规格制剂（如 50%、100% 和 150% 规格）获得不同的释放速率进行评估。对于 FDA 和 EMA 要求的惰性（不与活性成分结合）评估方法为：① 在 IVRT 的整个研究期间，将膜放置到相应温度的接收液中进行孵化 [如采用接收介质配制成待分析物的预期最高和最低浓度水平，在（32±1）℃下放置 6 h]，至少重复测定 3 份；② 在相同条件下，同步考察 3 份不加膜的对照溶液，评估与膜吸附无关的药物损失；③ 实验结束时，如果接收液中药物的回收率在（100±5）%，可认为在该条件下膜是惰性的。

综上所述，在合成膜的选择过程中，应选择具有适当惰性和商业化的人工膜，不宜采用生物膜或模拟生物膜开发的合成膜。在方法开发过程中，应确定合成膜的种类（包括孔径大小、厚度、材质）、是否需要进行浸泡处理（如需浸泡处理，需确定浸泡介质和浸泡时间），同时需对膜的惰性和非匀速渗透情况进行评估。此外，部分膜有正反面，在试验过程中，应根据厂家说明书使用。

2.3 样品分析方法

通常，IVRT 样品分析方法可基于成品的含量测定方法建立，但应确保所用的分析方法具有适当的灵敏度，以便定量测定从半固体制剂释放到接收介质中低浓度水平的药物量。建议将接收液的选择作为样品分析方法开发的初始步骤，其优点是：在使用接收液对不同膜评估前，可先采

用选定的接收液对样品分析方法进行优化。此外应对方法的专属性进行评估，以确认从制剂和/或膜中浸出的其他物质不干扰药物的定量测定；同时，应对样品在最高相关温度的接收液中放置的最长时间进行评估。

根据 FDA IVRT 指南和 USP ＜ 1724 ＞，应采用多点校正曲线法（6 ～ 8 个）进行测定。

2.4　IVRT 方法开发

2.4.1　上样量及上样方式　FDA SUPAC-SS 指南 [16] 建议上样量为 300 mg，在上样过程中为防止样品挥发，供给室应保持封闭状态。USP ＜ 1724 ＞要求拟定的上样量应确保剂量损耗不会影响试验期间的稳态药物释放动力学，正如 FDA IVRT 指南所述，虽然一些外用制剂在剂量消耗大于 30% 时也能持续观察到稳态释放动力学，但通常稳态释放动力学应假定剂量消耗低于 30%。EMA 为伪无限上样，但应确保实际上样量在拟定上样量的 ±5%。PMDA 要求根据释放和渗透的药物量确定。

因此，通常建议上样量在 300 mg 以上，以避免过量的剂量消耗，或因上样量过低导致上样难度的增加（如需将上样量控制在 ±5%）以及对检测方法的重复性、灵敏度造成挑战。此外，EMA 要求释放量至少为标示量的 70%，PMDA 要求至少为 70% 或达到平台期，因此上样量亦不能过高，以免整个试验时间过长。

除上述要求外，在上样过程中应尽量减少和控制剪切应力，采用相同的上样方式（如直接从管中挤出到膜上、用抹刀转移后涂覆到膜上、用外置活塞式移液器或一次性采集器转移后分配）将药物均匀地涂覆到膜上，制成紧凑的圆柱形，且在上样过程中应避免膜与样品之间产生气泡。

综上所述，在 IVRT 方法开发过程中，应根据样品特性的不同对不同的上样方式进行评估，确保上样的均匀性和一致性，并根据稳定药物释放动力学、释放量、试验时长以及方法的灵敏度和重复性等要求综合考虑确定样品的上样量。

2.4.2　接收介质　Proniuk 等 [25] 分别采用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液（pH 7.4 PBS）、肉豆蔻酸异丙酯为接收介质，用肉豆蔻酸异丙酯对膜进行浸泡，以及采用 pH 7.4 PBS 为接收介质并用 pH 7.4 PBS 对膜进行浸泡的三种方法，进行 IVRT 试验，对两种相似的酮洛芬水凝胶处方（分别含有乙氧基二甘醇和丙二醇）的释放速率进行评估。结果表明，在产品开发早期进行处方筛选时，只有当接收介质具有与人体皮肤相似的特性时，IVRT 才有助于预测可供吸收的药物量，说明接收介质选择的重要性。

pH 是接收介质选择时需要考虑的一个重要因素，其选择应基于配方制剂的 pH、原料药在不同 pH 条件下的溶解度以及药物作用部位的 pH，通常情况下，皮肤的 pH 在 5 ～ 6[20，26]。

虽然希望接收介质具有与皮肤相似的生理状态，但也必须确保其能够准确测量药物的释放，而选择接收介质的最重要因素是药物在其中的溶解度，即在半固体制剂的药物释放过程中，接收介质应可以提供合适的漏槽条件。

EMA 指南 [7] 中未明确说明接收介质的组成，但要求在整个试验期间，接收介质中活性物质的最大浓度不应超过在该接收介质中活性物质最大溶解度的 30%。同时要求，应尽量减少接收介质的反向扩散，以避免药物产品的转化，且在整个释放测试期间，应使接收介质的 pH 值保持恒定。

PMDA 要求采用 pH 值在 5 ～ 7 的缓冲液（离子强度约为 0.05）作为接收介质，但当采用标准制剂进行试验时，如果 24 h 的平均释放量小于 20%，则可改变离子强度，如添加表面活性剂、改变 pH。在不影响制剂形变的情况下，可以采用水、醇或有机溶剂混合液。

FDA IVRT 指南和 USP ＜ 1724 ＞指出接收介质通常为水、醇或有机溶剂混合液，要求药物在接收介质中的溶解度应超过 IVRT 研究中最高样品浓度，理想情况下是一个数量级，同时需要证明在研究期间可达到稳态释放速率。

根据上述分析，在接收介质选择中，可从以下几个方面进行考虑：① 通常可采用水、醇或有机溶剂混合液，但采用该类型的接收介质时，应尽量减少接收介质的反向扩散，以避免药物产品发生形变，如 Kanfer 等 [27] 研究表明乙醇可通过聚合物膜反向渗透导致乳膏制剂的完整性发生改变；② 对于水性缓冲液（pH 值在 5 ～ 7，离子强度约为 0.05），在整个释放测试期间，应使接收介质的 pH 值保持恒定，如释放量较低，可添加表面活性剂、改变 pH；③ 符合漏槽条件；④ 采用标称规格 150% 的配方制剂，也可使其达到稳态释放速率；⑤ 在整个试验期间，药物在接收介质中稳定；⑥ 如适用，需对接收介质进行脱气处理，避免试验期间产生气泡。

2.4.3　设备平衡　在 IVRT 试验开始之前，设备应在预定的试验条件下进行平衡。通常情况下需对接收介质进行脱气处理，以避免在试验前或试验过程中膜下产生气泡。系统温度应保持恒定并

进行良好的控制。根据不同的试验方法，IVRT 膜可以在扩散池组装之前预先用接收介质浸泡，也可以上样前在扩散池内与接收介质原位平衡（如在膜温度为 32 ℃下保持 30 min）。

2.4.4 试验时长和取样 根据 USP ＜ 1724 ＞，试验时长应适合于表征药物的稳态药物释放动力学，这通常是基于 4 ～ 6 h 的持续稳定释放。在第 1 h 获得的数据通常不能代表稳态释放动力学，对于很多 IVRT 方法，稳态释放动力学是根据 1 h 之后的时间点计算的（例如在 2、3、4、5 和 6 h）。至少选取 5 个取样时间点，以获得表征良好的释放率。在稳态释放速率评估中，取样时长至少为 4 h。此外，应精确控制样品的取样时间，将其控制在预定取样时间的 ±15 min 或 ±2%，取较窄的时间间隔范围。FDA SUPAC-SS 指南要求至少进行 5 次取样。在取样后，需要采用预热至系统预定温度的接收介质进行补液，同时需确保，在每次取样和补液后，膜下均无气泡产生。

EMA 要求试验时长应足以表征释放曲线，理想情况下，释放量至少为活性物质的 70%。在药物释放曲线的线性部分至少选取 6 个时间点（每小时至少取样一次），包括药物扩散达到稳态后的第一个取样时间点。PMDA 要求试验时长应确保释放曲线达到平台期或释放量超过 70%，但最长不应超过 24 h。

如上所述，在试验时长和取样时间点方面，各国要求存在差异，其中 FDA 仅要求对稳态释放动力学（即释放曲线的线性部分）进行评估，EMA 除需要对稳态释放动力学进行评估外，还要求在试验结束时释放量至少为 70%，PMDA 与 EMA 要求相似，但相对较为宽松（如释放曲线达到平台期或释放量超过 70% 均可作为释放终点）。

因此，在 IVRT 研究过程中，对于试验时长和取样，通常应满足以下要求：① 在稳态药物释放阶段至少选取 5 个取样点（如申报欧盟，至少选取 6 个时间点），且取样时长不应少于 4 h；② 将样品的取样时间控制在预定取样时间的 ±15 min 或 ±2%，取较窄的时间间隔范围；③ 如适用，释放曲线应达到平台期或释放量超过 70%，但最长时间不应超过 24 h；④ 在取样后，需采用预热至系统预定温度的接受介质进行补液，同时需确保在每次取样和补液后，膜下均无气泡产生。

2.4.5 重复次数 根据 USP ＜ 1724 ＞和 FDA SUPAC-SS 指南，通常采用 6 个剂量单位足以表征该产品的性能（释放速率），但在数据等效性评估中，如不能满足要求，应额外增加 12 个剂量单位进行评估。EMA 要求在首次进行方法验证或等效性评估时，每个批次的样品最少需要 12 个重复，而在日常放行检测中，每个批次采用 6 个剂量单位即可。PMDA 主要用于上市后处方变更的生物等效性评估，要求每个批次至少采用 12 个剂量单位。

2.4.6 膜温度 对于皮肤外用制剂，FDA 和 EMA 均要求控制在（32±1）℃，而 PMDA 要求将温度控制在（32±0.5）℃。对于直肠和阴道等内用产品，温度应控制在（37±1）℃。如适用，实验前用非接触式红外温度计对温度进行测定。

2.5 数据统计分析及一致性评价方法

对于每个扩散池，应测定每个取样点（t_1，t_2，etc）的药物释放量（通常以 μg • cm^{-2} 为单位），并以累计释放量对 $\sqrt{t}$ 作图，在稳态药物释放阶段，两者应呈线性关系（$r^2 \geqslant 0.97$），其斜率为药物释放速率。在 IVRT 研究中，各国均要求对药物释放速率的一致性进行评估。在理想情况下，EMA 和 PMDA 还要求药物的累计释放量大于 70%。下文对 FDA、EMA 和 PMDA 指南中推荐的一致性评价方法进行介绍。

2.5.1 FDA 由于普遍存在测定误差，如气泡和膜缺陷，测定结果常呈非正态分布，推荐采用 Mann-Whitney U 检验计算受试制剂（T）与参比制剂（R）之间斜率比值的 90% 置信区间。通过以下示例说明，采用 6 个剂量单位，分别以 RS 和 TS 代表参比制剂和受试批次的斜率，计算所有 T/R 斜率的比值（共计 36 个），如表 2 所示。

表 2 受试制剂斜率 (TS) 和参比制剂斜率 (RS) 比值

Tab 2 Test slope (TS) and reference slope (RS) ratios

	RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6
TS1	TS1/RS1	TS1/RS2	TS1/RS3	TS1/RS4	TS1/RS5	TS1/RS6
TS2	TS2/RS1	TS2/RS2	TS2/RS3	TS2/RS4	TS2/RS5	TS2/RS6
TS3	TS3/RS1	TS3/RS2	TS3/RS3	TS3/RS4	TS3/RS5	TS3/RS6
TS4	TS4/RS1	TS4/RS2	TS4/RS3	TS4/RS4	TS4/RS5	TS4/RS6
TS5	TS5/RS1	TS5/RS2	TS5/RS3	TS5/RS4	TS5/RS5	TS5/RS6
TS6	TS6/RS1	TS6/RS2	TS6/RS3	TS6/RS4	TS6/RS5	TS6/RS6

在计算出 T/R 斜率比值后，将 36 个 T/R 斜率比值从低至高排序。然后，将第 8 个和第 29 个斜率比值转换为百分单位，分别代表 90% 置信区间的下限和上限，如果两者均在 75% ～ 133.33%，则药物释放速率是等效的。如果置信区间在 75% ～ 133.33% 之外，R 和 T 再各测 12 个剂量单位，与第 1 次实验结果组合，2 组各有 18 个释

放速率，按上述进行置信区间计算，如果第 110 个和第 215 个斜率比值均在 75% ～ 133.33%，可判定药物释放速率是等效的。

2.5.2 EMA　与 FDA 的统计方法相似，采用 12 个剂量单位，计算 R 和 T 各释放速率的比值 TS/RS（共计 144 个），然后对 TS/RS 值进行对数变换，使用 $X \pm t \times s/\sqrt{n}$ 计算置信区间：

其中，X 是计算所得的所有 TS/RS 对数的平均值，n 表示样本量，t 是 $n-1$ 个自由度（t）的 90% 置信区间的 t 值（$n=6$，$t=2.015$；$n=12$，$t=1.796$），s 表示所有对数转换比率的标准偏差。所得结果取反对数，即为置信区间。如果 R 和 T 释放速率几何均值比的 90% 置信区间在 90% ～ 111%，则药物释放速率是等效的。

2.5.3 PMDA　在规定的试验时间或释放曲线达到平台期后的 1 个时间点，以及和该时间点对应的释放速率的一半所对应的时间点，受试制剂与标准制剂的平均释放速率之比应在 0.8 ～ 1.2。此外，PMDA 要求受试制剂释放速率的偏差与标准制剂相比，应相同（可采用 F 检验进行判断）或更小。

3　结语

本文汇总了 FDA、EMA 和 PMDA 等国家关于 IVRT 研究的政策法规，发现目前国内陆续发布了不少外用药物制剂相关研究的技术指南，但尚未有统一的技术规范对 IVRT 的研究进行规定。外用药物制剂本身具有工艺复杂性，在 IVRT 研究中亦有很多技术难点，如合成膜的选择及处理、接收介质的筛选、上样方式的控制等。伴随着我国对外用制剂研究的深入，希望结合上述对 IVRT 研究技术参数的讨论，重点参照 2022 年 USP ＜ 1724 ＞和 FDA IVRT 指南，结合我国实际需要，尽早统一 IVRT 研究技术要求。

参考文献

[1] 韩佳琦，刘哲鹏 . 经皮给药系统的研究进展 [J]. 生物医学工程学进展，2022，43（1）：24-28.

[2] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）[S]. 2021.

[3] FDA. In vitro release test studies for topical drug products submitted in ANDAs [S]. 2022.

[4] USP. General Chapters 1724：semisolid drug products-performance tests [S]. 2022，PF48（3）.

[5] Ghosh TK. Dermal drug delivery from innovation to production [M]. CRC Press，2020.231.

[6] Shah VP，Yacobi A，Rădulescu FŞ，et al. A science based approach to topical drug classification system（TCS）[J]. Int J Pharm，2015，491（1/2）：21-25.

[7] EMA. Draft guideline on quality and equivalence of topical products [S]. 2018.

[8] FDA. Physicochemical and structural（Q3）characterization of topical drug products submitted in ANDAs [S]. 2022.

[9] FDA. Draft guidance on adapalene [S]. 2022.

[10] FDA. Draft guidance on ammonium lactate [S]. 2022.

[11] FDA. Draft guidance on butenafine hydrochloride [S]. 2022.

[12] FDA. Draft guidance on clindamycin phosphae [S]. 2022.

[13] FDA. Draft guidance on brimonidine tartrate [S]. 2022.

[14] PMDA. Guideline on biological equivalence for formulation changes of topical products（semisolid products and patches）[S]. 2010.

[15] PMDA. Guideline on biological equivalence for formulation changes of topical products（semisolid products and patches）：questions and answers [S]. 2010.

[16] FDA. SUPAC-SS：nonsterile semisolid dosage forms；scale-up and post-approval changes：chemistry，manufacturing and controls；in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation [S]. 1997.

[17] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 新注册分类的皮肤外用仿制药的技术评价要求（征求意见稿）[S]. 2018.

[18] FDA. Draft guidance on acyclovir [S]. 2016.

[19] Ghosk TK. Dermal drug delivery from innovation to production [M]. CRC Press，2020：284.

[20] Olejnik A，Goscianska J，Nowak I. Active compounds release from semisolid dosage forms [J]. J Pharm Sci，2012，101（11）：4032-4045.

[21] Ph. Eur. General Chapters 2.9.4：dissolution test for transdermal patches [S]. 2023.

[22] Tiffner KI，Kanfer I，Augustin T，et al. A comprehensive approach to qualify and validate the essential parameters of an in vitro release test（IVRT）method for acyclovir cream，5% [J]. Int J Pharmaceut，2018，535（1-2）：217-227.

[23] 邵鹏，郑金琪，潘芳芳，等 . 外用半固体制剂的体外释放试验和等效性评价 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（20）：2481-2487.

[24] Realdon N，Tagliaboschi A，Perin F，et al. The “bubble point” for validation of drug release or simulated absorption for ointments [J]. Pharmazie，2005，60：910-916.

[25] Proniuk S，Dixon SE，Blanchard J. Investigation of the utility of an in vitro release test for optimizing semisolid dosage forms [J]. Pharm Dev Technol，2001，6（3）：469-476.

[26] Thakker KD，Chern WH. Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms case study [J]. Dissol Technol，2003，10（2）：10-15.

[27] Kanfer I，Rath S，Purazi P，et al. In vitro release testing of semi-solid dosage forms [J]. Dissol Technol，2017，24（3）：52-60.

（收稿日期：2023-08-15；修回日期：2023-09-07）

药物分析与检验

十大功劳叶 UPLC 特征图谱及多指标成分含量测定研究

詹智洪[1, 2]，魏家保[1, 2*]，唐双燕[1, 2]，谢嘉慧[1, 2]，黄凯伟[1, 2]，张辉[1, 2]，谭沛[1, 2]（1. 华润三九现代中药制药有限公司，广东 惠州 516000；2. 华润三九医药股份有限公司，广东 深圳 518000）

摘要：目的 建立十大功劳叶特征图谱，采用相似度、系统聚类分析和主成分因子分析，对不同产地药材质量差异进行对比分析，并评价其质量水平。**方法** 以 Waters CORTECS shield RP 18（100 mm×2.1 mm，1.6 μm）为色谱柱，以乙腈 -0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液为流动相，进行梯度洗脱，柱温为 30 ℃，流速为 0.3 mL • min^{-1}；检测波长为 326 nm，对 15 批十大功劳叶样品进行检测。**结果** 共确定特征峰 10 个，指认了其中 3 个成分为 4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯、绿原酸甲酯和咖啡酸甲酯。15 批样品的相似度在 0.913 ～ 0.987。系统聚类分析结果显示，15 批不同产地药材可聚为 3 类，共提取两大主成分，累积方差贡献率高达 87.842%。15 批药材 4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯含量为 0.015% ～ 0.038%，绿原酸甲酯含量为 0.145% ～ 0.380%，咖啡酸甲酯含量为 0.014% ～ 0.166%，3 种成分总含量为 0.189% ～ 0.575%。**结论** 本试验建立了十大功劳叶特征图谱及多指标成分含量测定方法，可用于鉴别十大功劳叶的真伪以及评估十大功劳叶的质量。

关键词：十大功劳叶；特征图谱；超高效液相色谱法；4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯；绿原酸甲酯；咖啡酸甲酯

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0748-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.029

UPLC characteristic chromatogram and multi-index component content determination of Folium Mahoniae

ZHAN Zhi-hong[1, 2], WEI Jia-bao[1, 2*], TANG Shuang-yan[1, 2], XIE Jia-hui[1, 2], HUANG Kai-wei[1, 2], ZHANG Hui[1, 2], TAN Pei[1, 2] (1. *China Resources Sanjiu Modern Chinese Medicine Pharmaceutical Co., Ltd., Huizhou Guangdong* 516000; 2. *China Resources Sanjiu Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen Guangdong* 518000)

Abstract: Objective To establish the characteristic chromatogram of Folium Mahoniae, and to analyze the quality differences in the medicinal materials from different origins, and evaluate its quality level by the similarity, cluster analysis and principal component factor analysis. **Methods** The chromatography was performed on Waters CORTECS shield RP 18 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) column with acetonitrile-0.05 mol • L^{-1} potassium dihydrogen phosphate solution as the mobile phase. Gradient elution was conducted at a column temperature of 30 ℃ and flow rate of 0.3 mL • min^{-1}. The detection wavelength was 326 nm, and 15 batches of Folium Mahoniae were detected. **Results** Totally 10 characteristic peaks were identified, and 3 components were identified confirmed as methyl 4-*O*-caffeoylquinate, methyl chlorogenate, and methyl caffeate. The similarity of 15 batches sample was between 0.913 ～ 0.987. The results of cluster analysis showed that 15 batches of medicinal materials from different origins were clustered into 3 categories, and the two main components were extracted, with cumulative variance contribution rate reaching

基金项目：深圳市科技计划项目（No. JSGG20191129093418578）。

作者简介：詹智洪，女，主要从事中药饮片及中药配方颗粒研究，email：ZHANZHIHONG@999.com.cn *通信作者：魏家保，男，硕士，主管中药师，主要从事中药饮片及中药配方颗粒研究，email：WEIJIABAO8@999.com.cn

87.842%. The content of methyl 4-*O*-caffeoylquinate in multiple batches of medicinal materials was 0.015% ～ 0.038%, methyl chlorogenate content was 0.145% ～ 0.380%, methyl caffeate content was 0.014% ～ 0.166%, and the total content was 0.189% ～ 0.575%. **Conclusion** The study establishes the characteristic chromatogram and multi-index component content determination method for Folium Mahoniae, which can distinguish the authenticity of Folium Mahoniae and evaluate their quality.

Key words: Folium Mahoniae; characteristic chromatogram; UPLC; methyl 4-*O*-caffeoylquinate; methyl chlorogenate; methyl caffeate

十大功劳叶为小檗科植物阔叶十大功劳 *Mahonia bealei*（Fort.）Carr.，细叶十大功劳 *Mahonia fortunei*（Lindl.）Fedde 或小果十大功劳 *Mahonia bodinieri* Gagnep. 的干燥叶。目前，2020 年版《中国药典》[1]、地方中药材标准 [2-4] 及相关文献 [5-10] 对十大功劳属药材十大功劳叶和十大功劳木（根）特征图谱研究较少，集中于小檗碱、巴马汀和药根碱等生物碱类化学成分的研究，但单一的成分测定不能全面地反映药材的质量。本试验通过超高效液相色谱法对十大功劳叶中的化学物质进行分离与鉴定，建立十大功劳叶特征图谱及多指标成分含量测定方法，从多种特征成分共同监控的角度出发，为其质量控制提供参考依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Thermo Vanquish 超高效液相色谱仪（美国赛默飞公司）；Agilent 1290 超高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；METTLER TOLEDOMS 204 S 万分之一电子分析天平、MS 36 S 十万分之一电子分析天平（瑞士梅特勒公司）；DHG-9240 A 恒温电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；KQ-500 DB 型超声清洗机（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2　试药

甲醇（色谱纯，批号：22065203，Honeywell），乙腈（色谱纯，批号：W9GA1H，Honeywell）。十大功劳叶对照药材（批号：21051，珠海安哲生物科技有限公司）；盐酸小檗碱（批号：110713-202015，纯度：85.90%，中国食品药品检定研究院）；绿原酸甲酯（批号：120232-202207，纯度：99.52%）、咖啡酸甲酯（批号：110044-202108，纯度：98.84%）（上海鸿永生物科技有限公司）；4-*O*-咖啡酰基奎宁酸甲酯（批号：001809-202211，纯度：97.85%，江西佰草源生物科技有限公司）。

1.3　样品

15 批十大功劳叶来源详见表 1，经安徽中医药大学刘守金教授鉴定，均为小檗科植物十大功劳 Folium Mahoniae 的干燥叶。

表 1　十大功劳叶样品信息

Tab 1　Sample information of Folium Mahoniae

编号	批号	产地
S1	2103001Y	四川省巴中市平昌
S2	2103002Y	四川省巴中市平昌
S3	2103003Y	四川省巴中市平昌
S4	2103004Y	贵州省贵阳市辖区
S5	2103005Y	贵州省贵阳市辖区
S6	2103006Y	贵州省贵阳市辖区
S7	2103007Y	云南省昭通市彝良县
S8	2103008Y	云南省昭通市彝良县
S9	2103009Y	云南省昭通市彝良县
S10	2103010Y	广西桂林市兴安县
S11	2103011Y	广西桂林市兴安县
S12	2103012Y	广西桂林市兴安县
S13	2103013Y	江西省萍乡市芦溪县
S14	2103014Y	江西省萍乡市芦溪县
S15	2103015Y	江西省萍乡市芦溪县

2　方法

2.1　色谱条件

以 Waters CORTECS shield RP 18（100 mm×2.1 mm，1.6 μm）为色谱柱，以乙腈为流动相 A，0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 15 min 9%A，15 ～ 30 min 9%A → 17%A）；柱温为 30 ℃，流速为 0.3 mL • min^{-1}；检测波长为 326 nm。理论塔板数按绿原酸甲酯峰计算应不低于 5000。

2.2　对照溶液的制备

取十大功劳叶对照药材 1.0 g，置具塞锥形瓶中，加水 50 mL，加热回流 60 min，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 - 盐酸（100 ∶ 2.5）溶液 10 mL，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，取出，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材溶液。取 4-*O*-咖啡酰基奎宁酸甲酯、绿原酸甲酯、咖啡酸甲酯对照品适量，精密称定，分别加甲醇制成每 1 mL 含 40 μg、160 μg、80 μg 的溶液，作为对照品溶液。

2.3　供试品溶液的制备

取本品粉末（过二号筛）约 0.1 g，精密称

定，精密加入甲醇 - 盐酸（100 ∶ 2.5）的混合溶液 10 mL，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，取出，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 特征图谱的建立及特征峰的定性

将 15 批十大功劳叶试验数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，将各色谱峰匹配，建立特征图谱呈现 10 个共有特征峰，见图 1，选择保留时间适中，峰面积较大，峰形较好的峰 6 作为参照峰（S），计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 ±10%。规定值为：0.32（峰 1）、0.41（峰 2）、0.47（峰 3）、0.61（峰 4）、0.79（峰 5）、1.08（峰 7）、1.20（峰 8）、1.41（峰 9）、1.60（峰 10）。

采用高分辨质谱分析鉴定十大功劳叶中化合物，以负离子模式扫描供试品，二级质谱裂解碎片的离子信息对特征峰进行识别，经对照品比对，确认色谱峰峰 4 为 4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯、峰 6 为绿原酸甲酯、峰 10 为咖啡酸甲酯，各特征峰的鉴定分析数据见表 2。

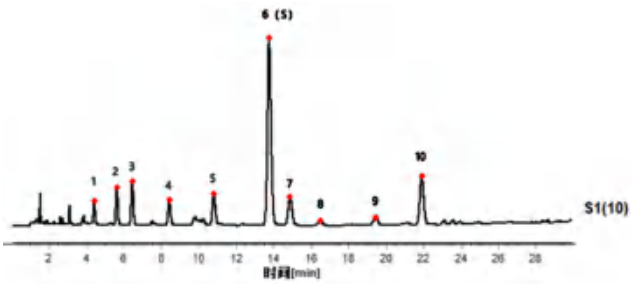


图 1 15 批十大功劳叶的对照特征图谱

Fig 1 Reference characteristic chromatogram of 15 batches of Fulium Mahoniae

表 2 目标成分鉴定结果

Tab 2 Identification of the target ingredient

峰号	加合离子	*m/z* 实际值	*m/z* 理论值	分子式	分子量	名称	MS/MS 数据
1	$[M-H]^-$	367.1031	367.1035	$C_{17}H_{20}O_9$	368.11	/	367.1043；161.0247
2	$[M-H]^-$	399.0935	399.0933	$C_{17}H_{20}O_{11}$	400.10	/	399.0882；367.0664；251.0569；179.0347；161.0239；135.0459；133.0302
3	$[M-H]^-$	399.0953	399.0933	$C_{17}H_{20}O_{11}$	400.10	/	179.0364；161.0254；135.0459；133.0302
4	$[M-H]^-$	367.1027	367.1035	$C_{17}H_{20}O_9$	368.11	4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯	367.1048；161.0247
6	$[M-H]^-$	367.1032	367.1035	$C_{17}H_{20}O_9$	368.11	绿原酸甲酯	367.1020；179.0349；161.0251；135.0452
7	$[M-H]^-$	399.0951	399.0933	$C_{17}H_{20}O_{11}$	400.10	/	399.0940；367.0655；251.0548；161.0242；133.0296
8	$[M-H]^-$	733.1985	733.1985	$C_{34}H_{38}O_{18}$	734.21	/	545.1243；527.1195；501.1373；339.0503；313.0726；229.0125
10	$[M-H]^-$	193.0512	193.0506	$C_{10}H_{10}O_4$	194.06	咖啡酸甲酯	193.0499；161.0246

2.5 色谱条件与系统适用性试验

按照“2.2”和“2.3”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，考察色谱条件的系统适用性，记录色谱图，结果见图 2。供试品色谱方法系统适用性良好，分离度均大于 3.0，理论塔板数在 9000 以上，可以作为十大功劳叶药材特征图谱的检测方法。

2.6 方法学验证

2.6.1 精密度试验 取同一份药材供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次，测定 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积，各特征峰的相对保留时间的 *RSD* 小于 2.0%，相对峰面积的 *RSD* 小于 3.0%，表明仪器的精密度良好。

2.6.2 重复性试验 取同一批号药材供试品 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别测定 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果表明各特征峰的相对保留时间的 *RSD* 值均小于 2.0%，相对峰面积的 *RSD* 值均小于 3.0%，表明该方法的重复性良好。

2.6.3 稳定性试验 取同一批号供试品，按“2.3”项下方法制备后，分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样，测定 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积，各特征峰的相对保留时间小于 2.0%，相对峰面积小于 3.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.4 耐用性考察 不同色谱柱、不同流速和柱温均对色谱峰有一定的影响，建议使用本方法推荐色谱柱，并固定流速和柱温。

2.6.5 线性关系考察 精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 1、2、4、6、8 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容。按“2.1”项下色谱条件进样，记录各指标成分峰面积，以各指标成分的峰面积为纵坐标（*y*），质量浓度为横坐标（*x*），分别绘制标准曲线，计算回归方程，结果见表 3。

2.6.6 加样回收试验 精密称定 9 份已知含量药材粉末，每份 0.05 g，分别按高、中、低浓度加入相当于药材中指标成分量 150%、100%、50% 的 4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯、绿原酸甲酯和咖啡酸甲酯混合对照品溶液适量，每个浓度平行制

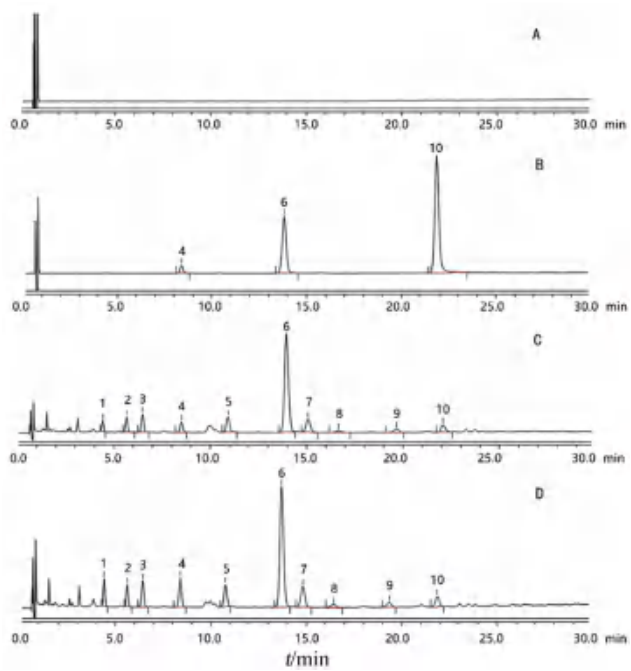


图 2　系统适用性试验

Fig 2　System adaptation experiments

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 对照药材溶液（reference medicinal material solution）；D. 供试品溶液（sample solution）；4. 4-*O*-咖啡酰基奎宁酸甲酯（methyl 4-*O*-caffeoylquinate）；6. 绿原酸甲酯（methyl chlorogenate）；10. 咖啡酸甲酯（methyl caffeate）

备 3 份，连续进样，记录各指标成分峰面积，计算得 4-*O*-咖啡酰基奎宁酸甲酯、绿原酸甲酯、咖啡酸甲酯低、中、高浓度的平均加样回收率分别在 95.05% ～ 98.90%、96.49% ～ 99.30%、95.12% ～ 98.90%，*RSD* 值均小于 2.0%，符合方法学要求。

2.7　15 批十大功劳叶药材特征图谱测定

测定 15 批十大功劳叶的药材特征图谱。结果表明 15 批十大功劳叶药材均呈现 10 个特征峰，各个特征峰相对保留时间均在规定值的 ±10% 之内。15 批十大功劳叶药材共有模式图见图 3。

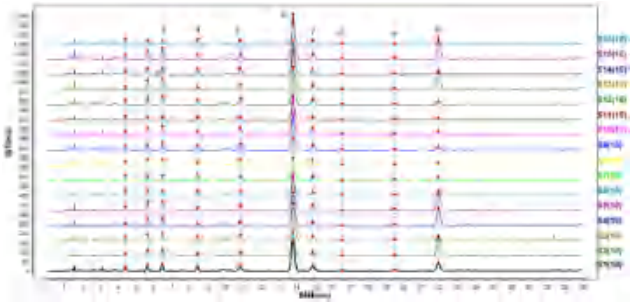


图 3　15 批次十大功劳叶药材共有模式图谱

Fig 3　Common pattern map of 15 batches of Folium Mahoniae

2.8　15 批十大功劳叶药材 3 种成分含量测定

对 15 批十大功劳叶药材中的 4-*O*-咖啡酰基奎宁酸甲酯、绿原酸甲酯、咖啡酸甲酯进行含量测定，结果见表 4。

表 3　3 种成分的线性关系考察结果

Tab 3　Linearity of 3 components

成分	回归方程	R^2	线性范围 /（μg・mL^{-1}）
4-*O*-咖啡酰基奎宁酸甲酯	$y = 239.63x - 10.896$	0.9999	4.20 ～ 42.00
绿原酸甲酯	$y = 5.2634x + 12.229$	0.9999	16.40 ～ 164.00
咖啡酸甲酯	$y = 72.095x + 17.255$	0.9999	8.30 ～ 83.00

2.9　结果分析

2.9.1　相似度评价　将“2.7”项下试验数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，根据软件计算得到各批次与对照图谱的相似度在 0.913 ～ 0.987，见表 5。说明 15 批次样品的在化学成分以及相关的量值上没有明显的差异。

2.9.2　系统聚类分析　采用 SPSS 22.0 软件，以共有峰的峰面积为变量，采用组间联接法、欧氏距离对 15 批十大功劳叶进行聚类分析，结果见图 4。根据聚类分析结果，欧氏距离小于 15 时，15 批十大功劳叶样品可以分为三类：第一类为：S2、S8、S9、S11、S13，第二类为：S5、S6、S7、S10、S15，第三类为：S1、S3、S4、S12、S14。

表 4　15 批十大功劳叶药材含量测定 (%)

Tab 4　Content of 15 batches of Folium Mahoniae (%)

批号	4-*O*-咖啡酰基奎宁酸甲酯含量	绿原酸甲酯含量	咖啡酸甲酯含量	总含量
S1	0.016	0.209	0.149	0.375
S2	0.029	0.314	0.018	0.360
S3	0.015	0.288	0.132	0.436
S4	0.023	0.306	0.148	0.478
S5	0.035	0.145	0.015	0.195
S6	0.038	0.187	0.019	0.244
S7	0.024	0.229	0.017	0.270
S8	0.029	0.244	0.032	0.305
S9	0.032	0.326	0.031	0.389
S10	0.023	0.151	0.014	0.189
S11	0.028	0.312	0.024	0.363
S12	0.016	0.318	0.138	0.472
S13	0.038	0.281	0.023	0.342
S14	0.029	0.380	0.166	0.575
S15	0.034	0.178	0.014	0.226
平均值	0.027	0.258	0.063	0.348

表 5 特征图谱相似度

Tab 5 Similarity of the feature map

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.913	S9	0.987
S2	0.980	S10	0.987
S3	0.973	S11	0.984
S4	0.971	S12	0.979
S5	0.978	S13	0.985
S6	0.983	S14	0.979
S7	0.984	S15	0.981
S8	0.983		

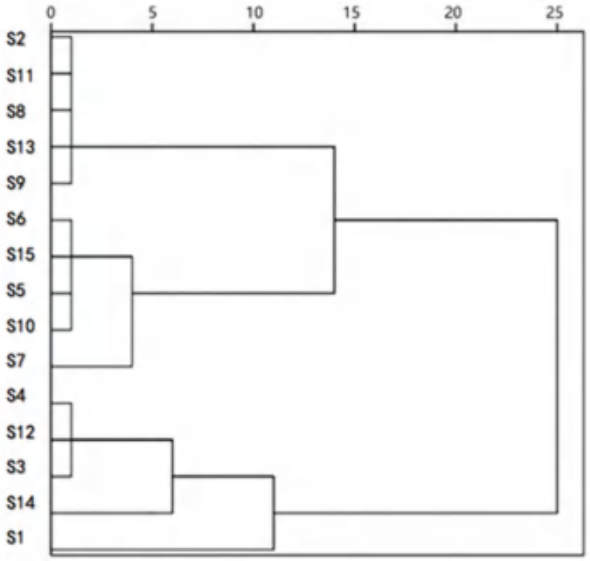


图 4 系统聚类分析结果

Fig 4 Analysis of systematic clustering

2.9.3 主成分分析 采用 SPSS 22.0 软件，以 10 个共有峰的峰面积为变量，进行主成分的分析。根据特征值大于 1 和贡献率达到 85% 以上作为提取原则，提取的主成分 1 的特征值为 5.924，贡献率达到 59.239%，提取的主成分 2 的特征值为 2.860，贡献率达到 28.603%，这两个主成分的贡献率达到了 87.842%。对成分矩阵进行了具有 Kaiser 标准化的正交旋转，得到 10 个指标（峰）在 2 个主成分旋转成分矩阵。成分载荷矩阵的数值及符号代表变量在主成分当中的载荷，载荷越大，表明该化合物在主成分分析中作用越大。峰 5、峰 6、峰 7、峰 8 对主成分 1 的影响力较大，峰 10 对主成分 2 的影响力较大。由图 5 可知，以主成分 1-X 轴为例，峰 5、峰 6、峰 7、峰 8 距离较近，可能归属于同一主成分 1，而主成分 2-Y 轴，峰 10 单独归为 1 类，两者结果一致。

2.9.4 指认物质药理作用 在十大功劳叶特征图谱的建立过程中，发现了 4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯、绿原酸甲酯和咖啡酸甲酯等多酚类化合物。

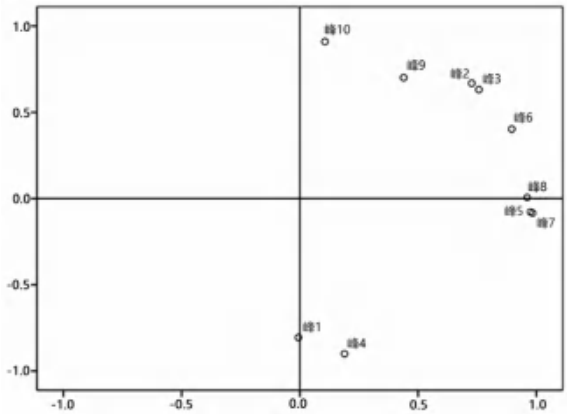


图 5 旋转成分载荷图

Fig 5 Load diagram of rotating components

Kumar 等 [11] 对绿原酸甲酯进行光谱和生物活性分析，发现其为一种良好的天然抗糖尿病剂；Park 等 [12] 发现咖啡酸甲酯通过抑制肥大细胞脱颗粒，显著减弱抗过敏作用；Wang 等 [13] 通过咖啡酸甲酯在微摩尔浓度下可引起宫颈癌细胞凋亡，抑制肿瘤生长现象，发现了其可作为靶向 3- 磷酸甘油酸脱氢酶的潜在抗癌剂；Lee 等 [14] 发现咖啡酸甲酯有助于治疗 2 型糖尿病；Zhao 等 [15] 发现咖啡酸甲酯能显著促进小鼠大肠蠕动，具有通便作用；Lim 等 [16] 发现咖啡酸甲酯能缓解与年龄相关的退行性疾病及慢性低度炎症；Balachandran 等 [17] 发现咖啡酸甲酯具有中等的抗菌活性和突出的抗分歧杆菌活性。该方法新指认的 3 种物质均具有一定的药理作用，可为进一步研究该植物药用价值及资源充分利用提供理论依据。

3 讨论

本试验为十大功劳叶提供了一种用于鉴别和评价的特征图谱方法，发现十大功劳叶中含有 4-*O*- 咖啡酰基奎宁酸甲酯、绿原酸甲酯、咖啡酸甲酯 3 种化学物质，其总含量大于 0.19%。鉴于该 3 种成分所具备的现代药理作用，可为开发十大功劳叶新的治疗使用方向，充分发挥十大功劳叶的药用价值提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：87.

[2] 贵州省药品监督管理局 . 贵州省中药材民族药材质量标准 [M]. 贵阳：贵州科技出版社，2003：7-8.

[3] 贵州省药品监督管理局 . 贵州省中药材质量标准 [M]. 贵阳：贵州科技出版社，1988：1.

[4] 安徽省药品监督管理局 . 安徽省中药材标准 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2019.

[5] 赵丹 . 中药十大功劳叶的质量标准研究 [D]. 蚌埠：蚌埠医学院，2017.

[6] 张文芳，李涛，娄华勇，等 . 小果十大功劳化学成分的研究 [J]. 广西植物，2014，34（4）：500-504.
[7] 洪林，蒲兰，李冰冰，等 . 阔叶十大功劳的化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 贵州农业科学，2019，47（9）：122-125.
[8] 王智，吕芳 . 中国十大功劳属植物化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 中医药学报，2022，50（12）：102-110.
[9] Singh A，Bajpai V，Kumar S，et al. Analysis of isoquinoline alkaloids from Mahonia leschenaultia and Mahonia napaulensis roots using UHPLC-Orbitrap-MS^n and UHPLC-QqQ^{LIT}-MS/MS [J]. J Pharml Anal，2017，7（2）：77-86.
[10] 黄洋 . 高效液相色谱法同时测定功劳木药材中 9 种化学成分含量 [J]. 中国药业，2022，31（4）：79-82.
[11] Kumar AM，Prakash ST. Spectroscopic and bioactivity analysis of naturally occurring methyl ester of chlorogenic acid using density functional theory based quantum chemical computation [J]. Sensor Letters，2019，17（10）：822-825.
[12] Park JY，Lee HJ，Han ET，et al. Caffeic acid methyl ester inhibits mast cell activation through the suppression of MAPKs and NF-κB signaling in RBL-2H3 cells [J]. Heliyon，2023，9（6）：e16529.
[13] Wang YL，Zheng MZ，Jiang QH，et al. Chemical components of the fruits of morus nigra linn.：methyl caffeate as a potential anticancer agent by targeting 3-phosphoglycerate dehydrogenase [J]. J Agric Food Chem，2021，69（42）：12433-12444.
[14] Lee D，Qi YT，Kim R，et al. Methyl caffeate isolated from the flowers of *Prunus persica*（L.）batsch enhances glucose-stimulated insulin secretion [J]. Biomolecules，2021，11（2）：279.
[15] Zhao FQ，Yan YH，Li Ju，et al. Chemical constituents of the seeds of pharbitis purpurea and laxative effect of methyl caffeate on rats [J]. Rec Nat Prod，2021，15（1）：1-9.
[16] Lim H，Park BK，Shin SY，et al. Methyl caffeate and some plant constituents inhibit age-related inflammation：effects on senescence-associated secretory phenotype（SASP）formation [J]. Arch Pharm Res，2017，40（4）：524-535.
[17] Balachandran C，Duraipandiyan V，Al-Dhabi NA，et al. Antimicrobial and antimycobacterial activities of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. fruit [J]. Indian J Microbiol，2012，52（4）：676-687.

（收稿日期：2023-08-31；修回日期：2023-10-31）

舒肝宁注射液的 ^{1}H-NMR 指纹图谱分析

何峰[1]，朱彤彤[2]，韩春月[2]，张昀[3]，杨翠萍[3]，韩立峰[2]，付志飞[2*]（1. 贵州医科大学 药学院，贵阳 550025；2. 天津中医药大学，天津市中药化学与分析重点实验室，天津　301617；3. 贵州瑞和制药有限公司，贵阳　550002）

摘要：目的　对舒肝宁注射液的 ^{1}H-NMR 指纹图谱进行分析，为其质量控制标准技术升级提供参考依据。**方法**　使用 Noesygppr1d 脉冲序列 [recycle delay（RD）-90°-t_1-90°-t_m-90°-ACQ] 采集 ^{1}H-NMR 谱图，质子共振频率为 600.13 MHz，实验温度为 298 K，通过方法学考察验证分析方法可靠性，采用相关系数法和夹角余弦法评价不同批次舒肝宁注射液样品的相似度。**结果**　对舒肝宁注射液的 ^{1}H-NMR 指纹图谱进行分析，共鉴定出 88 种化学成分，且不同批次的舒肝宁注射液具有较高的相似度。**结论**　建立了一种基于 ^{1}H-NMR 的舒肝宁注射液质量控制方法，可为舒肝宁注射液技术升级提供参考依据。

关键词：舒肝宁注射液；^{1}H-NMR；指纹图谱；相似度
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0753-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.030

^{1}H-NMR fingerprint of Shuganning injection

HE Feng[1], ZHU Tong-tong[2], HAN Chun-yue[2], ZHANG Yun[3], YANG Cui-ping[3], HAN Li-feng[2], FU Zhi-fei[2*] (1. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 550025; 2. *Tianjin Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Chemistry and Analysis*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 3 *Guizhou Ruihe Pharmaceutical Co.*, *Guiyang* 550002)

基金项目：贵州省科技计划项目（黔科合成果 [2022] 一般 013、黔科合支撑 [2023] 一般 158）。
作者简介：何峰，男，副教授，主要从事中药质量控制及中药药代动力学研究，email：838396231@ qq.com　*通信作者：付志飞，女，助理研究员，主要从事中药药效物质基础研究，email：fuzhifei@tjutcm.edu.cn

Abstract: Objective To establish ^{1}H-NMR fingerprint of Shuganning injection and to provide reference for its quality control. **Methods** The ^{1}H-NMR spectrum of the sample was collected by Noesygppr1d pulse sequence [recycle delay(RD)-90°-t_1-90°-t_m-90°-ACQ]. The proton resonance frequency was 600.13 MHz and the measurement temperature was 298 K. The methodology was verified. Correlation method and Cosin method were used to evaluate the similarity. **Results** ^{1}H-NMR fingerprint of Shuganning injection was established and 88 compounds were identified. Different batches of Shuganning injection were highly similar. **Conclusion** The ^{1}H-NMR fingerprint of Shuganning is established, which provide some reference for the evaluation of the quality of Shuganning injections.

Key words: Shuganning injection; ^{1}H-NMR; fingerprint; similarity

舒肝宁注射液是由茵陈、栀子、板蓝根、灵芝等药材经特定工艺制备而成[1]，具有清热解毒，利湿退黄，保肝护肝等功效。临床上常用于治疗急慢性病毒性肝炎、高胆红素血症、肝损伤、急性梗阻性化脓性胆管炎等疾病[2-3]。舒肝宁注射液现行的质量控制方法主要采用高效液相色谱（HPLC）技术，建立相应的含量测定及指纹图谱分析方法[4-5]，但 HPLC 往往采用紫外检测器，很难全面表征其化学成分，因此有必要采用现代分析技术，进一步完善其指纹图谱相关研究。

现代分析技术的飞速发展，使得中药化学成分的表征变得更容易，如高效液相色谱 - 质谱联用技术（LC-MS）、核磁共振波谱分析技术（NMR）、近红外光谱分析技术（NIR）等[6]。这些技术都在中药的质量控制中得到广泛的运用，而 NMR 技术因具有无偏向性、不破坏样品、操作简单、易于自动化等特点，非常适合标准品难以获得或成本较高的中药注射剂的质量控制研究[7-8]。

本研究首先采用 NOESYGPPR1D 序列对舒肝宁化学成分进行 ^{1}H-NMR 鉴定，然后建立基于 ^{1}H-NMR 技术的指纹图谱分析方法，通过方法学考察，确认方法准确可靠，最后针对 100 个不同批次的舒肝宁注射液进行 ^{1}H-NMR 指纹图谱分析，计算相似度，为舒肝宁注射液质量控制的技术升级提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

配备有超低温探头的 Bruker Ascend 600 MHz NMR 谱仪（德国 Bruker Biospin 公司），质子共振频率为 600.13 MHz，实验温度为 298 K；AX 205 型十万分之一天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1.2 试药

舒肝宁注射液 [贵州瑞和制药有限公司，批号 20191112、20191113、20191115、20191116、20191210、20191211、20191214 ～ 20191217、20200105 ～ 20200110、20200112、20200113、20200115 ～ 20200118、20200317 ～ 20200326、20200512 ～ 20200515、20200517 ～ 20200522、20200616 ～ 20200619、20200621 ～ 20200624、20200716 ～ 20200723、20200811 ～ 20200814、20200816 ～ 20200820、20200918 ～ 20200926、20201022、20201023、20201025、20201026、20201028 ～ 20201030、20201124 ～ 20201130、20210112 ～ 20210121（分别编号为 S1 ～ S100）]，磷酸二氢钠和磷酸氢二钠（分析纯，国药集团上海有限公司）；重水（D_2O）、三甲基硅基丙酸盐（TSP）(美国剑桥同位素实验室)。

2 方法与结果

2.1 样品配制

精密吸取 450 μL 舒肝宁注射液和 50 μL 磷酸盐缓冲液（0.1 mol • L^{-1}，100% D_2O，0.001% TSP）于离心管中混合，涡旋 30 s，离心 10 min，取上清液 450 μL 转移至 5 mm 核磁管中，NMR 待测[9]。

2.2 样品检测

使用 NOESYGPPR1D 序列 [RD-90°-t_1-90°-t_m-90°-ACQ] 采集 ^{1}H NMR 谱图。参数设置如下：谱宽（*SW*）为 20 ppm，弛豫延迟时间（*D*1）为 2 s，混合时间（t_m）为 100 ms，脉冲延迟时间（t_1）为 4 μs，90° 脉宽为 13.26 μs，采样时间为 1.36 s，采样点数为 32 K，FID 累加次数为 128 次。

2D NMR 包括 ^{1}H-^{1}H COSY，TOCSY，HSQC，HMBC 以及 *J* 分解谱等，参数设置：在 COSY 和 TOCSY 实验中，直接采样维（F2）和间接采样维（F1）的谱宽均为 10.5 ppm，采样点数分别为 2048（F2）和 281（F1），每一条 FID 累加次数为 128。在 TOCSY 实验中，选取 Dipsi 组合脉冲进行自旋锁定，混合时间（t_m）为 120 ms。J 偶合分解谱的采样点数分别为 4096（F2）和 80

（F1），每一条 FID 累加次数为 48。^{1}H-^{13}C 相关谱采用脉冲梯度场选择性的 HSQC 和 HMBC 序列。HSQC 在采样期间使用组合脉冲（GARP）对 ^{13}C 进行去偶，采样点数分别为 2048（F2）和 160（F1），谱宽分别为 10.5 ppm 和 175 ppm，每一条 FID 累加次数为 320。在 HMBC 实验中，采样点数分别为 2048（F2）和 160（F1），谱宽分别为 10.5 ppm 和 220 ppm，每一条 FID 累加次数为 320。数据填零后得到 2048×2048 的数据矩阵，在傅里叶变化前加上适当窗函数对 2D NMR 谱进行处理鉴定舒肝宁中的化合物。

2.3　方法学的考察

2.3.1　稳定性试验　随机选择一个批次的舒肝宁注射液（S71），按“2.1”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、10、12、24 h 进行 ^{1}H NMR 检测，计算特征峰的化学位移和峰面积，及其 *RSD* 值，在不同时间内测得舒肝宁注射液 NMR 指纹图谱中特征峰的峰面积和化学位移值的 *RSD* 值均小于 5%，表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3.2　精密度试验　随机选择一个批次的舒肝宁注射液（S71），按“2.1”项下方法制备供试品溶液，连续采集 6 次 ^{1}H-NMR 谱图，测定特征峰下的化学位移和峰面积，计算其 *RSD* 值，结果 6 次 NMR 指纹图谱中特征峰的峰面积和化学位移值的 *RSD* 值均小于 5%，表明仪器的精密度良好。

2.3.3　重复性试验　随机选择一个批次的舒肝宁注射液（S71），按“2.1”项下方法重复制备 6 份供试品，分别采集 ^{1}H-NMR 谱图，测定特征峰下的化学位移和峰面积，计算其 *RSD* 值，6 份样品测定得到的 ^{1}H-NMR 指纹图谱中，特征峰的峰面积和化学位移值的 *RSD* 值均小于 5%，表明方法的重现性良好。

2.4　不同批次舒肝宁注射液指纹图谱检测

收集 100 个不同批次舒肝宁注射液按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下 ^{1}H-NMR 检测方法采集谱图，结合 ^{1}H-^{1}H COSY、HSQC、HMBC、*J*-RES 等 1D/2D 核磁谱图，数据库（HMDB、SDBD 及 MMCD 等）以及参考文献，从舒肝宁注射液中成功鉴定出 88 种化学成分，具体谱图及结果见图 1 及表 1。100 个批次舒肝宁注射液 NMR 指纹图谱见图 2，采用相关系数和夹角余弦方法计算相似度 [33]，结果见表 2，由图 2 及表 2 可知，不同批次舒肝宁注射液的 ^{1}H-NMR 指纹图谱峰形和化学位移相似度较高，采用相关系数及夹角余弦方法计算，其相似度均在 0.9 以上，表明不同批次舒肝宁注射液相似度良好。

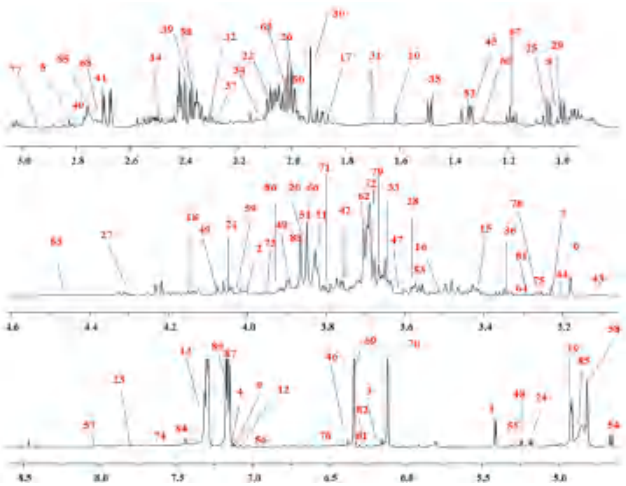


图 1　舒肝宁注射液定性分析 NMR 图谱

Fig 1　^{1}H-NMR signal peak of Shuganning injection

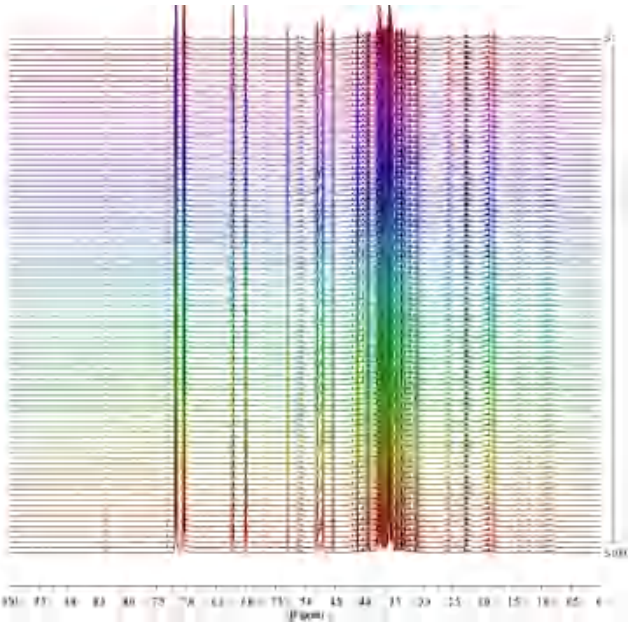


图 2　舒肝宁注射液指纹图谱

Fig 2　Fingerprint of Shuganning injection

2.5　数据处理

2.5.1　^{1}H-NMR 图谱处理　利用 Topspin 软件对所有 ^{1}H-NMR 谱的 FID 信号进行变换、相位和基线校正，使用 TSP（δ 0.00）的信号进行化学位移定标，然后对核磁谱图进行积分（0.5 ～ 9.5），去除水峰信号，每段积分 0.04 单位，对积分后的数据化学位移明显漂移的信号进行校正，利用 Excel 软件分析积分处理后得到的数据。

2.5.2　^{1}H-NMR 图谱的相似度计算　本研究采用余弦相似度作为判断指标，采用夹角余弦值及相关系数公式计算 ^{1}H-NMR 图谱相似度。通过一维 ^{1}H-NMR，二维 ^{1}H-^{1}HCOSY，TOCSY，HSQC，HMBC 以及 *J* 分解谱，与参考文献进行比对，对舒肝宁注射液中的化合物进行鉴定。

表 1 舒肝宁注射液定性分析结果

Tab 1 ^{1}H-NMR signal attribution in Shuganning injection

编号	化合物	δ_H	类别	来源	文献
1	表告依春	3.51（t），3.91（t），5.33（m），5.43（m），5.48（m），5.93（m）	生物碱	板蓝根	[10]
2	胡萝卜苷	4.06（m），4.42（m）	甾体	栀子、灵芝	[11]
3	阿克苷	7.56（d），7.02（d），6.92（dd），6.74（d），6.25（d）	苯丙素	板蓝根、灵芝	[12]
4	角胡麻苷	7.63（d），7.16（s），7.03（d），6.80（d），4.34（d），3.52（m）	苯丙素	灵芝、板蓝根	[12]
5	异地黄苷	6.79（d），6.77（s），5.20（s），2.79（m）	苯丙素	板蓝根	[12]
6	（＋）- 丁香脂素	3.10（m），4.66（d），6.68（m）	苯丙素	板蓝根	[12]
7	羽扇豆醇	3.26（d），0.91（m）	萜	板蓝根	[12]
8	白桦脂醇	1.03（s），1.61（s），3.78（d），4.64（s）	萜	板蓝根	[12]
9	2- 苯并噁唑啉酮	7.08（m），7.13（m）	苯并噁唑啉酮	板蓝根	[12]
10	角鲨烯	1.61（s），1.98 ～ 2.14（m）	萜	灵芝	[12]
11	肌醇	3.02（m），3.70（dd）	维生素	板蓝根、栀子	[13]
12	对羟基苯甲酸	6.82（dd），7.83（dd）	酚酸	板蓝根	[13]
13	尿嘧啶	5.42（d），7.30（d）	核苷	灵芝、板蓝根	[13]
14	琥珀酸	2.51（m）	有机酸	板蓝根、栀子	[14]
15	（＋）- 异落叶松树脂醇	2.75（m），3.38（m），3.40（m），3.69（m），3.71（m）	苯丙素	板蓝根	[10]
16	*β*- 谷甾醇	3.53（m）	萜	栀子、灵芝、板蓝根	[15]
17	棕榈酸	1.81 ～ 2.00（m）	有机酸	茵陈、板蓝根、栀子、灵芝	[16]
18	腺苷	3.57（m），4.17（m），4.55（m），5.92（m）	核苷	灵芝、板蓝根、茵陈	[13]
19	鸟苷	3.89（m），4.14（m），4.98（m）	核苷	灵芝、板蓝根、茵陈	[13]
20	尿苷	3.84（m），3.93（m），5.78（m）	核苷	灵芝、板蓝根、茵陈	[13]
21	丁香苷	3.24（m），4.11（m），4.33（m），4.88（d），6.72（m）	苯丙素	板蓝根	[10]
22	依靛蓝酮	1.90（m），1.91（m），2.11（m），3.33（m）	生物碱	板蓝根	[13]
23	3- 噻吩甲酸	7.80（m），8.00（s）	噻吩	板蓝根	[13]
24	灵芝醇 B	0.89（s），0.98（s），1.00（s），3.25（t），5.34（m）	萜	灵芝	[17]
25	7-oxo-ganoderic acid	0.93（m），0.95（d），1.01（m），6.89（t）	萜	灵芝	[18]
26	fornicin B	1.89（t），2.00（m），5.17（d），6.75（m）	萜	灵芝	[19]
27	胡萝卜苷	0.99（d），4.32（d），4.99（m）	甾体	栀子、灵芝	[20]
28	麦角甾醇	1.00（d），3.56 ～ 3.83（m）	甾体	灵芝	[18]
29	泥湖鞘鞍醇	0.86（m），4.29（t），4.42（m），4.55（dd）	萜	灵芝	[21]
30	异亮氨酸	0.94（t），1.01（d），1.99（m）	氨基酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[22]
31	亮氨酸	0.96（d），0.97（d），1.72（m）	氨基酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[22]
32	缬氨酸	0.99（d），1.04（d），2.27（m），3.61（m）	氨基酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[22]
33	苏氨酸	1.33（d），4.24（m），3.60（d）	氨基酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[22]
34	赖氨酸	1.73（m），1.45（m），1.92（m），3.02（t）	氨基酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[22]
35	丙氨酸	1.48（d），3.78（d）	氨基酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[22]
36	脯氨酸	2.01（m），2.08（m），3.33（m），3.42（m），4.13（dd）	氨基酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[22]
37	*γ*- 氨基丁酸	1.90（q），2.30（m），3.02（m）	氨基酸	灵芝、板蓝根	[14]
38	丙酮酸	2.39（s）	有机酸	灵芝、茵陈、栀子、板蓝根	[23]
39	谷氨酰胺	2.14（m），2.45（m），3.78（dd）	氨基酸	灵芝	[22]
40	二甲胺	2.76（m）	胺类	灵芝	[24]
41	天冬氨酸	2.68（dd），2.82（dd）	氨基酸	板蓝根	[22]
42	天冬酰胺	2.86（dd），2.96（dd），4.01（dd）	氨基酸	茵陈	[22]
43	乙醇胺	3.15（t），3.82（t）	醇胺		[22]
44	胆碱	3.20（s），3.52（m），4.06（m）	有机碱	茵陈、灵芝	[22]
45	壬二酸	1.37（s），1.62（s），2.32（t）	有机酸	茵陈、板蓝根	[25]
46	阿魏酸	6.63（d），6.79（d），7.07（m）	苯丙素	茵陈、板蓝根	[25]
47	dehydroleuodin	2.44（s），3.62（t），5.42（d）	萜	茵陈	[26]
48	路得威蒿内酯 A	3.05（s），3.96（s），5.25（d）	内酯	茵陈	[26]

续表 1

编号	化合物	δ_H	类别	来源	文献
49	异嗪皮啶	3.95（s），4.10（s），6.29（d）	香豆素	茵陈	[26]
50	狭叶墨西哥蒿素	1.27（s），2.00（d），2.80（m），3.91（s），4.92（d）	萜	茵陈	[26]
51	洋李素	3.85（s），3.83（s）	黄酮	茵陈	[27]
52	硬脂酸	1.35（m），2.41（m）	有机酸	栀子、板蓝根	[27]
53	甘氨酸	3.57（s）	氨基酸	板蓝根	[25]
54	*β*- 葡萄糖	3.25（m），3.49（m），3.41（dd），3.90（m），3.75（m），4.65（d）	糖	灵芝	[14]
55	*α*- 葡萄糖	3.53（m），3.70（m），3.83（m），3.41（t），5.24（d）	糖	灵芝	[22]
56	酪氨酸	6.90（d），7.19（d）	氨基酸	板蓝根	[14]
57	肌苷	6.10（d），4.44（dd），4.29（m）	核苷	栀子	[22]
58	7- 去氧栀子新苷	4.99（m），5.06（m），7.46（m）	环烯醚萜	栀子	[28]
59	tarenninoside C	3.89（s），4.67（d），5.66（m）	环烯醚萜	栀子	[28]
60	2'-*O*-coumaroylmussaenosidic acid	1.33（s），3.38（s），3.39（s），3.63（s）	环烯醚萜	栀子	[29]
61	10-*O*-caffeoyl deacetyl daphylloside	3.75（s），6.27（d），6.79（d）	环烯醚萜	栀子	[29]
62	京尼平苷	3.70（s），4.82（d），5.17（d），7.45（s）	环烯醚萜	栀子	[29]
63	7-deoxy-8-epiloganic acid	1.09（d），1.79（m），2.07（m），5.55（m）	环烯醚萜	栀子	[29]
64	secologanoside	3.21（m），3.29（m），5.32（m）	环烯醚萜	栀子	[29]
65	gardenamide A	2.16（m），2.86（m），3.70（s），4.34（dd），4.39（dd）	环烯醚萜	栀子	[29]
66	6'-*O*-*trans*-sinapoyljasminoside B	3.88（s）	萜	栀子	[28]
67	epijasminoside A	1.04（s），1.06（s），1.18（m），1.98（d）	萜	栀子	[29]
68	jasminodiol	1.16（m），2.03（m），2.74（m）	萜	栀子	[29]
69	芥子酸	3.88（s），6.34（s），6.91（s）	有机酸	栀子	[29]
70	咖啡酸	6.22（d），6.78（d），6.93（d），7.50（m）	有机酸	茵陈、栀子	[29]
71	没食子酸甲酯	3.81（s），7.06（m）	有机酸	栀子	[29]
72	C-veratroylglucol	3.74（s），3.92（s），3.89（s）	有机酸	栀子	[29]
73	*β*-hydroxypropiosyringone	3.19（t），3.91（s），3.95（t）	有机酸	栀子	[29]
74	芦丁	5.27（d），6.91（m），7.61（d），7.69（d）	黄酮	茵陈、栀子	[29]
75	glycyrrhisoflavone	3.23（d），5.31（m）	黄酮	栀子	[29]
76	西红花酸	1.91（d），1.98（d），6.50（d），6.83（m）	萜	栀子	[16]
77	栀子苷	2，07（m），2.94（m），3.13（t），3.6 ～ 3.8（m）	环烯醚萜	栀子	[30]
78	甜菜碱	3.27（s），3.91（s）	生物碱	茵陈、灵芝	
79	甘油磷酸胆碱	3.23（s），3.68（m），4.33（m）	胆碱	灵芝	[22]
80	对羟基苯乙酮	2.52（s），6.84（d）	黄酮	茵陈、栀子	[27]
81	金丝桃苷	3.28（m），3.33（m），3.36（m），3.46（m），3.50（m）	黄酮	茵陈、栀子	[31]
82	滨蒿内酯	3.89（s），3.91（s），6.10（s），6.35（s）	香豆素	茵陈、栀子	[26]
83	木香烃内酯	1.46（d），4.58（m），4.74（m）	萜类	栀子	
84	异鼠李素 -4'-*O*-*β*-D- 葡萄糖	3.11 ～ 3.60（m），6.91（d），7.49（dd）	黄酮	茵陈	[27]
85	6*β*- 羟基京尼平苷	3.70（s），4.53（m），4.82（d），5.17（d），7.45（s）	环烯醚萜	栀子	[31]
86	shanzhiside	3.20 ～ 3.50（m），3.65（d），3.89（d），5.52（m）	环烯醚萜	栀子	[11]
87	黄芩苷	6.12（s），6.34（s），7.16（t）	黄酮	黄芩苷原料	[32]
88	绿原酸	2.01（dd），3.86（dd），7.06（dd）	有机酸类	茵陈、栀子	[15]

3　总结与展望

舒肝宁注射液源自东汉张仲景《伤寒论》中的茵陈蒿汤，具有显著的清热解毒，利湿退黄，保肝护肝等功效。目前舒肝宁注射液质量标准仅有性状、薄层鉴别、重金属、pH 以及简单的指标性化合物的含量测定 [2020 年版《中国药典》一部附录]。虽然已有文献根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》，采用 HPLC 方法对舒肝宁注射液的指纹图谱进行研究 [34]，但由于舒肝宁注射液为中药复方制剂，化学成分相对较为复杂，采用 HPLC 方法构建指纹图谱存在一定的局限性，如有些氨基酸、脂肪酸类化

表 2 不同批次舒肝宁注射液 ^{1}H-NMR 指纹图谱相似度计算结果

Tab 2 Calculation of ^{1}H-NMR fingerprint similarity of different batches of Shuganning injection

样品编号	相似度平均数		相似度中位数		样品编号	相似度平均数		相似度中位数	
	相关系数法	夹角余弦法	相关系数法	夹角余弦法		相关系数法	夹角余弦法	相关系数法	夹角余弦法
S1	0.9574	0.9614	0.9466	0.9515	S51	0.9973	0.9975	0.9977	0.9979
S2	0.9590	0.9628	0.9487	0.9533	S52	0.9930	0.9937	0.9929	0.9935
S3	0.9431	0.9486	0.9311	0.9376	S53	0.9922	0.9929	0.9951	0.9955
S4	0.9975	0.9977	0.9980	0.9981	S54	0.9929	0.9936	0.9957	0.9961
S5	0.9537	0.9580	0.9433	0.9485	S55	0.9968	0.9971	0.9989	0.9990
S6	0.9349	0.9407	0.9216	0.9286	S56	0.9957	0.9961	0.9979	0.9980
S7	0.9675	0.9706	0.9584	0.9623	S57	0.9921	0.9928	0.9954	0.9958
S8	0.9935	0.9941	0.9910	0.9918	S58	0.9969	0.9970	0.9987	0.9988
S9	0.9949	0.9953	0.9953	0.9958	S59	0.9754	0.9776	0.9672	0.9702
S10	0.9968	0.9971	0.9950	0.9954	S60	0.9940	0.9946	0.9943	0.9948
S11	0.9956	0.9961	0.9946	0.9951	S61	0.9880	0.9891	0.9835	0.9850
S12	0.9980	0.9982	0.9964	0.9967	S62	0.9843	0.9857	0.9866	0.9878
S13	0.9950	0.9955	0.9958	0.9962	S63	0.9965	0.9967	0.9985	0.9986
S14	0.9972	0.9975	0.9967	0.9970	S64	0.9870	0.9882	0.9817	0.9833
S15	0.9946	0.9951	0.9917	0.9924	S65	0.9776	0.9796	0.9787	0.9807
S16	0.9940	0.9945	0.9954	0.9958	S66	0.9824	0.9840	0.9766	0.9787
S17	0.9965	0.9968	0.9970	0.9972	S67	0.9872	0.9883	0.9825	0.9840
S18	0.9887	0.9898	0.9908	0.9917	S68	0.9941	0.9944	0.9971	0.9973
S19	0.9957	0.9961	0.9954	0.9958	S69	0.9865	0.9874	0.9854	0.9861
S20	0.9708	0.9736	0.9709	0.9736	S70	0.9921	0.9928	0.9910	0.9918
S21	0.9711	0.9738	0.9712	0.9738	S71	0.9885	0.9895	0.9855	0.9868
S22	0.9736	0.9760	0.9744	0.9767	S72	0.9953	0.9956	0.9943	0.9948
S23	0.9689	0.9718	0.9698	0.9726	S73	0.9907	0.9915	0.9868	0.9880
S24	0.9577	0.9617	0.9576	0.9615	S74	0.9960	0.9964	0.9963	0.9966
S25	0.9957	0.9960	0.9968	0.9971	S75	0.9944	0.9948	0.9959	0.9962
S26	0.9776	0.9798	0.9784	0.9804	S76	0.9855	0.9868	0.9882	0.9892
S27	0.9921	0.9928	0.9928	0.9935	S77	0.9963	0.9965	0.9978	0.9980
S28	0.9856	0.9869	0.9870	0.9882	S78	0.9958	0.9961	0.9983	0.9984
S29	0.9859	0.9872	0.9877	0.9888	S79	0.9966	0.9969	0.9981	0.9983
S30	0.9901	0.9910	0.9911	0.9919	S80	0.9927	0.9933	0.9959	0.9962
S31	0.9897	0.9906	0.9864	0.9876	S81	0.9845	0.9859	0.9791	0.9810
S32	0.9978	0.9980	0.9967	0.9970	S82	0.9934	0.9940	0.9924	0.9931
S33	0.9852	0.9866	0.9855	0.9867	S83	0.9956	0.9959	0.9977	0.9978
S34	0.9737	0.9762	0.9750	0.9773	S84	0.9951	0.9955	0.9949	0.9954
S35	0.9682	0.9713	0.9682	0.9712	S85	0.9961	0.9965	0.9971	0.9974
S36	0.9920	0.9928	0.9936	0.9942	S86	0.9863	0.9875	0.9818	0.9834
S37	0.9935	0.9941	0.9953	0.9958	S87	0.9902	0.9910	0.9865	0.9877
S38	0.9896	0.9906	0.9911	0.9919	S88	0.9209	0.9282	0.9063	0.9148
S39	0.9852	0.9865	0.9874	0.9886	S89	0.9584	0.9623	0.9486	0.9533
S40	0.9606	0.9646	0.9419	0.9477	S90	0.9940	0.9945	0.9972	0.9975
S41	0.9919	0.9927	0.9932	0.9937	S91	0.9498	0.9543	0.9388	0.9443
S42	0.9771	0.9793	0.9781	0.9801	S92	0.9930	0.9936	0.9904	0.9913
S43	0.9915	0.9923	0.9932	0.9938	S93	0.9852	0.9865	0.9808	0.9826
S44	0.9933	0.9939	0.9954	0.9958	S94	0.9934	0.9940	0.9907	0.9916
S45	0.9905	0.9913	0.9935	0.9941	S95	0.9755	0.9777	0.9679	0.9708
S46	0.9945	0.9949	0.9921	0.9925	S96	0.9786	0.9806	0.9717	0.9743
S47	0.9949	0.9954	0.9966	0.9969	S97	0.9918	0.9925	0.9880	0.9891
S48	0.9930	0.9936	0.9960	0.9963	S98	0.9540	0.9582	0.9431	0.9483
S49	0.9869	0.9881	0.9889	0.9899	S99	0.9947	0.9952	0.9931	0.9937
S50	0.9920	0.9927	0.9939	0.9944	S100	0.9943	0.9948	0.9942	0.9947

合物没有紫外吸收，很难在指纹图谱中有所体现。NMR 具有无偏向性、不破坏样品、样品前处理简单、易于自动化等优点，非常适用于中药成分表征。但由于成本和技术原因，目前还没有广泛用于中药的质量控制中。本研究建立了一种基于代谢组学分析技术的 ^{1}H-NMR 指纹图谱分析方法，成功地对舒肝宁注射液中 88 个化学成分进行表征，包括萜类、有机酸和环烯醚萜类化合物，其中绿原酸、栀子苷、黄芩苷等多种化合物都有抗炎、抗氧化作用，灵芝中的很多化合物具有保肝作用，诸化合物协同互作，共同发挥清热解毒、利湿退黄、益气扶正、保肝护肝功效 [3]。同时针对不同批次样品进行了 ^{1}H-NMR 指纹图谱研究，结果显示各批次样品的指纹图谱具有很好的相似性。此舒肝宁注射液 ^{1}H-NMR 指纹图谱方法的建立不仅可以更有效地控制舒肝宁注射液产品的质量，而且可以为其他中药的质量控制研究提供方法学借鉴。

参考文献

[1] 曾令荣，黄雪梅，杨传玉，等 . 舒肝宁注射液临床应用安全性、合理性及药物利用情况分析 [J]. 临床合理用药杂志，2021，14（15）：35-37.

[2] 肖金超，王玲，张丽，等 . 平衡透析法结合 UPLC-MS/MS 技术测定舒肝宁注射液的血浆蛋白结合率 [J]. 中国中药杂志，2023，48（22）：6183-6190.

[3] 黄龙，范雅茜，段钟平 . 舒肝宁注射液利胆退黄抗炎护肝机制研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志，2023，26（5）：765-768.

[4] 潘道苇，向红霞，陈舒雅，等 . 超高效液相色谱法检测舒肝宁配伍含量的稳定性 [J]. 贵州医科大学学报，2021，46（1）：27-31.

[5] 支旭然，王觅，宋浩静，等 . UPLC-MS/MS 法同时测定舒肝宁注射液中 6 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2018，38（12）：2194-2199.

[6] Hou JJ，Zhang JQ，Yao CL，et al. Deeper chemical perceptions for better traditional chinese medicine standards [J]. Engineering，2019，5（1）：83-97.

[7] 潘坚扬，赵芳，李文竹，等 . 定量核磁共振技术及其在中药注射剂质量控制中的应用展望 [J]. 中国中药杂志，2022，47（3）：569-574.

[8] 裴洁荣，金如意，苏梅，等 . 大血藤质子核磁共振指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2023，21（7）：1707-1711.

[9] Tan Y，Wang LM，Gao J，et al. Multiomics integrative analysis for discovering the potential mechanism of dioscin against hyperuricemia mice [J]. J Proteome Res，2021，20（1）：645-660.

[10] 张东东 . 板蓝根化学成分及其抑制一氧化氮释放活性研究 [D]. 上海：上海中医药大学，2020.

[11] 杨前东 . 栀子花的化学成分及其 α- 糖苷酶抑制活性研究 [D]. 宜春：宜春学院，2021.

[12] 肖春霞 . 黔产南板蓝根中抗流感病毒化学成分的研究 [D]. 贵阳：贵州大学，2018.

[13] 潘以琳 . 板蓝根有效提取物化学成分的研究及其不同产地的主成分分析 [D]. 南京：南京中医药大学，2014.

[14] 吴香玉 . 绿豆萌发的动态代谢组学研究 [D]. 武汉：中国科学院大学，2014.

[15] 王志伟，谭晓杰，马婷婷，等 . 茵陈化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报，2008，25（10）：781-784 .

[16] 贾琳 . 栀子的质量标准及化学成分研究 [D]. 成都：四川大学，2005.

[17] 刘松照，王国凯，彭灿，等 . 灵芝三萜类化学成分研究 [J]. 现代中药研究与实践，2017，31（4）：41-45.

[18] 孙雪飞 . 赤芝子实体化学成分研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2015.

[19] 于超 . 反柄灵芝子实体的化学成分及生物活性研究 [D]. 杨凌：西北农林科技大学，2022.

[20] 郑阳 . 灵芝孢子粉化学成分的研究 [D]. 延吉：延边大学，2017.

[21] 刘超，陈若芸 . 紫芝中的一个新三萜 [J]. 中草药，2010，41（1）：8-11.

[22] 何盼 . 基于核磁代谢组学技术的黄芪抗疲劳药效研究 [D]. 太原：山西大学，2015.

[23] 李萌茹，周玉枝，柴建新，等 . 基于 ^{1}H NMR 尿液代谢组学的黄芩不同生长部位抗衰老作用研究 [J]. 药学学报，2020，55（11）：2702-2712.

[24] 马红 . 基于代谢组学技术的新疆哈萨克族食管鳞癌血浆特征代谢物及临床意义研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2014.

[25] 崔维恒，邓晓兰，王思琴 . 采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱快速鉴定板蓝根的化学成分 [J]. 化学研究，2023，34（4）：313-318.

[26] 冯佳 . 植物茵陈蒿化学成分研究 [D]. 延吉：延边大学，2016.

[27] 田晓卉，周超，喻长远，等 . 茵陈配方颗粒中的化学成分分离鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（3）：55-59.

[28] 李海波，马金凤，庞倩倩，等 . 栀子的化学成分研究 [J]. 中草药，2020，51（22）：5687-5697.

[29] 马金凤 . 中药栀子主要化学成分研究 [D]. 广州：暨南大学，2019.

[30] 邵青森 . 栀子花中化学成分的分离鉴定及生物活性研究 [D]. 宜春：宜春学院，2023.

[31] 彭开锋 . 栀子化学成分及生物活性研究 [D]. 沈阳：沈阳药科大学，2012.

[32] 陈季鹏 . 核磁共振技术用于黄芩化学成分定量及细胞代谢组学研究 [D]. 杭州：浙江工业大学，2020.

[33] 詹雪艳，史新元，段天璇，等 . 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（2）：248-251.

[34] 张昀，张艳萍，何峰 . 舒肝宁注射液 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国现代应用药学，2015，32（7）：824-827.

（收稿日期：2023-09-28；修回日期：2023-12-15）

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术建立银花抗病毒口服液的指纹图谱及多指标含量测定

谭金桃[1, 2]，周思倩[1, 3]，方艳[2]，潘吕婷[3]，梁诗瑶[2]，王雅静[3]，吴娟[3]，龙红萍[1*]（1. 湖南中医药大学第一附属医院，长沙 410007；2. 湖南省儿童医院药学部，长沙 410007；3. 湖南中医药大学，长沙 410208）

摘要：目的 建立银花抗病毒口服液的 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱，对其主要化学成分进行分析鉴定，并测定 6 个化学成分的含量。**方法** 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术，正、负离子模式，Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18（3.0 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱，以水相（A，含 0.1% 甲酸）和有机相乙腈（B）为流动相梯度洗脱，流速为 0.4 mL • min^{-1}，进样量为 1 μL。建立 12 批银花抗病毒口服液的指纹图谱，确定共有峰并进行相似度评价、聚类分析、主成分分析和偏最小二乘判别分析，通过一级、二级质谱及对照品比对鉴别共有峰的化学成分。**结果** 在正、负离子模式下共鉴定了 12 批银花抗病毒口服液的指纹图谱，确定共有峰 32 个，指纹图谱相似度均≥ 0.978，通过聚类分析将样品各分为 4 类、3 类，与主成分分析一致，筛选出汉黄芩苷、千层纸素 A 苷、连翘酯苷 I、异绿原酸 B 等 8 个成分是导致不同批次样品差异的标志性化合物。**结论** 所建立的指纹图谱结合多指标含量测定方法稳定、重复性好、特征性强，可为银花抗病毒口服液的质量评价和临床应用提供有效参考。

关键词：银花抗病毒口服液；UPLC-Q-TOF-MS；指纹图谱；成分鉴定；含量测定
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0760-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.031

Fingerprint of Yinhua antiviral oral liquid and multi-index determination content based on UPLC-Q-TOF-MS

TAN Jin-tao[1, 2], ZHOU Si-qian[1, 3], FANG Yan[2], PAN Lv-ting[3], LIANG Shi-yao[2], WANG Ya-jing[3], WU Juan[3], LONG Hong-ping[1*] (1. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410007; 2. *Department of Pharmacy*, *Hunan Children's Hospital*, *Changsha* 410007; 3. *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208)

Abstract: Objective To establish a UPLC-Q-TOF-MS fingerprint of Yinhua antiviral oral liquid identify its main chemical compositions, and to determine the content of 6 chemical compositions. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS was used. Under positive and negative ion modes, an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (3.0 mm×100 mm, 1.8 μm) column was used with gradient elution of an aqueous phase (A, containing 0.1% formic acid) and an organic phase acetonitrile (B) as the mobile phase at a flow rate of 0.4 mL • min^{-1} and an injection volume of 1 μL. Fingerprints of 12 batches of Yinhua antiviral oral liquid were established and the common peaks were determined. Similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and partial least squares discriminant analysis were performed. The chemical components of common peaks were identify through primary and secondary mass spectrometry, and compared with reference materials. **Results** Totally 32 peaks were identified in the fingerprint spectra of 12 batches of Yinhua antiviral oral liquid under positive and negative ion modes. The fingerprint similarity was ≥ 0.978. The samples were divided into categories four or three by cluster analysis, which was consistent with principal

基金项目：湖南省卫生健康委科研项目（No.D202313058462）；湖南中医药大学“双一流”学科建设项目（No.22JBZ025）。
作者简介：谭金桃，女，硕士研究生，主管药师，主要从事医院药学与药物分析，email：59952460@qq.com *通信作者：龙红萍，女，博士，副研究员，硕士研究生导师，主要从事中药药效物质基础和新药开发，email：longhongping84@163.com

component analysis. Eight components including wogonside, oroxyloside, forsythoside I, and isochlorogenic acid B were screened out as the hallmark compounds for the differences between various batches of samples. **Conclusion** The fingerprint combined with multi-index content determination method established in this study is stable, repeatable and specific, which can provide reference for the quality evaluation and clinical application of Yinhua antiviral oral liquid.

Key words: Yinhua antiviral oral liquid; UPLC-Q-TOF-MS; fingerprint; component identification; content determination

银花抗病毒口服液具有清热解毒、辛凉解表和利咽消肿的功效，临床上广泛用于上呼吸道感染、小儿肺炎、扁桃体炎、咽喉炎、水痘等证属风热者。全方由板蓝根、重楼、大青叶、柴胡、金银花、牛蒡子等 11 味药组成，其种类较多，成分复杂。目前，对银花抗病毒口服液的质量控制研究报道很少，仅祝文兵等[1]采用薄层色谱法对其中的金银花、黄连进行定性鉴别，用高效液相色谱法测定其中绿原酸和黄芩苷的含量。中药复方成分复杂，其功效的发挥往往体现为多成分、多靶点的协同作用[2-3]，通过检测其中一种或几种成分无法体现复杂中药整体质量。中药色谱指纹图谱是一种综合的、可量化的色谱鉴定手段[4]。超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间串联质谱仪联用技术（UPLC-Q-TOF-MS）能够实现对化合物的快速分离和精确鉴定，对中药复杂成分的鉴定分析具有独特优势[5]，且该方法专属性高、检测灵敏度高，分析速度快[6]。因此，本研究通过建立银花抗病毒口服液的 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱，结合聚类分析等多种化学模式识别方法，鉴定其主要化学成分以及多指标成分含量测定，更全面地评价银花抗病毒口服液的质量，以期为银花抗病毒口服液的质量控制提供参考依据。

1　材料

1.1　仪器

Agilent 1290 UPLC-6540 Q-TOF 色谱 - 质谱联用仪、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18（3.0 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱（美国 Agilent 科技公司）；超声仪（上海科导超声仪器有限公司）；S-23 高速台式离心机（湖南湘仪仪器有限公司）；AUW120D 电子分析天平（日本 SHIMADZU 公司）。

1.2　试药

银花抗病毒口服液（湖南省儿童医院自制制剂，委托湖南新汇制药股份有限公司配制，批号分别为：220101、220301、220401、220501、220601、220701、220801、220901、221001、221101、221201、230101，编号 S1 ～ S12）；色谱甲醇、质谱乙腈（德国 Merck Millipore 公司）；蒸馏水（深圳屈臣氏蒸馏水有限公司）；甲酸铵（质谱级，美国 Fisher 公司）；甘草酸（批号：20070203）、汉黄芩苷（批号：21102107）、黄芩苷（批号：21121404）、绿原酸（批号：21032502）、新绿原酸（批号：20123006）、隐绿原酸（批号：21061801）、异绿原酸 A（批号：21112405）、异绿原酸 B（批号：21012902）（成都普菲德生物技术有限公司，质量分数≥ 98.0%）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18（3.0 mm×100 mm，1.8 μm）：流动相由水相（A，含 0.1% 甲酸）和有机相乙腈（B）组成，梯度洗脱（0 ～ 10 min，5% ～ 15%B；10 ～ 20 min，15% ～ 35%B；20 ～ 30 min，35% ～ 55%B）；流速：0.4 mL•min^{-1}，柱温：30 ℃，进样量：1 μL。

2.2　质谱条件

采用正、负离子分析模式，离子化方式为电喷雾离子化（ESI），进样分析前进行准确质量数的校正；一级质谱扫描范围（*m/z*）：100 ～ 1200；采用氮气为除溶剂干燥气体；毛细管温度为 325 ℃；载气流速为 6.8 L • min^{-1}；鞘气温度为 350 ℃；毛细管电压为 4.0 kV；一级碰撞电压为 150 V；二级质谱扫描范围（*m/z*）：50 ～ 1000；二级碎裂电压为 10、25、40 V。

2.3　供试品溶液的制备

将银花抗病毒口服液离心（8000 r • min^{-1}）5 min，0.22 μm 滤膜滤过，即得银花抗病毒口服液的样品溶液。

2.4　对照品溶液的制备

精密称取对照品绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、甘草酸、汉黄芩苷、黄芩苷 8 个对照品各 10 mg，分别放入 25 mL 量瓶中，加入甲醇适量，超声溶解，静置后定容，即得对照品储备液。取 8 个对照品储备液各 100 μL 混合均匀，即得混合对照品溶液 1（用于化合物鉴别）。从量瓶中各取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、甘草酸、黄芩苷 6 个对照品储备液

各 100 μL 混合均匀，即得混合对照品溶液 2（用于含量测定）。

2.5 指纹图谱的建立及化学模式识别分析

2.5.1 精密度试验 取银花抗病毒口服液 10 mL（批号：220501），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，以甘草酸（31 号峰）为参照峰（S），计算各色谱峰（正离子模式下的 15 个峰，负离子模式下的 29 个峰）的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取银花抗病毒口服液 10 mL（批号：220501），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，室温放置 0、2、4、8、10、12、24 h，按“2.1”项下色谱条件进样，以甘草酸（31 号峰）为参照峰（S），计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均小于 3.0%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取银花抗病毒口服液 10 mL（批号：220501），共 6 份，按“2.3”项下方法分别制成供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，以甘草酸（31 号峰）为参照峰（S），计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均小于 3.0%，表明该方法重复性良好。

2.5.4 指纹图谱的建立及相似度评价 分别取 12 批银花抗病毒口服液，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，时间窗口设为 0.1，正离子流图以 S5 号样品色谱图为参照图谱，负离子流图以 S7 号样品色谱图为参照图谱，以平均数法进行色谱峰匹配，得到 12 批样品的指纹图谱见图 1、2，相似度见表 1。样品的特征图谱通过与对照品总离子流图对比（见图 3），指认新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸 8 个成分。

从图 1、2 可以看出，12 批的银花抗病毒口服液的化学成分总体来看较为稳定，结合表 1 可知，12 批口服液相似度均≥ 0.978，说明样品各个批次的质量较稳定。

2.5.5 聚类分析 将银花抗病毒口服液正、负离子模式下的指纹图谱中共有峰的峰面积导入 SPSS 软件，通过组间连接和平方欧氏距离法进行聚类分析，结果见图 4。当分类距离为 10 时，12 批样品正离子模式下可分为 4 类，第 1 类为 S4、S5、S6 号样品，第 2 类为 S10、S12 号样品，第 3 类为 S1、S8、S9、S11 号样品，第 4 类为

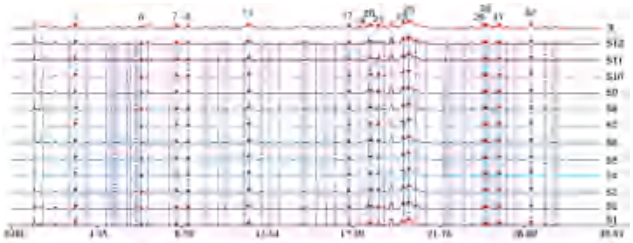


图 1 12 批银花抗病毒口服液指纹图谱（正离子模式）

Fig 1 Fingerprint of 12 batches of Yinhua antiviral oral liquid（positive ion mode）

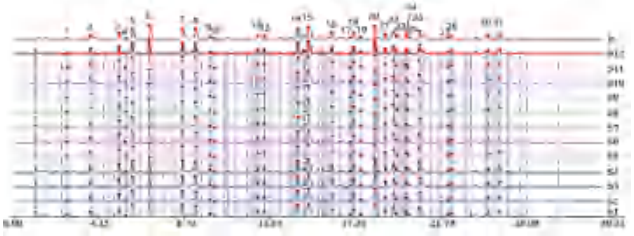


图 2 12 批银花抗病毒口服液指纹图谱（负离子模式）

Fig 2 Fingerprint of 12 batches of Yinhua antiviral oral liquid（negative ion mode）

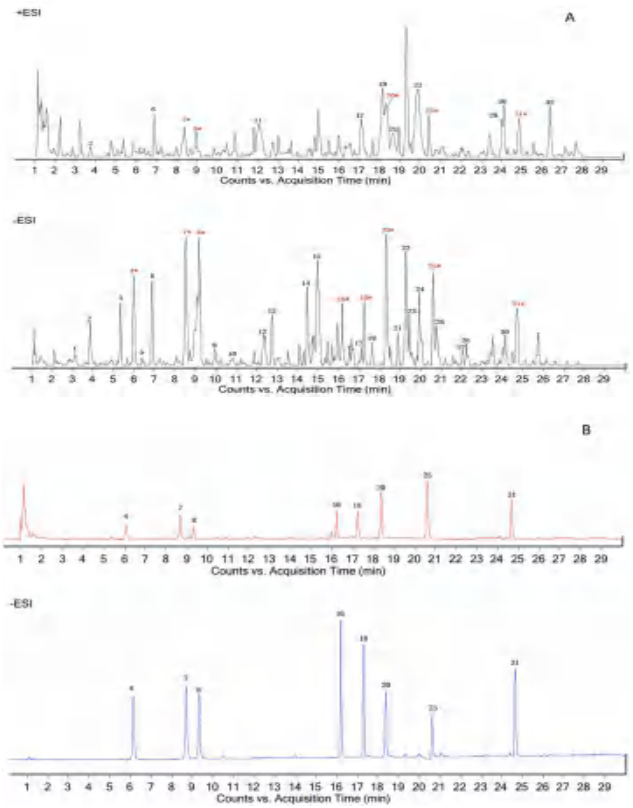


图 3 样品（A）及对照品（B）正离子模式和负离子模式下的总离子流图

Fig 3 Reference total ion chromatogram under positive ion mode（A）and negative ion mode（B）

4. 新绿原酸（neochlorogenic acid）；7. 绿原酸（chlorogenic acid）；8. 隐绿原酸（cryptochlorogenic acid）；16. 异绿原酸 B（isochlorogenic acid B）；18. 异绿原酸 A（isochlorogenic acid A）；20. 黄芩苷（baicalin）；25. 汉黄芩苷（baicalein）；31. 甘草酸（glycyrrhizic acid）

表 1　12 批样品的相似度

Tab 1　Similarity of 12 batches sample

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	SR
S1	1	0.997	0.991	0.991	0.994	0.987	0.997	0.994	0.992	0.992	0.983	0.978	0.999
S2	0.997	1	0.995	0.993	0.998	0.991	0.999	0.995	0.994	0.994	0.987	0.984	0.998
S3	0.991	0.995	1	0.993	0.996	0.994	0.994	0.989	0.997	0.990	0.990	0.988	0.999
S4	0.991	0.993	0.993	1	0.994	0.997	0.993	0.997	0.991	0.998	0.993	0.991	0.999
S5	0.994	0.998	0.996	0.994	1	0.993	0.997	0.993	0.995	0.994	0.985	0.984	0.997
S6	0.987	0.991	0.994	0.997	0.993	1	0.991	0.994	0.994	0.995	0.994	0.994	0.999
S7	0.997	0.999	0.994	0.993	0.997	0.991	1	0.995	0.995	0.994	0.988	0.985	0.998
S8	0.994	0.995	0.989	0.997	0.993	0.994	0.995	1	0.990	0.999	0.992	0.988	0.999
S9	0.992	0.994	0.997	0.991	0.995	0.994	0.995	0.990	1	0.989	0.992	0.990	0.997
S10	0.992	0.994	0.990	0.998	0.994	0.995	0.994	0.999	0.989	1	0.990	0.988	0.999
S11	0.983	0.987	0.990	0.993	0.985	0.994	0.988	0.992	0.992	0.990	1	0.996	0.998
S12	0.978	0.984	0.988	0.991	0.984	0.994	0.985	0.988	0.990	0.988	0.996	1	0.999
R	0.999	0.998	0.999	0.999	0.997	0.999	0.998	0.999	0.997	0.999	0.998	0.999	1

S2、S3、S7 号样品；负离子模式下可分为 3 类，第 1 类为 S2、S3、S7、S8、S9、S10、S11 号样品，第 2 类为 S1、S4、S5、S6 号样品，第 3 类为 S12 号样品。说明 12 批银花抗病毒口服液整体质量基本稳定，可能因原料来源、制备工艺等不同导致各批次制剂的共有成分存在差异。

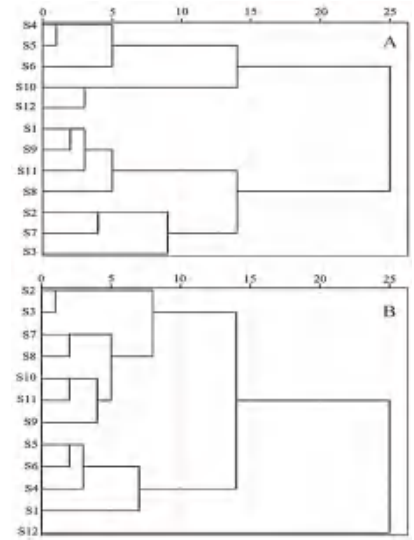


图 4　正离子模式（A）和负离子模式（B）下 12 批银花抗病毒口服液聚类分析图

Fig 4　Cluster analysis of 12 batches of Yinhua antiviral oral liquid under positive ion（A）and negative ion mode（B）

2.5.6　主成分分析（PCA）　以银花抗病毒口服液正、负离子模式下指纹图谱中共有峰的峰面积为变量，导入 SPSS 软件，对数据标准化处理后进行 PCA，以特征值＞1 为标准，正、负离子模式下均提取得到 1 个主成分，其累计方差贡献率分别为 99.915%、99.893%，可以客观地反映银花抗病毒口服液的大部分信息。采用 SIMCA-P14 软件绘制 PCA 得分图，见图 5，12 批样品在正、负离子模式下分别可分为 4 类、3 类，与聚类分析结果一致。

2.5.7　偏最小二乘判别分析（PLS-DA）　将银花抗病毒口服液正、负离子模式下指纹图谱中共有峰的峰面积导入 SIMCAP 软件，进行 PLS-DA，结果见图 6，12 批银花口服液分别可分为 4 类、3 类，与聚类分析、PCA 结果一致。采用变量重要性投影（VIP）法，以 VIP ＞ 1 为标准，正离子模式共得到 4 个差异标志物，依次为色谱峰 25（汉黄芩苷）、23（千层纸素 A 苷）、12（绿原酸甲酯）、30（牛蒡酚 A），说明这 4 个成分为引起银花抗病毒口服液正离子模式下分类差异的主要成分；负离子模式共得到 4 个差异标志物，依次为色谱峰 7（绿原酸）、15（连翘酯苷 A）、14（连翘酯苷 I）、16（异绿原酸 B），说明这 4 个成分为引起银花抗病毒口服液负离子模式下分类差异的主要成分（见图 7）。从而影响银花抗病毒口服液较大分类差异的主要成分有 8 种，在生产过程的质量控制中可重点关注它们的变化情况。

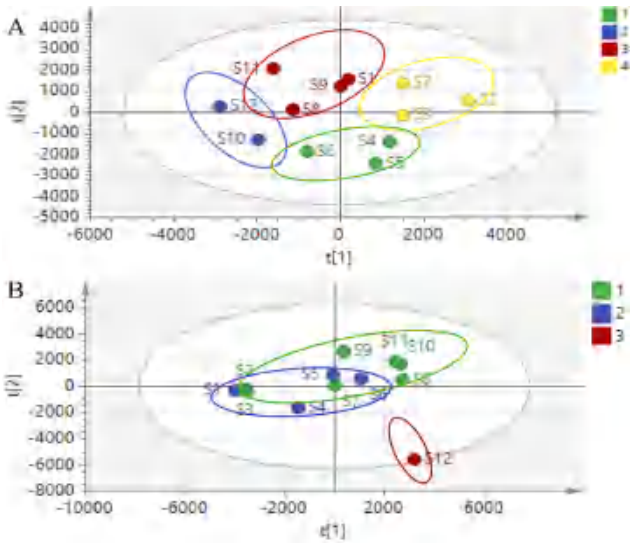


图 5　正离子模式（A）和负离子模式（B）下银花抗病毒口服液 PCA 得分图

Fig 5　PCA score plot of Yinhua antiviral oral liquid under positive ion（A）and negative ion mode（B）

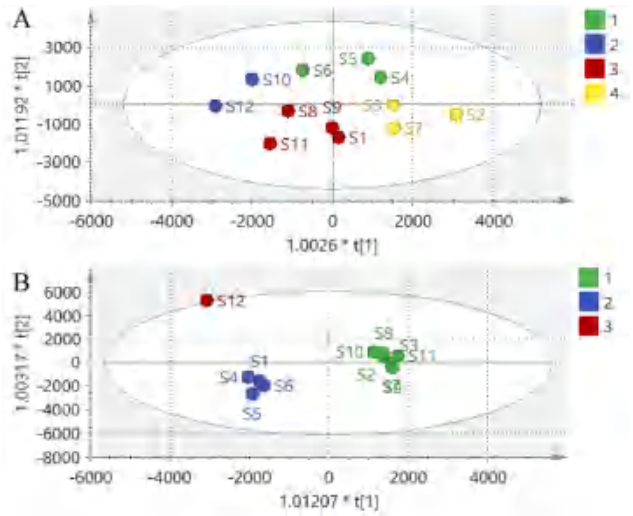


图 6 正离子模式（A）和负离子模式（B）下银花抗病毒口服液 PLS-DA 得分图

Fig 6 PLS-DA score plot of Yinhua antiviral oral liquid under positive ion（A）and negative ion mode（B）

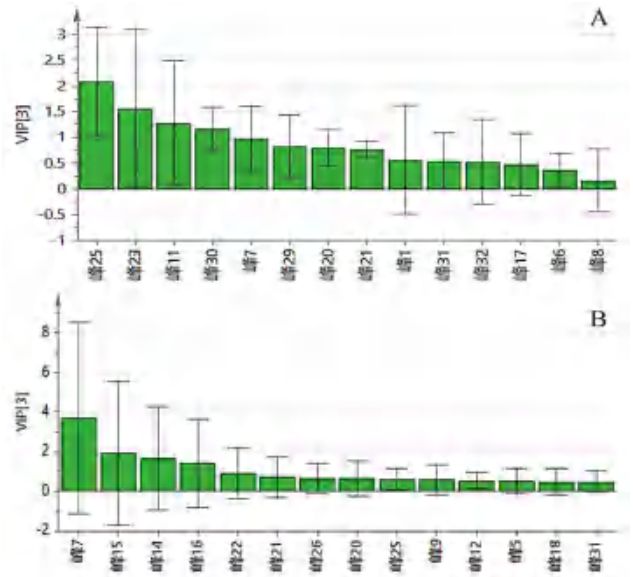


图 7 正离子模式（A）和负离子模式（B）下银花抗病毒口服液 PLS-DA VIP 值图

Fig 7 PLS-DA VIP value plot of Yinhua antiviral oral liquid under positive ion（A）and negative ion mode（B）

2.6 UPLC-Q-TOF-MS 对共有峰化学成分定性分析

通过使用 Agilent TCM-DATA 中药成分数据库生成分子式、依照误差小于 5×10^{-6} 的原则进行筛选，同时检索中国知网（CNKI），PubMed、Massbank 等数据库，建立银花抗病毒口服液的化学成分信息库。根据化合物的一级质谱、二级质谱、对照品比对以及比对自建中药成分化合物库，并结合文献 [7-18] 在银花抗病毒口服液中共确定 32 个化学成分，结果见表 2。

2.7 多指标成分含量测定

2.7.1 专属性试验 取甲醇（空白溶剂）、混合对照品溶液 2、“2.3” 项下供试品溶液适量，按“2.1”“2.2” 项下色谱条件进样测定，结果显示，供试品、混合对照品溶液在相应保留时间处有相同色谱峰，且空白溶剂无干扰，表明该方法专属性良好，色谱图见图 8。

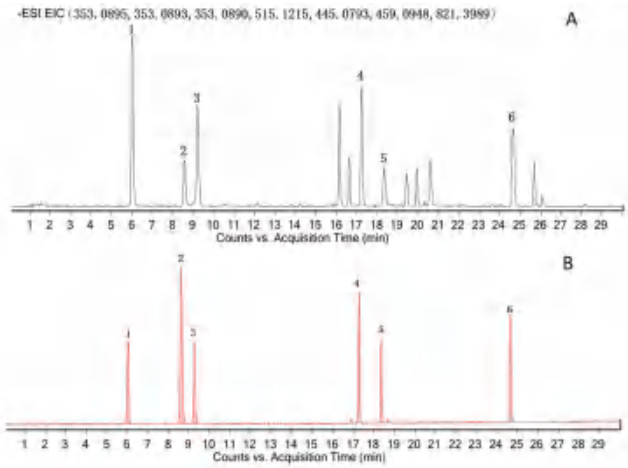


图 8 含量测定对照品总离子流图

Fig 8 Total ion current of content determination reference

A. 供试品溶液（sample solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；1. 新绿原酸（neochlorogenic acid）；2. 绿原酸（chlorogenic acid）；3. 隐绿原酸（cryptochlorogenic acid）；4. 异绿原酸 A（isochlorogenic acid A）；5. 黄芩苷（baicalin）；6. 甘草酸（glycyrrhetinic acid）

2.7.2 精密度试验 取银花抗病毒口服液 10 mL（批号：220501），按“2.3” 项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积。结果显示新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、黄芩苷、甘草酸的峰面积 *RSD* 值分别为 1.2%、1.2%、2.0%、1.4%、1.3%、1.5%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

2.7.3 稳定性试验 取银花抗病毒口服液 10 mL（批号：220501），按“2.3” 项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录峰面积。结果显示新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、黄芩苷、甘草酸的 *RSD* 值分别为 1.9%、1.5%、1.7%、1.9%、1.1%、1.8%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.4 重复性试验 取银花抗病毒口服液 10 mL，共 6 份，按“2.3” 项下方法分别制备供试品溶液，进样测定，记录峰面积并用外标法计算样品的含量。结果显示新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、黄芩苷、甘草酸的平均含量分别为 0.2080、0.0872、0.1850、0.0824、0.2802、0.0934 $mg\cdot mL^{-1}$（$n = 6$），*RSD* 值分别为 2.0%、1.5%、1.7%、1.3%、1.6%、1.9%，表明该方法重复性良好。

2.7.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液，用甲醇逐级稀释后，进样测定，记录峰面积，以对

表 2　银花抗病毒口服液共有峰 UPLC-Q-TOF/MS 成分鉴定分析

Tab 2　UPLC-Q-TOF/MS chemical composition identification of common peaks in Yinhua antiviral oral liquid

No.	t_R/min	正离子（*m/z*）	负离子（*m/z*）	分子量（理论值）	分子式	误差 /（$\times10^{-6}$）	中文名	归属
1	3.117	—	$[M-H]^-$ 191.0567	192.0639	$C_7H_{12}O_6$	− 2.74	奎宁酸	金银花、黄连
2	3.861	$[M+NH_4]^+$ 378.1405	$[M-H]^-$ 359.0998	360.1071	$C_{15}H_{20}O_{10}$	− 3.92	葡萄糖基丁香酸	黄连
3	5.37	—	$[M-H]^-$ 375.1311	376.1375	$C_{16}H_{24}O_{10}$	− 1.57	8- 依地乙酸	金银花
4*	5.991	$[M+H]^+$ 355.1030	$[M-H]^-$ 353.0895	354.0968	$C_{16}H_{18}O_9$	− 4.75	新绿原酸	金银花
5	6.390	$[M+NH_4]^+$ 466.1920	$[M-H]^-$ 447.1522	448.1593	$C_{19}H_{28}O_{12}$	− 2.75	木犀草苷	金银花
6	6.890	$[M+NH_4]^+$ 480.2074	$[M-H]^-$ 461.1680	462.1745	$C_{20}H_{30}O_{12}$	− 1.57	连翘酯苷 E	连翘
7*	8.577	$[M+H]^+$ 355.1032	$[M-H]^-$ 353.0893	354.0955	$C_{16}H_{18}O_9$	− 1.06	绿原酸	金银花
8*	9.196	$[M+H]^+$ 355.1024	$[M-H]^-$ 353.0890	354.0964	$C_{16}H_{18}O_9$	− 3.63	隐绿原酸	金银花
9	9.953	—	$[M-H]^-$ 179.0356	180.0429	$C_9H_8O_4$	− 3.31	咖啡酸	金银花
10	10.845	$[M+H]^+$ 359.1338	$[M-H]^-$ 357.1196	358.1264	$C_{16}H_{22}O_9$	− 0.28	獐牙菜苷	金银花
11	11.991	$[M+H]^+$ 187.0875	—	186.0804	$C_{11}H_{10}N_2O$	− 5.95	脱氧鸭嘴花碱酮	板蓝根
12	12.319	—	$[M-H]^-$ 367.1048	368.1121	$C_{17}H_{20}O_9$	− 3.69	绿原酸甲酯	金银花
13	12.736	$[M+Na]^+$ 427.1166	$[M-H]^-$ 403.1258	404.1331	$C_{17}H_{24}O_{11}$	− 2.94	栀子苷	金银花
14	14.457	$[M+H]^+$ 625.2099	$[M-H]^-$ 623.2004	624.2067	$C_{29}H_{36}O_{15}$	− 1.98	连翘酯苷 I	连翘
15	14.981	$[M+NH_4]^+$ 642.2401	$[M-H]^-$ 623.2005	624.2078	$C_{29}H_{36}O_{15}$	− 3.79	连翘酯苷 A	连翘
16*	16.167	$[M+H]^+$ 517.1342	$[M-H]^-$ 515.1215	516.1288	$C_{25}H_{24}O_{12}$	− 3.88	异绿原酸 B	金银花
17	17.003	$[M+H]^+$ 493.1345	$[M-H]^-$ 491.1209	492.1272	$C_{23}H_{24}O_{12}$	− 0.78	鸢尾新苷 B	射干
18*	17.249	—	$[M-H]^-$ 515.1209	516.1278	$C_{25}H_{24}O_{12}$	− 2.02	异绿原酸 A	金银花
19	17.412	$[M+H]^+$ 336.1238	—	335.1165	$C_{20}H_{17}NO_4$	− 2.20	表小檗碱	黄连
20*	18.390	$[M+H]^+$ 447.0933	$[M-H]^-$ 445.0793	446.0860	$C_{21}H_{18}O_{11}$	− 2.46	黄芩苷	黄芩
21	18.876	—	$[M+HCOO]^-$ 579.2101	534.2101	$C_{27}H_{34}O_{11}$	− 3.76	牛蒡苷	牛蒡子
22	19.285	$[M+H]^+$ 373.1636	$[M-H]^-$ 371.1508	372.1580	$C_{21}H_{24}O_6$	− 1.88	牛蒡子苷元	牛蒡子
23	19.988	$[M+H]^+$ 461.1091	$[M-H]^-$ 459.0946	460.1018	$C_{22}H_{20}O_{11}$	− 2.73	千层纸素 A 苷	黄芩
24	20.067	$[M+H]^+$ 477.1040	$[M-H]^-$ 475.0900	476.0955	$C_{22}H_{20}O_{12}$	0.02	野黄芩苷甲酯	黄芩
25*	20.659	$[M+H]^+$ 461.1093	$[M-H]^-$ 459.0948	460.1011	$C_{22}H_{20}O_{11}$	− 1.22	汉黄芩苷	黄芩
26	20.916	$[M+H]^+$ 855.4034	—	854.3958	$C_{44}H_{70}O_{16}$	0.86	重楼皂苷 I	重楼
27	21.199	—	$[M-H]^-$ 983.4526	984.4592	$C_{48}H_{72}O_{21}$	− 2.68	甘草皂苷 A3	甘草
28	22.228	$[M+H]^+$ 839.4052	$[M-H]^-$ 837.3937	838.3990	$C_{42}H_{62}O_{17}$	− 0.37	甘草皂苷 G2	甘草
29	24.013	$[M+NH_4]^+$ 554.2393	$[M-H]^-$ 535.1988	536.2049	$C_{30}H_{32}O_9$	− 0.44	异牛蒡酚 A	牛蒡子
30	24.123	$[M+NH_4]^+$ 554.2392	$[M-H]^-$ 535.1987	536.2049	$C_{30}H_{32}O_9$	− 0.50	牛蒡酚 A	牛蒡子
31*	24.707	$[M+H]^+$ 823.4133	$[M-H]^-$ 821.3989	822.4064	$C_{42}H_{62}O_{16}$	− 3.15	甘草酸	甘草
32	26.371	$[M+H]^+$ 387.1082	—	386.1003	$C_{20}H_{18}O_8$	− 0.40	次野鸢尾黄素	射干

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

照品溶液的浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果表明新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、黄芩苷、甘草酸 6 个成分在一定浓度范围内与峰面积线性关系良好（见表 3）。

表 3　银花抗病毒口服液线性关系考察结果

Tab 3　Linearity of Yinhua antiviral oral liquid

成分	回归方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
新绿原酸	$Y=5.966\times10^5X+5.272\times10^6$	0.9996	12.46 ～ 249.20
绿原酸	$Y=9.680\times10^5X+5.503\times10^6$	0.9990	8.75 ～ 175.00
隐绿原酸	$Y=8.920\times10^5X+3.446\times10^6$	0.9992	12.50 ～ 250.00
异绿原酸 A	$Y=7.413\times10^5X+9.120\times10^6$	0.9990	8.75 ～ 175.00
黄芩苷	$Y=5.738\times10^5X+1.173\times10^7$	0.9993	15.98 ～ 319.60
甘草酸	$Y=7.288\times10^5X+1.565\times10^7$	0.9991	8.19 ～ 163.83

2.7.6　加样回收试验　取已知含量的供试品溶液 6 份，分别按照对照品加入量与供试品中相应成分含量的比为 1∶1 的量精密加入新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、黄芩苷、甘草酸对照品，进样测定，测得其平均加样回收率分别为 99.42%、101.05%、95.33%、102.29%、92.75%、96.74%，*RSD* 分别为 1.2%、1.4%、2.0%、1.2%、1.6%、1.8%，表明该方法回收率良好。

2.7.7　样品含量测定　按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，并结合供试品溶液积分数据，对 12 批银花抗病毒口服液中新绿原酸、绿原酸等 6 种成分进行含量测定，结果见表 4。

3　讨论

3.1　色谱条件的考察

关于流动相的选择，比较了甲酸 - 甲醇、甲酸 - 乙腈、磷酸 - 乙腈不同流动相的出峰效果，结果发现流动相为甲酸 - 乙腈时，色谱峰较多，分离度高，故最终选择此流动相体系进行梯度洗脱。关于流速的选择，比较了不同流速（0.4、0.6、0.8 mL • min^{-1}）对色谱峰的影响，随着流速的增大，部分色谱峰出现交叉，分离度较差，流速 0.4 mL • min^{-1} 时，各色谱峰对称性较好。

表 4 12 批银花抗病毒口服液中 6 种成分的含量 (mg·mL^{-1}，n = 3)

Tab 4 Content of 6 components in 12 batches of Yinhua antiviral oral liquid (mg · mL^{-1}，n = 3)

编号	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 A	黄芩苷	甘草酸
S1	0.2054	0.0870	0.1843	0.0816	0.2799	0.0942
S2	0.2034	0.0903	0.1562	0.0743	0.2933	0.0878
S3	0.1988	0.0890	0.1698	0.0834	0.2800	0.0987
S4	0.2104	0.0875	0.1854	0.0847	0.2789	0.0997
S5	0.2056	0.0810	0.1942	0.0799	0.2675	0.1023
S6	0.2008	0.0884	0.1829	0.0718	0.2684	0.0850
S7	0.2052	0.0890	0.1786	0.0872	0.2823	0.0974
S8	0.2051	0.0910	0.1902	0.0902	0.2800	0.0886
S9	0.2052	0.0884	0.1728	0.0809	0.2786	0.0990
S10	0.2055	0.0876	0.1900	0.0758	0.2649	0.1002
S11	0.1965	0.0898	0.2002	0.0838	0.2688	0.0920
S12	0.1990	0.0960	0.1890	0.0797	0.2759	0.1035

3.2 指标成分的选择

现代药理学研究表明，金银花中酚酸类成分（绿原酸、新绿原酸等）具有抗病毒、抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性[19]，黄芩苷是中药黄芩中含量最高的黄酮类化合物，具有抗炎、抗菌等药理活性[20]。甘草酸是甘草的主要活性物质之一，具有抗炎、抗病毒等作用[21]。故选择上述 6 个指标成分进行含量测定。

3.3 结果分析

银花抗病毒口服液作为医院制剂，现行质量标准及质量控制方法较为低下，目前尚未见其指纹图谱的有关研究。而现有技术中，对银花抗病毒口服液的质量控制都是针对单独饮片，并非复方药物制剂，因此并不能适用于银花抗病毒复方口服液。本研究采用 UPLC 建立银花抗病毒口服液的指纹图谱，与普通液相色谱法相比，具有分离度更高，检测更灵敏，分离时间更短的优势[22]。对指纹图谱进行相似度分析、化学模式识别，结果表明口服液整体质量较稳定。6 个指标性成分的含量在不同批次间存在差异较小，整体质量较为接近，说明银花抗病毒口服液生产工艺较为稳定。

综上所述，本研究所建立的银花抗病毒口服液 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱、定性分析以及多指标成分测定的方法准确、简捷、实用，且具备定性和定量双重评价功能，可为银花抗病毒口服液质量提升提供更加全面的参考。

参考文献

[1] 祝文兵，龙荣，彭芳玲，等 . 银花抗病毒合剂的制备与质量控制 [J]. 中国医院用药评价与分析，2014，14（11）：979-981.

[2] 周昱杉，梁洁，信晨曦，等 . 中药复方制剂质量评价方法 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（3）：589-592.

[3] 吕玥，汤湧，李立言，等 . 中药复方制剂质量控制体系的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志，2020，26（1）：170-172.

[4] 郑恒，魏日胞，陈香美 . 中药质量标准与中药指纹图谱 [J]. 中国医院药学杂志，2003，23（2）：50-51.

[5] 史敏，任炳楠，邱志宏，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的黄柏化学成分快速辨识研究 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（21）：2225-2229.

[6] 戴冬艳，朱静毅，闻环毓 . 液相色谱 - 质谱联用技术在药物分析中的应用 [J]. 天津药学，2012，24（3）：50-53.

[7] 龚兴成，刘文静，曹丽波，等 . DI-MS/MSALL 法快速定性分析金银花的化学成分 [J]. 中国中药杂志，2021，46（9）：2220-2228.

[8] 朱童，杨丹，刘珊珊，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MSE 技术的黄连地上部分与地下部分化学成分比较研究 [J]. 中国中药杂志，2022，47（4）：980-987.

[9] Liu ZX，Liu CT，Liu QB，et al. Iridoid glycosides from the flower buds of *Lonicera japonica* and their nitric oxide production and *α*-glucosidase inhibitory activities [J]. J Funct Foods，2015，6（18）：512.

[10] 景奉堂，李峰，张天屹，等 . 连翘的化学成分与生物活性的最新研究进展 [J]. 中药材，2023，46（1）：242-251.

[11] 肖蕾，包正雪，郁阳，等 . 金银花化学成分及抗菌消炎活性研究 [J]. 中南药学，2022，20（8）：1773-1780.

[12] Feng QT，Zhu GY，Gao WN，et al. Two new alkaloids from the roots of *Baphicacanthus cusia* [J]. Chem Pharm Bull，2016，64（10）：1505-1508.

[13] Lee EJ，Kim JS，Kim HP，et al. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities [J]. Food Chem，2010，120（1）：134-139.

[14] 周洪旭，张毅，杨新勇，等 . 一测多评法测定川射干中 8 个异黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2022，42（6）：1072-1080.

[15] 高文雅，李涛，周严严，等 . 黄芩水煎液中化学成分的定性及定量研究 [J]. 中草药，2022，53（23）：7339-7352.

[16] 秦智彬，丁林芬，李兰，等 . 牛蒡子化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发，2015，27（12）：2050-2055.

[17] 黄圆圆 . 15 种重楼属植物根茎的化学成分分析 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2019.

[18] 孙立丽，游广娇，任晓亮，等 . 甘草化学成分快速定性分析与化学模式识别研究 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（5）：2074-2079.

[19] 宋亚玲，王红梅，倪付勇，等 . 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药，2015，46（4）：490-495.

[20] 李伟，徐伟 . 黄芩苷药理作用研究进展 [J]. 中西医结合研究，2022，14（3）：193-196.

[21] 王兵，王亚新，赵红燕，等 . 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报，2013，34（3）：215-218.

[22] 谭鹏，李春雨，章从恩，等 . 超高效液相色谱法在中药分析领域中的应用现状及展望 [J]. 中草药，2018，49（24）：5938-5945.

（收稿日期：2023-10-05；修回日期：2023-12-08）

芡实配方颗粒高效液相色谱特征图谱和 4 个成分含量测定

张耀元[1, 2]，仝一丹[1, 2*]，邱俊棠[1, 2]，秦宇翔[1, 2]，张辉[1, 2]（1.华润三九现代中药制药有限公司，广东　惠州 516000；2.中药配方颗粒安徽省重点实验室，安徽　淮北　235000）

摘要：目的　建立芡实配方颗粒高效液相色谱特征图谱，并测定其中腺苷、没食子酸、鸟苷和鞣花酸的含量。**方法**　以 Shim-pack GIST C18-AQ（4.6 mm×150 mm，3.0 μm）为色谱柱，以乙腈 -0.5% 甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱，柱温 20 ℃，流速 1.0 mL • min^{-1}，检测波长 258 nm。建立芡实配方颗粒特征图谱，并借助中药色谱指纹图谱相似度系统评价其相似度。**结果**　芡实配方颗粒特征图谱共确定了 9 个共有峰，并指认了 7 个共有峰成分，其中峰 2 为腺苷、峰 3 为没食子酸、峰 4 为鸟苷、峰 6 为短叶苏木酚酸、峰 7 为柯里拉京、峰 8 为尿石素 M5、峰 9 为鞣花酸。样品相似度均在 0.96 以上。含量测定结果显示，腺苷含量为 0.169 ～ 0.344 mg • g^{-1}，没食子酸含量为 0.469 ～ 1.956 mg • g^{-1}，鸟苷含量为 0.162 ～ 0.439 mg • g^{-1}，鞣花酸含量为 0.101 ～ 0.617 mg • g^{-1}。**结论**　建立的芡实配方颗粒特征图谱及主成分含量测定方法重现性好、适用范围广，可为芡实配方颗粒的质量控制提供参考。

关键词：芡实；特征图谱；高效液相色谱；配方颗粒；含量测定
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0767-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.032

HPLC specific chromatogram and quantitation of 4 components in Euryales semen formula granules

ZHANG Yao-yuan[1, 2], TONG Yi-dan[1, 2*], QIU Jun-tang[1, 2], QIN Yu-xiang[1, 2], ZHANG Hui[1, 2] (1. *China Resources Sanjiu Modern Chinese Medicine Pharmaceutical Co., Ltd., Huizhou Guangdong* 516000; 2. *Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Huaibei Anhui* 235000)

Abstract: Objective　To establish the HPLC specific chromatogram of Euryales semen formula granules and to determine the content of adenosine, gallic acid, guanosine and ellagic acid. **Methods** HPLC analysis of Euryales semen formula granules was conducted on Shim-pack GIST C18-AQ (4.6 mm×150 mm, 3.0 μm) column with the mobile phase of acetonitrile-0.5% formic acid system in gradient elution mode at a flow of 1.0 mL • min^{-1}. The ultraviolet detection wavelength was 258 nm and the column temperature was 20 ℃ . The similarity was evaluated by the traditional Chinese medicine chromatography fingerprint map similarity system. **Results**　Totally 9 Nine common peaks were identified in the characteristic chromatogram and 7 peaks were comfirmed. Peak 2 was adenosine, peak 3 was gallic acid, peak 4 was guanosine, peak 6 was brevifolin carboxylic acid, peak 7 was corilagin, peak 8 was urolithin M5, and peak 9 was ellagic acid. The similarity of multiple batches of samples was over 0.96. The content of adenosine, gallic acid, guanosine, and ellagic acid ranged 0.169 ～ 0.344 mg • g^{-1}, 0.469 ～ 1.956 mg • g^{-1}, 0.162 ～ 0.439 mg • g^{-1}, and 0.101 ～ 0.617 mg • g^{-1}. **Conclusion**　The characteristic HPLC chromatogram of Euryales semen formula granules is simple repeatable, which can comprehensively and truly reflect the quality difference in Euryales semen formula granules.

Key words: Euryales semen; characteristic chromatogram; HPLC; formula granule; content determination

基金项目：深圳市创新项目（No.JSGG20191129093418578）。
作者简介：张耀元，女，中药师，主要从事中药配方颗粒工艺及质量标准研究，email：zhangyaoyuan0128@163.com　*通信作者：仝一丹，女，中药师，主要从事中药配方颗粒工艺及质量标准研究，email：TONGYIDAN@999.com.cn

芡实，睡莲科植物芡 *Euryale ferox* Salisb. 的干燥成熟种仁，《神农本草经》《雷公炮制药性解》《本草纲目》等古籍中均有芡实入药记载，现收录于《中国药典》中，主要药效为益肾固精，补脾止泻，除湿止带[1]。芡实广泛分布于亚洲、东南亚的热带及亚热带地区，如中国、日本、韩国及印度等地[2]。主要成分有多酚、核苷、多糖、黄酮、甾醇、维生素及木脂素等[3-5]，具有抗肿瘤、免疫调节、抗菌、降血压、降血脂及抗氧化等作用[6-10]。

中药配方颗粒是依据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》，由单味药材经过炮制、提取、浓缩、干燥制成的配方用颗粒，改善了传统中药汤剂不易携带、煎煮不便的问题[11]。为更好地控制芡实配方颗粒质量，建立芡实配方颗粒的特征图谱标准，并对其中腺苷、没食子酸、鸟苷及鞣花酸进行含量测定，用于参考控制芡实配方颗粒的质量。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters ARCQUITY 色谱系统，包含 Waters 2998 二极管阵列紫外检测器、Empower 色谱管理系统（美国 Waters 公司）；百万分之一天平（XPE56，瑞士梅特勒公司）；超声仪（KQ-500DE，宁波新芝生物科技股份有限公司）。

1.2 试药

没食子酸（纯度：91.5%，批号：110831-201906）、鸟苷（纯度：88.6%，批号：111977-202202）、腺苷（纯度：99.4%，批号：110879-202204）、柯里拉京（批号：111623-200302）、鞣花酸（纯度：88.8%，批号：111959-201903）（中国食品药品检定研究院）；短叶苏木酚酸（纯度≥ 98%，批号：001718-202207，江西佰草源生物科技有限公司）；尿石素 M5（纯度≥ 98%，批号：030177-202310，上海鸿永生物科技有限公司）。甲醇、乙腈为色谱级，其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

18 批芡实药材（编号：Q1 ～ Q18）经安徽中医药大学刘守金教授鉴定为芡 *Euryale ferox* Salisb. 的干燥成熟种子，产地信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Shim-pack GIST C18-AQ（4.6 mm×150 mm，3.0 μm）色谱柱，以乙腈（A）-0.5% 甲酸（B）溶液为流动相进行梯度洗脱（0 ～ 5 min，1%A；5 ～ 11 min，1% ～ 2%A；11 ～ 15 min，2%A；15 ～ 20 min，2% ～ 4%A；20 ～ 35 min，4% ～ 15%A；35 ～ 42 min，15%A；42 ～ 46 min，15% ～ 21%A；46 ～ 58 min，21% ～ 22%A），检测波长为 258 nm，流速为 1.0 mL • min^{-1}，柱温为 20 ℃，进样量为 5 μL。

表 1 18 批芡实产地来源信息

Tab 1 Information of 18 batches of Euryales semen

批号	产地	批号	产地
Q1	广东省肇庆市高要区	Q10	安徽省合肥市庐江县
Q2	广东省肇庆市高要区	Q11	安徽省合肥市庐江县
Q3	广东省肇庆市高要区	Q12	安徽省合肥市庐江县
Q4	山东省济宁市微山县	Q13	湖南省岳阳市华容县
Q5	山东省济宁市微山县	Q14	湖南省岳阳市华容县
Q6	山东省济宁市微山县	Q15	湖南省岳阳市华容县
Q7	江西省上饶市余干县	Q16	广东省肇庆市高要区
Q8	江西省上饶市余干县	Q17	广东省肇庆市高要区
Q9	江西省上饶市余干县	Q18	广东省肇庆市高要区

2.2 配方颗粒的制备

取芡实饮片 12 500 g，破为两瓣，经过两次煎煮，煎液 65 ℃下减压浓缩至相对密度为 1.04 ～ 1.10 g • mL^{-1}[（65±5）℃] 流膏，加辅料麦芽糊精适量，混匀，喷雾干燥，干燥参数为：进口温度 160 ～ 200 ℃，出口温度 80 ～ 110 ℃，制成 1000 g 芡实配方颗粒（编号：S1 ～ S18）。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取腺苷、没食子酸、鸟苷、短叶苏木酚酸、柯里拉京、尿石素 M5、鞣花酸对照品适量，加 50% 甲醇定容制成质量浓度分别为 0.043、0.030、0.019、0.043、0.056、0.016、0.049 mg•mL^{-1} 的混合对照品溶液，备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 取芡实配方颗粒（研细）约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入 50% 甲醇 5 mL，超声（功率 250 W，频率 40 kHz）45 min，放冷，补足重量，过 0.45 μm 滤膜，取续滤液，即得。

2.3.3 阴性样品溶液的制备 取辅料麦芽糊精约 0.5 g，精密称定，照“2.2”项下方法制备，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性和系统适用性试验 精密吸取“2.3”项下三种溶液各 5 μL，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 1。供试品色谱与对照品色谱在相同保留时间呈现对应色谱峰，各峰理论塔板数均大于 8000，分离度均大于 2.0。阴性样品图谱显示无干扰，证明方法专属性很好。

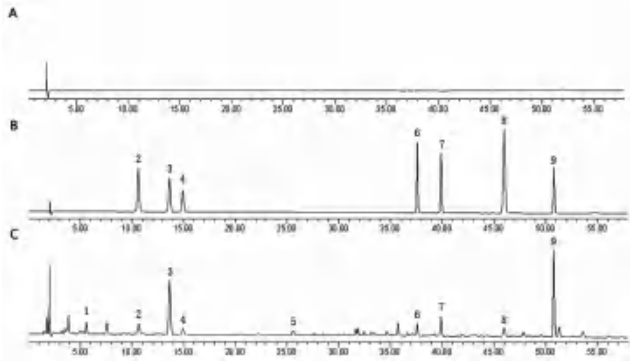


图 1　阴性样品溶液（A）、混合对照品溶液（B）及供试品溶液（C）的 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogarm of negative sample（A），mix standard（B）and sample solution（C）

2. 腺苷（adenosine）；3. 没食子酸（gallic acid）；4. 鸟苷（guanosine）；6. 短叶苏木酚酸（brevifolin carboxylic acid）；7. 柯里拉京（corilagin）；8. 尿石素 M5（urolithin M5）；9. 鞣花酸（ellagic acid）

2.4.2　精密度考察　精密吸取“2.3.2”项下供试品溶液，重复进样 6 次，以没食子酸（S_1）、鞣花酸（S_2）为双参照峰，各参照峰相对保留时间 *RSD* ＜ 0.50%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.3　重复性考察　取供试品 6 份，按“2.3.2”项下方法处理，进样测定。以没食子酸（S_1）、鞣花酸（S_2）为双参照峰，各参照峰相对保留时间 *RSD* ＜ 0.50%，相对峰面积 *RSD* ＜ 3.0%，表明方法重复性良好。

2.4.4　稳定性考察　取“2.3.2”项下供试品溶液，于 0、2、4、6、12、24 h 进样分析，以没食子酸（S_1）、鞣花酸（S_2）为双参照峰，各参照峰相对保留时间 *RSD* ＜ 0.50%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.0%，表明供试品在 24 h 内稳定。

2.5　特征图谱的建立

取“2.3.2”项下方法制备的 S1 ～ S18 供试品溶液，进样测定，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》对所得芡实配方颗粒的色谱图进行分析，18 批芡实配方颗粒共有 9 个共有峰。HPLC 叠加指纹图谱见图 2，生成的对照共有模式图见图 3。根据对照品指认，确定峰 2 为腺苷、峰 3 为没食子酸、峰 4 为鸟苷、峰 6 为短叶苏木酚酸、峰 7 为柯里拉京、峰 8 为尿石素 M5、峰 9 为鞣花酸。根据各峰响应值、保留时间等因素，确定以峰 3 没食子酸为 S_1 峰，峰 9 鞣花酸为 S_2 峰，分别计算峰 1、2、4、5 与 S_1 峰的相对保留时间，峰 6、7、8 与 S_2 峰的相对保留时间，规定值为：0.42（峰 1）、0.78（峰 2）、1.10（峰 4）、1.87（峰 5）、0.74（峰 6）、0.78（峰 7）、0.91（峰 8）。

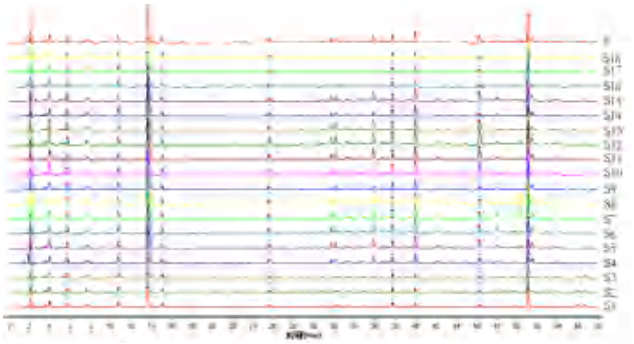


图 2　18 批芡实配方颗粒特征图谱

Fig 2　HPLC characteristic chromatograms of 18 batches of Euryales semen formula granules

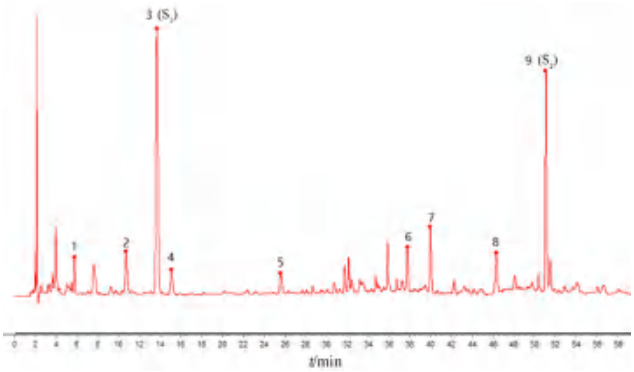


图 3　芡实配方颗粒特征图谱共有模式图

Fig 3　HPLC specific chromatogram of Euryales semen formula granules

2.6　相似度评价

以对照特征图谱为标准，根据《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》，18 批芡实配方颗粒相似度依次为 1.000、0.999、0.995、0.991、0.997、0.994、0.992、0.982、0.990、0.989、0.998、0.975、0.977、0.961、0.975、0.976、0.974、0.975，均大于 0.96。证明各批芡实配方颗粒质量较为稳定，成分差异较小。

2.7　含量测定

2.7.1　线性关系考察　精密称取腺苷、没食子酸、鸟苷、鞣花酸对照品适量，加 50% 甲醇定容制成质量浓度分别为 0.1050、0.2649、0.0756、0.1290 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。精密移取混合对照品溶液 2、4、6、8、10 mL 分别置于 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇定容至刻度，摇匀，即得系列浓度混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件测定，记录各对照品峰面积，以对照品溶液质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*），绘制标准曲线，结果见表 3。

表 3 芡实配方颗粒各成分线性关系

Tab 3 Linearity of each component in Euryales semen formula granule

组分	回归方程	r	范围 /（μg•mL^{-1}）
腺苷	$Y=8.949\times10^6X-1.717\times10^5$	0.9994	20.993 ～ 104.996
没食子酸	$Y=3.806\times10^6X-1.903\times10^3$	0.9999	52.979 ～ 264.893
乌苷	$Y=7.162\times10^6X-1.920\times10^5$	0.9999	15.115 ～ 75.576
鞣花酸	$Y=2.100\times10^7X-5.001\times10^3$	0.9998	25.804 ～ 129.021

2.7.2 精密度试验 取“2.3.2”项下同一份供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次，计算各成分峰面积 *RSD* 值分别为 0.06%、0.14%、0.15%、0.24%，表明方法日内精密度良好。取同一批供试品溶液，分别由 2 位检测人员在不同时间在同一台设备进样测定，计算各成分峰面积 *RSD* 值分别为 0.72%、0.73%、0.81%、1.6%，表明方法中间精密度良好。

2.7.3 稳定性试验 取供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样，各成分峰面积 *RSD* 值分别为 0.14%、0.26%、0.31%、0.24%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7.4 重复性试验 取供试品 6 份，按“2.3.2”项下方法处理进样测定。计算 4 个成分含量 *RSD* 值分别为 1.2%、0.54%、1.8%、0.63%，说明该方法重复性良好。

2.7.5 加样回收试验 取芡实配方颗粒供试品 9 份，每份约 0.25 g，精密称定，供试品中指标成分含量与加入对照品量之比为 1∶1，分别加入适量的对照品溶液，按“2.3.2”项下方法制备，进样测定，计算得平均回收率分别为 101.33%、104.32%、100.35%、98.04%，*RSD* 值分别为 1.2%、1.9%、1.2%、1.8%，表明该方法回收率良好。

2.7.6 样品含量测定 分别取 18 批芡实配方颗粒供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，计算各成分含量，结果见表 4。18 批芡实配方颗粒中腺苷、没食子酸、乌苷、鞣花酸的含量分别为 0.169 ～ 0.344 mg•g^{-1}、0.469 ～ 1.956 mg•g^{-1}、0.162 ～ 0.439 mg • g^{-1}、0.101 ～ 0.617 mg • g^{-1}。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

本试验比较了甲醇 - 水、乙腈 - 水作为梯度洗脱的流动相，乙腈 - 水流动相系统下芡实各成分保留时间合适，总检测时间较短。但是在纯水相洗脱下，色谱峰峰形不佳，因此将流动相替换为乙腈 -0.2% 磷酸、乙腈 -0.2% 醋酸、乙腈 -0.2% 甲酸进行考察，发现当水相选择甲酸时，芡实特征图谱中各色谱峰出峰时间合适、分离度良好，图谱基线平稳。对不同甲酸浓度进行考察，最终确定流动相为乙腈 -0.5% 甲酸水。

表 4 18 批芡实配方颗粒含量测定结果 (mg • g^{-1})

Tab 4 Content of components in 18 batches of Euryales semen formula granules (mg • g^{-1})

编号	腺苷	没食子酸	乌苷	鞣花酸
S1	0.221	0.660	0.236	0.255
S2	0.212	0.641	0.228	0.255
S3	0.213	0.644	0.229	0.249
S4	0.200	1.385	0.287	0.527
S5	0.201	1.358	0.276	0.602
S6	0.193	1.324	0.267	0.538
S7	0.227	1.412	0.308	0.282
S8	0.265	1.543	0.282	0.385
S9	0.213	1.956	0.439	0.497
S10	0.344	1.271	0.279	0.475
S11	0.212	1.101	0.229	0.593
S12	0.169	1.382	0.294	0.555
S13	0.214	1.351	0.283	0.617
S14	0.212	1.319	0.271	0.570
S15	0.201	1.311	0.273	0.551
S16	0.209	0.593	0.218	0.101
S17	0.207	0.473	0.162	0.127
S18	0.170	0.469	0.164	0.214

本特征图谱的两种主要成分为多酚类与腺苷类，结合两者的紫外最大吸收波长，并比较了不同波长下液相图谱情况，最终确定检测波长为 258 nm。

针对该色谱方法进行适用性考察，在不同色谱柱 [Agilent poroshell AQ（4.6 mm×150 mm，2.7 μm）、Waters CORTECS T3（4.6 mm×150 mm，2.7 μm）、CAPCELL CORE（4.6 mm×150 mm，2.7 μm）]、不同品牌液相设备（Waters Arc 高效液相色谱仪、Agilent 1200 高效液相色谱仪、戴安 U3000 高效液相色谱仪）下，芡实配方颗粒特征图谱均良好重现，各特征峰清晰无干扰，图谱较为一致，证明该检测方法适用性好。

3.2 供试品制备条件优化

根据 2020 年版《中国药典》芡实炮制方法，芡实用时需要捣碎。本试验考察了饮片破碎程度对配方颗粒的影响，结果证明，随着破碎程度的加大，鞣花酸含量会随之降低，为了控制配方颗粒质量，规定芡实饮片破碎程度为两瓣。

供试品溶液制备提取溶剂为水时，色谱峰缺失；溶剂为乙醇时，部分色谱峰变形。用不同比例甲醇提取，结果发现使用甲醇比例越高，各特

征峰总峰面积越大，但当甲醇比例高于 70% 时，部分峰形状改变，因此选择 50% 甲醇作为提取溶剂。超声提取和回流提取的供试品图谱未见明显差异，考虑操作简便，选择超声提取。考察提取溶剂量范围为 5 ～ 15 mL，5 mL 时各特征成分均能很好提取，随着溶剂量增加，各特征峰响应降低，因此溶剂量选择 5 mL。提取时间考察 15 ～ 60 min，在 45 min 后，特征峰总峰面积没有明显增加。最终确定本文色谱条件，所得到的特征图谱色谱峰信息全面、图谱基线平稳，各色谱峰响应值合适、分离度、对称性良好。

3.3　结果分析

关于芡实药材及其制剂的分析检测方法研究较少。蔡嘉洛等[12]研究了黄精芡实汤的指纹图谱方法，并在该图谱中指认了芡实的主要成分没食子酸。陈蓉等[13]建立了芡实药材的指纹图谱，但未指认特征峰成分。现有研究从植物芡 *Euryale ferox* Salisb. 的不同部位中分离到了 100 多种成分，多酚类成分占比 87%，集中于种子、种壳中[14]，除此以外，种子中还含有多糖、核苷类、生育酚等物质。芡实以芡的种仁入药，芡实配方颗粒为经水煮后提取的物质所制，因此对芡实配方颗粒的研究应该集中于芡实的水溶性成分。

本研究经过对 18 批芡实配方颗粒样品的分析，其特征图谱中共确定了 9 个共有峰，通过对照品定位指认了其中 7 个化学物质，可以分为两类：① 多酚及其衍生物，如峰 3 没食子酸、峰 6 短叶苏木酚酸、峰 9 鞣花酸、峰 7 柯里拉京、峰 8 尿石素 M5；② 核苷类，如峰 2 腺苷及峰 4 鸟苷。为了更好地控制芡实配方颗粒的质量，确定峰 3 没食子酸为 S_1 峰，峰 9 鞣花酸为 S_2 峰，并对各峰的相对保留时间进行了规定。同时对芡实特征图谱的双 S 峰没食子酸、鞣花酸及核苷类成分腺苷、鸟苷进行含量测定，更方便对芡实配方颗粒进行质量控制。

综上所述，本试验确定了一种芡实配方颗粒的特征图谱及含量方法，该方法稳定、适用性好，可为芡实配方颗粒的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：170.

[2] Yamada T，Imaichi R，Kato M. Developmental morphology of ovules and seeds of Nymphaeales [J]. Am J Bot，2001，88（6）：963-974.

[3] Jha V，Shalini R，Kumari A，et al. Aquacultural，nutritional and therapeutic biology of delicious seeds of *Euryale ferox* Salisb. ：a minireview [J]. Curr Pharm Biotechno，2018，19（7）：545-555.

[4] Kapoor S，Kaur A，Kaur R，et al. *Euryale ferox*，a prominent superfood：nutritional，pharmaceutical，and its economical importance [J]. J Food Biochem，2022，46（12）：e14435.

[5] Sun HL，Zhang YQ，Xie XY，et al. Studies on chemical constituents from seeds of *Euryale ferox* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials，2014，37（11）：2019-2021.

[6] Nam GH，Jo KJ，Park YS，et al. In vitro and in vivo induction of p53-dependent apoptosis by extract of *Euryale ferox* Salisb. in A549 human Caucasian lung carcinoma cancer cells is mediated through Akt signaling pathway [J]. Front oncol，2019，9：406.

[7] Wu CY，Chen R，Wang XS，et al. Antioxidant and anti-fatigue activities of phenolic extract from the seed coat of *Euryale ferox* Salisb. and identification of three phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS [J]. Molecules，2013，18（9）：11003-11021.

[8] Jian TY，Yu C，Ding XQ，et al. Hepatoprotective effect of seed coat of *Euryale ferox* extract in non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in mice by increasing IRs-1 and inhibiting CYP2E1[J]. J Oleo Sci，2019，68（6）：581-589.

[9] Huang ZH，Huang XY，Wang Q，et al. Extract of *Euryale ferox* Salisb exerts antidepressant effects and regulates autophagy through the adenosine monophosphate-activated protein kinase——UNC-51-like kinase 1 pathway [J]. IUBMB life，2018，70（4）：300-309.

[10] Liu L，Liu YY，Zhan Y，et al. Research progress in chemical components，pharmacological action and clinical application of Semen Euryales [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine，2015，30：477-479.

[11] 吴用彦，李青蔚，李红亮 . 中药配方颗粒的研究现状及存在问题的思考 [J]. 中南药学，2019，17（1）：78-83.

[12] 蔡嘉洛，李晓屏，朱贻霖，等 . 黄精芡实汤高效液相色谱指纹图谱结合化学模式识别评价及 3 个主成分含量测定研究 [J]. 广州中医药大学学报，2023，40（1）：188-196.

[13] 陈蓉，张超，张华锋，等 . 高效液相指纹图谱结合化学计量学评价不同产地芡实的质量 [J]. 西北药学杂志，2017，32（4）：446-450.

[14] Jiang JH，Ou HY，Chen RY，et al. The ethnopharmacological，phytochemical，and pharmacological review of *Euryale ferox* Salisb. ：a Chinese medicine food homology [J]. Molecules，2023，28（11）：4399.

（收稿日期：2023-11-24；修回日期：2023-12-18）

医院药学

免疫检查点抑制剂所致免疫相关性肝损伤的真实世界研究

唐亚娟，史金平，张琰，白娟，袁海玲*（西安国际医学中心医院，西安 710100）

摘要：目的 探讨免疫相关性肝损伤（IMH）的临床特征、危险因素、治疗方案及预后等情况，为临床识别 IMH 的高危患者提供依据，并对临床 IMH 患者的治疗及预后评估提供参考。**方法** 收集我院 2021 年 7 月—2022 年 7 月接受免疫检查点抑制剂（ICIs）治疗后出现 IMH 的肿瘤患者临床资料，分析 IMH 的临床特征、危险因素、治疗方案及预后。**结果** IMH 发生率为 6.6%，≥ 3 级 IMH 的发生率为 6.2%；70.7% 的 IMH 发生于用药 3 个月内；34.1% 的 IMH 表现为无症状的转氨酶升高，65.9% 的 IMH 表现为全身皮肤巩膜黄染或乏力。43.9% 的 IMH 为肝细胞损伤型，36.6% 为胆汁淤积型，19.5% 为混合型。IMH 的发生在患者是否发生肝转移及联合用药方面差异具有统计学意义；39 例 IMH 经糖皮质激素或联合吗替麦考酚酯、他克莫司等药物积极治疗后缓解，1 例患者经糖皮质激素单药治疗效果不佳出现肝功能衰竭，1 例患者停药后未经治疗出现肝功能衰竭；随访 6 个月，4 例患者出现 IMH 复发，2 例患者再次使用 ICIs 未发现 IMH 复发。**结论** IMH 总体发生率与患者的年龄、性别、体质量指数及是否合并乙肝病史无相关性，患者原发肿瘤类型、是否发生肝转移及联合用药为 IMH 的危险因素；IMH 的预后总体较好，复发率低。

关键词：免疫相关性肝损伤；临床特征；危险因素；风险评估；预后
中图分类号：R735.7 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0772-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.033

A real-world study of immune mediated hepatitis induced by immune checkpoint inhibitors

TANG Ya-juan, SHI Jin-ping, ZHANG Yan, BAI Juan, YUAN Hai-ling* (*Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an* 710100)

Abstract: Objective To determine the clinical features, risk factors, treatment plan and prognosis of immune checkpoint inhibitors (ICIs)-induced immune mediated hepatitis (IMH), and provide evidence for clinical identification of high-risk patients with IMH, for clinical treatment and prognosis evaluation of patients with IMH. **Methods** The clinical data of tumor patients with IMH after receiving ICIs in our hospital from July 2021 to July 2022 were collected, and the clinical features, risk factors, treatment plan and prognosis of IMH were analyzed. **Results** The incidence of IMH was 6.6%, and the incidence of ≥ grade 3 IMH reached 6.2%. About 70.7% of IMH occurred within 3 months of the treatment, 34.1% of IMH showed asymptomatic elevated aminotransferase, while 65.9% of IMH showed systemic skin sclera yellow staining or weakness. About 43.9% of IMH belonged to hepatocyte injury type, 36.6% cholestasis type and 19.5% mixed type. The incidence of IMH was an important index in the liver metastasis and combination therapy. Thirty-nine patients with IMH were improved after active treatment with glucocorticoids or combined with mycophenolate morpheate, tacrolimus and other drugs. One patient had liver failure after glucocorticoid monotherapy with poor effect, and another had liver failure after drug withdrawal without treatment. After 6 months of follow-up, IMH recurred in 4 patients and no IMH recurred in 2 of them after ICIs reuse. **Conclusion** The overall incidence of IMH is not related

基金项目：西安国际医学中心医院青年课题（编号：2021QN009）。
作者简介：唐亚娟，女，主管药师，主要从事临床药学及药物安全性评价研究，email：yezi11ok@163.com *__通信作者：__袁海玲，女，主任药师，主要从事临床药学与药事管理研究，email：aliceyuanhailing@163.com

to age, sex, body mass index and history of hepatitis B. Primary tumor type, liver metastasis and drugs combination are the risk factors for IMH. The prognosis of IMH is generally good with low recurrence.

Key words: immune checkpoint inhibitors-induced immune mediated hepatitis; clinical feature; risk factor; risk assessment; prognosis

免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitors，ICIs）作为肿瘤免疫治疗的方法之一，为肿瘤患者带来了显著生存获益，已被批准用于多种肿瘤的治疗[1-4]。ICIs能抑制肿瘤细胞通过程序性死亡受体1（PD-1）/程序性死亡配体1（PD-L1）和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4（CTLA-4）等通路从而逃避免疫系统攻击的机制，增强免疫系统对肿瘤的攻击力，从而抑制肿瘤生长。然而，ICIs也会破坏机体免疫耐受平衡，出现全身多个脏器的免疫相关不良事件（immune-related adverse events，irAEs）[5-6]。免疫相关性肝损伤（ICI-induced immune mediated hepatitis，IMH），是一种严重的irAEs，主要是由免疫系统反应增强引起的继发性肝损伤，属于间接的药物性肝损伤，对患者影响大[7-8]。目前，ICIs所致IMH的研究数据相对较少，本研究通过对我院2021年7月—2022年7月住院接受ICIs治疗后出现IMH的肿瘤患者的临床资料进行回顾性研究，探讨IMH的临床特征、危险因素、治疗方案及预后情况，以期为临床识别IMH的高危患者提供依据，并对临床IMH患者的治疗及预后评估提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

回顾性收集我院2021年7月—2022年7月接受ICIs治疗的肿瘤患者的临床资料。纳入标准：① 年龄≥18岁；② 有明确病理诊断的恶性肿瘤患者，并接受了ICIs单药或联合其他全身抗肿瘤药物治疗；③ 排除其他肝损伤可能性，临床明确诊断为IMH的患者；④ 患者一般资料、实验室检测结果、影像学检查结果资料完善。排除标准：① 使用ICIs前肝功能生化指标异常的患者；② 合并其他疾病或使用其他药物引起的肝功能异常者；③ 各种原因而不能完成相关检查者。

1.2 研究方法

1.2.1 资料收集 采用回顾性分析方法，收集患者基本资料[年龄、性别、体质量指数（BMI）]、原发肿瘤类型、肝转移、乙肝病史、ICIs类别、ICIs药物及联合用药；IMH的发生情况（临床特征、发生时间），IMH的分级及分型；IMH的治疗（使用药物、用药时间）及预后（转归情况、复发情况）等进行统计分析。

1.2.2 相关指标定义

① IMH鉴别诊断：IMH的诊断为排除性诊断，通过患者病史、药物治疗史、体格检查及诊断性评估排除肝功能异常的其他原因来确诊。鉴别诊断范围包括病毒性肝炎、肝脏肿瘤进展、饮酒或其他药物等引起的肝损伤。

② ICIs与肝损伤的因果关系判定：采用RUCAM量表[9]评分，结果分为5级：排除（＜1分）、不太可能（1～2分）、可能（3～5分）、很可能（6～8分）或极有可能（＞8分）。

③ IMH严重程度分级：依据美国国家癌症研究所不良事件通用术语标准（National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events，NCI CTC AE v5.0）[10]，对免疫治疗相关肝毒性的严重程度进行分级。1级：谷草转氨酶（AST）或谷丙转氨酶（ALT）1～3×正常值上限（ULN），总胆红素1～1.5×ULN；2级：AST或ALT 3～5×ULN，总胆红素1.5～3×ULN；3级：AST或ALT 5～20×ULN，总胆红素3～10×ULN；4级：AST或ALT＞20×ULN，总胆红素＞10×ULN。

④ 肝损伤类型：依据2023年版《中国药物性肝损伤诊断指南》[11]，以疑似药物性肝损伤（DILI）事件的首次异常肝脏生物化学检查结果计算R值，R值＝[ALT实测值/ALT的ULN]/[碱性磷酸酶（ALP）实测值/ALP的ULN]。根据R值，肝损伤类型分为 ① 肝细胞损伤型：ALT ≥ 3 ×ULN，且R ≥ 5；② 胆汁淤积型：ALP ≥ 2 × ULN，且R ≤ 2；③ 混合型：ALT ≥ 3 ×ULN，ALP ≥ 2 ×ULN，且2 ＜ R ＜ 5。

1.3 统计分析

采用SPSS 20.0软件进行统计分析，正态分布计量资料以均数 ± 标准差表示，非正态分布计量资料以M（P_{25}，P_{75}）表示；计数资料用例数（百分比）[n（%）]表示。正态分布计量资料两组数据间的比较采用t检验，非正态分布计量资料两组数据间的比较采用Mann-Whitney U检验；计数资料比较采用χ^2检验，多因素分析采用Logistic回归分析，P ＜ 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料

共纳入接受 ICIs 治疗的恶性肿瘤患者 625 例，其中位年龄数为 62 岁，以男性患者居多（74.6%），中位 BMI 为 21.95 kg·m^{-2}，以肺癌（43.8%）、肝癌（22.7%）居多，余情况详见表 1。

表 1 接受 ICIs 治疗患者的基线特征

Tab 1 Baseline characteristics of patients receiving ICIs

可变因素	基线特征	总计（n = 625）	未发生 IMH（n = 584）	发生 IMH（n = 41）	P 值
年龄 / 岁		62.0（54.0，69.0）	63.0（54.0，69.0）	59.0（52.5，68.0）	0.073
BMI/（kg·m^{-2}）		21.95（21.2，25.3）	21.95（21.2，25.3）	21.90（21.0，24.8）	0.465
性别 [n（%）]	男	466（74.6）	437（74.8）	29（70.7）	0.560
	女	159（25.4）	147（25.2）	12（29.3）	
原发肿瘤类型 [n（%）]	肺癌	274（43.8）	252（43.2）	22（53.7）	0.007
	肝癌	142（22.7）	128（21.9）	14（34.2）	
	肾癌	12（1.9）	10（1.7）	2（4.9）	
	胰腺癌	24（3.8）	22（3.8）	2（4.9）	
	食管癌	58（9.3）	57（9.8）	1（2.4）	
	其他	115（18.4）	115（19.7）	0（0.0）	
乙肝病史 [n（%）]	是	80（12.8）	72（12.3）	8（19.5）	0.183
	否	545（87.2）	512（87.7）	33（80.5）	
肝转移 [n（%）]	是	61（9.8）	46（7.9）	15（36.6）	＜ 0.001
	否	564（90.2）	538（92.1）	26（63.4）	
ICIs 类别 [n（%）]	PD-1	606（97.0）	567（97.3）	39（95.1）	0.811
	PD-L1	19（3.0）	17（2.7）	2（4.9）	
ICIs 药物 [n（%）]	卡瑞利珠单抗	211（33.8）	199（34.1）	12（29.3）	＜ 0.001
	信迪利单抗	165（26.4）	159（27.2）	6（14.6）	
	替雷利珠单抗	105（16.8）	97（16.7）	8（19.5）	
	特瑞普利单抗	75（12.0）	73（12.5）	2（4.9）	
	帕博利珠单抗	48（7.7）	38（6.5）	10（24.4）	
	纳武利尤单抗	2（0.3）	1（0.2）	1（2.4）	
	度伐利尤单抗	10（1.6）	8（1.4）	2（4.9）	
	阿替利珠单抗	9（1.4）	9（1.5）	0（0.0）	
联合用药 [n（%）]	联合化疗药物	362（57.9）	347（59.4）	15（36.6）	0.002
	联合靶向药物	207（33.1）	183（31.3）	24（58.5）	
	ICIs 单药	56（9.0）	54（9.3）	2（4.9）	

2.2 IMH 的影响因素

单因素分析显示，IMH 的发生在原发肿瘤类型、肝转移、ICIs 药物及联合用药的差异有统计学意义（P ＜ 0.05），而性别、年龄、BMI、乙肝病史及 ICIs 类别与 IMH 发生无关，详见表 1。多因素分析显示，IMH 危险因素为肝转移（P ＜ 0.001）及联合用药（P ＜ 0.001），而 IMH 的发生在原发肿瘤类型（P = 0.859）及 ICIs 药物（P = 0.340）中并无显著性差异，详见表 2。

表 2 IMH 的多因素 Logistic 回归分析

Tab 2 Multivariate Logistic regression analysis of IMH

可变因素	回归系数	标准误	Z 值	Wald χ^2	P 值	OR 值	OR 值 95%CI
原发肿瘤类型	0.021	0.120	0.178	0.032	0.859	1.022	0.807 ～ 1.294
是否肝转移	1.515	0.420	3.606	13.005	＜ 0.001	4.552	1.997 ～ 10.372
联合用药	1.177	0.327	3.599	12.954	＜ 0.001	3.244	1.709 ～ 6.156
ICIs 药物	0.083	0.087	0.955	0.912	0.340	1.086	0.917 ～ 1.287
截距	－ 7.534	1.185	－ 6.357	40.407	＜ 0.001	0.001	0.000 ～ 0.005

2.3 IMH 的临床特征

41 例 IMH 患者中，IMH 发生时间最短为 ICIs 用药后 1 周，最长为初始 ICIs 用药后 57 周，其中在用药 0 ～ 3 个月时 IMH 的发生率最高，使用 ICIs 后发生 IMH 最短周期为 1 周期，最长周期为 13 周期。其中在 ICIs 用药 1 ～ 5 周期后 IMH 的发生率最高。41 例 IMH 患者中 14 例（34.1%）表现为无症状的转氨酶升高，27 例（65.9%）有临床症状。免疫相关性肝损伤的严重程度分级及肝损伤类型，详见表 3。

2.4 IMH 的治疗及转归

2.4.1 IMH 的治疗方案　41 例患者出现 IMH 后均停用 ICIs，其中 26 例（63.4%）使用糖皮质激素单药治疗，13 例（31.7%）使用糖皮质激素联合吗替麦考酚酯治疗，1 例（2.4%）患者使用糖皮质激素联合吗替麦考酚酯及他克莫司治疗，1 例患者停用 ICIs，未进行抗 IMH 治疗。

表 3　IMH 的临床特征

Tab 3　Clinical features of IMH

发生情况	项目	例数 [*n*（%）]
用药时间	0 ～ 1 个月	12（29.3）
	1 ～ 3 个月	17（41.5）
	3 ～ 6 个月	4（9.8）
	＞ 6 个月	8（19.5）
用药周期	1 ～ 2 周期	24（58.5）
	3 ～ 5 周期	5（12.2）
	6 ～ 8 周期	6（14.6）
	＞ 8 周期	6（14.6）
临床症状	无临床症状	14（34.1）
	全身皮肤及巩膜黄染	23（56.1）
	乏力	4（9.8）
IMH 严重程度分级	2 级	2（4.9）
	3 级	35（85.4）
	4 级	4（9.8）
肝损伤类型	肝细胞损伤型	18（43.9）
	胆汁淤积型	15（36.6）
	混合型	8（19.5）

2.4.2　IMH 的治疗时间　使用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠治疗平均时间为（14.90±6.499）d，后续口服序贯泼尼松片治疗平均时间为（19.11±11.295）d，吗替麦考酚酯治疗平均时间为（17.29±8.185）d，他克莫司治疗平均时间为 30 d，详见表 4。

表 4　IMH 的治疗药物使用时间

Tab 4　Time of use of therapeutic drugs for IMH

使用药物	例数 [*n*（%）]	使用天数 /d
注射用甲泼尼龙琥珀酸钠	40（97.6）	14.90±6.499（6 ～ 30）
醋酸泼尼松片	35（85.4）	19.11±11.295（4 ～ 50）
吗替麦考酚酯分散片	15（36.6）	17.29±8.185（5 ～ 30）
他克莫司	1（2.4）	30

2.4.3　IMH 的预后　39 例患者使用糖皮质激素或联合吗替麦考酚酯及他克莫司等药物积极治疗后肝功能指标基本恢复正常；1 例胆汁淤积型 IMH 患者接受糖皮质激素治疗 6 d，因肝功能进一步恶化放弃治疗；1 例胆汁淤积型 IMH 患者停用 ICIs，未行糖皮质激素或吗替麦考酚酯等药物治疗，肝功能持续恶化放弃治疗。

随访 6 个月，39 例肝功能指标恢复的 IMH 患者中，35 例（89.7%）患者未出现肝功能异常，4 例（10.3%）胆汁淤积型 IMH 患者再次出现肝功能异常，临床考虑为 IMH 复发，IMH 复发时间为停止激素治疗后（50±1.155）d。35 例未再出现肝功能异常的患者中，有 2 例患者再次使用 ICIs 度伐利尤单抗，随访 6 个月肝功能指标未出现明显异常。

3　讨论

本研究回顾性分析了我院 ICIs 导致 IMH 的临床资料，探究 IMH 的临床特征、危险因素、治疗方案及预后等情况，为临床 IMH 的识别及处理提供参考。

3.1　IMH 的临床特征

ICIs 引起的 IMH 是一种严重 irAEs，可能导致肝功能衰竭，近年来相关报道逐渐增多，已经成为备受关注的临床问题。IMH 可发生于首次使用 ICIs 后的任意时间，据相关文献报道，ICIs 使用后 IMH 发生时间大多在治疗开始后 1 ～ 5 个月内，但也有极个别病例发生时间在用药 1 年以上 [12]。本研究显示 IMH 发生于 ICIs 用药后 1 ～ 57 周，其中 70.7% 的 IMH 发生于用药后 3 个月内，9.8% 发生于用药后 3 ～ 6 个月，19.5% 发生于用药 6 个月后；使用 ICIs 后发生 IMH 的用药周期最短为 1 周期，最长为 13 周期，其中在用药 1 ～ 5 周期后 IMH 的发生率最高。文献报道，患者发生 IMH 主要表现为 ALT 和 / 或 AST 升高，伴或不伴有胆红素、ALP 升高。IMH 一般无特征性的临床表现，偶有患者伴有发热、疲乏、食欲下降等非特异性症状，胆红素升高时可出现全身皮肤及巩膜黄染等 [13-14]。本研究显示 65.9% 的 IMH 患者临床症状表现为全身皮肤及巩膜黄染或乏力，34.1% 患者表现为无症状的转氨酶升高。IMH 发生率及其严重程度分级分布差异很大，文献报道 IMH 的发生率为 3.6% ～ 14.4%，≥ 3 级 IMH 的发生率为 4.3% ～ 7.6%[15-17]，本研究显示 IMH 发生率为 6.6%，≥ 3 级 IMH 发生率为 6.2%，与文献报道相似 [15-17]。发生 IMH 后肝损伤类型有胆汁淤积型、肝细胞损伤型、混合型，其中肝细胞损伤型更常见。本研究显示肝细胞损伤型 18 例（43.9%），胆汁淤积型 15 例（36.6%），混合型 8 例（19.5%），与文献报道一致 [18]。

3.2　IMH 的危险因素

一项荟萃分析结果表明年轻患者使用 ICIs 治疗较老年患者的 IMH 发生率高 [19]，可能是由于老年人 T 细胞激活所需的共刺激分子减少，在接受 ICIs 治疗的年轻患者中，T 细胞可能被过度激活以攻击肝细胞，从而导致 IMH 的发生。本研究结果显示 IMH 的中位年龄 59 岁，低于未发生 IMH 的中位年龄，但并无统计学差异（P ＝ 0.073）。Miah 等 [20] 研究报道女性是 IMH 的危险因素，而本研究结果并未显示 IMH 与性别之间存在显著性差异。荟萃分析结果表明 IMH 患者中 ICIs 联合治疗的比例显著高于非 IMH 联合治疗的患者，具有显著的异质性（P ＝ 0.003）[19]，本研究结果显示联合用药为 IMH 的独立危险因素，ICIs 联合靶向药物的 IMH 发生率高于 ICIs 单药或联合化疗，与研究报道一致 [21-22]。在接受 ICIs 治疗的肝癌患者与其他实体肿瘤相比，ALT/AST 升

高的发生率较高[23]。本研究结果并未显示肝癌与IMH存在统计学差异。有研究报道肝转移患者使用ICIs，可能增加IMH风险[24]，本研究结果显示肝转移为IMH的危险因素，与研究报道一致[24]。

3.3 IMH的治疗及预后

ICIs导致IMH的治疗方案包括停用ICIs及使用免疫抑制剂等[25]，中国临床肿瘤学会（CSCO）ICIs相关的毒性管理指南建议：2级IMH暂停ICIs，每日使用0.5～1 mg·kg^{-1}泼尼松口服，如肝功能好转，缓慢减量，总疗程至少4周；3级IMH建议永久停用ICIs，静脉使用甲泼尼龙1～2 mg·kg^{-1}，3 d后若肝功能无好转，考虑加用麦考酚酯，如效果仍不佳，可联合免疫抑制剂如托珠单抗、他克莫司、环孢素、硫唑嘌呤等[26]。本研究41例IMH患者中有39例患者使用糖皮质激素或联合吗替麦考酚酯及他克莫司等药物积极治疗后肝功能指标基本恢复正常，其中25例患者使用甲泼尼龙治疗后肝功能好转；14例患者使用甲泼尼龙治疗3 d后肝功能缓解不明显，其中13例患者加用吗替麦考酚酯后肝功能好转，1例患者加用吗替麦考酚酯后治疗效果不佳，联合他克莫司后肝功能好转。IMH患者严重时可出现急性肝衰竭[27-28]，在本研究中出现2例，其中1例患者使用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠治疗6 d后，肝功能未见明显缓解，放弃治疗导致肝功能衰竭；1例患者停用ICIs后未进行积极治疗，导致肝功能衰竭。

肝细胞损伤型IMH预后相对较好，通常对糖皮质激素治疗有效，较少发生肝功能衰竭和死亡。大多数患者在1～3个月恢复至基线肝功能状态[29-30]。胆汁淤积型及混合型IMH肝损伤对糖皮质激素和免疫抑制剂治疗不敏感，预后相对较差[31-33]。本研究结果发现15例胆汁淤积型IMH患者中，10例患者使用单药甲泼尼龙后肝功能好转，3例患者加用吗替麦考酚酯后肝功能好转，1例胆汁淤积型未经治疗出现肝功能衰竭，1例胆汁淤积型经糖皮质激素治疗后效果不佳放弃治疗后出现肝功能衰竭。8例混合型IMH患者中，1例使用甲泼尼龙后肝功能好转；6例患者使用甲泼尼龙治疗效果不佳，加用吗替麦考酚酯后肝功能好转；1例使用甲泼尼龙联合吗替麦考酚酯后效果仍不佳，联用他克莫司后肝功能好转。本研究结果显示肝细胞损伤型IMH使用甲泼尼龙治疗有效，胆汁淤积型尤其混合型IMH单独使用甲泼尼龙治疗效果不佳，往往需加用吗替麦考酚酯或他克莫司等，与既往研究结果一致[31-33]。

随访6个月，39例IMH治愈的患者中，35例（89.7%）患者未复发，4例（10.3%）患者复发。分析4例复发的IMH患者病例特点，结果发现IMH复发患者均为胆汁淤积型，既往单独使用糖皮质激素治愈，停用糖皮质激素后（50±1.155）d复发。结果表明胆汁淤积型IMH较肝细胞损伤型IMH复发率高，单独使用糖皮质激素治疗复发风险高。

Li等[34]对接受ICIs治疗后出现IMH的102例患者进行回顾性研究，31例再次使用ICIs的患者中仅有4例出现IMH复发，需要停用ICIs。本研究中2例IMH患者肝功能恢复正常后使用ICIs度伐利尤单抗，随访6个月，均未出现IMH复发。研究表明IMH再次使用ICIs是相对安全的，评估患者病情后可考虑再次使用ICIs。

4 小结

本研究就IMH的临床特征、危险因素、治疗方案及预后等方面进行阐述，结果表明ICIs引起的IMH的临床特征缺乏特异性，肝转移、联合用药是IMH的危险因素，IMH的预后总体较好，在积极治疗后较少发生肝功能衰竭或死亡，且复发率低。本研究结果为临床识别IMH的高危患者提供了依据，并对临床IMH患者的治疗及预后评估提供了参考。

本研究为回顾性研究，有以下局限之处：首先，目前对于IMH没有明确的诊断标准，其诊断为排除性诊断，≥2级IMH通常推荐肝活检，以排除其他肝病原因，并评估IMH的组织学严重程度，然而，本研究未发现真实世界中进行肝活检的病例；其次该研究样本量小，部分患者由于资料和实验室数据不完善而被排除，可能对统计分析造成影响。为了克服这些局限性，未来需要开展多中心前瞻性研究进行验证。

参考文献

[1] Motzer RJ，Escudier B，McDermott DF，et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma [J]. N Engl J Med，2015，373（19）：1803-1813.

[2] Nghiem PT，Bhatia S，Lipson EJ，et al. PD-1 blockade with pem-brolizumab in advanced merkel-cell carcinoma [J]. N Engl J Med，2016，374（26）：2542-2552.

[3] Ferris RL，Blumenschein G，Fayette J，et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck [J]. N Engl J Med，2016，375（19）：1856-1867.

[4] Garon EB，Rizvi NA，Hui R，et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med，2015，372（21）：2018-2028.

[5] Postow MA，Sidlow R，Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：158-168.

[6] Suzman DL，Pelosof L，Rosenberg A，et al. Hepatotoxicity of immune checkpoint inhibitors：an evolving picture of risk associated with a vital class of immunotherapy agents [J]. Liver

Int，2018，38（6）：976-987.

[7] Loomba R，Liang TJ. Hepatitis B reactivation associated with immune suppressive and biological modifier therapies：current concepts，management strategies，and future directions [J]. Gastroenterology，2017，152（6）：1297-1309.

[8] Lombardi A，Mondelli MU. Review article：immune checkpoint inhibitors and the liver，from therapeutic efficacy to side effects [J]. Aliment Pharm Ther，2019，50（8）：872-884.

[9] Danan G，Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs-I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings：application to drug-induced liver injuries [J]. J Clin Epidemiol，1993，46（11）：1323-1330.

[10] National Cancer Institute. NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）Version 5.0 [EB/OL].（2017-11-27）[2018-04-19] https：//evs. Nci. Nih. gov /ftp1 / CTCAE/CTCAE_5.0/.

[11] 中国医药生物技术协会药物性肝损伤防治技术专业委员会，中华医学会肝病学分会药物性肝病学组 . 中国药物性肝损伤诊治指南（2023 年版）[J]. 中华肝脏病杂志，2023，31（4）：355-384.

[12] Lleo A，Rimassa L，Colombo M. Hepatotoxicity of immune check point inhibitors：approach and management [J]. Dig Liver Dis，2019，51（8）：1074-1078.

[13] Karamchandani DM，Chetty R. Immune checkpoint inhibitor-induced gastrointestinal and hepatic injury：pathologists' perspective [J]. J Clin Pathol，2018，71（8）：665-671.

[14] Teufel A，Zhan TZ，Hartel N，et al. Management of immune related adverse events induced by immune checkpoint inhibition [J]. Cancer Lett，2019，456：80-87.

[15] Isono T，Kagiyama N，Takano K，et al. Outcome and risk factor of immune-related adverse events and pneumonitis in patients with advanced or postoperative recurrent non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors [J]. Thorac Cancer，2021，12（2）：153-164.

[16] Imoto K，Kohjima M，Hioki T，et al. Clinical features of liver injury induced by immune checkpoint inhibitors in Japanese patients [J]. Can J Gastroenterol Hepatol，2019，6391712.

[17] Cunningham M，Iafolla M，Kanjanapan Y，et al. Evaluation of liver enzyme elevations and hepatotoxicity in patients treated with checkpoint inhibitor immunotherapy [J]. PLoS One，2021，16（6）：e0253070.

[18] Mizuno K，Ito T，Ishigami M，et al. Real world data of liver injury induced by immune checkpoint inhibitors in Japanese patients with advanced malignancies [J]. J Gastroenterol. 2020，55（6）：653-661.

[19] Pan JH，Liu YW，Guo XZ，et al. Risk factors for immune-mediated hepatotoxicity in patients with cancer treated with immune checkpoint inhibitors：a systematic review and meta-analysis [J]. Expert Opin Drug Saf，2022，21（10）：1275-1287.

[20] Miah A，Tinoco G，Zhao S，et al. Immune checkpoint inhibitor-induced hepatitis injury：risk factors，outcomes，and impact on survival [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2023，149（5）：2235-2242.

[21] De Martin E，Michot JM，Rosmorduc O，et al. Liver toxicity as a limiting factor to the increasing use of immune checkpoint inhibitors [J]. JHEP Rep，2020，2（6）：100170.

[22] 李淑栾，高小平，陈倩琪，等 . 恶性肿瘤患者免疫治疗相关肝不良事件的影响因素 [J]. 中华肿瘤杂志，2020，42（1）：50-54.

[23] Fu J，Li WZ，McGrath NA，et al. Immune checkpoint inhibitor associated hepatotoxicity in primary liver cancer versus other cancers：a systematic review and meta-analysis [J]. Front Oncol，2021，11：650292.

[24] Vokes EE，Ready N，Felip E，et al. Nivolumab versus docetaxelin previously treated advanced non-small-cell lung cancer（CheckMate 017 and CheckMate 057）：3-year update andoutcomes in patients with liver metastases [J]. Ann Oncol，2018，29（4）：959-965.

[25] Thompson JA，Schneider BJ，Brahmer J，et al. Management of Immunotherapy-Related Toxicities，Version 1.2022，NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw，2022，20（4）：387-405.

[26] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 中国临床肿瘤学会（CSCO）免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 2023 [M]. 北京：人民卫生出版社，2023：51-59.

[27] De Martin E，Michot JM，Papouin B，et al. Characterization of liver injury induced by cancer immunotherapy using immune checkpoint inhibitors [J]. J Hepatol，2018，68（6）：1181-1190.

[28] Kim KW，Ramaiya NH，Krajewski KM，et al. Ipilimumab associated hepatitis：imaging and clinicopathologic findings [J]. Invest New Drugs，2013，31（4）：1071-1077.

[29] Haanen JBAG，Carbonnel F，Robert C，et al. ESMO Guidelines Committee. Management of toxicities from immunotherapy：ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis，treatment and follow-up [J]. Ann Oncol，2017，28（suppl_4）：iv119-iv142.

[30] Huffman BM，Kottschade LA，Kamath PS，et al. Hepatotoxicity after immune checkpoint inhibitor therapy in melanoma：natural progression and management [J]. Am J Clin Oncol，2018，41（8）：760-765.

[31] Ito T，Ishigami M，Yamamoto T，et al. Clinical course of liver injury induced by immune checkpoint inhibitors in patients with advanced malignancies [J]. Hepatol Int，2021，15（5）：1278-1287.

[32] Brahmer JR，Abu-Sbeih H，Ascierto PA，et al. Society for Immunotherapy of Cancer（SITC）Clinical Practice Guideline on immune checkpoint inhibitor-related adverse events [J]. J Immunother Cancer，2021，9（6）：e002435.

[33] Haanen J，Obeid M，Spain L，et al. ESMO Guidelines Committee. Electronic address：clinicalguidelines@esmo.org. Management of toxicities from immunotherapy：ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis，treatment and follow-up [J]. Ann Oncol，2022，33（12）：1217-1238.

[34] Li M，Sack JS，Rahma OE，et al. Outcomes after resumption of immune checkpoint inhibitor therapy after high-grade immune-mediated hepatitis [J]. Cancer，2020，126（23）：5088-5097.

（收稿日期：2023-06-08；修回日期：2023-08-09）

四川地区 24 例鹦鹉热衣原体肺炎的临床特点及治疗分析

周燕[1]，邹娅[1]，卢鋆[1]，郭西芮[1]，邹雍维[2]，叶永琴[1]，刘欢[3]，李刚[3, 4*]（1.成都市第二人民医院临床药学科，成都 610021；2.成都市第二人民医院呼吸与危重症医学科，成都 610021；3.四川省交通医院，成都 611731；4.四川省人民医院医学装备部，成都 610072）

摘要：目的 分析四川地区鹦鹉热衣原体肺炎患者的临床特征及治疗方案，为临床诊治提供参考。**方法** 对成都市第二人民医院 2020 年 12 月至 2023 年 2 月收治的通过宏基因二代测序（mNGS）确诊的 24 例鹦鹉热衣原体肺炎患者进行回顾性分析。**结果** 患者主要以发热为首要表现，其他临床症状包括畏寒、寒战、头晕、头痛、乏力、咳嗽、咳痰、肌肉酸痛等，主要并发症为急性呼吸衰竭和肝功能不全，胸部 CT 多呈单侧肺叶炎性改变，一半以上患者出现胸腔积液。采用多西环素、氟喹诺酮类单药或联合用药的方案进行抗感染治疗后预后良好，联合用药在退热时间上优于单药治疗，但是不能缩短住院时间和用药疗程。**结论** 鹦鹉热衣原体肺炎患者多有鸟类接触史。对不明原因社区获得性肺炎患者应仔细询问其流行病学史，同时结合患者的临床表现、实验室检查和影像学检查对疑似鹦鹉热的患者尽早通过 mNGS 技术进行辅助诊断。多西环素和氟喹诺酮类药物在鹦鹉热衣原体肺炎患者的治疗中有效，联合用药能使患者体温更快恢复正常。

关键词：鹦鹉热衣原体肺炎；社区获得性肺炎；肺泡灌洗液；宏基因二代测序

中图分类号：R563.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0778-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.034

Clinical characteristics and treatment of 24 patients with *Chlamydia psittaci* pneumonia in Sichuan area

ZHOU Yan[1], ZOU Ya[1], LU Yun[1], GUO Xi-rui[1], ZOU Yong-wei[2], YE Yong-qin[1], LIU Huan[3], LI Gang[3, 4*] (1. *Department of Clinical Pharmacy*, *Chengdu Second People's Hospital*, *Chengdu* 610021; 2. *Department of Respiratory and Critical Care Medicine*, *Chengdu Second People's Hospital*, *Chengdu* 610021; 3. *Sichuan Provincial Transportation Hospital*, *Chengdu* 611731; 4. *Department of Medical Equipment*, *Sichuan Provincial People's Hospital*, *Chengdu* 610072)

Abstract: Objective To analyze the clinical characteristics and treatment of *Chlamydia psittaci* pneumonia (*C. psittaci* pneumonia) patients in Sichuan, and to provide reference for clinical diagnosis and treatment. **Methods** We retrospectively analyzed of 24 patients with *C. psittaci* pneumonia confirmed by metagenomic next-generation sequencing (mNGS) admitted to Chengdu Second People's Hospital from December 2020 to February 2023. **Results** The main manifestations of patients were fever. Other clinical symptoms included chills, dizziness, headache, fatigue, cough, sputum and myalgia, etc. The main complications were acute respiratory failure and hepatic insufficiency. Chest CT scans showed unilateral pulmonary inflammatory changes, and pleural effusion occurred in more than half of the patients. The prognosis was good after the anti-infection therapy with doxycycline and fluoroquinolone single or combined administration.The combination therapy was superior to monotherapy in reducing fever, but it failed to shorten hospitalization time and medication course. **Conclusion** Most patients with *C. psittaci* pneumonia have a history of exposure to birds. Patients with unexplained community-acquired pneumonia should be carefully questioned about their epidemiological

基金项目：国家重点研发计划课题（No.2020YFC2005506）。

作者简介：周燕，女，主管药师，硕士，主要从事临床药学研究，email：757950440@qq.com *通信作者：李刚，男，主任药师，主要从事医院药学工作，email：906369706@ qq.com

history. At the same time, mNGS technology should be combined with the clinical manifestations, laboratory examination and imaging examination to diagnose suspected patients with psittacosis as soon as possible. Doxycycline and fluoroquinolones are effective for *C. psittaci* pneumonia, and combined medication helps patients recover to their normal body temperature more quickly.

Key words: *Chlamydia psittaci* pneumonia; community-acquired pneumonia; bronchoalveolar lavage fluid; metagenomic next-generation sequencing

鹦鹉热衣原体属于衣原体科，是介于病毒和立克次体之间的革兰氏阴性需氧专性细胞内寄生的病原体，鹦鹉热是鹦鹉热衣原体感染引起的疾病，主要在鸟类之间传播，特定情况下可通过鸟类或者其他动物传播给人类 [1]，也能通过人际传播 [2-4]，鹦鹉热以肺炎为主要表现，但是只有 1% 左右的社区获得性肺炎（CAP）由鹦鹉热引起 [5]。鹦鹉热曾在全球多个国家或地区暴发流行，近两年，我国也有聚集性病例报道 [6-8]。感染鹦鹉热衣原体可能导致严重的并发症，不经过有效抗菌药物治疗死亡率达 15% ～ 20%[9]，据国外文献报道，妊娠期鹦鹉热导致胎儿死亡率可高达 82.6%[10-11]。由于临床检测困难，相关报道也较少，但随着检测技术的发展，特别是宏基因二代测序（mNGS）技术在临床的应用，近年来确诊的病例有所增加，但是国内文献报道以个案为主，大样本临床研究少见。由于该病发生率低，临床表现复杂，临床医师对该病的认识不足，导致经常被漏诊和误诊，以致于延误患者的治疗。本文通过回顾性分析 24 例长居四川地区鹦鹉热衣原体肺炎患者的临床特点和治疗方案，以期增强临床对鹦鹉热的认知，提高其临床诊治水平，减少或避免误诊误治，促进合理用药。

1　材料与方法

1.1　研究对象

本研究为单中心回顾性研究，符合医学伦理学标准，并经医院医学伦理审查委员会批准（批件号：2023244）。成都市第二人民医院 2020 年 12 月至 2023 年 2 月共收治的 28 例四川地区的鹦鹉热衣原体肺炎患者，根据排除标准排除了 4 例患者，共纳入 24 例。本研究中鹦鹉热衣原体肺炎的诊断标准如下：① 符合 CAP 的诊断标准；② 支气管肺泡灌洗液通过 mNGS 技术检出鹦鹉热衣原体序列。病例排除标准：① 合并恶性肿瘤者；② 合并支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、反复呼吸道感染者；③ 合并基础肝肾疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病者；④ 合并其他致病菌感染者；⑤ 临床资料不完整者。

1.2　研究方法

将 24 例患者分为单药治疗组（住院期间单独使用多西环素、左氧氟沙星或莫西沙星治疗）和联合用药组（住院期间使用多西环素联合左氧氟沙星或莫西沙星治疗）。左氧氟沙星每次 0.5 g，每日一次；莫西沙星每次 0.4 g，每日一次；多西环素每次 0.1 g，每日两次。收集并分析患者的基本信息、临床症状、影像学资料、实验室检查、mNGS 结果、用药情况、临床结局（临床结局随访至出院后 3 个月）。数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件进行，计量资料用“均数 ± 标准差”表示，行 t 检验，计数资料行 χ^2 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　基本资料

24 例患者中男性 11 例，女性 13 例，平均年龄（56.79±14.53）岁（21 ～ 78 岁）。37.5%（9/24）患者合并高血压、糖尿病等慢性基础疾病。发病至入院的平均时间（4.00±2.30）d（1 ～ 9 d），平均住院时间（11.71±2.91）d（7 ～ 19 d）。83.3%（20/24）患者有鸟类或禽类接触史。患者具体情况见表 1。

2.2　影像学表现及 mNGS 检测结果

24 例患者均进行了胸部计算机断层扫描（CT）检查，均显示为肺部炎性改变，79.2%（19/24）患者表现为单肺叶炎性病变，其中左侧 8 例，右侧 11 例，各个肺叶均可受累，累及下叶 13 例，上叶 2 例，上下叶 7 例，上中叶 1 例，中下叶 1 例，主要表现为斑片状、团片状和条索状实变影，部分患者还可见磨玻璃影、网格影、小结节影、微小结节影和淋巴结肿大，45.8%（11/24）患者可见支气管充气征；58.3%（14/24）患者出现胸腔积液，其中右侧 6 例，左侧 3 例，双侧 5 例，均为少量胸腔积液。患者入院后行纤维支气管镜检查，送支气管肺泡灌洗液（BALF）进行 mNGS 检测，发现鹦鹉热衣原体序列，DNA 序列数为 1 ～ 7743（中位数为 501，平均值为 1274±1856）。

2.3　临床表现和并发症

24 例患者中以发热起病的占 83.3%（20/24），主要临床表现为畏寒、寒战，头晕、头痛，咳

嗽、咳痰，乏力和全身肌肉酸痛。66.7%（16/24）患者出现急性呼吸衰竭，54.2%（13/24）患者累及肝脏，出现肝功能不全，该部分患者谷丙转氨酶（ALT）平均值为（101.15±56.53）U·L^{-1}↑（范围 59 ～ 259），谷草转氨酶（AST）平均值为（73.38±30.22）U·L^{-1}↑（范围33 ～ 113），见表1。

表 1 24 例患者的临床病例资料

Tab 1 Clinical case data of 24 patients

临床项目	具体类别
性别	男（11）；女（13）
年龄分布	＜ 30 岁（1）；30 ～ 49 岁（8）；50 ～ 69 岁（11）；＞ 70 岁（4）
基础疾病	高血压（7）；糖尿病（2）；冠心病（1）；慢性胃炎（1）；既往体健（15）
发病至住院天数	≤ 3 d（11）；4 ～ 7 d（12）；＞ 7 d（1）
住院天数	≤ 10 d（9）；11 ～ 14 d（12）；＞ 14 d（3）
肺部影像学表现	单肺叶高密度影（19）；双肺叶高密度影（5）；胸腔积液（14）；支气管充气征（11）
接触史	鹦鹉（13）；鸡鸭等家禽（4）；鸽子（2）；其他（1）
首发症状	发热（20）；咳嗽、咳痰（1）；恶心、呕吐、腹泻（1）；头痛（1）；茶色尿（1）
伴随症状	畏寒、寒战（15）；头晕、头痛（12）；咳嗽、咳痰（11）；乏力（10）；全身肌肉酸痛（8）；发热（4）；干咳（4）；恶心、呕吐、腹泻（3）；胸闷、胸痛（2）
并发症	急性呼吸衰竭（16）；肝功能不全（13）；电解质紊乱（6）；低蛋白血症（6）；急性心力衰竭（3）；凝血功能障碍（2）；急性肾功能不全（2）

2.4 炎症指标情况

用药前大多数患者白细胞计数（WBC）(87.5%，21/24）正常，仅有 3 例患者超过 9.5×10^9·L^{-1}，一半患者（50.0%，12/24）中性粒细胞计数（NE）升高，大部分患者（66.7%，16/24）中性粒细胞百分比（NE%）升高，79.2%（19/24）患者淋巴细胞计数（LY）降低，所有患者淋巴细胞百分比（LY%）均明显降低，C-反应蛋白（CRP）和红细胞沉降率（ESR）明显升高，降钙素原（PCT）轻度升高。见表 2。

表 2 用药前 24 例患者炎症指标情况

Tab 2 Inflammation indicators of 24 patients before the medication

患者	WBC/（×10^9·L^{-1}）	NE/（×10^9·L^{-1}）	NE%/%	LY/（×10^9·L^{-1}）	LY%/%	CRP/（mg·L^{-1}）	PCT/（ng·mL^{-1}）	ESR/（mm·h^{-1}）
1	8.1	6.9	82.9	0.9	11.3	64.0	1.0	109.0
2	9.4	7.2	72.5	0.9	9.0	148.0	0.3	112.0
3	7.6	6.8	89.5	0.4	5.3	54.8	0.7	88.0
4	6.9	5.7	83.2	0.7	9.9	47.0	0.2	87.0
5	6.4	5.5	85.4	0.7	11.0	88.8	0.1	51.0
6	6.8	4.2	62.2	1.3	15.4	69.0	0.5	106.0
7	9.6	9.0	93.4	0.4	4.2	113.0	2.2	52.0
8	7.6	5.3	70.2	1.0	13.1	37.0	0.8	120.0
9	6.2	3.9	63.4	1.2	19.8	49.0	0.1	86.0
10	9.0	7.6	84.7	0.5	6.0	65.8	0.3	33.0
11	5.1	3.4	65.8	0.8	16.0	67.0	0.1	78.0
12	7.5	5.7	75.3	1.2	16.1	25.0	0.1	52.0
13	5.5	3.9	71.2	1.0	18.2	95.9	0.2	63.0
14	6.7	6.2	92.5	0.3	4.7	139.0	2.2	106.0
15	9.9	7.2	72.7	1.6	15.6	27.0	0.1	98.0
16	8.0	6.4	80.2	1.0	11.9	76.6	0.2	81.0
17	8.5	7.6	88.7	0.4	4.4	59.6	0.7	89.0
18	7.9	6.8	86.6	0.5	6.5	58.3	0.3	66.0
19	7.0	5.6	80.3	0.7	9.7	77.8	0.1	89.0
20	10.3	8.6	83.7	1.1	10.2	54.6	0.5	54.0
21	9.5	8.7	91.3	0.4	4.5	48.3	0.1	18.0
22	4.9	3.7	75.6	0.8	16.6	92.1	0.2	56.0
23	6.7	4.8	71.8	1.3	19.6	30.0	0.2	57.0
24	9.0	7.6	84.6	0.6	6.6	288.7	0.2	88.0
均值	7.67±1.52	6.18±1.64	79.5±9.2	0.82±0.35	11.07±5.14	78.2±54.9	0.48±0.59	76.6±26.36

2.5 药物治疗情况和转归

全部患者入院后均初步诊断为 CAP，并进行经验性抗感染治疗，通过 mNGS 技术确诊为鹦鹉热后，予以多西环素或氟喹诺酮类为基础的抗感

染治疗，并根据药物疗效和不良反应调整方案，治疗好转后出院，院外继续序贯治疗，平均有效用药疗程（17.71±4.06）d（12 ～ 27 d），具体治疗药物见表 3。停药 3 个月后呼吸内科门诊随访，所有病例临床表现与患病前相比无明显异常，胸部 CT 提示炎性病变基本吸收，各项实验室检查指标均恢复正常。

表 3　24 例患者的抗感染治疗与转归

Tab 3　Anti-infection therapy and outcomes of 24 patients

患者	诊断前用药	确诊后用药	出院带药	预后
1	哌拉西林他唑巴坦＋左氧氟沙星	多西环素＋左氧氟沙星	多西环素	好转
2	哌拉西林他唑巴坦＋莫西沙星	莫西沙星	莫西沙星	好转
3	头孢哌酮舒巴坦＋左氧氟沙星	左氧氟沙星	多西环素	好转
4	哌拉西林他唑巴坦＋左氧氟沙星	左氧氟沙星	多西环素	好转
5	头孢哌酮舒巴坦＋莫西沙星	多西环素＋莫西沙星	多西环素	好转
6	多西环素＋左氧氟沙星	多西环素＋左氧氟沙星	左氧氟沙星	好转
7	哌拉西林他唑巴坦	多西环素＋莫西沙星	多西环素＋莫西沙星	好转
8	头孢哌酮钠舒巴坦	多西环素＋莫西沙星	多西环素	好转
9	头孢噻肟＋左氧氟沙星	左氧氟沙星	左氧氟沙星	好转
10	头孢哌酮舒巴坦＋左氧氟沙星	左氧氟沙星	左氧氟沙星	好转
11	头孢哌酮舒巴坦＋左氧氟沙星	左氧氟沙星	左氧氟沙星	好转
12	头孢噻肟	多西环素	多西环素	好转
13	哌拉西林他唑巴坦	多西环素＋莫西沙星	多西环素＋莫西沙星	好转
14	头孢哌酮舒巴坦＋左氧氟沙星	左氧氟沙星	左氧氟沙星	好转
15	头孢噻肟	多西环素	多西环素	好转
16	哌拉西林他唑巴坦＋左氧氟沙星	多西环素＋左氧氟沙星	多西环素	好转
17	哌拉西林他唑巴坦	左氧氟沙星	莫西沙星	好转
18	头孢哌酮钠舒巴坦＋左氧氟沙星	多西环素	多西环素	好转
19	多西环素＋莫西沙星	多西环素＋莫西沙星	多西环素	好转
20	头孢哌酮钠舒巴坦＋左氧氟沙星	多西环素＋左氧氟沙星	多西环素	好转
21	哌拉西林他唑巴坦	多西环素＋莫西沙星	多西环素	好转
22	头孢哌酮舒巴坦	多西环素＋左氧氟沙星	多西环素	好转
23	哌拉西林他唑巴坦＋莫西沙星	莫西沙星	多西环素	好转
24	哌拉西林他唑巴坦	左氧氟沙星	左氧氟沙星	好转

2.6　药物治疗效果比较

住院期间单药治疗组有 13 例患者（单用多西环素的 3 例，单用左氧氟沙星的 8 例，单用莫西沙星的 2 例），联合用药组有 11 例患者（多西环素联合左氧氟沙星的 5 例，多西环素联合莫西沙星的 6 例），两组患者性别、年龄、住院时间和用药疗程差异无统计学意义（$P > 0.05$），退热时间差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 4。

表 4　单药治疗组和联合用药组一般资料和治疗效果比较

Tab 4　General information and treatment effect between the monotherapy group and the combination therapy group

组别	例数	性别（男 / 女）	年龄 / 岁	退热时间 /d	住院时间 /d	用药疗程 /d
单药治疗组	13	6/7	57.15±14.87	3.61±1.71	11.23±2.83	17.46±4.79
联合用药组	11	5/6	56.36±14.83	2.09±1.22	12.27±3.04	18.00±3.19
χ^2/t 值		0.167	0.130	2.469	－0.869	－0.317
P 值		0.683	0.898	0.022	0.394	0.754

3　讨论

鹦鹉热病是人类、鸟类和部分哺乳动物感染鹦鹉热衣原体导致的一种感染性疾病，既往研究表明该病的发生具有季节性。本研究纳入的是四川地区的患者，主要发病于冬季，国内另外一项华中华东地区的研究显示本病秋冬季高发[12]，而国外的研究结果显示，春夏季节是鹦鹉热的发病高峰[13-14]。鹦鹉热的好发季节存在国家和地域差异，可能与气候因素和地理环境有关，需要进一步的研究来证实。鸟类和禽类是鹦鹉热衣原体的主要宿主[15-16]，本研究中，大部分患者有明确的鸟类或禽类接触史，潜伏期多在 1 ～ 2 周，与既往报道一致[17]。发病年龄以中老年为主，鹦鹉热衣原体肺炎的发病年龄总体较肺炎支原体肺炎和肺炎衣原体肺炎大。以发热为首发症状的患者占比高达 83.3%，70.8%（17/24）患者为 39 ℃以上的高热，33.3%（8/24）患者体温甚至高达 40 ℃以上。不同患者存在个体差异，临床首发症状不尽相同，亦有以突发性感音神经性耳聋为首发症状的报道[18]，以其他症状起病的

患者在后面的病程中均出现了发热症状。本研究中，16 例患者（66.7%）出现了急性呼吸衰竭 [诊断标准：氧合指数（PaO_2/FiO_2）＜ 300 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）]，该部分患者平均 PaO_2/FiO_2 为 232.82±38.16↓（范 围 146 ～ 285），2 例患者（8.3%）发展为重症鹦鹉热衣原体肺炎，并使用了呼吸机进行机械通气，其中 1 例为既往体健的中年女性，因此，年轻又无基础疾病的患者也需警惕发展为重症的可能性。超过一半患者（54.2%）出现了肝功能不全，表现为肝功能指标异常，转氨酶升高为主，其中 4 例患者（4/13，30.8%）同时合并胆红素升高，胆红素升高表现为直接胆红素升高。肝功能异常可能与鹦鹉热衣原体引起肝细胞损害有关，而肺炎支原体肺炎和肺炎衣原体肺炎患者肝功能指标少有异常 [19-20]。鹦鹉热衣原体通过呼吸道进入机体直接引起鹦鹉热衣原体肺炎，入血后经血行播散至全身，心脏、肝脏、肾脏、中枢神经系统和消化系统均可受累，累及不同器官，临床表现有差异，严重程度也各不相同，可从轻症、自限性到急性呼吸衰竭，甚至成人呼吸窘迫综合征和多器官功能衰竭。鹦鹉热的临床表现不典型，病情进展快，严重者可危及生命，因此早期识别很重要。研究发现，通过 mNGS 技术可以早期识别鹦鹉热，并进行针对性治疗，减少不必要的抗菌药物使用，缩短病程，改善鹦鹉热衣原体引起的重症 CAP 的预后 [21]。

本研究结果显示，鹦鹉热衣原体肺炎患者 WBC 不高，NE% 升高，LY 降低、LY% 降低，CRP、PCT 和 ESR 均升高。研究发现，鹦鹉热衣原体肺炎患者组（实验组）WBC、NE、NE%、CRP、PCT 等炎症相关指标均高于肺炎支原体肺炎患者（对照组），但是实验组的 LY 明显低于对照组，此项研究未进行 LY% 的报道 [19]。本研究发现，所有患者的 LY% 均降低。此外，与鹦鹉热衣原体肺炎患者相比，一般情况下细菌性肺炎 WBC、CRP、PCT 和 NE 明显升高 [22]，病毒性肺炎 WBC 和 PCT 不高，CRP 可轻度升高 [23]，真菌性肺炎 WBC、NE、PCT、CRP 和 ESR 轻度升高 [24]。鹦鹉热衣原体肺炎和肺炎支原体肺炎、细菌性肺炎、病毒性肺炎及真菌性肺炎在炎性相关指标上有一定差异，此差异对临床诊疗有一定价值。患者胸部影像学表现为肺部炎性改变，可见支气管充气征，部分患者可出现少量胸腔积液。本研究中大部分患者表现为单侧肺叶炎性改变，一半以上患者出现少量胸腔积液。基于 mNGS 技术的便捷性和高效性，目前广泛用于鹦鹉热衣原体的确诊。正常人体内不存在鹦鹉热衣原体定植，因此，一旦检测出其序列数就需要考虑鹦鹉热的可能，本研究的所有患者均检出鹦鹉热衣原体的 DNA 序列，结合其接触史、临床表现及影像学检查确诊为鹦鹉热。

四环素类、大环内酯类和氟喹诺酮类药物是治疗鹦鹉热有效的药物。其中四环素类药物是治疗鹦鹉热的一线药物，多西环素由于胞内活性强，临床用药经验多，作为首选 [25]，90% 以上患者在给药 48 h 内退热 [26]；米诺环素也具有良好的体外抗菌活性，已成功应用于临床；大环内酯类药物，如红霉素或阿奇霉素为二线治疗药物，疗效不如四环素类药物，当患者存在使用四环素类药物的禁忌证，比如孕妇和 8 岁以下儿童，可选择使用，阿奇霉素对鹦鹉热衣原体的作用比红霉素更强，耐受性也更好，可作为首选。在国内，四环素类和大环内酯类很少作为 CAP 住院患者的首选药物，而氟喹诺酮类药物却广泛经验性应用。鹦鹉热衣原体同属的沙眼衣原体、肺炎衣原体对上述药物耐药比较常见，但是关于鹦鹉热衣原体耐药性的研究相对较少，一项最新的研究对 3 例鹦鹉热患者 BALF 样本中提取的核酸进行 mNGS 测序，序列比对显示，所有患者的样本中均存在不同丰度的耐药基因，耐药基因的存在可能影响临床抗感染疗效，当初始药物治疗失败时需考虑耐药的可能 [27]。在本研究中，一半以上患者在初始抗感染方案中选择了氟喹诺酮类药物，多数患者获得了良好的治疗效果，部分患者疗效欠佳，换成了多西环素或者联合多西环素治疗才开始起效。确诊为鹦鹉热以后，采用了单药治疗或者联合用药的方案，所有患者均预后良好。本研究表明，联合用药组在退热时间上明显优于单药治疗组，为了尽快使患者体温恢复正常，采用联合用药的方案更有优势。国内另外一项研究比较了单用多西环素组、单用氟喹诺酮类组和联合用药组的退热时间，该项结果表明，联合用药组与单用多西环素组在体温恢复正常时间相当，均优于单用氟喹诺酮类 [12]，但是该项研究未进行住院时间和用药疗程的比较，本研究弥补了此项研究的不足，研究了单药治疗组和联合用药组在住院时间和用药疗程上的差异，结果显示，两组患者在住院时间和用药疗程上相当，联合用药虽然可以使患者体温尽快恢复正常，但是却不能明显缩短住院时间和用药疗程。以多西环素为代表的四环素类药物是鹦鹉热的一线治疗药物，疗效确切，以多西环素为基础的单药治疗或联合用药方案可缩短鹦鹉热的病程，而本研究中部分患者采用氟喹诺酮类药物单用或者联合多西环素的方案同样取得了良好的治疗效果，当四环素类药物不能耐受

或者存在禁忌证时，氟喹诺酮类药物是一种有效的替代治疗方案。

从本研究来看，鹦鹉热衣原体肺炎患者的临床特点包括：① 患者多为中老年人，多有鸟类或禽类的接触史；② 所有患者在病程中均有发热，70.8% 患者为 39 ℃以上的高热，33% 患者体温甚至高达 40 ℃以上；③ 最常见的症状包括畏寒、寒战、头晕、头痛、咳嗽、咳痰、肌肉酸痛；④ 肝功能不全和急性呼吸衰竭发生率高；⑤ 白细胞总数不高，中性粒细胞比例升高，所有患者淋巴细胞比例均降低；⑥ 超过一半患者出现胸腔积液；⑦ 联合用药在退热时间上优于单药治疗，但是不能缩短住院时间和用药疗程。本研究纳入病例数有限，临床特点及治疗方案仍需更多的病例进行归纳总结。对于疑似鹦鹉热患者，应尽早行 mNGS 检测明确病原菌，使用多西环素和氟喹诺酮类药物治疗，患者预后良好。

参考文献

[1] Chan J，Doyle B，Branley J，et al. An outbreak of psittacosis at a veterinary school demonstrating a novel source of infection [J]. One Health，2017，3：29-33.

[2] Wallensten A，Fredlund H，Runehagen A. Multiple human-to-human transmission from a severe case of psittacosis，Sweden，January-February 2013 [J]. Euro Surveill，2014，19（42）：20937.

[3] Hughes C，Maharg P，Rosario P，et al. Possible nosocomial transmission of psittacosis [J]. Infect Control Hosp Epidemiol，1997，18（3）：165-168.

[4] Zhang ZJ，Zhou H，Cao HE，et al. Human-to-human transmission of *Chlamydia psittaci* in China，2020：an epidemiological and aetiological investigation [J]. Lancet Microbe，2022，3（7）：e512-e520.

[5] Hogerwerf L，Gier BDE，Baan B，et al. *Chlamydia psittaci*（psittacosis）as a cause of community-acquired pneumonia：a systematic review and meta-analysis [J]. Epidemiol Infect，2017，145（15）：3096-3105.

[6] 刘芳，苑少欣，李显庭，等 . 9 例聚集性鹦鹉热肺炎临床和流行病学特征 [J]. 中华医院感染学杂志，2021，31（16）：2462-2466.

[7] 谢晓燕，郭玮，曹晶，等 . 一起家庭聚集性鹦鹉热衣原体肺炎的临床特征分析及诊治 [J]. 国际呼吸杂志，2022，42（14）：1074-1079.

[8] Yao WW，Chen XY，Wu ZY，et al. A cluster of *Psittacosis cases* in Lishui，Zhejiang Province，China，in 2021 [J]. Front Cell Infect Microbiol，2022，12：1044984.

[9] Smith KA，Bradley KK，Stobierski MG，et al. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci*（formerly Chlamydia psittaci）infection among humans（psittacosis）and pet birds，2005 [J]. J Am Vet Med Assoc，2005，226（4）：532-539.

[10] Tantengco OAG. Gestational psittacosis：an emerging infection [J]. Lancet Microbe，2022，3（10）：e728.

[11] Katsura D，Tsuji S，Kimura F，et al. Gestational psittacosis：a case report and literature review [J]. J Obstet Gynaecol Res，2020，46（5）：673-677.

[12] 沈凌，田贤江，梁荣章，等 . 鹦鹉热衣原体肺炎 48 例临床特征分析 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2021，44（10）：886-891.

[13] Hogerwerf L，Holstege MMC，Benincà E，et al. Temporal and spatial analysis of psittacosis in association with poultry farming in the Netherlands，2000—2015 [J]. BMC Infect Dis，2017，17（1）：519.

[14] Branley JM，Weston KM，England J，et al. Clinical features of endemic community-acquired psittacosis [J]. New Microbes New Infect，2014，2（1）：7-12.

[15] Sukon P，Nam NH，Kittipreeya P，et al. Global prevalence of chlamydial infections in birds：a systematic review and meta-analysis [J]. Prev Vet Med，2021，192：105370.

[16] Chen XC，Cao KC，Wei Y，et al. Metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of severe pneumonias caused by *Chlamydia psittaci* [J]. Infection，2020，48（4）：535-542.

[17] Grayston JT，Thom DH. The chlamydial pneumonias [J]. Curr Clin Top Infect Dis，1991，11：1-18.

[18] 郑恒，吴刚，徐静，等 . 以听力下降为首发症状的鹦鹉热衣原体肺炎一例并文献复习 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2022，21（7）：505-508.

[19] 韩娜，赵磊，杨进 . 24 例鹦鹉热衣原体肺炎临床特征分析 [J]. 牡丹江医学院学报，2022，43（2）：33-36，95.

[20] 罗明，王雪，李爱华，等 . 北京市 2015—2019 年肺炎衣原体感染患者临床特征分析 [J]. 中华预防医学杂志，2021，55（8）：938-944.

[21] Xiao Q，Shen W，Zou YQ，et al. Sixteen cases of severe pneumonia caused by *Chlamydia psittaci* in South China investigated via metagenomic next-generation sequencing [J]. J Med Microbiol，2021，doi：10.1099/jmm. 0.001456.

[22] 张冠新，唐荣德，苏群志，等 . PCT 等 5 项炎症指标联合检测在细菌性肺炎中的诊断价值 [J]. 实验与检验医学，2020，38（2）：374-376.

[23] Galván JM，Rajas O，Aspa J. Review of non-bacterial infections in respiratory medicine：viral pneumonia [J]. Arch Bronconeumol，2015，51（11）：590-597.

[24] 梁嫄琦 . 78 例肺真菌病不同宿主因素下临床特征分析 [D]. 福州：福建医科大学，2017.

[25] Stewardson AJ，Grayson ML. Psittacosis [J]. Infect Dis Clin North Am，2010，24（1）：7-25.

[26] Yung AP，Grayson ML. Psittacosis——a review of 135 cases [J]. Med J Aust，1988，148（5）：228-233.

[27] Lu HQ，Yuan J，Wu ZM，et al. Distribution of drug-resistant genes in alveolar lavage fluid from patients with psittacosis and traceability analysis of causative organisms [J]. Front Microbiol，2023，14：1182604.

（收稿日期：2023-08-15；修回日期：2023-11-08）

医疗机构麻醉、第一类精神药品信息化管理模式探讨

王晨，张剑，王元园，薛佳（四川大学华西医院，成都 610041）

摘要：麻醉、第一类精神药品是我国依法依规实行特殊管理的药品，是医疗机构药事管理工作的重点内容。由于其特殊性，我国医疗机构内麻醉、第一类精神药品管理主要以人工操作为主，智能化程度不高。随着医疗信息化的发展，传统管理模式已不足以满足现在医疗机构对麻醉、第一类精神药品的管理需求。本文通过分析传统管理模式中医疗机构内麻醉、第一类精神药品的管理难点及风险，探讨在医院信息系统下，结合智能化设备，构建麻醉、第一类精神药品智能化信息管理模式的方法及可达到的应用效果，为临床应用提供思路。

关键词：医疗机构；麻精药品；信息化管理；智能化管理

中图分类号：R971，R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0784-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.035

Information management models for narcotic drugs and first category psychotropic drugs in medical institutions

WANG Chen, ZHANG Jian, WANG Yuan-yuan, XUE Jia (*West China Hospital*, *Sichuan University*, *Chendu* 610041)

Abstract: Narcotic drugs and first category psychotropic drugs (anesthesia drugs) are subject to special regulatory supervision in China, governed by laws and regulations. They constitute a focal point of pharmaceutical administration within medical institutions. Due to their unique characteristics, the management of anesthesia drugs in Chinese medical facilities primarily relies on manual operations, with limited automation. As medical informatics continues to develop, the traditional management model can no longer meet the demands of anesthesia drug management in contemporary medical institutions. This paper analyzed the challenges and risks associated with the management of anesthesia drugs with traditional approaches. We explored the methodology for establishing an intelligent information management system for anesthesia drugs within the hospital information system and discussed the outcomes to provide insights into clinical implementation.

Key words: medical institution; psychotropic drug; information management; intelligent management

麻醉、第一类精神药品（以下简称麻精药品）是直接作用于中枢神经系统，使之兴奋或抑制，连续使用能产生依赖性和成瘾性，是国家依法实行特殊管理的药品[1]。这两类药品具有两重性，一方面有很强的镇痛或镇静等作用，是医疗上必不可少的药品，另一方面不规范地连续使用，易产生依赖性，若管理不当，流入非法渠道可能造成严重的社会危害[2-3]。医疗机构是销售使用麻精药品的主要场所，合法依规管理麻精药品是医院药事管理工作中一项十分重要的内容。

目前，各医疗机构的麻精药品管理是依据《中华人民共和国药品管理法》《麻醉药品和精神药品管理条例》《医疗机构麻醉药品、第一类精神药品管理规定》等相关法律法规、部门规章及临床用药指南等进行管理[1]。随着“癌症三阶梯止痛原则”的普及，麻精药品的品种增加、用药需求增加，以人工操作为主导的传统管理模式已不足以满足现在麻精药品的管理需求，亟需借助信息化技术提高麻精药品的管理水平。而在医疗信息化的迅速发展中，医疗机构麻精药品管理的信

作者简介：王晨，女，主管药师，主要从事医院药事管理研究，email：505484571@qq.com *通信作者：张剑，女，硕士，副主任药师，主要从事医院药学及药事管理学研究，email：904881285@qq.com

息化建设差异较大，呈现传统管理与信息化管理并存的现状[4]，且我国的法律法规对于麻精药品信息化管理的要求相对滞后。2020 年 9 月 15 日国家卫健委发布的《关于加强医疗机构麻醉药品和第一类精神药品管理的通知》中，首次对麻精药品信息化管理要求提出指导意见。要求医疗机构依托现代化院内物流系统和信息化平台，加强麻精药品全流程管理，实现来源可查、去向可追、责任可究的全程闭环式可追溯管理。有条件的地区或医疗机构要积极探索麻精药品智能存储柜、电子药柜等智能化设备的使用，结合实际开发麻精药品智能管理系统，逐步实现精细化管理，提高工作效率和差错防范能力[5]。

1 传统管理模式下麻精药品管理的难点

医疗机构中麻精药品的管理内容包括麻精药品的采购、验收、储存、保管、发放、调配、使用、报损、销毁、丢失及被盗案件报告、值班巡查等，等级医院评审标准药品管理相关规定中要求，医疗机构应建立并执行适用于本医疗机构的《麻醉药品和精神药品使用及管理制度》、各项工作的标准操作流程和岗位人员职责，并由职能部门定期监督检查[6]。传统管理模式中，麻醉、第一类精神药品验收、储存、保管、发放、调配、使用等环节中的三级、五专及批号溯源管理需要消耗医务人员大量的时间和精力，且存在管理中的难点及隐患。

1.1 医疗机构内麻精药品基数管理的难点及风险

医疗机构内的麻精药品实行三级、五专管理。在药库、药房、病房、手术室、医技科室等麻精药品使用的重点部门，按照基数管理，指定专职人员负责本部门麻精药品的日常管理工作。传统管理模式中，麻精药品基数由各部门专职人员经部门负责人同意，向医务部提出申请，经批准后施行，并在医务部、药学部备案。医务部审批麻精药品基数申请时，应在了解申请部门既往麻精药品用量、用药目的、取药所需时间等信息前提下，判断其设置的基数品种及数量是否合理。各部门提交麻精药品基数修改申请时，医务部应作废该部门既往的麻精药品基数申请。然而，由于麻精药品基数设置或变更时提交的是书面申请，需要在全院申请中找出指定申请文件存在难度，且如何作废、作废的申请如何处置，目前没有规范，存在管理盲点。此外，批准后的麻精药品基数书面申请需及时至药学部备案，以便药学部监督院内麻精药品管理与使用。若药学部基数备案更新不及时，药师则无法准确判断病区麻精药品的贮存数量及品种是否符合医院要求，不能准确溯源。

1.2 空安瓿 / 废贴回收中的管理难点及风险

目前，我国生产及使用的麻醉药品有 23 种，第一类精神药品 9 种[7-9]，常用品种有芬太尼注射液（0.1 mg/0.5 mg）、舒芬太尼注射液、注射用瑞芬太尼、吗啡注射液、哌替啶注射液、布桂嗪注射液、氢吗啡酮注射液、羟考酮注射液、氯胺酮注射液、艾司氯胺酮注射液、芬太尼透皮贴剂（2.1 mg/4.2 mg/8.4 mg/12.6 mg）等。根据要求，使用后的麻精药品注射剂和贴剂，应回收空安瓿及废贴[10]。但可能由于医务人员培训不到位、管理不足、患者转科、出院，门诊患者忘记回收或携带废贴等多种原因，导致空安瓿及废贴回收数量不足，存在药品流弊的风险[11]。

1.3 癌痛和中、重度慢性疼痛患者的用药管理难点及风险

医疗机构应为门（急）诊癌症疼痛患者和中、重度慢性疼痛需长期使用麻精药品的患者，建立相应的病历，要求其签署知情同意书[10，12]。传统管理模式下，癌痛和中、重度慢性疼痛患者的病历管理不仅流程复杂，需耗费医务人员大量时间，且存在许多弊端[13]。如患者办理麻精药品专用病历后，每次就诊和取药时都需携带麻精药品专用病历，医师和药师需人工核实并手工书写病历，不仅费时，还可能出现书写不规范的情况，尤其是药品的使用剂量、用法、给药频次书写不规范，容易造成医疗差错。传统的麻精药品专用病历，不能体现患者的住院情况，并且在各医疗机构间没有实现信息共享，可能存在患者在住院和门诊重复取药，或在多个医疗机构重复取药，甚至可能存在骗取、冒领麻精药品等行为，导致麻精药品流入非法渠道。此外，传统的管理模式发出药品后，医师和药师无法主动开展随访，不能通过患者用药疗效、不良反应等信息，及时调整剂量，进行用药指导。使药品管理处于开环管理的状态，即仅存在始端对末端的影响和作用，不存在末端对始端的影响和作用[14]。

1.4 自控镇痛泵中废弃余液的管理难点及风险

患者自控镇痛（patient controlled analgesia，PCA）是目前手术后镇痛最常用和最理想的方法，常用于缓解患者手术后的中度到重度疼痛[15]。传统镇痛泵由于不能远程监测、患者运转节奏快、人手不足、随访时间短缺等原因，导致麻醉科医师无法管理分散在医院各病区的患者，镇痛泵患者随访

难度大，发生术后并发症、设备不稳定等问题时，不能及时处理。且静脉和硬膜外泵入的自控镇痛治疗用药时长可达 48 ～ 72 h，麻醉医师根据理论治疗总量开具处方并配置镇痛泵，患者自行控制镇痛泵的实际用药量，导致处方开具量与使用量存在脱节现象。结束镇痛治疗时患者已从手术室转至病房，病房对使用后的自控镇痛泵的处理暂无标准操作流程，若自控镇痛泵中的废弃余液处理不当，则可能导致麻精药品流入非法渠道。

2 医疗机构内麻精药品智能化信息管理模式的研究

目前，我国大多数医疗机构使用医院信息系统（hospital informationsystem，HIS），在药品库存管理、药品调剂环节基本实现了信息管理，但智能化程度参差不齐；部分医院依托 HIS 实现了麻精药品电子专用病历管理和癌疼患者随访 [16-17]；有的医疗机构依托物流系统和信息平台，以自动化智能药柜为工具，构建了麻精药品智能化信息管理平台 [18]。此外，也有少数医疗机构在麻精药品信息化管理中引入了电子处方、麻精药品电子账册、空安瓿使用与回收清点系统 [19-21]。但是，目前我国各医疗机构麻精药品管理智能化程度参差不齐，许多医疗机构软硬件设施达不到信息化要求，极大地限制了其智能化发展。本文通过解决麻精药品储存、领用、使用、回收、销毁等各环节中的管理难点，探索智能化设备和信息化技术在麻精药品管理中的应用方法及可达到的使用效果，为临床应用提供参考。

2.1 基于 OA 系统的麻精药品基数申请 / 变更 / 备案管理平台

办公自动化系统（office automation system，OA 系统）是目前使用范围广、功能成熟稳定的办公信息化产品 [22]。工作流技术是 OA 系统运行的核心，通过网络技术实现业务办理，根据工作内容，设置固定的顺序，通过对中间节点进行处理并传递，完成工作 [23]。开发人员在 OA 系统中制作电子签章和电子表格，设定审批流程及判断条件，制定各节点的处理人员、审批权限、审批时限，实现业务的审批，工作流程见图 1，OA 系统中麻精药品的基数申请及基数变更申请审批流程见图 2，审批通过的基数申请需归档备案。由于在实际应用中存在基数变更、科室搬迁等情况，审批通过的基数申请需要归档入专门的数据库（见图 3），数据库中同科室有新的基数申请生效时，应自动作废该科室之前的申请记录。数据库中应包含药品存放位置，科室搬迁时系统自动更新，有助于医疗机构监督院内麻精药品的贮存情况。麻精药品基数备案数据库通过设置查询权限，开放给药学部和护理部专人，即可避免药学部基数备案更新不及时，也有助于药学部、护理部、医院管理部门对院内各科室的麻精药品管理进行监督。

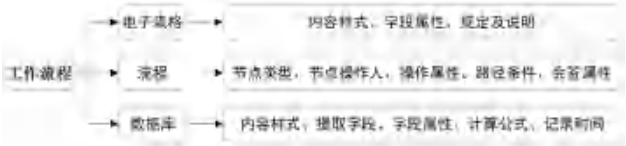


图 1 OA 系统基数审批流程设计工作流程

Fig 1 Flow chart of approval process in the OA system

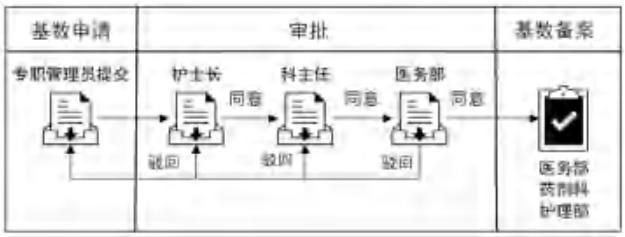


图 2 麻精药品的基数申请、基数变更申请审批流程

Fig 2 Flow chart of application and approval change of psychotropic

科室信息		药品信息			生效日期	已作废记录
		盐酸哌替啶注射液	盐酸吗啡注射液	枸橼酸芬太尼注射液		
		50 mg	10 mg	0.5 mg		
科室	存放地点	数量（支）	数量（支）	数量（支）		
急诊科	抢救区治疗室	5	5	0	XXXX年XX月XX日	XXXX年XX月XX日 XXXX年XX月XX日
心脏内科	住院部2楼B区治疗室	0	5	5	XXXX年XX月XX日	XXXX年XX月XX日 XXXX年XX月XX日
合计		5	10	5		

图 3 麻精药品基数备案数据库

Fig 3 Database of records of psychotropic

2.2 基于 ADC 的麻精药品信息化监控与管理模式

自动化智能药柜（automated dispensing cabinet，ADC）于 20 世纪 80 年代开始进入美国医疗机构，2013 年时，美国≥ 600 张床位的医院，ADC 配备率达 91.7%[24]。近年来，我国也有部分医院开始采用智能药柜用于供应和管理病区药品 [25]。麻精药品存放于病区 ADC 中，通过 ADC 系统满足麻精药品的安全储存、自动调剂以及库存管理、效

期管理等，精确记录药品的取用[24]，满足全程闭环式可追溯管理的要求。其功能系统包括身份识别、仓储配置、库存清点、批号 / 效期管理、与 HIS 间的数据传输、空安瓿 / 废贴回收、生成记录 / 报表等板块，并安装视频监控，相关视频保存期限应≥ 180 d，流程见图 4。从药品的安全性考虑，发生退药时，取出药柜的药品应经过药师验收后重新入柜。由于 ADC 摆放在病区内，且麻精药品为现取现用，所以不会造成过多的退药操作。

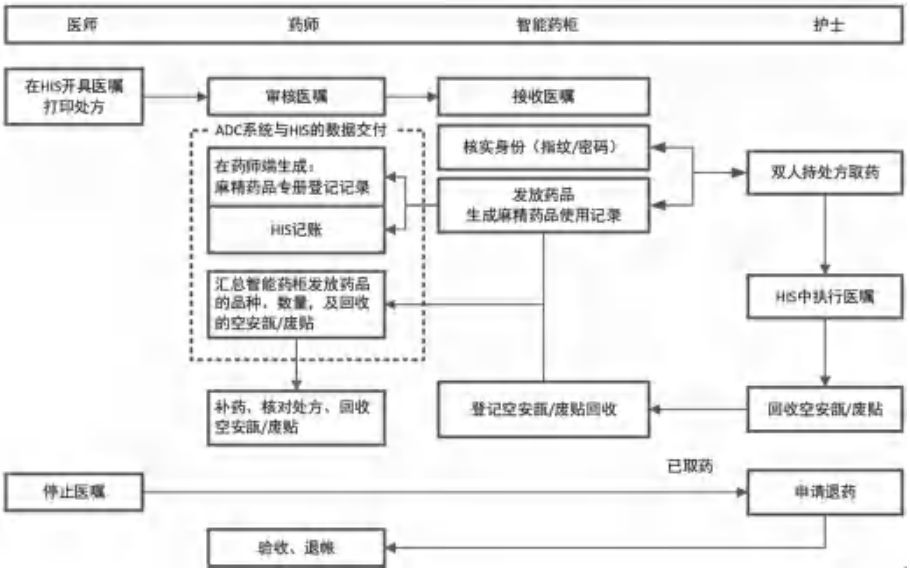


图 4　麻精药品信息化监控与管理模式下的操作流程

Fig 4　Operational flow in the informationized monitoring and management model for psychotropic

与传统管理模式相比，基于 ADC 的麻精药品信息化监控与管理模式具有以下优势：

① 远程监控：药师可实时监控病区麻精药品的药品数量、批号、效期、使用情况等；② 自动化管理，减少差错：数据在 HIS 和 ADC 系统，医师端、药师端、护士端自动传递，机器管理人工复核，避免人为因素造成的差错；③ 信息化管理：自动记录操作人，自动生成所有电子操作记录并储存，便于汇总及统计分析，发生差错可及时溯源；④ 规范化管理：根据医嘱用法用量自动生成电子处方、麻精药品使用记录、废弃余液登记记录、麻精药品专册登记记录等，可保证麻精药品的文书记录完整规范；⑤ 提升效率：缩短住院医嘱执行时间，减少药师和护士人工登记操作，提高药师和护士的工作效率；⑥ 闭环管理，便于追溯：系统核实、视频记录取药人、复核人、取药品种、数量、批号、对应处方，生成使用记录，在回收空安瓿 / 废贴时，关联相应处方信息，实现麻精药品在使用端的闭环可溯源管理。

2.3　基于电子处方系统的麻精药品无纸化管理模式

电子处方是通过 HIS 实现处方电子化的主要途径[26]。电子处方系统通过识别医师在 HIS 中录入的患者病历、药品信息等，按照《处方管理办法》要求的规定格式自动生成处方并打印，是医院信息系统的重要组成部分，已广泛应用在各级医疗机构[27-28]。但由于麻精药品管理的特殊要求，麻精药品电子处方的使用相对滞后。已使用麻精药品电子处方的医疗机构，多数采用打印纸质处方后医师手写签名，或打印自带电子签名的处方后加盖医师签章，药师审核调配处方后，按日装订编号储存。我国现行法律法规对于麻精药品信息化管理要求比较滞后，尚无麻精药品处方是否可以采用电子签名的明确规定[19]。根据《中华人民共和国电子签名法》第十四条要求：“可靠的电子签名与手写签名或者盖章具有同等的法律效力”。未来或许电子签名也可应用在麻精药品处方中。

麻精药品电子处方从 HIS 电子病历中采集患者 ID 号、姓名、性别、年龄、身份证号、代办人姓名和身份证号、科室、床号、临床诊断，从医嘱信息中采集药品的名称、规格、数量、剂量、给药途径、给药频次。麻精药品电子处方应用流程见图 5。电子处方生成前由药师在线完成前置审方，对不合理处方进行提前干预。可有效避免手写处方因字迹潦草、缺项漏项、处方内容涂改、用法用量不规范等情况影响临床用药的及时性。北京协和医学院麻醉科手术室上线麻醉药品电子处方后，处方

合格率提高了 23.5%[19]。此外，通过在系统中维护的批号，并与处方进行关联，可实现药品在使用端的批号溯源。若电子签名技术应用在麻精药品处方中，打印处方的步骤则可移至药师发放药品时，并通过技术手段自动生成处方编号，即可减少人工编号、人工清点的工作量，又可降低处方丢失的风险，也可为处方无纸化管理奠定基础。华中科技大学同济医学院通过保存麻醉药品电子处方 PDF 文件，实现了麻醉药品处方无纸化管理，不仅减少了医疗差错的发生率，还降低了传染病流行期间潜在的交叉感染风险，并延长了处方可保存的时间 [29]。

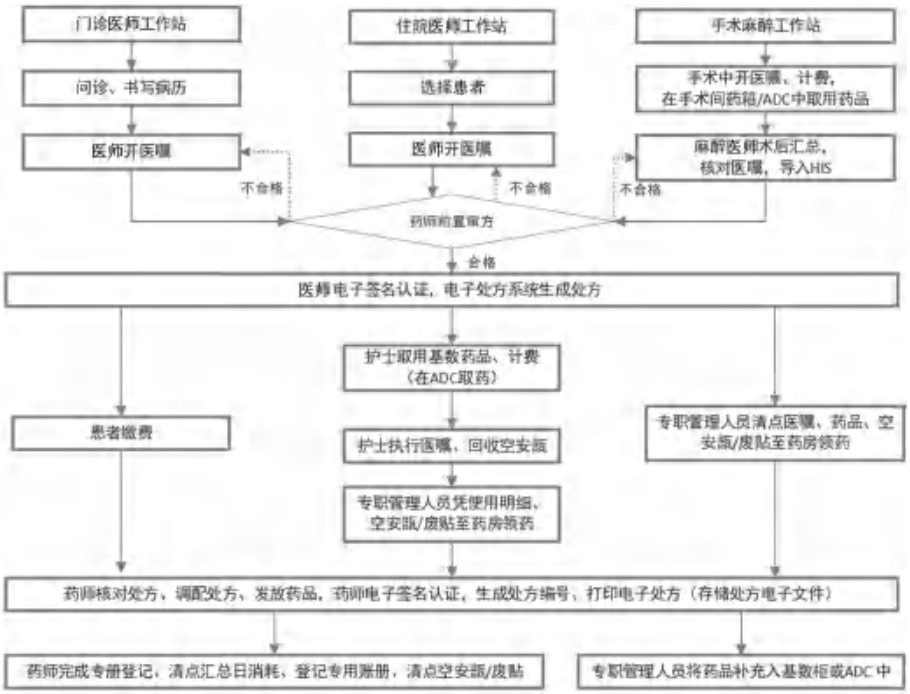


图 5 麻精药品电子处方应用流程

Fig 5 Application process of electronic prescriptions for psychotropic

2.4 基于麻精药品专用电子病历管理癌痛和中、重度慢性疼痛患者

在 HIS 和 APP 中开发构建麻精药品专用电子病历模块，可改进门（急）诊癌痛和中、重度慢性疼痛患者资格审核、就医、取药流程，实现麻精药品的全程闭环式可追溯管理（见图 6）。麻精药品专用电子病历，可存档患者身份信息文件、知情同意书、病情证明书、就诊病历等资料的电子文件，可完整保存患者的病历信息，便于快速查询，提升病历管理质量。在诊疗中麻精药品专用电子病历模块自动记录患者每次就诊的病历内容、处方信息，计算处方疗程，记录随诊时间和出 / 入院时间，保证患者用药安全，提高医疗服务质量和效率。浙江省绍兴市新昌县人民医院通过建立门诊麻醉药品电子专用病历管理系统缩短了门诊患者取药等候时间约 23 min，显著提升了患者满意度 [30]。

药师结合麻精药品专用电子病历中的信息进行处方审核，并记录患者取药信息和废贴归还情况。通过 APP 中的麻精药品专用电子病历板块，药师可开展远程用药教育、药学随访、不良反应监测；医师可开展疼痛评估、疼痛随访；患者可查询既往就诊信息，设置复诊提醒，查询用药教育，填写疼痛问卷，登记不良反应等。未来，在公安部门的支持下，还可借助麻精药品专用电子病历建立麻精药品区域信息共享平台，将麻精药品使用信息在各医疗机构间共享，实现麻精药品流向追踪、实时用量数据监控、违规行为预警等功能，有效预防骗取、冒领麻精药品的行为，避免麻精药品流入非法渠道 [31]。南京大学医学院附属鼓楼医院通过建成门诊麻醉药品电子专用病历管理系统，简化了慢性疼痛患者的就诊流程，降低了麻醉药品被滥用的风险 [32]。

2.5 基于物联网技术的电子镇痛泵管理

PCA 是指患者使用 PCA 泵，按需多次自助设定小剂量镇痛药的一种方法 [33]。PCA 起效快，能根据需要及时调整用药剂量，实现个体化给药，可避免用药量不足镇痛效果不佳或用药过量发生不良反应，有利于维持患者呼吸、循环系统稳定。PCA 不仅能有效控制患者的疼痛，还有利

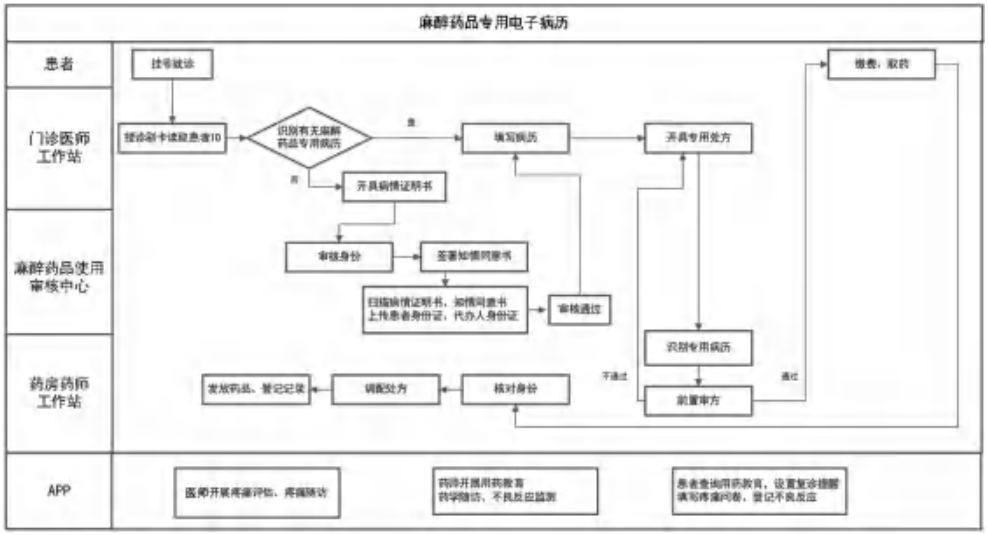


图 6　麻醉药品专用电子病历模块信息化改造流程

Fig 6　Process for the informational transformation of the electronic medical record module for anesthetic drugs

于术后患者咳嗽排痰、胃肠功能恢复，减轻免疫抑制、加快免疫功能恢复，降低术后并发症的发生率，已广泛应用于术后镇痛[34]。基于物联网技术的电子镇痛泵管理系统（结构图见图 7），能够将院内运行的电子镇痛泵信息传输到集中信息处理平台进行数据分析和处理，医护人员实时监控 PCA 的使用，麻醉医师在系统中对使用 PCA 的患者进行随访，发现问题及时干预。使用定位技术对镇痛泵进行管理，有助于医务人员及时定位到发出报警的镇痛泵并处理。此外，电子镇痛泵管理系统还可记录患者停用的镇痛泵处理信息，并生成《镇痛泵使用和废弃余液处理记录》。麻醉医师远程监测镇痛泵运行状态的同时，还可对已停用的镇痛泵的处理情况进行监督，避免麻精药品流入非法渠道。浙江大学医学院附属第一医院基于物联网技术设计的镇痛泵的远程管理系统，实现了镇痛泵信息远程采集传输和定位管理等临床需求，提升了镇痛管理质量[35]。

3　总结与展望

基于 OA 系统、HIS、物联网技术、智能化设备、处方审核系统、处方点评系统等共同构建的麻精药品智能化管理模式，实现麻精药品全程闭环式可追溯管理的同时，能够加强对医疗机构麻精药品的监管力度，规范麻精药品使用，填补麻精药品的监控盲区，保证麻精药品管理的安全合法，杜绝了药物滥用[36-37]；能够为医护人员提供高效的工作环境，降低了医疗风险，为患者提供更加安全有效的诊疗服务；能够将药师从烦琐的管理工作中解脱出来，将工作重心移至合理用

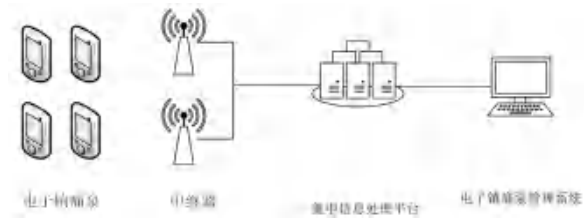


图 7　基于物联网技术的电子镇痛泵管理系统结构图

Fig 7　Schematic diagram of patient-controlled analgesia management system

药，为临床提供更优质的药学服务[38-39]。

随着新时期医疗水平高质量的发展，以及开展互联网医疗的需求，利用人工智能、物联网和区块链等新兴技术，构建全流程、信息化、智能化的医疗服务，提升医院药事管理工作的效率和质量，是医院药学发展的必然趋势。随着信息技术的日益成熟和不断涌现的新型智能化设备，给医疗机构麻精药品管理提供了基础支持。在国家政策的指导和鼓励下，医疗机构麻精药品的管理必然会向精细化、信息化、智能化发展。

参考文献

[1] 许祎，陈清，陈晓蕾 . 医疗机构管理麻醉药品、精神药品相关新政策解读 [J]. 中国处方药，2022，20（2）：45-46.

[2] 中华人民共和国卫生部 . 卫生部关于印发《麻醉药品临床应用指导原则》的通知 [EB/OL]. [2007-5-11]. http：//www. nhc. gov. cn/bgt/pw10704/200705/4381b0ae7f-72464c9d364e81ed491022. shtml.

[3] 中华人民共和国卫生部 . 卫生部关于印发《精神药品临床应用指导原则》的通知 [EB/OL]. [2007-5-11]. http：//www. nhc. gov.cn/bgt/pw10704/200705/e407fbb6908f-4d469a750a7dd23c7485. shtml.

[4] 中国抗癌协会肿瘤临床药学专业委员会 . 医疗机构麻醉药品和第一类精神药品信息化管理专家共识编写组 . 医疗机构麻醉药品和第一类精神药品信息化管理专家共识 [J]. 医药导报，2022，41（1）：1-7.
[5] 国家卫生健康委办公厅 . 关于加强医疗机构麻醉药品和第一类精神药品管理的通知 [EB/OL]. [2020-9-11]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/202009/ee-4a21c2756f440e98f78d2533d7539a. shtml.
[6] 国家卫生健康委 . 关于印发《三级医院评审标准（2022 年版）》及其实施细则的通知 [EB/OL]. [2022-12-15]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s3585/202212/cf-89d8a82a68421cbb9953ec610fb861. shtml.
[7] 国家食品药品监督管理总局，中华人民共和国公安部，中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 . 关于公布麻醉药品和精神药品品种目录的通知 [EB/OL]. [2013-11-11]. https：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwj-yp/20131111120001419. html.
[8] 国家药监局，公安部，国家卫生健康委 . 关于将含羟考酮复方制剂等品种列入精神药品管理的公告 [EB/OL]. [2019-7-11]. https：//www. nmpa. gov. cn/yaopin/ypggtg/ypqtgg/20190806152901102. html.
[9] 国家药监局，公安部，国家卫生健康委 . 关于调整麻醉药品和精神药品目录的公告 [EB/OL]. [2023-4-18]. https：//www. nmpa. gov. cn/yaopin/ypggtg/20230418144449182. html.
[10] 卫生部 . 关于印发《医疗机构麻醉药品、第一类精神药品管理规定》的通知 [EB/OL]. [2005-11-14]. https：//www. gov. cn/gongbao/content/2006/content_401231. htm.
[11] 陈春玲，张晅，许建国，等 . 我院住院药房麻醉药品、第一类精神药品空安瓿、废贴回收的现状分析和改善 [J]. 中国医药导报，2017，14（2）：122-126.
[12] 中华人民共和国卫生部令 . 处方管理办法 [S]. 2007.
[13] 赵红英，邵燕飞，沈浓儿，等 . 麻醉药品专用病历信息化管理体系的构建与实施 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（15）：1878-1881.
[14] 营凌燕，何晓静 . 国外医院药学信息化发展及对我国的启示 [J]. 中国信息界 -e 医疗，2014，7（11）：60-61.
[15] 中华医学会麻醉学分会 . 成人手术后疼痛处理专家共识 [J]. 临床麻醉学杂志，2017，33（9）：190-196.
[16] 王亚州，龚瑞雪，张斌 . 利用信息技术再造门诊麻醉药品专用病历管理流程 [J]. 江苏卫生事业管理，2020，31（2）：171-174.
[17] 丁群芳，黄静，江子芳，等 . 癌症疼痛规范化管理信息平台的构建及应用 [J]. 中华护理杂志，2014，49（1）：387-391.
[18] 邢鲁民，徐民，李潇 . 智能化药品闭环管理在药品管理流程优化的应用体会 [J]. 中国医学装备，2019，16（4）：137-141.
[19] 白冰，杨根治，张越伦，等 . 麻醉药品处方的电子化在质量控制中的应用 [J]. 基础医学与临床，2022，42（5）：836-839.
[20] 李攀，严安定，李静，等 . 某院手术药房麻醉药品专用账册电子化的实践 [J]. 中国医药科学，2020，10（16）：227-230.
[21] 丁红，林玉玲，陈前升，等 . 全程可追溯安瓿使用与回收清点系统的发明 [J]. 护理学报，2020，27（1）：76-78.
[22] 刘天波，聂启博 . OA 系统在日常工作中的应用 [J]. 电脑迷，2018，16（9）：149.
[23] 贺丽琴，张小英 . 工作流技术的研究与应用 [J]. 科学之友，2011，32（24）：11-12.
[24] 张琪，梁欣，刘洋，等 . 智能药柜在美国医院的应用概况及在我国的发展 [J]. 中国药房，2016，27（13）：1865-1867.
[25] 施俊伟，潘冬梅 . 智能药架在药房应用的利弊分析 [J]. 中医药管理杂志，2015，23（22）：87-88.
[26] 裴奕 . 电子处方系统的设计与实现 [J]. 中国病案，2012，13（4）：51-52.
[27] 刘健，邓小云，刘艺平，等 . 信息化促进医院药学服务转型与学科发展 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（4）：448-451，455.
[28] 白冰，杨根治，张越伦，等 . 麻醉药品处方的电子化在质量控制中的应用 [J]. 基础医学与临床，2022，42（5）：836-839.
[29] 裘琳，周海云，吴广杰，等 . 后疫情时代医院麻醉药品处方无纸化流程的实践与探讨 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（13）：1382-1385.
[30] 陈颖 . 门诊麻醉药品电子专用病历管理系统的建立与应用 [J]. 中医药管理杂志，2021，29（17）：166-167.
[31] 中国抗癌协会肿瘤临床药学专业委员会，医疗机构麻醉药品和第一类精神药品信息化管理专家共识编写组 . 医疗机构麻醉药品和第一类精神药品信息化管理专家共识 [J]. 医药导报，2022，41（1）：1-7.
[32] 王亚州，龚瑞雪，张斌 . 利用信息技术再造门诊麻醉药品专用病历管理流程 [J]. 江苏卫生事业管理，2020，31（2）：171-174.
[33] Du YJ，Wei SM. Progresses in patient-controlled analgesin [J]. Med Recap，2008，14（7）：1089-1091.
[34] Gianferrari P，Voltolina M，Clara ME，et al. Postop-erative pain management：epidural analgesia [J]. Minerva Chir，2003，58（6）：857-860.
[35] 陈华，陈斯尧，毛彬 . 基于物联网技术电子镇痛泵的智能管理 [J]. 医疗装备，2018，31（13）：24-26.
[36] 陈晓莉，张瑞，楚尧娟，等 . 智能麻醉药品管理系统在我院麻醉科的应用实践及体会 [J]. 中国药房，2015，26（16）：2247-2250.
[37] 陈波，朱余兵，戚建伟，等 . 应用 DIH 智能麻醉药品管理柜提高麻醉药品管理质量 [J]. 中国卫生质量管理，2015，22（5）：38-39.
[38] 王瑞君，朱晓虹，王咏梅，等 . 智能毒麻药管理柜在我院住院西药房的应用评价 [J]. 中国药房，2015，26（16）：2241-2243.
[39] 顾宝晨，陈蓉，包健安 . 智能麻醉药品管理机在我院门诊药房麻醉药品管理中的应用 [J]. 中国药房，2015，26（25）：3534-3536.

（收稿日期：2023-09-10；修回日期：2023-11-05）

免疫检查点抑制剂治疗肾细胞癌致免疫相关不良反应与预后相关性的 Meta 分析

桂辉娜[1, 2]，刘晓波[1]，温瑾[2*]，蒋佳豫[1, 2]（1. 大理大学药学院，云南　大理　671000；2. 云南省第三人民医院药剂科，昆明　650011）

摘要：目的　系统评价免疫检查点抑制剂（ICIs）治疗肾细胞癌致免疫相关不良反应（irAEs）与预后的相关性。**方法**　计算机检索 PubMed、Cochrane Library、Embase、Web of Science、中国知网、万方、维普、中国生物医学文献服务系统数据库自建库至 2023 年 10 月 28 日发表的关于 ICIs 治疗肾细胞癌致 irAEs 与预后相关性的临床研究。采用纽卡斯尔 - 渥太华量表对纳入文献质量进行评价，采用 RevMan 5.4 软件进行 Meta 分析。**结果**　共纳入 15 篇回顾性研究，涉及 1781 例患者。Meta 分析结果显示，在接受 ICIs 治疗的肾细胞癌患者中，irAEs 的发生与更好的客观反应率（ORR）（$P < 0.01$）、疾病控制率（DCR）（$P < 0.01$）、无进展生存期（PFS）（$P < 0.01$）和总生存期（OS）（$P < 0.01$）显著相关。轻度（1 ～ 2 级）irAEs 及数量≥ 2 种 irAEs 的发生与 PFS 和 OS 的改善显著相关（$P < 0.01$）。然而，器官特异性 irAEs 及重度（3 ～ 4 级）irAEs 发生与 OS 和 PFS 的改善无统计学相关性（$P > 0.05$）。根据地理区域、ICI 类型进行的亚组分析结果显示，美国、意大利地区和仅接受抗 PD-1/PD-L1 治疗的患者，都显示 irAEs 发生与更好的 PFS 和 OS 相关（$P < 0.01$）；联合使用抗 PD-1 和抗 CTLA-4 治疗的患者，显示 irAEs 发生与更好的 OS 相关（$P < 0.01$）。敏感性分析结果显示，所得结果较稳健。发表偏倚分析结果显示，本研究可能存在一定的发表偏倚。**结论**　ICI 治疗肾细胞癌致 irAEs 发生与其更好的 ORR、DCR、PFS 和 OS 有关，轻度（1 ～ 2 级）irAEs 及数量≥ 2 种 irAEs 的发生与 PFS 和 OS 的改善相关。irAEs 可能是 ICIs 治疗肾细胞癌疗效的预测因子。

关键词：肾细胞癌；免疫检查点抑制剂；免疫相关不良事件；预后；相关性；Meta 分析
中图分类号：R735.1，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0791-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.036

Meta-analysis of the correlation between immune-related adverse events and prognosis of immune checkpoint inhibitors for renal cell carcinoma

GUI Hui-na[1, 2], LIU Xiao-bo[1], WEN Jin[2*], JIANG Jia-yu[1, 2] (1. *College of Pharmacy*, *Dali University*, *Dali Yunnan* 671000; 2. *Department of Pharmacy*, *Yunnan Third People's Hospital*, *Kunming* 650011)

Abstract: Objective To systematically evaluate the relationship between immune-related adverse events (irAEs) and prognosis of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in the treatment of renal cell carcinoma (RCC). **Methods** PubMed, Cochrane Library, Embase, Web of Science, CNKI, Wanfang database, VIP and CBM were searched to collect prospective or retrospective cohort studies on the correlation between irAEs and prognosis of ICIs for RCC. The retrieval time was from the inception to October 28, 2023. Newcastle-Ottawa scale was used to evaluate the quality of included literatures. Meta-analysis was performed by RevMan 5.4 software. **Results** Totally 15 retrospective studies involving 1781 patients. The meta-analysis showed that the occurrence of irAEs was significantly associated with better objective response rate (ORR)($P < 0.01$), disease control rate (DCR)($P < 0.01$), progression-free survival (PFS)($P < 0.01$) and overall survival (OS)($P < 0.01$) in patients with RCC receiving

基金项目：云南省科技厅基础研究计划项目（No. 202101BA070001-121）。
作者简介：桂辉娜，女，硕士，主要从事临床药学研究，email：ghn1146347537@163.com　*__通信作者：__温瑾，女，硕士，主管药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学、药物基因组学、治疗药物监测研究，email：ynwjin@163.com

ICIs. The occurrence of mild (grade 1 ～ 2) and ⩾ 2 kinds of irAEs was significantly associated with the improvement of PFS and OS ($P < 0.01$), while the occurrence of organ-specific irAEs and severe irAEs (grade 3 ～ 4) was not significantly associated with the improvement of OS and PFS ($P > 0.05$). Subgroup analysis based on geographic regions and ICI types showed that irAEs were associated with better PFS and OS in patients receiving only anti-PD-1/PD-L1 therapy in the United States and Italy ($P < 0.01$), while irAEs were associated with better OS in patients receiving combination therapy of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 ($P < 0.01$). Sensitivity analysis showed relatively robust results in the above-mentioned meta-analysis. The results of the publication bias analysis showed possible publication bias in this study. **Conclusion** ICIs for RCC resulted in irAEs associated with better ORR, DCR, PFS and OS. The occurrence of mild (grade 1 ～ 2) and ⩾ 2 kinds of irAEs is associated with improved PFS and OS, so irAEs may be a predictor of the efficacy of ICIs for RCC.

Key words: renal cell carcinoma; immune checkpoint inhibitor; immune-related adverse event; prognosis; correlation; meta-analysis

肾细胞癌（renal cell carcinoma，RCC）是泌尿系统常见的恶性肿瘤[1]，发病率占所有肿瘤的2% ～ 3%[2]。肾细胞癌具有起病隐匿，恶性度高，进展迅速等特点。20% ～ 30%的新发患者初诊时就已出现转移[3]。分子靶向药物、酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitors，TKI）和免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitors，ICIs）已越来越多地用于晚期肾细胞癌的治疗[4]。目前，ICIs已成为晚期或转移性肾细胞癌患者治疗的重要组成部分[5-6]。ICIs增强了宿主细胞的免疫能力，其对机体产生一定的不良反应被称为免疫相关不良事件（immune-related adverse events，irAEs）[7]。这些irAEs与传统肿瘤疗法的不良反应不同，通常发作比较迟缓且持续时间较长[8]。IrAEs可以影响任何器官系统，其中胃肠道、内分泌腺、皮肤和肝脏最常见。虽然大多数irAEs可以用类固醇和其他免疫调节剂成功治疗，但罕见的、严重的irAEs如心肌炎死亡率高达24%，给肿瘤免疫治疗带来了极大的挑战[9]。

目前，虽然已有Meta分析证明了irAEs与ICIs疗效之间具有相关性，但主要是关于黑色素瘤或肺癌的研究[10-11]。肾细胞癌相关的文献纳入很少，且未进行系统的亚组分析，有的研究仅对单独的文献结果进行分析，未得出一致的结论[12-14]。部分国外学者运用队列研究的方法，对肾细胞癌患者使用ICIs后发生irAEs与疗效的相关性进行了研究，但研究结论不一致，尚存在争议[15-19]。因此，对于肾细胞癌患者irAEs发生是否与ICIs疗效的改善有关，还有待进一步探讨。

基于此，本研究将纳入国内外相关数据进行Meta分析，以评估肾细胞癌患者使用ICIs后irAEs的发生与临床结局的相关性，为临床上肾细胞癌患者ICIs的使用及安全性评估提供全面、可靠的循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 文献检索策略

通过医学主题词与自由词结合的检索方法自建库至2023年10月28日在英文数据库（PubMed、Cochrane Library、Embase、Web of Science）和中文数据库（中国知网、万方、维普、中国生物医学文献服务系统）进行相关文献检索。中文检索词为“肾细胞癌”“免疫检查点抑制剂”“帕博利珠单抗”“纳武利尤单抗”“阿替利珠单抗”“度伐利尤单抗”“伊匹木单抗”“特瑞普利单抗”“卡瑞利珠单抗”“西米普利单抗”“信迪利单抗”“阿维单抗”“曲美木单抗”“免疫相关不良反应”“治疗相关不良反应”“不良反应”“疗效”“结局”“预后”“生存”；英文检索词为“renal cell carcinoma”“RCC”“immune checkpoint inhibitors”“PD-1”“PD-L1”“CTLA-4”“pembrolizumab”“nivolumab”“atezolizumab”“durvalumab”“ipilimumab”“toripalimab”“camrelizumab”“cemiplimab”“sintilimab”“avelumab”“tremlimumab”“immune-related adverse events”“irAEs”“treatment-related adverse events”“adverse events”“efficacy”“outcome”“prognosis”“survival”。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 ① 评估接受PD-1/PD-L1或CTLA-4抑制剂单药治疗或联合治疗的肾细胞癌患者，并根据是否发生irAEs将患者分为irAEs

组和非 irAEs 组；② 报道了接受 ICIs 治疗的肾细胞癌患者的 irAEs 与预后 [总生存期（OS）或无进展生存期（PFS）] 之间的关联。

1.2.2　排除标准　① 评论、综述、指南、病例报告或动物研究；② 有 OS 和 PFS 的相关报道但未提供其风险比（HR）及 95% 置信区间的文献；③ 无法检索到全文或无法提取到数据的文献；④ 研究内容、设计不符合或研究内容包括所有肿瘤类型的文献。

1.3　文献筛选与数据提取

两名研究者独立完成了文献筛选和数据提取，第三名研究者解决了分歧。提取的基线信息主要包括第一作者、发表年份、研究设计类型、国家、接受 ICIs 治疗患者的数量、年龄、性别、ICIs 类型、irAEs 类型、等级和发生数量、结局指标 [HR 及 95% 置信区间（*CI*）]。一些研究提供了多变量和单变量 HR，本研究选择了前者。

1.4　文献质量评价

两位研究者使用纽卡斯尔 - 渥太华量表（NOS）对纳入的 15 项回顾性研究的质量进行独立评估 [20]，得分范围为 0 ～ 9，得分为≥ 6 的为高质量研究。

1.5　统计学方法

提取 HR 及其 95%*CI*，以评估 irAEs 的发生与 OS 和 PFS 之间的关联，使用 RevMan 5.4 软件绘制森林图。采用卡方检验判断各纳入研究结果间的异质性，若 $P > 0.10$，且 $I^2 < 50\%$，表明同质性较好，采用固定效应模型分析；若 $P < 0.10$ 或 $I^2 > 50\%$，表明统计上具有异质性，采用随机效应模型分析数据 [20]。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　文献检索结果

共检索到相关文献 3216 篇，剔除重复后获得 2142 篇，通过阅读标题、摘要和全文进行逐层筛选，最终纳入 15 篇文献，均为回顾性队列研究 [17-19，21-32]，共 1781 例肾细胞癌患者，具体的筛选流程见图 1。纳入文献基本信息见表 1，纳入的 15 项研究 NOS 评分均不低于 5 分，文献质量可靠。

2.2　Meta 分析结果

2.2.1　irAEs 与 ORR、DCR 的相关性　4 项研究报道了 irAEs 组与非 irAEs 组患者的 ORR 和 DCR[17，19，25，28]。ORR 和 DCR 异质性检验结果分别对应 $I^2 = 0\%$、$P = 0.56$ 和 $I^2 = 8\%$、$P = 0.37$，Meta 分析采用固定效应模型。结果显示，irAEs 组患者的 ORR 和 DCR 都显著高于非 irAEs 组（$P < 0.01$），见图 2 和图 3（在分析 ORR 和 DCR 指标时，原始文献 [18] 未纳入最初的所有患者，故该篇文献的两组患者总数与表 1 中总样本量不一致）。

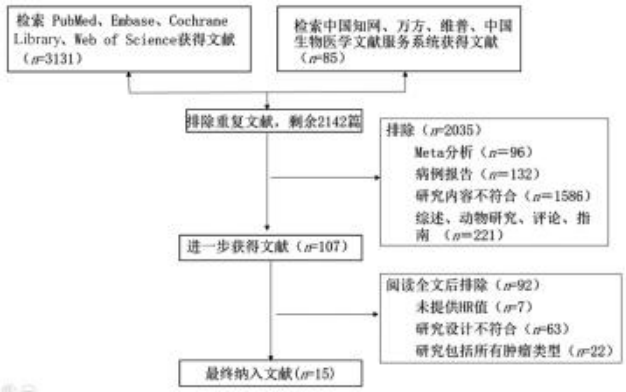


图 1　文献筛选流程图

Fig 1　Flow chart of literature screening

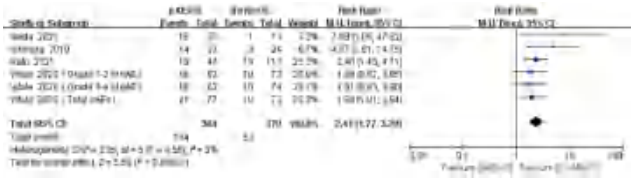


图 2　两组患者 ORR 的 Meta 分析森林图

Fig 2　Meta-analysis forest plot of ORR in both groups of patients

图 3　两组患者 DCR 的 Meta 分析森林图

Fig 3　Meta-analysis forest plot of DCR in both groups of patients

2.2.2　irAEs 与 PFS、OS 的相关性　11 项研究报告了 irAEs 与 PFS 的相关性 [17-19，21-25，27-28，32]，12 项研究报告了 irAEs 与 OS 的相关性 [18-19，21-23，25-27，29-32]。各研究间有统计学异质性（PFS：$I^2 = 65\%$，$P < 0.000\,01$；OS：$I^2 = 48\%$，$P = 0.0003$），Meta 分析采用随机效应模型。结果显示，irAEs 与 PFS（$P < 0.01$）和 OS（$P < 0.01$）的改善显著相关，见图 4 和图 5。

2.2.3　不同类型、等级和数量 irAEs 与 PFS、OS 的相关性　进一步对不同类型器官特异性 irAEs 与 PFS 和 OS 的相关性进行分析。结果显示，肾细胞癌患者发生皮肤、肾上腺、甲状腺、肝炎、肺炎和结肠 irAEs 与 PFS 和 OS 改善均无统计学相关性；对不同等级和数量 irAEs 与 PFS 和 OS 的相关性进行分析，结果显示，轻度（1 ～ 2 级）irAEs 的发生与 PFS（$P < 0.01$）和 OS（$P < 0.01$）的改善显著相关；数量≥ 2 种 irAEs 的发生与 OS（$P < 0.01$）的改善显著相关。结果见表 2。

2.2.4　亚组分析　根据 ICI 类型、地理区域对

表 1 纳入研究的基本信息及质量评价结果

Tab 1 Basic information of included studies and quality evaluation results

作者	国家	中位年龄 / 岁	男 / 女	ICIs	（irAEs 组 / 非 irAEs 组）人数	irAEs 类型	irAEs 等级和 / 或数量	结局指标	NOS 评分
Ueda	日本	66（42 ～ 80）	31/4	NIVO ＋ IPI	22/13	任何，主要是皮肤，肾上腺，甲状腺，结肠炎	任何	PFS，OS	8
Numakura	日本			NIVO ＋ IPI	56/33	任何	任何	PFS，OS，ORR	6
Kankkunen	芬兰			NIVO	56/40	任何	任何	PFS，OS	7
Paderi	意大利	65（45 ～ 79）	35/8	NIVO 或 NIVO ＋ IPI	29/14	皮肤，甲状腺	任何，≥ 2 种	PFS	9
Martini	美国		142/58	PD-1	66/134	任何，主要是内分泌（甲状腺、垂体），肺，皮肤，肾上腺，胃肠道（结肠），肾，肝，胰腺，其他	任何，3 ～ 4 级	PFS，OS	9
Kato	日本	66（27 ～ 87）	118/42	NIVO	47/113	任何	任何	PFS，OS，ORR，DCR	9
Ikeda	日本		33/13	NIVO ＋ IPI	33/13	任何	任何	PFS，ORR，DCR	8
Vitale	意大利	66.8（31 ～ 85）	124/43	NIVO	77/90	任何	任何，1 ～ 2 级，3 ～ 4 级	PFS，OS，ORR，DCR	7
Verzoni	意大利	65（34 ～ 85）	291/98	NIVO	76/313	任何	任何	OS	6
Labadie	美国	66（17 ～ 92）	65/25	PD-1/PD-L1	24/66	任何	任何	PFS，OS	7
Ishihara	日本		37/10	NIVO	23/24	任何	任何	PFS，ORR，DCR	8
Elias	美国			ICIs	65/25	任何	任何	OS	5
Sagie	以色列	62（53 ～ 69）	87/36	NIVO ＋ IPI 或 NIVO	47/76	甲状腺炎、瘙痒、皮疹、肾炎、肝炎、肺炎、腹泻或结肠炎或胃炎	任何，3 ～ 4 级	OS	9
Nukaya	日本	65.5（59 ～ 74）	57/12	NIVO ＋ IPI	38/31	任何	任何	OS	7
Washino	日本	67（28 ～ 87）	92/37	NIVO ＋ IPI	96/41	任何	1 ～ 2 级，≥ 3 级；1 种，≥ 2 种	PFS，OS	6

注（Note）：NIVO. 纳武利尤单抗（nivolumab）；IPI. 伊匹木单抗（ipilimumab）；PD-1. 程序性死亡受体 1（programmed death receptor 1）；PD-L1. 程序性死亡配体 -1（programmed cell death-ligand 1）；ORR. 客观反应率（objective response rate）；DCR. 疾病控制率（disease control rate）

irAEs 与 PFS 和 OS 的关联进行了亚组分析。结果见表 3。

① 基于 ICI 类型的亚组分析：对抗 PD-1/ PD-L1、抗 PD-1 或抗 PD-1 ＋抗 CTLA-4 两种类型的 ICIs 进行了亚组分析。结果显示，对于仅接受抗 PD-1/ PD-L1 治疗的肾细胞癌患者，irAEs 发生与 PFS（$P < 0.01$）和 OS（$P < 0.01$）的改善显著相关。但对于同时接受 PD-1 和 CTLA-4 治疗的肾细胞癌患者，irAEs 发生与 OS（$P < 0.01$）的改善显著相关，而与 PFS（$P = 0.06$）的改善无关。

② 基于地理区域的亚组分析：根据地理区域分层的亚组分析结果显示，在美国和意大利地区，发生 irAEs 的肾细胞癌患者与更好的 PFS 和 OS 的改善显著相关（$P < 0.01$）；而在日本地区，发生 irAEs 的肾细胞癌患者与更好的 PFS 和 OS 的改善无关（$P = 0.07$）。

2.3 敏感性分析

采用改变效应模型的方法对四个结局指标（ORR、DCR、PFS、OS）进行敏感性分析，当改变原本的效应模型后，各项指标的结果没有发生较大变化，表明敏感性较低，本次 Meta 分析结果较稳定，具体如表 4 所示。

2.4 发表偏倚分析

以 PFS 和 OS 为指标，绘制倒漏斗图进行发表偏倚分析。倒漏斗图显示，各研究散点位于倒漏斗图的中上方，倒漏斗图左右两侧不对称，且少数研究偏离中心较远，提示可能存在一定的发表偏倚，详见图 6。

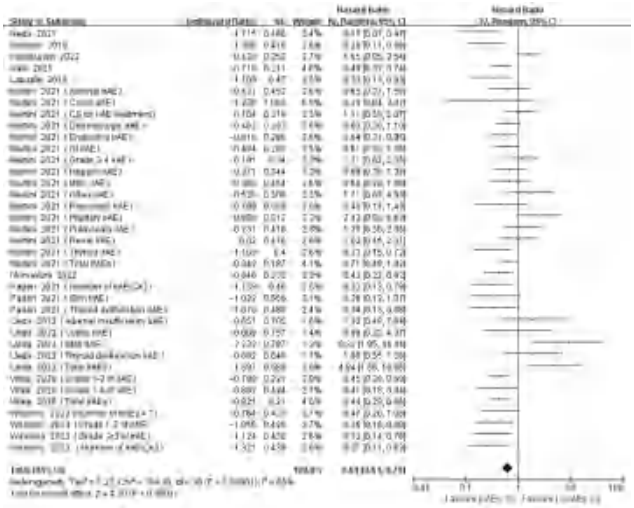


图 4　两组患者 PFS 的 Meta 分析森林图

Fig 4　Meta-analysis forest plot of PFS in both groups of patients

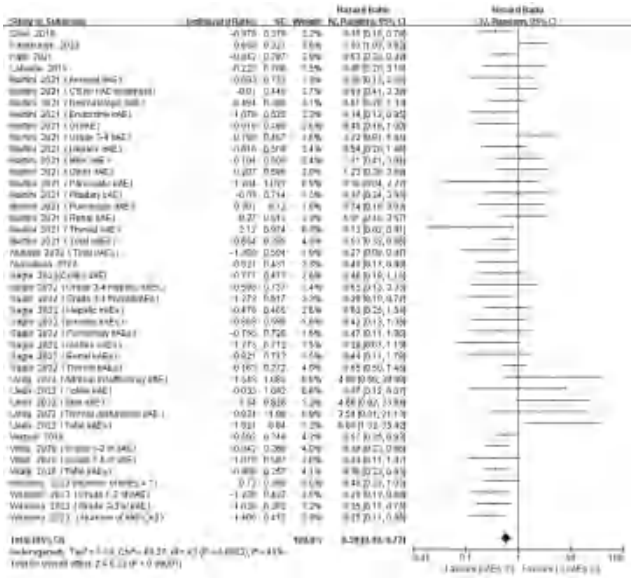


图 5　两组患者 OS 的 Meta 分析森林图

Fig 5　Meta-analysis of forest plots of OS in both groups of patients

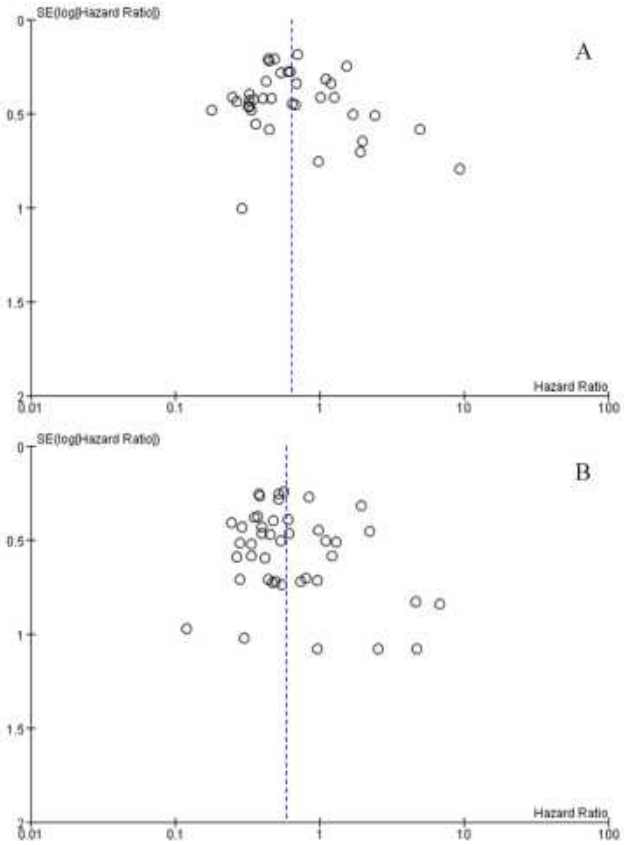


图 6　PFS（A）、OS（B）的倒漏斗图

Fig 6　Inverted funnel diagram for PFS（A）and OS（B）

3　讨论

3.1　irAEs 与 ICIs 治疗预后之间的相关性

目前，irAEs 与 ICIs 治疗预后之间的相关性仍存在争议。虽然 Fan 和 Hussaini 等 [12-13] 的 Meta 分析证明 irAEs 发生与 ICIs 治疗癌症患者更好的疗效和预后有关，但研究纳入了多种肿瘤类型，且主要分析肺癌和黑色素瘤，关于肾细胞癌纳入的

表 2　不同类型、等级和数量 irAEs 与 PFS、OS 的相关性

Tab 2　Correlation of different types，grades and numbers of irAEs with PFS，OS

irAEs	PFS					OS				
	纳入研究数（*n*）	异质性检验		HR[95%*CI*]	*P* 值	纳入研究数（*n*）	异质性检验		HR[95%*CI*]	*P* 值
		I^2/%	*P*				I^2/%	*P*		
任何 irAEs	11	65	＜0.000 01	0.64[0.51，0.79]	＜0.0001	12	48	0.0003	0.59[0.48，0.72]	＜0.000 01
皮肤 irAEs	3	83	0.002	1.11[0.26，4.74]	0.89	3	61	0.05	0.69[0.26，1.78]	0.44
肾上腺 irAEs	2	40	0.20	0.89[0.42，1.88]	0.76	3	46	0.16	0.71[0.29，1.75]	0.46
甲状腺 irAEs	3	67	0.05	0.55[0.20，1.48]	0.23	3	64	0.04	0.52[0.19，1.40]	0.19
结肠 irAEs	2	0	0.33	0.63[0.19，2.07]	0.45	2	0	0.53	0.52[0.22，1.21]	0.13
肝炎 irAEs	/	/	/	/	/	2	0	0.98	0.58[0.31，1.06]	0.08
肺炎 irAEs	/	/	/	/	/	2	0	0.66	0.59[0.22，1.61]	0.30
1～2 级 irAEs	2	0	0.59	0.43[0.29，0.63]	＜0.0001	2	0	0.56	0.36[0.23，0.56]	＜0.000 01
3～4 级 irAEs	3	72	0.03	0.56[0.24，1.31]	0.18	4	69	0.01	0.54[0.24，1.21]	0.13
数量≥2 种 irAEs	2	0	0.77	0.29[0.16，0.54]	＜0.0001	/	/	/	/	/

表 3 免疫相关不良事件与生存之间关联的亚组分析

Tab 3 Subgroup analysis of associations between immune-related adverse events and survival

亚组类别	PFS					OS				
	纳入研究数（*n*）	异质性检验 I^2/%	异质性检验 *P*	HR[95%*CI*]	*P* 值	纳入研究数（*n*）	异质性检验 I^2/%	异质性检验 *P*	HR[95%*CI*]	*P* 值
ICI 类型										
抗 PD-1/PD-L1	6	59	0.0002	0.67[0.54，0.83]	0.0002	6	49	0.005	0.65[0.50，0.84]	0.0009
抗 PD-1 或抗 PD-1 ＋抗 CTLA-4	5	73	＜0.000 01	0.62[0.37，1.03]	0.06	5	48	0.009	0.54[0.38，0.76]	0.0003
地理区域										
日本	6	75	＜0.000 01	0.64[0.39，1.05]	0.07	5	64	0.001	0.63[0.38，1.05]	0.07
美国	2	36	0.07	0.74[0.60，0.93]	0.009	3	27	0.14	0.67[0.50，0.89]	0.006
意大利	2	0	0.98	0.42[0.32，0.54]	＜0.000 01	2	0	0.61	0.44[0.33，0.58]	＜0.000 01

表 4 ORR、DCR 指标敏感性的 Meta 分析结果

Tab 4 Meta-analysis of sensitivity of ORR and DCR indicators

结局指标	固定效应模型		随机效应模型	
	RR[95%*CI*]	*P*	RR[95%*CI*]	*P*
ORR	2.41[1.77，3.29]	＜0.000 01	2.30[1.69，3.13]	＜0.000 01
DCR	1.65[1.44，1.88]	＜0.000 01	1.62[1.41，1.85]	＜0.000 01

表 5 PFS、OS 指标敏感性的 Meta 分析结果

Tab 5 Meta-analysis of the sensitivity of PFS and OS indicators

结局指标	固定效应模型		随机效应模型	
	HR[95%*CI*]	*P*	HR[95%*CI*]	*P*
PFS	0.61[0.55，0.69]	＜0.000 01	0.64[0.51，0.79]	＜0.0001
OS	0.57[0.50，0.65]	＜0.000 01	0.59[0.48，0.72]	＜0.000 01

文献数量很少，且未进行相应的亚组分析。因此，这种关联需要进一步在其他肿瘤患者中进行验证。ICIs 治疗肾细胞癌致 irAEs 发生与生存预后的相关性尚无综合分析和系统评价。因此我们通过系统评价和荟萃分析，以证明使用 ICIs 的肾细胞癌患者 irAEs 的发生与生存预后之间的关联。本文最终纳入了 15 项研究，共涉及 1781 例肾细胞癌患者。汇总分析显示，irAEs 组患者的 ORR、DCR、OS 和 PFS 明显优于非 irAE 组患者。该结论与先前发表的纳入所有癌症、肺癌或黑色素瘤患者的荟萃分析一致，表明 irAEs 的发生与 ORR、DCR、PFS 和 OS 之间存在正相关，irAEs 的发生可能是接受 ICIs 治疗的癌症患者的预后因素 [10-14]。

3.2 不同类型、等级和数量的 irAEs 与 ICIs 治疗预后之间的相关性

irAEs 常见且多类型，其发生率、时间和严重程度各不相同。因此，本文对不同类型、等级和数量的 irAEs 与 PFS 和 OS 的相关性进行分析，以进一步验证 irAEs 与 ICIs 治疗肿瘤预后之间的相关性。对不同等级和数量的 irAEs 进行分析，结果表明，轻度（1 ～ 2 级）及发生≥ 2 种 irAEs 与患者 PFS 和 OS 的改善显著相关（$P < 0.05$），此结果与先前发表的相关荟萃分析结果一致 [10-11，33]。irAEs 的机制尚不清楚，但被认为与以下因素有关：T 细胞对肿瘤和健康组织中存在的抗原的活性增加，先前存在的自身抗体或炎性细胞因子水平增加，以及由于 CTLA-4 抗体的直接结合而增强补体介导的炎症 [34]。根据上述可能的机制理论，irAEs 越严重，预后越好是符合逻辑的。然而，本研究表明，轻度 irAEs 与患者 PFS、OS 的改善相关，而重度 irAEs 则无此相关性，这可能是由于重度 irAEs 的病情较严重，死亡风险的增加可能会抵消免疫效果。因此，需要进一步研究来阐明 irAEs 的发生机制 [35]。对不同类型 irAEs 的分析结果表明，器官特异性 irAEs 的发生与 PFS 和 OS 的改善均无统计学相关性，所得结论与文献分析不一致 [11-12]，原因可能是由于可以纳入的分析肾细胞癌患者器官特异性 irAEs 与生存结局之间关联的文献数量太少；样本量较小，可能导致较大的置信区间并影响结果的精确性。因此，应谨慎解释结果。较大的样本量对于分层分析很有价值，以确定肾细胞癌患者不同类型的 irAEs 与 ICIs 治疗预后的相关性 [36]。

3.3 基于 ICI 类型、地理区域的亚组分析

地理区域亚组分析结果显示，美国和意大利地区的肾细胞癌患者发生 irAEs 与 PFS 和 OS 的改善显著相关；而在日本地区的患者却无此相关性。造成这种差异的潜在生物学机制尚不清楚，但可能与肾细胞癌亚型、遗传易感性和环境因素有关 [37-38]。基于 ICIs 类型的亚组分析结果显示，在仅接受抗 PD-1/PD-L1 治疗的肾细胞癌患者中，irAEs 的发生与更好的 PFS 和 OS 显著相关。这与 Zhang 等 [11] 研究非小细胞肺癌（NSCLC）的结论一致。然而，在接受抗 PD-1 联合 CTLA-4 治疗的肾细胞癌患者中，irAEs 的发生与 OS 的改善显著相关，而与 PFS 的改善无关。造成这种差异的原因可能受到 ICIs 作用机制的影响。CTLA-4 抑制剂在 T 细胞发育的早期阶段激活 T 细胞，因此可

能直接破坏中枢耐受而不影响肿瘤免疫反应，而 PD-1/PD-L1 抑制剂在效应阶段激活 T 细胞 [39-40]。因此，接受 CTLA-4 抑制剂治疗的患者会出现更严重的 irAEs。对这一现象可能的解释是与 PD-1/PD-L1 抑制剂相比，抗 CTLA-4 治疗介导的 irAEs 的严重程度和死亡率更高，这在一定程度上削弱了疗效 [41-42]。

3.4 小结

综上所述，ICIs 治疗肾细胞癌致 irAEs 发生与更好的肿瘤预后相关，irAEs 可能是肾细胞癌 ICIs 疗效的预测因子。需要大样本量的前瞻性研究进一步分析器官特异性 irAEs 的发生与肾细胞癌 ICIs 治疗预后的相关性，并验证 irAEs 的预测价值，从而促进 ICIs 在肾细胞癌患者中的临床应用以及 irAEs 的临床管理。虽然纳入研究的质量可靠，但该荟萃分析仍存在如下局限性：① 纳入 Meta 分析的 15 项研究均为回顾性队列研究，患者基线信息的判定方法等均存在差异，可能会影响 Meta 分析的结果。因此，需大规模、高质量的前瞻性研究对此结论进一步验证；② 在对器官特异性 irAEs 的分析和亚组分析中，各组的样本量相对较小，可能会使得相关分析结果存在一定偏倚；③ 一些 HR 没有针对多变量因素进行调整，也没有直接从研究的生存曲线计算，因此不确定观察到的结果是否仅对目标危险因素的反应，而不是对其他混杂因素的反应。

参考文献

[1] Motzer RJ，Jonasch E，Agarwal N，et al. Kidney Cancer，Version 3.2022，NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw，2022，20（1）：71-90.

[2] 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.

[3] Bukowski RM. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma：the role of interleukin-2 [J]. Cancer，1997，80（7）：1198-1220.

[4] Lai YC，Tang F，Huang Y，et al. The tumour microenvironment and metabolism in renal cell carcinoma targeted or immune therapy [J]. J Cell Physiol，2021，236（3）：1616-1627.

[5] Parikh M，Bajwa P. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma [J]. Semin Nephrol，2020，40（1）：76-85.

[6] Shiravand Y，Khodadadi F，Kashani S，et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy [J]. Curr Oncol，2022，29（5）：3044-3060.

[7] Olsen TA，Zhuang TZ，Caulfield S，et al. Advances in knowledge and management of immune-related adverse events in cancer immunotherapy [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2022，13（22）：779915.

[8] Ramos-Casals M，Brahmer JR，Callahan MK，et al. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors [J]. Nat Rev Dis Primers，2020，6（1）：38.

[9] Smithy JW，Faleck DM，Postow MA. Facts and hopes in prediction，diagnosis，and treatment of immune-related adverse events [J]. Clin Cancer Res，2022，28（7）：1250-1257.

[10] Sun Q，Sun HY，Wu N，et al. Patients with melanoma treated with immune checkpoint inhibitors who had non-thyroid endocrine and skin immune-related adverse events have better prognosis：a systematic review and meta-analysis [J]. Front Oncol，2022，12（14）：976224.

[11] Zhang Q，Wang W，Yuan Q，et al. Correlation between immune-related adverse events and the efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer：systematic review and meta-analysis [J]. Cancer Chemother Pharmacol，2022，89（1）：1-9.

[12] Fan Y，Xie WH，Huang H，et al. Association of immune related adverse events with efficacy of immune checkpoint inhibitors and overall survival in cancers：a systemic review and meta-analysis [J]. Front Oncol，2021，11（12）：633032.

[13] Hussaini S，Chehade R，Boldt RG，et al. Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors-A systematic review and meta-analysis [J]. Cancer Treat Rev，2021，92（2021）：102134.

[14] Park R，Lopes L，Saeed A. Anti-PD-1/L1-associated immune-related adverse events as harbinger of favorable clinical outcome：systematic review and meta-analysis [J]. Clin Transl Oncol，2021，23（1）：100-109.

[15] Haddad TC，Zhao S，Li M，et al. Immune checkpoint inhibitor-related thrombocytopenia：incidence，risk factors and effect on survival [J]. Cancer Immunol Immunother，2022，71（5）：1157-1165.

[16] Desai K，Rybicki LA，Nizam A，et al. Retrospective analysis of immune-related adverse events（irAE）in metastatic renal cell carcinoma（mRCC）patients treated with first-line ipilimumab and nivolumab（I ＋ N）[J]. J Clin Oncol，2020，38（15）：e17094-e17094.

[17] Ikeda T，Ishihara H，Nemoto Y，et al. Prognostic impact of immune-related adverse events in metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab [J]. Urol Oncol，2021，39（10）：735-739.

[18] Martini DJ，Goyal S，Liu Y，et al. Immune-related adverse events as clinical biomarkers in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with immune checkpoint inhibitors [J]. Oncologist，2021，26（10）：e1742-e1750.

[19] Vitale MG，Pipitone S，Venturelli M，et al. Correlation between immune-related adverse event（IRAE）occurrence and clinical outcome in patients with metastatic renal cell carcinoma（mRCC）treated with nivolumab：IRAENE trial，an Italian multi-institutional retrospective study [J]. Clin Geni-

tourin Cancer，2020，18（6）：477-488.
[20] Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses [J]. Eur J Epidemiol，2010，25（9）：603-605.
[21] Ueda K，Suekane S，Kurose H，et al. Immune-related adverse events are clinical biomarkers to predict favorable outcomes in advanced renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab [J]. Jpn J Clin Oncol，2022，52（5）：479-485.
[22] Numakura K，Hatakeyama S，Sekine Y，et al. Immune-related adverse events associated with better survival outcomes for metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab [J]. J Urology，2022，207（SUPPL 5）：e175.
[23] Kankkunen E，Penttilä P，Peltola K，et al. C-reactive protein and immune-related adverse events as prognostic biomarkers in immune checkpoint inhibitor treated metastatic renal cell carcinoma patients [J]. Acta Oncol，2022，61（10）：1240-1247.
[24] Paderi A，Giorgione R，Giommoni E，et al. Article association between immune related adverse events and outcome in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with immune checkpoint inhibitors [J]. Cancers，2021，13（4）：1-11.
[25] Kato T，Nagahara A，Kawamura N，et al. The prognostic impact of immune-related adverse events in metastatic renal cell carcinoma patients treated with nivolumab：a real-world multi-institutional retrospective study [J]. Int J Clin Oncol，2021，26（5）：954-961.
[26] Verzoni E，Cartenì G，Cortesi E，et al. Real-world efficacy and safety of nivolumab in previously-treated metastatic renal cell carcinoma，and association between immune-related adverse events and survival：the Italian expanded access program [J]. J Immunother Cancer，2019，7（1）：99.
[27] Labadie B，Liu P，Bao R，et al. BMI，irAE and gene expression signatures predict resistance and survival to immune-checkpoint inhibition in renal cell carcinoma [J]. J Immuno Ther Cancer，2019，17（1）：386.
[28] Ishihara H，Takagi T，Kondo T，et al. Association between immune-related adverse events and prognosis in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab [J]. Urol Oncol，2019，37（6）：321-355.
[29] Elias R，Yan F，Singla N，et al. Immune-related adverse events are associated with improved outcomes in ICI-treated renal cell carcinoma patients [J]. J Clin Oncol，2019，37（7 suppl）：645-645.
[30] Sagie S，Gadot M，Levartovsky M，et al. Immune-related thyroiditis as a predictor for survival in metastatic renal cell carcinoma [J]. Cancers，2022，14（4）：875.
[31] Nukaya T，Takahara K，Yoshizawa A，et al. Prognostic impact of immune-related adverse events as first-line therapy for metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab：a multicenter retrospective study [J]. Clin Genitourin Cancer，2023，1：S1558-7673（23）00219-7.
[32] Washino S，Shirotake S，Takeshita H，et al. Association between immune-related adverse events and survival in patients with renal cell carcinoma treated with nivolumab plus ipilimumab：immortal time bias-corrected analysis [J]. Int J Clin Oncol，2023，28（12）：1651-1658.
[33] 赵倩，陈瑞祥，温瑾，等 . ICIs 治疗 NSCLC 致免疫相关不良反应与疗效相关性的 Meta 分析 [J]. 中国药房，2022，33（6）：745-752，768.
[34] Postow MA，Sidlow R，Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：158-168.
[35] Wang WX，Gu XD，Wang LP，et al. The prognostic impact of mild and severe immune-related adverse events in non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors：a multicenter retrospective study [J]. Cancer Immunol Immunother，2022，71（7）：1693-1703.
[36] Xu S，Lai RX，Zhao Q，et al. Correlation between immune-related adverse events and prognosis in hepatocellular carcinoma patients treated with immune checkpoint inhibitors [J]. Front Immunol，2021，12：794099.
[37] Junker K，Hallscheidt P，Wunderlich H，et al. Diagnostics and prognostic evaluation in renal cell tumors：the German S3 guidelines recommendations [J]. World J Urol，2022，40（10）：2373-2379.
[38] Odubanjo MO，Oluwasola AO，Ikuerowo SO，et al. Histopathological pattern of renal cell carcinoma in Ibadan [J]. Afr J Med Med Sci，2010，39（4）：317-321.
[39] Boutros C，Tarhini A，Routier E，et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination [J]. Nat Rev Clin Oncol，2016，13（8）：473-486.
[40] Buchbinder EI，Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways：similarities，differences，and implications of their inhibition [J]. Am J Clin Oncol，2016，39（1）：98-106.
[41] El OB，Hu F，Sadek R，et al. Not all immune-checkpoint inhibitors are created equal：meta-analysis and systematic review of immune-related adverse events in cancer trials [J]. Crit Rev Oncol Hematol，2017，119：1-12.
[42] Wang DY，Salem JE，Cohen JV，et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors：a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol，2018，4（12）：1721-1728.

（收稿日期：2023-11-12；修回日期：2023-12-12）

带量采购政策对我院核苷类抗乙型肝炎病毒药物使用情况的影响

陈刚，袁玉丽（武汉科技大学附属孝感医院 孝感市中心医院药学部，湖北　孝感　432000）

摘要：目的　分析孝感市中心医院执行带量采购政策对核苷类抗乙型肝炎病毒药物使用情况的影响，为医院药事管理和药物政策制定提供参考。**方法**　提取医院执行带量采购政策前后 4 种核苷类抗乙型肝炎病毒药物的使用数据，采用药物经济学方法对药品供应目录、药品价格、销售数量、销售金额、用药频度（DDDs）、限定日费用（DDC）和排序比（B/A）等进行回顾性分析。**结果**　执行带量采购政策后，4 种核苷类抗乙型肝炎病毒药物的总消耗量增加了 73.34%，销售总金额下降了 96.49%，总 DDDs 增加了 46.15%，未中选的阿德福韦酯、恩替卡韦和替诺福韦 DDC 下降比例达 10.45% ～ 42.12%。**结论**　执行带量采购政策可以有效减少医疗机构药品费用支出，提高医保基金使用效率，显著减轻患者的用药负担，进一步促进临床合理用药。

关键词：带量采购；核苷类抗乙型肝炎病毒药物；用药频度；限定日费用
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0799-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.037

Effect of purchasing policy with quantity on the use of nucleoside anti-hepatitis B drugs in our hospital

CHEN Gang, YUAN Yu-li (*Department of Pharmacy*, *Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology*, *Xiaogan Center Hospital*, *Xiaogan Hubei* 432000)

Abstract: Objective To analyze the influence of purchasing policy with quantity on the use of nucleoside anti-hepatitis B drugs in Xiaogan Center Hospital, and provide reference for hospital pharmaceutical management and drug policy. **Methods** The medication data of 4 nucleoside anti-hepatitis B drugs in our hospital before and after the implementation of purchasing policy with quantity were collected. The changes in drug supply catalog, price, sales quantity, sum, defined daily doses (DDDs), defined daily cost (DDC), and sequence ratio (B/A) were analyzed retrospectively by pharmacoeconomic method. **Results** After the implementation of purchasing policy with quantity, the total consumption of 4 nucleoside anti-hepatitis B drugs increased by 73.34%, and the total consumption sum decreased by 96.49%. The total DDDs increased by 46.15%, and the DDC of excluded adefovir dipivoxil, entecavir and tenofovir decreased by 10.45% ～ 42.12%. **Conclusion** Purchasing policy with quantity can effectively reduce the drug cost in medical institutions and improve the efficiency of medical insurance fund, greatly reduce the medical burden of patients, and promote rational drug use.

Key words: purchase with quantity; nucleoside anti-hepatitis B drug; defined daily dose; defined daily cost

慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B，CHB）是由乙型肝炎病毒（HBV）感染导致的一种疾病，据统计，目前我国约有 CHB 患者 2000 万，其中有 8% ～ 20% 发展为肝硬化，严重威胁着患者的生命安全[1-2]。临床对 CHB 的治疗主要通过抗病毒治疗来抑制病毒复制，减轻肝细胞炎性坏死及纤维化、延缓肝功能衰竭、肝硬化失代偿和肝癌等不良结局的发生，提高患者的生活质量[3-5]。目前常用药物

基金项目：孝感市自然科学计划项目（No. XGKJ2020010021）。
作者简介：陈刚，男，硕士，主管药师，主要从事医院药学和药物经济学研究，email：770981534@qq.com

主要是核苷类抗病毒药物，其作用机制为通过抑制HBV-DNA逆转录酶活性，抑制逆转录过程，在体内磷酸化后可竞争性结合DNA链3-OH基团产生无复制功能的模板，阻止HBV-DNA链的复制。由于CHB治疗存在耐药毒株变异、抗病毒药物价格昂贵、治疗疗程长且难以根治的问题，长期服药给患者造成严重经济负担[6-8]。

为减轻患者用药负担，节省医保资金，使药品价格回归合理水平，2019年1月，国务院办公厅关于印发《国家组织药品集中采购和试点方案》的通知中提出要开展国家组织药品集中采购和使用试点[9]，同年9月，国家医保局等9个部门制定的《国家组织药品集中采购和使用试点扩大区域范围的实施意见》中明确了在全国范围内扩大国家组织药品集中采购和使用试点区域范围[10]。湖北省为保证国家带量采购政策落地相继出台了《全面落实国家组织药品集中带量采购和使用试点扩围工作实施方案》和《国家组织药品集中采购和使用试点扩围医保配套措施的实施意见》等文件[11-12]。自2019年12月开始，孝感市中心医院共有3种核苷类抗HBV药物执行带量采购，分别为阿德福韦酯、恩替卡韦和替诺福韦。本研究通过对孝感市中心医院在执行带量采购前后核苷类抗乙型肝炎病毒药物的使用情况进行分析，探讨带量采购对相关药物使用以及医院药事管理的影响，以期为医疗机构进一步加强药事管理和执行药物政策提供依据。

1 资料与方法

1.1 资料

本研究中所有数据均来源于医院信息系统（HIS），数据采集时段以带量采购执行时间为分界点，提取带量采购前1年（2018年12月15日—2019年12月14日）、带量采购后第1年（2019年12月15日—2020年12月14日）、带量采购后第2年（2020年12月15日—2021年12月14日）和带量采购后第3年（2021年12月15日—2022年12月14日）核苷类抗HBV药物使用情况，包括药品目录、药品价格、销售数量、销售金额等数据。

1.2 评价指标

1.2.1 限定日剂量（DDD） 依据世界卫生组织（WHO）官方网站提供的数据，并参考《新编药物学》（第18版）及药品说明书确定[13-14]。

1.2.2 用药频度（DDDs） DDDs＝某药的销售总剂量/该药的DDD值。DDDs越大，说明该药的使用频率越高，临床对该药的使用倾向越大，反之亦然[15]。

1.2.3 限定日费用（DDC） DDC＝某药的销售总金额/该药的DDDs值。DDC越大，说明使用该药的日均费用越高，患者经济负担越重，反之亦然[15]。

1.2.4 排序比（B/A） B/A＝某药的销售金额排序/该药的DDDs值排序。B/A值越接近1，说明该药的市场份额和用药选择一致性越好，有较好的社会效益和经济效益；B/A＞1，表示社会效益大于经济效益；B/A＜1，则相反[15]。

1.3 方法

运用Excel软件对采集的数据进行统计，对比分析带量采购前后药品供应目录、药品价格、销售数量、销售金额、DDDs、DDC和B/A等评价指标。

2 结果

2.1 核苷类抗乙型肝炎病毒药物供应目录及价格变化

带量采购前后医院HIS系统共涉及核苷类抗HBV药物4个品种（阿德福韦酯、恩替卡韦、替诺福韦和拉米夫定），10个品规。执行带量采购政策后，共有3个品规通过医院药事会进入医院药品采购目录。阿德福韦酯（正大天晴）由3.99元/粒降为3.58元/粒，降幅10.26%；集采中选阿德福韦酯（齐鲁制药）仅为0.90元/片。恩替卡韦（正大天晴）由11.10元/片降为7.74元/片，降幅30.28%；恩替卡韦（福建广生堂）由7.86元/粒降为4.57元/粒，降幅达41.89%；集采中选恩替卡韦（苏州东瑞）仅为0.18元/片。替诺福韦（福建广生堂）由15.29元/粒降为9.97元/粒，降幅达34.77%；替诺福韦（葛兰素史克）由16.33元/片降为10.98元/片，降幅达32.77%；集采中选替诺福韦（杭州苏泊尔）仅为0.38元/片。由于拉米夫定未进入集采，所以暂未降价。具体见表1。

2.2 带量采购对核苷类抗HBV药物消耗量的影响

执行带量采购政策后，4种核苷类抗HBV药物总消耗量从27 707.62 g提高至48 029.13 g。从使用品种的消耗量来看，替诺福韦总消耗量仍占据主导地位，占比从91.21%提高至99.61%，其中集采中选富马酸替诺福韦二吡呋酯（杭州苏泊尔）消耗量占比达99.05%，非集采富马酸替诺福韦二吡呋酯（福建广生堂和葛兰素史克）消耗量占比分别从48.04%和43.17%降至0和0.56%，带量采购对非集采品种富马酸替诺福韦二吡呋酯消耗量产生了巨大影响，且对国产非集采品种影响尤为突出。阿德福韦酯总消耗量由299.88 g降至2.70 g，占比减少了1.07%，非集采阿德福韦酯胶囊（正大天晴）消耗量降幅为100%。恩替卡

表 1　核苷类抗乙型肝炎病毒药物供应目录及价格变化

Tab 1　Supply catalog and price change of nucleoside anti-hepatitis B drugs

编号	药物名称	规格	生产厂家	价格 /[元 / 片（粒）]		降幅 /%
				带量采购前	带量采购后	
1	阿德福韦酯胶囊	10 mg×14 粒	正大天晴药业集团股份有限公司	3.99	3.58	10.26
2	阿德福韦酯片 *	10 mg×30 片	齐鲁制药有限公司	—	0.90	—
3	恩替卡韦分散片	0.5 mg×7 片	正大天晴药业集团股份有限公司	11.10	7.74	30.28
4	恩替卡韦胶囊	0.5 mg×7 粒	福建广生堂药业有限公司	7.86	4.57	41.89
5	恩替卡韦分散片 *	0.5 mg×21 片	苏州东瑞制药有限公司	—	0.18	—
6	富马酸替诺福韦二吡呋酯胶囊	0.3 g×7 粒	福建广生堂药业有限公司	15.29	9.97	34.77
7	富马酸替诺福韦二吡呋酯片	0.3 g×30 片	葛兰素史克（天津）有限公司	16.33	10.98	32.77
8	富马酸替诺福韦二吡呋酯片 *	0.3 g×30 片	杭州苏泊尔南洋药业有限公司	—	0.38	—
9	拉米夫定胶囊	0.1 g×14 粒	北京万生药业有限责任公司	7.63	7.63	0.00
10	拉米夫定片	0.1 g×14 片	中孚药业股份有限公司	5.16	5.16	0.00

注：* 为带量采购中选品种，“—” 代表该药物集采前未进入我院药品目录，且该药物集采前销售价格无法查询。

Note：* Is the selected varieties for purchasing with quantity，“ —” means that the price cannot be queried if the drug is not included in the catalog before selection.

韦总消耗量增加了 62.54%，且仍以集采恩替卡韦分散片（苏州东瑞）消耗为主，占比达 100%，非集采恩替卡韦分散片（正大天晴）和恩替卡韦胶囊（福建广生堂）消耗量均降低至 0。拉米夫定虽未纳入集采，因带量采购政策影响，消耗量仍降低至 0。4 种核苷类抗乙型肝炎病毒药物的总消耗量增加了 73.34%，具体见表 2。

表 2　核苷类抗乙型肝炎病毒药物的消耗量

Tab 2　Consumption of nucleoside anti-hepatitis B drugs

编号	药物名称	带量采购前 1 年		带量采购后第 1 年		带量采购后第 2 年		带量采购后第 3 年	
		消耗量 /g	占比 /%	消耗量 /g	占比 /%	消耗量 /g	占比 /%	消耗量 /g	占比 /%
1	阿德福韦酯胶囊	299.88	1.08	93.24	0.30	—	—	—	—
2	阿德福韦酯片 *	—	—	141.30	0.45	194.10	0.49	2.70	0.01
3	恩替卡韦分散片	70.06	0.25	18.83	0.06	5.18	0.01	—	—
4	恩替卡韦胶囊	42.18	0.15	0.78	0.00	—	—	—	—
5	恩替卡韦分散片 *	—	—	101.83	0.33	184.69	0.46	182.43	0.38
6	富马酸替诺福韦二吡呋酯胶囊	13 310.10	48.04	875.70	2.81	—	—	—	—
7	富马酸替诺福韦二吡呋酯片	11 961.00	43.17	8 955.00	28.75	2 871.00	7.19	270.00	0.56
8	富马酸替诺福韦二吡呋酯片 *	—	—	19 422.00	62.35	36 333.90	91.02	47 574.00	99.05
9	拉米夫定胶囊	1 520.40	5.49	1 327.20	4.26	330.40	0.83	—	—
10	拉米夫定片	504.00	1.82	215.60	0.69	—	—	—	—
	合计	27 707.62		31 151.48		39 919.27		48 029.13	

注：* 为带量采购中选品种，“—” 代表该药物无相关使用数据。

Note：* Is the selected varieties for purchasing with quantity，“—” means that there is no relevant use data of the drug.

2.3　带量采购对核苷类抗 HBV 药物销售金额的影响

执行带量采购政策后，4 种核苷类抗 HBV 药物的总销售金额从 380.92 万元下降至 13.37 万元，降幅达 96.49%。从使用品种的总销售金额来看，恩替卡韦和替诺福韦占据主导地位，占比从 93.13% 提高至 99.84%。可以看出，因带量采购政策影响，进口非集采富马酸替诺福韦二吡呋酯（葛兰素史克）销售金额从 65.12 万元降至 0.99 万元，但其他国产非集采品种销售金额均降低至 0。具体见表 3。

2.4　带量采购对核苷类抗乙型肝炎病毒药物 DDDs 的影响

执行带量采购政策后，4 种核苷类抗乙型肝炎病毒药物总 DDDs 增幅为 46.15%，表现为恩替卡韦和替诺福韦总 DDDs 分别升高 62.54% 和 89.32%，阿德福韦酯和拉米夫定总 DDDs 分别下降 99.10% 和 100%。进口非集采富马酸替诺福韦二吡呋酯（葛兰素史克）仍有少量使用，其他国产非集采品种均退出临床使用。从使用品种的 DDDs 来看，集采前恩替卡韦分散片（正大天晴）和恩替卡韦胶囊（福建广生堂）的 DDDs 位居第 1，集采后中选恩替卡韦分散片（苏州东瑞）的 DDDs 一直排名第 1，说明恩替卡韦始终是 4 种核苷类抗乙型肝炎病毒药物中使用频率最高的。具体见表 4。

表 3 核苷类抗乙型肝炎病毒药物的销售金额

Tab 3 Consumption sum of nucleoside anti-hepatitis B drugs

药物名称	带量采购前 1 年		带量采购后第 1 年		带量采购后第 2 年		带量采购后第 3 年	
	销售金额 / 万元	占比 /%	销售金 / 万元	占比 /%	销售金额 / 万元	占比 /%	销售金额 / 万元	占比 /%
阿德福韦酯胶囊	11.96	3.14	3.33	3.80	—	—	—	—
阿德福韦酯片 *	—	—	1.27	1.45	1.75	5.19	0.02	0.15
恩替卡韦分散片	155.53	40.83	29.14	33.29	7.62	22.59	—	—
恩替卡韦胶囊	66.29	17.40	0.71	0.81	—	—	—	—
恩替卡韦分散片 *	—	—	3.71	4.24	6.74	19.98	6.35	47.49
富马酸替诺福韦二吡呋酯胶囊	67.82	17.80	2.91	3.32	—	—	—	—
富马酸替诺福韦二吡呋酯片	65.12	17.10	32.78	37.45	10.51	31.16	0.99	7.40
富马酸替诺福韦二吡呋酯片 *	—	—	2.45	2.80	4.59	13.61	6.01	44.95
拉米夫定胶囊	11.60	3.05	10.13	11.57	2.52	7.47	—	—
拉米夫定片	2.60	0.68	1.11	1.27	—	—	—	—
合计	380.92		87.54		33.73		13.37	

注：* 为带量采购中选品种，“—” 代表该药物无相关使用数据。

Note：* Is the selected varieties for purchasing with quantity，“—” means that there is no relevant use data of the drug.

表 4 核苷类抗乙型肝炎病毒药物的 DDDs

Tab 4 DDDs of nucleoside anti-hepatitis B drugs

药物名称	带量采购前 1 年		带量采购后第 1 年		带量采购后第 2 年		带量采购后第 3 年	
	DDDs	占比 /%	DDDs	占比 /%	DDDs	占比 /%	DDDs	占比 /%
阿德福韦酯胶囊	29 988.00	8.35	9324.00	2.46	—	—	—	—
阿德福韦酯片 *	—	—	14 130.00	3.73	19 410.00	3.64	270.00	0.05
恩替卡韦分散片	140 114.00	39.03	37 662.00	9.93	10 360.00	1.94	—	—
恩替卡韦胶囊	84 364.00	23.50	1561.00	0.41	—	—	—	—
恩替卡韦分散片 *	—	—	203 652.98	53.70	369 391.00	69.28	364 867.99	69.55
富马酸替诺福韦二吡呋酯胶囊	44 367.00	12.36	2919.00	0.77	—	—	—	—
富马酸替诺福韦二吡呋酯片	39 870.00	11.11	29 850.00	7.87	9570.00	1.79	900.00	0.17
富马酸替诺福韦二吡呋酯片 *	—	—	64 740.00	17.07	121 113.00	22.72	158 580.00	30.23
拉米夫定胶囊	15 204.00	4.24	13 272.00	3.50	3304.00	0.62	—	—
拉米夫定片	5040.00	1.40	2156.00	0.57	—	—	—	—
合计	358 947.00		379 266.98		533 148.00		524 617.99	

注：* 为带量采购中选品种，“—” 代表该药物无相关使用数据。

Note：* Is the selected varieties for purchasing with quantity，“—” means that there is no relevant use data of the drug.

2.5 带量采购对核苷类抗乙型肝炎病毒药物 DDC 的影响

执行带量采购政策后，未中选品种阿德福韦酯胶囊（正大天晴）、恩替卡韦分散片（正大天晴）、恩替卡韦胶囊（福建广生堂）、富马酸替诺福韦二吡呋酯胶囊（福建广生堂）和富马酸替诺福韦二吡呋酯片（葛兰素史克）DDC 呈明显下降，降幅分别在 10.45% ～ 42.12%，且 DDC 排名后 3 位的均为集采中选品种阿德福韦酯片（齐鲁制药）、恩替卡韦分散片（苏州东瑞）和富马酸替诺福韦二吡呋酯片（杭州苏泊尔），体现了集采品种的药物经济性。集采前后，未中选富马酸替诺福韦二吡呋酯片（葛兰素史克）DDC 始终处于第 1 名，说明患者使用该药的日均费用明显偏高。拉米夫定未进入集采，所以其 DDC 未见明显变化，但逐渐退出临床使用。具体见表 5。

2.6 带量采购对核苷类抗乙型肝炎病毒药物 B/A 的影响

执行带量采购政策后，B/A 比值排名前 3 位的为集采中选品种恩替卡韦分散片（苏州东瑞）、富马酸替诺福韦二吡呋酯片（杭州苏泊尔）和阿德福韦酯片（齐鲁制药），分别为 4.00、3.50 和 1.60，说明集采中选品种的价格明显偏低，社会效益大于经济效益；集采前后，富马酸替诺福韦二吡呋酯片（葛兰素史克）的 B/A 比值从 1.00 降低至 0.25，说明其价格明显偏高，经济效益大于社会效益。具体见表 6。

3 讨论

3.1 带量采购对药物临床使用的影响

带量采购前后未中选核苷类抗乙型肝炎病毒药物降价幅度达 10.26% ～ 41.89%，虽然我院该类药物总消耗量增加了 73.34%，但是总销售金额却从 380.92 万元下降至 13.37 万元，降幅达 96.49%，说明患者确实通过带量采购享受到了药品价格优惠，减轻了药费负担，达到带量采购政策的预期效果。

表 5　核苷类抗乙型肝炎病毒药物的 DDC

Tab 5　DDC of nucleoside anti-hepatitis B drugs

药物名称	DDC/ 元			
	带量采购前 1 年	带量采购后第 1 年	带量采购后第 2 年	带量采购后第 3 年
阿德福韦酯胶囊	3.99	3.57	—	—
阿德福韦酯片 *	—	0.90	0.90	0.90
恩替卡韦分散片	11.10	7.74	7.36	—
恩替卡韦胶囊	7.86	4.55	—	—
恩替卡韦分散片 *	—	0.18	0.18	0.18
富马酸替诺福韦二吡呋酯胶囊	15.29	9.97	—	—
富马酸替诺福韦二吡呋酯片	16.33	10.98	10.98	10.98
富马酸替诺福韦二吡呋酯片 *	—	0.38	0.38	0.38
拉米夫定胶囊	7.63	7.63	7.63	—
拉米夫定片	5.16	5.16	—	—

注：* 为带量采购中选品种，“—” 代表该药物无相关使用数据。

Note：* Is the selected varieties for purchasing with quantity，“—” means that there is no relevant use data of the drug.

表 6　核苷类抗乙型肝炎病毒药物的 B/A

Tab 6　B/A of nucleoside anti-hepatitis B drugs

药物名称	B/A	
	带量采购前 1 年	带量采购后第 1 年
阿德福韦酯胶囊	1.00	0.71
阿德福韦酯片 *	—	1.60
恩替卡韦分散片	1.00	0.67
恩替卡韦胶囊	1.50	1.00
恩替卡韦分散片 *	—	4.00
富马酸替诺福韦二吡呋酯胶囊	0.67	0.75
富马酸替诺福韦二吡呋酯片	1.00	0.25
富马酸替诺福韦二吡呋酯片 *	—	3.50
拉米夫定胶囊	1.00	0.50
拉米夫定片	1.00	1.00

注：* 为带量采购中选品种，“—” 代表该药物无相关使用数据。

Note：* Is the selected varieties for purchasing with quantity，“—” means that there is no relevant use data of the drug.

带量采购后，恩替卡韦和替诺福韦的总 DDDs 呈大幅上升趋势，且始终处于前 2 位。根据最新指南推荐，恩替卡韦和替诺福韦为 CHB 初治患者的首选用药 [16]，说明我院药物使用情况与指南推荐相符合，也体现了带量采购政策与指南推荐的相符性。

拉米夫定是第一个被批准用于治疗 CHB 的口服抗病毒药物，但由于存在耐药和停药后反跳的缺点，临床使用受限。研究表明一旦其抗病毒耐药的 HBV 突变体被选择，即使停止治疗，也会持续停留在病毒群体中，并对下一个序贯单药治疗产生交叉耐药性 [17]。因此拉米夫定也逐渐退出临床使用。

阿德福韦酯抗病毒能力弱且起效慢，尽管其耐药发生率低，但持续治疗后会产生耐药突变，由于阿德福韦酯主要经肾脏排泄，长期服用存在明显肾毒性 [18]。这可能是使阿德福韦酯进入了集采，但消耗量和消耗金额仍下降了 99.10% 和 99.83% 的原因。

3.2　带量采购对医疗机构药事管理的影响

带量采购政策总体目标是实现药价明显降低，减轻患者药费负担；降低企业交易成本，净化流通环境，改善行业生态；引导医疗机构规范用药，支持公立医院改革；探索完善药品集中采购机制和以市场为主导的药品价格形成机制。伴随着政策的落实，也给医疗机构药事管理带来了一些挑战。

带量采购要求医疗机构依据上一年度使用情况预填报中选品种采购需求量，但是有些中选品种在执行周期中因临床治疗指南更新而导致临床需求不足，例如最新指南不建议阿德福韦酯用于 HBV 感染的治疗，因此我院中选品种阿德福韦酯未能如期完成约定任务。另外中选药品使用情况纳入了国家三级公立医院绩效考核，可能存在因集采任务约束导致临床治疗与指南推荐不相符的现象，反而影响患者治疗。

由于中选品种生产企业产能不足或者供应不及时，导致有些中选品种不能有效连续供应，甚至出现断供。恩替卡韦作为指南推荐的 CHB 初治患者的首选用药，且中选后价格便宜，临床需求量极大，曾多次出现断货现象，导致临床需要频繁更换治疗方案，严重影响患者治疗。

为保证按时完成约定任务，中选品种直接进医院药品供应目录采购使用。根据政策要求，对群众有合理用药需求的非中选品种，不能简单地“一刀切”停用，但中选品种入院后势必会打破医院原有的药品品规配置，并且有些药物本身同类品种较多，加上多品规的存在，造成医院药品管理难度和药师调剂差错率增加。

带量采购政策宣传力度不足，患者和医务人员对政策知晓度低，部分医务人员主观上不认可仿制药的疗效和安全性。因中选药品降价幅度太大，患者也对中选药品的质量和疗效存疑，尤其

是慢性病复诊患者对药品品牌要求高，不相信中选药品与原研药等效，主观认为药品质量无法保证，加上专业化的药师队伍建设尚未完成，使得中选药品很难在短期内被患者主动接受。

3.3 执行带量采购政策所采取的系列措施

医院高度重视，建立长效机制，制订了落实药品集中带量采购工作实施方案，成立了药品集中采购工作领导小组，负责药品集中带量采购政策的落实。多部门协同，加强运营管理，明确相关部门职责，将药品集中带量采购工作落实情况纳入日常监督和专项督查范围，同时将落实情况作为目标考核及年度考核的重要内容。

适时召开临床医师、医保管理人员和临床药师联席会议，合理填报预采购量。将约定采购量按月分解到临床科室 / 医师个人，借助信息系统探索集采药品完成情况的精细化管理，对中选品种在信息系统中统一标注，便于临床科室优先使用。集采任务完成情况实行月报制，对落实不力的科室及时下达整改通知单，并对科室负责人进行约谈。

完善中选药品监测及短缺预警机制，充分发挥临床药师专业优势，建立替代目录，并推送给临床医师。定期分析和反馈中选药品不良反应数据，收集中选药品在临床使用过程中出现的问题，并及时反馈至有关管理部门，便于相关政策的调整。

通过中层干部会、科主任例会、药事会和科室例会，加强带量采购政策的解读和宣传，使医务人员充分认识带量采购的工作意义。依托各种媒介、医院公众号、电子显示屏和宣传彩页，开展带量采购科普宣传，利于医师和药师对患者进行正面引导，提高患者对中选药品的接受度。

综上所述，尽管带量采购给医疗机构药事管理带来了一定的困扰，但通过采取系列措施可以得到有效解决。本研究通过对孝感市中心医院在执行带量采购政策前后 4 种核苷类抗 HBV 药物的使用情况进行分析，发现带量采购政策降低了药品价格，显著减轻了患者的药费负担，有效减少了医保基金支出，也取得了阶段性的成效。如若后期带量采购激励政策能进一步得到落实，对因规范使用中选药品减少医保基金支出形成结余的，可按照“两个允许”的要求，统筹用于医疗机构人员薪酬支出，必然会进一步提升医疗机构和医务人员的积极性，促进带量采购可持续发展。

参考文献

[1] 洪阳 . 不同核苷类抗病毒药物对乙型肝炎肝硬化的治疗效果评价 [J]. 中国现代药物应用，2020，14（18）：113-115.

[2] Xue M，Lin XN，Lin QX，et al. Association between hepatitis B and E virus infection and hepatocellular carcinoma risk [J]. Int J Cancer，2021，148（12）：2974-2981.

[3] Liu ZQ，Xu KL，Jiang YF，et al. Global trend of aetiology-based primary liver cancer incidence from 1990 to 2030：a modelling study [J]. Int J Epidemiol，2021，50（1）：128-142.

[4] 刘丽君，车连容，陈婉文，等 . 2019—2020 年核苷酸类似物在医院抗乙型肝炎病毒治疗中的应用分析 [J]. 临床合理用药杂志，2022，15（23）：145-148.

[5] WHO. Hepatitis B fact sheets [EB/OL] [2020-07-27]. https：//www. Who. int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b.

[6] 盛亮亮，李学海，胡晓玥 . 基于“4 ＋ 7”带量采购下核苷类抗乙型肝炎病毒药物的应用情况 [J]. 中国药物经济学，2019，14（7）：36-39.

[7] 皮军 . 核苷类药物在乙型肝炎后肝硬化治疗中的效果及对 Child-pugh 评分的影响 [J]. 中外医学研究，2021，19（8）：125-127.

[8] 陈宜宏，严志辉 . 富马酸替诺福韦二吡呋酯治疗慢性 HBV 感染者的临床效果分析 [J]. 海峡药学，2021，33（3）：180-182.

[9] 国务院办公厅 . 关于印发国家组织药品集中采购和试点方案的通知 [EB/OL] [2019-01-17]. http：//www. gov. cn/zhengce/content/2019-01/17/content_535860 4. htm.

[10] 国家医保局，工业和信息化部，财政部，等 . 关于国家组织药品集中采购和使用试点扩大区域范围的实施意见 [EB/OL] [2019-09-30]. http：//www. nhsa. gov. cn/art/2019/9/30/art_37_1817. html.

[11] 湖北省医疗保障局，湖北省经济和信息化厅，湖北省财政厅，等 . 关于印发全面落实国家组织药品集中带量采购和使用试点扩围工作实施方案的通知 [EB/OL] [2019-11-8]. http：//www. hbjgzc. com/new/show4574. html.

[12] 湖北省医疗保障局 . 关于国家组织药品集中采购和使用试点扩围医保配套措施的实施意见 [EB/OL] [2019-11-12]. http：//www. hbjgzc. com/new/show4575. html.

[13] 世界卫生组织 . 国际标准 DDD 检索指南 [EB/OL] [2023-01-23]. https：//www. whocc. no/atc_ddd_index/.

[14] 陈新谦，金有豫，汤光 . 新编药物学 [M]. 18 版 . 北京：人民卫生出版社，2018：139-161.

[15] 沈洁，束艳，童宁，等 .“4 ＋ 7”带量采购对南京中医药大学附属南京医院核苷类抗病毒性肝炎药物使用影响分析 [J]. 现代药物与临床，2022，37（2）：408-414.

[16] 中华医学会感染病学分会，中华医学会肝病学分会 . 慢性乙型肝炎防治指南（2019 年版）[J]. 中华肝脏病杂志，2019，27（12）：938-961.

[17] Lim YS. Management of antiviral resistance in chronic hepatitis B [J]. Gut Liver，2017，11（2）：189-195.

[18] 陆群 . 南通大学附属第三医院 2017—2019 年核苷（酸）类似物抗乙型肝炎病毒药物使用情况分析 [J]. 临床合理用药杂志，2020，13（33）：17-20，24.

（收稿日期：2023-08-23；修回日期：2023-12-21）

药物与临床

结核丸联合抗结核化疗药物治疗儿童肺结核的临床疗效

陈芳[1]，江杰[2]，危松青[2]，李嘉[2]，周海依[1*]（1. 南华大学衡阳医学院附属长沙中心医院学生儿童结核科，长沙 410004；2. 南华大学衡阳医学院附属长沙中心医院儿科，长沙　410004）

摘要：目的　分析结核丸联合标准化抗结核治疗方案治疗儿童初治病原学阳性肺结核患儿的临床疗效及安全性。**方法**　回顾性分析 2018 年 6 月至 2022 年 6 月就诊的儿童初治病原学阳性肺结核患儿，按是否使用过结核丸，分为结核丸组和对照组，结核丸组给予结核丸加标准化抗结核治疗方案 HRZ（E）治疗，对照组仅给予 HRZ（E）治疗，比较两组患儿的临床疗效及安全性。**结果**　结核丸组及对照组分别纳入 61 例和 101 例患儿，两组患儿治疗前基线资料差异无统计学意义。在临床疗效方面，治疗 2 个月后，结核丸组痰检阴转率明显高于对照组（$P < 0.05$）。结核丸组影像学病灶显著吸收率明显高于对照组（$P < 0.05$）。在实验室指标改善方面，治疗 2 个月后结核丸组的血红蛋白、血清前白蛋白较对照组改善更为明显，结核丸组血尿酸升高低于对照组（$P < 0.05$）。在安全性方面，结核丸组的总体药物不良反应发生率与对照组比较，差异无统计学意义，但结核丸组肝功能异常发生率明显低于对照组（$P < 0.05$）。**结论**　结核丸联合标准化抗结核治疗方案可提高儿童初治病原学阳性肺结核患儿的痰检阴转率，促进肺部病灶吸收，改善贫血及营养不良，减少抗结核药物性肝损伤的发生率。

关键词：结核丸；抗结核化疗药物；肺结核；儿童
中图分类号：R521　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0805-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.038

Clinical effect of tuberculosis pills combined with anti-tuberculosis chemotherapy drugs on children with pulmonary tuberculosis

CHEN Fang[1], JIANG Jie[2], WEI Song-qing[2], LI Jia[2], ZHOU Hai-yi[1*] (1. *Department of Student and Child Tuberculosis*, *Changsha Central Hospital Affliated to Hengyang Medical School*, *University of South China*, *Changsha* 410004; 2. *Department of Pediatrics*, *Changsha Central Hospital Affliated to Hengyang Medical School*, *University of South China*, *Changsha* 410004)

Abstract: Objective To determine the clinical efficacy and safety of tuberculosis pills combined with standard chemotherapy treatment in children with newly diagnosed pathogen positive pulmonary tuberculosis. **Methods** Children newly diagnosed pathogen positive pulmonary tuberculosis from June 2018 to June 2022 were retrospectively analyzed, and divided into a tuberculosis pill group and a control group based on whether they had used tuberculosis pills. The tuberculosis pill group was given tuberculosis pills plus standard chemotherapy treatment including HRZ (E), while the control group was only given HRZ (E). **Results** Totally 61 children were included in the tuberculosis pills group and 101 children in the control group. There was no significant difference in the baseline information between the two groups before the treatment. After two months of treatment, the sputum negative conversion rate, and focus absorption effective rate in the tuberculosis pill group were much higher than those in the control group ($P < 0.05$). The hemoglobin and serum pre-albumin in the tuberculosis pill group

基金项目：湖南省卫生健康委项目（No.D202306016238）。
作者简介：陈芳，女，硕士，主治医师，主要从事儿童结核病相关研究，email：465188146@qq.com　*通信作者：周海依，女，副主任医师，主要从事儿童结核病相关研究，email：2659369158@qq.com

improved more significantly than those in the control group, but the blood uric acid elevation in the tuberculosis pill group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). In terms of safety, the overall incidence of adverse drug reactions in the tuberculosis pills group showed no significant different in the two groups, but the incidence of liver dysfunction in the tuberculosis pill group was much lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Besides standard chemotherapy treatment, tuberculosis pills help increase the rate of negative conversion of sputum bacteria, promote lung lesion absorption, improve anemia and malnutrition, and reduce the incidence of anti-tuberculosis drug-induced liver injury in children with newly diagnosed pathogen positive pulmonary tuberculosis.

Key words: tuberculosis pill; anti-tuberculosis chemotherapy drug; pulmonary tuberculosis; child

肺结核（pulmonary tuberculosis，PTB）是由结核分枝杆菌感染引起的肺部传染性疾病，属中医的“肺痨”范畴[1]，以发热、咳嗽、咯血、消瘦等为主要临床表现，为单一传染病死亡的主要原因，严重威胁人类健康，已成为全球重点关注的公共卫生问题[2]。临床治疗主要以抗结核化疗为主，但药物的毒副作用，以及近年来耐药率的增高，影响了患者的依从性及疗效[3]。中医认为肺痨主要系正气虚弱，感染痨虫所致[1]。结核丸可滋阴润肺，扶正祛邪，有利于改善肺结核病情[4]，提高疗效，减少耐药发生。因此，近年来，有学者提出采用中西医联合治疗的方案治疗肺结核，并在成人肺结核的患者中取得了一定的效果[4-5]。故本研究探讨了结核丸联合标准化抗结核药物治疗儿童肺结核的临床疗效，旨在了解中西医结合治疗儿童初治病原学阳性肺结核的价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取在2018年6月至2022年6月于南华大学衡阳医学院附属长沙中心医院就诊的初治病原学阳性的肺结核患儿162例（伦理批件号：2023150）。将使用WHO推荐的标准化抗结核治疗方案异烟肼（H）、利福平（R）、吡嗪酰胺（Z）、乙胺丁醇（E）联合结核丸治疗的61例患儿归为结核丸组，仅使用HRZ（E）抗结核治疗的101例患儿归为对照组。回顾性收集患儿的人口学资料及临床数据，包括年龄、性别、身高、体重、病史、实验室检查结果、病原学和影像学等资料。

1.2 纳入和排除标准

1.2.1 纳入标准 初治肺结核诊断标准符合我国WS288—2017《肺结核诊断》的诊断标准[6]；病原学阳性（包括痰涂片抗酸杆菌染色、结核分枝杆菌核酸、结核分枝杆菌培养中任意一项阳性）；结核丸组：使用WHO推荐的标准化抗结核治疗方案联合结核丸治疗；对照组：仅使用标准化抗结核治疗方案；年龄6～18岁（考虑结核丸为药丸，不易溶于水，故6岁以下儿童未使用）。

1.2.2 排除标准 近3个月应用免疫调节剂者；合并精神疾病、意识障碍、自身免疫性疾病或内分泌代谢障碍者；治疗不足2个月者；合并肝肾功能损伤者；临床资料不全者。

1.3 治疗方案

对照组：给予标准化治疗方案2HR/4HRZ（E）治疗（H：异烟肼10～15 mg·kg^{-1}，R：利福平10～15 mg·kg^{-1}，Z：吡嗪酰胺30～40 mg·kg^{-1}，E：乙胺丁醇15～ 25 mg·kg^{-1}）。结核丸组：在标准化治疗方案的基础上联合结核丸治疗。结核丸（甘肃天水岐黄药业有限公司，每20丸重3.5 g）是由醋龟甲、蜜百部、醋鳖甲、煅紫石英、地黄、熟地黄、天冬、牡蛎、阿胶、北沙参、龙骨、麦冬、熟大黄、白及、川贝母、蜂蜡16味药组成的成方。抗结核化疗药物剂量根据患儿体重及血药浓度调整（异烟肼血药浓度维持在3～6 μg·mL^{-1}、利福平血药浓度维持在8～24 μg·mL^{-1}、吡嗪酰胺血药浓度维持在20～60 μg·mL^{-1}）。结核丸剂量根据儿童药物治疗原则，药物剂量计算从成人剂量折算，计算给药剂量[儿童剂量＝成人剂量×儿童体重（kg）/50]。

1.4 观察指标

每月复查一次血常规、尿常规、肝肾功能、红细胞沉降率、痰涂片抗酸杆菌染色、结核分枝杆菌培养、心电图，记录可能出现的抗结核药物不良反应，2个月强化期治疗后复查肺部CT。

1.5 临床疗效评估

1.5.1 痰检转阴情况 比较两组患儿治疗前、治疗1个月、治疗2个月痰涂片抗酸杆菌染色、结核分枝杆菌培养情况。治疗期间至少连续两次痰检为阴性，且间隔时间28 d以上，定义为痰检转阴。痰检转阴时间定义为患儿出现痰检阴性后，从基线到首次转阴的时间。

1.5.2 肺部病灶转归情况 参照《中华医学会临

床治疗指南（结核病分册）》的有关标准[7]：病灶吸收≥1/2 原病灶为显著吸收；病灶吸收＜1/2 原病灶为吸收；病灶无明显变化定义为不变；病灶扩大或播散为病情恶化。

1.6　用药安全性评估

比较两组患儿治疗前后血常规、尿常规、肝肾功能、心电图及药物相关的不良事件（adverse event，AE）。抗结核药物相关不良事件定义为患儿开始治疗后出现的且与治疗有因果关系的相关不良反应[8]。

1.7　统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行临床数据处理和统计分析，正态分布的计量资料以“$\bar{x}\pm s$”描述，非正态分布的计量资料以中位数（四分位数）“M（Q_1，Q_3）”描述。计数资料以“例（构成比/率，%）”描述。分类变量资料的比较采用卡方检验或 Fisherie’s 确切概率法检验，连续性变量资料的比较采用两独立样本 t 检验或 Mann-Whitney U 秩和检验，单向有序列联表资料比较采用 H 检验，P＜0.05 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　患儿基线资料

本研究共纳入 162 例患儿，其中结核丸组 61 例，对照组 101 例，两组患儿一般基线特征比较，差异无统计学意义（见表 1）。

表 1　两组患者基线资料比较

Tab 1　Baseline data between the two groups

组别	男性 [n（%）]	年龄 / 岁	体重 [M（Q_1，Q_3）]/kg	病程 [M（Q_1，Q_3）]/d
结核丸组（n＝61）	32（52.5）	13.38±3.14	47（33.5，52.0）	10（3.5，16）
对照组（n＝101）	48（47.5）	12.48±3.75	43（25.0，49.3）	15（7.0，23.0）
χ^2/t/Z	0.301	1.572	－1.859	－1.906
P	0.583	0.118	0.063	0.057

2.2　两组患儿痰检阴转率比较

两组患儿 2 个月强化期治疗后结核丸组痰检阴转率明显高于对照组（见表 2）。

表 2　两组患者痰检阴转情况 [n(%)]

Tab 2　Sputum culture conversion between the two groups [n(%)]

组别	1 个月末	2 个月末
结核丸组（n＝61）	51（83.6）	59（96.7）
对照组（n＝101）	81（80.2）	88（87.1）
χ^2	0.293	4.165
P	0.588	0.041

2.3　两组影像学病灶吸收情况比较

治疗 2 个月后，结核丸组病灶吸收率明显高于对照组（见表 3）。

表 3　两组患者影像学病灶吸收情况 [n(%)]

Tab 3　Imaging lesion absorption between the two groups [n(%)]

组别	病灶吸收情况			
	显著吸收	吸收	不变	恶化
结核丸组（n＝61）	41（67.2）	16（26.2）	2（3.3）	2（3.3）
对照组（n＝101）	50（49.5）	39（38.6）	8（7.9）	4（4.0）
H	6.316			
P	0.012			

2.4　两组实验室指标改善情况比较

治疗 2 个月后结核丸组的血红蛋白、血清前白蛋白较对照组改善更为明显，结核丸组血尿酸升高低于对照组（P＜0.05）（见表 4）。

2.5　两组用药安全性比较

治疗过程中，结核丸组 61 例患儿发生了 17 次 AE，其中 2 例患儿发生了 2 次 3 级及以上 AE（1 例肝功能异常，1 例周围神经炎），余 15 次为 1 级或 2 级 AE。对照组 101 例患儿发生了 40 次 AE，其中 3 例患儿发生了 3 次 3 级及以上 AE（1 例肝功能异常，1 例视力损害，1 例过敏反应），余 37 次为 1 级或 2 级 AE。结核丸组总药物不良反应发生率与对照组比较，差异无统计学意义，但肝功能异常发生率明显低于对照组（P＜0.05）（见表 5）。

3　讨论

据世界卫生组织 2023 年全球结核病报告，2022 年全球估算约有 1060 万人感染结核病，其中有 750 万人被诊断为肺结核患者，我国仍然是结核病高负担国家之一，且位居全球第三，儿童结核病患者也相对较高[2]。儿童结核病仍是严重危害我国儿童身心健康的慢性传染性疾病。目前最主要的治疗方法是抗结核化学治疗，疗程较长，且需多药联合，药物不良反应常常难以避免，有时导致患儿抵触治疗，甚至中断或放弃治疗[9]。在儿童抗结核治疗过程中，由于儿童处于生长发育的特殊阶段，其药物的吸收代谢、消除特点、药物疗效及其不良反应与成人不尽相同[10]。因此，儿科医师应努力寻求可接受的治疗效果与不良反应之间的平衡，探索更好的治疗儿童结核病的方案。

中医在结核病治疗方面积累了丰富的临床经

表 4 两组患者治疗 2 个月后实验室指标比较 [M (Q_1，Q_3)]

Tab 4 Laboratory indexes after 2 months of the treatment between the two groups [M (Q_1，Q_3)]

组别	白细胞 / （$\times 10^9 \cdot L^{-1}$）	血小板 / （$\times 10^9 \cdot L^{-1}$）	血红蛋白 / （$g \cdot L^{-1}$）	血沉 / （$mm \cdot h^{-1}$）	血清前白蛋白 / （$mg \cdot L^{-1}$）	白蛋白 / （$g \cdot L^{-1}$）
结核丸组	－1.80	－67.00	28.95	－14.00	30.00	2.00
（n = 61）	（－2.75，0.15）	（－132.50，－27.50）	（13.00，43.50）	（－31.00，－6.00）	（5.50，80.50）	（－1.50，6.50）
对照组	－1.90	－83.00	－3.03	－18.00	86.00	2.00
（n = 101）	（－2.90，－0.20）	（－150.50，－31.00）	（－2.00，18.50）	（－35.00，－5.50）	（33.00，120.50）	（－1.00，5.50）
Z	－0.415	－1.186	－6.558	－0.301	－3.816	－0.109
P	0.678	0.236	0.000	0.764	0.00	0.913

组别	谷丙转氨酶 / （$U \cdot L^{-1}$）	谷草转氨酶 / （$U \cdot L^{-1}$）	总胆红素 / （$\mu mol \cdot L^{-1}$）	间接胆红素 / （$\mu mol \cdot L^{-1}$）	血尿素氮 / （$mmol \cdot L^{-1}$）	血尿酸 / （$\mu mol \cdot L^{-1}$）
结核丸组	－0.75	0.75	1.60	0.00	0.12	131.00
（n = 61）	（－3.00，6.00）	（－3.50，7.00）	（－1.65，4.60）	（－2.25，2.55）	（－0.66，0.73）	（20.00，274.50）
对照组	－13.90	－3.60	1.30	－0.21	0.01	226.00
（n = 101）	（－6.50，4.50）	（－5.00，6.00）	（－2.14，4.38）	（－2.60，1.40）	（－0.54，0.72）	（92.00，340.50）
Z	－1.183	－1.372	－0.408	－0.472	－0.168	－2.140
P	0.237	0.170	0.683	0.637	0.867	0.032

表 5 两组患者治疗期间不良反应发生率比较 [n(%)]

Tab 5 Incidence of adverse reactions during the treatment between the two groups [n(%)]

组别	肝功能异常	胃肠道反应	过敏反应	骨髓抑制	周围神经炎	视力损害	总计
结核丸组（n = 61）	5（8.2）	6（9.8）	2（3.3）	3（4.9）	1（1.6）	0（0.0）	17（27.8）
对照组（n = 101）	22（21.7）	12（11.9）	2（2.0）	3（3.0）	0（0.0）	1（1.0）	40（39.6）
χ^2	5.054	0.161	0.266	0.405	0.065	0.608	2.297
P	0.025	0.688	0.606	0.525	0.798	0.436	0.130

验，认为治疗结核病职责在于杀虫和补虚[11-12]。文献报道，结核丸联合标准化抗结核治疗在成人肺结核治疗中取得了很好的效果[13-15]，但能否提高儿童抗结核疗效及其减轻化疗不良反应，目前尚无报道。结核丸是由 16 味药组成的成方，方以白及杀虫，阿胶、熟地黄等增强免疫力、补虚复元，以北沙参、地黄、麦冬、龙骨、白及、川贝母等滋阴润燥、清肺化痰，诸药合用，共奏补肺杀虫、滋阴养血之功效，可复气阴，润肺生津、痨虫皆灭，诸症可平[14]。现代药理研究表明，中药不仅具有增强西药对结核分枝杆菌的杀菌和抑菌作用，同时还可增强患者的免疫力，能够促进患者临床症状的缓解、促进病灶吸收、减轻化学治疗的不良反应等效果[13，16-18]。本研究采用结核丸联合标准化抗结核治疗儿童初治病原学阳性肺结核，并评价其强化期的治疗疗效及不良反应。

痰菌阳性患者是结核病传播的主要人群，早期痰菌转阴可大大降低结核病的传播风险，对结核防控具有重大意义[19-20]。本研究结果显示，结核丸组患儿在治疗 2 个月末的痰菌阴转率明显高于对照组，同时病灶显著吸收率明显高于对照组。提示结核丸不仅可促进肺部病灶的吸收与修复，提高患儿免疫力和抗病能力，同时，提高痰菌阴转率，可减少患儿结核传播，对结核病防控意义深远。血清前白蛋白与人体的病理生理状态关系密切，其含量明显降低可能提示患者营养不良、疾病预后不佳[21-22]。营养不良是结核病发生发展的重要原因之一[23]，此外，国内外多项研究表明，营养不良及贫血是抗结核药物性肝损伤的独立危险因素[24-25]。本研究结果显示，治疗 2 个月末与治疗前两组血清前白蛋白及血红蛋白改善值结核丸组明显高于对照组，这可能与结核丸具有滋阴补血、清热益肺之功效有关，结核丸可改善患儿全身营养状况，增强其对化学治疗药物的敏感性及减少药物不良反应。

儿童肝肾发育尚未完善，抗结核药物不良反应发生率亦相对较高，其中抗结核药物性肝损伤是抗结核治疗过程中最常见、危害性最大的不良反应，严重影响患儿治疗的依从性，增加疾病经济负担[26]。本研究结果显示：结核丸组的总体不良反应发生率与对照组比较并无明显差异，但结核丸组肝功能异常发生率明显低于对照组。提示结核丸不会增加患儿抗结核药物的总体不良反应，但可减少抗结核药物性肝损伤的发生率。分析这可能与结核丸方含阿胶、熟地黄等具有增强免疫力、补虚复元的作用有关，有利于提高患儿治疗

的依从性，减轻疾病负担，改善预后。另外，治疗 2 个月后结核丸组患儿血尿酸明显低于对照组。提示结核丸可能具有促进尿酸代谢的作用。由于儿童抗结核药物相关的血尿酸升高，并无相关关节肿痛症状，大部分患儿仅需多饮水，无需药物治疗，故本研究未将其列入不良反应进行比较。

本研究尚存在一定的不足，首先，本研究为单中心回顾性研究，样本量受限，加之研究对象为儿童，部分患儿无法准确描述疾病症状，部分病历对患儿的疾病症状记录不详，故并未评估两组患儿临床症状改善情况。其次，随访时间短，全疗程规律使用结核丸治疗患儿病例数不足，故暂无法评估两组患儿全疗程结束后的疗效、不良反应情况及两年内结核复发率情况。最后，入组病例偏少，研究结果有待进一步扩大样本量证实。

综上所述，结核丸联合标准化抗结核治疗可提高儿童初治病原学阳性肺结核患儿早期痰菌阴转率、促进肺部病灶吸收以及减轻抗结核药物性肝损伤的发生率，改善患儿血清前白蛋白和血红蛋白水平，值得临床推广应用。

参考文献

[1] 郑正伟，李权，刘忠达，等 . 基于数据挖掘探讨古代治疗肺痨骨蒸劳热证的用药规律 [J]. 浙江中医杂志，2022，57（3）：230-231.

[2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 [R]. Geneva：World Health Organization，2023.

[3] Dartois VA，Rubin EJ. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development：challenges and priorities [J]. Nat Rev Microbiol，2022，20（11）：685-701.

[4] 闫壁，松高原 . 常规抗结核化疗方案联合中成药结核丸治疗肺结核的 Meta 分析 [J]. 中国中医药科技，2017，24（4）：533-536.

[5] 施利，裴异 . 益肺养阴方治疗肺结核合并 2 型糖尿病患者的临床疗效分析 [J]. 中南药学杂志，2022，20（7）：1679-1683.

[6] 王黎霞，成诗明，周林，等 . 中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断：WS 288—2017 [J]. 中国感染控制杂志，2018，17（7）：642-652.

[7] 中华医学会 . 中华医学会临床诊疗指南：结核病分册 [M]. 北京：人民卫生出版社，2005：64-86.

[8] Imam F，Sharma M，Khayyam KU，et al. Adverse drug reaction prevalence and mechanisms of action of first-line anti-tubercular drugs [J]. Saudi Pharm J，2020，28（3）：316-324.

[9] Turkova A，Wills GH，Wobudeya E，et al. Shorter treatment for nonsevere tuberculosis in African and Indian children [J]. N Engl J Med，2022，386（10）：911-922.

[10] 刘洋，万朝敏 . 儿童抗结核药物不良反应及处理对策 [J]. 中华实用儿科临床杂志，2020，35（10）：770-774.

[11] 杨红梅，裴宁，钟秀君，等 . 初治肺结核患者中医证候与实验室指标相关性分析 [J]. 中国中西医结合杂志，2021，41（3）：324-329.

[12] 王小美，刘光陵，吴雪琼 . 中医药治疗小儿肺结核 [J]. 吉林中医药，2015，35（5）：470-472.

[13] 黄艳，张向荣，刘裔 . 结核丸联合肺结核标准化疗方案治疗肺结核的临床疗效及对 IgG、IgA、IgM 水平的影响研究 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（4）：255-258.

[14] 杨涛，王飞 . 结核丸联合四联抗结核化疗药物治疗病原学阳性肺结核的临床效果 [J]. 中国血液流变学杂志，2022，32（1）：83-85.

[15] 张斌 . 结核丸对初治涂阳肺结核患者痰菌阴转及 IFN-γ、IL-17 水平的影响 [J]. 新中医，2020，52（11）：60-63.

[16] 鹿振辉，张惠勇，张洪春，等 . 我国中医药防治结核病的现状与展望 [J]. 中国防痨杂志，2020，42（2）：88-90.

[17] 施利，裴异 . 中医药治疗初治肺结核临床用药规律研究 [J]. 湖南中医药大学学报，2020，40（8）：1018-1021.

[18] 温陈勇，裴晓娇，闫志伟，等 . 健脾润肺丸联合常规抗结核药物治疗小儿肺结核疗效及对肺功能的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2022，31（8）：1128-1131.

[19] Miyahara R，Piboonsiri P，Chiyasirinroje B，et al. Risk for prison-to-community tuberculosis transmission，thailand，2017—2020 [J]. Emerg Infect Dis，2023，29（3）：477-483.

[20] 李倩钰，徐鹏，陈玲 . 活动性结核病候选血清学诊断标志物的研究进展 [J]. 实用心脑肺血管病杂志，2021，29（6）：17-21.

[21] Ranasinghe RN，Biswas M，Vincent RP. Prealbumin：the clinical utility and analytical methodologies [J]. Ann Clin Biochem，2022，59（1）：7-14.

[22] Yu QS，Wang ZQ，Ding X. Serum prealbumin as a predictor of adverse outcomes in patients with heart failure：asystematic review and meta-analysis [J]. Biomark Med，2022，16（7）：569-575.

[23] VanValkenburg A，Kaipilyawar V，Sarkar S，et al. Malnutrition leads to increased inflammation and expression of tuberculosis risk signatures in recently exposed household contacts of pulmonary tuberculosis [J]. Front Immunol，2022，13：1664-3224.

[24] 李永红，李红恩，雷世鑫，等 . 抗结核药致中国人群药物性肝损伤危险因素的 Meta 分析 [J]. 中国抗生素杂志，2021，46（6）：628-632.

[25] Ali N，Gupta N，Saravu K. Malnutrition as an important risk factor for drug-induced liver injury in patients on anti-tubercular therapy：an experience from a tertiary care center in South India [J]. Drug Discov Ther，2020，14（3）：135-138.

[26] 中华医学会结核病学分会 . 抗结核药物性肝损伤诊治指南（2019 年版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2019，5（42）：343-355.

（收稿日期：2023-08-19；修回日期：2023-11-23）

基于条件价值评估法的肠道准备药物支付意愿调查

付兴维，徐怀伏*（中国药科大学国际医药商学院，南京 211198）

摘要：目的 了解患者对肠道准备药物的支付意愿水平并估算支付意愿（WTP）阈值，为促进合理用药提供参考。**方法** 以二分式条件价值评估法设计调查问卷；对数据进行描述性统计，计算累计频度中位值作为平均 WTP，并基于年龄段、就诊医疗机构级别等特征变量进行亚组分析。**结果** 患者平均 WTP 为 264.55 元 /1%。亚组中 30 ～ 40 岁、东北地区、就诊三级医疗机构，个人年收入＞ 35 万元和家庭年收入＞ 60 万元的患者所在组别的平均 WTP 较大。**结论** 本次调查估算的 WTP 值可为肠道准备药物的成本 - 效果分析提供阈值参考。二分式条件价值评估法能有效引导患者给出真实的支付意愿。一般而言，患者就诊医疗机构级别、收入水平越高，其 WTP 越高，实际应用时可结合人群特征适当调整该阈值。

关键词：肠道准备；支付意愿；条件价值评估法；问卷调查
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0810-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.039

Survey of willingness to pay for bowel preparation drugs based on the contingent evaluation method

FU Xing-wei, XU Huai-fu* (*School of International Pharmaceutical Business, China Pharmaceutical University, Nanjing* 211198)

Abstract: Objective To determine patients' willingness to pay (WTP) for bowel preparation medications and the WTP threshold, to promote rational medication use. **Methods** The WTP questionnaire was designed by dichotomous contingent evaluation method. The statistical data were described. The median cumulative frequency value was calculated as the mean WTP, and subgroup analysis was performed based on the characteristic variables of age groups and level of medical institutions. **Results** The mean WTP of the patients was 264.55 yuan/1%. The groups with the largest mean WTP in each subgroup were 30 ～ 40 year olds, from Northeast China, visiting a tertiary care institution, having an annual personal income of ＞ 350 000 yuan, and an annual household income of ＞ 600 000 yuan. **Conclusion** The WTP estimated in this survey may provide a threshold reference for the cost-effectiveness analysis of bowel preparation drugs. The dichotomous contingent evaluation method effectively guides patients to show their true willingness-to-pay. In general, the higher the level of the medical institutions the patients' visit and their income level, the higher their WTP. The threshold value can be adjusted with the characteristics of the population when using the threshold in practice.

Key words: bowel preparation; willingness to pay; contingent evaluation method; questionnaire

近年来，我国结直肠癌患者不断增加，结肠镜检查是结直肠癌筛查中普遍应用的金标准[1-2]。而肠道准备药物是一种用于清洁肠道，为结肠镜检查或肠道手术做准备的药物。充分的肠道准备是结肠镜检查中视野清晰的重要前提[3]，不充分的肠道准备会显著降低诊断或治疗的安全性和有效性[4]。

我国临床可使用的肠道准备药物选择较多，但价格高低不一，因而既要充分考虑患者的健康状况和偏好，还要结合药物的疗效、成本、安全

基金项目：江苏高校哲学社会科学研究基金项目（No.2019SJA0062）。
作者简介：付兴维，男，硕士研究生，主要从事公共卫生政策、药物经济学研究，email：fxw17351014631@163.com *通信作者：徐怀伏，男，副教授，主要从事管理学、公共卫生政策研究，email：xhfu66@163.com

性等进行经济价值的比较[3-4]。评估药物的经济价值可结合患者对该药物的支付意愿（willingness to pay，WTP）阈值进行判断[5]，WTP 即每多获得一个单位的临床疗效所愿意花费的成本。在患者对肠道准备药物的 WTP 值尚不明确的情况下，从临床角度出发，仅凭经验用药可能无法根据患者的实际需求和经济状况为其推荐最合适的药物，不利于医疗资源的合理利用；从患者角度出发，如未能选用经济性更高的药物，患者承受直接治疗成本外还需承担较高的间接成本[6]，并可能因此拒绝使用或不规范使用，导致健康受损。

目前国内外尚无关于肠道准备药物的 WTP 研究，而本领域研究又难以将质量调整生命年作为健康产出指标，常采用有效率或成功率等指标[4, 6]，且该阈值受人群的健康偏好、社会经济发展水平等的影响[7]，故不宜将 1 ～ 3 倍人均 GDP 作为阈值。鉴于此，本研究开展了患者对肠道准备药物的 WTP 阈值调查，并分析不同患者人群对一个单位疗效增量的平均 WTP，旨在为肠道准备药物的短期疗效评估提供可参考的增量成本 - 效果阈值，在一定程度上为临床决策提供更多的信息和依据。

1　方法

1.1　资料来源

2022 年 9 月 10 日至 10 月 17 日，调查员经统一培训后分派至江苏、浙江等 16 个省、自治区、直辖市，通过走访具备肠道准备操作能力的医疗机构，寻找相关科室的门诊患者作为调查对象。具体纳入标准：≥ 18 岁；被诊断为需行肠道准备；未患炎症性肠病、结直肠癌等严重肠道疾病，且无基础性疾病。排除标准：无法独立完成问卷；无法理解问卷内容。

1.2　问卷设计与内容

1.2.1　问卷指标设计　经系统性文献回顾分析可知，临床常以肠道准备成功率作为肠道准备药物的疗效指标[3-4, 8]，因此本研究在需行肠道准备的假设情景下，向受访者提供了基础药物 A、新型药物 B 两种假设的代表药物，避免其受到具体药物名称或品牌的影响。此外，结合临床文献与市场定价，本研究出于以下考虑设置了一组疗效与成本的对照，如表 1 所示。

① 为便于受访者理解，“成功 / 失败概率”实际为药物的疗效数据，来源于临床研究的最新荟萃分析结果[9]，两种药物的疗效为 90.60% *vs* 93.30%；② 以上数值呈现出真实的疗效增量，有助于引导患者报告 WTP；③ 一组对照的可操作性更强，设置多组对照将增加受访者的认知负担，影响测量效果；④ 基础药物 A 的药品费用是基于国内近 2 年的药品中标价格计算得到的销售额加权均价。

表 1　两种药物的肠道准备成功或失败概率及费用信息

Tab 1　Probability of success or failure of bowel preparation and cost information for the both drugs

药物	成功概率 /%	失败概率 /%	药品费用 / 元
基础药物 A	90.60	9.40	88.42
新型药物 B	93.30	6.70	—

注：“—”表示需由调研结果计算得到。

Note：“—” Needs to be calculated from the survey results.

此外，本次调查分析的 WTP 与用药方案并无明确的对应关系，仅针对此类药物的疗效增量进行估算。本研究中所使用的 WTP 阈值定义为“在需要接受肠道准备时，为多提高 1% 的肠道准备成功率，患者至多愿意多花费的药品费用”。

1.2.2　问卷结构与内容　问卷为患者设置了需行肠道准备的假设情景，具体采用条件价值评估法（contingent evaluation method，CVM）进行 WTP 的调查，并以该方法中的二分式选择法（dichotomous choice，DC）进行价值引导的设计[10]，其原理是通过加强模拟决策的过程，递进式地询问受访者是否接受某一边界值[11]，以获得受访者最终支付意愿区间。

正式调研前，先在南京市开展预调研，以获得正式问卷中不同疗效药品可接受的价格差起始值。预调研共获得样本数 20 人，计算均值以了解患者愿意多支付费用的起始值（100 元）。结合预调研结果整理形成正式问卷，内容分为三部分：第一部分包括姓名、年龄、性别、就诊医疗机构级别、就诊科室、地区来源等基本信息；第二部分包括个人年收入与家庭年收入水平；第三部分是在假设情景下，向受访者提供图 1 的肠道准备结局说明[2-4, 8]和表 1 中的信息，基于其中 2.70% 的疗效增量，以预调研结果的 100 元为价格差初始值，通过设置多轮上下浮动的边界值问题逐步缩小价格差区间，受访者根据最终价格差区间填写愿意支付的最高金额，即为该样本的支付意愿值（用“WTP_i”表示）。

1.3　数据分析方法

使用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS 19.0 软件进行数据整理与描述性统计分析。以累计频度中位值代表样本群体的平均 WTP 值，以减少极端

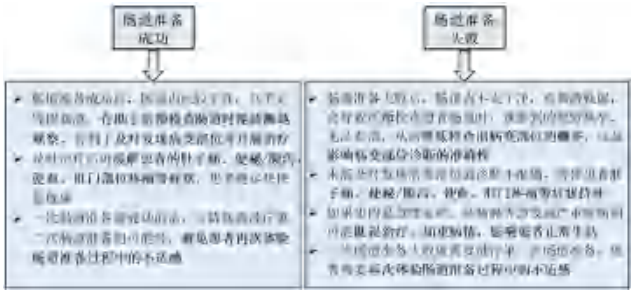


图 1 肠道准备成功 / 失败的结局说明

Fig 1 Notes for bowel preparation success/failure

值的影响，使用线性插值法 [12] 计算得出。

在不同亚组人群中计算累计频度中位值，亚组划分依据如下。根据国家统计局对我国经济发展水平的地区划分，将样本分为“东部地区”“中部地区”“西部地区”“东北地区”4 个亚组；根据就诊医疗机构级别分为“一级”“二级”“三级”3 个亚组；通过计算数据的四分位数，根据年龄（岁）分为“≤ 30”“＞ 30 且≤ 40”“＞ 40 且≤ 50”“＞ 50”4 个亚组；根据个人年收入（万元）分为“≤ 15”“＞ 15 且≤ 25”“＞ 25 且≤ 35”“＞ 35”4 个亚组，根据家庭年收入（万元）分为“≤ 20”“＞ 20 且≤ 40”“＞ 40 且≤ 60”“＞ 60”4 个亚组。

2 结果

2.1 数据基本情况

调查共发放并回收 275 份问卷，经审核整理获得有效问卷 244 份，有效率为 88.73%。受访者男性占比 65.57%，女性占比 34.43%；平均年龄为（40.04±8.03）岁。91.80% 的受访者来自消化内科科室，86.89% 就诊于三级医疗机构。个人年收入平均为（22.29±14.61）万元，家庭年收入平均为（42.51±30.34）万元。其他信息见表 2。

2.2 WTP 阈值分析

2.2.1 平均 WTP 水平 分析 WTP_i 数据可知，受访者如愿意接受 2.70% 的疗效增量，其愿意接受的药品价格差整体区间为 5 ～ 1800 元，需计算累计频度中位值以代表受访者的平均支付意愿水平。图 2 呈现了受访者 WTP_i 数据的频数与频度（%），分别反映了 WTP_i 出现的次数和比例。由图 2 可知，WTP_i 为 1000 和 1100 的受访者最多，分别为 49 人和 29 人。

图 3 中 WTP_i 的累计频度（%）反映了 WTP_i 数值增加的幅度。观察可知累计频度中位值在 500 ～ 800，利用线性插值法算出为 714.29，再结合疗效增量 2.70%，计算得样本人群的平均 WTP 值为 264.55 元 /1%。

2.2.2 不同特征变量下亚组人群的 WTP 分析

表 2 受访者基本信息

Tab 2 General information of respondents

项目	人数	比例 /%
年龄 / 岁		
≤ 30	24	9.84
＞ 30 且≤ 40	123	50.41
＞ 40 且≤ 50	73	29.92
＞ 50	24	9.84
性别		
男	160	65.57
女	84	34.43
地区来源		
东部地区	186	76.23
中部地区	7	2.87
西部地区	34	13.93
东北地区	17	6.97
就诊科室		
消化内科	224	91.80
消化外科	8	3.28
胃肠镜科	6	2.46
其他科室	6	2.46
就诊医疗机构级别		
一级	3	1.23
二级	29	11.89
三级	212	86.89
个人年收入 / 万元		
≤ 15	85	34.84
＞ 15 且≤ 25	82	33.61
＞ 25 且≤ 35	44	18.03
＞ 35	33	13.52
家庭年收入 / 万元		
≤ 20	55	22.54
＞ 20 且≤ 40	80	32.79
＞ 40 且≤ 60	79	32.38
＞ 60	30	12.30

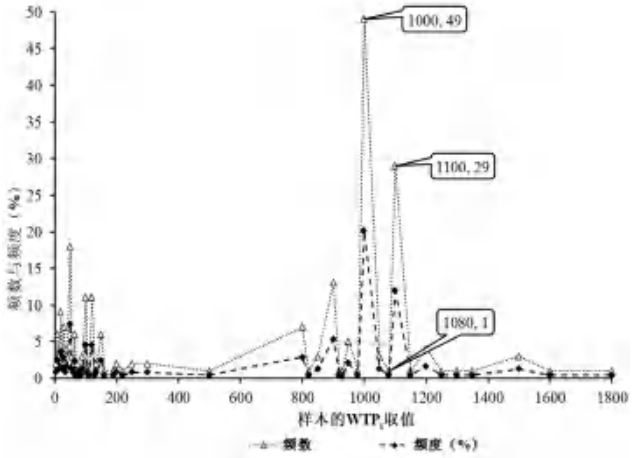


图 2 受访者 WTP_i 的频数与频度（%）统计图

Fig 2 Number and frequency (%) of respondent WTP_i

各特征变量下亚组人群的平均 WTP 值如图 4 所

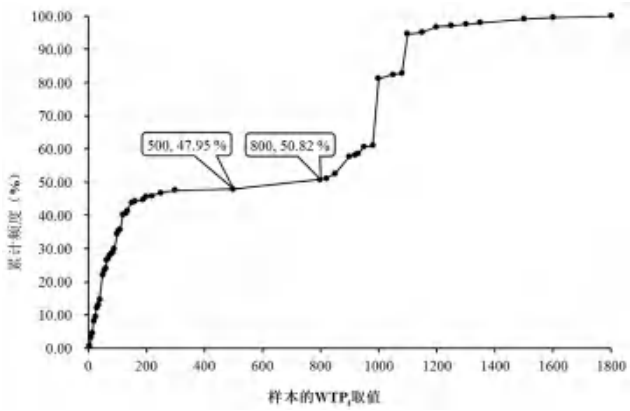


图 3　受访者 WTP_i 的累计频度统计图

Fig 3　Cumulative frequency statistics of respondents' WTP_i

示，在年龄段亚组中，受访者年龄（岁）“＞ 30 且≤ 40”组最大（325.10 元 /1%），“＞ 50”组最小（24.07 元 /1%）；在地区来源亚组中，“东北地区”组的平均 WTP 值最高（359.26 元 /1%），“中部地区”组最低（27.78 元 /1%）；在就诊医疗机构级别亚组中，“一级”“二级”组的平均 WTP 值显著低于“三级”组（322.65 元 /1%）；在两种收入（万元）亚组中，随着收入水平的提高，平均 WTP 值均逐渐增大。

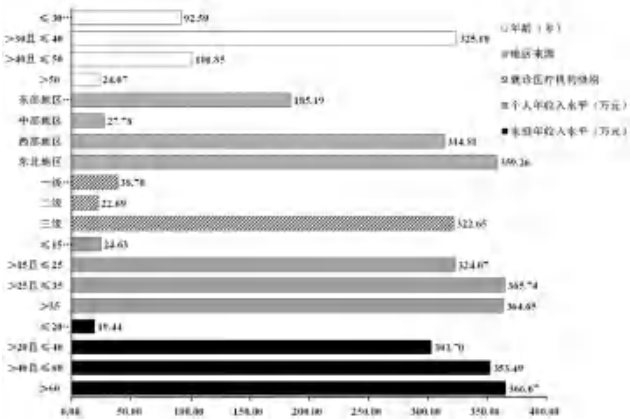


图 4　各特征变量下亚组人群的平均 WTP 值（单位：元 /1%）

Fig 4　Mean WTP values of subgroups population under each characteristic variable（unit：yuan/1%）

3　讨论

3.1　肠道准备药物 WTP 调查的应用价值

调查显示，患者为提高 1% 的肠道准备成功率，平均至多愿意多花费 264.55 元。该阈值相对较高，说明患者重视肠道准备的质量和效果，认为疗效更好的肠道准备药物能够提高肠镜检查的准确性和安全性，促进提高生命质量。药物经济学评价中常将研究药物与对照药物的增量成本 - 效果比与患者的 WTP 值进行比较，以判断该药物是否具有经济性 [5]。相较于以 1 ～ 3 倍人均 GDP 作为阈值，本研究所测算的 WTP 是一种基于患者偏好，而非基于社会平均水平的阈值标准，在一定程度上填补了该阈值标准的研究空白，为临床选用经济性较高的药物提供了参考。

本次 WTP 调查的结果还间接表明，患者对肠道准备药物有一定的需求和价值认知，但也存在一定的价格敏感性。在当前市场上，传统的肠道准备药物价格相对较低，如聚乙二醇电解质散和硫酸镁等；而新型的肠道准备药物价格相对较高，如口服硫酸盐溶液和改良型聚乙二醇电解质溶液等。如果新型的肠道准备药物能够提供更高的肠道准备成功率，那么患者可能会更倾向于选择这些药物，而不是传统的低价药物。

3.2　二分式 CVM 可有效引导患者给出真实的支付意愿

本研究设计了基于二分式 CVM 的 WTP 调查问卷。一方面通过设置基础药物与新型药物的假设对比情景，避免受访者对具体药物名称或品牌的先入为主或偏见，既便于理解和回答，也可保证得到客观结果；另一方面通过逐步缩小受访者所能接受的价格差区间，提高测量精度和效率，可降低其高报价格的可能性，有助于反映出患者的真实 WTP。在医疗卫生领域，国内外学者也常使用 CVM 设计 WTP 调查问卷，为糖尿病药物和医疗技术等的经济性评价提供了参考标准 [13-14]。

为使受访者更快地理解问卷内容，本次调查是在需行肠道准备的假设情景下，以临床文献的最新荟萃分析结果 [9] 作为常规与新型药物的疗效对照，该疗效增量虽不显著但客观存在，在肠道准备结局说明的辅助作用下受访者可直观感知提高疗效带来的利好程度，由此给出真实的 WTP。但在逐步确认支付意愿边界值的过程中，也可能受到受访者的锚定效应或策略性回答的影响，导致 WTP 出现一定偏差，是本研究的局限性之一。因此后续研究可与开放式问答、支付卡等其他 CVM 进行比较和验证，进一步优化二分式 CVM 的 WTP 调查。

3.3　不同特征变量下亚组人群的 WTP 存在差异

亚组分析结果显示，就诊医疗机构级别与收入水平越高，患者人群的平均 WTP 越高，两者可能是影响患者 WTP 的重要因素。即对医疗服务水平要求较高的患者更倾向于到三级医疗机构就诊，因此更愿意接受新型的肠道准备药物并支付更多费用；收入水平越高的患者对价格的敏感度越低，因此更能承受较高的费用。

在年龄亚组中，“≤ 30”岁亚组的平均 WTP 值较小，“30 岁以上”亚组则随年龄段升高，平均 WTP 先升高再逐渐降低。推测是因为 30 岁以下患者在严重肠道疾病上的患病率和死亡率较低 [2]，因重视程度较低而不愿为疗效增量支付较高的费用。当患者年龄到 30 岁后，罹患严重肠道疾病的概率相对较高，且达到了指南推荐的常规化结肠镜检查年龄范围 [2-4]，由此患者的 WTP 达到峰值，此后年龄更大的患者或因疾病负担增加而导致其 WTP 降低。

此外，本研究还发现，在不同地区来源划分的亚组中，中部地区的经济发展水平较高，但患者平均 WTP 却最低，说明地区经济发展水平并不直接反映该地区患者 WTP 的高低。一般而言，地区医疗资源配置是否充足会对药物的可及性与价格区间产生较大影响，或将影响患者的 WTP。例如西部和东北地区的地方药品集采中标品种相对较少，品种供应与配置尚不能实现充分，患者往往只能被动接受成本相对较高的药品品种，或因惯性思维而在调查中报告了较高的 WTP 值。反观药品可及性较高且集采中标品种更多的东部地区，用药方案相对丰富，患者更趋向于选择更具成本优势的品种，致使其 WTP 较低。在调查到肠道准备药物的 WTP 后，未能开展系统全面的影响因素分析是本研究的局限性。未来可通过系统性识别和筛选流程开展影响因素分析，以涵盖患者的健康状况、知识水平、风险偏好等多层面的变量因素，进一步明确肠道准备药物 WTP 的主要影响因素。

参考文献

[1] 柏愚，杨帆，马丹，等 . 中国早期结直肠癌筛查及内镜诊治指南（2014 年，北京）[J]. 胃肠病学，2015，20（6）：345-365.

[2] 国家癌症中心中国结直肠癌筛查与早诊早治指南制定专家组 . 中国结直肠癌筛查与早诊早治指南（2020，北京）[J]. 中华肿瘤杂志，2021，43（1）：16-38.

[3] John RS，Brooks DC，Shabana FP，et al. Bowel preparation before colonoscopy [J]. Gastrointest Endosc，2015，81（4）：781-794.

[4] 中国医师协会内镜医师分会消化内镜专业委员会，中国抗癌协会肿瘤内镜学专业委员会 . 中国消化内镜诊疗相关肠道准备指南（2019，上海）[J]. 中华消化内镜杂志，2019，36（7）：457-469.

[5] 田雪莹，连桂玉 . 药物经济学在药学实践中的应用 [J]. 中南药学，2003，1（3）：190-191.

[6] 洪小飞，童秀萍，吴深宝，等 . 三种肠道准备药物在结肠镜检查前的成本 - 效果分析 [A]// 2013 第六届浙江省消化病学术大会论文汇编 [C]. 2013.

[7] 周挺，李洪超，马爱霞，等 . 药物经济学评价中生命终末期患者意愿支付阈值探讨 [J]. 卫生经济研究，2018，371（3）：55-57，60.

[8] Kaminski MF，Thomas-Gibson S，Bugajski M，et al. Performance measures for lower gastrointestinal endoscopy：a European Society of Gastrointestinal Endoscopy（ESGE）quality improvement initiative [J]. Endoscopy，2017，49（4）：378-397.

[9] Ali IA，Roton D，Madhoun M. Oral sulfate solution versus low-volume polyethylene glycol for bowel preparation：meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Digest Endosc，2022，34（4）：721-728.

[10] Balistreri E，Mcclelland G，Poe G. Can hypothetical questions reveal true values? A laboratory comparison of dichotomous choice and open-ended contingent values with auction values [J]. Environ Resour Econ，2001，18（3）：275-292.

[11] Girma H，Geremew A，Alemayehu M，et al. Urban households’ willingness to pay to improve municipal solid waste collection services and associated factors：a double-bounded contingent valuation study in Harar city，Ethiopia [J]. Environ Health Insights，2022，2（11）：16.

[12] 蔡锁章，杨明，雷英杰 . 数值计算方法 [M]. 2 版 . 北京：国防工业出版社，2016.

[13] 陈洁，龙恩武，胡明 . 糖尿病治疗指标的意愿支付调查及影响因素分析 [J]. 中国药房，2016，27（18）：2456-2460.

[14] Sadri H，MacKeigan LD，Leiter LA，et al. Willingness to pay for inhaled insulin：a contingent valuation approach [J]. Pharmacoeconomics，2005，23（12）：1215-1227.

（收稿日期：2023-08-06；修回日期：2023-11-10）

临床药师在临床

临床药师参与 1 例西罗莫司治疗肺淋巴管肌瘤病后继发肝损伤、肺结核患者的药学监护

龙靓，刘湘，龚婷（湘潭市中心医院临床药学科，湖南　湘潭　411100）

摘要：临床药师参与 1 例西罗莫司治疗肺淋巴管肌瘤病后继发肺结核的诊治实践，为西罗莫司引起肝损伤并继发结核分枝杆菌感染后诊治的复杂性和安全性提供参考。本案例中，临床药师协助评估患者发生肝损伤与使用西罗莫司的相关性，参与抗结核药物与肝损伤风险、与西罗莫司药物相互作用之间治疗方案的调整，并查阅文献对该患者是否继续使用西罗莫司进行分析。经过 4 个月的治疗，患者病情整体控制良好，西罗莫司在停药 1 个月后重启也未出现与之相关的药物不良反应。

关键词：西罗莫司；肺淋巴管肌瘤病；肝损伤；肺结核；药学监护

中图分类号：R521，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0815-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.040

淋巴管肌瘤病（lymphangioleiomyomatosis，LAM）是一种好发于育龄期女性、弥漫性肺部囊性病变为特点的多系统低度恶性肿瘤性疾病。它以呼吸困难、反复气胸、乳糜胸为主要临床表现[1]，发生于肺部时称为肺淋巴管肌瘤病（pulmonary lymphangioleiomyomatosis，PLAM），目前尚无明确的特效治疗方法。西罗莫司（sirolimus，SRL）是雷帕霉素蛋白激酶特异性抑制剂，已被证实能够稳定 LAM 患者的肺功能[2]，但西罗莫司可能使患者免疫功能受到抑制而增加机会感染风险[3]。本文报道 1 例育龄期 PLAM 女性患者在服用西罗莫司两个月后继发肺结核的诊治过程，临床药师协助医师全程参与该患者的治疗，并提供药学监护，最终患者疾病得到有效救治，为类似病例的药物治疗提供用药参考。

1　临床资料

患者女性，34 岁，体重 47 kg。2022 年 2 月因“右侧自发性气胸”行右下肺楔形切除术＋肺修补＋胸膜固定术，此后多次因气胸行右侧液气胸闭式引流术，5 月诊断为肺淋巴管肌瘤后开始服用西罗莫司片（厂家：Pfizer Ireland Pharmaceuticals，用法用量：1 mg po qd），半个月后测西罗莫司血药浓度为 6.34 mg • L^{-1}。自 7 月下旬起患者频繁出现发热、咽喉痛等上呼吸道感染症状，颜面部及胸背可见痤疮样皮疹；8 月 25 日患者因反复发热，为午后低热，伴吞咽痛、乏力、气促，发热时有头晕，稍有咳嗽、咳痰不多，无腹痛、腹泻等不适，先后口服复方氨酚烷胺片（感康）、蒲地蓝口服液等药物治疗 1 周无效，于 9 月 7 日住院治疗。既往无结核病病史，否认结核病患者密切接触史。入院查体：体温（T）37.8 ℃，脉率（P）97 次 • min^{-1}，呼吸（R）22 次 • min^{-1}，血压（BP）108/80 mmHg，神清，急性病面容，精神欠佳，全身皮肤巩膜未见黄染，无皮疹，全身浅表淋巴结未扪及肿大，呼吸稍促，咽红，左侧扁桃体Ⅱ° 肿大，可见脓性分泌物，双肺呼吸音粗，可闻及散在湿啰音，心音可，律齐，无杂音，腹膨隆，无压痛及反跳痛，肝肾区无叩痛，移动性浊音阴性，双下肢不肿。门诊检查：尿常规示镜检示白细胞计数（WBC）216 个 • μL^{-1}↑，亚硝酸盐阴性，细菌＋；肝功能示谷丙转氨酶（ALT）132.3 U • L^{-1}↑，谷草转氨酶（AST）83.4 U • L^{-1}↑，碱性磷酸酶（ALP）156.7 U • L^{-1}↑，谷氨酰转肽酶（GGT）168.5 U • L^{-1}↑；肾功能正常，C- 反应蛋白（CRP）7.61 mg • L^{-1}↑，血常规正常；胸部 CT 示双肺多发囊状影，肺淋巴管肌瘤病？双肺继发性结核可能，右下肺楔形切除术后（见图 1A 和 1B）。新型冠

基金项目：2021—2022 年度国家抗肿瘤药物临床应用监测网肿瘤规范化诊疗中青年研究基金项目（No.DSS-YSF2022-03）。

作者简介：龙靓，女，副主任药师，主要从事临床药学方面的研究，email：123131609@qq.com

状病毒核酸阴性。诊断：① 发热查因，化脓性扁桃体炎？泌尿系感染；② 药物性肝损伤；③ 右侧肺楔形切除术后；④ 肺淋巴管肌瘤病。

2 治疗过程

入院后完善相关检查，血沉 22 mm • h^{-1}，PPD 试验（－），结核感染 T 细胞检测阳性、T-N（T 管 -N 管的含量）239.532 pg • mL^{-1}↑；6 项细胞因子检测示 γ- 干扰素 146.94 pg • mL^{-1}↑；尿培养示光滑假丝酵母＞ 10 万 cfu • mL^{-1}；2 次血培养（－）；心电图示窦性心律。先后予以阿莫西林克拉维酸钾（D1 ～ D3 1.2 g ivgtt q8 h）、哌拉西林他唑巴坦（D4 ～ D6 4.5 g ivgtt q8 h）抗感染，仍反复发热，午后为主，热峰较前升高，最高达 39.3 ℃，查体咽红，扁桃体Ⅰ° 肿大，无脓点，余无异常，于 D7 停西罗莫司胶囊，调整抗菌方案为阿米卡星（0.4 g ivgtt qd）＋左氧氟沙星（0.5 g ivgtt qd），D8 下午，患者发热有缓解，无尿路刺激征，临床药师会诊建议：① 化脓性扁桃体炎明确，西罗莫司免疫抑制宿主后致机会性感染结核分枝杆菌可能大，因患者无尿路刺激征考虑尿培养出光滑假丝酵母为定植或污染可能，完善肺泡灌洗液宏基因测序（NGS）等检查，进一步明确肺部感染致病菌；② 针对化脓性扁桃体炎抗细菌治疗足疗程 10 d 左右；③ 后续如诊断性抗结核治疗，因利福平 / 利福喷丁与西罗莫司存在相互作用，不建议两者联用。D10，患者 IDseq™ 肺泡灌洗液病原 NGS 检测结核分枝杆菌序列数 137 条，鉴定置信度 99%，确诊肺结核，医师和临床药师联合查房后确定抗结核方案：停阿米卡星，续左氧氟沙星，加异烟肼（H，0.3 g • d^{-1}）、吡嗪酰胺（Z，1.5 g • d^{-1}）、乙胺丁醇（E，0.75 g • d^{-1}），当日下午和 D11 下午再次低热，未予特殊处理，后体温完全正常。D14，复查肝功能示 ALP 128.4 U • L^{-1}↑，GGT 104.4 U • L^{-1}↑，ALT 和 AST 均正常，肾功能正常。D20（2022 年 9 月 26 日），患者病情好转，出院带药 HZE ＋左氧氟沙星片（V）＋双环醇片。

出院后随访，患者一直使用 HZEV 方案抗结核，10 月 5 日复查肝肾功能示 ALP 144 U • L^{-1}↑，GGT 127 U • L^{-1}↑，余正常，加用水飞蓟宾葡甲胺片（100 mg tid po）护肝。10 月 15 日再次给予西罗莫司片（0.75 mg qd po），病情相对平稳，无发热、无咽扁桃体疼痛，颜面部间断出现少许痤疮样皮疹。11 月 11 日复查肝肾功能示 ALP 100 U • L^{-1}↑，GGT 70 U • L^{-1}↑，指标较前下降，12 月 15 日复查西罗莫司血药浓度 4.43 mg • L^{-1}。2023 年 1 月 8 日复查胸部 CT 示右下肺肺结核（较前吸收）、部分硬结；右下肺术后改变；双肺多发肺气囊影，考虑 PLAM（见图 1C 和 1D）。

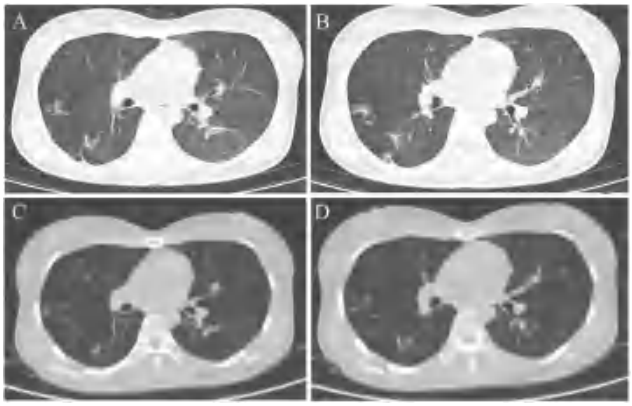


图 1 患者 2022 年 9 月 8 日（A、B）及抗结核治疗 4 个月后（C、D）的胸部 CT 片

3 讨论

3.1 PLAM 患者继发结核分枝杆菌感染时西罗莫司的取舍

PLAM 使用西罗莫司的患者属于继发性免疫缺陷人群，可使机体识别、清除病原体障碍，是造成宿主继发真菌、病毒和结核分枝杆菌等机会性感染的关键因素 [2]。通过文献检索，西罗莫司因其免疫抑制作用可使患者感染机会增加，其中结核分枝杆菌感染鲜有报道 [4]。西罗莫司目前已被证实有效并被首选推荐用于治疗 LAM，而抗雌激素疗法、羟氯喹、他汀类药物和多西环素等其他药物治疗 LAM 证据有限或仍存在很大争议 [5-6]。研究显示，西罗莫司药动学个体差异变化大，其血药浓度不但与临床疗效相关，也与包括肺炎在内的不良反应发生率相关 [7-8]。临床经验表明，大部分 LAM 患者使用西罗莫司比较适合的目标浓度为 5 ～ 10 μg • L^{-1}，部分患者其血药浓度低于 5 μg • L^{-1} 时也可能达到预期的治疗效果 [1, 8]。本例患者为育龄期女性，因 LAM 服用西罗莫司半个月后血药浓度为 6.34 mg • L^{-1}，在服药近 2 个月时患者皮肤出现痤疮样皮疹、反复上呼吸道感染和肝损伤，对症处理后症状无改善，继而确诊肺结核。研究表明，当出现严重的感染，需考虑停用西罗莫司 [1, 9]；然而，足量且长期使用西罗莫司对于首次气胸及乳糜胸的 LAM 患者疗效可能更好。为此，该患者暂时性停用西罗莫司 1 个月并积极抗结核治疗后肺结核症状有效控制、肝功能好转；1 个月后，在继续抗结核治疗的基础上予以西罗莫司减量重启，并监测西罗莫司血药浓度为 4.43 mg • L^{-1}。此后连续 4

个月随访观察，患者 PLAM 和肺结核均控制良好，且痤疮和肝损伤等药物不良反应均未再出现，提示西罗莫司血药浓度与药物不良反应存在关联，且与之相关的不良反应与西罗莫司使用前 3 个月内关系更大，与文献报道一致[5]，但西罗莫司剂量与疗效的关系可能并不相关，与研究报道一致，但仍需要进一步研究[10]。

3.2　肝损伤患者抗结核药物的选用

该患者入院时肝功能不全，临床药师根据西罗莫司药物不良反应诺氏评估量表法[11]，考虑药物性肝损伤为很可能（评分 7 分）。结合患者肺结核可能，停用可疑药物西罗莫司，诊断性抗结核治疗选择对肝功能影响较小的二线抗结核治疗方案（如阿米卡星＋左氧氟沙星）并兼顾化脓性扁桃体炎抗菌疗程[12]。后续治疗中患者症状改善、肝功能恢复正常，且肺结核确诊，结合患者为肺结核初治、耐药结核可能性较小，以及治疗的依从性，尤其是药物相互作用，即西罗莫司是 CYP3A 和 P- 糖蛋白（P-gp）的底物，对于影响该酶系和 P-gp 活性的药物均可能影响西罗莫司的药动学参数，其中利福平是 CYP3A4 和 P-gp 的强效诱导剂，两者联用可使西罗莫司浓度显著降低或治疗无效，应避免联用[13]。为此，临床药师协助临床医师调整抗结核方案为 HZEV 口服，既保证了抗结核方案的可延续性，又规避了药物间的相互作用。

4　结论

在临床治疗中，当 PLAM 使用西罗莫司治疗后出现结核分枝杆菌机会性感染和肝损伤时，医师对于原发疾病和并发症积极治疗，但对药物相互作用和药物不良反应的评估关注甚少，同时患者也缺乏对长期用药的了解，安全隐患可能难以避免。为此，临床药师在临床会诊或查房的过程中，可协助临床医师合理地选择治疗药物，并对患者进行用药宣教，保证患者用药安全、有效和经济。临床药师积极参与到临床实践中，理论与实践相结合，解决问题的能力也能够得以快速提升。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺疾病学组，淋巴管肌瘤病共识专家组，中国医学科学院罕见病研究中心，等 . 西罗莫司治疗淋巴管肌瘤病专家共识（2018）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2019，42（2）：92-97.

[2] 邱晔，曾文，潘绵鸾，等 . 非人类免疫缺陷病毒宿主机会性感染潜在的免疫缺陷研究进展 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2022，42（9）：744-748.

[3] Wang ZP，Yan HL，Ding YJ，et al. Successful treatment of fibro-adipose vascular anomaly with sirolimus [J]. Pediatric Surgery，2023，58（7）：1337-1341.

[4] 李英，徐晓琳，刘莹，等 . 西罗莫司致儿童不良反应的文献分析 [J]. 临床药物治疗杂志，2021，19（9）：74-78.

[5] 陈雪芬，邓静敏 . 肺淋巴管肌瘤病治疗的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志（电子版），2021，15（7）：556-560.

[6] Krymskaya VP，Courtwright AM，Fleck V，et al. A phase Ⅱ clinical trial of the safety of simvastatin（SOS）in patients with pulmonary lymphangioleiomyomatosis and with tuberous sclerosis complex [J]. Respir Med，2020，163：105898.

[7] 王彦娥，林美钦，林立敏，等 . 影响西罗莫司药动学、疗效及不良反应的因素分析 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（11）：1043-1047.

[8] Reichen J，Stickel F，Bhattacharya I，et al. Repeat-dose sirolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with hepatic allografts [J]. Eur J Clin Pharmacol，2012，68（5）：589-97.

[9] 徐文君，张建全，周黄超，等 . 肺淋巴管平滑肌瘤病 2 例病例报道并文献复习 [J]. 临床肺科杂志，2023，28（6）：965-970.

[10] Ando K，Kurihara M，Kataoka H，et al. Efficacy and safety of low-dose sirolimus for treatment of lymphangioleiomyomatosis [J]. Respiatory Investigation，2013，51（3）：175-83.

[11] 李荣辉，郭小兰，李伟，等 . 诺氏评估量表法在小剂量甲氨蝶呤致粒细胞减少中的应用 [J]. 中南药学，2017，15（7）：1010-1012.

[12] 黄维维 . 抗结核药物的不良反应及其处理 [J]. 西部医学，2016，28（1）：137-145.

[13] 王伟霞，张翠欣，唐霄 . 西罗莫司临床应用及药物相互作用的研究进展 [J]. 临床合理用药，2018，11（11A）：173-177.

（收稿日期：2023-09-28；修回日期：2023-11-08）

1 例脑脊液二代测序检出解脂耶氏酵母菌病例分析

刘清慧[1,2]，张颖佩[1*]（1.武汉大学中南医院药学部，武汉 430070；2.十堰市郧阳区中医医院药剂科，湖北 十堰 442500）

摘要：宏基因组二代测序（mNGS）技术的广泛应用使临床罕见病原学检出率增加。解脂耶氏酵母菌是一种罕见的机会性致病真菌，主要引起院内导管相关性感染。目前有关于脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌及其引发颅内感染的临床资料有限。本文报道了 1 例神经外科术后颅内感染脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌的病例。临床药师参与患者抗感染治疗并给出药学监护建议。患者仅接受抗细菌治疗及腰大池脑脊液引流，未行抗真菌药物治疗，最终治疗成功。本案例补充了脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌的临床资料。

关键词：解脂耶氏酵母菌；颅内感染；宏基因组二代测序；脑脊液；临床药师

中图分类号：R651.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)03-0818-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.041

解脂耶氏酵母是一种子囊菌酵母，广泛存在于自然界[1]，是一种致病菌[2-3]。研究表明，解脂耶氏酵母菌是一种可引起院内感染的罕见机会性致病念珠菌[3-4]。宏基因组二代测序技术（metagenomic next-generation sequencing，mNGS）是一种病原学检测新技术，使罕见病原学的检出率增加[5]。但 mNGS 技术受背景核酸干扰及环境污染影响，其检测价值很难评估[6]。这使临床面临 mNGS 结果往往存在治疗挑战。本文介绍 1 例神经外科术后颅内感染患者脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌的病例，临床药师参与治疗、会诊与药学监护，在临床诊疗过程中发挥作用。

1 病例资料

患者，女，60 岁，因“昏迷 1 d”于 2022 年 6 月 3 日入住我院神经外科。患者有高血压病史 15 年，其他病史无特殊。入院诊断：① 左侧大脑中动脉瘤破裂伴蛛网膜下腔出血；② 颞叶出血；③ 高血压病 3 级。患者入院后急诊在全麻下行“脑动脉瘤夹闭术＋颅内血肿清除术＋颅骨去骨瓣减压术”。术后患者浅昏迷，格拉斯哥昏迷评分法（GCS）评分：E2VTM3，予以气管插管、呼吸机辅助呼吸及对症支持治疗。

第 7 日，患者神志昏迷，体温最高 38.8 ℃，行腰大池引流，查脑脊液常规：红色浑浊，有核细胞总数 6705 个 • μL^{-1}↑，多核细胞百分比 72%；脑脊液生化：蛋白 1.89 g • L^{-1}↑，糖 1.08 mmol • L^{-1}↓，氯化物 124.2 mmol • L^{-1}。患者发生颅内感染可能性大，同时合并肺部感染，予以万古霉素 1.0 g ivd q12h 联合美罗培南 1.0 g ivd q8h。第 10 日，患者体温最高 38.5 ℃，复查脑脊液，有核细胞总数 708 个 • μL^{-1}↑。脑脊液多病原学基因检测：解脂耶氏酵母菌（序列数 3882，占比 100%）。临床就此病原学结果请临床药师会诊，讨论是否增加抗真菌治疗。药学会诊建议：① 无菌部位检出念珠菌，通常应当作致病菌，且患者接受多种侵入性操作治疗，存在念珠菌感染危险因素；② 念珠菌性中枢感染罕见于免疫功能正常人群，需进一步明确患者既往史；③ 若检出菌为致病菌，首选两性霉素 B 脂质体治疗。后追问病史，患者既往史无特殊。由于经腰大池引流及美罗培南联合万古霉素治疗 3 d，患者虽仍有发热，但生命体征平稳，感染指标不高，脑脊液常规及生化指标较前好转。因此临床医师决定暂不予以抗真菌治疗。临床药师提示临床注意脑脊液引流，并需密切关注患者体温、感染指标、脑脊液指标、病原学检查结果的变化。

第 13 日，患者神志昏迷，体温最高 38.5 ℃，腰大池持续引流通畅，脑脊液色黄、微浑浊。第 15 日，患者体温最高 37.7 ℃，腰大池引流出淡黄色透亮液体，复查感染指标基本正常。第 17 日，患者无发热，停用万古霉素。第 21 日，患者停用美罗培南。第 25 日，患者转当地医院继续治疗。患者住院期间的脑脊液细胞计数、多核细胞比例变化趋势见图 1，脑脊液蛋白、糖变化趋势见图 2。

2022 年 7 月 22 日患者返院行“脑室腹腔分流术”，入院时 GCS 评分 E3VTM5，7 月 25 日脑脊液培养阴性、脑脊液检查无异常，8 月 10 日患者顺利出院。

作者简介：刘清慧，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：1667137671@qq.com *通信作者：张颖佩，女，副主任药师，主要从事临床药学研究，email：znyyzyp@126.com

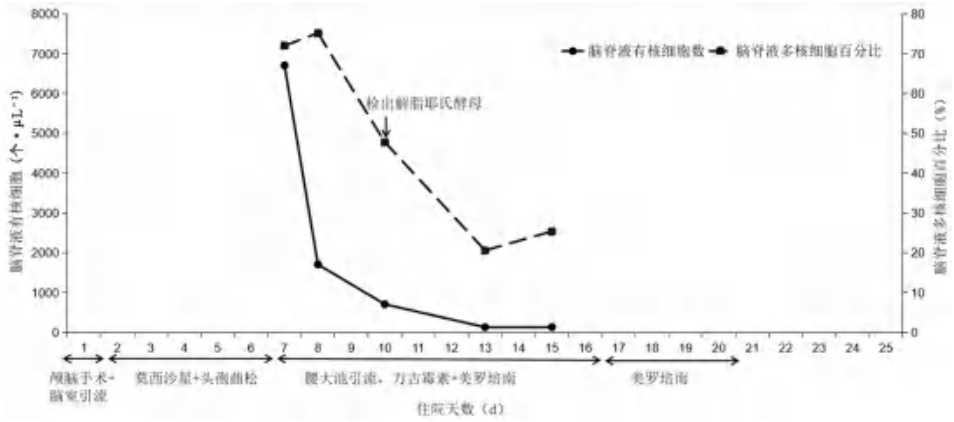


图 1　治疗方案和患者脑脊液细胞计数变化

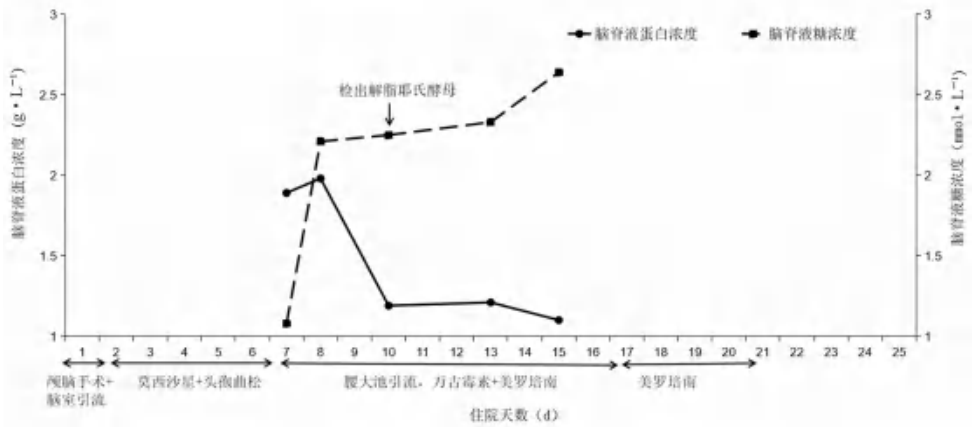


图 2　治疗方案和患者脑脊液蛋白、糖含量变化

2　讨论

2.1　解脂耶氏酵母菌与感染性疾病

解脂耶氏酵母广泛存在于自然环境，属于人类正常菌群，可定植于皮肤、呼吸道、消化道、阴道，可在免疫功能低下和危重患者中引起感染 [2]，糖尿病患者尤甚 [3]。此菌虽然毒力较弱，但其可通过产生水解酶、黏附宿主细胞产生致病性 [2]。广谱抗菌药物的使用、导管置入和在 ICU 住院时间延长是解脂耶氏酵母菌感染的主要危险因素 [3]。目前已有多篇解脂耶氏酵母菌感染相关研究报道，几乎均为血流及导管相关性感染，少数为皮肤、阴道、眼部等感染 [2，7-8]。然而，由解脂耶氏酵母菌引发颅内感染尚未见报道。解脂耶氏酵母菌对氟康唑等抗真菌药物普遍敏感，但最低抑菌浓度高于白念珠菌 [3]。氟康唑耐药分离株也经常被报道，这提示解脂耶氏酵母菌可能是一种潜在多重耐药真菌 [9]。

2.2　脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌的临床意义

病原学精准诊断对感染性疾病的诊断非常重要 [5]。传统中枢神经系统感染的诊断主要通过液体涂片显微镜检查、病原体培养等，检出率较低 [10]。mNGS 利用生物信息学技术，使中枢神经系统感染病原学检出率增高 [5-6，11]。一项荟萃分析表明，mNGS 技术用于细菌性脑膜炎诊断的灵敏度为 33% ～ 98%，特异度为 67% ～ 98%[12]。另有一些研究者发现，脑脊液 mNGS 检出的病原学序列数与脑脊液白细胞计数、葡萄糖比例、预后成相关性，mNGS 不仅在中枢感染性疾病中有较高的诊断价值，也有一定的判断预后价值 [6]。但是，目前尚无关于 mNGS 诊断真菌相关感染确切的诊断界值，尚不能准确判断菌群污染或感染状态。因此，本例患者脑脊液 mNGS 结果检出解脂耶氏酵母菌（唯一检出菌），是污染菌还是致病菌，其临床意义较难确定。

2.3　本例患者的治疗策略

入院第 7 日，患者颅脑手术后出现发热，脑脊液检查异常，提示颅内感染。而对于院内获得性颅内感染，万古霉素联合美罗培南是经典的抗感染治疗方案 [13]。当脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌后，临床医师就是否启动抗真菌治疗与药师展开讨论。

一方面，患者虽无免疫缺陷相关病史，但接受开颅手术及广谱抗菌药物治疗，存在念珠菌感

染的高危因素。且脑脊液为无菌部位，若检出念珠菌，通常应作为致病菌[14]。以上证据支持患者启动抗真菌治疗。解脂耶氏酵母菌中枢神经系统感染目前无规范治疗指南。并且，我们也未检索到该病原菌引发颅内感染的案例报道。参照念珠菌中枢神经系统感染的治疗，两性霉素 B± 氟胞嘧啶为首选治疗方案。两性霉素 B 脂质体较两性霉素 B 有更好的中枢渗透性，为更优治疗选择[14-15]，但两性霉素 B 脂质体毒性较大且治疗费用更高[16]。

另一方面，目前尚无关于脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌的规范结果解读。且经病情评估，患者经抗细菌治疗及脑脊液引流后病情趋于平稳。根据相关报道，解脂耶氏酵母菌毒力较低，对于其引起的血流感染，仅拔除导管，而不进行全身抗真菌治疗即可治疗成功[2，7]。以上分析提示我们，面对 mNGS 结果不必急于开启抗真菌治疗，但需给予患者严密的临床观察。

最终，本例患者未增加抗真菌治疗，继续抗细菌治疗及维持脑脊液引流，并及时评估患者治疗效果，最终患者颅内感染逐渐控制。1 个月后患者返院复诊，患者亦无颅内感染相关临床表现及实验室检查支持，提示治疗成功。

3 总结

本文首次报道了 1 例神经外科术后颅内感染患者脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌的病例。临床药师全程参与药物治疗，给出药学建议。本案例提示，随着 mNGS 技术在临床的广泛应用，中枢神经感染患者的病原学检出率增高，但治疗挑战也随之增加。因此，面对病原学结果，我们可以充分评估现有治疗方案，无需急于调整、增加治疗药物。另外，解脂耶氏酵母菌为一种院内感染的罕见念珠菌，其在中枢神经系统感染中的临床资料与治疗经验不足，本案例报道可作为脑脊液 mNGS 检出解脂耶氏酵母菌临床资料的补充，为后续相关临床问题提供参考。

参考文献

[1] Trabelsi H，Chtara K，Khemakhem N，et al. Fungemia caused by Yarrowia lipolytica [J]. Mycopathologia，2015，179（5-6）：437-445.

[2] Zieniuk B，Fabiszewska A. Yarrowia lipolytica：a beneficious yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen：a minireview [J]. World J Microb Biot，2018，35（1）：10.

[3] Desnos-Ollivier M，Letscher-Bru V，Neuveglise C，et al. Yarrowia lipolytica causes sporadic cases and local outbreaks of infections and colonisation [J]. Mycoses，2020，63（7）：737-745.

[4] Chi HY，Su YS，Chen FL，et al. Breakthrough fungemia caused by Yarrowia lipolytica in a patient with gastric adenocarcinoma during echinocandin therapy [J]. J Infection，2021，82（1）：e52-e53.

[5] Batool M，Galloway-Pena J. Clinical metagenomics-challenges and future prospects [J]. Front Microbiol，2023，14：1186424.

[6] Li ZY，Dang D，Wu H. Next-generation sequencing of cerebrospinal fluid for the diagnosis of unexplained central nervous system infections [J]. Pediatr Neurol，2021，115：10-20.

[7] Boyd AS，Wheless L，Brady BG，et al. Cutaneous Yarrowia lipolytica infection in an immunocompetent woman [J]. JAAD Case Rep，2017，3（3）：219-221.

[8] Kumar S，Kumar A，Roudbary M，et al. Overview on the infections related to rare candida species [J]. Pathogens，2022，11（9）：963.

[9] Zhao Y，Chan JF，Tsang CC，et al. Clinical characteristics，laboratory identification，and in vitro antifungal susceptibility of Yarrowia（Candida）lipolytica isolates causing fungemia：a multicenter，prospective surveillance study [J]. J Clin Microbiol，2015，53（11）：3639-3645.

[10] Gu JN，Chen L，Zeng CJ，et al. A retrospective analysis of metagenomic next generation sequencing（mNGS）of cerebrospinal fluid from patients with suspected encephalitis or meningitis infections [J]. J Healthc Eng，2022，2022：5641609.

[11] Wilson MR，Sample HA，Zorn KC，et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis [J]. New Engl J Med，2019，380（24）：2327-2340.

[12] Kanaujia R，Biswal M，Angrup A，et al. Diagnostic accuracy of the metagenomic next-generation sequencing（mNGS）for detection of bacterial meningoencephalitis：a systematic review and meta-analysis [J]. Eur J Clin Microbiol，2022，41（6）：881-891.

[13] Tunkel AR，Hasbun R，Bhimraj A，et al. 2017 Infectious diseases society of America’s clinical practice guidelines for healthcare-associated ventriculitis and meningitis [J]. Clin Infect Dis，2017，64（6）：e34-e65.

[14] Chinese Adult Candidiasis Diagnosis and Management Expert Consensus Group. Chinese consensus on the diagnosis and management of adult candidiasis [J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi，2020，59（1）：5-17.

[15] Pappas PG，Kauffman CA，Andes DR，et al. Clinical practice guideline for the management of Candidiasis：2016 update by the infectious diseases society of America [J]. Clin Infect Dis，2016，62（4）：e1-e50.

[16] Hamill RJ. Amphotericin B formulations：a comparative review of efficacy and toxicity [J]. Drugs，2013，73（9）：919-934.

（收稿日期：2023-08-09；修回日期：2023-11-05）

药学教育

“BOPPPS ＋ E”教学模式在《药剂学》课程中的应用

高祎婷，孙晓飞，刘晓航，朱丽丽（新疆第二医学院药学院，新疆　克拉玛依　834000）

摘要：目的　研究“BOPPPS ＋ E”教学模式在《药剂学》课程中的实践和应用。**方法**　选取新疆第二医学院的学生作为研究对象，在《药剂学》课程中使用“BOPPPS ＋ E”教学模式和传统教学模式，使用综合测评的方式对两个教学模式进行对比。**结果**　相较于传统教学模式，“BOPPPS ＋ E”教学模式既可有效强化学生在课堂的互动性和参与性，综合测评成绩提高，还可以辅助教师教学，提升教师的教学水平。**结论**　“BOPPPS ＋ E”教学模式在《药剂学》课程的实际运用中取得了良好教学效果，为其他专业有关课程的教学改革提供了理论依据和实践参考。

关键词：药剂学；“BOPPPS ＋ E”教学模式；综合测评
中图分类号：G642　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)03-0821-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.03.042

Teaching mode of BOPPPS ＋ E in the course of *Pharmaceutics*

GAO Yi-ting, SUN Xiao-fei, LIU Xiao-hang, ZHU Li-li (*School of Pharmacy, Xinjiang Second Medical College, Karamay Xinjiang* 834000)

Abstract: Objective To apply the teaching mode of BOPPPS ＋ E in the *Pharmaceutics* course. **Methods** Students from Xinjiang Second Medical College were selected as the research subjects. Both teaching modes BOPPPS ＋ E teaching mode and traditional teaching mode were compared and evaluated. **Results** Compared with the traditional teaching model, the BOPPPS ＋ E teaching model effectively strengthened students’ interaction and participation in the classroom, improved comprehensive evaluation scores, and also assisted teachers to polish their teaching skills. **Conclusion** The BOPPPS ＋ E teaching model achieves good results in the *Pharmaceutics* teaching, which provided a theoretical basis and practical reference for other academic courses.

Key words: *Pharmaceutics*; BOPPPS ＋ E teaching mode; comprehensive evaluation

“BOPPPS”教学模式是近年来在欧美国家广泛推行的一种教学方法[1-3]，六个字母代表六大元素，即导言（Bridge-in，B）、学习目标（Objective，O）、前测（Pre-Test，P）、参与式学习（Participatory Learning，P）、后测（Post-Assessment，P）、总结（Summary，S）。目前以“BOPPPS”教学模式为基础的教学方法已被超过 33 个国家引进采用，超过 100 所教育机构推崇，2011 年后“BOPPPS”逐渐被我国学者应用于教育学、计算机、医学等学科领域[4-5]。大量实践表明，“BOPPPS”是一种有效果、有效率、有效益的，能够有效调动学生的积极性和主动性，能够帮助教师分解并分析教学过程、找出教学盲点、改善并提升教学效果和质量的工具[6-8]。“BOPPPS”不是一成不变的，我们以“BOPPPS”为基础，根据药剂学课程特点和教学实践，创新性地提出“BOPPPS ＋ E”教学模式，在“BOPPPS”教学模式基础上增加第七个元素——拓展（Extension，E），这七大元素贯穿课前 - 课中 - 课后全过程，见图 1。该模式按照学生认知曲线设计，注重学生在教学过程中的参与度，体现了以学生为中心、教师

基金项目：2023 年度自治区高校本科教育教学研究和改革项目（No.XJGXPTJG-2023102）；2023 年中央支持地方高校改革发展专项资金项目。

作者简介：高祎婷，女，讲师，主要从事药物结构修饰与制剂研究，email：528610128@qq.com

为主导的教育理念，能更好地调动学生的学习兴趣，提高创新思维能力。

本研究中选取新疆第二医学院药学专业学生为对象，将“BOPPPS ＋ E”教学模式用于《药剂学》课堂教学，将课堂赋予全新的体验，最大限度地释放教与学的能量，以期提高教学质量、优化教学效果。

图 1 “BOPPPS ＋ E”教学元素

Fig 1 BOPPPS ＋ E teaching elements

1 《药剂学》课程简介

《药剂学》是药学专业的一门核心专业课程，是国家执业药师（药学综合知识一）和药学卫生资格（相关专业知识）考试必考内容，课程设置在本科大三下学期 / 专升本大二上学期，理论课 54 学时。结合本校应用型人才培养目标，课程设置的目标包括，知识层面：使学生掌握药物制剂的基本理论、生产技术、质量控制与合理应用的相关内容；能力层面：使学生具备制剂设计和制备的能力以及分析和解决制剂质量问题的能力；素养层面：培养学生树立正确的价值观，增强学生法制意识和社会责任感，增强文化自信，培育工匠精神 [9-15]。

药品是特殊商品，药剂学承载着将原料药制成药品过程中最后一环的重大使命。一般而言，药物对疗效起主要作用，而剂型对疗效起主导作用。原料药一旦加工成制剂后，附加值增大，且药物制剂与临床用药的顺应性密切相关，因此，对于医药专业的学生而言，学习好药剂学对于今后步入工作岗位，开展医疗和科研工作具有十分重要的意义 [16]。

2 《药剂学》教学现状分析

《药剂学》（主编：方亮，第 8 版，人民卫生出版社）理论课程内容主要包括药物制剂基本理论（第一章至第六章）、常规药物剂型与技术（第七章至第十一章）、新型药物制剂与技术（第十二章至第十七章）。

通过近几年的教学效果反馈，学生收获颇多。但是由于该课程理论内容繁多、知识量大且繁杂，传统的教学模式让教师教得辛苦，学生学得乏味，学习效率相对较低。笔者在授课过程中发现存在以下问题：

① 章节内容繁多且知识量大，知识点分散且琐碎，如药用辅料，虽难度不大，但需要学生反复记忆，学生普遍反映记忆量大、易混淆且不能很好地灵活运用；

② 内容叙述性强，学生往往是被动灌输，学习过程较为枯燥，课堂参与度不佳，听课效率低，学习成效差；

③ 药剂学对于解决临床药物使用问题，对于正确评价药物的安全性、有效性非常必要，如雾化吸入制剂的规范使用方法，缓控释制剂的用药注意事项等知识点，为平衡过多的知识点讲解，在课堂上与临床相结合的用药交代、合理用药内容讲解较少；

④ 药剂学的学科发展非常迅速，除书本上记载的内容，多数前沿知识集中在先进的科学期刊文献中，在课堂上因为时间关系，无法让学生过多涉猎。

3 《药剂学》教学改革思路

通过对药剂学课程教学重点、难点以及特点的深入分析，根据课程内容明确 10 个专题，分别是液体制剂、无菌制剂、固体制剂 1、固体制剂 2、半固体制剂、气雾剂、中药制剂、缓控释制剂、经皮吸收制剂、制剂新剂型。针对这 10 个专题开展“BOPPPS ＋ E”教学。

该模式的实施将有助于解决以下问题：

① 通过课前摸底测试、课中重难点突破检测、课后自学反思，建立“散点”知识间的“网状链接”，让学生学得扎实、深入；

② 学生拿到专题学习任务单后，明确学什么、怎么学、学会没，并量化评分课前、课中、课后全过程，加强过程考核，使学生在学习过程中得到激励，有助于增强学生学习的参与感、成就感和自信心，同时教师可对学生的学习成效作出更加综合的评价；

③ 精选明星药物制剂案例式教学，学生通过课前资料准备，课中讨论交流，使药剂学与临床、患者实际相结合，突出其实用性，同时培养学生家国情怀；

④ 学生可以根据自身的能力，灵活完成教师布置的拓展任务，开阔视野、放大格局。

4 “BOPPPS ＋ E”教学模式实战演练

以制剂新剂型专题中“脂质体”为例进行教学模式实践。

4.1 课前 BOP

学生根据专题学习任务单（B），明确学习目标（O），见表 1。

表 1　教学目标

Tab 1　Teaching objectives

目标（O）	具体学习任务（B）
知识目标	① 掌握脂质体的概念和膜材料；② 熟悉脂质体的制备方法和特点
技能目标	① 培养学生根据药物性质选择新剂型的能力；② 锻炼学生设计剂型制备方案的能力
情感目标	① 提高学生对药剂学前沿知识的兴趣，感受创新的价值和新剂型的魅力；② 提高分析问题 - 解决问题的能力

学生根据专题学习任务单和目标，雨课堂平台线上观看教学课件、慕课视频，完成课前摸底测试（P），测试试题量为 10 道，难易程度为一般，平均正确率为 45%，见表 2；并参与词云讨论，多数同学表示未见过脂质体、抽象、难理解，见图 2；课前查找已上市的明星药物脂质体制剂——“阿霉素脂质体”案例课堂讨论交流资料。

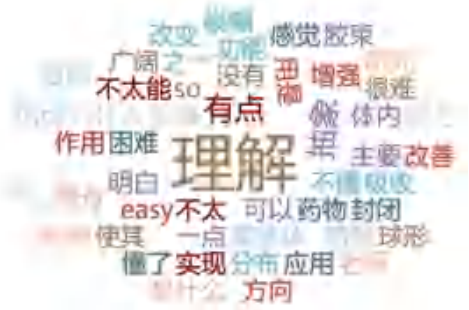


图 2　制剂新剂型专题——“脂质体”预习内容的词云讨论

Fig 2　New formulations topic——online discussion of "liposome"

4.2　课中 PPS

① 结合教学大纲要求和学生课前预习反馈情况，教师调整线下教学方式，在进行重、难点讲授时，比如脂质体的概念、组成、三个特点，以动画和视频等多媒体手段辅助教学，加深学生对抽象知识点的理解和记忆。

② 精选明星药物制剂案例式教学，引导学生进行思考，增强学生的创新意识，并组织学生讨论交流（P），设置两个讨论交流点，分别为交流点 1：pH 梯度法制备阿霉素脂质体的原理；交流点 2：对比薄膜分散法和 pH 梯度法的优缺点。在此过程适时引入课程思政，阿霉素脂质体注射液，商品名“里葆多”，是我国首个自主创新研发的脂质体阿霉素，作为乳腺癌、淋巴癌等一线化疗药，一经问世，便打破了多年来国外医药企业对此类药品的垄断，标志着中国抗肿瘤药物实现了再次升级。脂质体研发之路任重道远，作为药学专业的学生，应该学好自己的专业技能，提升自主创新意识，让更多的中国创新服务于人类健康，激发学生创新意识和民族自豪感。

③ 针对学生的学习效果和授课质量进行检测（P），测试试题量为 10 道，难易程度为难，平均正确率为 96%，见表 2。

表 2　学生参加测试结果对比

Tab 2　Test results comparison among students

测试种类	试题量	难易程度	平均正确率 /%
课前摸底测试	10	一般	45
课中学习效果检测	10	难	96

教师引导，学生表述完成课堂小结（S），师生共同总结本节课的教学重难点，见图 3，实现知识点的深入与内化。

图 3　师生共同课堂小结

Fig 3　Brief summary of teachers and students

4.3　课后＋E

拓展（Extension，E）指安排自学和拓展任务，见表 3，满足学生的自主学习和个体化学习需求。

4.4　成效

分析“BOPPPS ＋ E”教学模式在脂质体教学中取得的成效可分为：知识成效、技能成效、情感成效、总体成效。

① 知识成效：自媒体时代，学习不拘于课堂，借助信息化手段，教学过程中充分采用微课、视频、动画和图片等数字资源突出重点，突破难点，可以将课堂容量有限变成无限，将教学内容多角度展开、形象直观地呈现，打造创新教学的课堂魔方，并以课堂为抓手，打开一扇门，开阔视野，启迪智慧。这样，有效解决了药剂学内容抽象难懂的问题，学生们通过绘制思维导图对知识脉络有了更加清晰的认知，见图 4。

② 技能成效：通过提问、小组讨论、案例对比分析，培养学生的思维能力；学以致用，通过课堂讲授，安排课后文献阅读分析，既保证了课程的深度，又体现了学科学术性，培养了学生根据药物性质选择新剂型的能力，锻炼了学生设计

表 3 课后任务

Tab 3 After-class tasks

任务类型	具体学习任务
自学	① 观看学堂在线“黄芩苷固体脂质纳米粒的制备”操作视频；② 自学课本脂质体隐形化原理章节分析文献中脂质体的设计策略，撰写阅读报告
拓展	[1] 周晶，欧阳怡，徐倩，等 . 黄芩苷固体脂质纳米粒的制备及其在小鼠体内组织分布研究 [J]. 安徽中医药大学学报，2020，39（3）：6.
	[2] Minamisakamoto T，Nishiguchi S，Hashimoto K，et al. Sequential administration of PEG-Span 80 niosome enhances anti-tumor effect of doxorubicin-containing PEG liposome [J]. Eur J Pharm Biopharm，2021，169：20-28.

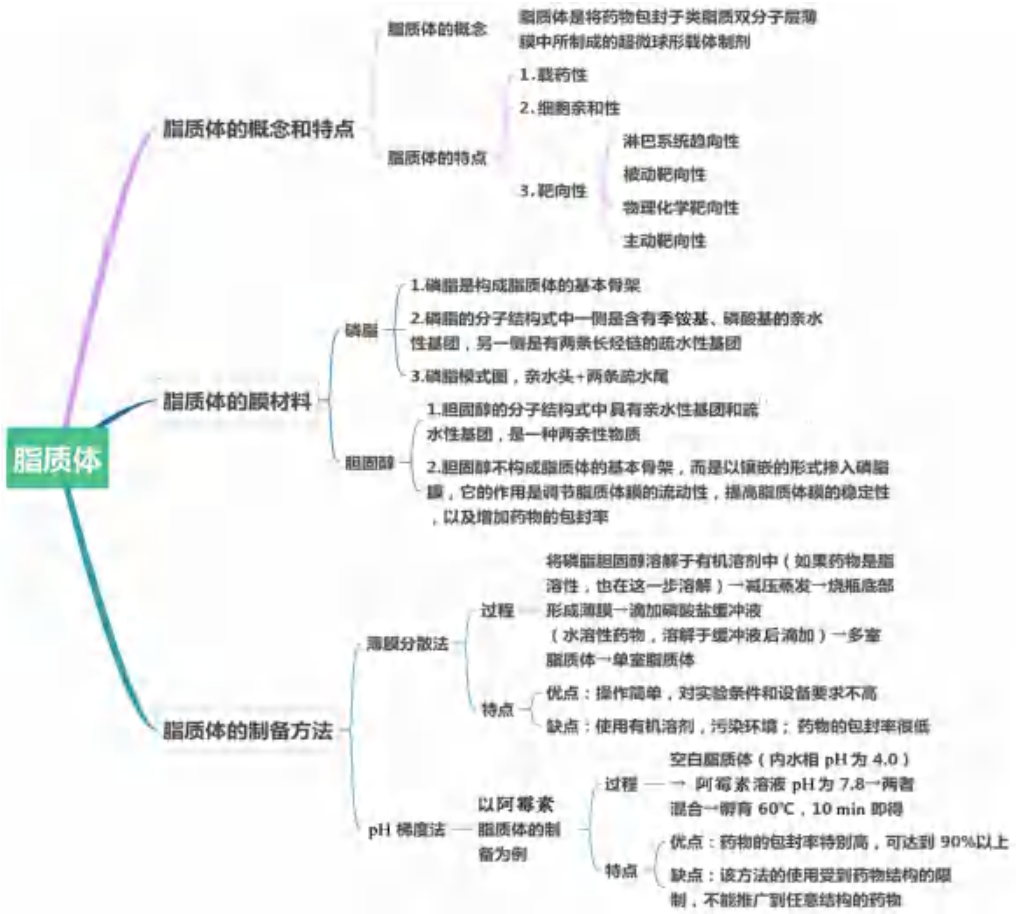


图 4 学生绘制的思维导图（节选）

Fig 4 Mind maps by students（excerpt）

剂型制备方案的能力。

③ 情感成效：通过介绍制剂研发案例，提高学生对药剂学前沿知识的兴趣，感受创新的价值和新剂型的魅力，有助于培养药学生严谨科学的态度和自主创新的使命感。

阿霉素脂质体制备案例的引入不仅让学生真切地感受到所学内容的实用性，而且通过课堂讨论发言，师生互动，同学交流，课堂氛围活跃，提升学生参与度，激发了学生学习药剂新剂型的积极性，增强了学生的探究意识，培养了学生语言表达能力、分析问题并解决问题的能力，也锻炼了学生严谨求实的科学态度和与人合作的团队精神。

④ 总体成效：通过“BOPPPS ＋ E”教学模式的实施，对学生而言，抽象的专业知识直观化，更易理解，思维更活跃，学习的兴趣更浓、效率更高。对教师而言，信息化的教学手段辅助了传统的课堂教学，教法合理，达到了预期的教学效果。

5 “BOPPPS ＋ E”教学效果与反馈

5.1 学生成绩对比

“BOPPPS ＋ E”教学模式注重过程性考核，综合测评成绩为：课前 10% ＋课中 10% ＋课后 10% ＋期中考试 10% ＋期末考试 60%。通过增加过程考核，使学生在学习过程中得到激励，同时教师可对学生的学习情况作出更加综合的评价。

我们对比了药学专业 2019-01 本科班和 2021-

01 专升本班学生的综合测评成绩，结果如图 5 所示。2019-01 本科班 53 人，四年制；2021-01 专升本班 40 人，2 年制。前期调研发现，相较于本科班，专升本班学生不仅基础知识薄弱，且层次不齐，鉴于此，“BOPPPS ＋ E” 教学模式在专升本班实施既势在必行又充满挑战。

2021-01 专升本班实施“BOPPPS ＋ E” 教学模式，2019-01 本科班未实施。由图 5 可知，由成绩分布直方图可以看出两个班级的成绩分布呈现“中间高、两头低”的正态曲线状。药学 2019-01 本科班和 2021-01 专升本班平均分别为 74 分和 79 分，半数学生成绩分别集中在 70 ～ 79 分和 80 ～ 89 分，不及格率分别为 9.4% 和 2.5%。从综合测评成绩上印证了“BOPPPS ＋ E” 教学模式对专升本班学生产生的积极影响。

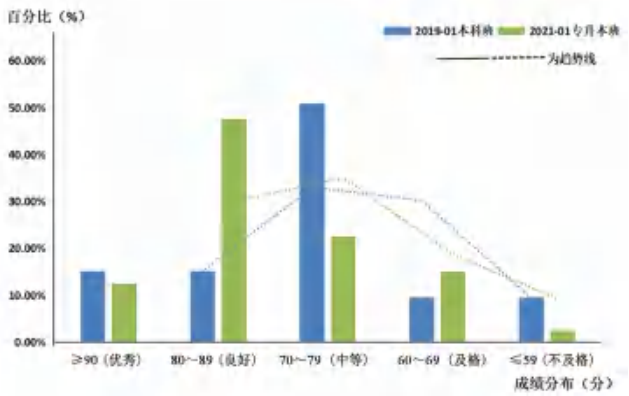


图 5　2019-01 本科班和 2021-01 专升本班综合测评成绩分布图

Fig 5　Comprehensive evaluation scores distribution for undergraduate class 2019-01 and upgrade from junior college student to university student class 2021-01

5.2　学生反馈

本文对比了药学专业 2019-01 本科班和 2021-01 专升本班学生对常规教学模式和“BOPPPS ＋ E” 教学模式的反馈评分，见表 4，大部分学生表示这种教学模式有助于提高学习的主动性和积极性，能够在知识上查漏补缺，拓展学习的深度和宽度，对这种教学模式评分较高。但是也有部分学生表示，课程压力大，学习任务繁重，占用时间较多，存在疲于应付、敷衍了事的情况。

表 4　学生反馈评分表

Tab 4　Students feedback rating form

序号	评价内容	反馈评分	
		“BOPPPS ＋ E” 教学模式	常规教学模式
1	教学模式设计合理性	8.5	6.6
2	教模式与教学内容切合度	9.0	8.2
3	教学模式组织教学安排得当	9.1	7.1
4	教学模式适合基础薄弱，层次不齐的学生	9.3	6.5
5	教学模式使课程内容易于理解	9.1	7.8
6	教学模式有助于提高我对该学科的兴趣	8.6	8.4
7	教学模式有助于提高我认识、解决相关问题的能力	9.5	8.0
8	教学模式有助于我做人、做事、做学问	8.9	8.3
9	教学模式使我感觉任务繁重、耗时较长	7.1	4.3
10	我对教学模式的认可度	9.4	6.0

注：每项评价内容 0 ～ 10 分，根据符合程度打分，符合程度越高，分值越高。

Note：Each evaluation item was scored from 0 to 10，based on the degree of conformity. the higher the conformity degree，the higher the score.

6　“BOPPPS ＋ E” 教学模式的特色

本项目充分利用智慧教学工具雨课堂和“BOPPPS ＋ E” 教学模式，将课前 - 课中 - 课后的每一个环节都赋予全新的体验，最大限度地释放教与学的能量。在本项目实施的过程中，教师将专题学习任务单、习题及课堂上需讨论的内容推送到学生手机，还可进行实时答题、弹幕互动、词云讨论，让师生互动更多、教学更为便捷。每个专题学习结束后，通过拓展学习，不仅可以实现知识点的深入和内化，还能提高学生的思考能力，激发学生丰富的创造力。

7　讨论

市场对于药学专业人才的要求已从一维的专业要求向人文素养、职业操守、事业心和社会责任感等多维拓展，这一深度变化要求我们创新人才培养模式。“BOPPPS ＋ E” 教学模式用于《药剂学》课程的教学，是药剂学本科生培养模式的创新，对于提高学生自主学习的积极性和效率，培养其创新精神、逻辑思维能力，提升其独立思考和解决问题的能力具有一定的推动作用 [17-22]。

“BOPPPS ＋ E” 教学模式与其他教学模式相比存在一些区别和优势。在传统教学中，教师讲，学生听；教师问，学生答；重结论，轻过程；教学方法单一，学生被动地接受，课堂效益很不好。与传统教学模式相比，“BOPPPS ＋ E” 教学模式注重结构化和指导，通过导言、学习目标、前测、参与式学习、后测、总结和拓展等步骤，为学生提供了清晰的学习过程和目标。这种结构化的教学方法有助于学生理解和掌握知识，提供了明确的学习方向和指导，从而促进学习效

果的提高。以问题为基础的教学法（problem-based learning，PBL）和以病例为基础的教学法（case-based learning，CBL）等问题导向的学习模式，通过自主学习、探究和解决问题来获取知识和技能，培养学生的自主学习能力、批判思维和合作技能，并将学习与实际问题或案例联系起来，使学习更具实际意义。PBL 和 CBL 教学模式鼓励学生主动参与和合作，这可作为“BOPPPS ＋ E”教学模式中参与式学习的方法，使其成为“BOPPPS ＋ E”教学模式的一部分。可见“BOPPPS ＋ E”教学模式具有灵活性和兼容性，因而具有较高的教学效率和个性化优势[23-24]。

我们在实践过程中也发现一些问题，如每堂课程教学环节较多，以致耗费的课堂时间较传统教学法更长；学生参与度不高，互动设计不够；一些学生表示上课的节奏偏快，知识内容有跳跃性；一些学生反馈作业难度系数偏高，执行起来吃力；教师在教学过程中容易出现缺乏“BOPPPS ＋ E”教学模式中的某个构成部件而导致教学设计失误和偏差；部分教师严格按照 7 个模块操作，缺乏灵活性等。因此，后续教学中教师需优化课堂结构，调整各环节的教学时间，布置作业有意义且难度适宜，师生共同努力，以达到更好的教学效果。

参考文献

[1] 严丹，于霞，杨礼琼 . 教育新常态视域下基于 BOPPPS 教学模式的翻转课堂教学实践 [J]. 科教文汇，2023（10）：66-69.

[2] Yuan JQ，Tang ZW，Shi ZY，et al. Exploration of an online and offline mixed teaching mode for “Protein Engineering” based on BOPPPS ＋ flipped classroom [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao，2023，39（7）：3037-3048.

[3] Xu ZF，Che X，Yang XD，et al. Application of the hybrid BOPPPS teaching model in clinical internships in gynecology [J]. BMC Med Educ，2023，23（1）：465.

[4] Li SQ，Liu QL，Guo S，et al. Research on the application of the blended BOPPPS based on an online and offline mixed teaching model in the course of fermentation engineering in applied universities [J]. Biochem Mol Biol Educ，2023，51（3）：244-253.

[5] Li ZY，Cai XY，Zhou KB，et al. Effects of BOPPPS combined with TBL in surgical nursing for nursing undergraduates：a mixed-method study [J]. BMC Nurs，2023，22（1）：133.

[6] Kao MC，Yuan YH，Wang YX. The study on designed gamified mobile learning model to assess students’ learning outcome of accounting education [J]. Heliyon，2023，9（2）：e13409.

[7] Sun FL，Wang YJ，He QY. BOPPPS teaching method-based effective online teaching strategies and practices for biopharmaceutical engineering [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao，2022，38（12）：4808-4815.

[8] Lin GSS，Tan WW，Tan HJ，et al. Innovative pedagogical strategies in health professions education：active learning in dental materials science [J]. Int J Environ Res Public Health，2023，20（3）：2041.

[9] 喻录容，罗先钦 . 基于 BOPPPS 的线上线下混合式教学模式在中药药剂学课程中的应用探析 [J]. 卫生职业教育，2023，41（11）：51-54.

[10] 郭嘉伟，王保旗，张定林，等 . BOPPPS 联合案例教学法用于《药剂学前沿进展》课堂教学实践 [J]. 中国药业，2022，31（12）：31-34.

[11] 唐海玲，李培源，王志萍 . 雨课堂联合 BOPPPS 教学模式在“中药药剂学”课堂教学中的应用和实践 [J]. 科教文汇（下旬刊），2021，12（8）：107-108.

[12] 叶勇，黄秋洁，韦凯，等 . BOPPPS 教学模式在中药药剂学教学中的应用 [J]. 蛇志，2021，33（2）：247-248.

[13] 陆姗姗，赵玉荣 . BOPPPS 教学法在工业药剂学实验课程中的应用 [J]. 广州化工，2021，49（8）：156-158.

[14] 唐海玲，黄秋洁，梁丹，等 . 目标导向的 BOPPPS 模式在药剂学实验教学中的应用实践 [J]. 山东化工，2021，50（3）：180-181.

[15] 刘苗，成颖，刘道洲，等 . BOPPPS 模式下 SRT 融入药剂学实验的课程设计与实践 [J]. 实验室研究与探索，2020，39（8）：210-213.

[16] 武艳，吴敏珏，卞钰，等 . 线上线下混合优化的 BOPPPS 教学模式课程思政教学评价探索 [J]. 教育信息化论坛，2023（3）：108-110.

[17] 陈晶，杨吟宇，邓凤君 . 线上线下混合式 BOPPPS 教学模式在药学专业“药理学”课程中的应用 [J]. 现代盐化工，2023，50（1）：131-133.

[18] 佟雅婧，乔文彪，李翠娟，等 . 基于“雨课堂”的 BOPPPS 教学模式在中医基础理论课程中的实践应用 [J]. 中国医药导报，2023，20（10）：80-83.

[19] 张静，孔璐，王雅梅 . 融合 BOPPPS 教学模式的医学分子生物学课程思政教学探索与实践 [J]. 卫生职业教育，2023，41（7）：20-22.

[20] 段志强，赵佳福，张依裕，等 .“BOPPPS 课程思政”教学模式在“细胞分子生物学”课程教学中的应用——以蛋白质工程章节为例 [J]. 西部素质教育，2023，9（6）：32-35.

[21] 王丽婷，马羚，吕晓峰，等 . 基于任务驱动和 BOPPPS 模型的实践课程思政教学模式研究——以“航空弹药转运实操”为例 [J]. 高等教育研究学报，2023，46（1）：96-100.

[22] 王晓钰，郑冰清，王静，等 . 多元化教学模式在中药药理学课程中的应用 [J]. 中国中医药现代远程教育，2023，21（5）：20-22.

[23] 原彬，于彦，孙昌国 . BOPPPS 教学模式下课堂互动策略的研究与实践 [J]. 教育教学论坛，2023（1）：101-104.

[24] Han WJ，Han ZY，Tian YF，et al. Practice exploration of blended teaching based on smart classroom [J]. computer education，2022（12）：60-67.

（收稿日期：2023-06-08；修回日期：2023-08-09）