中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 22 卷　第 4 期（总第 219 期）　2024 年 4 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

（827）湖南省医疗机构集采药品管理专家共识 …… 湖南省药学会

（831）围术期严重过敏反应处理流程院内规范 …… 中南大学湘雅二医院

研究论文

（834）香青兰总黄酮通过调控 TGF-β/BMP 信号通路对肺动脉高压大鼠的保护作用 …… 张钰朋，杨涛，方磊，等

（843）新型土贝母苷甲脂质体的制备及其抗胰腺癌作用研究 …… 李书慧，杨磊，王艳，等

（851）云南重楼的皂苷类化学成分研究 …… 陈文文，郑淑娴，胡晋铭，等

（857）*TREM2* 在肝细胞癌中的表达与预后、免疫浸润及药物敏感性的分析 …… 王文榜，冯佳宁，解辉平，等

（864）白杨素脂质体的制备工艺优化及抗神经炎症活性研究 …… 贾文，丁文华，汪凯康，等

（871）基于下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴对比杂交天麻及其亲本醇提物镇静催眠药效学研究 …… 高翰博，王广政，巩晴晴，等

（878）基于降解动力学模型的二至丸的活性成分松果菊苷稳定性研究 …… 郝冰玉，陈微，陈园，等

（884）水溶性汉防己甲素衍生物的合成 …… 谢广通，蒋太白，焦子伟，等

（892）基于 LC/GC-MS 和网络药理学探讨大黄 - 桃仁药对逐瘀泻热的作用机制 …… 黄建萍，井亚江，王七龙，等

（902）基于 NF-κB 通路研究平肝活血合剂对脑缺血再灌注损伤的作用机制 …… 刘宗梅，王晓玲，宋发萍，等

（908）阿戈美拉汀离子液体贴片的制备及体外透皮研究 …… 杜卓芳，符渝昕，程泽能

（914）身痛逐瘀汤对 CIA 模型大鼠预防及治疗的作用研究 …… 李淋雨，张紫园，李子伊，等

（923）基于 Box-Behnken 响应面法与 BP 神经网络优化雪莲药渣化学成分提取工艺 …… 艾尼玩尔·买提库尔班，马桂芝，滕亮

《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　峰　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　睢大筠　肇丽梅
翟　青　黎　敏　颜　苗　潘卫三
魏高文

（930）基于 UPLC-QQQ-MS 技术的仙灵脾颗粒体内药代动力学研究
…… 王月鑫，王帅，杨欣欣，等

（936）Box-Behnken 效应面法优化盐酸达克罗宁温敏凝胶的处方工艺
…… 李娇，潘娇娇，徐丽芝，等

（943）鞣花酸通过 TLR4-SRC/MAPK/NF-κB 途径抑制脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应
…… 乌里盼·托乎达阿里，丁宛婷，孙媛，等

（949）基于新绿原酸的紫外吸收和电化学双信号响应的 Al^{3+} 分析新方法研究 …… 魏文凤，董永亮，张自品

（955）马缨丹中一个 2，3- 环氧角鲨烯环化酶基因 *LaOSC1* 的鉴定和克隆
…… 高蝶娜，范志高，冯时茵

（960）外水相组成对醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球理化性质的影响
…… 郑明秀，刘磊，梁荣财

（967）不同基原枳实水煎液黄酮类成分及抗氧化活性差异研究
…… 赵香玉，熊英，刘永富，等

（974）流苏石斛的黄酮类成分及其对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤的保护作用研究 …… 王靖雯，徐晓娜，张海浪，等

（979）复方葛根汤调控 IL-6/STAT3 和铁死亡通路抑制在体结肠癌发展
…… 钱玲，赵斌，饶江泉，等

（984）基于质量源于设计理念的降脂护肝方提取工艺研究
…… 吴作敏，李恒，王韵旨，等

综述

（991）小胶质细胞调控阿尔茨海默病中微管相关蛋白的研究进展
…… 王亚男，何玲

（999）铁死亡在胰腺疾病中的研究进展 …… 孙银，李鹏洲，李荣

（1008）何首乌肝损伤机制及减毒方法研究进展
…… 刘思雨，李敏，唐瑜，等

（1016）特拉唑嗪药理学研究进展…… 李玫，陶彦华，仇念壮，等

（1023）基于各国监管机构相关技术要求的吸入气雾剂质量控制研究进展
…… 汪敏，房兆营，王雪，等

（1030）CDK4/6 抑制剂在 HR^{+} 晚期乳腺癌治疗中的耐药机制及进展后治疗策略 …… 王蕾，杨思原，张季，等

（1037）基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路中药防治血管性痴呆的研究进展
…… 高媛，惠乐乐，杨瑞林，等

药物分析与检验

（1042）近红外光谱快速检测苏黄止咳胶囊中间体苏黄颗粒的水分含量
…… 马盼盼，吴晨璐，张婉莹，等

（1048）威廉环毛蚓提取物蛋白质含量测定方法研究
…… 蒋巧萍，宇泉霖，宋嘉佳，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　兰丽丽
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。

（1053）基于 UPLC 指纹图谱及含量测定结合化学模式识别法比较不同产地枇杷花的差异 …… 胡孔兴，何鹏，张萍，等

（1059）基于 HPLC 指纹图谱和多组分含量测定结合化学模式识别研究的龙眼核质量评价 …… 王艺洁，蒋佳丽，陈彦洁，等

（1065）高效液相色谱法测定 α- 硫辛酸绿茶片中 α- 硫辛酸的含量 …… 徐硕，王月，邝咏梅，等

（1070）不同产地及加热方式文冠果仁中的氨基酸成分分析 …… 段佩利，院军，张帅，等

（1076）高效液相色谱法测定芦荟大黄素的有关物质 …… 姚倩，邓远雄，李岩，等

医院药学

（1080）集中带量采购政策对注射用喹诺酮类药物处方行为和细菌耐药性影响分析 …… 过佳月，刘金春，张海霞，等

（1087）盐酸多柔比星化疗的乳腺癌患者心脏毒性的发生和影响因素分析 …… 王梅，李鹏洲，童隆财，等

（1091）《抗肿瘤药物临床应用管理办法》实施现状分析 …… 杜娟，田锋奇，张文周

（1097）借助自回归移动平均模型构建儿童口服退烧药消耗量的预测模型 …… 王卓芸，于飚，陶亮亮，等

药品不良反应

（1101）奥沙利铂致眼睑下垂 1 例并文献复习 …… 贾东丽，石亚楠，赵永军，等

（1103）万古霉素致颅内脓肿患者发生 DRESS 1 例 …… 阮旭，韩晶晶，王运红，等

（1107）注射用六氟化硫微泡致心律失常 1 例 …… 高超，杨金果，牟雷，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*282*zh*P*30.0*46*2024-4

本期责任编辑：邬志娟，彭金飞，李科，陆窈窈

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 4 April 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

(834) **Protective effect of total flavones in *Dracocephalum Moldavica* L. on pulmonary hypertension in rats via modulation of TGF-β/BMP signaling pathway** ····· *ZHANG Yu-peng, YANG Tao, FANG Lei, et al*

(843) **Preparation of novel Tubeimoside I liposomes and its anti-pancreatic cancer research** ····· *LI Shu-hui, YANG Lei, WANG Yan, et al*

(851) **Chemical constituents of steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*** ·····*CHEN Wen-wen, ZHENG Shu-xian, HU Jin-ming, et al*

(857) ***TREM2* expression in hepatocellular carcinoma and its correlation with prognosis, immune infiltration, and drug sensitivity** ····· *WANG Wen-bang, FENG Jia-ning, XIE Hui-ping, et al*

(864) **Preparation optimisation and anti-neuroinflammation activity of liposomes chrysin** ····· *JIA Wen, DING Wen-hua, WANG Kai-kang, et al*

(871) **Comparison sedative and hypnotic pharmacodynamics of hybrid *Gastrodia elata* and its parent alcohol extracts based on hypothalamic-pituitary-adrenal axis** ····· *GAO Han-bo, WANG Guang-zheng, GONG Qing-qing, et al*

(878) **Stability of the active component echinacetin in Erzhi pills based on a degradation kinetics model** ····· *HAO Bing-yu, CHEN Wei, CHEN Yuan, et al*

(884) **Synthesis of hydrophilic tetrandrine derivatives** ····· *XIE Guang-tong, JIANG Tai-bai, JIAO Zi-wei, et al*

(892) **Active ingredients and mechanism of Rhubarb-Peach kernel pair in removing blood stasis and purging heat based GC-MS and network pharmacology** ····· *HUANG Jian-ping, JING Ya-jiang, WANG Qi-long, et al*

(902) **Mechanism of Pinggan Huoxue mixture on cerebral ischemia reperfusion injury based on the NF-κB pathway** ····· *LIU Zong-mei, WANG Xiao-ling, SONG Fa-ping, et al*

(908) **Preparation and in vitro transdermal research of agomelatine ionic liquid patch** ····· *DU Zhuo-fang, FU Yu-xin, CHENG Ze-neng*

(914) **Preventive and therapeutic effect of Shentong Zhuyu decoction on CIA model rats** ·····*LI Lin-yu, ZHANG Zi-yuan, LI Zi-yi, 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.

(923) Optimization of extraction of dregs of *Saussurea involucrata* after ethanol extraction based on Box-Behnken response surface methodology and BP neural network ····· *Ainiwaner Maitikuerban, MA Gui-zhi, TENG Liang*

(930) In vivo pharmacokinetics of Xianlingpi granules based on UPLC-QQQ-MS ····· *WANG Yue-xin, WANG Shuai, YANG Xin-xin, et al*

(937) Formula optimization of dyclonine hydrochloride thermosensitive gel by Box-Behnken response surface methodology ····· *LI Jiao, PAN Jiao-jiao, XU Li-zhi, et al*

(943) Inhibition of ellagic acid on lipopolysaccharids-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophage through TLR4-SRC/MAPK/NF-κB pathway ·····*Wulipan Tuohudaali, DING Wan-ting, SUN Yuan, et al*

(950) UV absorption/electrochemistry dual-readout method for Al^{3+} detection based on neochlorogenic acid ····· *WEI Wen-feng, DONG Yong-liang, ZHANG Zi-pin*

(955) Identification and cloning of a 2, 3-oxidosqualene cyclase gene *LaOSC1* from *Lantana camara* ····· *GAO Die-na, FAN Zhi-gao, FENG Shi-yin*

(961) Effect of external aqueous phase composition on the physicochemical properties of goserelin acetate PLGA microspheres ·····*ZHENG Ming-xiu, LIU Lei, LIANG Rong-cai*

(967) Flavonoids and antioxidant activity of water decoction prepared by Aurantii Fructus Immaturus from different origins ····· *ZHAO Xiang-yu, XIONG Ying, LIU Yong-fu, et al*

(974) Flavonoids from *Dendrobium fimbriatum* and its protective effect on corticosterone-induced PC12 cell damage ····· *WANG Jing-wen, XU Xiao-na, ZHANG Hai-lang, et al*

(979) Inhibition effect of Compound Gegen decoction on the development of colon cancer in vivo by regulating IL-6/STAT3 and ferroptosis pathway ····· *QIAN Ling, ZHAO Bin, RAO Jiang-quan, et al*

(984) Extraction of Jiangzhi Hugan prescription based on concept of quality by design ····· *WU Zuo-min, LI Heng, WANG Yun-zhi, et al*

(991) Advance in regulation of microglial cells on tau proteins in Alzheimer's disease ····· *WANG Ya-nan, HE Ling*

(999) Advances in the study of ferroptosis in pancreatic diseases ····· *SUN Yin, LI Peng-zhou, LI Rong*

(1008) Research progress on the mechanism of liver injury by polygonum multiflorum and attenuation and synergism ·····*LIU Si-yu, LI Min, TANG Yu, et al*

(1016) Advances in the pharmacological study of terazosin ····· *LI Mei, TAO Yan-hua, QIU Nian-zhuang, et al*

(1023) Advances in quality control of inhalable aerosols based on technical requirements of regulation agencies worldwide ····· *WANG Min, FANG Zhao-ying, WANG Xue, et al*

(1030) Mechanism of resistance to CDK4/6 inhibitors in HR$^+$ advanced breast cancer and subsequent treatment strategies
…… *WANG Lei, YANG Si-yuan, ZHANG Ji, et al*

(1037) Research progress in traditional Chinese medicine for vascular dementia based on cAMP-PKA-CREB signaling pathway
…… *GAO Yuan, HUI Le-le, YANG Rui-lin, et al*

(1042) Rapid detection of moisture content in intermediate Suhuang granules of Suhuang Zhike capsules by near infrared spectroscopy
…… *MA Pan-pan, WU Chen-lu, ZHANG Wan-ying, et al*

(1048) Determination of protein content in the extract from *Pheretima guillelmi*
…… *JIANG Qiao-ping, YU Quan-lin, SONG Jia-jia, et al*

(1053) Loquat flowers from different regions by HPLC fingerprint and content determination combined with chemical pattern recognition
…… *HU Kong-xing, HE Peng, ZHANG Ping, et al*

(1059) Quality evaluation of seeds of *Dimocarpus longan* Lour. based on HPLC fingerprint and multi-component content determination combined with chemical pattern recognition
…… *WANG Yi-jie, JIANG Jia-li, CHEN Yan-jie, et al*

(1065) Determination of *α*-lipoic acid in *α*-lipoic acid with green tea tablets by high-performance liquid chromatography
…… *XU Shuo, WANG Yue, KUANG Yong-mei, et al*

(1070) Amino acid components in Xanthoceras sorbifolium seeds from different origins and heating methods
…… *DUAN Pei-li, YUAN Jun, ZHANG Shuai, et al*

(1076) Determination of aloe-emodin related substances by HPLC
…… *YAO Qian, DENG Yuan-xiong, LI Yan, et al*

(1080) Impact of centralized drug volume-based procurement policy on the prescribing behaviors and bacterial resistance of quinolone injection
…… *GUO Jia-yue, LIU Jin-chun, ZHANG Hai-xia, et al*

(1087) Occurrence of cardiotoxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin hydrochloride chemotherapy and influence factors
…… *WANG Mei, LI Peng-zhou, TONG Long-cai, et al*

(1091) Implementation status of *Management Measures for Clinical Application of Anti-tumor Drugs*
…… *DU Juan, TIAN Feng-qi, ZHANG Wen-zhou*

(1097) Prediction model of children's oral antipyretic drug consumption by autoregressive moving average model
…… *WANG Zhuo-yun, YU Biao, TAO Liang-liang, et al*

指南或共识

湖南省医疗机构集采药品管理专家共识

湖南省药学会

摘要：梳理国家和本省药品集采政策，指导各级医疗机构贯彻执行集采政策。组织专家对落实集采药品组织机构及职责、中选药品目录管理、需求量的科学测算、集采药品使用监测、结余留用政策等进行梳理、分析，提出专家建议。结果总结出落实药品集采和管理的指导意见三十条。具有较强的政策解读性和实际操作性。

关键词：医疗机构；集中采购药品；精细化管理；专家共识

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0827-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.001

为了指导湖南省各级医疗机构正确执行药品集中带量采购政策，保障我省医疗机构药品集中带量采购工作常态化、制度化，促进集采中选品种的优先合理使用。湖南省药学会组织部分医疗机构药学部负责人和集采工作实施人员，针对集采药品采购管理，参考国家和本省有关药品集中带量采购政策，召开多次研讨会议，采用德尔菲法聚集问题和专家意见，起草了本共识。本共识分为五部分，归纳出指导意见三十条，希望对我省各级医疗机构贯彻执行好集中带量采购起到促进作用。

一、医疗机构集采药品管理的组织架构及职责

【陈述一】

集采药品管理工作组组长应由医疗机构主要负责人担任，副组长由医务部、药学部门负责人担任，工作组成员由医务（含医疗质量管理控制）、运营管理、财务（含绩效）、医保、药学、信息、临床科室等部门负责人组成。

日常工作由医务、医保、药学、运营管理等部门指定专人具体负责。

纪检监察部门对本医疗机构集采药品管理工作进行全程监督[1]。

【陈述二】

集采药品工作组全面负责本医疗机构集采药品工作的指导、组织协调和监督管理，拟订推进工作有关措施，定期召开专题会议通报本医疗机构集采药品执行情况，研究解决实施过程中存在的问题，保障集采药品工作的扎实推进。

【陈述三】

各协作部门应进行明确分工，并通过健全的沟通协调与反馈机制，共同推进落实药品集采政策。具体分工可根据医疗机构实际情况进行内部调整。

医务部（含医疗质量管理控制部门）主要职责：组织开展国家集采药品政策解读与培训。组织制订集采药品绩效考核标准并推进落实，包括集采药品各专科任务量分配，对无正当理由未完成约定任务量的科室及个人，采取预警、约谈、通报、绩效扣除等方案。建立集采药品不良事件处理预案，并组织处理集采药品不良事件。

医保部门主要职责：与上级医保部门衔接，沟通落实医保基金预付；协助集采药品医保政策的传达、培训及落实；测算结余留用金额，并配合完成结余留用资金核定与结算工作；协助拟定院内结余留用金额分配方案。

药学部门主要职责：科学测算与上报本医疗机构集采药品采购需求量。动态监测集采药品与可替代药品的使用情况，对用量异常增长的药品，及时反馈至工作组，采取干预措施。落实与配送企业签订采购协议，评估配送质量，做好集采药品供应保障。监测药品质量与不良事件发生情况，及时收集、上报和分析不良事件。汇总和分析集采药品供应保障和临床应用存在的问题，及时反馈至工作组；并做好集采药品供应不及时的替代方案，必要时提出优化药品供应目录的方案，保障临床诊疗需求。

信息中心主要职责：负责集采药品数据采集的信息化技术支持。

运营管理、财务（含绩效）部门主要职责：

按照集采药品绩效考核结果，执行医疗机构内相关科室与人员经济奖惩。负责集采药品相关款项结算，包括建立集采药品相关款项专账；审核并确保医保平台与药品入库金额一致性。及时落实结余留用金额的院内分配。

临床科室主要职责：开展科内政策宣讲和培训，提高科室人员的政策知晓率。做好本科室集采药品任务量的二次分配与完成进度监测，落实科内奖惩，确保优先使用集采中选品种。开展集采药品不良事件监测、处理与上报工作。

二、目录遴选与可替代药品管理

1. 中选药品遴选和使用管理

【陈述四】

中选药品与本院在用药品通用名称和医保剂型一致的，中选药品直接替换原目录非中选药品，纳入本院药品处方集和基本用药供应目录，且原非中选药品不再采购使用[2]。

【陈述五】

中选药品与本院在用药品通用名称一致但医保剂型不一致的，可根据临床需求，报药事管理与药物治疗学委员会（下称药事会）讨论决定该中选药品是否纳入本院药品处方集和基本用药供应目录，同时讨论同通用名不同剂型产品是否继续保留[2]。

【陈述六】

中选药品为本医疗机构既往未曾使用且未报量的，临床有需求的可直接采购，并提交下一次药事会审议或备案[2]。

【陈述七】

对于集采药品有多家中选企业的，本院药事会应根据当前是否在用或既往是否使用过该产品、中选企业属性、药品质量层次和价格等情况，制订本医疗机构勾选中选产品的原则，自行选择。

2. 非中选药品遴选和使用管理

【陈述八】

对于集采同通用名的非中选原研药品或参比制剂药品[2]，应根据医院临床实际需要适当保留，以应对临床多样化或沿用需求，尤其是特殊患者如精神性疾病、慢性疾病、重大疾病及急危重症用药，但需严格控制、合理使用和监测。

【陈述九】

对于集采同通用名非中选但通过一致性评价的仿制药，若挂网价低于集采中选药品价格，可根据临床反馈的使用疗效及不良反应等情况，提交本院药事会讨论决定，选用中选产品或通过一致性评价的同通用名非中选产品；若挂网价高于集采中选药品价格的，不应继续使用[3-4]。

【陈述十】

对于集采同通用名非中选且未通过一致性评价的仿制药，不再纳入本院采购目录[2]。

【陈述十一】

协议期满未续约的药品，参照本院基本用药供应目录内非中选但通过一致性评价的仿制药的处置方式处理[2]。

3. 完全可替代药品管理

【陈述十二】

完全可替代药品可参考同通用名药品处置，原则上应停止使用或淘汰完全可替代药品（包括双通道和国家谈判药品），对于慢性疾病、重大疾病及急危重症患者需要使用完全可替代药品的，可采取临时采购方式满足临床需求[5-6]。

4. 部分可替代药品管理

【陈述十三】

部分可替代药品根据中选药品完成情况而定，如中选药品任务量完成不佳，应限制使用甚至停用，并提交药事会讨论；如中选药品任务量按进度完成，可继续使用[7]。

5. 一定程度上可替代药品管理

【陈述十四】

一定程度上可替代药品原则上可继续使用，若出现集采中选药品任务量完成不佳，且一定程度上可替代药品用量出现异常增长时，应限制使用并提交本院药事会讨论[7]。

6. 备供药品管理

【陈述十五】

中选药品出现供应不足的情况时，可根据临床需求直接采购可及的同通用名备供药品[2]。

三、采购需求量的科学测算与上报

【陈述十六】

应坚持以临床需求为导向，参考药品历史使用量及合理性，考虑循证医学证据的更新、药品说明书修订、疾病谱变化等影响，充分征求临床专科意见，在医保部门文件规定的比例范围内上报需求量，超出范围可以根据有关规定提供相关支撑材料[2，8-10]。

【陈述十七】

报量时应充分考虑相关政策和药品属性（如是否基本药物、国家重点监控品种、非医保目录内药品等）[11-13]。

【陈述十八】

报量时应考虑可替代药品的中选情况，以及

患者在用药转换过程中对非中选产品的需求[14]，抗菌药物还需结合细菌耐药情况，病原菌变化趋势，相关管理政策等进行测算[15]。

【陈述十九】

续约药品的报量应结合上一周期临床综合评价情况，约定采购量完成情况，可替代药品使用情况，中选企业保障供应能力等因素进行调整[16]。

四、集采药品使用监测与分析

【陈述二十】

医务部牵头与临床科室签署责任状，集采药品使用相关科室主任为第一责任人。根据协议期上一年度实际使用量及同类药品的需求，将任务量按月分解至科室。可按上一年度科室实际用量 / 全院实际总用量 × 全院约定采购量，按月平均分配，并结合季节与患者就诊习惯等适当调整，特殊专科用药需征求临床意见。

【陈述二十一】

对既往用药记录中非专科诊疗范围的临时用药、某些特殊药品，如抗菌药物，可酌情少分配或不分配用量，但临床科室应优先使用中选药品，同时限制非中选药品处方权限。如遇医保支付政策调整、临床指南变化、科室设置调整等特殊情况，应对分配量进行适当调整。

【陈述二十二】

药学部每月或每季度监测全院集采药品采购及使用进度，及时上报医务部门反馈至相关科室负责人；各相关科室应及时关注集采药品使用量及合理使用情况。将任务量完成情况纳入科室绩效考核方案，进行定期考核并公示。对于完成进度严重滞后且无特殊理由的科室 / 医师应采取约谈、限制可替代药品处方权限等措施督促其按期完成任务量。

【陈述二十三】

当生产企业不能正常供应导致中选药品短缺，医疗机构可根据临床需求适量采购备供药品或非中选药品供临床使用，直到中选药品供应恢复正常。如首选配送企业无法保障供应时，应视情况择优选择其他可配送企业。

【陈述二十四】

在采购周期内，非中选药品的使用量不得超过各批次执行文件规定的约定采购量比例（具体以相应批次执行文件为准）。二级、三级公立医疗机构国家组织药品集采药品使用比例要求逐年提高。

【陈述二十五】

对集采药品可替代药品的使用进行监测和管理。完全可替代药品采购量增幅不得高于上年度同期 50%，部分可替代药品采购量增幅不得高于上年同期 100%。

【陈述二十六】

当突发公共卫生事件发生时，可突破集采药品采购比例限制。

【陈述二十七】

对于集采药品在使用过程中发现的质量问题及不良事件，除按规定上报不良反应监测系统外，还应定期梳理，上报医保部门，保障集中带量采购药品的安全使用。

【陈述二十八】

医院信息系统应实现当医师开具处方时，按通用名进行检索，中选药品排序置顶并有相应标识，方便医师优先使用中选药品。并建立相应的统计功能，监测中选药品完成进度。

五、结余留用与激励考核

【陈述二十九】

医疗机构应将医保结余留用资金纳入单位财务专用账户，专款专用，提升精细化管理水平[17]。

【陈述三十】

医疗机构应完善内部考核办法和建立激励机制，实行量化考核及差异化激励，促进相关科室及人员积极落实集采政策[17]。对集采药品主要使用科室实行绩效激励，结合全院任务量完成情况、科室使用情况、合理用药指标考核结果等进行量化考核分配[18]；建议将部分结余留用资金用于药学部、医务部、财务部、医保部门、院办、网络信息中心、运营管理部、纪委监察办、审计办等相关管理、职能部门的绩效激励[8]。

共识主持：

张毕奎（中南大学湘雅二医院）

共识专家组：

张毕奎（中南大学湘雅二医院）

邓　晟（中南大学湘雅医院）

方平飞（中南大学湘雅二医院）

邓银华（湖南省人民医院）

龙明辉（湖南省肿瘤医院）

何鸽飞（长沙市第一医院）

共识秘书组：

张啟智（中南大学湘雅二医院）

张　超（湖南省药学会）

彭 敏（湖南省人民医院）
向左娟（湖南省肿瘤医院）
孙 吉（长沙市第一医院）
黄娟娟（长沙市第一医院）

参考文献

[1] 中华人民共和国国务院办公厅 . 国务院办公厅关于推动药品集中带量采购工作常态化制度化开展的意见 [EB/OL].（2021-01-28）[2023-11-28]. https：//www. gov. cn/zhengce/content/2021-01/28/content_5583305. htm.
[2] 中国药师协会 . 医疗机构国家组织集中采购药品管理中国专家共识 [J]. 中国新药杂志，2023，32（3）：311-322.
[3] 福建省医疗保障研究院，福建省药学会 . 福建省公立医疗机构落实药品集中带量采购工作指导手册 [EB/OL].（2022-09-06）[2023-11-28]. http://yxh.fjhxyx.com/commnewdetail.aspx?id=5D948B9220454782BF145E9422D11E29.
[4] 湖南省医疗保障局 . 湖南省医疗保障局关于做好第三、五批国家组织药品集中带量采购药品新采购周期执行工作的通知 [EB/OL].（2022-12-13）[2023-11-28]. https：//ybj. hunan. gov. cn/ybj/first113541/firstF/f3113607/202212/t20221213_29160159. html.
[5] 国家医疗保障局 . 关于印发《前七批国家组织药品集中采购品种可替代药品参考监测范围》的通知 [EB/OL]. 医保价采函〔2022〕126 号 .
[6] 湖南省医疗保障局 . 第五批集采药品帕洛诺司琼注射液及完全可替代产品多拉司琼注射液（国家谈判）采购数据复核及情况说明 .
[7] 湖南省医疗保障局 . 关于明确国家组织药品集中采购工作中医保资金结余留用有关计算参数的函 . 湘医保招采函〔2021〕7 号 .
[8] 陈月，冯英楠，孔旭东，等 . 北京市医疗机构落实国家组织药品集中采购专家共识 [J]. 中国医药，2022，17（11）：1601-1604.
[9] 关于加强药品和医用耗材集中带量采购全流程管理的通知 [J]. 山东省人民政府公报，2023（8）：39-43.
[10] 国家医疗保障局办公室 . 关于做好 2023 年医药集中采购和价格管理工作的通知 [EB/OL].（2023-03-01）[2023.08.24]. http：//www. nhsa. gov. cn/art/2023/3/1/art_109_10207. html.
[11] 湖南省卫生计生委 . 湖南省卫生计生委关于进一步调整完善医疗机构药品配备使用政策的通知 [EB/OL].（2018-05-23）[2023-08-24]. http：//wjw. hunan. gov. cn/xxgk/tzgg/201805/t20180523_5018111. html.
[12] 中华人民共和国国务院办公厅 . 关于进一步做好短缺药品保供稳价工作的意见 [EB/OL].（2019-10-11）[2023-08-24]. https：//www. gov. cn/zhengce/content/2019-10/11/content_5438499. htm.
[13] 国家卫生健康委，教育部，财政部，等 . 关于印发加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见的通知 [EB/OL].（2020-02-21）[2023-08-24]. https：//www. gov. cn/gongbao/content/2020/content_5522549. htm.
[14] 湖南省医疗保障局 . 关于做好第七批国家组织药品集中带量采购中选结果执行工作的通知 [EB/OL].（2022-11-18）[2023-08-24]. http：//ybj. hunan. gov. cn/ybj/first113541/firstF/f3113607/202211/t20221118_29130175. html.
[15] 童荣生，赵杰，王明贵，等 . 医疗机构抗菌药物集中带量采购管理专家共识 [J]. 医药导报，2023，42（1）：1-5.
[16] 国家医疗保障局办公室 . 关于做好国家组织药品集中带量采购协议期满后接续工作的通知 [EB/OL].（2021-11-03）[2023-08-24]. https：//www. gov. cn/zhengce/zhengceku/2021-11/05/content_5649219. htm.
[17] 湖南省医疗保障局 . 关于国家组织药品集中采购工作中医保资金结余留用的实施意见（试行）[EB/OL].（2020-12-04）[2023-10-11]. http：//ybj. hunan. gov. cn/ybj/first1 13541/firstF/f2113606/202012/t20201204_13976014. html.
[18] 新疆药学会 . 关于发布《新疆地区医疗机构落实药品集中采购政策药学专家建议》的通知 [EB/OL].（2022-04-18）[2023-10-11]. http：//www. xjyxh. com/xjyxh/article. asp?articleid ＝ 354.

（收稿日期：2023-12-25；修回日期：2024-01-30）

围术期严重过敏反应处理流程院内规范

中南大学湘雅二医院

摘要：围术期严重过敏反应严重威胁手术患者生命，规范处理流程能最大程度地减少患者的死亡。我院根据相关指南和共识，从危机资源管理、风险评估、监测与识别以及救治四个维度规范了围术期严重过敏反应的处理流程，为临床医师诊治提供依据和参考。

关键词：围术期；严重过敏反应；处理流程；院内规范

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0831-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.002

尽管围术期严重过敏反应发生率低，但却是麻醉过程中最严重的并发症，其死亡率在 3.5% ～ 4.8%[1]。围术期严重过敏反应的原因因围术期使用的药物类型而不同 [2]。从流行病学分析，神经肌肉阻断剂（如琥珀胆碱、罗库溴铵、维库溴铵、米库氯铵、阿曲库铵和顺式阿曲库铵）、抗菌药物、镇痛药、胶体、脂类局麻药、血液制品和鱼精蛋白等引起围术期严重过敏反应较多 [3-6]。早期识别和规范围术期过敏反应会减少缺氧缺血性脑病和死亡，减少医疗风险和法律风险 [3，7-8]。为此中南大学湘雅二医院组织麻醉科、重症医学科、药学科等学科专家，参考《欧洲变态反应与临床免疫学会（EAACI）严重过敏反应指南》《世界过敏组织严重过敏反应指导意见（WAO）指南》以及《围术期严重过敏反应诊治专家共识》等文献资料 [9-11]，结合临床经验，经反复讨论和修改，撰写了《围术期严重过敏反应处理流程院内规范》，对过敏性休克救治流程进行了规范，以期最大程度地减少围术期严重过敏反应所致患者的死亡。

1　危机资源管理

严重过敏反应多为突发不良反应，难于预测。因此，医疗机构应做好围术期严重过敏反应救治预案及相应医疗资源的准备。预案内容应包括紧急情况下呼叫援助的对象、过敏反应发生时确定急救负责人等。同时，在手术间应准备好抢救车，车中备有基本的抢救药物以及必要的抢救设备，如喉镜等。

2　风险因素

严重过敏反应为免疫球蛋白 E（IgE）介导的速发性过敏反应，通常在给药后数分钟到 1 h 之内发生，属于 B 型药物不良反应，是一种与剂量无关，难以预测的不良反应。特异性反应、过敏性哮喘等非过敏性疾病（如非甾体抗炎药加重的呼吸系统疾病、慢性荨麻疹、肥大细胞增多症、遗传性或获得性血管性水肿）尽管不是 IgE 介导的药物过敏的危险因素，但上述情况存在恶化围术期的风险 [12]。也有学者认为有过敏史、特异反应史或哮喘史的患者更有可能发生危及生命的超敏反应。因此，对于有多重药物过敏史（MDA）的患者，应在手术前进行过敏症评估，能一定程度上预防和降低过敏性休克反应的风险 [13]。

3　监测与识别

尽管过敏领域的研究取得了较大进展，但速发性过敏反应的症状仍未得到充分认识，诊断往往被遗漏，治疗往往被延误 [14]。过敏性反应经典的三联征包括：红斑、心血管异常和气道压力升高，过敏反应临床症状出现的快慢和严重程度与所累及的器官系统有关。累及循环系统或呼吸系统过敏反应如果处理不及时，预后极差。因此，围术期需全程监测血压、心率和血氧饱和度等 [7]。在排除全脊麻、全麻过深、肺栓塞、气胸、心脏压塞、气道高反应（支气管哮喘）和失血性休克等情况，出现吞咽困难、声嘶、喘鸣、呼吸困难、气促、喘息、发绀、心动过速、低血压、晕厥、意识障碍时要高度怀疑严重过敏反应的可能。血清类胰蛋白酶、血浆组胺、血清特异性 IgE 抗体、皮肤试验有助于严重过敏反应的诊断，但不建议在围术期过敏调查中使用 [15]，紧急情况下 EAACI 严重过敏反应诊断标准更为适用 [16]。严重过敏反应有发生延迟反应和双相反应的风险，有高危因素者需延长留观时间，表现为呼吸系统受损者留观 6 ～ 8 h，伴有低血压者留观＞ 12 ～ 24 h。

4　救治策略

4.1　严重程度评估

对过敏反应严重程度进行评估，有利于采取正确的救治措施。过敏反应的严重程度与所累及的器官系统有关。过敏反应共分为四级：仅出现皮肤、黏膜症状时为Ⅰ级；出现多个器官系统中度受累表现时为Ⅱ级；出现危及生命的单个或多个器官系统受累的临床表现为Ⅲ级；心搏骤停和/或呼吸停止为Ⅳ级。过敏反应严重程度不同，所选择的治疗方案和药物剂量也存在差异。

4.2　紧急救治

严重过敏反应处理不及时，预后极差。在去除触发因素的基础上，紧急采取抢救措施，尽早使用肾上腺素，吸氧或机械通气，有效的液体管理等。

4.2.1　药物的选择、给药途径与剂量　对于过敏性休克，肾上腺素是唯一首选的药物，而且没有绝对禁忌证。及时应用肾上腺素可最大程度地减少严重过敏反应所致疾病进展和死亡，而不是选择抗组胺药和糖皮质激素。肾上腺素的给药途径与给药剂量非常重要。通常情况下，肾上腺素选择大腿中外侧进行肌内注射，给药剂量为 0.01 mg·kg^{-1}，成人和青少年最大剂量为 0.5 mg（0.5 mL），6 ～ 12 岁儿童最大剂量为 0.3 mg（0.3 mL），小于 6 岁最大剂量为 0.15 mg（0.15 mL）。根据需要，可以每 5 ～ 15 min 重复一次（或更频繁）。大约 10% 的过敏反应者需要两剂或三剂[17]。出现难治性呼吸窘迫或低血压时肌内注射肾上腺素可能无效，需尽早静脉注射肾上腺素。静脉推注可致严重心律失常，应在有监护条件下由经验丰富的医务人员操作，最好使用输液泵静脉输注。输液泵持续输注肾上腺素从 0.1 μg/（kg·min）开始，根据血压、心率和心功能、氧合情况连续滴定剂量。

4.2.2　吸氧或机械通气　根据需要，通过面罩给予 8 ～ 10 L·min^{-1} 的氧气或最高100% 的氧气。如存在血管性水肿导致气道阻塞应立即插管，延误可能导致气道完全阻塞，若插管困难，环甲膜切开术也是必要的。

4.2.3　液体管理　如果不恢复循环容量肾上腺素可能无效，因此心血管受累的过敏患者，首次使用肾上腺素时应尽早给予静脉输液；对于伴有呼吸系统表现的严重过敏反应患者，如果需要第二剂肾上腺素肌内注射，也应液体支持。对于Ⅱ级和Ⅲ级患者，其液体复苏优先选择晶体液，初始剂量分别是 0.5 L 和 1 L。如果效果不佳可以根据临床需要继续补充晶体液。对于严重的病例，如果条件允许，应尽快进行高级血流动力学评估以明确患者容量状态。Ⅳ级患者的液体复苏应遵循高级生命支持（ALS）流程。

4.2.4　解痉治疗　对肌内注射肾上腺素无效的支气管痉挛患者，2.5 ～ 5 mg 沙丁胺醇雾化，必要时重复，直至气道痉挛缓解。

4.2.5　其他治疗　服用 β- 受体阻滞剂的患者可能对肾上腺素无反应，可在 5 min 内给予胰高血糖素 1 ～ 5 mg iv，随后静脉输注 5 ～ 15 μg•min^{-1}。H_1 和 H_2 抗组胺药可缓解皮肤症状，但对非皮肤症状的可能影响仍未得到证实。国内常用苯海拉明缓解荨麻疹和瘙痒。糖皮质激素不作为严重过敏反应的首选药物，有限证据认为糖皮质激素（甲泼尼龙 125 mg iv）可以预防长期症状和可能的双相反应。个别患者可能需要使用抗利尿药物（除了肾上腺素）。所有抗利尿药物均采用输液泵给药，根据血压、心率和心功能连续滴定剂量，脉搏血氧仪监测氧合情况。

5　围术期过敏反应抢救预案

围术期过敏反应抢救预案见图 1。

声明：本规范旨在为严重过敏反应预防和治疗提出指导性意见，不排除其他共识、意见与建议的合理性。本院内规范的制订与任何商业团体无利益冲突。

《围术期严重过敏反应处理流程院内规范》编写组成员名单：

通信作者：

徐军美

执笔作者：

戴茹萍　张燕玲

刘艺平　原海燕

编写组成员（排名不分先后）：

陈国纯　陈　柱

戴茹萍　方平飞

黄伶智　李金秀

刘艺平　毛新展

王　清　王勇军

徐军美　徐　萍

原海燕　张毕奎

张燕玲

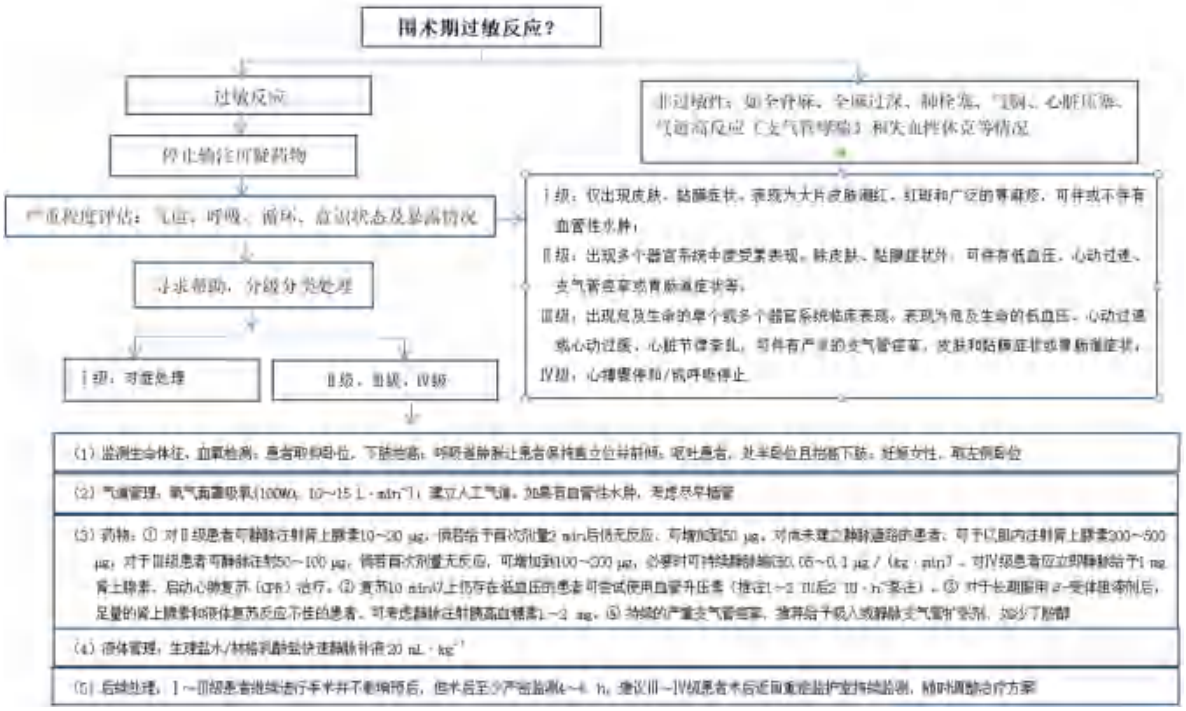


图 1　围术期过敏反应抢救预案

参考文献

[1] van Cuilenborg VR，Hermanides J，Drs BE，et al. Perioperative approach of allergic patients [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol，2021，35（1）：11-25.

[2] Volcheck GW，Hepner DL. Identification and management of perioperative anaphylaxis [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2019，7（7）：2134-2142.

[3] Hanschmann T，Francuzik W，Dölle-Bierke S，et al. Different phenotypes of drug-induced anaphylaxis-data from the European Anaphylaxis Registry [J]. Allergy，2023，78（6）：1615-1627.

[4] Wolaver W，Thakrar S，Thomas K，et al. Demystifying α-gal syndrome：identification and risk management in the perioperative setting [J]. Curr Opin Anaesthesiol，2021，34（6）：761-765.

[5] Hanžek I，Tonković D，Margaretić Piljek N，et al. Allergic reactions to colloid fluids in anesthesia [J]. Psychiatr Danub，2020，32（Suppl 4）：429-431.

[6] Fernando SL，Capon MJ，Green SL，et al. Pharmacovigilance for chlorhexidine anaphylaxis：a preventable adverse reaction [J]. Med J Aust，2021，214（4）：162-163. e1.

[7] Gouel-Cheron A，Neukirch C，Kantor E，et al. Clinical reasoning in anaphylactic shock：addressing the challenges faced by anaesthesiologists in real time：a clinical review and management algorithms [J]. Eur J Anaesthesiol，2021，38（11）：1158-1167.

[8] van Cuilenborg VR，Hermanides J，Drs BE，et al. Perioperative approach of allergic patients [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol，2021，35（1）：11-25.

[9] Cardona V，Ansotegui IJ，Ebisawa M，et al. World allergy organization anaphylaxis guidance 2020 [J]. World Allergy Organ J，2020，13（10）：100472.

[10] Muraro A，Worm M，Alviani C，et al. EAACI guidelines：anaphylaxis（2021 update）[J]. Allergy，2022，77（2）：357-377.

[11] Ryan D，Flokstra-de Blok B，Clark E，et al. Allergic and hypersensitivity conditions in non-specialist care：flow diagrams to support clinical practice [J]. Allergy，2022，77（9）：2618-2633.

[12] Dewachter P，Kopac P，Laguna JJ，et al. Anaesthetic management of patients with pre-existing allergic conditions：a narrative review [J]. Br J Anaesth，2019，123（1）：e65-e81.

[13] Patil SS，Sun L，Fox CJ，et al. Multiple drug allergies：recommendations for perioperative management [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol，2020，34（2）：325-344.

[14] Beyaz Ş，Gelincik A. Anaphylaxis in risky populations [J]. Curr Pharm Des，2023，29（3）：224-238.

[15] Garvey LH，Ebo DG，Krøigaard M，et al. The use of drug provocation testing in the investigation of suspected immediate perioperative allergic reactions：current status [J]. Br J Anaesth，2019，123（1）：e126-e134.

[16] van der Poorten MM，Walschot M，Faber M，et al. Reliability of early and late testing for suspected perioperative hypersensitivity [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2022，10（4）：1057-1062.

[17] Patel N，Chong KW，Yip A，et al. Use of multiple epinephrine doses in anaphylaxis：a systematic review and meta-analysis [J]. J Allergy Clin Immunol，2021，148（5）：1307-1315.

（收稿日期：2023-08-09；修回日期：2023-10-02）

研究论文

香青兰总黄酮通过调控 TGF-β/BMP 信号通路对肺动脉高压大鼠的保护作用

张钰朋[1]，杨涛[1, 2]，方磊[1]，伊力亚尔·尼加提[2]，达力娅·沙那哈提[1]，艾尼娃尔·艾克木[1, 3, 4, 5*]
（1. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011；2. 新疆医科大学中心实验室，乌鲁木齐 830011；3. 新疆维吾尔医学专科学校，新疆 和田 848099；4. 新疆和田特色中医药研究重点实验室，新疆 和田 848099；5. 新疆维吾尔自治区维吾尔药材及制剂质量控制工程研究中心，新疆 和田 848099）

摘要：目的 通过野百合碱诱导的肺动脉高压（PH）大鼠模型，探讨香青兰总黄酮（DMTF）对 PH 大鼠的保护作用及作用机制。**方法** 建立野百合碱诱导的 PH 大鼠模型，采用超声法检测大鼠心脏功能，观察肺的病理变化并评估 PH 的发展状态以及肺血管重构程度。使用 ELISA 法检测血清相关指标，评价 DMTF 抗炎、抗氧化应激能力；使用 Western blot 法检测 BMPR2、TGF-β1、Smad1/5/8、p-Smad1/5/8、Smad2/3 和 p-Smad2/3 的蛋白表达。通过低氧诱导肺动脉平滑肌细胞（PASMCs）增殖模型，并用 CCK-8 法检测细胞增殖能力；使用流式细胞术检测细胞周期及凋亡，并采用 Western blot 法检测 BMPR2、TGF-β1、Smad1/5/8、p-Smad1/5/8、Smad2/3 和 p-Smad2/3 的蛋白表达。**结果** 心脏超声和病理检查结果显示，PH 大鼠平均肺动脉压力（mPAP）显著升高，血管壁增厚，α-SMA 表达增加，血清中 ET-1、IL-1β、IL-6、TNF-α 和 MDA 含量升高，SOD、GSH-Px 和 NO 含量降低（$P < 0.05$）。DMTF 药物干预后降低 mPAP，并减轻或延缓肺动脉血管重构；升高血清 SOD、GSH-Px 和 NO 含量，降低 ET-1、IL-1β、IL-6、TNF-α 和 MDA 含量；下调 PH 大鼠肺组织中 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白的表达，并上调 BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白的表达（$P < 0.05$）。CCK-8 和流式细胞术结果显示 DMTF 抑制了低氧诱导的 PASMCs 过度增殖，并下调 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白的表达，上调 BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白的表达（$P < 0.05$）。**结论** DMTF 可降低肺动脉压，改善肺血管重构，对 PH 大鼠具有一定的保护作用，其机制可能与抑制炎症反应、减轻氧化应激反应和调节 TGF-β/BMP 信号通路有关。

关键词：香青兰总黄酮；肺动脉高压；骨形态发生蛋白受体 2；转化生长因子 -β1
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0834-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.003

Protective effect of total flavones in *Dracocephalum Moldavica* L. on pulmonary hypertension in rats via modulation of TGF-β/BMP signaling pathway

ZHANG Yu-peng[1], YANG Tao[1, 2], FANG Lei[1], Yiliyaer Nijiati[2], Daliya Shanahati[1], Ainiwaer Aikemu[1, 3, 4, 5*]
(1. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 2. *Central Laboratory*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 3. *College of Xinjiang Uyghur Medicine*, *Heton Xinjiang* 848099; 4. *Xinjiang Key Laboratory of Hotan Characteristic Chinese Traditional Medicine Research*, *Heton Xinjiang* 848099; 5. *Engineering Research Center for Quality Control of Uyghur Medicinal Materials and Preparations*, *Xinjiang Uyghur Autonomous Region*, *Heton Xinjiang* 848099)

基金项目：中国医学科学院阜外医院心血管疾病国家重点实验室开放课题（No.2022KF-05）；和田地区本级科技计划项目（No.202312）。
作者简介：张钰朋，男，在读硕士研究生，主要从事慢性高原病机制研究，email：447530326@qq.com *通信作者：艾尼娃尔·艾克木，男，博士研究生导师，主要从事药物质量控制与评价研究和慢性高原病机制及药物研究，email：ainiwa@sina.com

Abstract: Objective To establish the rat model of pulmonary hypertension (PH) induced by monocrotaline and to determine the protective effect and mechanism of action of total flavone in *Dracocephalum Moldavica* L. (DMTF) on PH rats. **Methods** After the establishment of a monocrotaline-induced PH rat model, the cardiac function of rats was determined by ultrasound. The pathological changes in the lung were observed to evaluate the development of PH and the degree of pulmonary vascular remodeling. The serum nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined by ELISA, and bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), Smad2/3 and p-Smad2/3 were determined by Western blot. The proliferation model of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) was induced by hypoxia in vitro, and the cell proliferation ability was determined by CCK-8 method. The cell cycle and apoptosis were detected with flow cytometry, and the protein expression levels of BMPR2, TGF-β1, Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, Smad2/3, and p-Smad2/3 were determined by Western blot. **Results** Echocardiography and pathology showed significantly increased mean pulmonary artery pressure (mPAP) of the PH rats, thickened vascular walls, increased α-SMA expression, elevated serum content of ET-1, IL-1β, IL-6, TNF-α and MDA, and lowered the content of SOD, GSH-Px and NO (P ＜ 0.05). DMTF intervention reduced mPAP, alleviated/delayed pulmonary artery vascular remodeling, elevated the serum content of SOD, GSH-Px and NO, and lowered the content of ET-1, IL-1β, IL-6, TNF-α and MDA, down-regulated the protein expression of TGF-β1 and p-Smad2/3 in the lung tissue of PH rats, and upregulated the protein expression of BMPR2 (P ＜ 0.05). CCK-8 and flow cytometry showed that DMTF inhibited hypoxia-induced hyperproliferation of PASMCs, reduced the protein expression of TGF-β1, p-Smad2/3, and promoted the protein expression of BMPR2 and p-Smad1/5/8 (P ＜ 0.05). **Conclusion** DMTF can reduce the pulmonary artery pressure and improve pulmonary vascular remodeling. The mechanism of protective effect on PH rats may be related to inhibiting inflammation, alleviating oxidative stress reactions and regulating the TGF-β/BMP signaling pathway.

Key words: total flavone in *Dracocephalum Moldavica* L.; pulmonary hypertension; BMPR2; TGF-β1

肺动脉高压（pulmonary hypertension，PH）是一种复杂的心血管疾病，主要病理改变是肺动脉平滑肌细胞异常增殖、内皮细胞损伤，导致肺动脉持续性异常收缩，引起肺血管重构和肺动脉压力升高，随着疾病的发生发展最终导致心力衰竭甚至死亡[1-4]。流行病学调查发现，PH 在一般人群中的患病率达 1%，在 65 岁以上人群中患病率达 10%，并且 PH 的预后较差[5]。PH 的发生发展涉及多种复杂机制，是多因素多环节共同作用的结果。血管重构、炎症反应、氧化应激与基因调控等途径共同促进 PH 的发展[6-8]。转化生长因子-β（TGF-β）信号通路参与许多细胞过程，包括细胞生长、分化、细胞迁移、侵袭和细胞外基质重塑，在 PH 的发生发展过程中扮演着重要角色[9-10]。现有研究发现，TGF-β/BMP 信号通路参与了肺血管重构的过程[11]。作为 TGF-β 超家族的成员，骨形态发生蛋白受体 2（BMPR2）是首个被克隆发现的 PH 致病基因[12]。TGF-β 与骨形态发生蛋白（BMP）之间的信号失衡是 PH 发生发展中的重要因素之一。目前，临床上用于治疗 PH 的药物，如西地那非、内皮素受体拮抗剂等靶向药物，主要是通过阻断内皮素与受体结合，抑制异常激活的内皮素系统或抑制细胞增殖等，减缓肺血管收缩，减轻 PH 相关症状，但作用目标单一，使用有局限性[13-16]。Benza 等[17]的调查结果显示，靶向治疗的 PH 患者，5 年的生存率仅为 57%。

天然产物是药物发现的重要来源之一，与临床应用中的靶向药物相比，中药活性成分复杂，具有多成分、多机制、多靶点的特点。香青兰（*Dracocephalum Moldavica* L.）是唇形科青兰属植物，在中医药中有着悠久的使用历史，并具有确切的治疗心脑血管疾病的效果[18]。香青兰富含丰富的黄酮类成分，如田蓟苷[19]、木犀草素[20]、芹菜素[21]等，具有抗炎、抗氧化、抗增殖等药理活性并对改善缺血再灌注损伤、低氧损伤具有较好的作用。通过前期研究发现，香青兰总黄酮（DMTF）对缺氧导致的慢性高原病具有较好的保护作用，可以降低肺动脉压，缓解心脏损伤，降低氧化应激水平等，表现出良好的应用前景[22-24]。

DMTF 对 PH 的治疗作用尚不明确，本实验通过建立 PH 大鼠模型，研究 DMTF 对 PH 的治疗作用，探讨 DMTF 发挥对 PH 的治疗作用与 TGF-β/BMP 信号通路之间的关系。

1　材料

1.1　实验动物和细胞

SPF 级 SD 大鼠 60 只，雄性，体重（200±20）g，购于新疆医科大学实验动物中心 [动物许可证号：SYSK（新）2020-003]；大鼠肺动脉平滑肌细胞株（PASMCs）由新疆医科大学中心实验室惠赠。本实验经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准（伦理批件号：IACUC-20200309-187）。

1.2　试药

DMTF（实验室自制，纯度＞ 85%）；木犀草素、芹菜素、金合欢素、田蓟苷（纯度均为 98%，上海源叶生物科技有限公司）；野百合碱（纯度：98%，美国 MedChemExpress 公司）；西地那非（辉瑞制药有限公司）；白细胞介素 1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素 6（IL-6）、内皮素 -1（ET-1）、超氧化物歧化酶（SOD）、一氧化氮（NO）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、丙二醛（MDA）测定试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司）；增强型 RIPA 裂解液、广谱磷酸酶抑制剂、广谱蛋白酶抑制剂（武汉博士德公司）；BCA 蛋白定量试剂盒（北京聚合美公司）；抗 BMPR2 抗体（美国 Abcam 公司）；抗 Smad2/3 抗体、抗 p-Smad2/3 抗体、抗 TGF-β1 抗体、抗 β-actin 抗体（北京 Affinity 公司）；CCK-8 细胞增殖检测试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）；胎牛血清（FBS，美国 Gibco 公司）；原代平滑肌细胞基础培养基、细胞生长因子、青霉素 - 链霉素双抗（上海赛百慷公司）；0.25% 胰酶（美国 HyClone 公司）；二甲基亚砜（DMSO，美国 BIOFROXX 公司）。

1.3　仪器

超高效液相色谱 / 四极杆串联飞行时间质谱仪（Waters XEVO G2-XS QTOF，美国 Waters 公司）；万分之一电子分析天平（MS105DU，瑞士 METTLER TOLEDO 公司）；四维超声诊断仪（HD11XE）、心脏超声探头（S12-4）（美国 PHILIPS 公司）；酶标仪（Thermo Multiskan GO，美国 Thermo 公司）；小型垂直电泳转印系统（Mini-PROTEAN Tetra Cell，美国 Bio-Rad 公司）；化学发光凝胶成像仪（FluorChem E，美国 Protein Simple 公司）；低温高速离心机（Allegra-64R，美国 Beckman Coulter 公司）。

2　方法与结果

2.1　DMTF 的提取及含量测定

2.1.1　DMTF 的提取　取适量香青兰粉末，用 25 倍体积 45% 乙醇在 65 ℃下回流提取两次，每次 3 h，过滤，减压回收乙醇。将提取液以 0.6 BV • h^{-1} 的速度通过大孔吸附树脂柱，先用蒸馏水洗脱，再用 45% 乙醇洗脱，并收集洗脱液，浓缩干燥得 DMTF 提取物。

2.1.2　溶液的配制　称取适量香青兰提取物，加 70% 甲醇定容，制成 1 mL 含香青兰提取物 0.13 mg 的供试品储备液。称取金合欢素、田蓟苷、芹菜素、木犀草素对照品，分别置于 10 mL 量瓶中，加 70% 甲醇定容，制成 1 mL 含金合欢素 0.12 mg、田蓟苷 0.11 mg、芹菜素 0.14 mg、木犀草素 0.10 mg 的对照品储备液。

2.1.3　色谱条件

① 液相条件：色谱柱为 Acquity UPLC BEH C18 柱（1.7 μm，50 mm×2.1 mm，Waters），流动相为 A 为 1% 甲酸水溶液，B 为乙腈；流速为 0.3 mL • min^{-1}，梯度洗脱（0 ～ 1 min，5%B；1 ～ 1.5 min，5% ～ 10%B；1.5 ～ 5 min，10% ～ 21%B；5 ～ 8 min，21% ～ 90%B；8 ～ 10 min，90%B；10 ～ 10.5 min，90% ～ 5%B）。

② 质谱条件：电离方式 ESI（＋ / －），雾化气温度 250 ℃，雾化气气流 14 L • min^{-1}，鞘气温度 300 ℃，鞘气气流 11 L • min^{-1}。

2.1.4　含量测定　采用液相色谱 - 质谱联用技术对 DMTF 中的金合欢素、田蓟苷、芹菜素、木犀草素进行含量测定，结果见图 1、表 1。

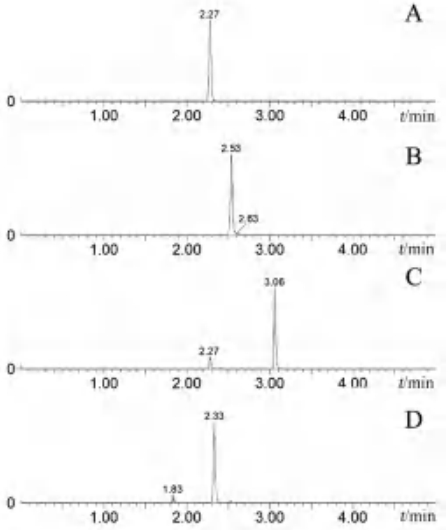


图 1　香青兰总黄酮提取物中代表性黄酮类化合物的色谱图

Fig 1　Chromatogram of representative flavonoids in extract *Dracocephalum moldavica* L.

A. 正离子模式下的金合欢素（acacetin in positive ion mode）；B. 正离子模式下的田蓟苷（tilianin in positive ion mode）；C. 负离子模式下的芹菜素（apigenin in negative ion mode）；D. 负离子模式下的木犀草素（luteolin in negative ion mode）

表 1　香青兰提取物中主要黄酮成分的含量

Tab 1　Content of the main flavonoids in extract *Dracocephalum moldavica* L.

化合物	分子式	含量 /%
田蓟苷	$C_{22}H_{22}O_{10}$	9.9
金合欢素	$C_{16}H_{12}O_5$	0.4
木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	0.3
芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	0.1

2.2　动物分组及 PH 大鼠模型建立

60 只雄性 SD 大鼠，随机抽取 50 只，皮下注射野百合碱（monocrotaline，MCT）60 mg • kg^{-1} 构建 PH 模型，通过大鼠心脏超声检测，计算大鼠肺动脉压力（mPAP），mPAP ＞ 25 mmHg 视为大鼠 PH 模型建立。

将 50 只 PH 模型大鼠随机分为模型组（MCT 组），西地那非组 [给予西地那非 30 mg/（kg • d）]，DMTF 低、中、高剂量组（分别给予 DMTF 100、200、400 mg • kg^{-1}），连续给药 15 d。对照组和模型组给予相同体积的生理盐水。

2.3　大鼠心脏超声检查

大鼠麻醉后，在固定台上进行胸前备皮。采用多普勒彩色超声仪探查各组大鼠心脏上的结构变化：包括 SD 大鼠肺动脉血流加速时间（PAAT）、肺动脉射血时间（PET）、肺动脉内径（PA）、右心室前壁（RVAW）及结构变化等，观察心脏运动状态，测量并记录相关参数。

结果如图 2 所示，与对照组相比，模型组 RVAW 明显增厚，PAAT 减少，PET 增加，PA 增宽（$P < 0.05$）；与模型组大鼠比较，给予不同剂量 DMTF 干预后 RVAW 厚度变薄，PAAT 增加，PET 减少，PA 降低（$P < 0.05$）。

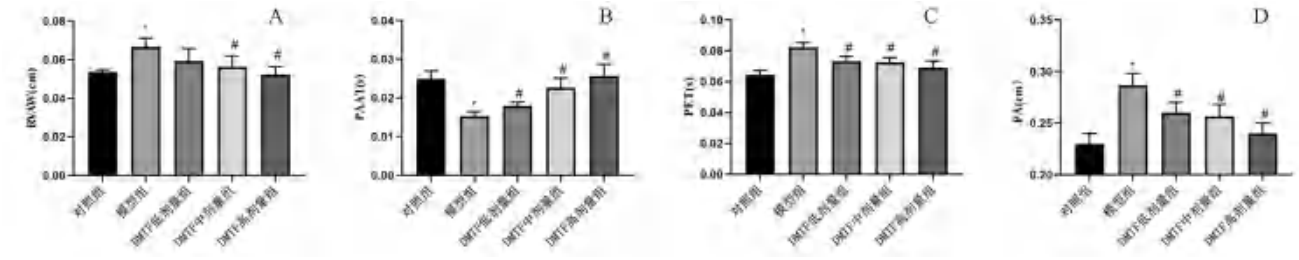


图 2　DMTF 对 PH 大鼠心脏中各指标的影响

Fig 2　Effect of DMTF on the indexes of heart in PH rats

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

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

如图 3 所示，根据大鼠心脏超声检测结果推算 mPAP（mPAP ＝ － 1.84PAAT ＋ 82.1）[25]。与对照组大鼠相比，模型组大鼠 mPAP 明显升高（$P < 0.05$），表明大鼠 PH 模型构建成功；给予不同剂量 DMTF 干预后 mPAP 降低（$P < 0.05$），表明 DMTF 对 PH 模型大鼠具有保护作用。

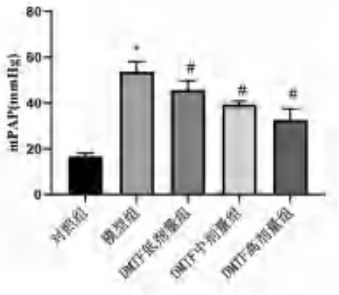


图 3　PH 大鼠肺动脉压力变化

Fig 3　Changes in pulmonary artery pressure in PH rats

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

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

2.4　血液指标检测

各组大鼠麻醉后通过腹主动脉取血，将全血静置 2 h 后 4000 r•min^{-1} 离心 10 min，取上清液备用。采用 ELISA 试剂盒测定大鼠血清中 NO、ET-1、IL-1β、IL-6、GSH-Px、MDA、SOD 以及 TNF-α 含量。

如图 4 所示，与对照组相比，模型组大鼠血清中 ET-1、IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA 含量增加（$P < 0.05$），NO 浓度降低、SOD、GSH-Px 酶活性降低（$P < 0.05$），给予 DMTF 干预后，各剂量组均有不同程度的改善作用（$P < 0.05$）。

2.5　组织病理学观察

2.5.1　大鼠肺组织形态检测　取各组大鼠肺组织，放入 10% 甲醛溶液固定、脱水、透明、包埋。将石蜡包埋组织块切成 5 μm 薄片，进行 HE 染色。采用血管壁面积百分比（WA%）和血管壁厚度百分比（WT%）来表明肺组织小动脉的重构增殖程度。结果如图 5、6 所示，与对照组相比，模型组大鼠肺组织 WA%、WT% 显著增加（$P < 0.05$）。给予西地那非和不同剂量 DMTF 干预后，大鼠肺血管的 WA%、WT% 降低（$P < 0.05$）。

2.5.2　免疫组化检测大鼠肺组织 α-SMA 表达水平　将肺组织石蜡块切片脱蜡至水，抗原修复后进行封闭，加入稀释好的一抗工作液（α-SMA），4 ℃条件下反应 12 h。滴加辣根过氧化物酶标记二抗 30 min 后滴加 DAB 显色，最后用苏木素复染。在光学显微

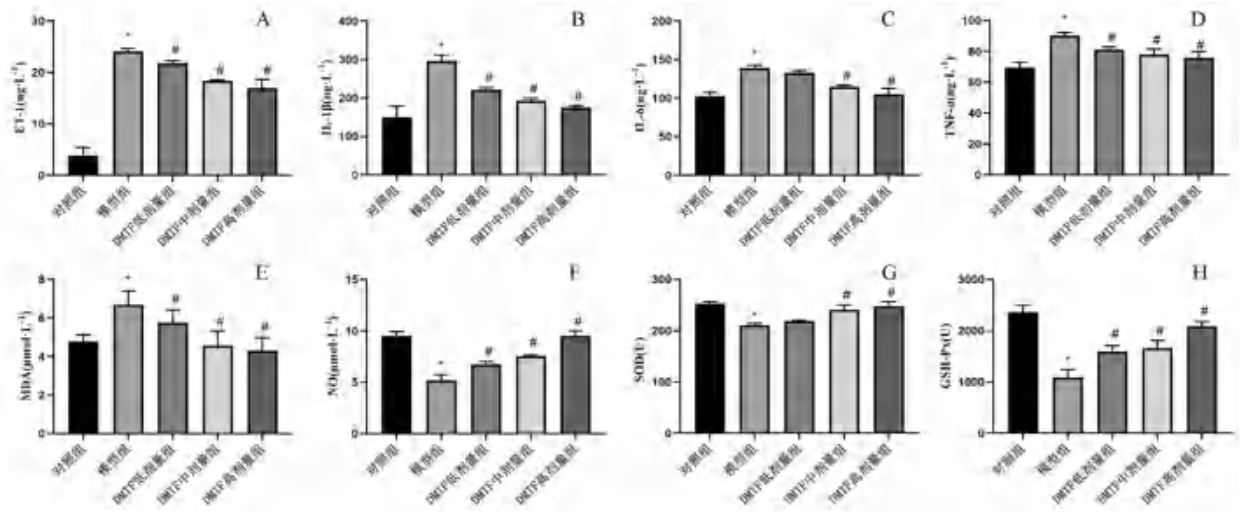


图 4　DMTF 对 PH 大鼠血清相关指标的影响

Fig 4　Effect of DMTF on the related indexes in PH rat serum

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

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

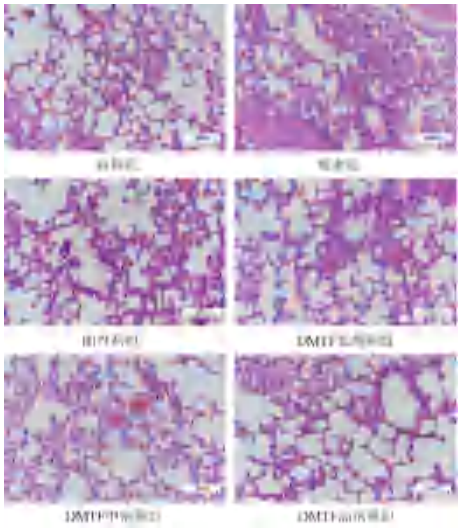


图 5　PH 大鼠肺组织 HE 染色（×200）

Fig 5　HE staining of PH rat lung tissue（×200）

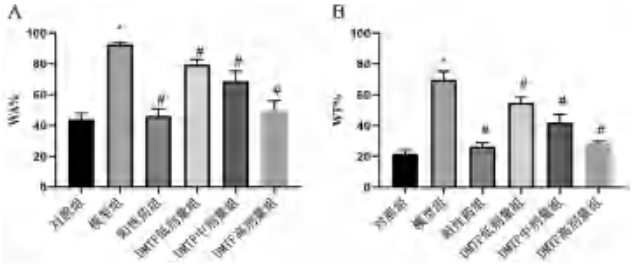


图 6　DMTF 对 PH 大鼠肺血管重构的影响

Fig 6　DMTF effectively alleviates pulmonary vascular remodeling in PH rats

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

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

镜下观察并使用半定量评分系统进行描述。结果如图 7、8 所示，观察肺组织免疫组化染色结果，通过 α-SMA 的表达水平反映中膜平滑肌肥大、增生程度。与对照组相比，模型组中 α-SMA 的表达水平显著增加（$P < 0.05$），给予西地那非和不同剂量 DMTF 药物干预后，α-SMA 的表达水平显著降低（$P < 0.05$）。

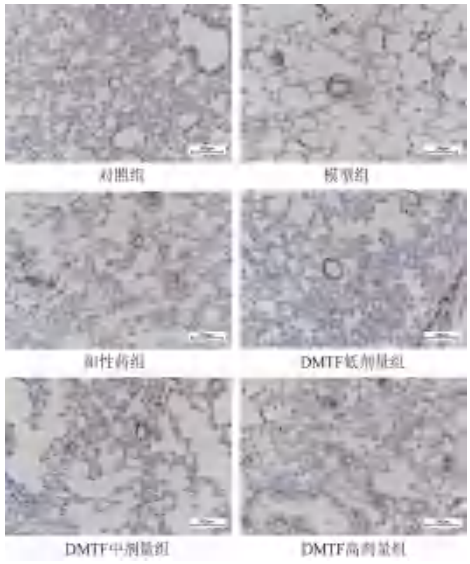


图 7　免疫组化检测 PH 大鼠肺组织中 α-SMA 表达水平（×200）

Fig 7　α-SMA expression level determined by immunohistochemical in the lung tissue in PH rats（×200）

2.6　Western blot 检测肺组织蛋白表达

组织蛋白加入 RIPA 裂解液研磨后，BCA 法进行蛋白定量。将蛋白与 Loading Buffer 混合后金属浴 100 ℃ 变性 10 min，再经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭。分别加入抗 BMPR2 抗体（1∶1000）、抗 Smad1/5/8 抗体（1∶1000）、抗 p-Smad1/5/8 抗体（1∶1500）、抗 TGF-β1 抗体（1∶2000）、抗 Smad2/3 抗体（1∶2000）、抗 p-Smad2/3 抗体（1∶2000）、抗 β-actin 抗体（1∶20 000），4 ℃孵育 12 h，室温孵育相

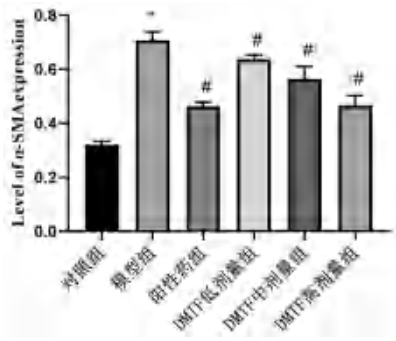


图 8　PH 大鼠肺组织中 α-SMA 的表达水平

Fig 8　α-SMA expression levels in the lung tissue in PH rats

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

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

应二抗 1 h。采用 ECL 化学发光显影后，Image J 软件分析蛋白条带，蛋白表达水平均以相对表达量表示。

如图 9 所示，与对照组大鼠比较，模型组大鼠肺组织中 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达上升，BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白表达下降（$P < 0.05$）。与模型组比较，给予不同剂量 DMTF 干预后，各剂量组肺组织中 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达下降，BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白表达上升（$P < 0.05$）。

2.7　细胞培养、造模及分组

PASMCs 在含 10% FBS、1% 青霉素 - 链霉素双抗、1% 细胞生长因子培养体系中培养。将细胞分为对照组、模型组、DMTF 药物干预组（200 μg•mL^{-1}），模型组和 DMTF 药物干预组在 5%O_2

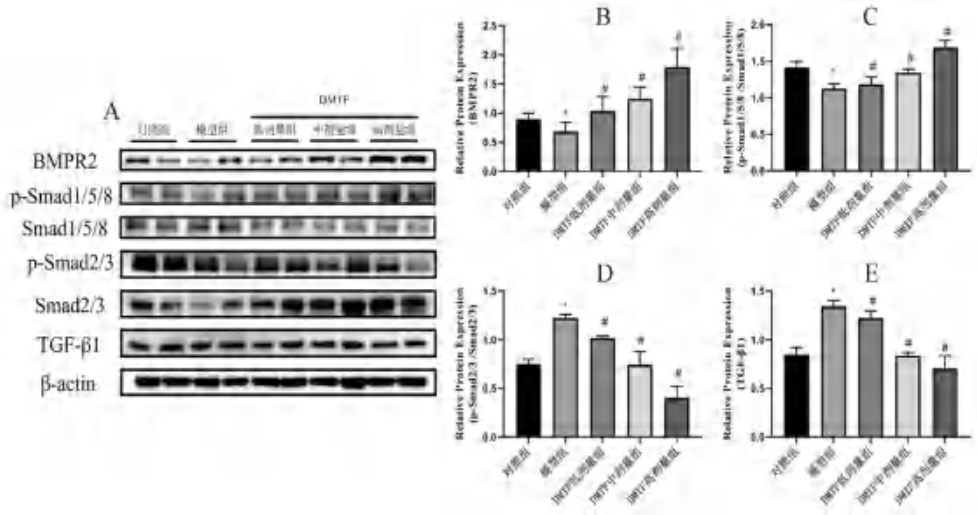


图 9　DMTF 对 PH 大鼠肺组织蛋白表达影响

Fig 9　Effect of DMTF on the protein expression in the lung tissue in PH rats

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

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

培养箱中进行缺氧 48 h 处理。

2.8　CCK-8法检测细胞活力

取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板，培养贴壁。模型组、给药组置于 5%O_2 培养箱中低氧处理 48 h，给药组中加入不同浓度的 DMTF。48 h 后弃去培养基，每孔加入 100 μL 含 CCK-8 培养基孵育 2 h，酶标仪检测 450 nm 波长处各孔吸光度（OD）值，细胞活力＝[（$OD_{实验孔}$－$OD_{空白孔}$）/（$OD_{对照孔}$－$OD_{空白孔}$）]×100%。

结果如图 10 所示，与对照组相比，模型组的 PASMCs 增殖效果明显（$P < 0.05$）。与模型组相比，给予 DMTF 干预后，细胞增殖减少（$P < 0.05$）。结果表明，DMTF 能够抑制缺氧引起的 PASMCs 增殖，并呈现出剂量依赖性，其中 DMTF 质量浓度为 200 μg • mL^{-1} 时效果最显著，后续实验均采用 DMTF 质量浓度为 200 μg • mL^{-1}。

2.9　流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡

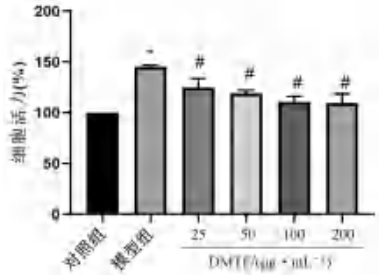


图 10　DMTF 对 PASMCs 活力的影响

Fig 10　Effect of DMTF on the viability of PASMCs

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

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

收集对数生长期细胞并将其接种到培养皿中并培养以进行壁附着。模型组和给药组置于 5%O_2 培养箱中缺氧处理 48 h，给药组接受 DMTF 干预。48 h 后收集细胞，用预冷的 PBS 洗涤两次，分别使用 PI 染色液和 Annexin V-FITC/PI 凋亡测定试剂盒染

色，并通过流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率。

与对照组相比，模型组 PASMC 的 S 期比值升高，G_2/M 期比值降低（$P < 0.05$），而 DMTF 的干预则逆转了这一趋势（见图 11）。模型组 PASMCs 凋亡率明显降低（$P < 0.05$），给予 DMTF 干预后，细胞凋亡率升高（$P < 0.05$）。结果表明，DMTF 能够抑制缺氧引起的 PASMCs 增殖（见图 12）。

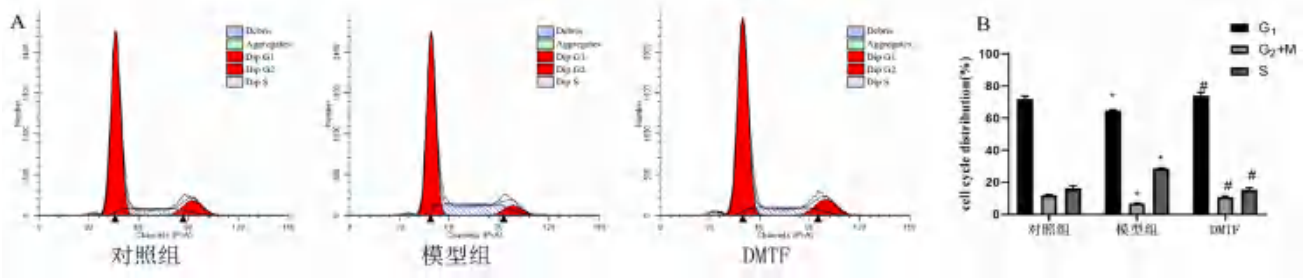


图 11　流式细胞术检测细胞周期分布

Fig 11　Cell cycle distribution by flow cytometry

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

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

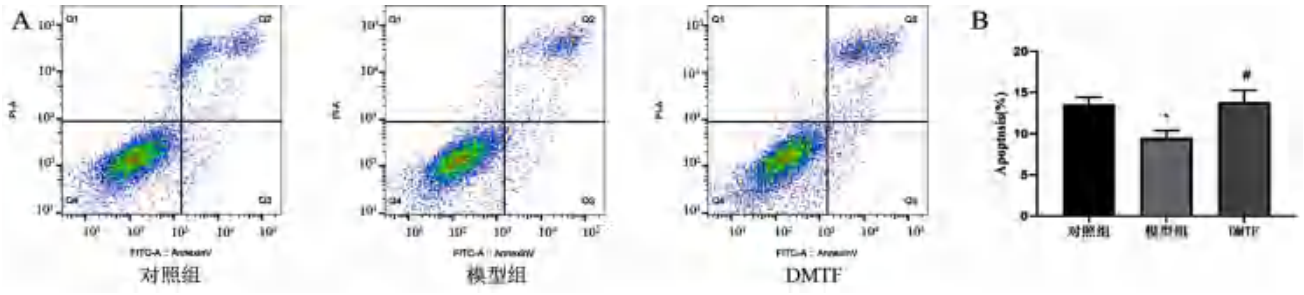


图 12　DMTF 对 PASMCs 凋亡的影响

Fig 12　Effect of DMTF on the apoptosis of PASMCs

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

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

2.10　Western blot 检测 PASMCs 蛋白表达

细胞蛋白加入 RIPA裂解液裂解，BCA 法进行蛋白定量。将蛋白与 Loading Buffer 混合后金属浴 100 ℃变性 10 min。变性后的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭。分别加入抗 BMPR2 抗体（1∶1000 稀释）、抗 TGF-β1 抗体（1∶1500）、抗 Smad1/5/8 抗体（1∶1000）、抗 p-Smad1/5/8 抗体（1∶1500）、抗 Smad2/3 抗体（1∶2000）、抗 p-Smad2/3 抗体（1∶2000）、抗 β-actin 抗体（1∶20 000 稀释），4 ℃孵育 12 h，室温孵育相应二抗 1 h。采用 ECL 化学发光显影后，Image J 软件分析蛋白条带，蛋白表达水平均以相对表达量表示。

如图 13 所示，与对照组相比，模型组 PASMCs 的 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达增加，BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白表达下调（$P < 0.05$）。给予 DMTF 干预后，TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达下调，BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白表达上升（$P < 0.05$）。

2.11　统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析，GraphPad Prism 8.2 软件进行图形绘制。以 $\bar{x} \pm s$ 表示实验结果数据。多组间比较采用 One-way ANOVA 检验，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　讨论

PH 是由多因素、多机制引起的以 mPAP 升高为主要临床症状的一种心血管疾病，肺血管重构是 PH 的主要病理特征之一。在 PH 的发生发展过程中，抑制细胞凋亡，促进增殖，导致肺血管重构以及 mPAP 升高[26]。其中 PASMCs 过度增殖是肺血管重构的最主要因素之一，PASMCs 异常增殖和分化，导致血管平滑肌细胞肥大、血管壁增厚、血管内直径变窄和血流灌注阻力增加，最终导致肺动脉重构[27]。因此 PASMCs 的增殖和凋亡失衡在肺血管重构的发生、发展过程中起关键性作用。本研究旨在阐明 DMTF 对 PH 的保护作用及其潜在的治疗机制。结果显示，模型组大鼠 mPAP 明显升高，肺组织 WA%、WT% 明显增加，心脏组织中可见心肌细胞排列紊乱、心肌间质血管明显扩张充血，偶见炎性细胞浸润，同时免疫组化结果显示模型组大鼠肺组织中的 α-SMA 表达水平明显增高，表明已成功构建 MCT 诱导的 PH 模型大鼠。给予不同剂量 DMTF

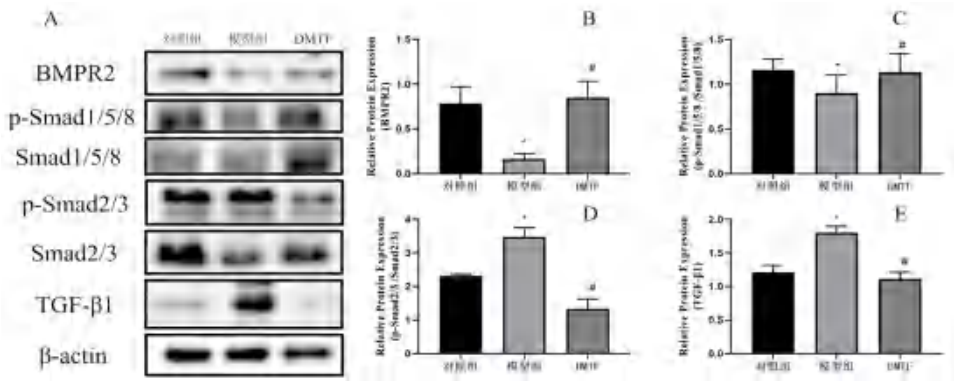


图 13　DMTF 对 PASMCs 蛋白表达的影响

Fig 13　Effect of DMTF on the expression of PASMCs protein

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

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

干预后，mPAP 降低，肺组织 WA%、WT% 下降，表明 DMTF 可以降低 PH 模型大鼠的肺动脉压力，缓解肺血管重构，对 PH 模型大鼠具有保护作用。同时体外实验结果显示，DMTF 药物干预后可以抑制 PASMCs 过度增殖，表明 DMTF 可能通过抑制 PASMCs 的过度增殖和纤维化减缓肺血管重构。

在 PH 的发生发展过程中，炎症反应和氧化应激同样重要。炎症因子是由免疫细胞产生和分泌的一系列化学因子，在 PH 病程发展中起着重要的作用且炎症因子的血液指标对 PH 的诊断和治疗有着重要意义 [28]。伴随着 PH 的发生发展，体内的炎症反应便会启动，表现为炎性细胞浸润以及炎症因子的分泌增加 [29]，激活细胞外调节蛋白激酶诱导 PASMCs 的增殖，引发肺血管重构 [30]。氧化应激是指机体组织或细胞内的氧自由基生成增加或清除能力降低，导致活性氧（ROS）在组织、细胞中积聚引起的氧化损伤过程。由于 ROS 积聚过多，不能被 SOD、GSH-Px 完全分解，引发氧化应激，导致血管壁中的氧化、抗氧化平衡受损，促进血管收缩、平滑肌细胞增殖和血管重构 [31]。实验结果显示，PH 模型大鼠血清中 ET-1、IL-1β、IL-6、TNF-α、SOD、GSH-Px 表达升高，NO、MDA 表达降低，给予 DMTF 预防性干预后逆转了这一趋势，表明 DMTF 可能通过抑制 PH 大鼠炎症反应和氧化应激状态，降低 PH 大鼠肺动脉压力。

TGF-β 和 BMP 之间的信号调控失衡是导致肺血管重构发生重要因素。TGF-β 细胞因子在正常组织损伤后诱导重要的修复过程，异常表达的 TGF-β1 会促使 PASMCs 异常增殖最终导致血管重塑化、纤维化，是 PH 发展过程中的重要机制之一 [32-33]。作为 BMP 的受体，BMPR2 表达下调会破坏 BMP 信号通路正常调控 PASMCs 增殖、分化、迁移与凋亡活动 [34]。因此，BMP 信号通路抑制被认为是引发 PH 的重要机制之一。本实验结果显示，模型组大鼠肺组织中 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达升高，BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白表达降低，给予不同剂量 DMTF 干预后 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达降低，BMPR2、p-Smad1/5/8 蛋白表达升高。同时在体外实验低氧诱导的 PASMCs 增殖模型中 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达水平增高，BMPR2、p-Smad1/5/8 表达水平降低，给予 DMTF 干预后逆转了这些改变，提示 DMTF 对 PH 的治疗作用可能与 TGF-β/BMP 信号通路的调控有关。

4　结论

综上所述，DMTF 可以降低 PH 大鼠的 mPAP，减缓肺血管重构并抑制炎症和氧化应激反应，具有潜在的治疗 PH 的作用。BMPR2 作为 DMTF 治疗 PH 的潜在靶点，这些效应可能与 TGF-β/BMP 信号通路的调控有关。

参考文献

[1] Mirrakhimov AE，Strohl KP. High-altitude pulmonary hypertension：an update on disease pathogenesis and management [J]. Open Cardiovasc Med J，2016，10：19-27.

[2] Machado RD，Southgate L，Eichstaedt CA，et al. Pulmonary arterial hypertension：a current perspective on established and emerging molecular genetic defects [J]. Hum Mutat，2015，36（12）：1113-1127.

[3] Chai TC，Qiu C，Xian ZH，et al. A narrative review of research advances in hypoxic pulmonary hypertension [J]. Ann Transl Med，2022，10（4）：230.

[4] Arriaza K，Cuevas C，Pena E，et al. Impact of zinc on oxidative signaling pathways in the development of pulmonary vasoconstriction induced by hypobaric hypoxia [J]. Int J Mol Sci，2022，23（13）：6974.

[5] Hoeper MM，Humbert M，Souza R，et al. A global view of pulmonary hypertension [J]. Lancet Resp Med，2016，4（4）：306-322.

[6] Pu X，Lin X，Duan X，et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress responses to chronic high-altitude exposure during

the development of high-altitude pulmonary hypertension [J]. High Alt Med Biol，2020，21（4）：378-387.
[7] Chen J，Wang YX，Dong MQ，et al. Reoxygenation reverses hypoxic pulmonary arterial remodeling by inducing smooth muscle cell apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction [J]. J Am Heart Assoc，2017，6（6）：e005602.
[8] Zhang HH，Zhao J，Lu QD，et al. Luteolin improves cyclophosphamide-induced cystitis through TXNIP/NLRP3 and NF-kappab pathways [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：1718709.
[9] Tie Y，Tang F，Peng DD，et al. TGF-beta signal transduction：biology，function and therapy for diseases [J]. Mol Biomed，2022，3（1）：45.
[10] Ojiaku CA，Yoo EJ，Panettieri RA，JR. Transforming growth factor beta1 function in airway remodeling and hyperresponsiveness. The missing link? [J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2017，56（4）：432-442.
[11] Sharmin N，Nganwuchu CC，Nasim MT. Targeting the TGF-beta signaling pathway for resolution of pulmonary arterial hypertension [J]. Trends Pharmacol Sci，2021，42（7）：510-513.
[12] Van DIJK RA，Engels CC，Schaapherder AF，et al. Visualizing TGF-β and BMP signaling in human atherosclerosis：a histological evaluation based on Smad activation [J]. Histol Histopathol，2012，27（3）：387-396.
[13] Avitabile CM，Vorhies EE，Ivy DD. Drug treatment of pulmonary hypertension in children [J]. Paediatr Drugs，2020，22（2）：123-147.
[14] Zhang Y，Xu CB. The roles of endothelin and its receptors in cigarette smoke-associated pulmonary hypertension with chronic lung disease [J]. Pathol Res Pract，2020，216（9）：153083.
[15] Liu HL，Pan ZH，Ma XD，et al. Rock inhibitor fasudil reduces the expression of inflammatory factors in LPS-induced rat pulmonary microvascular endothelial cells via ROS/NF-kappab pathway [J]. BMC Pharmacol Toxicol，2022，23（1）：24.
[16] Ivy DD. Prostacyclin in the intensive care setting [J]. Pediatr Crit Care Med，2010，11（2 Suppl）：S41-S45.
[17] Benza RL，Miller DP，Barst RJ，et al. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the reveal registry [J]. Chest，2012，142（2）：448-456.
[18] Li SJ，Su WL，Xu L，et al. Study of the protective effect of total flavonoids of *Dracocephalum Moldavica* L. on doxorubicin induced injury in huvecs based on VEGF-b/AMPK pathway [J]. Chinese Pharmacological Bulletin，2022，38（5）：726-732.
[19] Jang W，Zhang W，Zhang YX，et al. Tilianin extracted from xiangqinglan inhibits apoptosis induced by mitochondrial pathway and endoplasmic reticulum stress in H9C2 cells after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine，2023，43（1）：42-50.
[20] Si H，Wyeth RP，Liu D. The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation [J]. Eur J Nutr，2014，53（1）：269-275.
[21] Wang ZL，Chen Y，Xu DL. Apigenin protects myocardium by inhibiting the TGF-beta（1）-mediated Smad signaling transduction pathway in acute myocardial infarcted rats [J]. J Funct Foods，2017，30：48-55.
[22] Maimaiti A，Yang T，Wang MM，et al. Improvement of total flavonoids from *Dracocephalum Moldavica* L. in rats with chronic mountain sickness through ^{1}H-NMR metabonomics [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：6695346.
[23] 艾海旦·阿布都瓦依提 . 基于 iTRAQ 蛋白质组学的香青兰总黄酮对慢性高原病大鼠的改善作用研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2022.
[24] Maimaitiyiming D，Hu GM，Aikemu A，et al. The treatment of uygur medicine *Dracocephalum Moldavica* L. on chronic mountain sickness rat model [J]. Pharmacogn Mag，2014，10（40）：477-482.
[25] Koskenvuo JW，Mirsky R，Zhang Y，et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model [J]. Int J Cardiovasc Imaging，2010，26（5）：509-518.
[26] Blum JI，Bijli KM，Murphy TC，et al. Time-dependent ppargamma modulation of HIF-1alpha signaling in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Am J Med Sci，2016，352（1）：71-79.
[27] Su J，Xu HT，Yu JJ，et al. Luteolin ameliorates hypertensive vascular remodeling through inhibiting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2015，2015：364876.
[28] Rabinovitch M，Guignabert C，Humbert M，et al. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. Circ Res，2014，115（1）：165-175.
[29] Liu JJ，Cai GX，Li MX，et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension by upregulating pparγ expression and suppressing inflammatory cytokine levels [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，504（2）：478-484.
[30] Siques P，Pena E，Brito J，et al. Oxidative stress，kinase activation，and inflammatory pathways involved in effects on smooth muscle cells during pulmonary artery hypertension under hypobaric hypoxia exposure [J]. Front Physiol，2021，12：690341.
[31] Acosta MF，Muralidharan P，Grijalva CL，et al. Advanced therapeutic inhalation aerosols of a Nrf2 activator and Rhoa/Rho kinase（rock）inhibitor for targeted pulmonary drug delivery in pulmonary hypertension：design，characterization，aerosolization，in vitro 2d/3d human lung cell cultures，and in vivo efficacy [J]. Ther Adv Respir Dis，2021，doi：10.1177/1753466621998245.
[32] Arciniegas E，Frid MG，Douglas IS，et al. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition：potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2007，293（1）：L1-L8.
[33] Liu Y，Cao YG，Sun SY，et al. Transforming growth factor-beta1 upregulation triggers pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis imbalance in rats with hypoxic pulmonary hypertension via the PTEN/AKT pathways [J]. Int J Biochem Cell B，2016，77：141-154.
[34] Soon E，Crosby A，Southwood M，et al. Bone morphogenetic protein receptor type Ⅱ deficiency and increased inflammatory cytokine production. A gateway to pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med，2015，192（7）：859-872.

（收稿日期：2023-08-09；修回日期：2023-10-05）

新型土贝母苷甲脂质体的制备及其抗胰腺癌作用研究

李书慧[1, 3]，杨磊[2]，王艳[2]，卓玉珍[2]，王阳[1, 3*]，杨磊[2*]（1. 天津中医药大学中药学院，天津　301617；2. 天津市中西医结合医院南开医院，天津　300100）

摘要：目的　利用中药活性成分土贝母苷甲完全替代胆固醇作为脂质体膜材料，制备新型土贝母苷甲脂质体（Tub I-LPs），并研究其体内外抗肿瘤作用。**方法**　采用薄膜水化法制备脂质体。利用粒径仪考察粒径和电位，透射电镜观察形貌，并进行包封率及体外稳定性考察。使用小鼠全血比较土贝母苷甲单体（Tub I）、土贝母苷甲普通型胆固醇脂质体（C-Tub I-LPs）和 Tub I-LPs 的溶血性。使用 CCK-8 法检测 Tub I-LPs 对 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞的增殖抑制效果，利用流式细胞仪检测凋亡作用。倒置荧光显微镜和流式细胞仪分别定性和定量检测 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞对两种脂质体的细胞摄取能力。使用 JC-1 实验检测线粒体膜电位的变化。体内实验评估两种脂质体的抗肿瘤效果。使用 HE 染色评价制剂的安全性。**结果**　两种脂质体粒径分散均匀，呈近似球状，Tub I-LPs 平均粒径为（112.8±0.2）nm，Zeta 电位为（－2.6±0.2）mV。C-Tub I-LPs 平均粒径为（185.2±0.2）nm，Zeta 电位为（－3.1±0.2）mV。Tub I-LPs 和 C-Tub I-LPs 的包封率分别为 98.22% 和 48.39%，两者相比，稳定性相似，但 Tub I-LPs 溶血性明显降低，且其在细胞增殖抑制，致癌细胞凋亡方面作用更加显著。细胞摄取实验结果显示，肿瘤细胞对 Tub I-LPs 的摄取能力为 C-LPs 的 3 倍。Tub I-LPs 引起肿瘤细胞线粒体膜电位下降更显著。C57 原位胰腺癌模型证实 Tub I-LPs 抑制肿瘤作用更加显著。HE 染色显示两种脂质体均无明显毒副作用。**结论**　使用土贝母苷甲作为膜材能显著增强其细胞摄取能力，并有效提高整体抗肿瘤效果，为进一步利用该膜材包裹抗肿瘤药物研究奠定了基础。

关键词：胰腺癌；土贝母苷甲；脂质体；细胞凋亡；细胞摄取
中图分类号：R283，R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0843-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.004

Preparation of novel Tubeimoside I liposomes and its anti-pancreatic cancer research

LI Shu-hui[1, 3], YANG Lei[2], WANG Yan[2], ZHUO Yu-zhen[2], WANG Yang[1, 3*], YANG Lei[2*] (1. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *Tianjin Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Nankai Hospital*, *Tianjin* 300100)

Abstract: Objective　To determine the potential anti-tumor effect of new Tubeimoside I liposomes (Tub I-LPs) in vitro and in vivo. **Methods**　Liposomes were prepared with the thin film hydration method. The particle size and potential were analyzed by a particle size analyzer, while the morphology was observed with a transmission electron microscope. The encapsulation efficiency and in vitro stability were also determined. To compare the hemolytic properties of Tubeimoside I monomer, Tubeimoside I ordinary cholesterol liposomes, and novel Tub I-LPs, mouse whole blood was taken. The cell proliferation inhibitory effect of the new Tub I-LPs on Panc 02 cells and MIA PaCa 02 cells was detected with the CCK-8 method, and the apoptosis effect was determined by flow cytometry. The cellular uptake ability of the two liposomes by Panc 02 cells and MIA PaCa 02 cells was qualitatively and quantitatively assessed with inverted fluorescence microscopy and flow

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No.81602773）。
作者简介：李书慧，女，硕士研究生，主要从事药剂学研究，email：a18802284013@163.com　*通信作者：王阳，女，教授，主要从事药物新制剂新技术研究，email：wangy9902@163.com；杨磊，男，主要从事药理学研究，email：nkyanglei@126.com

cytometry, respectively. Additionally, changes in the mitochondrial membrane potential were detected with the JC-1 assay. Furthermore, the anti-tumor effect of both liposomes were evaluated with in vivo experiments. The safety of the formulation was assessed by HE staining. **Results** The particle sizes of the two prepared liposomes were uniformly dispersed and approximately spherical. The average particle size of the Tub I-LPs was (112.8±0.2) nm, and the Zeta potential was (－2.6±0.2) mV. The average particle size of the C-Tub I-LPs was (185.2±0.2) nm, and the Zeta potential was (－3.1±0.2) mV. The encapsulation rates of the Tub I-LPs and the C-Tub I-LPs were 98.22% and 48.39% respectively. The stabilities of two preparations were similar, but the Tub I-LPs significantly reduced plastid hemolysis. They exhibited a more significant effect in inhibiting the cell proliferation and inducing cancer cell apoptosis. The cell uptake flow cytometry demonstrated that cancer cells took up the Tub I-LPs three time more than the C-LPs. The Tub I-LPs caused a more pronounced decrease in the mitochondrial membrane potential of cancer cells. The C57 orthotopic pancreatic cancer model confirmed that the Tub I-LPs had a more significant tumor inhibitory effect. HE staining showed no obvious toxic or side effects were found in the new preparation. **Conclusion** Tubeimoside I as a membrane material greatly enhances its cellular uptake capacity and effectively improves the overall anti-tumor effect. This finding provides a basis for future utilization of this film material for encapsulating anti-tumor drugs, thereby promoting the development of innovative traditional Chinese medicine drugs for tumor treatment.

Key words: pancreatic cancer; Tubeimoside I; liposome; apoptosis; cellular uptake

胰腺癌是全球癌症患者主要的死因之一[1-3]，其死亡风险随年龄的增长急剧上升[4]。研究指出高龄、家族病史、饮酒和肥胖等因素与胰腺癌有关。胰腺癌早期症状不明显，大多数患者在确诊时已经晚期[5]。化疗成为主要的治疗方案。目前常用的治疗药物存在毒性和耐药性等问题。因此，迫切需要开发新的给药方式来优化临床治疗。

癌症纳米技术为药物传递提供了新的治疗策略[6]。脂质体被认为是最具前途的传递系统。它是由磷脂和胆固醇作为材料[7]制备成的具有生物相容性，可提高药物疗效和减少药物细胞毒性等优点的生物制剂[8]。然而，膜材成分胆固醇会引发一些临床副作用，肿瘤细胞会增加外源性脂质如胆固醇的摄取，以支持细胞的快速增殖[9]。胆固醇代谢物也能促进肿瘤的生长。例如，肠道微生物的胆固醇代谢物可诱发结肠癌[10]。代谢物 27-羟基胆固醇与乳腺癌细胞相互作用促进肿瘤细胞增殖[11]。现有研究证明使用甾醇、皂苷及其他类似化合物替代脂质体中的胆固醇可达到减少人体特别是病灶细胞对胆固醇的过量摄入，帮助维持脂质体的稳定性，提高脂质体的药用价值等目的。

中药土贝母是一种广泛使用的葫芦科植物，具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎等作用[12]。土贝母苷甲是从土贝母中提取出的一种三萜皂苷，由亲水性糖苷链和疏水性糖苷配基组成，具有与胆固醇相似的五环三萜类皂苷结构，在肿瘤形成的各个阶段具有抗肿瘤活性[13]。在肺癌 A549 细胞中，土贝母苷甲通过增加 Bax 与 Bcl-2 的比例，降低环氧合酶 -2（COX-2）的表达诱导细胞凋亡[14]。土贝母苷甲通过 Akt 介导的信号通路在 MCF-7、MDAMB-231 和 T47D 人乳腺癌细胞中诱导细胞保护性自噬[15]。

本研究基于土贝母苷甲的抗肿瘤活性和结构特性，考察了其对 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞的细胞毒性、致细胞凋亡和细胞摄取作用。还考察了其体内抗肿瘤作用。结果证明其可以代替胆固醇与磷脂形成稳定的膜材，与土贝母苷甲普通型胆固醇脂质体（C-Tub I-LPs）相比具有较好的抗肿瘤优势。这为进一步利用这种新型土贝母苷甲脂质体（Tub I-LPs）载药提供了基础。

1 材料

1.1 试药

土贝母苷甲（质量分数：98%，批号：H07s9z-69639）、胆固醇（质量分数＞ 98%）（上海源叶生物科技有限公司）；大豆卵磷脂（质量分数：97%，艾伟拓上海医药科技有限公司，批号：sy-so-220602）；三氯甲烷（质量分数：99%，天津渤化化学试剂有限公司）；Hoechst33342（碧云天生物技术有限公司，批号：C1056）；胎牛血清（FBS，上海龙田生物科技有限公司，批号：2244289）；培养基（DMEM，索莱宝生物科技有限公司，批号：G4531）；CCK-8（北京

睿芯诺生物科技有限公司，批号：GK10001）；AnnexinV-HTC 和碘化丙啶（PI 试剂盒）[翌圣生物科技（上海）股份有限公司，批号：A6216080）]；甲醇（质量分数≥ 99.9%，批号：J2222453）、香豆素 -6（质量分数：98%，批号：A2214385）（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；JC-1 试剂盒（Elabscience，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号：AK13801）。

1.2　仪器

AB135-S 型十万分之一天平（梅特勒 - 托利多有限公司）；岛津 LC-20at 型高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；N-1300 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂，RE-2000a）；KQ-250DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；超声波细胞破碎仪（美国 Sonics 公司）；Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪（英国马尔文公司）；Leica 倒置荧光显微镜（德国徕卡微系统有限公司）；酶标仪（瑞士 Tecan Trading AG 公司）。

1.3　细胞株

小鼠胰腺癌细胞 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞从美国 ATCC 细胞库购买。细胞接种在含 10%FBS 的高糖 DMEM 培养基中，于 37 ℃、5%CO_2 无菌细胞培养箱培养。待细胞长至培养瓶面积的 80% ～ 90% 时，用 0.25% 胰酶在培养箱中消化 2 min，按 1∶2 ～ 1∶4 的比例进行传代，取对数生长期细胞制成细胞悬液用于后续实验。

1.4　实验动物

SPF 级雌性 C57 小鼠，体重（18±2）g，6 ～ 8 周；SPF 级雌性 KM 小鼠，体重（30±2）g，6 ～ 8 周 [许可证号 SYXK（津）2015-0007，北京维通利华实验动物技术有限公司]。在南开医院动物房进行饲养，饲养环境温度为（22±2）℃，相对湿度为（50±5）%。饲料、水和垫料均经过无菌处理，并定时补充和更换。所有的动物实验方案经南开医院实验动物伦理委员会批准，并且按照南开医院有关实验动物饲养和使用准则进行。

1.5　统计学方法

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

2　方法与结果

2.1　脂质体的制备

采用薄膜水合法制备 C-Tub I-LPs 和 Tub I-LPs。C-Tub I-LPs 由磷脂和胆固醇包被土贝母苷甲制成，磷脂∶土贝母苷甲∶胆固醇质量比为 10∶3∶1。Tub I-LPs 则由磷脂∶土贝母苷甲 = 10∶3 制成。C-Tub I-LPs 先将处方量磷脂和胆固醇溶于氯仿∶甲醇 = 2∶1 的溶液中，振摇多次，再加入土贝母苷甲甲醇溶液，50 ℃下使用旋转蒸发仪旋转蒸发形成脂膜，Tub I-LPs 直接将处方量磷脂和土贝母苷甲溶于氯仿∶甲醇 = 2∶1 的溶液中，50 ℃下使用旋转蒸发仪旋转蒸发形成脂膜。随后，将两种脂质体加入 10 mL PBS，50 ℃下水合 30 min，冰浴中对脂质体悬浮液 30 min 超声处理（工作时间 2 s，间歇时间 3 s，功率 80 W），过 0.22 μm 微孔滤膜过滤即可得到产品。

2.2　脂质体的表征

2.2.1　粒径分布与 Zeta 电位　取适量待测样品溶液用 PBS 稀释。室温下测定两种脂质体的粒径分布和 Zeta 电位。Tub I-LPs 的粒径为（112.8±0.2）nm，PDI 为（0.270±0.022），Zeta 电位为（－ 2.6±0.2）mV。C-Tub I-LPs 的粒径为（185.2±0.2）nm，PDI 为（0.320±0.020），Zeta 电位为（－ 3.1±0.2）mV。Tub I-LPs 粒径比 C-Tub I-LPs 小，是由于 Tub I 的亲水部分和胆固醇在两种脂质体中所占据的面积不同导致的，Tub I 是一种表面活性剂，能够降低水的表面张力，压缩脂质体，减小粒径（见图 1）。

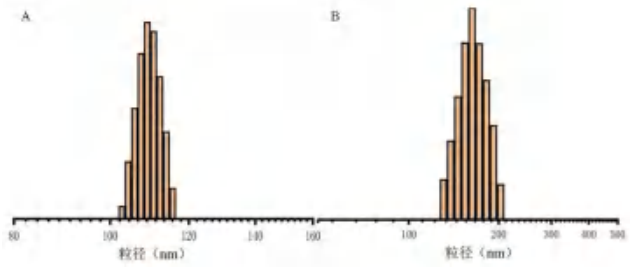
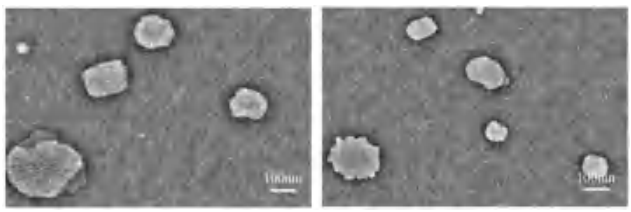


图 1　Tub I-LPs（A）和 C-Tub I-LPs（B）的粒径分布

Fig 1　Particle size distribution of Tub I-LPs（A）and C-Tub I-LPs（B）

2.2.2　脂质体的形态观察　取适量稀释好的脂质体滴到铜网上，自然干燥 1 h。1.5% 的磷钨酸滴到铜网上进行复染，自然干燥过夜。使用透射电子显微镜（TEM）进行测试[16-17]。通过 TEM 观察到 Tub I-LPs 呈现近似球形外观，分散均匀，见图 2。



Tub I-LPs　　C-Tub I-LPs

图 2　TEM 观察 Tub I-LPs 和 C-Tub I-LPs 的形态

Fig 2　Transmission electron microscopy images of Tub I-LPs and C-Tub I-LPs

2.3　包封率测定

将 300 μL 脂质体加入 2700 μL 的 PBS 中混合

均匀，取 2 mL 放入 50 kDa 的超滤管，4 ℃、5000 r • min^{-1} 冷冻离心 30 min，得到的滤液即游离的土贝母苷甲。取 200 μL 脂质体到离心管中，加入 1800 μL 甲醇超声破乳 30 min，13 000 r • min^{-1} 离心 10 min，过 0.22 μm 滤膜，得到游离的土贝母苷甲样品。以甲醇 - 水＝ 1∶9 为流动相，色谱柱为 C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 214 nm；柱温 30 ℃；进样量 20 μL，使用高效液相色谱仪进行含量测定[18]，计算包封率：包封率（*EE*，%）＝（$m_{总}$ － $m_{游}$）/$m_{总}$ ×100%，$m_{总}$代表脂质体中包含的药物的总量，$m_{游}$表示游离的药物的量。

Tub I-LPs 包封率为 98.22%，C-Tub I-LPs 包封率为 48.39%。其原因是 Tub I 是能够降低水的表面张力的表面活性剂，改变磷脂在脂质体双层中的排列方式，使磷脂紧密排列，减少脂质体双层间隙，提高 Tub I-LPs 的包封率。

2.4　稳定性考察

将 Tub I-LPs 和 C-Tub I-LPs 置于 4 ℃保存，在 0、1、2、3、4、5、6 和 7 d 取一定量的脂质体，稀释至适当浓度，使用粒径仪测定粒径和 Zeta 电位的变化，高效液相色谱仪测定包封率的变化，观察药物泄漏情况，考察其稳定性。

放置 7 d 后的测定结果如图 3 所示。Tub I-LPs 和 C-Tub I-LPs 的粒径、PDI 变化差异较小。C-Tub I-LPs 在第 7 日的药物泄漏率约为 60%，Tub I-LPs 的泄漏率低于 20%，说明 Tub I-LPs 更稳定。原因是皂苷类成分能够改变磷脂双层的热力学参数，提高脂质体的膜稳定性。

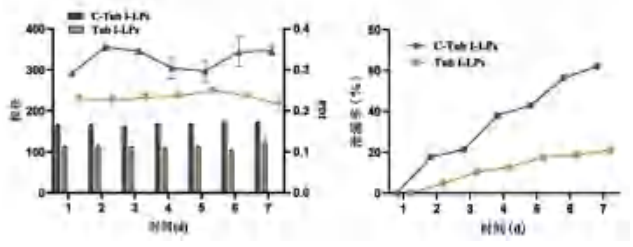


图 3　脂质体 4 ℃保存 7 d 稳定性考察

Fig 3　Stability of liposomes stored at 4 ℃ for 7 days

2.5　溶血性

取 2 mL KM 小鼠全血，1000 g 离心 10 min，弃上清液，生理盐水洗涤沉淀物数次。离心沉淀的红细胞用生理盐水制备成 2% 红细胞悬液。按体积比为 1∶5 将游离 Tub I、C-Tub I-LPs、Tub I-LPs 与 2% 红细胞悬液混合，37 ℃恒温孵育 1 h，1000 g 离心 10 min，570 nm 处测量上层溶液吸光度。阳性对照用蒸馏水替代测试药物，阴性对照用生理盐水替代测试药物，计算溶血率（%）：溶血率（%）＝（样品吸光度－阴性对照吸光度）/（阳性对照吸光度－阴性对照吸光度）×100%。溶血率超过 5%，判定有溶血现象[19]。结果显示 Tub I 溶血性为 6.7%，具有溶血性，Tub I-LPs 溶血率为 2.5%，C-Tub I-LPs 溶血率为 4.2%。其原因是将 Tub I 用脂质体包被后可以降低其与血液的接触面积，C-Tub I-LPs 稳定性没有 Tub I-LPs 高，整体溶血率 Tub I-LPs 最低。Tub I-LPs 有效避免了 Tub I 中观察到的溶血现象，更适合肿瘤治疗。

2.6　体外抗肿瘤作用

2.6.1　细胞毒性　取对数生长期的 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞分别以密度 5×10^4 个 / 孔和 1×10^5 个 / 孔接种于 96 孔板后加 100 μL 培养基。另取 5 孔加 100 μL 培养基作为调零孔，培养 24 h。完全培养基配制游离 Tub I、C-Tub I-LPs 和 Tub I-LPs，逐级稀释得 1 ～ 20 μg • mL^{-1} 土贝母苷甲。培养 24 h，每孔加 10 μL CCK-8 溶液，孵育 1 h，酶标仪在 450 nm 处测定吸光度（*A* 值），以下式计算细胞生存率[20]：细胞生存率（%）＝（$A_{给药组}$ － $A_{空白组}$）/（$A_{阴性对照组}$ － $A_{空白组}$）×100%。与 Tub I 相比，C-Tub I-LPs 和 Tub I-LPs 对细胞产生的杀伤能力更强，Tub I-LPs 对细胞的增殖抑制作用更明显（见表 1）。这些结果提示，Tub I 作为膜材制备的 Tub I-LPs 与直接包被的 C-Tub I-LPs 相比效果更佳（见图 4）。

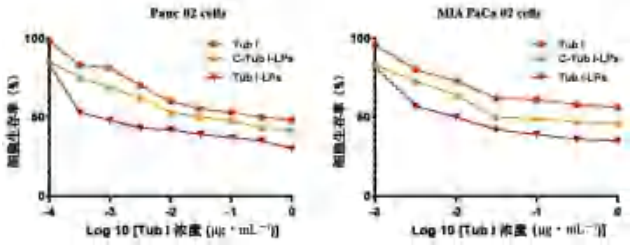


图 4　各组药物对 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞增殖的抑制作用（$\bar{x}\pm s$，n ＝ 5）

Fig 4　Inhibitory effect of drugs on the proliferation of Panc 02 and MIA PaCa 02 cells（$\bar{x}\pm s$，n ＝ 5）

2.6.2　细胞凋亡　对数生长期的 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞，分别以密度 1×10^5 个 / 孔和 2.5×10^5 个 / 孔的细胞接种于 6 孔板，孵育 24 h。分别添加游离 Tub I、C-Tub I-LPs 和 Tub I-LPs，其中 Tub I 的质量浓度均为 10 μg • mL^{-1}。孵育 24 h，消化、离心，弃上清液，PBS 洗涤细胞两次后收集。Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡情况，细胞分为正常（Annexin V$^-$，PI$^-$）、早期凋亡（Annexin V$^+$，PI$^-$）和晚期凋亡（Annexin V$^+$，PI$^+$）[21-22]。结果显示，Tub I-LPs 对早期凋亡的促进作用明显高于 C-Tub I-LPs 和 Tub I。在 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞中，Tub I-LPs 总体凋亡率均高于 C-Tub I-LPs 和

表 1　游离 Tub I 和 Tub I 脂质体对 Panc 02 和 MIA PaCa 02 细胞的 IC_{50} ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

Tab 1　IC_{50} values of free Tub I and Tub I liposomes against Panc 02 and MIA PaCa 02 cells ($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

药物	IC_{50}/（μg • mL^{-1}）	
	Panc 02	MIA PaCa 02
Tub I	8.39	—
C-Tub I-Lps	6.37	5.68
Tub I-Lps	2.01	1.83

Tub I（见图 5）。

2.6.3　细胞摄取　取对数生长期的 Panc 02 和 MIA PaCa 02 细胞，分别以 1×10^5 个 / 孔和 2.5×10^5 个 / 孔的密度接种于 6 孔板，孵育 24 h。添加 500 ng • mL^{-1} coumarin-6 标记的 Tub I-LPs 和 C-LPs，孵育 4 h，PBS 洗涤两次，每孔加入 0.005 μg • mL^{-1} Hoechst33342 溶液，避光孵育 30 min，用预冷 PBS 洗涤两次，正置荧光显微镜下观察和拍照 [23]。另外，将细胞接种

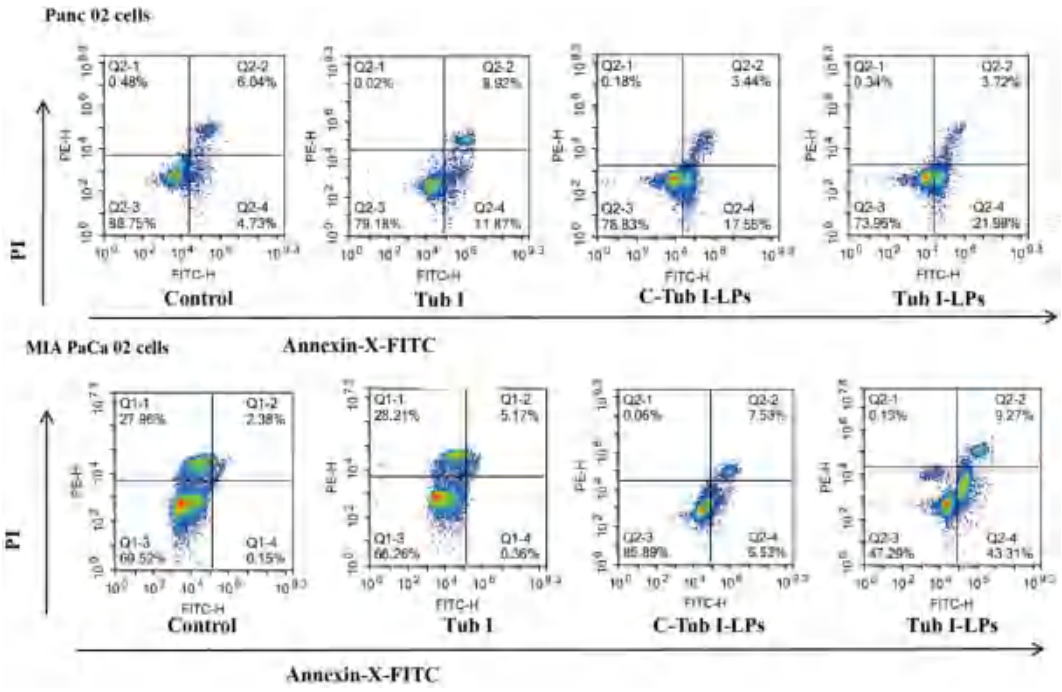


图 5　Annexin V-FITC/PI 检测各组 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞凋亡率

Fig 5　Apoptosis rate of Panc 02 cells and MIA PaCa 02 cells in each group detected by Annexin V-FITC/PI

于 12 孔板中按照相同的方法处理，孵育 4 h，200 μL 胰酶消化细胞，制成细胞悬液，用预冷 PBS 洗涤三次，离心，收集细胞，300 μL 的缓冲液重悬细胞，流式细胞仪上定量测定。根据共聚焦荧光显微镜获得的图片，观察到相较于 C-LPs，Tub I-LPs 在 Panc 02 和 MIA PaCa 02 细胞上显示出明显增强的荧光强度，Tub I 的修饰有效增加了 Panc 02 和 MIA PaCa 02 细胞对脂质体的摄取。流式细胞仪的结果进一步说明了 Tub I-LPs 的细胞摄取率约为 C-LPs 的 3 倍（见图 6 ）。

2.6.4　JC-1 染色检测细胞线粒体膜电位　收集各组 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞，消化后，按 JC-1 试剂盒的操作方法各取约 5×10^5 个细胞，加入 1 mL 的 JC-1 工作液，37 ℃避光孵育 20 min，预冷染色缓冲液充分洗涤细胞，流式细胞仪定量检测各组细胞线粒体膜电位的转变 [24]。结果证实，土贝母苷甲可以引起细胞线粒体膜电位下降但 Tub I-LPs 下降更为显著，具体见图 7。

2.7　体内抗肿瘤作用

2.7.1　胰腺癌原位肿瘤模型建立、分组及给药　取 6 ～ 8 周龄的雌性 C57 小鼠建立原位胰腺癌模型，C57 小鼠麻醉后，右肋下方切割长约 1 cm 的斜切口，打开腹腔，暴露胰腺。取 Panc 02 细胞悬液（对数生长期），调整细胞密度为 2.5×10^7 个 • mL^{-1}，每只小鼠接种 200 μL。随后，切口缝合止血，消毒 [25]。接种后 48 h，小鼠随机分为 4 组：PBS 组，游离 Tub I 组，C-Tub I-LPs 组和 Tub I-LPs 组。腹腔注射给药，隔日给药一次，共给药 7 次，为期 14 d。在实验期间，小鼠自由采食和饮水。

2.7.2　肿瘤体积、瘤重测定　末次给药隔日将小鼠处死，剖取原位胰腺癌瘤体组织称重，测量其体积。心脏、肝脏、肺、肾以及部分肿瘤放入甲醛中保存，供 HE 染色。结果如图 8 所示，药物治疗后，Tub I-LPs 组对于抑制肿瘤的作用最为明显，瘤重和瘤体积均显著下降。

2.7.3　苏木素 - 伊红染色（HE）　心、肝、肺、肾用 4% 多聚甲醛固定，切片后进行 HE 染色。光学显微

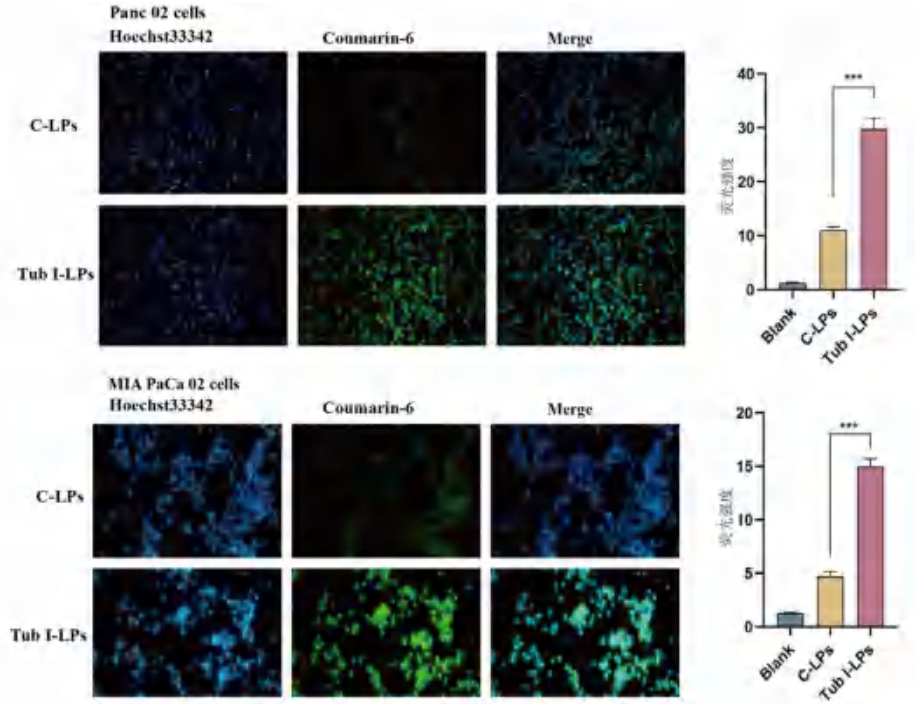


图 6 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞对 Tub I-LPs 及 C-LPs 的体外摄取（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，$^{**}P<0.01$）

Fig 6 In vitro uptake of Tub I-LPs and C-LPs in Panc 02 cells and MIA PaCa 02 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，$^{**}P<0.01$）

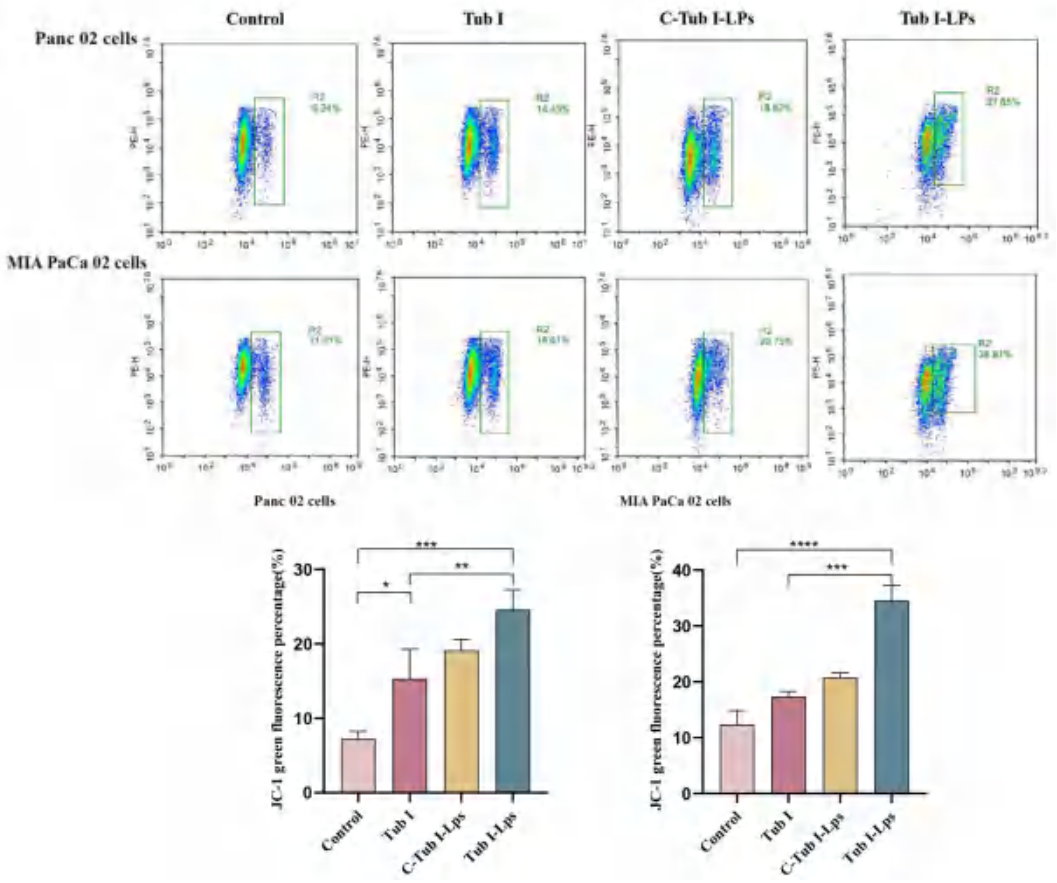


图 7 Panc 02 细胞和 MIA PaCa 02 细胞 JC-1 分析（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 7 Panc 02 cells and MIA PaCa 02 cells in JC-1（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

镜观察各组的病理表现和特点，数码相机采集图像。组织学检查显示，所有组均未发生明显的病理损伤，如图 8D 所示。说明 Tub I-LPs 给药系统具有较高的安全性，有望用于临床治疗。

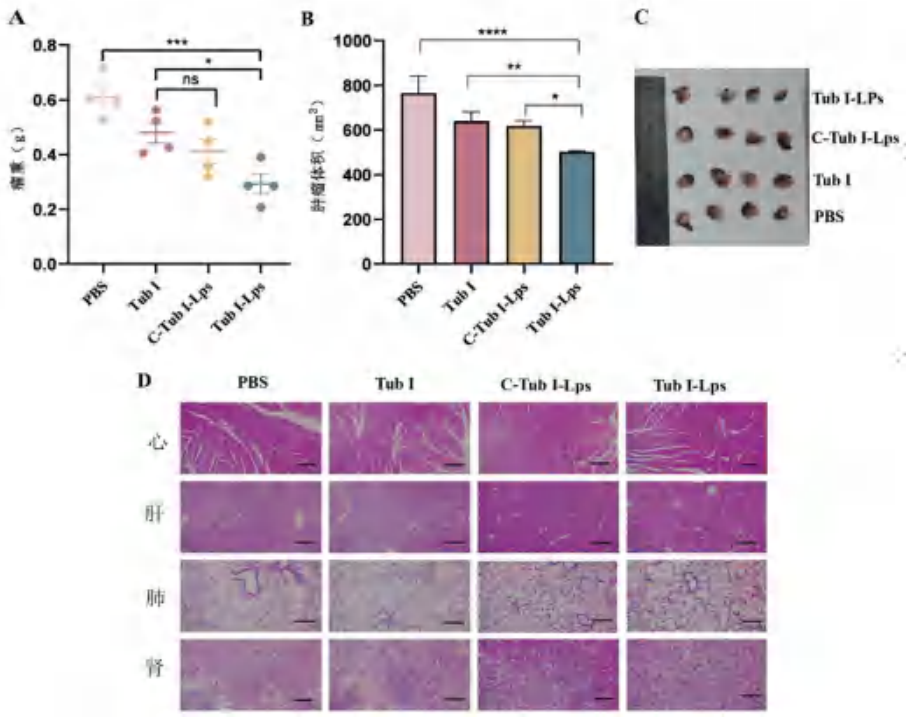


图 8　各组在 C57 胰腺癌原位模型中的抗肿瘤作用

Fig 8　Anti-tumor effects of each group in an orthotopic model of C57 pancreatic cancer

注（Note）：$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

3　讨论

脂质体具有良好的生物相容性，可提高药物的溶解度和生物利用度，从而增强药物的吸收。目前大部分研究都是在脂质体表面修饰一些靶向配体或免疫调节剂等，直接将药物靶向肿瘤细胞以发挥共同的抗肿瘤作用。然而，这些修饰涉及多个合成步骤，费时且过程复杂。因此，寻找一种制备简便，但同时具备肿瘤靶向性的脂质体就显得尤为重要。

近年来的研究发现，土贝母苷甲具有较强的抗肿瘤活性，并且抗癌谱较广，能有效抑制人宫颈癌细胞（Hela）[26]、肺癌细胞（NSCLC）[27]、胃癌细胞（BCG823）[28]、人肝癌细胞（HepG2）[28] 等癌细胞的增殖。Zhang 等 [14] 研究发现，土贝母苷甲通过增加 Bax 与 Bcl-2 比值和降低 COX-2 的表达来抑制肺癌 A549 细胞的增殖，并诱导细胞凋亡。Xu 等 [29] 研究显示，土贝母苷甲通过线粒体内在凋亡和 P21-cdc2/cyclin-B1 信号通路来诱导细胞凋亡。然而，土贝母苷甲属于五环三萜类皂苷，静脉注射后会产生强烈的溶血作用，不能直接用于临床。但土贝母苷甲的结构与胆固醇相似，用它来代替传统的脂质体成膜材料胆固醇，既可以发挥膜材功能，又具有抗肿瘤效果。

本研究经简单的处方工艺优化，得到的新型土贝母苷甲脂质体具有粒径更小、稳定性更强、包封率更高等优点。这种优化不仅改善了土贝母苷甲单体的溶血性，还通过结构优势制备了一种新型载体。肿瘤细胞摄取实验中，与普通脂质体相比，Tub I-LPs 细胞摄取增强。这可能是由于土贝母苷甲是一种皂苷，皂苷成分中的糖部分有识别并与 Glut1 相互作用的潜力。例如，Xia 等 [30] 研究的 Rg_3 的糖基可以从脂质体表面突出，Tub I-LPs 具有类似的结构，导致肿瘤细胞对其的摄取增加。因此，本研究开发了一种多功能脂质体系统，土贝母苷甲既可以作为膜稳定剂还可以提高肿瘤细胞摄取能力，具有良好的膜材优势，为胰腺癌的治疗提供了一个多功能的膜材，可以基于土贝母苷甲脂质体进一步包载化疗药物。

参考文献

[1] Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology：understanding the role of lifestyle and inherited risk factors [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2021，18（7）：493-502.

[2] Siegel RL，Miller KD，Fuchs HE，et al. Cancer statistics，2022 [J]. CA Cancer J Clin，2022，72（1）：7-33.

[3] Kamisawa T，Wood LD，Itoi T，et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet，2016，388（10039）：73-85.

[4] Wang BY，Cao J，Chen JW，et al. Triptolide induces apoptosis of gastric cancer cells via inhibiting the overexpression of MDM2 [J]. Med Oncol，2014，31（11）：270.

[5] Rawla P，Sunkara T，Gadupudi V，et al. Epidemiology of pancreatic cancer：global trends，etiology and risk factors [J]. World J Oncol，2019，10（1）：10-27.
[6] Haque S，Norbert CC，Acharyya R，et al. Biosynthesized silver nanoparticles for cancer therapy and in vivo bioimaging [J]. Cancers，2021，13（23）：250-263.
[7] Asmari AK，Ullah Z，Al Balowi A，et al. In vitro determination of the efficacy of scorpion venoms as anti-cancer agents against colorectal cancer cells：a nano-liposomal delivery approach [J]. Int J Nanomedicine，2017，12：559-574.
[8] Woźniak M，Nowak M，Lazebna A，et al. The comparison of in vitro photosensitizing efficacy of curcumin-loaded liposomes following photodynamic therapy on melanoma MUG-Mel2，squamous cell carcinoma SCC-25，and normal keratinocyte HaCaT cells [J]. Pharmaceuticals，2021，14（4）：102-123.
[9] Folkerd EJ，Dowsett M. Influence of sex hormones on cancer progression [J]. J Clin Oncol，2010，28（26）：4038-4044.
[10] Le Goff M，Le Ferrec E，Mayer C，et al. Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention [J]. Biochimie，2019，167：106-118.
[11] Nelson ER，Chang CY，Mcdonnell DP. Cholesterol and breast cancer pathophysiology [J]. Trends Endocrinol Metab，2014，25（12）：649-655.
[12] Islam MS，Wang C，Zheng J，et al. The potential role of tubeimosides in cancer prevention and treatment [J]. Eur J Med Chem，2019，162：109-121 .
[13] Feng XP，Zhou J，Li JY，et al. Tubeimoside I induces accumulation of impaired autophagolysosome against cervical cancer cells by both initiating autophagy and inhibiting lysosomal function [J]. Cell Death Dis，2018，9（11）：1117-1132.
[14] Zhang Y，Xu XM，He P. Tubeimoside-1 inhibits proliferation and induces apoptosis by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing COX-2 expression in lung cancer A549 cells [J]. Mol Med Rep，2011，4（1）：25-29.
[15] Jiang SL，Guan YD，Chen XS，et al. Tubeimoside-1，a triterpenoid saponin，induces cytoprotective autophagy in human breast cancer cells in vitro via Akt-mediated pathway [J]. Acta Pharmacol Sin，2019，40（7）：919-928.
[16] Bochicchio S，Dalmoro A，Bertoncia P，et al. Design and production of hybrid nanoparticles with polymeric-lipid shell-core structures：conventional and next-generation approaches [J]. RSC Adv，2018，8（60）：34614.
[17] Yao X，Bunt C，Cornish J，et al. Oral delivery of bovine lactoferrin using pectin-and chitosan-modified liposomes and solid lipid particles：improvement of stability of lactoferrin [J]. Chem Biol Drug Des，2015，86（4）：466.
[18] Yu H，Teng LR，Meng QF，et al. Development of liposomal ginsenoside Rg_3：formulation optimization and evaluation of its anticancer effects [J]. Int J Pharmaceut，2013，450：250-258.
[19] Huang XY，Qiu MJ，Wang TQ，et al. Carrier-free multifunctional nanomedicine for intraperitoneal disseminated ovarian cancer therapy [J]. Nanobiotechnology，2022，20（1）：93.
[20] Hong C，Liang JM，Xia JX，et al. One stone four birds：a novel liposomal delivery system multi-functionalized with ginsenoside Rh_2 for tumor targeting therapy [J]. Nanomicro Lett，2020，12（1）：129.
[21] 董荧荧，余陈欢，俞冰，等 . 土贝母皂苷甲长循环脂质体的制备及体外性质考察 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（7）：832-836.
[22] Sercombe L，Veerati T，Moheimani F，et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery [J]. Front Pharmacol，2015，6：286.
[23] Vulczak A，Souza AD，Ferrari GD，et al. Moderate exercise modulates tumor metabolism of triple-negative breast cancer [J]. Cells，2020，9（3）：628.
[24] García KP，Zarschler K，Barbaro L，et al. Zwitterioniccoated “stealth” nanoparticles for biomedical applications：recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system [J]. Small，2014，10（13）：2516-2529.
[25] Qiu W，Su GH. Development of orthotopic pancreatic tumor mouse models [J]. Methods Mol Biol，2013，980：215-223.
[26] Feng XP，Zhou J，Li JY，et al. Tubeimoside I induces accumulation of impaired autophagolysosome against cervical cancer cells by both initiating autophagy and inhibiting lysosomal function [J]. Cell Death Dis，2018，9（11）：1117-1132.
[27] Shi HB，Bi HX，Sun XY，et al. Tubeimoside-1 inhibits the proliferation and metastasis by promoting miR-126-5p expression in non-small cell lung cancer cells [J]. Oncol Lett，2018，16（3）：3126-3134.
[28] Islam MS，Wang CY，Zheng JY，et al. The potential role of tubeimosides in cancer prevention and treatment [J]. Eur J Med Chem，2019，162：109-121.
[29] Xu Y，Wang GH，Chen QC，et al. Intrinsic apoptotic pathway and G_2/M cell cycle arrest involved in tubeimoside-I induced EC109 cell death [J]. Chin J Cancer Res，2013，25（3）：312-321.
[30] Xia JX，Zhang SY，Zhang R，et al. Targeting therapy and tumor microenvironment remodeling of triple-negative breast cancer by ginsenoside Rg_3 based liposomes [J]. Nanobiotechnology，2022，20：414.

（收稿日期：2023-11-21；修回日期：2024-02-26）

云南重楼的皂苷类化学成分研究

陈文文[1]，郑淑娴[2]，胡晋铭[1]，田韵远[1]，曹宇[1]，陆云阳[1]，刘杨[1]，汤海峰[1*]（1. 空军军医大学药学系中药与天然药物学教研室，西安　710032；2. 陕西中医药大学药学院，陕西　咸阳　712046）

摘要：目的　研究云南重楼根状茎中的皂苷类化学成分。**方法**　利用硅胶柱色谱、硅胶 C-18 柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以及半制备高效液相色谱等技术，从云南重楼根茎 70% 乙醇提取物的水饱和正丁醇萃取物中，纯化得到单体成分。通过 NMR、MS 等波谱分析和酸水解等化学方法对其进行结构鉴定。**结果**　共分离得到 6 个皂苷类化合物，分别鉴定为 parisyunnanoside Ⅰ（**1**）、paristenoside B（**2**）、26-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，16*α*，26- 三羟基 -（23*R*，25*R*）-16，23- 环胆甾烷醇 -5，17（20）- 二烯 -22- 酮 -3-*O*-*α*-L- 呋喃阿拉伯糖基 -（1 → 4）-[*α*-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷（**3**）、26-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖基 -17，22- 二羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-*α*-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷（**4**）、parisyunnanoside A（**5**）和 26-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，26- 二羟基 -（25*R*）- 胆甾 -5，17（20）- 二烯 -16，22- 二酮 -3-*O*-*α*-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[*α*-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷（**6**）。**结论**　化合物 **3**、**4** 和 **6** 为首次从云南重楼中发现。

关键词：云南重楼；皂苷；化学成分
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0851-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.005

Chemical constituents of steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

CHEN Wen-wen[1], ZHENG Shu-xian[2], HU Jin-ming[1], TIAN Yun-yuan[1], CAO Yu[1], LU Yun-yang[1], LIU Yang[1], TANG Hai-feng[1*] (1. *Department of Chinese Materia Medica and Natural Medicines*, *Air Force Medical University*, *Xi'an*　710032; 2. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi*　712046)

Abstract: Objective　To determine the steroidal saponin constituents in rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Methods**　C-18 silica gel column chromatography and semi-preparative HPLC were used to isolate and purify the 70% ethanol extract from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. The structures of the isolated compounds were determined by extensive spectroscopic analysis and chemical methods. **Results**　Six compounds were isolated and identified as parisyunnanoside Ⅰ (**1**), paristenoside B (**2**), 26-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-3*β*, 16*α*, 26-trihydroxy-(23*R*, 25*R*)-16, 23-cyclocholest-5, 17(20)-dien-22-one-3-*O*-*α*-L-arabinofuranosyl-(1 → 4)-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)]-*β*-D-glucopyranoside (**3**), 26-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-17, 22-dihydroxy-(25R)-furost-5-en-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-*β*-D-glucopyranoside (**4**), parisyunnanoside A (**5**), and 26-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-3*β*, 26-dihydroxy-(25*R*)-cholesta-5, 17(20)-dien-16, 22-dione-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1 → 4)-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)]-*β*-D-glucopyranoside (**6**). **Conclusion**　Compounds **3**, **4** and **6** have been isolated from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* for the first time.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; saponin; chemical constituent

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81973192）；陕西省重点研发计划重点产业创新链（No.2021ZDLSF04-07）；陕西省中医药管理局“秦药”开发重点科学研究项目（No.2021-02-ZZ-003）。

作者简介：陈文文，男，硕士，主要从事天然药物化学研究，email：199626cww@163.com　*通信作者：汤海峰，男，教授，主任药师，博士研究生导师，主要从事天然药化研究和中药、海洋药物开发，email：tanghaifeng71@163.com

重楼属（*Paris*）是一种多年生草本，属于黑药花科（Melanthiaceae）（早期归属于百合科或者延龄草科），目前全世界已知 33 种、15 变种，主要分布在欧洲和亚洲亚热带及温带地区 [1-2]。在中国，有 30 余种重楼属植物，其中以四川、云南、贵州等为主要分布地。重楼作为一种传统药用植物，入药历史悠久，且是云南白药、热毒清片、宫血宁胶囊等多种知名中成药的主要原料。2020 年版《中国药典》对中药重楼（Paridis Rhizoma）的使用和注意事项等进行了详细的介绍，明确指出中药重楼指的是云南重楼 [*Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*（Franch.）Hand.-Mazz.] 和七叶一枝花 [*Paris polyphylla* Smith var. *chinensis*（Franch.）Hara] 等植物经过一系列干燥加工和处理后的根茎，能够起到消肿止痛、凉肝定惊等作用，在清热解毒方面也有良好的功效。结合相关统计数据进行对比与分析可以发现，就目前而言，重楼属植物中包含的各种类型的化合物大约有 323 个，其中涵盖甾体皂苷、黄酮、三萜皂苷、胆甾烷醇、植物甾醇、C-21 固醇、昆虫过敏激素和其他次级代谢产物 [3]。重楼属植物的主要活性成分是甾体皂苷，具有抗肿瘤、止血、抗炎和免疫调节等药理活性 [4]。

云南重楼主要分布于中国的西南和华中部分地区，包括云南、四川、贵州、湖南、广西等 [5]。生长环境多为海拔 1400 ～ 3100 m 的湿润阴暗地带 [6]。为进一步明确陕西产云南重楼的化学成分并为其开发利用提供理论支撑，本文以采自陕西省安康市镇坪县的云南重楼根茎为研究与试验对象，从 70% 的乙醇提取物中采集适量的正丁醇萃取部位，通过一系列的分离纯化和结构鉴定，得到 6 个不同结构的皂苷类化合物（见图 1）。现报道如下。

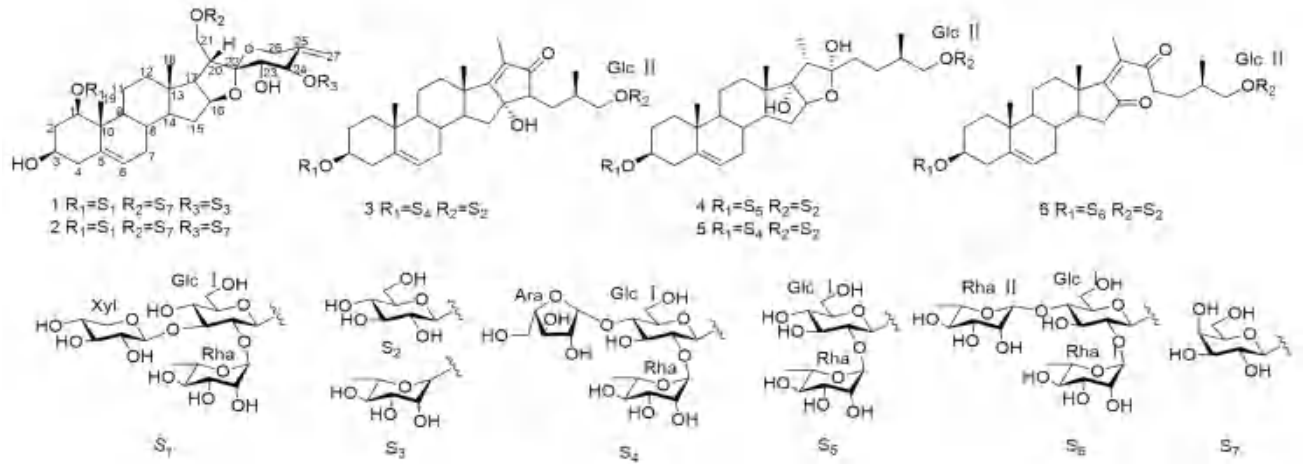


图 1　化合物 **1** ～ **6** 的结构式

Fig 1　Structures of compounds **1** ～ **6**

1　材料

X500R 高分辨液质联用仪（AB SCIEX）；Bruker AVANCE 800 型核磁共振波谱仪（German PerkinElmer 公司）；Gilson 2050 高效液相色谱仪 [UV-VS 检测器、配 YMC-Pack R&D ODS-A 半制备色谱柱（20 mm×250 mm，5 μm）]；岛津 GCMS-QP 2010 气相色谱仪 [采用 Rxi-5Sil 质谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），FID 检测器]；Sephadex LH-20 凝胶（GE-Healthcare 公司）；柱色谱硅胶（LiChroprep RP-18，40 ～ 63 μm，Merck 公司）、预制硅胶板 G（中国青岛海洋化工厂股份有限公司）；RP-18 高效薄层预制板（Merck 公司）。色谱纯甲醇（天津科密欧公司）；对照品 L- 阿拉伯糖（批号：110720，供含量测定用，上海蓝季科技发展有限公司），L- 鼠李糖（批号：718M021）、D- 葡萄糖（批号：316C021）（供含量测定用，北京索莱宝科技有限公司），显色剂为 20% 浓度的硫酸乙醇溶液。

样品于 2019 年 7 月采自陕西省安康市镇坪县，由汤海峰教授鉴定为云南重楼 [*Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*（Franch.）Hand.-Mazz.] 的根茎，药材标本编号 No.2019090。

2　提取与分离

取干燥后的云南重楼根茎 1.9 kg，进行粉碎处理，用 70% 的乙醇溶液浸渍过夜，次日加热回流提取 3 次，每次 2 h，提取液用旋转蒸发仪浓缩，得到浸膏 542.5 g。用适量水将其分散均匀，用石油醚和正丁醇依次对水层萃取 3 次，回收正丁醇层得总皂苷 109.2 g。利用硅胶柱对总皂苷进行分离，选择 $V_{二氯甲烷}$∶$V_{甲醇}$∶$V_{水}$（100∶1∶0 ～ 63∶35∶5）作为洗脱剂，利用薄层色谱（TLC）对其进行检视后合并洗脱液，获得 13 个部分（Fr.1 ～ Fr.13）。

Fr.9（5.3 g）通过 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱（以甲醇为洗脱剂）除去杂质，得到 Fr.9-1 ～ Fr.9-2。Fr.9-1（2.6 g）通过 C_{18} 硅胶色谱柱进行分离，选择 $V_{甲醇}$∶$V_{水}$（2∶8 ～ 10∶0）作为洗脱剂，

通过 TLC 对其进行检视后合并洗脱液获得 7 个组分 Fr.9-1-1 ～ Fr.9-1-7，Fr.9-1-3（92.6 mg）通过半制备高效液相色谱（HPLC）（流速为 10 mL•min^{-1}，检测波长为 206 nm；流动相为 20% 乙腈）分离得到化合物 **4**（3.7 mg，t_R = 13.5 min）和化合物 **5**（4.6 mg，t_R = 28.4 min）。Fr.9-2（1.8 g）通过 C_{18} 反相硅胶柱色谱分离，以洗脱剂 $V_{甲醇}$∶$V_{水}$（2∶8 ～ 10∶0）进行梯度洗脱，得到 6 个组分 Fr.9-2-1 ～ Fr.9-2-6。Fr.9-2-4（177.6 mg）利用半制备 HPLC 进行分离纯化，获得化合物 **6**（2.1 mg，t_R = 31.0 min）。Fr.10（11.3 g）利用 SephadexLH-20 凝胶色谱柱除杂，得到 Fr.10-1 ～ Fr.10-4。Fr.10-2（5.1 g）用 C_{18} 反相硅胶柱色谱分离，以 $V_{甲醇}$∶$V_{水}$（2∶8 ～ 10∶0）为洗脱剂，通过 TLC 检视后合并洗脱液可获得 4 个组分 Fr.10-2-1 ～ Fr.10-2-4。Fr.10-2-4（72.2 mg）利用半制备 HPLC 进行分离纯化，得化合物 **3**（4.6 mg，t_R = 26.5 min）。Fr.11（45.3 g）通过 SephadexLH-20 凝胶色谱柱进行除杂，得到 Fr.11-1 ～ Fr.11-2。Fr.11-1（15.1 g）通过 C_{18} 反相硅胶柱色谱分离，以 $V_{甲醇}$∶$V_{水}$（2∶8 ～ 10∶0）为洗脱剂，通过 TLC 检视后合并洗脱液得到 6 个组分 Fr.11-1-1-Fr.11-1-6。Fr.11-1-4（122.5 mg）利用半制备 HPLC 进行分离纯化，获得化合物 **1**（9.5 mg，t_R = 25.8 min）。Fr.11-1-5（89.7 mg）利用半制备 HPLC 进行分离纯化获得化合物 **2**（2.5 mg，t_R = 23.6 min）。

3 结构的分析与鉴定

化合物 **1**：白色的无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 显色反应呈阳性，说明该化合物可能是皂苷类化合物。根据电喷雾电离质谱（ESI-MS）结果发现，化合物的准分子离子峰 *m/z* 为 1225.5489 $[M+H]^+$和 1223.5341 $[M-H]^-$，相对分子质量为 1224.5411，结合化合物的 ^{13}C-NMR 谱可推导出化合物 **1** 的分子式为 $C_{56}H_{88}O_{29}$。分析其 ^{13}C-NMR 谱（200 MHz，CD_3OD）和无畸变极化转移增强谱（DEPT）数据，结果显示，化合物的 56 个碳信号中，有 27 个属于苷元部分。^{1}H-NMR 谱的结果显示，在高场区域内存在 4 个甲基氢信号 δ_H 0.93（s，H_3-18），1.09（s，H_3-19），1.12（d，J = 6.6 Hz），1.24（d，J = 6.2 Hz），1 个烯烃信号 δ_H 5.56，1 个伯醇基信号 δ_H 3.49（m，H-21），δ_H 4.01（m，H-21）。根据氢 - 多重键相互作用关联谱（HMBC），发现 H_3-19 与 C-5（δ_C 139.4）相关，H-6（δ_H 5.56）与 C-4（δ_C 43.5）以及 C-8（δ_C 34.1）相关，同时 H-6（δ_H 5.56）与 H-7（δ_H 1.97）在 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中相关，表明三取代双键位于 5/6 位。通过 HMBC 谱发现，H-27（δ_H 5.09，4.98）处的烯烃亚甲基质子与 C-24（δ_C 83.5）、C-25 和 C-26（δ_C 62.2）存在远程相关，表明 C-25（δ_C 144.5）与 C-27（δ_C 114.1）处存在一个末端双键。H_2-21 与 C-22（δ_C 111.6）、C-17（δ_C 58.8）存在远程相关，同时 H_2-21 与 H-20（δ_H 2.92）在氢 - 氢相互作用关联谱（^{1}H-^{1}H COSY）中相关，表明伯醇基团与 C-20 相连。根据 C-1（δ_C 85.1）、C-3（δ_C 69.2）、C-16（δ_C 84.2）、C-23（δ_C 71.7）和 C-24（δ_C 83.5）的化学位移推断这几个碳原子上均有羟基取代。综合分析以上数据，推测化合物的苷元为 1，3，21，23，24- 五羟基 -5，25（27）- 二烯 - 螺甾烷结构。

取 1.0 mg 化合物，加入 2 mL（2 mol • L^{-1}）的三氟乙酸来对其进行溶解，所得溶液于 120 ℃条件下加热 2 h，至溶剂蒸干，加入二氯甲烷及水进行萃取。蒸干水层，向残留物中加入 1 mL 无水吡啶和 2 mL L- 半胱氨酸甲酯盐酸盐的无水吡啶溶液（0.1 mol • L^{-1}），60 ℃加热 2 h，氮气吹干；加入 1 mL 吡啶和 0.5 mL *N*-（三甲基硅基）咪唑，60 ℃加热 1 h；蒸干溶液，用正己烷和水进行萃取，并对正己烷层进行气相色谱（GC）分析 [7]。取标准糖用相同方法制备单糖衍生物进行对照。通过 GC 对化合物水解产物的衍生物和标准单糖衍生物进行分析，结果显示，其单糖结构组成包括 L- 鼠李糖（L-Rha）、D- 葡萄糖（D-Glc）、L- 半乳糖（L-Gal）以及 D- 木糖（D-Xyl），组成比为 2∶1∶1∶1。HMBC 谱显示 H-1（Xyl）与 C-4（Glc），H-1（Rha I）与 C-2（Glc），H-1（Glc，δ_H 4.38）和苷元 C-1（δ_C 85.1）之间存在远程相关，H-1（Gal，δ_H 4.21）与苷元 C-21（δ_C 70.9）之间存在远程相关，H-1（Rha Ⅱ，δ_H 4.75）和苷元 C-24（δ_C 83.5）之间存在远程相关，证实了化合物中糖与苷元的连接位点。在 NOESY 谱中，H-1 与 H-3 和 H-9 相关，表明 H-1 和 H-3 都是 α 构型，即 C-1 和 C-3 位上的羟基都是 β 构型。综合上述数据，结合文献 [8] 可以确定化合物 **1** 为已知化合物 parisyunnanoside Ⅰ。

化合物 **2**：白色的无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 显色反应呈阳性，说明该化合物可能是皂苷类化合物。根据 ESI-MS 结果发现，化合物的准分子离子峰 *m/z* 为 1241.5439 $[M+H]^+$和 1239.5282 $[M-H]^-$，相对分子质量为 1240.5361，结合 NMR 谱可推导出化合物 **2** 的分子式为 $C_{56}H_{88}O_{30}$。将 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 数据与化合物 **1** 进行对照，发现化合物 **2** 苷元部分与化合物 **1** 一致，是高度氧化的螺甾烷醇型苷元。按照化合物 **1** 的方法将化合物 **2** 制备成单糖衍生物，与标准糖衍生物对比，分析其单糖组成为 L-Gal、D-Glc、D-Xyl 和 L-Rha，组成比为 2∶1∶1∶1。在低场区域内存在 5 个糖的端基氢信号，即 δ_H 4.90（d，J = 7.2 Hz，

Xyl H-1），δ_H 4.71（d，J = 7.8 Hz，Glc H-1），δ_H 5.82（d，J = 6.9 Hz，Gal Ⅱ H-1），δ_H 4.85（d，J = 7.3 Hz，Gal Ⅰ H-1）和 δ_H 6.34（br s，Rha H-1）。其对应的端基碳信号为 δ_C 105.1（Xyl C-1），δ_C 100.3（Glc C-1），δ_C 103.8（Gal Ⅱ C-1），δ_C 105.3（Gal Ⅰ C-1）和 δ_C 101.3（Rha C-1）。HMBC 谱显示 H-1（Xyl）与 C-3（Glc），H-1（Rha） 与 C-2（Glc），H-1（Glc）和苷元 C-1（δ_C 84.4）之间存在远程相关，H-1（Gal Ⅰ）与苷元 C-21（δ_C 70.2）之间存在远程相关，H-1（Gal Ⅱ）和苷元 C-24（δ_C 82.1）之间存在远程相关，说明了化合物中糖与苷元的连接位点。与文献 [9] 进行对比，确定化合物 **2** 为 paristenoside B。

化合物 **3**：白色的无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 显色反应呈阳性，说明该化合物可能是皂苷类化合物。根据 ESI-MS 结果发现，化合物的准分子离子峰 *m/z* 为 1031.5063 $[M + H]^+$和 1029.4907 $[M - H]^-$，相对分子质量为 1030.4985，结合 NMR 谱可推导出化合物 **3** 的分子式为 $C_{50}H_{78}O_{22}$。NMR 谱显示有 4 个甲基氢信号 δ_H 1.47（s，H_3-18）、1.13（s，H_3-19）、1.83（s，H_3-21） 和 1.11（d，J = 6.2 Hz，H_3-27），分别与 δ_C 15.8、19.9、8.4 和 17.9 信号相对应。其结构中包含 1 个三取代烯烃信号 δ_H 5.35（H-5）、δ_C 122.4（C-6）和 δ_C 141.9（C-5），1 个四取代烯烃碳信号 δ_C 183.2（C-17）和 δ_C 129.7（C-20），1 个酮羰基信号 δ_C 213.8（C-22）和 3 个季碳 δ_C 38.2（C-15）、δ_C 45.1（C-13）和 δ_C84.7（C-16）。HMBC 谱显示 H_3-27 与 C-24（δ_C 29.4）、C-25（δ_C 33.1）和 C-26（δ_C 77.0）有远程相关，结合 ^{1}H-^{1}H COSY 谱 中 H-23/H_2-24、H_2-24/H-25、H-25/H_2-26 和 H-25/H_3-27 的相关信号，可证明侧链的存在。通过 HMBC 谱发现，H-23（δ_H 2.62）与 C-16（δ_C 84.1）、C-22（δ_C 213.8）和 C-25，以及 H_3-21（δ_H 1.83）与 C-17（δ_C 183.2）、C-20（δ_C 129.7）和 C-22 的远程相关，证明苷元上存在一个具有 α，β- 不饱和酮基的五元环并与上述侧链相连。结合文献 [10] 推断化合物 **3** 的苷元结构为 3β，16α，26- 三羟基 -16，23、-（23*R*，25*R*）- 二烯 -22- 酮环胆甾烷醇 -5，17（20）。

运用化合物 **1** 的方法对化合物 **3** 进行酸水解制备单糖衍生物，分析其单糖组成为 L-Rha、D-Glc 以及 L- 阿拉伯糖（L-Ara*f*），组成比为 1∶2∶1。HMBC 谱显示 H-1（Ara*f*）与 C-4（Glc Ⅰ，δ_H 3.83），H-1（Rha）与 C-2（Glc Ⅰ，δ_H 4.06），H-1（Glc Ⅰ，δ_H 4.75）和苷元 C-3（δ_C 78.6）之间存在远程相关，H-1（Glc Ⅱ，δ_H 4.78）与苷元 C-26（δ_C 77.0）之间存在远程相关，说明了化合物中糖与苷元的连接位点。对比文献 [11] 发现，化合物 **3** 为已知化合物 26-*O*-β-D- 吡喃葡萄糖基 -3β，16α，26- 三羟基 -（23*R*，25*R*）- 二烯 -22- 酮 -3-*O*-α-L- 呋喃阿拉伯糖基 -（1 → 4）-[α-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-β-D- 吡喃葡萄糖苷，且为云南重楼中首次分离得到。

化合物 **4**：白色的无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 显色反应呈阳性，说明该化合物可能是皂苷类化合物。根据 ESI-MS 结果发现，化合物的准分子离子峰 *m/z* 为 919.4903 $[M + H]^+$ 和 917.4746 $[M - H]^-$，相对分子质量为 918.4824，结合 NMR 谱可推导出化合物 **4** 的分子式为 $C_{45}H_{74}O_{19}$。在 ^{1}H-NMR 高场区存在 4 个甲基氢信号 δ_H 0.90（s，H_3-18），1.11（s，H_3-19），1.41（d，J = 6.0 Hz，H_3-21），1.04（d，J = 6.4 Hz，H_3-27） 与 ^{13}C-NMR 中的 δ_C 16.8，19.8，15.9 和 18.0 相对应 [12]。通过 NOESY 谱，得知 H_2-26 化学位移值差 $\delta_{Ha} - \delta_{Hb}$ = 3.96 − 3.64 = 0.32 < 0.48，从而确定 C-25 为 *R* 构型。δ_C 91.0（C-17）和 δ_C 82.3（C-16）的化学位移表明 C-17 的羟基为 α 构型 [13]。

按照化合物 **1** 的方法将化合物 **4** 制备成单糖衍生物，与标准糖衍生物对比发现其单糖组成为 D-Glc 和 L-Rha，组成比为 2∶1。结合 NMR 谱可知，其端基氢信号为 δ_H 5.04（d，J = 7.0 Hz，Glc Ⅰ H-1），4.78（d，J = 7.0 Hz，Glc Ⅱ H-1），6.41（br s，Rha H-1）；端基碳信号为 δ_C 100.5（Glc Ⅰ C-1），104.6（Glc Ⅱ C-1），102.2（Rha C-1）。H-1（Rha）与 C-2（Glc Ⅰ，δ_H 4.39），H-1（Glc Ⅰ，δ_H 5.04）和苷元 C-3（δ_C 78.1）之间存在远程相关，说明了化合物中糖与苷元的连接位点。对比文献 [14] 发现，化合物 **4** 为已知化合物 26-*O*-β-D- 吡喃葡萄糖基 -17，22- 二羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-α-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）-β-D- 吡喃葡萄糖苷，首次从云南重楼中分离得到。

化合物 **5**：白色的无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 显色反应呈阳性，说明该化合物可能是皂苷类化合物。根据 ESI-MS 结果发现，化合物的准分子离子峰 *m/z* 为 1051.5325 $[M + H]^+$和 1049.5169 $[M - H]^-$，相对分子质量为 1050.5247，结合 NMR 谱可推导出化合物 **5** 的分子式为 $C_{50}H_{82}O_{23}$。与化合物 **4** 对比发现两者苷元部分的碳谱数据一致，确定化合物 **5** 为双糖链呋甾烷醇型甾体皂苷。特征的 ^{1}H-NMR 信号为：1.40（d，J = 7.2 Hz，H_3-21），1.02（d，J = 6.4 Hz，H_3-27），5.30（br s，H-6），4.84（d，J = 7.2 Hz，Glc Ⅰ H-1），4.96（d，J = 7.2 Hz，Glc Ⅱ H-1），数据见表 1。化合物 **5** 和文献 [15] 报道的已知化合物的波谱数据对比，确定化合物 **5** 为 26-*O*-β-D- 吡喃葡萄糖基 -17，22- 二羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-α-L- 呋喃阿拉伯糖

基 -（1 → 4）-[α-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-β-D- 吡喃葡萄糖苷，即已知化合物 parisyunnanoside A。

化合物 **6**：白色的无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 显色反应呈阳性，说明该化合物可能是皂苷类化合物。根据 ESI-MS 结果发现，化合物的准分子离子峰 *m/z* 为 1045.5219 $[M+H]^+$ 和 1043.5063 $[M-H]^-$，相对分子质量为 1044.5141，结合 NMR 谱可推导出化合物 **6** 的分子式为 $C_{51}H_{80}O_{22}$。其高场区域内分布着 4 个甲基氢信号 δ_H 1.01（s，H_3-18），1.08（s，H_3-19），2.03（d，J = 7.2 Hz，H_3-21）和 1.02（d，J = 6.4 Hz，H_3-27）与 ^{13}C-NMR 中的 δ_C 17.2，19.8，16.3，18.0 信号对应。NMR 谱显示该化合物结构中存在 1 个三取代烯烃信号 δ_H 5.30（H-6）、δ_C 121.9（C-6）及 δ_C 141.4（C-5），2 个季碳 δ_C 37.5（C-10）和 δ_C 43.9（C-13），2 个四取代烯烃碳信号 δ_C 143.1（C-17）、δ_C 146.2（C-20）和 2 个酮羰基碳信号 δ_C 206.3（C-22）、δ_C 211.0（C-16）。在 HMBC 谱中，H-4（δ_H 2.80）和 H-7（δ_H 1.70）与 C-5（δ_C 141.4）和 C-6（δ_C 121.9）均存在远程相关信号；H_3-21 分别与 C-17、C-20（δ_C 146.2）和 C-22（δ_C 206.3）存在远程相关信号；C-15（δ_C 38.5）与 C-14 和 C-16（δ_C 211.0）存在远程相关。说明化合物 **6** 的苷元中 2 个双键分别位于 5/6 位和 17/20 位。结合文献 [16] 推断化合物 **6** 的苷元为（25*R*）- 胆甾 -5，17（20）- 二烯 -16，22- 二酮 -3β，26- 二醇。

按照化合物 **1** 的方法将化合物 **6** 制备成单糖衍生物，与标准糖衍生物对比发现其单糖组成为 D-Glc 和 L-Rha，组成比为 1∶1。由 NMR 谱可知，4 个糖的端基氢信号分别为 4.04（d，J = 7.2 Hz，Glc Ⅱ H-1）、δ_H 5.04（d，J = 7.2 Hz，Glc Ⅰ H-1）、4.13（br s，Rha Ⅱ H-1）和 6.41（br s，Rha Ⅰ H-1），端基碳信号为 δ_C 100.8（Glc Ⅰ C-1），105.4（Glc Ⅱ C-1），102.6（Rha Ⅰ C-1）和 103.4（Rha Ⅱ C-1）。通过 HMBC 谱发现，H-1（Rha Ⅱ）与 C-4（Glc Ⅰ，δ_H 3.83），H-1（Rha Ⅰ，δ_H 6.34）与 C-2（Glc Ⅰ，δ_H 4.06），H-1（Glc Ⅰ，δ_H 4.78）和苷元 C-3（δ_C 78.1），H-1（Glc Ⅱ，δ_H 4.73）和苷元 C-26（δ_C 75.6）之间存在远程相关，说明了化合物中糖与苷元的连接位点。对比文献 [17] 发现，化合物 **6** 为已知化合物 26-*O*-β-D- 吡喃葡萄糖基 -3β，26- 二羟基 -（25*R*）- 胆甾 -5，17（20）- 二烯 -16，22- 二酮 -3-*O*-α-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[α-L- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-β-D- 吡喃葡萄糖苷，从云南重楼中首次分离得到。

化合物 1 ～ 6 苷元部分及糖基部分的数据见表 1 和 2。

表 1　化合物 1 ～ 6 苷元部分 ^{13}C-NMR 的数据 (200 MHz，CD_3OD)

Tab 1　^{13}C-NMR data of the aglycone moieties of compounds 1 ～ 6 (200 MHz，CD_3OD)

编号	化合物					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
1	85.1	84.4	38.5	38.6	38.0	37.6
2	37.6	37.8	30.7	30.7	30.9	30.6
3	69.2	68.6	78.6	78.1	78.4	78.1
4	43.5	43.7	39.5	39.5	39.3	39.4
5	139.4	139.2	141.9	141.9	141.6	141.4
6	126.1	125.1	122.4	122.6	122.2	121.9
7	32.6	32.3	32.5	33.2	33.0	32.2
8	34.1	33.0	32.2	32.9	32.6	31.2
9	51.1	50.9	51.8	51.7	50.8	50.4
10	43.3	42.8	38.2	38.1	37.9	37.5
11	24.8	24.0	21.5	22.0	21.8	21.4
12	41.0	41.2	36.7	40.9	32.5	36.5
13	41.7	41.4	45.1	41.8	45.7	43.9
14	57.9	57.3	55.1	57.7	53.8	51.0
15	33.0	32.8	38.5	32.8	32.9	38.5
16	84.2	83.6	84.1	82.3	90.9	211.0
17	58.8	58.6	183.2	91.0	91.2	143.1
18	17.2	16.9	15.8	16.8	18.0	17.2
19	15.3	15.1	19.9	19.8	19.9	19.8
20	44.3	43.7	129.7	40.8	44.1	146.2
21	70.9	70.2	8.4	15.9	11.0	16.3
22	111.6	111.2	213.8	120.1	111.9	206.3
23	71.7	71.1	57.9	37.0	37.4	39.2
24	83.5	82.1	29.4	28.7	28.8	28.4
25	144.5	143.7	33.1	34.8	34.6	33.9
26	62.2	61.9	77.0	76.0	75.8	75.6
27	114.1	113.7	17.9	18.0	17.8	18.0

4　结果与讨论

中药重楼在中医药行业中具有重要的经济和社会价值，近年来，尽管重楼已在云南、贵州等地实现大面积种植，但重楼是一种从出苗到入药需要 5 ～ 8 年的多年生草本植物，因其胚后熟的特点，导致植物繁殖率低，至少要种植 7 ～ 8 年才能出售，资源再生缓慢 [18]。重楼是云南白药等中国传统名药的主要类别，但因其巨大的药用和经济价值而被过度采挖，导致其需求量已经超过再生能力。此外，由于重楼属植物存在长期的异花授粉，品种间杂交混种情况严重，这对优质重楼规范化栽培以及种属植物的资源保护与开发利用带来挑战，因此，寻找重楼的优质种源，对其进行有效的资源保护迫在眉睫。

陕产云南重楼由于产地、气候等因素的差异，植物的二次代谢产物可能产生较大变化。因此，本文对陕产云南重楼的化学成分开展了研究，以

表 2　化合物 1 ～ 6 糖基部分的数据 (200 MHz，CD_3OD)

Tab 2　^{13}C-NMR data of the sugar moieties of compounds 1 ～ 6 (200 MHz，CD_3OD)

编号	化合物					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
	Glc	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ
1	100.5	100.3	100.7	100.5	100.6	100.8
2	76.9	76.3	77.9	77.8	77.9	78.3
3	88.9	88.7	78.2	79.4	78.2	78.2
4	70.5	69.9	77.5	72.2	77.5	79.1
5	77.5	77.7	77.2	77.7	77.2	77.5
6	63.5	63.1	61.9	62.8	61.8	61.8
	Rha Ⅰ	Rha	Rha	Rha	Rha	Rha Ⅰ
1	101.7	101.3	102.4	102.2	102.4	102.6
2	72.2	72.2	73.0	72.4	73.0	73.0
3	71.9	72.0	73.3	73.9	73.3	73.3
4	74.1	73.9	74.6	75.2	74.6	74.6
5	69.8	69.4	70.0	69.8	70.0	70.2
6	18.6	19.0	19.2	19.1	18.9	19.1
	Xyl	Xyl	Ara	Glc Ⅱ	Ara	Rha Ⅱ
1	105.3	105.1	110.1	104.6	110.2	103.4
2	74.9	74.7	83.2	75.8	83.4	73.1
3	78.0	78.3	78.4	79.2	78.8	73.5
4	70.9	70.6	87.2	72.1	86.9	74.4
5	67.1	67.2	63.0	79.0	62.9	70.9
6				62.8		19.0
	Gal	Gal Ⅰ	Glc Ⅱ		Glc Ⅱ	Glc Ⅱ
1	105.4	10.3	105.8		105.6	105.4
2	72.5	72.3	75.8		75.7	75.7
3	75.1	75.4	79.1		78.9	79.0
4	70.4	70.2	72.1		72.4	72.2
5	76.8	76.7	79.0		79.0	79.1
6	62.6	62.3	63.3		63.0	63.4
	Rha Ⅱ	Gal Ⅱ				
1	103.3	103.8				
2	69.9	70.6				
3	73.6	75.1				
4	73.3	71.0				
5	70.2	77.0				
6	16.1	62.7				

期为陕产云南重楼的资源开发和药理活性研究提供科学依据。本文报道的 6 个皂苷类成分包括 1 个环胆甾烷醇型甾体皂苷（化合物 **3**）、2 个呋甾烷醇型甾体皂苷（化合物 **4**、**5**）、1 个胆甾烷醇型皂苷（化合物 **6**）以及 2 个其他类型甾体皂苷（化合物 **1**、**2**），化合物 **3**、**4** 和 **6** 都能在云南重楼中分离获取。化合物 **3** 苷元的骨架比较特殊，在云南丫蕊花 [10]、吉林延龄草 [19] 和陕西狭叶重楼 [11] 中均有发现，且在云南重楼中为首次发现。陕产云南重楼除本文中报道的化合物外，还含有丰富的皂苷成分。未来将对化合物的成分及活性等展开深入的研究和探索，以期为相关药材的开发和应用提供重要的理论依据。

参考文献

[1] Yu LL，Ling SS，Gao WT，et al. Parisfargosides A-E，five new cholestane glycosides from the rhizomes of *Paris fargesii* [J]. Fitoterapia，2022，158：105174.

[2] Ji Y. A monograph of Paris（Melanthiaceae）[M]. Science Press edn，2020.

[3] Ding YG，Zhao YL，Zhang J，et al. The traditional uses，phytochemistry，and pharmacological properties of *Paris* L.（Liliaceae）：a review [J]. J Ethnopharmacol，2021，278：114293.

[4] Wei JC，Gao WY，Yan XD，et al. Chemical constituents of plants from the genus *Paris* [J]. Chem Biodivers，2014，11（9）：1277-1297.

[5] 李宛霖，李冰燕 . 滇重楼的研究现状与发展 [J]. 普洱学院学报，2021，37（3）：10-12.

[6] 高燕，李桂琳，姜艳，等 . 德宏地区滇重楼资源及种植情况调查 [J]. 热带农业科技，2020，43（1）：30-35.

[7] 樊培，陆云阳，刘杨，等 . 巴山重楼的皂苷类化学成分研究 [J]. 中南药学，2021，19（5）：794-800.

[8] Kang LP，Liu YX，Eichhorn T，et al. Polyhydroxylated steroidal glycosides from *Paris polyphylla* [J]. J Nat Prod，2012，75（6）：1201-1205.

[9] Jin LY，Lu TX，Qin XJ，et al. Two new highly oxygenated spirostanol saponins from *Paris polyphylla* var. *stenophylla* [J]. Nat Prod Bioprospect，2016，6（4）：205-210.

[10] Chen Y，Si YA，Ni W，et al. Ypsiyunnosides A-E，five new cholestanol glycosides from *Ypsilandra yunnanensis* [J]. Nat Prod Bioprospect，2016，6（3）：173-182.

[11] 胡晋铭，汤海峰，陆云阳，等 . 狭叶重楼中一个新的环胆甾烷醇型甾体皂苷 [J]. 中南药学，2022，20（4）：736-743.

[12] Challinor VL，Piacente S，De Voss JJ. NMR assignment of the absolute configuration of C-25 in furostanol steroidal saponins [J]. Steroids，2012，77（6）：602-608.

[13] Agrawal PK. Dependence of ^{1}H NMR chemical shifts of geminal protons of glycosyloxy methylene（H_2-26）on the orientation of the 27-methyl group of furostane-type steroidal saponins [J]. Magn Reson Chem，2004，42（11）：990-993.

[14] Ono M，Yanai Y，Ikeda T，et al. Steroids from the underground parts of *Trillium kamtschaticum* [J]. Chem Pharm Bull，2003，51（11）：1328-1331.

[15] Zhao Y，Kang LP，Liu YX，et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities [J]. Planta Medica，2009，75（4）：356-363.

[16] Zhao Y，Kang LP，Liu YX，et al. Three new steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* [J]. Magn Reson Chem，2007，45（9）：739-744.

[17] Ono M，Takamura C，Sugita F，et al. Two new steroid glycosides and a new sesquiterpenoid glycoside from the underground parts of *Trillium kamtschaticum* [J]. Chem Pharm Bull，2007，55（4）：551-556.

[18] 杨光义，胡培，叶方 . 重楼资源分布与可持续利用研究进展 [J]. 中国药师，2016，19（1）：159-162.

[19] Qin XJ，Si YA，Chen Y，et al. Cytotoxic steroidal saponins from *Trillium kamtschaticum* [J]. Bioorg Med Chem Lett，2017，27（11）：2267-2273.

（收稿日期：2023-11-01；修回日期：2023-12-15）

TREM2 在肝细胞癌中的表达与预后、免疫浸润及药物敏感性的分析

王文榜[1]，冯佳宁[1]，解辉平[1]，王淼[1]，余克富[2]，张志斐[1]，于德红[1*]（1.华北理工大学，河北　唐山　063000；2.首都医科大学附属北京天坛医院，北京　100071）

摘要：目的　基于生物信息学的方法分析肝细胞癌患者中髓系细胞触发受体 2（*TREM2*）基因表达水平与预后、免疫微环境及化疗药物敏感性的关联。**方法**　基于癌症基因组图谱（TCGA）、基因表达综合数据库（GEO）和国际癌症基因组联合体（ICGC）数据库分析 *TREM2* 在肝细胞癌组织中的表达差异；分析 *TREM2* 高、低表达组与肝细胞癌生存预后及免疫浸润的相关性；然后对 *TREM2* 进行 GO 和 KEGG、突变和药物敏感性分析。**结果**　*TREM2* 在肿瘤组织中的表达水平明显高于正常组织（$P < 0.001$）；*TREM2* 高表达组患者的总生存率（OS）显著低于低表达组（$P < 0.05$）。突变分析发现 *TP53* 基因在 *TREM2* 高表达组具有更高的突变频率。免疫分析结果表明 *TREM2* 的表达与肝细胞癌基质评分（$r = 0.36$，$P < 0.001$）、免疫评分（$r = 0.55$，$P < 0.001$）和 ESTIMATE 评分（$r = 0.50$，$P < 0.001$）成正相关；与调节性 T 细胞（Tregs）、M2 型巨噬细胞的免疫浸润水平成正相关（$P < 0.001$）。KEGG 和 GO 富集分析显示，*TREM2* 基因在细胞吞噬、肝癌细胞转移、免疫逃逸、炎症反应等生物学过程通路上高度富集。药物敏感性分析发现，*TREM2* 高表达组有较高敏感性的药物有索拉非尼、帕博利珠单抗、西罗莫司、硼替佐米和拉帕替尼（$P < 0.05$）。**结论**　*TREM2* 高表达的患者预后较差，且与免疫细胞浸润、肿瘤微环境有关，并有望成为肝细胞癌治疗的新靶点。

关键词：肝细胞癌；*TREM2*；生物信息；肿瘤微环境；药物敏感性
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0857-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.006

TREM2 expression in hepatocellular carcinoma and its correlation with prognosis, immune infiltration, and drug sensitivity

WANG Wen-bang[1], FENG Jia-ning[1], XIE Hui-ping[1], WANG Miao[1], YU Ke-fu[2], ZHANG Zhi-fei[1], YU De-hong[1*] (1. *North China University of Science and Technology*, *Tangshan Hebei* 063000; 2. *Beijing Tiantan Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100071)

Abstract: Objective　To analyze the association between *TREM2* gene expression level and prognosis, immune microenvironment, and drug sensitivity in chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. **Methods**　Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA), the Gene Expression Omnibus (GEO), and the International Cancer Genome Consortium (ICGC) databases were collected and *TREM2* expression differences in the hepatocellular carcinoma tissues were also conducted. We analyzed the correlation between *TREM2* high and low expression groups with regards to hepatocellular carcinoma survival prognosis and immune infiltration. We analyzed GO and KEGG enrichment, mutation, and drug sensitivity for *TREM2*. **Results**　The expression level of *TREM2* in the tumor tissues was significantly higher than that in the normal tissues ($P < 0.001$). The overall survival rate (OS) of patients in the high *TREM2* expression group was significantly lower than that in the low expression group ($P < 0.05$). Mutation analysis revealed a higher mutation frequency of the *TP53*

作者简介：王文榜，男，硕士研究生，主要从事生物信息学与天然药物化学研究，email：wwbjiayoua@163.com　*通信作者：于德红，女，教授，主要从事中药药效物质基础和质量控制研究，email：ydh613@126.com

gene in the high *TREM2* expression group. Immune analysis results indicated a positive correlation between *TREM2* expression and the hepatocellular carcinoma stroma score ($r = 0.36$, $P < 0.001$), the immune score ($r = 0.55$, $P < 0.001$), and the ESTIMATE score ($r = 0.50$, $P < 0.001$). *TREM2* expression was also positively correlated with immune infiltration levels of regulatory T cells (Tregs) and M2 macrophages ($P < 0.001$). KEGG and GO enrichment analysis showed that the *TREM2* gene was highly enriched in biological pathways related to cell phagocytosis, hepatocellular carcinoma cell migration, immune evasion, and inflammatory response. Drug sensitivity analysis identified increased sensitivity to drugs such as sorafenib, pembrolizumab, regorafenib, bortezomib, and apatinib in the high *TREM2* expression group ($P < 0.05$). **Conclusion** Patients with high *TREM2* expression have poor prognosis, which is associated with immune cell infiltration and tumor microenvironment, and expected to be a new target for hepatocellular carcinoma treatment.

Key words: hepatocellular carcinoma; *TREM2*; bioinformatics; tumor microenvironment; drug sensitivity

肝细胞癌位居全球范围内恶性肿瘤死亡原因的前列[1]，严重威胁人类健康。肝细胞癌具有高度的侵袭性和潜伏性，其早期诊断和有效治疗备受关注[2]。虽然肝细胞癌的临床治疗取得了一些进展，但其发病率高和复发率高，大多数患者在确诊时已经处于晚期[3]。肝细胞癌的发生和发展涉及复杂的分子机制，包括基因突变、异常信号传导以及肿瘤微环境的改变等[4]。此外，肝细胞癌往往伴随着慢性肝硬化和 / 或乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒感染等，这进一步提高了治疗的难度。这些因素共同导致肝细胞癌呈现出高度异质性，使得不同患者的肿瘤具备不同的分子特征和临床表现。

TREM2 基因（triggering receptor expressed on myeloid cells 2）是一种编码跨膜蛋白的基因，在阿尔茨海默病和代谢综合征等疾病中得到了广泛的研究[5]。但是，其与肝细胞癌患者临床信息、预后、免疫微环境等关系的研究却较为有限。近年来，随着大规模肿瘤基因组学项目如癌症基因组图谱（TCGA）和基因表达综合数据库（GEO）的建立，获得了大量有关肿瘤基因表达的数据。因此，本研究借助生物信息学工具，进行基因功能富集分析、生存分析以及药物预测等研究，旨在揭示肝细胞癌的分子特征和驱动机制，并为寻找新的治疗靶点和个体化治疗策略提供坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

从 TCGA 数据库（https：//portal.gdc.cancer.gov/）下载包括 50 例正常组织和 373 例肝细胞癌组织的 RNA 测序表达数据。从 GEO 数据库（https：www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）获取 GSE14520 数据集，其中包括 220 例正常样本和 225 例肝细胞癌样本的表达谱数据。从国际癌症基因组联合体（ICGC）数据库（https：dcc.icgc.org/）下载 197 例正常样本和 240 例肝细胞癌样本。

1.2 *TREM2* 在肝细胞癌中的表达

使用 R Studio 软件中的 ggplot2 包分析和呈现 *TREM2* 基因在 TCGA、GEO、ICGC 数据库中肝细胞癌组织和正常组织中的表达情况。

1.3 生存分析

在 TCGA 数据库中，以 *TREM2* 在肝细胞癌中表达量的中位数将患者分为高表达组和低表达组。使用 R Studio 软件中的 survival 包对 *TREM2* 高、低表达组患者的总生存期进行分析。

1.4 *TREM2* 在肝细胞癌中的突变分析

使用 R Studio 软件中的 maftools 包对 TCGA 数据库肝细胞癌的 *TREM2* 高、低表达组中基因的突变进行差异分析，绘制突变瀑布图展示分析结果。

1.5 免疫细胞浸润分析

使用 R Studio 软件，运用 Estimate 算法，通过表达谱估算肿瘤基质、免疫细胞浸润和 ESTIMATE 得分。使用 IOBR 包分析 TCGA 数据库肝细胞癌 *TREM2* 高、低表达组的免疫细胞浸润水平。

1.6 相关性分析

在 TCGA 数据库中，通过 Sperman 相关性分析，筛选出与 *TREM2* 和免疫评分相关性较高的基因，然后使用 clusterProfiler，enrichplot 包，对筛选后的基因进行 GO 和 KEGG 分析，以深入探索 *TREM2* 在肝细胞癌中的细胞定位和参与的生物学过程。

1.7 *TREM2* 的表达与药物敏感性预测

基于 *TREM2* 在 TCGA 数据库肝细胞癌组织中表达水平的中位数，将其分为高、低表达组，并借助 oncopredict 包预测 *TREM2* 高、低表达组对肝细胞癌常用化疗药物的敏感性分数。

1.8 统计学方法

采用 R 软件（版本 4.3.0）进行数据分析和呈现。肝细胞癌中基因表达差异分析采用 *t* 检验，使用 Kaplan-Meier 生存分析比较 *TREM2* 高、低表达组之间的生存差异，*TREM2* 相关基因、免疫评分相关基因的相关性分析采用 Sperman 相关系数。药物敏感性差异采用 Wilcoxon 秩合检验进行非参数检验。$P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　*TREM2* 在肝细胞癌中的表达

TREM2 在肝细胞癌和正常组织中的差异表达见图 1，在 TCGA、ICGC 和 GEO 数据库中，肝细胞癌组织中 *TREM2* 的表达量显著高于正常肝组织（$P < 0.001$）。

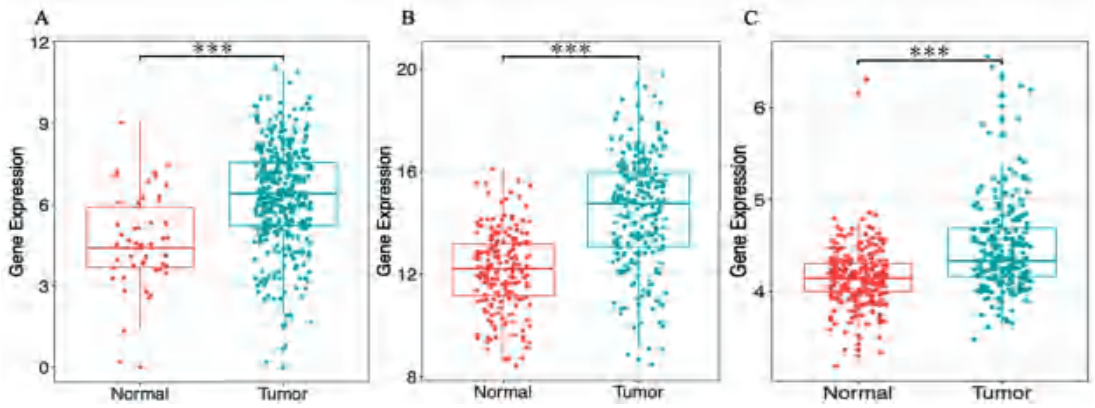


图 1　*TREM2* 在 TCGA（A）、ICGC（B）、GEO（C）数据库肝细胞癌组织中的表达

Fig 1　Expression of *TREM2* in hepatocellular carcinoma tissues in TCGA（A），ICGC（B），and GEO（C）databases

注（Note）：与正常组织相比，$^{***}P < 0.001$（Compared with the normal tissues group，$^{***}P < 0.001$）。

2.2　生存分析

在 TCGA 数据库中，*TREM2* 基因表达与肝细胞癌患者预后分析显示 *TREM2* 高表达组患者的总生存率（OS）显著低于低表达组（$P < 0.05$）（见图 2）。

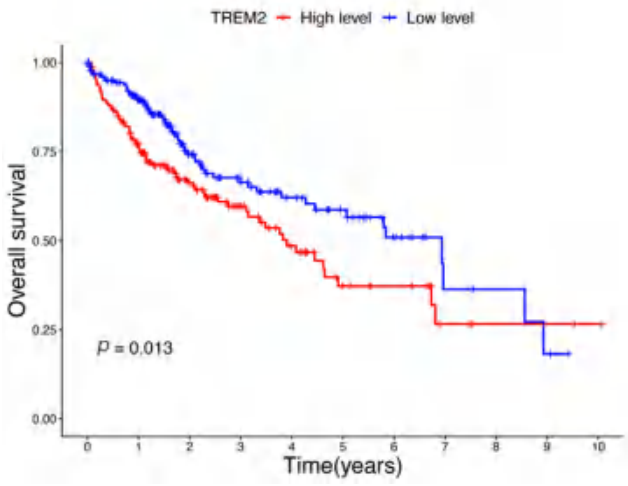


图 2　TCGA 数据库中 *TREM2* 与肝细胞癌患者总生存率的分析

Fig 2　*TREM2* and overall survival of hepatocellular carcinoma patients in TCGA database

2.3　突变分析

TREM2 在 TCGA 数据库肝细胞癌中的突变景观分析见图 3，结果显示 *TP53*（28%）的突变率最高，其次是 *CTNNB1*（26%）和 *TTN*（23%），并且这些突变以错义突变为主要。此外，从图 3 可见 *TREM2* 高表达组肿瘤组织中 *TP53* 的突变率高于低表达组。

2.4　免疫细胞浸润分析

TREM2 在肝细胞癌中的肿瘤微环境与免疫浸润分析显示 *TREM2* 的表达与肝细胞癌基质评分（$r = 0.36$，$P < 0.001$）、免疫评分（$r = 0.55$，$P < 0.001$）和 ESTIMATE 评分（$r = 0.50$，$P < 0.001$）成正相关（见图 4 ～ 5）。通过 Cibersort（见图 6）、Epic（见图 7）和 Mcp（见图 8）等三种算法计算不同免疫细胞分数，结果显示调节性 T 细胞（Tregs）、M2 型巨噬细胞、NK 细胞以及 $CD8^+$ T 细胞与 *TREM2* 表达具有高度的正相关性（$P < 0.001$）。

2.5　*TREM2* 的功能分析

筛选出 *TREM2* 相关系数大于 0.4 的基因集（*TREM2*.cor，共 322 个基因），以及与免疫评分相关系数大于 0.4 的基因集（ImmuneScore.cor，共 738 个基因），结果显示两个基因集的交集基因有 620 个。对这 620 个基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析，GO 分析显示肝细胞癌与细胞黏附、免疫激活等密切相关，涉及吞噬、细胞膜、免疫受体活性等。KEGG 分析则揭示了肝细胞癌细胞在生长、转移、免疫逃逸等方面存在异常的生物学过程（见图 9）。

2.6　*TREM2* 的表达与药物敏感性预测

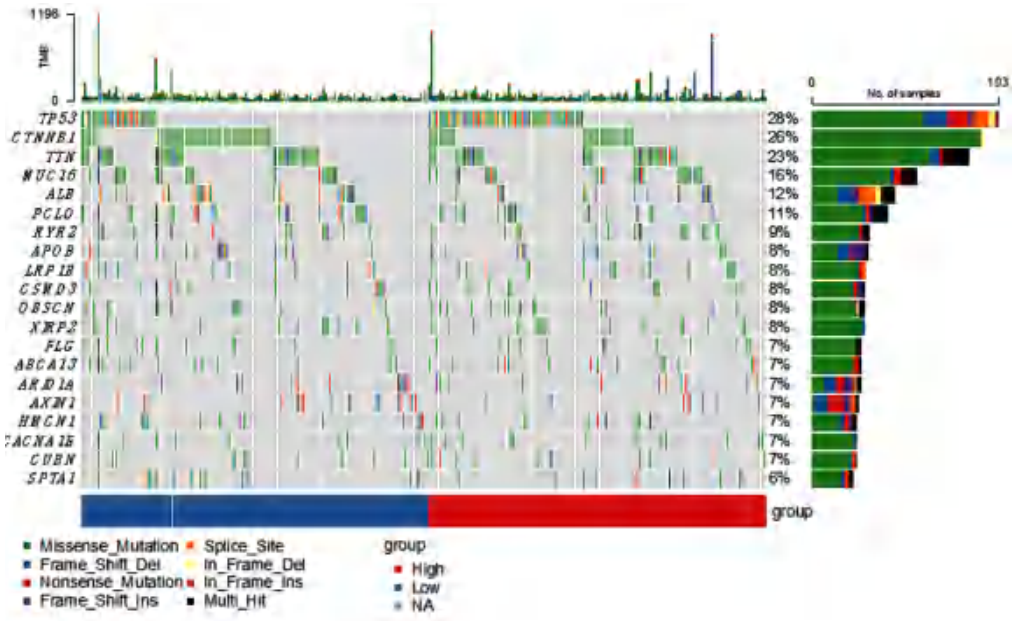


图 3　*TREM2* 在 TCGA 数据库中肝细胞癌样本的突变景观图

Fig 3　Mutation landscape of *TREM2* in hepatocellular carcinoma samples in TCGA

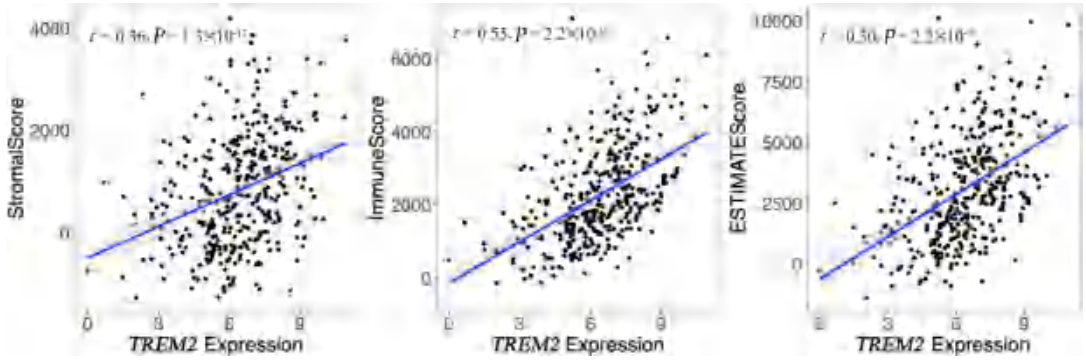


图 4　*TREM2* 表达与免疫和基质细胞评分相关性的散点图

Fig 4　Scatter plot of the correlation between *TREM2* expression and immune and stromal cell scores

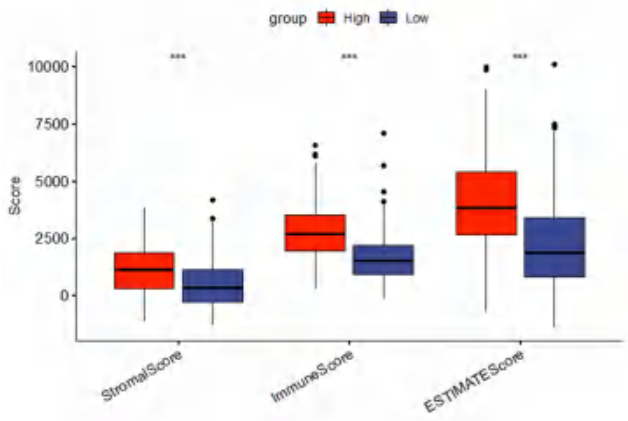


图 5　*TREM2* 表达与免疫和基质细胞评分相关性的箱式图

Fig 5　Box plot of the correlation between *TREM2* expression and immune and stromal cell scores

注（Note）：与低表达组相比，$^{***}P < 0.001$（Compared with the low expression group，$^{***}P < 0.001$）。

TREM2 基因表达与药物敏感性预测，使用癌症药物敏感性基因组学数据库（GDSC）数据库预测肝细胞癌组织中的 *TREM2* 表达水平与常见治疗药物敏感性分数之间的关系。结果显示，在 *TREM2* 高表达组中索拉非尼、帕博利珠单抗、西罗莫司、硼替佐米、拉帕替尼的敏感性分数较低（$P < 0.05$），提示 *TREM2* 高表达组患者可能对这些药物敏感（见图 10）。

3　讨论

肝细胞癌是肝癌的主要类型，约占中国肝癌病例的 80%[6]，其发病率和死亡率在全球范围内持续上升[7]。近年来，生物信息学迅猛发展，成为了更强有力的工具，能够深入研究肿瘤的分子机制以及潜在的治疗靶点。*TREM2* 属于免疫球蛋白超家族受体中触发髓系细胞表达受体（*TREM*）家族的成员[8]，其主要功能在于识别外来抗原和有毒物质，从而调节炎症反应。在肝脏中，*TREM2* 主要表达于非实质细胞，包括肝窦内皮细胞、库普弗细胞和肝星状细胞，同时也存在于响

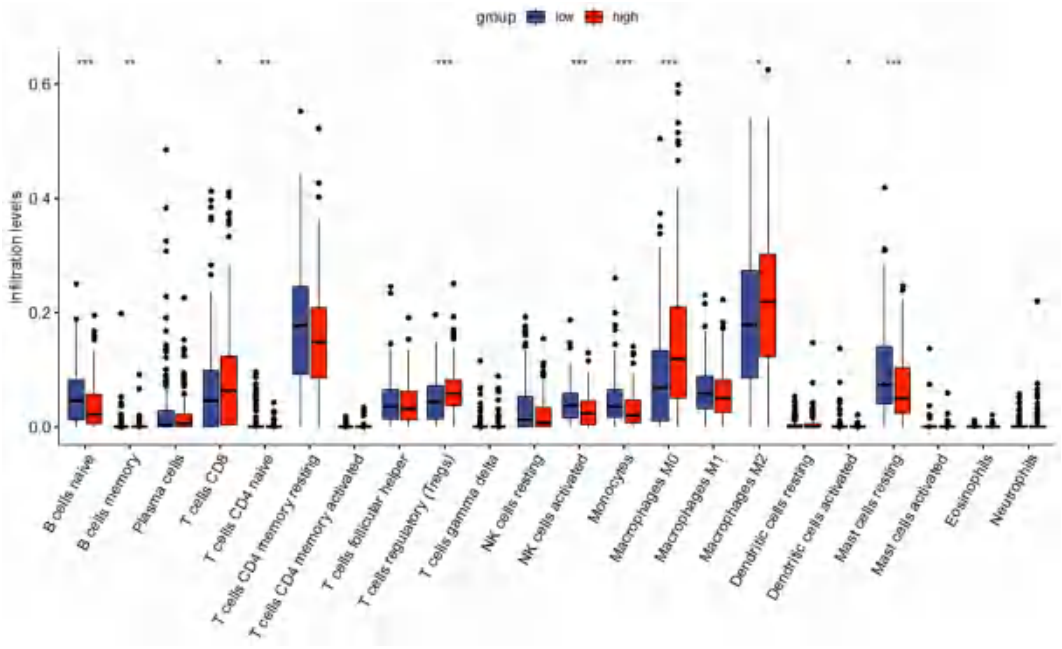


图 6　通过 Cibersort 算法计算不同免疫细胞分数

Fig 6　Immune cell scores by Cibersort algorithm

注（Note）：与低表达组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the low expression group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

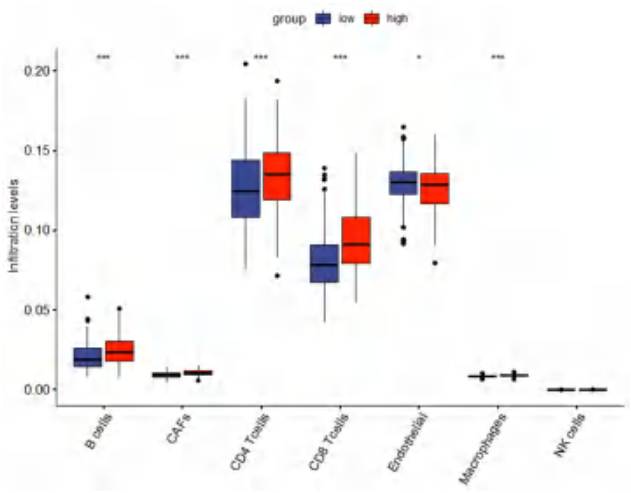


图 7　通过 Epic 算法计算不同免疫细胞分数

Fig 7　Immune cell scores by Epic algorithm

注（Note）：与低表达组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the low expression group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）。

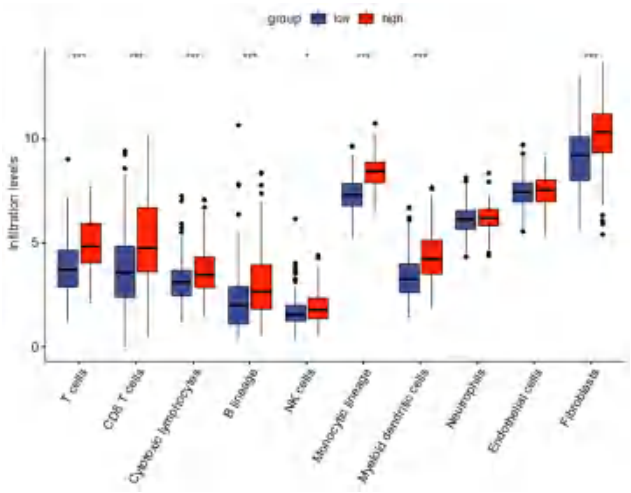


图 8　通过 Mcp 算法计算不同免疫细胞分数

Fig 8　Immune cell scores by Mcp algorithm

注（Note）：与低表达组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the low expression group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）。

应损伤而渗入肝脏的细胞中[9]。本研究通过生信分析技术，深入探究了 *TREM2* 对肝细胞癌的多方面影响，旨在揭示其在该疾病中的潜在作用和生物学意义。

通过对 TCGA 数据库的分析发现，*TREM2* 在肝细胞癌组织中的表达显著高于正常组织。这一结果与 Zhou 等[10]对肝细胞癌的单细胞 RNA 测序研究结果一致，强调了 *TREM2* 在肝细胞癌中的重要性。通过对 GEO 数据库和 ICGC 数据库中的肝细胞癌样本数据的进一步分析，发现了 *TREM2* 高表达在 TCGA、ICGC 和 GEO 三个不同数据集中的一致性，证实了结果的可靠性。本课题接下来将进行 PCR（Polymerase Chain Reaction）或者蛋白质免疫印迹法（Western blot）实验验证，进一步证明结果的可靠性。

通过对 *TREM2* 与肝细胞癌患者预后的关联性分析发现，*TREM2* 高表达与总生存率显著相关。这表明 *TREM2* 可能是肝细胞癌预后不良因

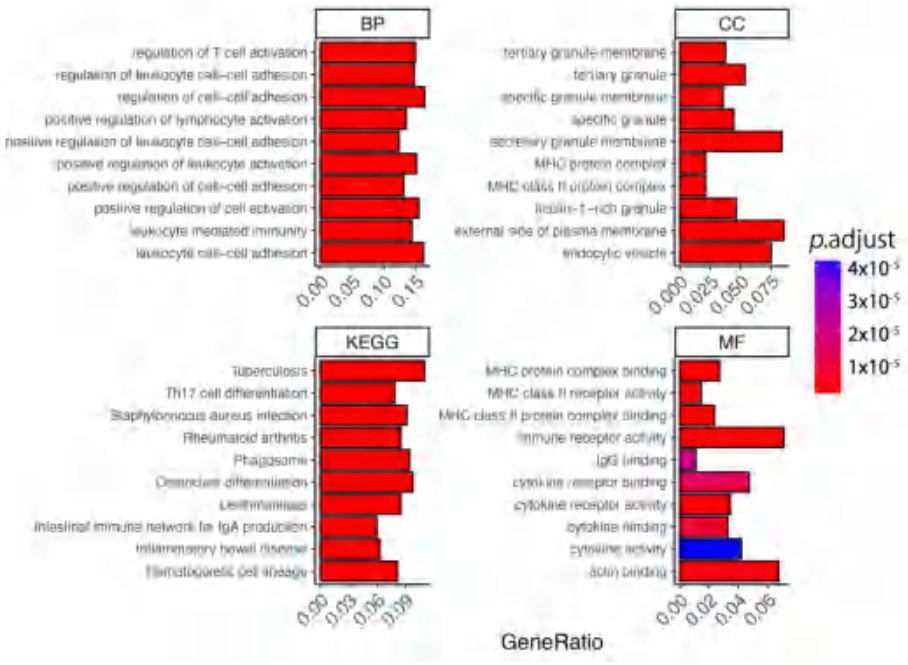


图 9　相关基因集进行 GO 和 KEGG 功能富集分析

Fig 9　GO and KEGG functional enrichment analysis of related gene sets

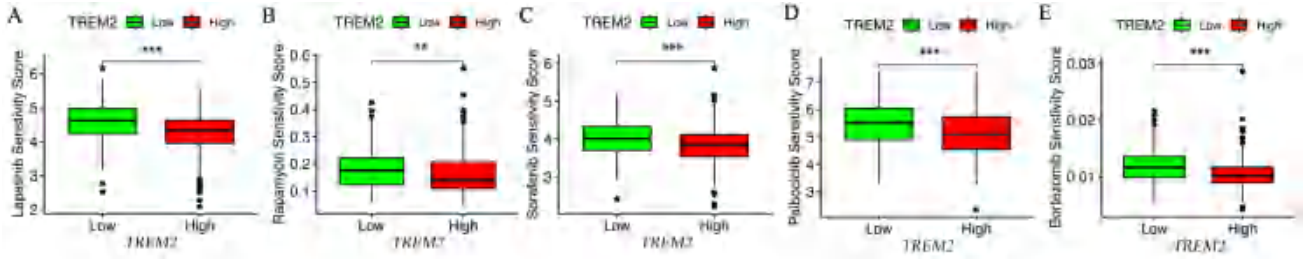


图 10　*TREM2* 基因表达与药物敏感性预测（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 10　*TREM2* gene expression and drug sensitivity prediction（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

素，具有临床预测价值[11]。

肿瘤微环境是一个高度复杂的生态系统，在癌症的发生、发展和远程转移过程中扮演着至关重要的角色[12]。肿瘤微环境由多种细胞类型和分子组分组成，包括 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等[13]。三种免疫浸润的算法分析揭示了 Tregs 细胞、$CD8^+$ T 细胞、M2 型巨噬细胞及 NK 细胞等免疫细胞浸润水平与 *TREM2* 表达相关。其中，高水平的 Tregs 在肿瘤内部或者周围血液中的存在被视为肝细胞癌不良预后的指标[14]。同样 M2 型巨噬细胞在高表达组中的免疫浸润水平较高。在肿瘤的进展过程中，肿瘤相关巨噬细胞（TAM）通常会发生极性转化，从 M1 型向 M2 型转化，通过调节复杂的信号通路来调控生物学过程，包括血管生成、免疫抑制和慢性炎症反应等生物过程，从而促进肿瘤的进展[15]。而且，*TREM2* 的参与可能会进一步丰富肿瘤微环境的免疫调节网络。作为一种具有免疫调控功能的分子[16]，*TREM2* 有可能通过与免疫细胞的相互作用来影响肿瘤免疫逃逸。因此，若使 *TREM2* 基因失活或阻断或将有助于提高肿瘤免疫反应及抑制肿瘤的发展。这一发现为探索 *TREM2* 在免疫治疗中的潜在作用提供了新的线索，为开发更加个体化的免疫疗法提供了坚实的基础。

富集分析揭示，*TREM2* 基因在细胞吞噬、免疫逃避以及炎症反应等生物学通路中表现出显著的富集现象。细胞凋亡碎片的内部吞噬可以预防继发性坏死以及避免释放内源性促炎危险信号。然而，*TREM2* 在促进内部吞噬过程的同时也抑制了免疫激活的过程[17-19]。由此展示了在肝细胞癌中，*TREM2* 可能通过调控不同层面的肿瘤生物学过程来发挥重要作用[20]。这些富集通路的深入解析有望揭示 *TREM2* 在肝细胞癌中的具体作用机制。

一般适用于其他癌症的化疗药物难以对肝细胞癌产生有效治疗效果，因为这些药物在肝细胞癌患者中往往耐受或难以取得显著的疗效[21]。药

物敏感性分析结果表明，高表达的 *TREM2* 可能对索拉非尼、帕博利珠单抗、西罗莫司、硼替佐米、拉帕替尼具有较高的敏感性，然而，高敏感性药物与预后并不总是相关，尽管 *TREM2* 高表达对这些药物的敏感性增加，但这些药物的敏感性可能会伴随着药物耐药性的产生，进而减弱了药物的疗效。此外，*TREM2* 高表达与免疫逃逸和炎症反应等生物学过程相关，可能会导致免疫微环境处于抑制状态，从而导致较差的预后。这些结果强调了 *TREM2* 在肝细胞癌中的多面性作用，既与药物敏感性有关，又与免疫微环境和疾病预后存在复杂的关联。这将为 *TREM2* 作为治疗靶点开发个体化的药物治疗方案提供更多的思路。但是仍需要进一步的实验验证，以确认 *TREM2* 是否可作为肝细胞癌治疗的有效药物靶点。

综上所述，本研究通过综合生物信息学分析，深入探讨了 *TREM2* 在肝细胞癌中多方面的作用，包括表达水平、预后影响、免疫浸润关联性、生物学过程以及药物敏感性等。研究结果表明，*TREM2* 可能作为肝细胞癌的预后评估指标，与免疫细胞浸润、肿瘤微环境密切相关，并通过炎症和免疫相关通路调控肝细胞癌的发展。但是，本研究还存在一些局限性，例如基于公共数据库的分析结果仍需要在临床样本中得到验证。未来的研究可以进一步深入探索 *TREM2* 在肝细胞癌中的具体作用机制，从而为肝细胞癌的治疗提供新的思路和方案。

参考文献

[1] Llovet JM，Castet F，Heikenwalder M，et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Clin Oncol，2022，19（3）：151-172.

[2] Sangro B，Sarobe P，Hervás-Stubbs S，et al. Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2021，18（8）：525-543.

[3] Singal AG，Lampertico P，Nahon P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma：new trends [J]. J Hepatol，2020，72（2）：250-261.

[4] Llovet JM，Pinyol R，Kelley RK，et al. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma [J]. Nat Cancer，2022，3（4）：386-401.

[5] Deczkowska A，Weiner A，Amit I. The physiology，pathology，and potential therapeutic applications of the TREM2 signaling pathway [J]. Cell，2020，181（6）：1207-1217.

[6] 潘晓娟 . 晚期原发性肝癌免疫治疗现状及研究进展 [J]. 婚育与健康，2023，29（12）：37-39.

[7] Chakraborty E，Sarkar D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma（HCC）[J]. Cancers（Basel），2022，14（11）：2798.

[8] 韩雪，夏天娇，刘斌文，等 . TREM2 介导小胶质细胞吞噬功能在神经退行性疾病中的作用 [J]. 中国免疫学杂志，2022，38（11）：1388-1394.

[9] Sun HF，Feng JG，Tang LL. Function of TREM1 and TREM2 in liver-related diseases [J]. Cells，202，9（12）：2626.

[10] Zhou LS，Wang ML，Guo HR，et al. Integrated analysis highlights the immunosuppressive role of TREM2 $^{+}$ macrophages in hepatocellular carcinoma [J]. Front Immunol，2022，13：848367.

[11] Wang TB，Chen B，Meng T，et al. Identification and immunoprofiling of key prognostic genes in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma [J]. Bioengineered，2021，12（1）：1555-1575.

[12] Schreiber RD，Old LJ，Smyth MJ. Cancer immunoediting：integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion [J]. Science，2011，331（6024）：1565-1570.

[13] Anderson NM，Simon MC. The tumor microenvironment [J]. Curr Biol，2020，30（16）：R921-R925.

[14] 李江，黄志勇 . 肝癌免疫微环境与免疫治疗研究进展 [J]. 临床外科杂志，2021，29（11）：1089-1091.

[15] Liu YY，Zhou XX，Wang X. Targeting the tumor microenvironment in B-cell lymphoma：challenges and opportunities [J]. J Hematol Oncol，2021，14（1）：125.

[16] 李晓月，倪赛佳，姚增莹，等 . TREM2 在阿尔兹海默症中的研究进展 [J]. 中国药理学通报，2020，36（8）：1049-1053.

[17] Hamerman JA，Jarjoura JR，Humphrey MB，et al. Cutting edge：inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells（TREM）-2 and DAP12 [J]. J Immunol，2006，177（4）：2051-2055.

[18] Ito H，Hamerman JA. TREM-2，triggering receptor expressed on myeloid cell-2，negatively regulates TLR responses in dendritic cells [J]. Eur J Immunol，2012，42（1）：176-185.

[19] Turnbull IR，Gilfillan S，Cella M，et al. Cutting edge：TREM-2 attenuates macrophage activation [J]. J Immunol，2006，177（6）：3520-3524.

[20] Ng CKY，Dazert E，Boldanova T，et al. Integrative proteogenomic characterization of hepatocellular carcinoma across etiologies and stages [J]. Nat Commun，2022，13（1）：2436.

[21] Lohitesh K，Chowdhury R，Mukherjee S. Resistance a major hindrance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma：an insight [J]. Cancer Cell Int，2018，18：44.

（收稿日期：2023-10-27；修回日期：2023-12-05）

白杨素脂质体的制备工艺优化及抗神经炎症活性研究

贾文[1]，丁文华[1]，汪凯康[1]，王丹[2]，徐维平[1, 2, 3*]（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 230027；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，合肥 230001）

摘要：目的 优化白杨素脂质体的制备工艺并研究其体外抗神经炎症活性。**方法** 采用乙醇注入法制备白杨素脂质体，根据单因素实验结果，通过 Box-Behnken 响应面筛选最优处方并表征。细胞毒性实验确定白杨素及其脂质体的安全药物浓度范围，利用脂多糖（LPS）诱导的 BV2 细胞分析白杨素脂质体的抗神经炎症活性。**结果** 白杨素脂质体最佳制备工艺参数：磷脂与胆固醇比 7.86∶1、搅拌速度 615 r·min^{-1}、水浴温度 60 ℃，制备的白杨素脂质体形态呈椭圆球形，包封率为（85.01±0.33）%，平均粒径为（141.43±0.5）nm，平均 PDI 为（0.240±0.021），体外释药具有明显的缓释特征。细胞实验结果显示，在 0 ～ 100 μmol·L^{-1} 实验浓度范围内，空白脂质体对 BV2 细胞无明显的细胞毒性。抗炎性能分析表明，相较于游离白杨素，白杨素脂质体对 LPS 诱导的 BV2 细胞具有更强的抗炎效果，且在使用范围（＜ 25 μmol·L^{-1}）内无细胞毒性。**结论** 本研究成功制备并优化了白杨素脂质体，该制剂提高了白杨素的溶解度和体外释放性能，同时展现出良好的体外抗炎活性，为未来白杨素新剂型的开发提供了理论基础。

关键词：白杨素；脂质体；响应面法；神经炎症
中图分类号：R283，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0864-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.007

Preparation optimisation and anti-neuroinflammation activity of liposomes chrysin

JIA Wen[1], DING Wen-hua[1], WANG Kai-kang[1], WANG Dan[2], XU Wei-ping[1, 2, 3*] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *University of Science and Technology of China*, *Hefei* 230027; 3. *Anhui Institute of Gerontology*, *Department of Gerontology*, *First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China*, *Hefei* 230001)

Abstract: Objective To optimize the preparation of chrysin liposomes by response surface methodology and determine their in vitro anti-neuroinflammation activity. **Methods** The chrysin liposome was prepared by ethanol injection. According to the results of single factor experiment, the optimal prescription was screened and characterized by Box-Behnken response surface. Cytotoxicity experiments determined the safe drug concentration range of chrysin and chrysin liposome, and lipopolysaccharide (LPS) was used to analyze the anti-neuroinflammation activity in BV2 cells. **Results** Parameters for the optimal preparation of chrysin liposomes were as follows: lipid-cholestero 7.86∶1, stirring at 615 r·min^{-1}, and temperature at 60 ℃. The morphology of chrysin liposome prepared under this condition was elliptical, with encapsulation rate (85.01±0.33)%, the average particle size (141.43±0.5) nm, and PDI (0.240±0.021). In vitro drug release showed obvious characteristics of sustained release. In vitro cell experiments indicated: the experimental concentration range of 0 ～ 100 μmol·L^{-1}, blank liposomes without cells cytotoxicity on BV2 microglia. Anti-inflammatory performance indicated that as compared to free chrysin, chrysin liposomes had stronger anti-inflammatory effecting, and were no cytotoxicity within the range of use (＜ 25 μmol·L^{-1}). **Conclusion** This study successfully prepares and optimizes chrysin liposomes, improves the

基金项目：国家自然科学基金项目（No.52072360）。

作者简介：贾文，女，硕士，主要从事新技术与新剂型，email：jw958020@163.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、药理学研究，email：weipingx@ustc.edu.cn

solubility and release performance of chrysin in vitro, and showes good anti-inflammatory activity in vitro, providing a theoretical basis for the development of new formulations of chrysin.

Key words: chrysin; liposome; response surface methodology; neuroinflammation

白杨素（chrysin）是一种天然黄酮类化合物[1-3]，具有多种生物活性，如抗肿瘤、抗菌、抗抑郁、降血脂和抗神经炎症等[4-6]；白杨素也是蜂胶的有效成分[7]。由于其独特的药理活性和潜在的药用价值，近年来对白杨素的抗神经炎症研究越来越受到关注。研究表明，白杨素可以抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的活化，减少细胞因子、趋化因子和活性氧（ROS）的产生，从而减轻神经炎症[8]。此外，白杨素还可以抑制 NF-κB 和 MAPK 信号通路，从而抑制炎性因子的表达[9-10]。但在实际应用中，由于白杨素存在水溶性差、生物利用度低等缺点限制了其进一步应用。

脂质体与传统的纳米递送系统相比，其与生物膜结构类似，使得脂质体具有出色的细胞亲和性和组织相容性，能够提高药物的生物利用度。同时脂质体可以降低药物的毒性和副作用，通常作为药物和营养物质的优良载体[11-12]。因此，脂质体在药物传输领域具有广泛的应用前景。小胶质细胞是中枢神经系统的免疫细胞，能够持续调节中枢神经系统的稳态[13]。异常激活的小胶质细胞通过分泌多种促炎因子显著增加神经炎症和神经毒性[14]。因此，小胶质细胞常被用作神经炎症的细胞实验模型。

尽管目前关于白杨素脂质体的制备已有相关报道，但其应用仍具有一定的局限性。Huang 等[15]制备的白杨素脂质体未对缓释性进行考察，且制备过程中使用的丙酮具有一定毒性，使制剂的安全性有待商榷。Deshmukh 等[16]采用薄膜水化和静电沉积方法制备白杨素脂质体，工艺较为烦琐，且所得脂质体粒径较大。此外，以往文献报道的白杨素脂质体未对脑部神经退行性疾病进行研究，因此，本研究拟采用乙醇注入法制备白杨素脂质体，通过 Box-Behnken 响应面设计筛选一种简单、安全的处方工艺，对其粒径大小和分布以及微观形貌进行表征，并初步评价其对脂多糖（LPS）诱导的 BV2 细胞炎症的保护作用，以期为后续白杨素制剂的研发和抗神经炎症治疗提供参考。

1　材料

1.1　仪器

Light Cycler 96 荧光定量 PCR 仪（美国罗氏公司）；ZNCL-DLS130*70 磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限公司）；HT7700 透射电子显微镜（日本日立公司）；超声波破碎仪（上海达洛科学仪器有限公司）；BS224S 万分之一电子天平（德国赛多利斯公司）；Beckman 紫外分光光度计 DU530（北京兴延诚博科技有限公司）；NanoBrook 90PlusPALS 粒径仪（美国布鲁克海文公司）；ReadMax 1200 型光吸收全波长酶标仪（上海闪谱生物科技有限公司）。

1.2　细胞与试药

小鼠小胶质细胞（BV2）(上海富衡生物科技有限公司)；白杨素对照品（纯度≥ 99.0%，美国 Sigma 公司，批号：BCCG4179）；白杨素（批号：C12423724）、胆固醇（上海麦克林生化科技有限公司）；大豆磷脂（艾伟拓医药科技有限公司）；LPS（美国 Sigma 公司）；CCK-8 试剂盒（亚科因生物技术有限公司）；DMEM 培养基（上海达特希尔生物科技有限公司；SPARKeasy 细胞 RNA 快速提取试剂盒（思科捷技术有限公司）；PerfectStart Uni RT&qPCR Kit 试剂盒（全式金生物技术有限公司）；MD3544-5 普通型透析袋（上海源叶生物科技有限公司）。

2　方法与结果

2.1　白杨素分析方法的建立

2.1.1　检测波长的确定　取 10 mg 白杨素对照品，加无水乙醇溶解并稀释至 5 μg·mL^{-1}。在 200 ～ 400 nm 范围内进行全波长扫描。测得白杨素对照品最大吸收峰在 269 nm，且空白脂质体在此波长处无吸收，因此确定白杨素的检测波长为 269 nm。

2.1.2　标准曲线的绘制　取 10 mg 白杨素对照品用无水乙醇配制成 200 μg·mL^{-1} 母液，依次稀释成 2 ～ 10 μg·mL^{-1} 白杨素溶液。在 269 nm 的最大吸收波长处测其吸光度。以白杨素浓度为横坐标、吸光度（A）值为纵坐标，绘制标准曲线方程为：$Y = 0.1196X - 0.0211$，$R^2 = 0.9993$（$n = 3$），结果表明，白杨素对照品溶液在 2 ～ 10 μg·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.1.3　精密度试验　取质量浓度为 3、6、9 μg·mL^{-1} 白杨素对照品溶液于 269 nm 处进行检测，平行操作 3 次。结果显示，3 种浓度的白杨素对照品溶液日内精密度 *RSD* 分别为 0.61%、0.88%、0.54%，日间精密度 *RSD* 分别为 1.6%、1.2%、0.78%，*RSD* 值均＜ 2%，表明仪器的精密度良好。

2.1.4　回收试验　取 3 组 3 mL 空白脂质体置 10 mL 量瓶中，分别加入 1 mL 质量浓度为 3、6、9 μg·mL^{-1} 白杨素对照品溶液，甲醇定容，于

269 nm 处检测吸光度，按标准曲线对其结果进行分析，平行操作 3 次。计算回收率分别为 99.70%（*RSD* ＝ 0.81%），101.13%（*RSD* ＝ 0.42%），98.46%（*RSD* ＝ 0.67%），*RSD* 值均＜ 1%，符合方法学要求。

2.2　白杨素脂质体的制备 [17]

称取处方量的大豆磷脂、胆固醇、白杨素置于烧杯中，加入 10 mL 无水乙醇溶解。将此混合溶液匀速滴加到 60 ℃水浴的 30 mL 去离子水中，600 r • min^{-1} 搅拌一定时间待有机溶剂完全挥发，混悬液用细胞破碎仪探头超声 10 min，每超声 10 s，暂停 10 s。0.22 μm 有机滤膜过滤，得白杨素脂质体。利用上述方法制备不含白杨素的空白脂质体。

2.3　白杨素脂质体包封率的测定

白杨素为强疏水性药物，未被包封的游离药物常以微粒的形式存在于溶液中，因此采用低速离心法 [18-19] 测定白杨素脂质体包封率。取 1 mL 白杨素脂质体在 4500 r • min^{-1} 条件下离心 15 min，分离含药脂质体和游离的白杨素。取 200 μL 上清液，甲醇定容至 5 mL，检测吸光度值，计算被包封白杨素的量（W_1）。另取白杨素脂质体 100 μL 置 5 mL 量瓶中，甲醇定容，检测吸光度值，计算白杨素总量（W_2）。包封率＝ W_1/W_2×100%。

2.4　单因素考察白杨素脂质体处方及制备工艺

根据前期预实验结果，通过单因素实验分别考察磷脂与胆固醇比（4∶1、5∶1、6∶1、7∶1、8∶1、9∶1）、搅拌速度（400、500、600、700、750、800 r • min^{-1}）、水浴温度（45、50、55、60、65 ℃）、有机相注入速度（0.3、0.6、0.9、1.5、2 mL • min^{-1}）对白杨素脂质体包封率的影响。

由图 1A 可知，以磷脂与胆固醇比例为（4∶1、5∶1、6∶1、7∶1、8∶1、9∶1）时，制备的白杨素脂质体包封率分别为 51.65%、53.21%、53.50%、57.93%、81.76%、59.43%。胆固醇含量对脂质体膜稳定性有很大影响，进而影响脂质体包封率 [20]。因此需选择适宜比例的胆固醇制备脂质体。

由图 1B 可知，以搅拌速度（400、500、600、700、750、800 r • min^{-1}）制备的白杨素脂质体包封率分别为 41.33%、43.52%、53.50%、51.39%、46.52%、40.37%。当搅拌速度为 600 r • min^{-1} 时，白杨素脂质体包封率最大，随着搅拌速度的增加，其包封率呈现先增大后减小的趋势，说明适宜的搅拌速度可增加脂质体包封率。

由图 1C 可知，以水浴温度（45、50、55、60、65 ℃）制备的脂质体包封率分别为 39.69%、45.63%、46.81%、53.50%、41.42%，水浴温度在 60 ℃时包封率最大，因此乙醇注入法制备脂质体需选择合适的水浴温度。

由图 1D 可知，以有机相注入速度（0.3、0.6、0.9、1.5、2 mL • min^{-1}）制备脂质体，得到的包封率分别为 52.68%、48.34%、51.39%、53.50%、50.85%，注入速度对脂质体包封率几乎没有影响，缓慢注入虽然滴入后的状态良好，但由于磷脂处于高温状态，难以保证其不氧化 [21]。而高速注入制备的脂质体状态不佳，因此选择 1.5 mL • min^{-1} 注入速度。

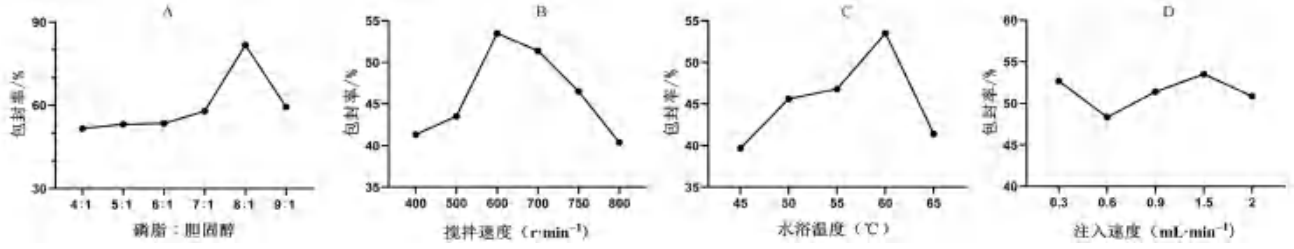


图 1　四个因素对白杨素脂质体包封率的影响

Fig 1　Influence of four factors on the encapsulation rate of chrysin liposomes

2.5　Box-Benhnken 响应面法优化最佳处方

2.5.1　响应面实验设计方案及结果　在“2.4”项单因素实验的基础上，选取磷脂与胆固醇比（A）、搅拌速度（B）、水浴温度（C）作为考察因素，以包封率为响应值，进行三因素三水平的响应面实验设计，对白杨素脂质体的制备工艺进行优化。编码值为 0 代表中心值，－ 1 代表最小值，1 代表最大值，因素水平如表 1 所示。根据实验设计方案测定不同条件下的白杨素脂质体包封率，结果最优处方为：磷脂与胆固醇比为 8∶1、搅拌速度为 600 r • min^{-1}、水浴温度为 60 ℃，包封率为 84.96%，结果见表 2。

2.5.2　回归方程拟合及方差分析　使用 Design Expert 8.0.6 软件对各因素进行分析，得到二次回归方程：$Y = 83.76 - 2.64A + 2.76B + 3.64C - 7.70AB + 4.43AC + 2.45BC - 12.44A^2 - 13.52B^2 - 19.65C^2$（$R^2 = 0.9876$）。分析该方程，由表 3 可知，模型的 $F = 57.55$，$P < 0.0001$，差异有统计学意义，而失拟项 $F = 5.13$，$P = 0.0741$，说明此模型适用于白杨素脂质体的工艺优化。

表 1　响应面设计因素和水平

Tab 1　Factor and level for response surface design

水平	因素		
	A 磷脂与胆固醇比	B 搅拌速度 /（r • min^{-1}）	C 水浴温度 /℃
－1	7∶1	500	55
0	8∶1	600	60
1	9∶1	700	65

表 2　响应面设计实验方案及结果

Tab 2　Response surface design test and results

编号	A	B	C	包封率 /%
1	0	1	－1	49.91
2	0	0	0	84.65
3	1	－1	0	59.80
4	－1	－1	0	51.94
5	0	1	1	58.45
6	0	0	0	84.96
7	－1	0	－1	52.14
8	0	0	0	84.87
9	0	0	0	83.26
10	0	0	0	81.06
11	－1	1	0	71.21
12	0	－1	－1	47.62
13	1	0	1	60.05
14	－1	0	1	54.22
15	1	1	0	48.26
16	1	0	－1	40.27
17	0	－1	1	46.36

2.5.3　响应面交互作用分析与优化条件的确定　由图 2 可看出，3 个因素对白杨素脂质体包封率的影响顺序为水浴温度＞搅拌速度＞磷脂与胆固醇比，与表 3 方差分析结果一致。利用回归模型进行优化，得到最佳条件的预测值为磷脂与胆固醇比 7.86∶1、搅拌速度 615 r • min^{-1}、水浴温度 60 ℃，包封率为 84.30%。为验证实验准确性和可重复性，进行 3 次重复实验得到验证结果包封率分别为 84.63%、85.14%、85.26%，平均包封率为（85.01±0.33）%。包封率结果与数学模型预测值接近，验证了该模型的准确性和可靠性。

表 3　包封率回归模型方差分析

Tab 3　Analysis of variance for regression model of encapsulation rate

因素	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	3947.23	9	438.58	57.55	＜0.0001
A	55.81	1	55.81	7.32	0.0304
B	61.11	1	61.11	8.02	0.0253
C	106.14	1	106.14	13.93	0.0073
AB	237.31	1	237.31	31.14	0.0008
AC	78.32	1	78.32	10.28	0.0149
BC	24.01	1	24.01	3.15	0.1192
A^2	651.2	1	651.2	85.46	＜0.0001
B^2	769.79	1	769.79	101.02	＜0.0001
C^2	1626.4	1	1626.4	213.43	＜0.0001
残差	53.34	7	7.62		
失拟项	42.34	3	14.11	5.13	0.0741
纯误差	11	4	2.75		
总离差	4000.57	16			

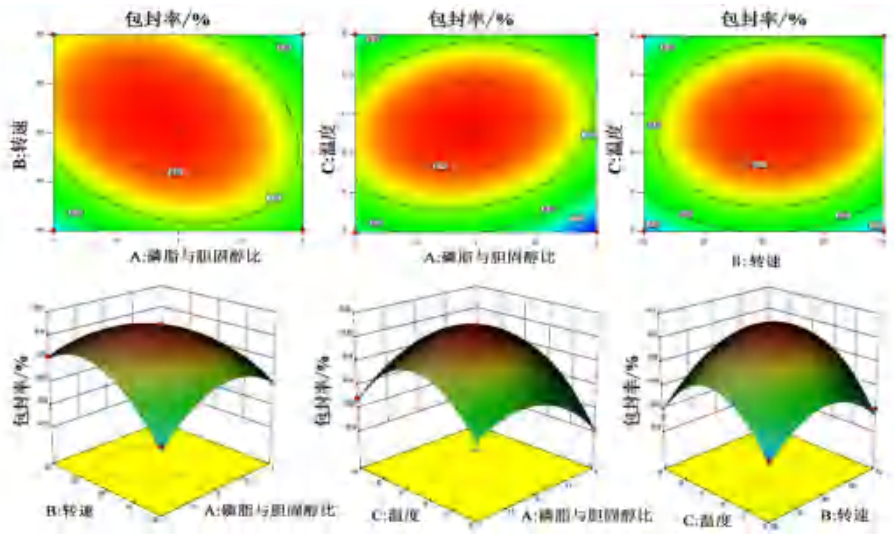


图 2　各因素间交互作用的响应面及等高线图

Fig 2　Response surface and contour map of interaction between each factor

2.6　白杨素脂质体的质量评价

2.6.1　粒径和多分散指数（PDI）的测定　粒径与 PDI 值对脂质体的质量和稳定性非常重要[22-23]。白杨素脂质体粒径和 PDI 结果如图 3 所示，室温（约 25 ℃）条件下，白杨素脂质体粒径均匀且分布较窄，平均粒径为（141.43±0.5）nm，平均 PDI 为（0.240±0.021）。表明白杨素脂质体具有较好的稳定性。

2.6.2　透射电镜（TEM）观察脂质体形态　由图 4A 可知，白杨素脂质体外观呈现澄清并伴有淡蓝色乳光的半透明乳状液。取 5 μL 白杨素脂质体溶液滴加到铜网上，使用 2.0% 磷钨酸钠负染色，自然风干后用 TEM 观察结构。由图 4B 可知，白

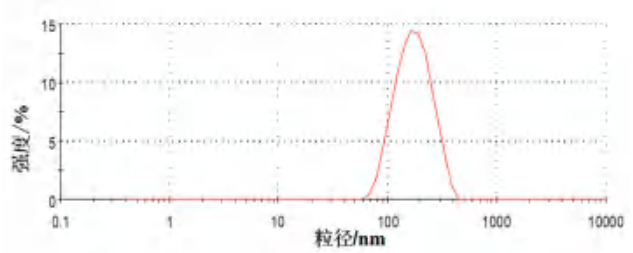


图 3　白杨素脂质体粒径分布图

Fig 3　Size distribution of chrysin liposomes

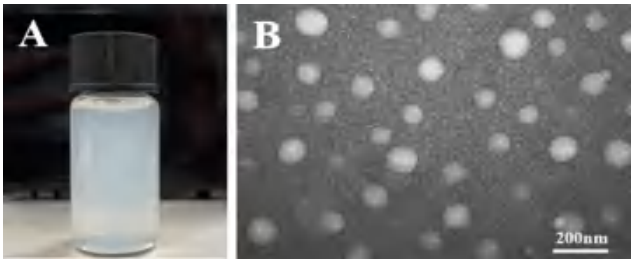


图 4　白杨素脂质体的外观（A）和透射电镜图（B）

Fig 4　Appearance（A）and transmission electron microscopic（B）of chrysin liposomes

杨素脂质体形态呈椭圆球形。

2.7　药物体外释放度考察

采用透析法测定白杨素及其脂质体的体外释放过程[24]。分别取 2 mL 含药量均为 150 μg • mL^{-1} 的白杨素溶液（无水乙醇溶解）和白杨素脂质体置于透析袋（截留分子质量 3500）中，随后浸没于含 0.5% 十二烷基硫酸钠的 30 mL PBS（pH 6.8）释放介质中[25]，37 ℃ 水浴下 100 r•min^{-1} 搅拌，分别于 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL，同时补充等体积释放介质。用紫外分光光度计检测吸光度值，计算取出的药物浓度。重复实验 3 次，绘制体外释放曲线，结果如图 5 所示，游离白杨素在 4 h 累计释放率为 90.64%，而白杨素脂质体呈缓慢释放，24 h 累计释放率达到 80.72%，表明白杨素脂质体相较于白杨素原料药具有明显的缓释特征。

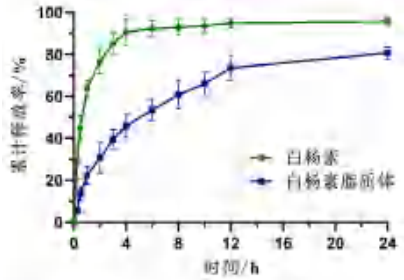


图 5　白杨素及其脂质体的体外释放度

Fig 5　Release degree of chrysin and chrysin liposomes in vitro

2.8　细胞毒性实验

采用 CCK-8 法检测白杨素、白杨素脂质体、空白脂质体对 BV2 细胞活力的影响，确定其作用于 BV2 细胞的安全浓度范围。设置空白对照组、白杨素组、白杨素脂质体组，每组 6 个平行孔。实验组设定 0、5、15、25、50、75、100 μmol • L^{-1} 不同浓度的样品。空白脂质体设置同样实验浓度，向已接种 BV2 细胞的 96 孔板中分别加入不同浓度的制剂，培养 24 h 后加入 CCK-8 试剂，培养箱孵育一定时间，酶标仪于 450 nm 处测量吸光度值，计算细胞存活率（%）。实验结果如图 6 所示，在图 6A 中，与所有浓度空白脂质体共培养的细胞活力与空白对照组相比差异无统计学意义，表明，空白脂质体对 BV2 细胞没有细胞毒性。图 6B 中 BV2 小胶质细胞在 5 ～ 25 μmol • L^{-1} 药物浓度时细胞活力与对照组相比差异无统计学意义；当白杨素及其脂质体浓度在 50 ～ 100 μmol • L^{-1} 时细胞活力明显下降。因此综合考虑选择 25 μmol • L^{-1} 的药物浓度用于后续实验。

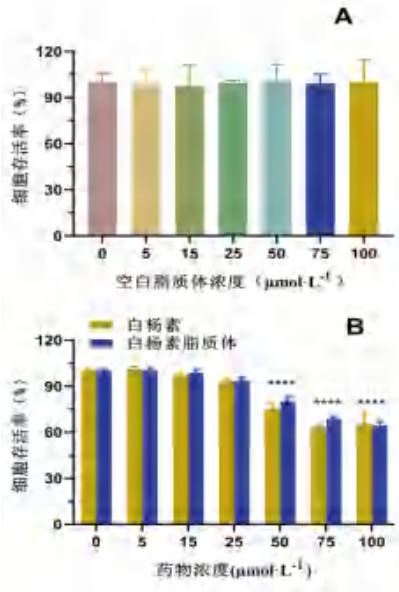


图 6　白杨素及脂质体对 BV2 小胶质细胞的细胞毒性

Fig 6　Cytotoxicity of chrysin and chrysin liposomes on BV2 cells

注：与对照组（0 μmol • L^{-1}）相比，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the control group（0 μmol • L^{-1}），$^{****}P < 0.0001$.

2.9　抗炎性能研究

2.9.1　白杨素对 LPS 诱导的 BV2 炎症模型一氧化氮（NO）释放量的影响　LPS 诱导 BV2 细胞产生的炎症因子能够增加亚硝酸盐的产生，通过 Griess 法检测 BV2 细胞上清液中亚硝酸盐浓度作为生成 NO 的量，从而评估抗炎药物的疗效和抗炎活性。同“2.8”项下方法对 BV2 细胞铺板，设置对照组、模型组（LPS 组）、白杨素组和白杨素脂质体组，每组分别设置 3 个复孔。待细胞贴壁，实验组分别加入 25 μmol • L^{-1} 药物预处理 1 h 后，除对照

组外其他分组加入 1 μg • mL^{-1} LPS 处理 24 h，每组取上清液 50 μL 测定 NO 水平。如图 7 所示，与对照组相比，模型组细胞上清液中 NO 水平升高（$P < 0.001$），与模型组相比，白杨素和白杨素脂质体可有效抑制 NO 产生（$P < 0.05$，$P < 0.01$），其中白杨素脂质体抑制 NO 产生效果更为显著。

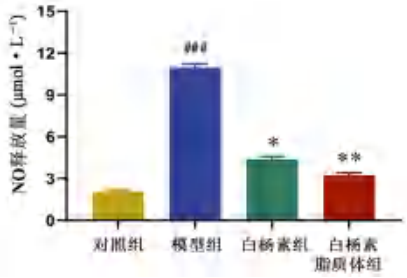


图 7　白杨素及其脂质体的抗炎活性评价

Fig 7　Anti-inflammatory activity of chrysin and chrysin liposomes

注：与对照组相比，$^{###}P < 0.001$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

2.9.2　白杨素对 LPS 诱导的 BV2 炎症模型相关炎症因子 mRNA 表达的影响　按“2.9.1”项下方法分组并干预 BV2 细胞，按照 RNA 快速提取试剂盒说明书提取总 RNA。通过 PerfectStart Uni RT&qPCR Kit 试剂盒说明书配制反应体系，将上述 RNA 逆转录为 cDNA 并进行 qPCR 检测。反应条件为 94 ℃变性 30 min，94 ℃延伸 5 s，60 ℃退火 30 s，共循环 40 次。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相关基因 mRNA 表达。引物序列见表 4。实验结果如图 8 所示，与对照组相比，模型组中 BV2 细胞的 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 表达升高；与模型组相比，白杨素组和白杨素脂质体组细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 水平均降低，表明白杨素及其脂质体对 LPS 诱导 BV2 细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 表达具有抑制作用。

表 4　引物序列

Tab 4　Primer sequences

基因	引物序列
TNF-α	上游：5'-ATCAGTTCTATGGCCCAGAC-3'
	下游：5'-TCACAGAGCAATGACTCCAA-3'
IL-1β	上游：5'-CCAGTGAAATGATGGCTTATTACAG-3'
	下游：5'-CTAGTGGTGGTCGGAGATTCGTAGC-3'
IL-6	上游：5'-CTTCTTCGGACTGATGCTGGTGAC-3'
	下游：5'-TCTGTTGGGAGTCGTATCCTCTGTG-3'

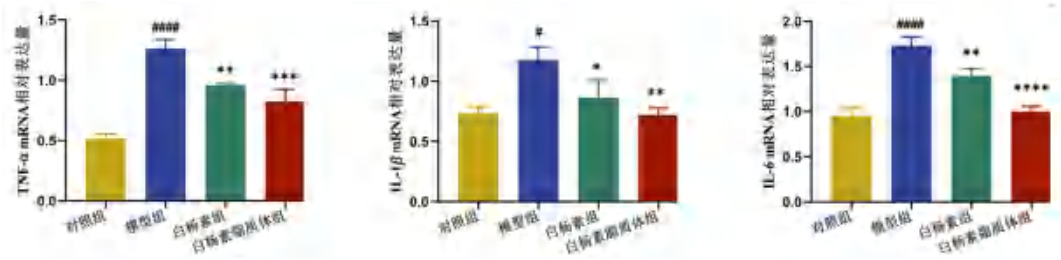


图 8　白杨素及其脂质体对 LPS 诱导 BV2 细胞相关炎症因子 mRNA 表达量的影响

Fig 8　Effect of chrysin and chrysin liposomes on mRNA expression of LPS induced inflammatory cytokines in BV2 cells

注：与对照组相比，$^{#}P < 0.05$，$^{####}P < 0.0001$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the control group，$^{#}P < 0.05$，$^{####}P < 0.0001$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$.

3　讨论

传统中药具有独特的生物活性、广泛的结构样式、毒副作用小等优势。白杨素具有显著的抗炎作用，然而白杨素的一系列缺点限制了其临床应用。脂质体可以提高药物稳定性，降低药物的毒性，同时具有高度的生物相容性和生物可降解性，可以保护药物在到达病灶部位前不被酶降解，发挥更佳的治疗作用[26]。因此，本研究拟设计、筛选白杨素脂质体的制备工艺，并评估其体外释放性能以及体外细胞药效学作用。

本研究以包封率为指标对白杨素脂质体制备工艺进行优化，制备得到包封率为（85.01±0.33）%，平均粒径为（141.4±0.5）nm，平均 PDI 为（0.240±0.021）的白杨素脂质体，表明该处方工艺制备的白杨素脂质体分布均匀，符合脑靶向纳米递送系统要求[27]。体外模拟释药结果表明，与白杨素单体药比较，白杨素脂质体的缓释特征更为明显。

神经炎症是发生在中枢神经系统的一种炎症反应，其中小胶质细胞在中枢神经系统中起着至关重要的作用[14]。LPS 是一种细菌内毒素，能激发周围组织和免疫细胞产生各种抗炎因子[28]，因其模型再现性好，对全身的影响易于鉴定和测量等优点，是构建神经炎症模型的金标准试剂之一[29]。LPS 能够诱导 BV2 产生多种促炎因子，TNF-α、IL-1β、IL-6 三者是机体早期炎症标志物[30]。本研究采用 LPS 诱导 BV2 细胞成功建立体外神经炎症模型，细胞毒性实验确定了后续

药物实验浓度范围，并表明空白脂质体浓度对于后续实验细胞存活率无明显影响。体外药效学研究发现，白杨素脂质体可降低 LPS 诱导 BV2 细胞上清液中 NO 水平，抑制 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 表达，且与游离白杨素抑制率相比，差异具有统计学意义（$P < 0.01$），这表明白杨素脂质体对神经炎症疾病的治疗有巨大的应用前景。

综上所述，本研究筛选并确定了白杨素脂质体的最优处方，对白杨素和白杨素脂质体的体外抗炎作用进行了初步探讨，为进一步探索白杨素及其脂质体的抗炎机制提供了实验基础。后续研究将继续完善白杨素及其脂质体的体内药效学、脑靶向性、药动学评价，为白杨素新剂型的研发提供理论依据。

参考文献

[1] 程新杰，卞广利，李德强，等 . 木蝴蝶活性成分质量控制研究进展 [J]. 医药导报，2022，41（8）：1177-1180.

[2] Yang L，Qi ZZ，Jun H，et al. Synthesis and biological evaluation of amino acid derivatives containing chrysin that induce apoptosis [J]. Nat Prod Res，2021，35（4）：529-538.

[3] 李轲，封林林，薛婉莹，等 . 黄芩中黄酮化合物提取检测研究进展 [J]. 中国农学通报，2023，39（15）：158-164.

[4] 邹雅茹，童建菁，叶静，等 . 白杨素抗肿瘤效应及其机制的研究进展 [J]. 医学研究杂志，2015，44（7）：165-167，186.

[5] Yasaman O，Sheida D，Ommoleila M，et al. Chrysin and chrysin-loaded nanocarriers induced immunogenic cell death on B16 melanoma cells [J]. Med Oncol，2023，40（10）：278-278.

[6] 凡春玲，申栋帅，冯小明，等 . 白杨素衍生物的抗氧化和抗炎活性研究进展 [J]. 中国兽药杂志，2022，56（11）：69-78.

[7] Zullkiflee N，Taha H，Usman A. Propolis：its role and efficacy in human health and diseases [J]. Molecules，2022，27（18）：6120-6120.

[8] Xu MJ，Yang YF，Peng J，et al. Effects of Alpinae Oxyphyllae Fructus on microglial polarization in a LPS-induced BV2 cells model of neuroinflammation via TREM2 [J]. J Ethnopharmacol，2022，302（PtA）：115914.

[9] 蔡苏娜，李强，周慧，等 . 白杨素通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥抗炎和抗氧化作用：基于蛋白质芯片方法 [J]. 南方医科大学学报，2021，41（10）：1554-1561.

[10] Mani R，Natesan V，Arumugam R. Neuroprotective effect of chrysin on hyperammonemia mediated neuroinflammatory responses and altered expression of astrocytic protein in the hippocampus [J]. Biomed Pharmacother，2017，88：762-769.

[11] 黄思成，柯瑾，金文彬，等 . 脂质体修饰性材料应用研究进展 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（19）：2567-2572.

[12] 张曼玉，楼晨曦，曹傲能 . 主动靶向载药脂质体在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志，2022，39（3）：633-638.

[13] 张琼，刘文娟，曹霞 . 小胶质细胞对神经元作用的研究进展 [J]. 医学研究生学报，2016，29（4）：431-434.

[14] 刘彦超，王建枝 . 小胶质细胞在阿尔茨海默病中的研究进展 [J]. 神经损伤与功能重建，2016，11（2）：149-152.

[15] Huang R，Zhao ZZ，Jiang XJ，et al. Liposomal chrysin attenuates hepatic ischaemia-reperfusion injury：possible mechanism via inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. J Pharm Pharmacol，2022，74（2）：216-226.

[16] Deshmukh PK，Mutha RE，Surana SJ. Electrostatic deposition assisted preparation，characterization and evaluation of chrysin liposomes for breast cancer treatment [J]. Drug Dev Ind Pharm，2021，47（5）：809-819.

[17] 肖卫红，徐蕾，杨爱霞 . 乙醇注入法制备高乌甲素脂质体凝胶的工艺研究 [J]. 中国药师，2018，21（12）：2140-2144.

[18] 吴斯宇，曾盈蓉，唐聘，等 . RGD 环肽修饰的姜黄素 / 黄芩苷靶向共递送纳米脂质体的制备工艺优化及表征 [J]. 中草药，2021，52（22）：6834-6844.

[19] 焦岩，李大婧，刘春泉，等 . 叶黄素纳米脂质体的制备工艺优化及其氧化稳定性 [J]. 食品科学，2017，38（18）：259-265.

[20] 王茜，曹婉君，张纱纱，等 . 类脂囊泡在不同给药途径中的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（9）：961-966.

[21] 徐艳艳，郑丽君，张霞燕，等 . 替加环素脂质体的制备工艺研究 [J]. 药学研究，2021，40（11）：730-734，770.

[22] 司佳奇，刘洋，蔡佳雨，等 . 甘露糖修饰雷公藤红素脂质体处方工艺优化及体外靶向性评价 [J]. 中草药，2022，53（21）：6726-6733.

[23] Sylwia L，Agata W，Izabela N，et al. Synthesis of lipid nanoparticles incorporated with *Ferula assa-foetida* L. extract [J]. Cosmetics，2022，9（6）：129-129.

[24] 宋波，黄莺，郭盈杉 . 脂质体体外释放行为评价方法研究进展 [J]. 医药导报，2023，42（3）：384-389.

[25] Protopapa C，Siamidi A，Pavlou P，et al. Excipients used for modified nasal drug delivery：a mini-review of the recent advances [J]. Materials，2022，15（19）：6547.

[26] Bhargava M. Optimizing CNS-delivery by lactyl stearate-coupled liposomes [J]. Parkinsonism Relat Disord，2020，79：e116-e117.

[27] Kozlov AS，Angulo MC，Audinat E，et al. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2006，103（26）：10058-10063.

[28] 周继勤，倪玮，凌亚亭，等 . 神经干细胞分泌组通过调节小胶质细胞表型抑制体内外神经炎症 [J]. 江苏大学学报（医学版），2023，33（4）：277-283.

[29] 李孟，万鸽，曹杏，等 . 栀子苷减轻 LPS 诱导的血脑屏障功能障碍 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2022，31（5）：454-460.

[30] 白鲁岳，赵思齐，高升，等 . 小胶质细胞极化在神经病理性疼痛发生发展过程中的作用研究进展 [J]. 中华诊断学电子杂志，11（1）：33-36.

（收稿日期：2023-10-16；修回日期：2023-11-14）

基于下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴对比杂交天麻及其亲本醇提物镇静催眠药效学研究

高翰博[1, 2]，王广政[1, 2]，巩晴晴[1, 2]，俞年军[1, 2, 3, 4, 5*]，方悦[1]，杜方平[6]（1.安徽中医药大学药学院，合肥　230012；2.安徽省中医药科学院 中药资源保护与开发研究所，合肥　230012；3.食药用菌功能活性与资源利用安徽省联合共建学科重点实验室，安徽　六安　237300；4.省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心，合肥　230012；5.中药研究与开发安徽省重点实验室，合肥　230012；6.金寨县金山寨食（药）用菌种植专业合作社，安徽　六安　237399）

摘要：目的　基于下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴（HPA 轴）和单胺类神经递质水平研究比较杂交天麻及其亲本醇提物镇静催眠药效。**方法**　连续 4 d 对小鼠腹腔注射对氯苯丙氨酸（PCPA）造失眠模型，造模同期给药。以阳性药艾司唑仑、杂交天麻及其亲本（红天麻、乌天麻）醇提取物、天麻素给药，7 d 后检测腹腔注射戊巴比妥钠诱导小鼠的睡眠发生率、睡眠潜伏期及睡眠时间；苏木精 - 伊红染色法（HE）染色观察小鼠大脑相关组织的病变，ELISA 法检测机体中单胺类神经递质 5- 羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）、多巴胺（DA）含量水平及 HPA 轴激素及血清中 γ- 氨基丁酸（GABA）水平。**结果**　PCPA 致失眠小鼠造模成功，各组天麻醇提取物均可改善失眠小鼠行为异常，缓解失眠小鼠脑组织病变，促进机体内 5-HT、DA 表达量的回调；抑制血清中 NE 水平及机体内促肾上腺皮质激素释放激素（CRH）、促肾上腺皮质激素（ACTH）、皮质酮（CORT）水平升高，促进机体 GABA 水平提高。杂交天麻对单胺类神经递质的调节作用优于红天麻；抑制 HPA 轴亢奋与提升机体内 GABA 水平作用优于乌天麻。**结论**　杂交天麻及其亲本醇提物均可通过抑制 HPA 轴亢奋与调节机体内单胺类神经递质紊乱缓解失眠症状。杂交天麻综合疗效与亲本相近，可在后续药效学研究中提供数据以便参考。

关键词：杂交天麻；镇静催眠；药效差异；HPA 轴；5- 羟色胺

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0871-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.008

Comparison sedative and hypnotic pharmacodynamics of hybrid *Gastrodia elata* and its parent alcohol extracts based on hypothalamic-pituitary-adrenal axis

GAO Han-bo[1, 2], WANG Guang-zheng[1, 2], GONG Qing-qing[1, 2], YU Nian-jun[1, 2, 3, 4, 5*], FANG Yue[1], DU Fang-ping[6] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei*　230012; 2. *Institute of Conservation and Development of Traditional Chinese Medicine Resources Academy of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei*　230012; 3. *Anhui Joint Key Laboratory of Functional Activity and Resource Utilization of Edible and Medicinal Fungi*, *Lu'an*　*Anhui*　237300; 4. *Anhui Collaborative Innovation Centre for Ouality Enhancement of Authentic Chinese Herbs*, *Hefei*　230012; 5. *Key Laboratorv of Traditional Chinese Medicine Research and Development of Anhui*, *Hefei*　230012; 6. *Jinzhai County Jinshanzhai Specialized Cooperative of Edible* (*Medicinal*) *Fungi Planting*, *Lu'an*　*Anhui*　237399)

Abstract: Objective　To compare the sedative and hypnotic effects of hybrid *Gastrodia elata* Blume and its parent alcohol extract based on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and monoamine neurotransmitter levels. **Methods**　The insomnia model was established by

基金项目：省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心项目（教科信厅函〔2022〕4 号）；直接口服中药饮片亳州市重点实验室开放基金（No. ZFYP20211204）。

作者简介：高翰博，男，在读硕士研究生，主要从事中药资源与中药质量研究，email：2744700453@qq.com　*__通信作者__：俞年军，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药生物技术与栽培药材质量研究，email：ynj2005288@sina.com

intraperitoneal injection of *p*-chlorophenylalanine (PCPA) in mice for four consecutive days, and the drug was administered at the same time. The positive drug estazolam, hybrid *Gastrodia elata* and its parent alcohol extract (*Gastrodia elata* BL. f. glauca and *Gastrodia elata* BL. f. elata), and gastrodin were administered. Seven days later, the sleep incidence, sleep latency, and sleep time of mice induced by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital were detected. Hematoxylin eosin staining was used to observe the lesions of brain related tissues in mice. ELISA method was used to detect the levels of monoamine neurotransmitters serotonin, 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) in the body. HPA axis hormones in the body and serum *γ*-aminobutyric acid (GABA) levels were also measured. **Results** The mice model of PCPA induced insomnia mice was successfully established. Gastrodia alcohol extract of each group improved the behavioral abnormalities in insomnia mice, alleviated the brain tissue lesions of insomnia mice, and promoted the callback of 5-HT and DA expression in the body; the increase of NE level in the serum, corticotropin releasing hormone (CRH), adrenocorticotropic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) levels in the body were inhibited, and GABA level increased in the body. The regulatory effect of hybrid *Gastrodia elata* on monoamine neurotransmitters was better than that of *Gastrodia elata* BL. f. elata. The effect of inhibiting HPA axis hyperactivity and increasing GABA level in the body was better than that of *Gastrodia elata* BL. f. glauca. **Conclusion** Both hybrid *Gastrodia elata* and its parent ethanol extract can alleviate insomnia by inhibiting HPA axis hyperactivity and regulating monoamine neurotransmitter disorders in the body. The comprehensive efficacy of hybrid *Gastrodia elata* is similar to that of its parents, and reference data can be provided for subsequent pharmacodynamic studies.

Key words: hybrid *Gastrodia elata*; sedative and hypnotic; difference in efficacy; HPA axis; 5-HT

中药天麻为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* BL. 的干燥块茎，是我国传统常用中药，首载于《神农本草经》，并被列为“上品”[1]。2020 年版《中国药典》中记载天麻味甘、性平，入肝经，具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的作用[2]。当前在市场上主要流通的有乌天麻（*Gastrodia elata* BL. f. glauca）、红天麻（*Gastrodia elata* BL. f. elata）及以两者为亲本杂交的子代（F_1 代）杂交天麻。乌天麻主要分布于云贵高原等高海拔地区；红天麻主要分布于长江中下流域等低海拔地区[3]。金寨杂交天麻（红 × 乌杂交天麻）是以红天麻为母本，乌天麻为父本杂交培育的杂交天麻，主要产区为安徽金寨，其产量远高于乌天麻、红天麻[4]。

现代研究表明失眠症的发生多与单胺类神经递质失调、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺（the hypothalamic-pituitary-adrenal axis，HPA）轴功能紊乱等因素有关[5]。研究人员发现天麻中含有酚类、苷类及甾醇类等物质，具有镇静催眠的作用[6-7]，这些成分普遍具有小分子结构，醇溶性较高。而课题组前期研究发现，天麻的 75% 乙醇提取物的镇静催眠作用优于其他浓度的醇提物与水提物。故此，本文选用对氯苯丙氨酸（PCPA）腹腔注射进行剥夺小鼠睡眠造模，并分别以红、乌、杂 3 种天麻的 75% 醇提取物给药，基于 3 种天麻对 HPA 轴功能及单胺类神经递质水平的影响，探究杂交天麻与其亲本镇静催眠药效差异，并考察杂交天麻与亲本活性关系，为该品种提供药效学研究数据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级昆明种 ICR 小鼠 80 只（雄鼠，体重 30 ～ 35 g [杭州子源实验动物科技有限公司，动物生产许可证号：SCXK（浙）2019-0004]。动物饲养于安徽中医药大学药学院动物房，适应性喂养 1 周，每笼 10 只，自由进食、进水。

1.2 试药

红天麻、杂交天麻来自安徽金寨，乌天麻来自云南小草坝，经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为兰科植物天麻（*Gastrodia elata* BL.）的干燥块茎。

艾司唑仑片（吉林制药股份有限公司，规格：1 mg/ 片）；乙酰天麻素片（昆药集团股份有限公司，规格：50mg/ 片）；PCPA（含量 ≥ 97%）、阿拉伯胶（医药级，批号分别为 A841909、A800707，上海麦克林生化科技股份有限公司）；戊巴比妥钠（批号：20170308，Sigma）；4% 多聚甲醛（批号：70085400，Biosharp 公司）。无水乙

醇、二甲苯、中性树胶（批号分别为 100092683、10023418、10004160，国药集团化学试剂有限公司）；HE 染液套装（批号：G1003，武汉赛维尔生物科技有限公司）；小鼠血清促肾上腺皮质激素释放激素（CRH）、促肾上腺皮质激素（ACTH）、皮质酮（CORT）、5- 羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）、多巴胺（DA）及 γ- 氨基丁酸（GABA）ELISA 试剂盒（批号分别为 JYM0508Mo、JYM-0422Mo、JYM0544Mo、JYM0433Mo、JYM-0296Mo、JYM0577Mo、JYM0125Mo、JYM-0432Mo，武汉基因美生物科技有限公司）。

1.3　仪器

CCA-111CE 旋转蒸发仪（日本 EYELA），AX324ZH 电子分析天平（常州奥克斯），AS 系超声波清洗机（天津奥特赛恩斯），WH-2 微型涡旋振荡器（上海沪西分析仪器厂），CENTRIFUGE 5810R 高速离心机（德国艾本德），LGJ-10 型真空冷冻干燥机（北京松源），RT-6000 型酶标仪（深圳雷杜），JB-P5 包埋机、JB-L5 冻台（武汉俊杰电子有限公司），RM2016 病理切片机（上海徕卡仪器有限公司），KD-P 组织摊片机（浙江省金华市科迪仪器设备有限公司），Giotto 染色机（DIAPATH）、GFL-230 烤箱、G6004 载玻片（Servicebio）、Nikon Eclipse E100-NIKON DS-U3 正置光学显微镜成像系统（日本尼康）。

2　方法与结果

2.1　供试药物的制备

将 3 种天麻分别粉碎成粗粉（过 7 号筛），加 25 倍量 75% 乙醇浸泡静置 1 h 后，在 60 ℃下 240 W 功率超声提取 2 次，每次 90 min，滤过，合并滤液，60 ℃减压浓缩滤液至近干。以超纯水复溶，冷冻干燥后得天麻醇提物。供试药物均置于－ 20 ℃冰箱中备用，临用时以超纯水复溶至所需剂量。

2.2　戊巴比妥钠阈剂量确定

经适应性喂养 7 d 后，将小鼠随机分为 5 组，每组 12 只。规定注射戊巴比妥钠并在随后 15 min 内翻正反射消失 1 min 以上小鼠为入睡小鼠。戊巴比妥钠注射剂量分别设置为 15、25、35、45、55、65 $mg \cdot kg^{-1}$ 五个剂量进行腹腔注射给药并统计入睡只数。将组内 10% 小鼠入睡剂量，定为阈下剂量；90% 小鼠入睡剂量，定为阈上剂量。

实验结果如表 1 所示，戊巴比妥钠在 25 $mg \cdot kg^{-1}$ 和 55 $mg \cdot kg^{-1}$ 的给药浓度下入睡率分别为 8% 和 92%，故将 25 $mg \cdot kg^{-1}$ 和 55 $mg \cdot kg^{-1}$ 剂量分别设为阈下剂量与阈上剂量。

表 1　小鼠注射不同浓度戊巴比妥钠入睡情况

Tab 1　Sleep state of mice injected with different concentrations of pentobarbital sodium

给药浓度 /（$mg \cdot kg^{-1}$）	小鼠只数	入睡只数	入睡率 /%
15	12	0	0
25	12	1	8
35	12	3	25
45	12	7	58
55	12	11	92
65	12	12	100

2.3　动物分组与模型制备

随机将 70 只小鼠分为 7 组，每组 10 只，分别为正常组、模型组、阳性药组（艾司唑仑）、红天麻醇提物组（红天麻组）、乌天麻醇提物组（乌天麻组）、杂交天麻醇提物组（杂交天麻组）及天麻素组。除正常组外，其他各组小鼠参照文献方法腹腔注射 PCPA 混悬液 [8-9] 450 $mg \cdot kg^{-1}$，含 1% 阿拉伯胶的 0.9%NaCl 溶液配制），正常组腹腔注射等剂量 0.9%NaCl 溶液，体积均为 10 $mL \cdot kg^{-1}$（体重），每日 1 次，连续 4 d。

2.4　动物给药

造模同期给药，阳性药组（艾司唑仑 1 $mg \cdot kg^{-1}$）、红天麻组（2.05 $g \cdot kg^{-1}$）、乌天麻组（2.05 $g \cdot kg^{-1}$）、杂交天麻组（2.05 $g \cdot kg^{-1}$）、天麻素组（40 $mg \cdot kg^{-1}$），均灌胃对应的药物，共给药 7 d，其中红、乌、杂交天麻给药量以生药量计。正常组和模型组灌胃等剂量水，给药体积均为 10 $mL \cdot kg^{-1}$。

2.5　天麻醇提物对戊巴比妥钠致小鼠睡眠影响

2.5.1　天麻醇提取物对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠只数的影响　第 6 日给药后 1 h，给予各组小鼠 25 $mg \cdot kg^{-1}$ 戊巴比妥钠（阈下剂量）腹腔注射，若发现翻正反射消失 30 s 以上，则可认定小鼠已经处于睡眠状态。记录 15 min 内各组小鼠睡眠只数。如表 2 所示，与正常组相比，模型组睡眠率为 0（$P < 0.01$）。给予天麻醇提取物及艾司唑仑治疗后，PCPA 失眠小鼠入睡率显著增加（$P < 0.01$）。结果提示杂交天麻及其亲本醇提取物和天麻素对 PCPA 失眠小鼠的睡眠均具有改善作用，且杂交天麻、乌天麻镇静催眠效果强于红天麻。

2.5.2　天麻醇提物对阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的影响　第 7 日给药后 1 h，给予各组小鼠 55 $mg \cdot kg^{-1}$ 戊巴比妥钠腹腔注射，观察每组小鼠的行为表现。若发现翻正反射消失 30 s 以上，则可认定小鼠已经处于睡眠状态，从进入睡眠状态开始计时至翻正反射再现时可得睡眠时间。计算每组小鼠入睡潜伏期与睡眠时间。如表 3 所示，阳性药组、红天麻组和天麻素组均可减少小鼠睡眠潜伏期（$P < 0.001$），显著加快小鼠入睡。同

表 2　各组天麻醇提物对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡的影响

Tab 2　Effect of *Gastrodia elata* alcohol extract on the mice falling asleep induced by subthreshold dose of pentobarbital sodium

组别	给药剂量	入睡率 /%
正常组	—	20
模型组	—	$0^{\#\#}$
阳性药组	1 mg・kg^{-1}	100^{**}
红天麻组	2.05 g・kg^{-1}	30^{**}
乌天麻组	2.05 g・kg^{-1}	60^{**}
杂交天麻组	2.05 g・kg^{-1}	70^{**}
天麻素组	40 mg・kg^{-1}	30^{**}

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

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

时各给药组也可以增长小鼠睡眠时间，其中红天麻与杂交天麻可更好地提高小鼠睡眠质量，且在此次实验中天麻素改善睡眠质量疗效优异。

2.6　样本的采集与处理

阈上剂量睡眠实验结束后禁食 12 h，腹腔注射戊巴比妥钠（80 mg・kg^{-1}，0.9% 氯化钠溶液配制）进行麻醉。摘眼球采集血液于 2 mL 离心管中，静置 1 h 后于 4 ℃以 3000 r・min^{-1} 离心 20 min，取上层血清置于－ 80 ℃冰箱中保存，用于血清生化指标测定。取血后迅速摘取脑组织，每组取部分脑组织置于 4% 多聚甲醛组织固定液中，用于组织病理分析，剩余用于组织生化指标测定。

表 3　各组天麻醇提取物对阈上剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠质量的影响

Tab 3　Effect of *Gastrodia elata* alcohol extract in each group on sleep quality of mice induced by subthreshold dose of pentobarbital sodium

组别	给药剂量	戊巴比妥钠剂量 /（mg・kg^{-1}）	睡眠潜伏期 /min	睡眠时长 /min
正常组	—	55	3.88±1.45	17.88±3.10
模型组	—	55	$7.00\pm1.12^{\#\#\#}$	6.75±2.99
阳性药组	1 mg・kg^{-1}	55	$1.63\pm0.86^{***}$	$87.13\pm36.05^{***}$
红天麻组	2.05 g・kg^{-1}	55	$3.75\pm1.79^{***}$	$39.00\pm13.06^{**}$
乌天麻组	2.05 g・kg^{-1}	55	$5.38\pm2.23^{*}$	$35.25\pm18.59^{*}$
杂交天麻组	2.05 g・kg^{-1}	55	$4.75\pm1.48^{**}$	$40.88\pm10.73^{**}$
天麻素组	40 mg・kg^{-1}	55	$2.75\pm0.66^{***}$	$55.00\pm30.29^{***}$

注：与正常组比较，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

2.7　组织病理分析

对固定在 4% 多聚甲醛中的脑组织进行苏木精 - 伊红染色法（HE）染色。经无水乙醇脱水，二甲苯透明后，将组织浸入石蜡中包埋切片烤片，石蜡切片脱蜡，经 HE 染色封片后，于显微镜下观察组织形态，组织取横截面拍照，主要观察下丘脑、海马体和皮层的细胞数量与形态在给药前后的变化。

如图 1 所示，影像学分析中，正常组小鼠神经元细胞形态正常，分子层及外颗粒层分界较为清晰，锥体细胞层排列较为正常。与正常组相比，模型组大脑皮层区及下丘脑区出现部分神经元胞核固缩深染，胞质溶解。且在模型组海马体 CA3 区和 DG 区，出现大部分神经元细胞核核固缩深染，胞质溶解，细胞之间距离显著增宽等现象（图中表现为黑色）。

经过 7 d 的给药治疗后，大脑皮层区及下丘脑区神经元细胞受损情况得到一定的改善。除红天麻组外，其余各组切片海马体神经元排列整齐，胞核固缩，胞质溶解等现象减少，锥体细胞层排列较为整齐；细胞空泡、胞核固缩现象减少，细胞间距离恢复正常，由此说明红、乌、杂 3 种天麻及天麻素均可不同程度地改善失眠小鼠脑组织病变，其中红天麻组疗效相对较差。

2.8　ELISA 法分析各组小鼠激素水平

根据 ELISA 试剂盒说明书的操作方法，测定各组小鼠血清中单胺类神经递质（5-HT、DA、NE）的水平及 HPA 轴激素（CRH、ACTH、CORT）的水平与 γ- 氨基丁酸（GABA）的水平。称取适量全脑于 1.5 mL 离心管中，加入一定量的 PBS（pH 在 7.2 ～ 7.4）。脑组织在冰上使用研棒充分匀浆后，离心取上清液，得 10% 组织匀浆液，并按照相应 ELISA 试剂盒的操作说明，分别测定小鼠脑组织中的 CRH、ACTH 的含量。

2.8.1　天麻对失眠小鼠单胺类神经递质的影响

结果如图 2 所示，与正常组相比，模型组血清中的 5-HT 与 DA 水平均显著低于正常组小鼠；NE 水平显著高于正常组小鼠（$P < 0.01$）。与模型组相比，阳性药组与天麻素组均可提高失眠小鼠血清或脑组织中 5-HT 与 DA 水平，但天麻素无法影响失眠小鼠血浆内 NE 水平。3 种天麻醇提物均可影响失眠小鼠机体内单胺类神经递质水平：均可降低小鼠血清内 NE 浓度，红天麻与杂交天麻可分别提高小鼠血清内 DA 与 5-HT 浓度；同时 3 种天麻醇提物也可提高小鼠大脑内 5-HT 浓度，乌天麻与杂交天麻还提高小鼠脑内 DA 水平。

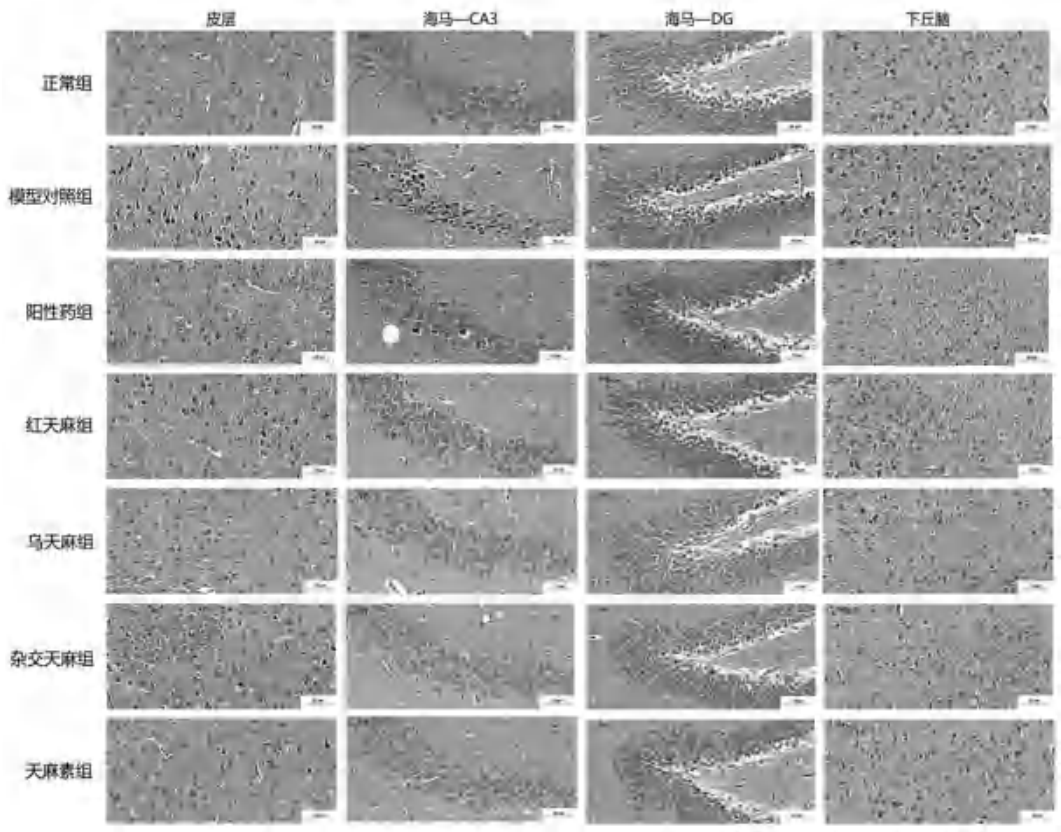


图 1　各组药物对 PCPA 致失眠小鼠大脑组织病理改变的影响（HE 染色，×20）

Fig 1　Effect of each group of drugs on pathological changes of brain tissue in PCPA induced insomnia mice（HE staining，×20）

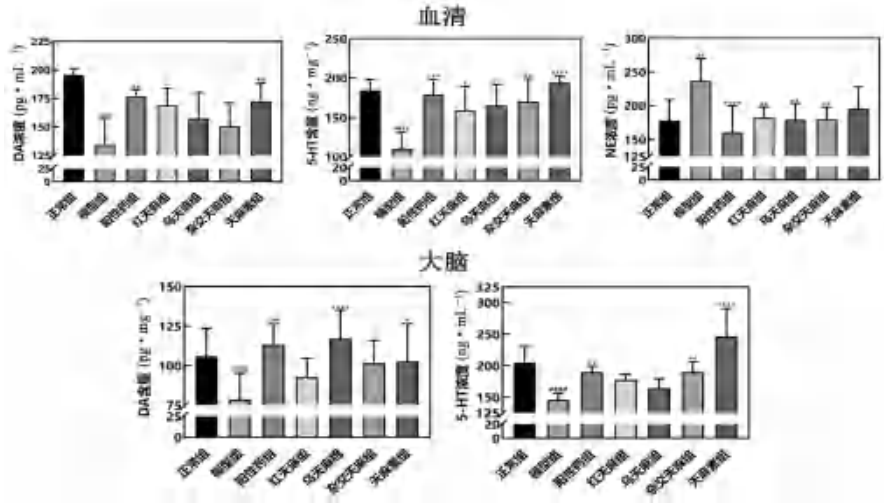


图 2　各组药物对 PCPA 致失眠小鼠单胺类神经递质水平的影响

Fig 2　Effect of each group of drugs on the levels of monoamine neurotransmitters in PCPA induced insomnia mice

注：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#\#}P < 0.0001$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the normal group，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#\#}P < 0.0001$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$.

结果提示 3 种天麻醇提物与天麻素均可改善失眠小鼠机体内单胺类神经递质水平，且乌天麻、杂交天麻略优于红天麻，而天麻素药效较好但无法影响机体内 NE 水平。

2.8.2　天麻醇提物对 HPA 轴激素水平的影响　研究结果显示，与正常组相比，模型组血清和大脑中的 HPA 轴相关激素（CRH、ACTH、CORT）水平较正常组均显著升高（$P < 0.01$），说明失眠小鼠机体内 HPA 轴状态亢奋。与模型组相比，阳性药组，红、乌、杂 3 种天麻及天麻素均可不同程度改善小鼠 HPA 轴紊乱，且其主要通过改善机体（血清或脑组织）中的 CRH 与 ACTH 水平有关，结果为红天麻、

杂交天麻略优于乌天麻。在调节机体内 CORT 水平紊乱这一环节中，乌天麻与天麻素表现不佳，而红天麻、杂交天麻可显著下调小鼠血清中的 CORT 表达（见图 3）。

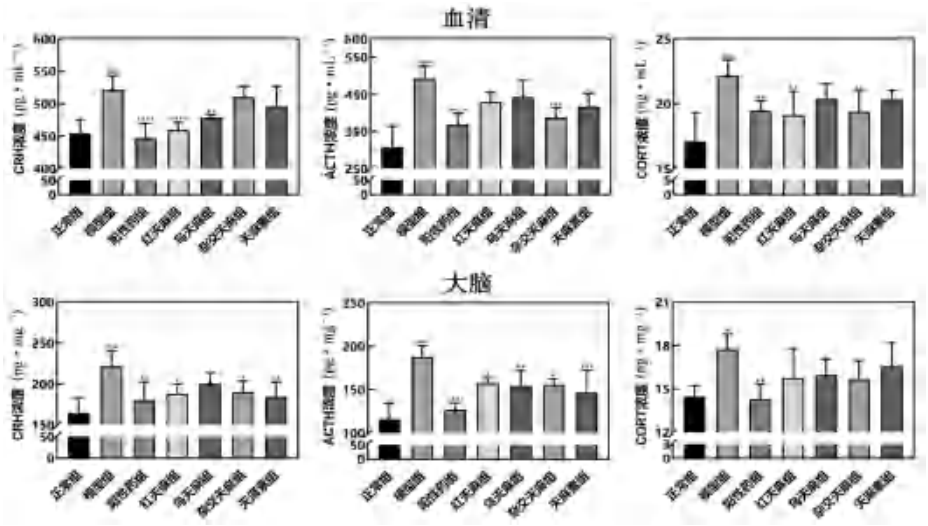


图 3　各组药物对 PCPA 致失眠小鼠 HPA 轴激素水平的影响

Fig 3　Effect of each group of drugs on HPA axis hormone levels in PCPA induced insomnia mice

注：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#\#}P < 0.0001$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$。

Note：Compared with the normal group，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#\#}P < 0.0001$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$.

2.8.3　天麻对失眠小鼠 GABA 水平的影响　结果如图 4 所示，模型组中 GABA 与正常组水平相比无显著性差异；而艾司唑仑，红天麻、杂交天麻及天麻素均可升高小鼠血清中 GABA 水平（$P < 0.01$），乌天麻则仅有提高 GABA 水平的趋势。

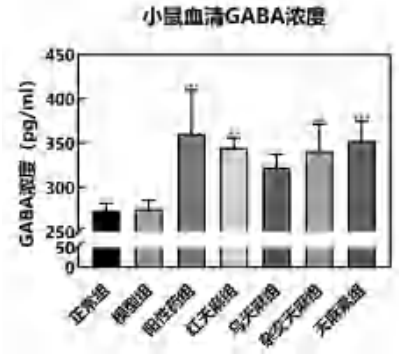


图 4　各组药物对 PCPA 致失眠小鼠 GABA 的影响

Fig 4　Effect of each group of drugs on GABA in PCPA induced insomnia mice

注：与模型组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the model group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

3　讨论

传统中医认为天麻可用于肝阳上亢所致的夜不能寐等症状；目前临床上也常用天麻缓解治疗失眠 [10]，焦虑、抑郁等症状 [11-12]。与临床常用的苯二氮䓬类、巴比妥类镇静催眠药相比，中药天麻具有副作用小、无依赖性等优势。天麻内含有的酚酸类物质，如天麻素、巴利森苷、对羟基苯甲醇等具有良好的镇静催眠的效果 [6-7]，且该类成分普遍具有易提取、醇溶性高等特点。以 75% 乙醇作为溶剂对天麻进行提取，即可提取天麻中大部分巴利森苷与天麻素等酚类物质 [13-14]。因此，本实验以 3 种天麻的醇提物进行药效学考察。

单胺类神经递质，如 5-HT、DA、NE 等在机体镇静催眠的调节中发挥着重要的作用，当单胺类神经递质浓度过低时会造成体内神经递质分泌紊乱，影响睡眠功能的正常表达，最终导致失眠 [15-16]。HPA 轴可维持机体正常的激动、觉醒等生理活动 [17]，其对机体的调节机制分为三个部分：首先由下丘脑释放 CRH，当 CRH 作用于垂体时，会刺激垂体释放 ACTH，最后 ACTH 通过血液循环作用于肾上腺，刺激其分泌糖皮质激素。当 HPA 轴亢进时，会产生过量的 CRH、ACTH，导致机体内糖皮质激素浓度激增，高水平糖皮质激素会使机体难以抑制 HPA 轴兴奋，从而导致机体激动、亢奋、难以入睡等特征 [18-19]。

PCPA 是一种抑制 5-HT 合成的化学制剂，小鼠经腹腔注射 PCPA 后，能明显减少其睡眠时间以达到剥夺睡眠的目的 [20-21]。本实验通过连续 4 d 腹腔注射 PCPA 混悬液（450 mg • kg^{-1}）进行造模。造模期间，模型组小鼠表现出易怒、对光线敏感等特征；造模结束后，模型组食量降低，摄

食欲望下降，安静时萎靡，但易激动，激怒时攻击性强且暴躁等特征。戊巴比妥钠协同催眠实验表明较正常组相比，模型组更难入睡，且睡眠质量变差。且模型组小鼠 HPA 轴处于亢奋状态，同时其体内单胺类神经递质整体水平紊乱，表明 PCPA 致失眠小鼠造模成功。给药治疗 7 d 后发现：阳性药，红、乌、杂天麻醇提取物与天麻素均可改善失眠小鼠单胺类神经递质紊乱，同时也可以抑制失眠小鼠 HPA 轴的应激状态，并提高机体 GABA 水平。说明天麻可能是通过以上途径来达到镇静催眠的效果。

值得注意的是，本次实验中各组小鼠血清与脑组织的生化指标水平趋势相似，但细微之处仍有一定差异，笔者认为此变化可能由血脑屏障 [22] 与小鼠个体之间差异所致。同时模型组 GABA 水平与正常组相比没有差异，这与以往的部分报道略有不符，经过反复核对实验数据，并再次实验进行验证发现结果均与目前一致。可能是由于本次实验造模时间短（4 d）导致失眠小鼠 GABA 水平还未下降所致。而天麻醇提物与天麻素均可提高机体 GABA 水平，以达到镇静催眠的效果，这一结果与部分研究结论一致。

综上所述，天麻醇提物主要通过调节单胺类神经递质水平、抑制机体 HPA 轴亢奋与提升机体 GABA 水平以达到镇静催眠的作用。红天麻、乌天麻、杂交天麻醇提取物均有镇静催眠的功效且三者在不同途径镇静催眠效果各有特点。与亲本醇提物相比，杂交天麻镇静催眠疗效尚可，本研究以期为日后不同品种天麻提供药效学研究数据。

参考文献

[1] （魏）吴普等述 . 神农本草经 [M]. 北京：中版集团数字传媒有限公司，2020.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020.

[3] 周铉，陈心启 . 国产天麻属植物的整理 [J]. 云南植物研究，1983，5（4）：361-368.

[4] 韦中强，肖波，韩如刚，等 . 天麻种间杂交优势利用研究 [J]. 现代农业科技，2015，（13）：85-86.

[5] Dong YJ，Jiang NH，Zhan LH，et al. Soporific effect of modified Suanzaoren Decoction on mice models of insomnia by regulating Orexin-A and HPA axis homeostasis [J]. Biomed Pharmacother，2021，143：112141.

[6] 马建福，王豆，李涛，等 . 天麻及其有效成分对神经系统疾病的药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2023，41（1）：127-132.

[7] Huang H，Jiang N，Zhang YW，et al. Gastrodia elata blume ameliorates circadian rhythm disorder-induced mice memory impairment [J]. Life Sci Space Res（Amst），2021，31：51-58.

[8] 魏歆然，郑雪娜，裴芸，等 . 大鼠失眠模型造模中对氯苯丙氨酸混悬液改良法的探讨 [J]. 湖南中医药大学学报，2018，38（9）：986-989.

[9] 夏天吉，闫明珠，王智，等 . 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报，2022，30（3）：428-435.

[10] 邓情，曹建雄 . 曹建雄治疗肺腺癌相关性失眠经验 [J]. 湖南中医杂志，2023，39（2）：54-55，88.

[11] 陈丽媛，顾健霞 . 顾健霞自拟天麻合欢枣仁汤治疗高血压病合并焦虑抑郁经验 [J]. 中医临床研究，2023，15（11）：81-85.

[12] 黄琼，代莲，李平，等 . 天麻钩藤饮加减治疗肝阳上亢型高血压病合并焦虑抑郁症状的临床效果 [J]. 中国当代医药，2023，30（16）：135-138，42.

[13] 廖霞，吴振，杨勇，等 . 乌天麻不同溶剂提取物的总多酚、总黄酮含量及其抗氧化能力 [J]. 食品与发酵工业，2022，48（5）：157-164.

[14] 罗紫屹，朱顺耀，周衡朴，等 . 乌天麻多酚提取工艺的优化 [J]. 中成药，2022，44（5）：1571-1574.

[15] 李玉洁，彭慧霞，夏璐瑶，等 . 六味安神汤对失眠小鼠脑组织不同区域单胺类神经递质水平的影响 [J]. 中华中医药杂志，2022，37（9）：5323-5328.

[16] 王泽琨，刘沈林，于小聪，等 . 基于血清代谢组学探讨复方枣仁颗粒改善失眠的机制 [J]. 中国药房，2023，34（9）：1093-1098.

[17] 合浩，李晓霞，高长青，等 . 慢性失眠障碍与促肾上腺皮质激素释放激素和皮质醇的相关性研究 [J]. 世界睡眠医学杂志，2023，10（1）：7-9，13.

[18] 张敏，黄俊山，张一帆，等 . 归脾汤对慢性睡眠剥夺大鼠 HPA 轴功能及单胺类神经递质的影响 [J]. 福建中医药，2022，53（2）：15-17.

[19] 张艳，杨嫚，刘西建，等 . 痰湿内阻慢性失眠大鼠模型建立及半夏秫米汤基于 HPA 轴、炎症因子的治疗机制 [J]. 山东医药，2022，62（10）：44-47.

[20] 全世建，林杏娥，刘妮 . PCPA 大鼠失眠模型的证候属性研究 [J]. 中医药学刊，2006（3）：450-451.

[21] 张羽翀，王梦阳，林慧娇，等 . 五味子木脂素对氯苯丙氨酸致失眠大鼠的催眠作用 [J]. 中国老年学杂志，2020，40（4）：861-863.

[22] Daneman R，Prat A. The blood-brain barrier [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol，2015，7（1）：a020412.

（收稿日期：2023-10-07；修回日期：2023-10-30）

基于降解动力学模型的二至丸的活性成分松果菊苷稳定性研究

郝冰玉[1]，陈微[2]，陈园[2]，王冬萍[1]，任晓亮[2]，王萌[1]，刘艺[2*]（1. 天津中医药大学组分中药国家重点实验室，天津 301617；2. 天津中医药大学中药学院，天津 301617）

摘要：目的 建立苯乙醇苷类成分 - 松果菊苷单体及其在二至丸中的降解动力学模型，研究制剂对活性成分的影响。**方法** 使用超高效液相色谱法（UPLC）测定不同环境干扰下的松果菊苷（单体、二至丸）含量变化，并建立其降解动力学模型。**结果** 松果菊苷（单体、二至丸）在多种条件下可发生降解，在不同环境干扰下降解规律可归为（伪）一级反应；制剂形式下的松果菊苷降解速度较松果菊苷单体慢。**结论** 松果菊苷更适合储存在干燥、低温、避光条件下，尽量避免与碱性溶液、铁器接触；二至丸制剂能够延缓松果菊苷单体在多种条件下的降解。

关键词：松果菊苷；二至丸；降解动力学；稳定性；UPLC
中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0878-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.009

Stability of the active component echinacetin in Erzhi pills based on a degradation kinetics model

HAO Bing-yu[1], CHEN Wei[2], CHEN Yuan[2], WANG Dong-ping[1], REN Xiao-liang[2], WANG Meng[1], LIU Yi[2*] (1. *State Key Laboratory for Component-based Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To establish a degradation kinetics model of phenylethanoid glycosides-echinacoside monomer and its degradation in Erzhi pills under various conditions, and to determine the effect of preparation on the active components. **Methods** Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was used to determine the content of echinacoside (monomers, Erzhi pills) under different environmental interferences, and the degradation kinetics model was established. **Results** Echinacoside (monomers, Erzhi pills) was degraded under various conditions, and the degradation rule under different environmental disturbances was classified as (pseudo) first-order reaction. The degradation rate of echinacoside in the form of preparation was slower than that of echinacoside monomers. **Conclusion** Echinacoside should be stored in dry and dark environment, with low temperature, and try to avoid contacting with alkaline solution and iron. Erzhi pills can delay the degradation rate of echinacoside monomers under various conditions.

Key words: echinacoside; Erzhi pill; degradation kinetics; stability; UPLC

二至丸是木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实酒女贞子和菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分墨旱莲两种药材经过炮制而成的水蜜丸制剂，具有补益肝肾、滋阴止血的功效[1]。研究表明二至丸在临床上能防治骨质疏松[2]、糖尿病[3]、类风湿关节炎[4]等疾病。方中女贞子为君药，含有萜类、挥发油类、黄酮类、苯乙醇苷类、多糖类等化合物，临床上可以治疗多种疾病[5-7]。松果菊苷（echinacoside）属于苯乙醇苷类化合物，可以从女贞子中分离得到[8-9]，具有抗骨质疏松[10]、降血糖、降血脂[11]、抗炎[12]、抗肿瘤[13]以及保护心脏、神经、肝脏

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82274236）。
作者简介：郝冰玉，女，硕士，主要从事中药药剂学研究，email：2582351037 @qq.com *通信作者：刘艺，女，讲师，主要从事药剂学研究，email：liuyi9256 @tjutcm.edu.cn

等作用[14]，是二至丸的主要有效成分。

松果菊苷广泛存在于女贞子、肉苁蓉、松果菊、地黄[15]等植物中，具有多种药理活性，然而松果菊苷是苯乙醇苷水溶性成分，具有酯键和糖苷键结构，容易发生降解反应，从而影响制剂疗效，但目前针对松果菊苷的稳定性研究较少。因此本实验选择了二至丸中含量高[16]且具有明显药理活性[17-19]的松果菊苷作为研究对象，考察了松果菊苷以单体（松果菊苷）及制剂（二至丸）形式存在时，在不同pH、不同温度、不同光照条件、不同金属离子条件下的含量变化，将其随时间的变化趋势分别进行零级、一级和二级降解动力学拟合，建立降解动力学模型，快速预测松果菊苷的降解速率、半衰期和有效期，并在此基础上比较松果菊苷单体和二至丸制剂形式的稳定性差异，从化学稳定性角度分析制剂工艺对中药活性成分的影响。

1 材料

1.1 仪器

Acquity H-class 超高效液相色谱系统（美国Waters公司）；AX224ZH十万分之一天平（上海奥豪斯仪器有限公司）；AL-204万分之一电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）；SB-3200D超声波清洗器（宁波新芝生物科技股份有限公司）；H-1650W高速离心机（长沙湘仪离心机仪器有限公司）；DELTA 320 PH仪（瑞士Mettler Toledo公司）；HH-2数显恒温水浴锅（常州金坛良友仪器有限公司）。

1.2 试药

松果菊苷（纯度：98.3%，批号：111670，中国食品药品检定研究院）；二至丸（批号：190104，江西仁丰药业有限公司）由酒女贞子和墨旱莲组成，各500 g，经煮沸、浓缩、炼蜜丸而成；甲酸（色谱纯，美国Roe Scientific Inc公司）；乙腈、甲醇（色谱纯，赛默飞世尔科技有限公司）；盐酸（分析纯，天津化学试剂一厂）；氢氧化钠、氯化钠（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）；氯化铁、氯化亚铁（分析纯，阿拉丁试剂上海有限公司）；纯净水（广州屈臣氏食品饮料有限公司）。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C18（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）分析柱；检测波长：230 nm；流动相：0.1%甲酸水（A）-乙腈（B）；流速：0.2 mL•min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：10 μL；梯度洗脱（0～5 min，5%～15%B；5～15 min，15%～17%B，15～30 min，17%～34%B）。

2.2 溶液的制备

2.2.1 单体溶液的制备 精密称取松果菊苷对照品5.00 mg，置于5 mL棕色量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，配制成质量浓度为1.00 mg•mL^{-1}的对照品溶液，避光，4 ℃保存备用。

2.2.2 二至丸溶液的制备 取二至丸10粒，研细，取约1 g，置于棕色量瓶中，溶于50 mL不同介质中，超声20 min使其溶解，放冷再称定重量，用对应的介质补足减失的重量，摇匀，12 000 r•min^{-1}离心10 min，取上清液，过滤，避光，4 ℃保存备用。

2.2.3 不同pH介质的制备

① pH 3.0的磷酸盐缓冲液：称取磷酸二氢钾6.8 g，加水900 mL，用稀磷酸调节pH至3.0，用水稀释至1000 mL。

② pH 5.0的磷酸盐缓冲液：取一定量0.2 mol•L^{-1}磷酸二氢钠溶液，用氢氧化钠溶液调节pH值至5.0，即得。

③ pH 6.2的磷酸盐缓冲液：取一定量0.2 mol•L^{-1}磷酸二氢钠溶液，用氢氧化钠溶液调节pH值至6.2，即得。

④ pH 8.0的磷酸盐缓冲液：取磷酸氢二钾5.59 g与磷酸二氢钾0.41 g，加水使溶解成1000 mL，即得。

2.3 稳定性试验

2.3.1 pH对松果菊苷含量的影响 精密量取单体溶液及二至丸溶液200 μL分别置于10 mL棕色量瓶中，用已配制好的各pH值溶液稀释至刻度，制成20 μg•mL^{-1}溶液，置于37 ℃水浴锅中，间隔一定时间取样，测定松果菊苷含量。

2.3.2 温度对松果菊苷含量的影响 精密量取单体溶液及二至丸溶液200 μL分别置于10 mL棕色量瓶中，用纯水（pH为6.2）稀释至刻度，制成20 μg•mL^{-1}溶液，置于37、60、80 ℃水浴锅，间隔一定时间取样，测定松果菊苷含量。

2.3.3 光照对松果菊苷含量的影响 精密量取单体溶液及二至丸溶液200 μL分别置于10 mL棕色量瓶中，超纯水稀释至刻度，得20 μg•mL^{-1}的溶液，密封后置于日光灯、紫外灯及避光条件下，间隔一定时间取样，测定松果菊苷含量。

2.3.4 金属离子对松果菊苷含量的影响 精密量取单体溶液及二至丸溶液200 μL分别置于10 mL棕色量瓶中，分别用超纯水及含0.10 mol•L^{-1} Fe^{3+}、Fe^{2+}、Na^{+}的$FeCl_3$、$FeCl_2$、NaCl溶液稀释至刻度，制成20 μg•mL^{-1}溶液，密封后置于80 ℃水浴锅中，间隔一定时间取样，测定松果菊苷含量。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取“2.2.1”和“2.2.2”项下单体溶液及二至丸溶液，按“2.1”项下色谱条件方法连续进样6次，计算松果菊苷峰面积的*RSD*值。

2.4.2　重复性考察　制备 6 份“2.2.1”和“2.2.2”项下单体溶液及二至丸溶液，按“2.1”项下色谱条件方法进样，计算松果菊苷峰面积的 *RSD* 值。

2.4.3　稳定性考察　取“2.2.1”和“2.2.2”项下单体溶液及二至丸溶液，分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件方法进样，计算松果菊苷峰面积的 *RSD* 值。

2.4.4　线性关系考察　称取适量松果菊苷对照品，置于 10 mL 棕色量瓶中，以甲醇定容，得到储备液，加甲醇逐级稀释为一系列浓度梯度的对照品溶液，进样检测，以对照品浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行线性拟合。

2.5　*降解动力学模型建立*

根据松果菊苷的含量随时间变化情况，按照零级动力学（$C_t - C_0 = -K_t$）、一级动力学 [$-\ln(C_t/C_0) = K_t$]、二级动力学（$1/C_t - 1/C_0 = K_t$）的反应方程式进行拟合（其中 C_t 为时间 t 点时松果菊苷的浓度，C_0 为松果菊苷的初始浓度，K 为反应速率常数，t 为处理时间），比较 R^2 的数值，建立松果菊苷的降解动力学模型，计算降解动力学参数 K、$t_{1/2}$[零级反应 $t_{1/2} = C_0/2K$，一级反应 $t_{1/2} = -(\ln 0.5)/K$、二级反应 $t_{1/2} = 1/(KC_0)$]、$t_{0.9}$（零级反应 $t_{0.9} = C_0/10K$，一级反应 $t_{0.9} = 0.1054/K$，二级反应 $t_{0.9} = 1/9C_0K$），其中 $t_{1/2}$ 为松果菊苷浓度降解 50% 所需要的时间即半衰期、$t_{0.9}$ 为松果菊苷浓度降解 10% 需要的时间即有效期。

3　结果

3.1　*方法学考察结果*

精密度结果显示松果菊苷的峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，表明仪器精密度符合要求，方法的重复性和样品溶液的稳定性均符合要求。松果菊苷在 1.036 ～ 20.720 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，其回归方程为 $Y = 1.93\times10^5X - 1.72\times10^5$（$R^2 = 0.9992$）。

3.2　*pH 对松果菊苷含量的影响*

根据松果菊苷含量随时间的变化情况，分别按照零级、一级和二级动力学方程进行拟合，结果见表 1，发现一级降解动力学方程中的 R^2 均大于 0.9，因此将不同酸碱度下的松果菊苷的降解归为一级反应。将松果菊苷（单体、二至丸）的浓度按一级降解动力学方程计算相应的动力学参数，结果见表 2。绘制松果菊苷在 37 ℃、不同 pH 条件的降解曲线，结果见图 1。表 2、图 1 显示随着 pH 增加，松果菊苷单体降解速率增加，该成分在酸性条件下较为稳定；二至丸中的松果菊苷在碱性条件下较为稳定。在 pH 8.0 条件下，单体和二至丸的有效期（$t_{0.9}$）分别是 2.39 h、37.64 h，二至丸中松果菊苷的有效期明显延长，说明二至丸制剂工艺能够改善松果菊苷单体在碱性条件（pH 8.0）下的稳定性。

表 1　不同 pH 下单体降解动力学参数

Tab 1　Degradation kinetics parameters of monomer at different pH

pH	零级		一级		二级	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
3	$C_t - C_0 = -0.0043t$	0.9699	$\ln(C_t/C_0) = -0.0002t$	0.9705	$1/C_t - 1/C_0 = 0.0042t$	0.9687
5	$C_t - C_0 = -0.0105t$	0.8980	$\ln(C_t/C_0) = -0.0005t$	0.9007	$1/C_t - 1/C_0 = 0.0101t$	0.8924
6.2	$C_t - C_0 = -0.0250t$	0.9654	$\ln(C_t/C_0) = -0.0013t$	0.9646	$1/C_t - 1/C_0 = 0.0223t$	0.9619
8	$C_t - C_0 = -0.5331t$	0.9231	$\ln(C_t/C_0) = -0.0440t$	0.9974	不符合	—

表 2　单体及二至丸的降解动力学参数

Tab 2　Degradation kinetics parameters of monomers and Erzhiwan

pH	单体				二至丸制剂			
	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h
3	$\ln(C_t/C_0) = -0.0002t$	0.0002	3465.50	527.00	$\ln(C_t/C_0) = -0.0036t$	0.0036	192.50	29.27
5	$\ln(C_t/C_0) = -0.0005t$	0.0005	1386.20	210.80	$\ln(C_t/C_0) = -0.0031t$	0.0031	223.55	34.00
6.2	$\ln(C_t/C_0) = -0.0013t$	0.0013	533.15	81.08	$\ln(C_t/C_0) = -0.0035t$	0.0035	198.00	30.11
8	$\ln(C_t/C_0) = -0.0440t$	0.0440	15.75	2.39	$\ln(C_t/C_0) = -0.0028t$	0.0028	247.50	37.64

3.3　*温度对松果菊苷含量的影响*

表 3 显示，37、60、80 ℃条件下松果菊苷的一级降解动力学拟合方程 R^2 均大于 0.96，接近 1，因此将不同温度下的松果菊苷的降解归为一级反应。由表 4、图 2 可以看出，在 37、60、80 ℃条件下，随着温度的升高，松果菊苷的降解加快，有效期缩短；且制备成二至丸后能够显著延长松果菊苷在高温（60、80 ℃）条件下的有效期。

3.4　*光照对松果菊苷含量的影响*

由表 5 看出，不同光照条件下的零级、一级、二级降解动力学拟合方程 R^2 相差不多，为了比较半衰期，将不同光照下的降解归于伪一级反应。由表 6、图 3 可知，3 种光照条件下，松果菊苷（单体、二至丸）在避光条件下的有效期最长，其次是日光条件，最短是紫外光条件，表明紫外灯和日光灯下均能加速松果菊苷的降解。

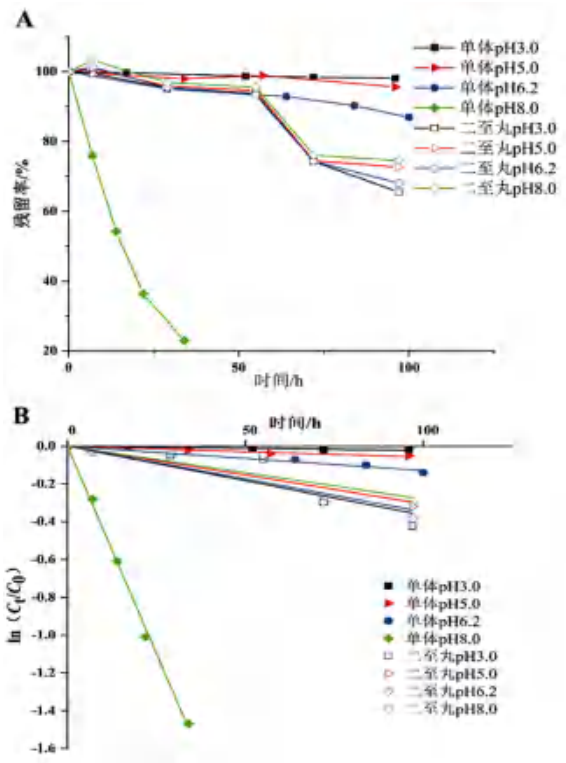


图 1　松果菊苷在不同 pH 下的含量变化情况

Fig 1　Content change of echinacoside at different pH

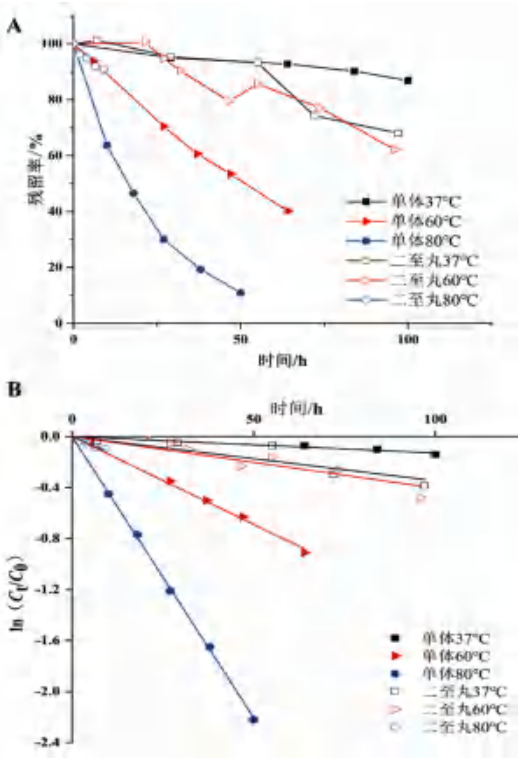


图 2　松果菊苷在不同温度下的含量变化情况

Fig 2　Content change of echinacoside at different temperatures

表 3　不同温度下单体的降解动力学参数

Tab 3　Degradation kinetics parameters of monomer at different temperatures

温度 /℃	零级		一级		二级	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
37	$C_t - C_0 = -0.0250t$	0.9654	$\ln(C_t/C_0) = -0.0013t$	0.9646	$1/C_t - 1/C_0 = 0.0223t$	0.9619
60	$C_t - C_0 = -0.1977t$	0.9899	$\ln(C_t/C_0) = -0.0138t$	0.9962	$1/C_t - 1/C_0 = 0.4095t$	0.9526
80	$C_t - C_0 = -0.4231t$	0.8324	$\ln(C_t/C_0) = -0.044t$	0.9994	$1/C_t - 1/C_0 = 2.5897t$	0.8560

表 4　不同温度下单体与二至丸降解动力学参数

Tab 4　Degradation kinetics parameters of monomer and Erzhiwan at different temperature

温度 /℃	单体				二至丸制剂			
	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h
37	$\ln(C_t/C_0) = -0.0013t$	0.0013	533.15	81.07	$\ln(C_t/C_0) = -0.0035t$	0.0035	198.02	30.11
60	$\ln(C_t/C_0) = -0.0138t$	0.0138	50.22	7.63	$\ln(C_t/C_0) = -0.004t$	0.0040	173.27	26.35
80	$\ln(C_t/C_0) = -0.044t$	0.044	15.75	2.39	$\ln(C_t/C_0) = -0.0119t$	0.0119	58.24	8.86

表 5　不同光照下单体降解动力学参数

Tab 5　Degradation kinetic parameters of monomer at different light

光源	零级		一级		二级	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
避光	$C_t - C_0 = -0.0021t$	0.9437	$\ln(C_t/C_0) = -0.0001t$	0.9444	$1/C_t - 1/C_0 = 0.0021t$	0.9424
日光	$C_t - C_0 = -0.0298t$	0.8818	$\ln(C_t/C_0) = -0.0016t$	0.8961	$1/C_t - 1/C_0 = 0.0263t$	0.8473
紫外光	$C_t - C_0 = -0.0357t$	0.9887	$\ln(C_t/C_0) = -0.0023t$	0.9713	$1/C_t - 1/C_0 = 0.0357t$	0.9887

3.5　金属离子对松果菊苷的影响

如表 7 所示，零级和一级降解动力学拟合方程的 R^2 相差不多，为了比较有效期，将松果菊苷在不同金属离子条件下的降解归为伪一级反应。由表 8、图 4 可以看出金属离子对松果菊苷降解的影响程度为 $Fe^{3+} > Fe^{2+} > Na^+$；二至丸中松果菊苷的有效期显著延长，说明二至丸制剂工艺能够改善松果菊苷单体在不同金属离子存在时的稳定性。

4　讨论

本研究松果菊苷单体及其在二至丸中的稳定性，建立其在多种外界环境下的降解动力学模型，结果表明降解过程均符合（伪）一级动力学反应。松果菊苷是多酚类化合物，呈弱酸性，在碱性条件下容易离子化进而发生降解反应，因此在碱性条件

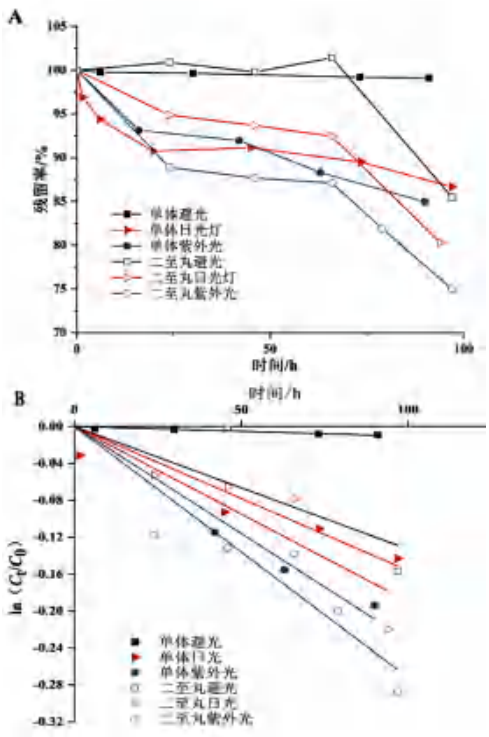


图 3　松果菊苷在不同光照条件下的含量变化情况

Fig 3　Content changes of echinacoside under different light conditions

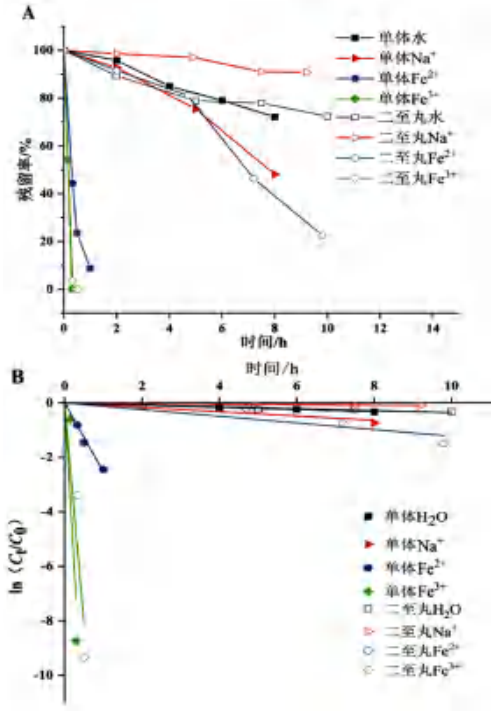


图 4　松果菊苷在不同金属离子条件下的含量变化情况

Fig 4　Content changes of echinacoside under different metal ion conditions

表 6　不同光照下单体与二至丸降解动力学参数

Tab 6　Degradation kinetics parameters of monomer and Erzhi pills at different light conditions

光照	单体				二至丸制剂			
	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h
避光	$\ln(C_t/C_0) = -0.0001t$	0.0001	6931.00	1054.00	$\ln(C_t/C_0) = -0.0013t$	0.0013	533.15	81.08
日光	$\ln(C_t/C_0) = -0.0016t$	0.0016	433.19	65.88	$\ln(C_t/C_0) = -0.0019t$	0.0019	364.79	55.47
紫外光	$\ln(C_t/C_0) = -0.0023t$	0.0023	301.35	45.83	$\ln(C_t/C_0) = -0.0027t$	0.0027	256.70	39.04

表 7　不同金属离子条件下单体降解动力学参数

Tab 7　Degradation kinetics parameters of monomer at different metal ion conditions

金属离子	零级		一级		二级	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
水	$C_t - C_0 = -0.7685t$	0.9836	$\ln(C_tC_0) = -0.0397t$	0.9801	$1/C_t - 1/C_0 = 0.5881t$	0.9728
Na^+	$C_t - C_0 = -1.3126t$	0.9578	$\ln(C_t/C_0) = -0.0797t$	0.9085	$1/C_t - 1/C_0 = 0.7265t$	0.9839
Fe^{2+}	$C_t - C_0 = -24.06t$	0.7528	$\ln(C_t/C_0) = -2.5281t$	0.9868	$1/C_t - 1/C_0 = 4.0766t$	0.4990
Fe^{3+}	$C_t - C_0 = -72.391t$	0.9971	$\ln(C_t/C_0) = -24.113t$	0.7626	$1/C_t - 1/C_0 = 367147t$	0.7001

表 8　不同金属离子下单体与二至丸降解动力学参数

Tab 8　Degradation kinetics parameters of monomer and Erzhiwan at different metal ions

金属离子	单体				二至丸制剂			
	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h	拟合方程	K	$t_{1/2}$/h	$t_{0.9}$/h
水	$\ln(C_t/C_0) = -0.0397t$	0.0397	17.4584	2.6549	$\ln(C_t/C_0) = -0.0352t$	0.0352	19.6903	2.9943
Na^+	$\ln(C_t/C_0) = -0.0797t$	0.0797	8.6964	1.3225	$\ln(C_t/C_0) = -0.0105t$	0.0105	66.0095	10.0381
Fe^{2+}	$\ln(C_t/C_0) = -2.5281t$	2.5281	0.2742	0.0417	$\ln(C_t/C_0) = -0.1223t$	0.1223	5.6672	0.8618
Fe^{3+}	$\ln(C_t/C_0) = -24.113t$	24.1130	0.0287	0.0044	$\ln(C_t/C_0) = -16.125t$	16.125	0.0430	0.0065

下不稳定；而二至丸制剂中松果菊苷在碱性条件下的稳定性明显比单体稳定性强，说明松果菊苷经过在制剂辅料及配伍作用下稳定性得到了提高。随着温度升高，松果菊苷降解速度明显加快，二至丸制剂能够显著延缓松果菊苷在高温下的降解，说明制剂及配伍过程能够改善松果菊苷在高温下的稳定性。日光、紫外光可能诱导松果菊苷中的酚羟基发生化学反应从而降解[20]，二至丸制剂未能改善光照条件下松果菊苷的稳定性，说明光照对松果菊苷的影响较大，松果菊苷单体及制剂均应在避光条件下保存。松果菊苷具有邻苯二酚结构，金属铁离子容易与其发生螯合反应形成稳定的配合物导致松果

菊苷迅速降解[21]，提示松果菊苷及二至丸应该避免与含铁药物同时服用、避免用铁器储存。

总体来说，在碱性溶液、不同温度、不同金属离子存在的条件下，相比于松果菊苷单体，其在二至丸制剂中的降解速率降低、半衰期和有效期均有一定程度的延长，提示二至丸制剂工艺及配伍过程能改善松果菊苷的稳定性，从活性成分稳定性的视角说明了中药复方传统制剂的合理性。松果菊苷经过合理配伍，稳定性得到改善，推测二至丸水溶液偏酸性，从而降低松果菊苷的降解，提高其稳定性[22]；抑或因为松果菊苷处于复杂的多成分环境中，与女贞子或墨旱莲中其他成分配伍，进而促进了松果菊苷的稳定性[23-25]；也可能是松果菊苷与其他化学成分形成稳定的复合物[26]，促进松果菊苷的稳定性；女贞子、墨旱莲药粉用水炼制的蜂蜜进行黏合制成二至丸，可使药物缓慢释放，推测此工艺能够增强松果菊苷的稳定性、延长药效。

本实验提示松果菊苷单体及含松果菊苷的制剂宜在低温、干燥、避光条件下储存，应避免与金属离子、铁器等接触，该研究为松果菊苷及其制剂在有效期设立及生产、包装、运输、储存条件提供了理论依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：457.

[2] Zhong ZG，Li YY，Chen Y，et al. Predicting and exploring the mechanisms of Erzhi pill in prevention and treatment of osteoporosis based on network pharmacology and zebrafish experiments [J]. Drug Des Devel Ther，2021，15：817-827.

[3] Peng MM，Xia TY，Zhong YM，et al. Integrative pharmacology reveals the mechanisms of Erzhi pill，a traditional Chinese formulation，against diabetic cardiomyopathy [J]. J Ethnopharmacol，2022，296：115474.

[4] 刘牧秋，余嘉慧，高安然，等 . 二至丸防治类风湿关节炎网络药理学机制探究 [J]. 现代中西医结合杂志，2021，30（13）：1454-1461.

[5] Chen BB，Wang LL，Li L，et al. Fructus Ligustri Lucidi in osteoporosis：a review of its pharmacology，phytochemistry，pharmacokinetics and safety [J]. Molecules，2017，22（9）：1469.

[6] 吕佳霖，王荣荣，贺明帅，等 . 基于网络药理学探讨女贞子治疗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 天津中医药大学学报，2022，41（4）：498-506.

[7] 孙雅文，张明发，沈雅琴 . 女贞子及其活性成分降血糖、调血脂、抗肥胖作用研究进展 [J]. 药物评价研究，2016，39（6）：1086-1091.

[8] 宋敏，封安杰，郭庆梅 . 女贞子化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国药房，2021，32（24）：3064-3068.

[9] 许浚，游飞祥，袁雪海，等 . 女贞子 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定 [J]. 中草药，2017，48（20）：4198-4202.

[10] Li F，Yang XL，Yang YN，et al. Antiosteoporotic activity of echinacoside in ovariectomized rats [J]. Phytomedicine，2013，20（6）：549-557.

[11] Zhu KN，Meng ZQ，Tian YS，et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of total glycosides of Cistanche tubulosa in diet/streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol，2021，276：113991.

[12] Li L，Wan GW，Han B，et al. Echinacoside alleviated LPS-induced cell apoptosis and inflammation in rat intestine epithelial cells by inhibiting the mTOR/STAT3 pathway [J]. Biomed Pharmacother，2018，104：622-628.

[13] Ye Y，Song YA，Zhuang JH，et al. Anticancer effects of echinacoside in hepatocellular carcinoma mouse model and HepG2 cells [J]. J Cell Physiol，2019，234（2）：1880-1888.

[14] 李洋，洪莉，刘成，等 . 松果菊苷药理作用研究进展 [J]. 医药导报，2017，36（1）：56-60.

[15] Gong W，Zhang ND，Cheng G，et al. Rehmannia glutinosa libosch extracts prevent bone loss and architectural deterioration and enhance osteoblastic bone formation by regulating the IGF-1/PI3K/mTOR pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Int J Mol Sci，2019，20（16）：3964.

[16] 温巧巧，李焕茹，胡雁萍，等 . 二至丸 HPLC 指纹图谱建立 [J]. 中成药，2023，45（1）：199-202.

[17] Zhu M，Lu CZ，Li WW. Transient exposure to echinacoside is sufficient to activate Trk signaling and protect neuronal cells from rotenone [J]. J Neurochem，2013，124（4）：571-580.

[18] Li XH，Gou CY，Yang HS，et al. Echinacoside ameliorates D-galactosamine plus lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis and inflammation [J]. Scand J Gastroenterol，2014，49（8）：993-1000.

[19] 李旺廷，陈海霞，陈锦仪，等 . 复方二至丸的研究进展 [J]. 西北药学杂志，2022，37（6）：192-196.

[20] 李平 . 提高中药制剂稳定性方法的研究进展 [J]. 中医药临床杂志，2012，24（4）：383-384.

[21] 张国琴，赵晓然，王冬萍，等 . 蟛蜞菊内酯在不同条件下的降解动力学研究 [J]. 中成药，2022，44（3）：695-699.

[22] Cao XX，Wang L，Liu MQ，et al. Study on solubilization and stabilization of eight flavonoids by 17 Chinese herbal polysaccharides [J]. J Chem，2020，2020：6235284

[23] 王俊芳，任晓亮，王萌 . 组分中药稳定性研究进展 [J]. 中草药，2022，53（14）：4545-4553.

[24] 党晓芳，曹飒丽，林龙飞，等 . 三七提取液中皂苷类成分的热稳定性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（1）：31-34.

[25] 王菲菲，吴寿海，王明娟，等 . 马钱子生物碱混合对照溶液稳定性研究 [J]. 广州中医药大学学报，2018，35（2）：328-332.

[26] Liu F，Sun LL，You GJ，et al. Effects of Astragalus polysaccharide on the solubility and stability of 15 flavonoids [J]. Int J Biol Macromol，2020，143：873-880.

（收稿日期：2023-10-26；修回日期：2023-12-27）

水溶性汉防己甲素衍生物的合成

谢广通[1, 2]，蒋太白[2, 3]，焦子伟[2, 4]，朱月[2, 5]，李金玉[2*]，潘卫东[2, 5*]（1. 贵州中医药大学药学院，贵阳 550025；2. 贵州省天然产物研究中心，贵阳 550014；3. 贵阳康养职业大学，贵阳 550081；4. 遵义医科大学，贵州 遵义 563006；5. 贵州大学药学院，贵阳 550025）

摘要：目的 研究改善汉防己甲素水溶性和生物利用度。**方法** 设计汉防己甲素衍生物合成路线：以汉防己甲素为起始原料，经过硝化反应、还原反应、酰胺缩合反应、点击化学和消去反应得到目标衍生物。所有衍生物均通过 ESI-MS、^{1}H NMR、^{13}C NMR 进行结构表征，并对选定的化合物进行水溶性评价。**结果** 首次合成 10 个汉防己甲素糖苷衍生物和 1 个汉防己甲素 C-14 酰胺衍生物。**结论** 汉防己甲素糖苷衍生物水溶性显著提升，其中 **1b** 汉防己甲素麦芽糖衍生物水溶性最好，具有进一步研究价值。

关键词：汉防己甲素；糖苷衍生物；点击化学；水溶性
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0884-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.010

Synthesis of hydrophilic tetrandrine derivatives

XIE Guang-tong[1, 2], JIANG Tai-bai[2, 3], JIAO Zi-wei[2, 4], ZHU Yue[2, 5], LI Jin-yu[2*], PAN Wei-dong[2, 5*] (1. *College of Pharmacy*, *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, *Guiyang* 550025; 2. *Natural Products Research Center of Guizhou Province*, *Guiyang* 550014; 3. *Guiyang Healthcare Vocational University*, *Guiyang* 550081; 4. *Zunyi Medical University*, *Zunyi Guizhou* 563006; 5. *College of Pharmacy*, *Guizhou University*, *Guiyang* 550025)

Abstract: Objective To improve the poor water solubility and low bioavailability of tetrandrine and its clinical applications. **Methods** The synthetic routes of tetrandrine derivatives were designed. The target derivatives were obtained by nitration reactions, reduction reactions, amide condensation reactions, click chemistry, and elimination reactions with tetrandrin as the starting point. All the derivatives were elucidated by ESI-MS, ^{1}H NMR, and ^{13}C NMR spectra. The aqueous solubility of selected compounds were evaluated. **Results** Totally 10 glycoside tetrandrine derivatives and one C-14 amide tetrandrin derivatives were first synthesized. **Conclusion** The water solubility of the glycoside tetrandrine derivatives is greatly improved, and compound **1b**, the tetrandrin maltose derivative, exhibits notable water solubility for further research.

Key words: tetrandrine; glycoside derivative; click chemistry; water solubility

天然来源的汉防己甲素是从粉防己中分离得到的一类双苄基异喹啉生物碱[1]。它具有广泛的药理活性，如抗肿瘤、抗炎、抗阿尔茨海默病等[2-5]。针对汉防己甲素的结构改造主要集中在对 C-5 位以及叔胺氮上进行修饰[6-7]。在过去几年中，本课题组率先对汉防己甲素的 C-14 位进行了结构衍生研究，成功合成了卤素取代衍生物、氨基酸类衍生物、氨基酸脲类衍生物、硫脲类衍生物、酰胺和磺酰胺类衍生物[8-13]。然而，目前现有的汉防己甲素衍生物主要通过引入非极性基团进行修饰，导致其水溶性极差，限制了其作为新药候选进行下一步开发[14]。

药物的水溶性是影响其生物利用度的关键因素。改善药物水溶性的方法有多种，其中通过化

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81960635）；贵州省科学技术基金项目（黔科合基础 -ZK[2021] 一般 558）。
作者简介：谢广通，男，硕士，主要从事中药化学研究，email：1649123239@qq.com *通信作者：李金玉，女，副研究员，主要从事药物化学研究，email：lijinyu20080@126.com；潘卫东，男，教授，主要从事药物化学研究，email：wdpan@163.com

学修饰改善水溶性的策略较为常用[15-16]。该策略包括引入极性基团、降低脂溶性、构象优化以及成盐修饰等方法。从汉防己甲素衍生物的结构来看，它含有多个非极性基团，几乎不含极性基团，同时，半刚性的结构也限制了其构象的改变。因此，不易于用降低脂溶性和构象优化的方法来改善水溶性。此外，成盐可通过增加离子水合能，促进溶解。汉防己甲素作为双苄基异喹啉生物碱可以在酸性环境下成盐，但在酸性环境下可能会改变汉防己甲素原有结构。因此引入极性基团是一个较为可行的方法。糖作为优秀的亲水性基团，其中含有多个羟基，拥有极好的亲水性，同时在生命系统中扮演着至关重要的角色[17-19]，非常适合用来改善药物溶解性。本课题组曾在汉防己甲素 C-14 位成功引入单个寡糖，但并未深入对其进行水溶性研究，且引入糖片段的方法烦琐复杂，收率低[20]。基于此，本课题对原设计路线进行了优化，一方面直接由乙酰化糖合成糖叠氮衍生物，避开引入不稳定基团如溴代糖和叠氮化钠，使反应路线更加安全、高效；另一方面在制备汉防己甲素中间体 M3 时改用 HBTU 作为催化剂，极大提升了中间体收率。最终本课题设计的路线成功引入了两分子寡糖，目标化合物具有更多的亲水性基团，水溶性得到了极大提升。

1　材料

汉防己甲素（纯度：98%，南京景竹生物科技有限公司）；其余试剂均为市售分析纯。300 ～ 400 目硅胶（安耐吉化学试剂有限公司）；ZF-20D 暗箱式紫外分光仪器（上海宝山顾村电光仪器厂）；SQP 型电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；Bruker AVANCE Ⅲ 600 MHz 型核磁共振（瑞士 Bruker 公司）；高分辨率质谱（Thermo Scientific Q Exactive Focus）；微熔点测量仪器 WRX-4（上海泰坦科技有限公司）。

2　方法与结果

2.1　汉防己甲素衍生物药代动力学预测

现代高通量药物发现方法能在更短的时间内发现更多的先导化合物，提高药物研发的成功率。pkCSM 方法工作原理是分析化合物的一般特性（包括分子特性、毒物和药理）和基于距离的图谱特征进行预测[21]。对汉防己甲素衍生物进行溶解度预测（见表 1）。通过预测结果判断设计合成的糖苷化合物相比原形化合物水溶性得到了极大提升，证实实验计划可行。

表 1　Log*P* 值预测结果

Tab 1　Log*P* value prediction results

化合物	Log*P*
汉防己甲素	7.1624
1b	－3.0213
2b	1.3303
3b	2.6085
4b	3.3855
5b	2.6085

2.2　目标化合物合成路线设计

由于需要进行多步保护 - 脱保护反应，糖苷衍生物的化学制备通常收率较低，副产物较多[22]，而点击化学具有温和的反应条件、高产物收率以及良好的选择性等特点，其引入的三唑环本身能参与氢键形成，从而增加生物分子的水溶性。糖类中间体合成路线如图 1所示，参考文献[23]方法制备。首先用乙酸酐保护糖上羟基，之后以三氯化锡催化，用叠氮基三甲基硅烷在糖上引入叠氮基团。目标化合物的合成路线见图 2。根据本课题组已经摸索出的汉防己甲素 C-14 位衍生路线，在粉防己碱 C-14 位置硝化以获得化合物 **M1**。随后，**M1** 被高效还原为中间体 **M2**。**M2** 在 HBTU 和 DIPEA 催化下通过酰胺缩合与 2-（2- 丙炔基）-4- 戊炔酸耦连合成 **M3**。之后引入点击化学途径使糖类中间体与 **M3** 连接，得到化合物 **1a** ～ **5a**。最后在甲醇钠作用下对化合物 **1a** ～ **5a** 进行脱乙酰基保护得到化合物 **1b** ～ **5b**。所有目标化合物均经 ^{1}H NMR、^{13}C NMR 和 ESI-MS 进行结构确认。

图 1　糖中间体合成路线

Fig 1　Sugar intermediate synthesis route

注（Note）：（i）Ac_2O，Py，r.t. 3 h（94% ～ 99%）；（ii）$TMSN_3$，$SnCl_3$，DCM，r.t. 4 h（79% ～ 85%）。

2.3　化学合成

2.3.1　中间体 **M1** ～ **M3** 的合成　参考文献[8-13]合成中间体 **M1** ～ **M3**。

化合物 **M1**：^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：7.43（s，1H），7.39（dd，J = 8.4，2.4 Hz，1H），7.14（dd，J = 8.4，2.4 Hz，1H），6.78（dd，J = 8.4，2.4 Hz，1H），6.54（d，J = 9.6 Hz，2H），6.34 ～ 6.27（m，2H），6.00（s，1H），4.00（s，3H），3.93（dd，J = 10.8，6.0 Hz，1H），3.77（s，3H），3.67（m，1H），3.56 ～ 3.49（m，1H），3.46（m，1H），3.39（s，

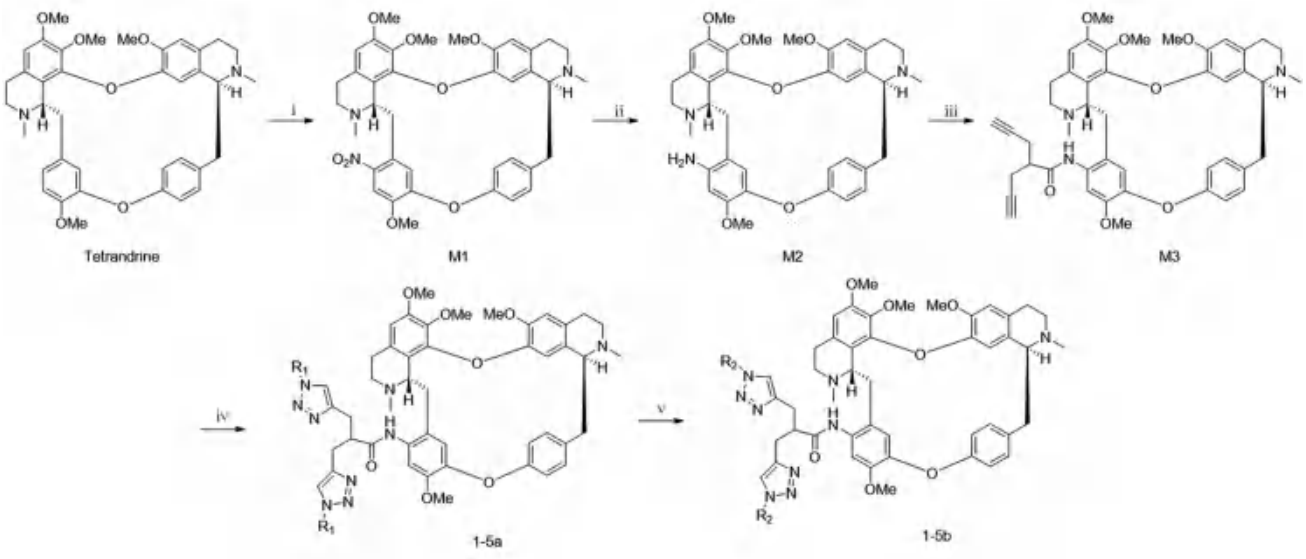


图 2　汉防己甲素糖苷衍生物合成路线

Fig 2　Synthetic routes of glycoside derivatives of tetrandrin

注（Note）：（i）Mixed acid [12.0 eq，HNO_3∶（CH_3CO）$_2O$ = 3∶5，*V*/*V*]，CH_2Cl_2，0 ℃ to r.t. 2 h（94%）；（ii）20% Pd/C，N_2H_4 • H_2O，MeOH，80 ℃，1 h（83%）；（iii）HBTU，DIPEA，DMF，r.t. 12 h（88%）；（ⅳ）$CuSO_4$，TBTA，$C_6H_7O_6Na$，DMF，r.t. 24 h，（75% ～ 90%）；（ⅴ）NaOMe，MeOH，r.t. 4 h（81% ～ 89%）。

3H），3.34 ～ 3.23（m，2H），3.20（s，3H），3.02 ～ 2.81（m，4H），2.80 ～ 2.69（m，2H），2.65（s，3H），2.55（dd，*J* = 13.8，1.8 Hz，1H），2.34（dd，*J* = 16.8，4.8 Hz，1H），2.22（s，3H）。

化合物 **M2**：^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）*δ*：7.28（dd，*J* = 6.6，1.8 Hz，1H），7.18（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），6.60（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），6.50（s，1H），6.46（s，1H），6.30（d，*J* = 11.4 Hz，2H），6.12（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），5.87（s，1H），3.95（d，*J* = 9.0 Hz，1H），3.87（s，3H），3.79（dd，*J* = 11.4，5.4 Hz，1H），3.73（s，3H），3.70 ～ 3.61（m，1H），3.49 ～ 3.42（m，1H），3.34（s，3H），3.25（dd，*J* = 12.6，5.4 Hz，1H），3.11（s，3H），3.05（dd，*J* = 14.4，9.0 Hz，1H），2.95 ～ 2.85（m，4H），2.74（t，*J* = 11.4 Hz，1H），2.71 ～ 2.65（m，1H），2.60（s，3H），2.42（s，3H），2.39（d，*J* = 4.8 Hz，1H），2.33（d，*J* = 14.4 Hz，1H）。

化合物 **M3**：黄色固体，收率 93%，m.p. 160 ～ 169 ℃。ESI-MS *m*/*z*：756.4 [M ＋ H] $^+$；^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）*δ*：12.45（s，1H），8.00（s，1H），7.31（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），7.22（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），6.58（s，1H），6.56（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），6.49（s，1H），6.33（s，1H），6.11（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），5.90（s，1H），4.02（d，*J* = 9.0 Hz，1H），3.94（s，3H），3.93 ～ 3.88（m，1H），3.74（s，3H），3.70（m，1H），3.53（m，1H），3.37（s，3H），3.27（m，1H），2.97（m，3H），2.81 ～ 2.73（m，2H），2.73 ～ 2.68（m，1H），2.68（s，3H），2.66 ～ 2.62（m，1H），2.57（m，3H），2.54（s，3H），2.53 ～ 2.47（m，1H），2.43（d，*J* = 14.4 Hz，1H），2.06（m，2H）；^{13}C NMR（150 MHz，$CDCl_3$）*δ* 170.6，156.6，152.2，149.4，148.9，148.5，144.8，144.5，138.3，133.0，132.9，132.6，129.7，127.8，127.1，126.3，125.1，121.7，121.5，121.4，120.9，120.6，112.2，106.2，106.0，81.6，81.4，70.5，70.5，64.3，61.2，60.1，56.3，55.7，55.5，47.4，45.1，43.7，42.2，40.8，40.2，38.7，24.3，21.8，21.6，20.7。

2.3.2　化合物 **a** 的合成（以化合物 **1a** 为例）　在氩气保护下将 **M3**（150 mg，0.2 mmol）和麦芽糖叠氮化物（661.2 mg，0.5 mmol），$CuSO_4$（25.54 mg，0.16 mmol），H_2O（0.36 mg，0.02 mmol），TBTA（84.90 mg，0.16 mmol），抗坏血酸钠（31.70 mg，0.32 mmol）溶解在 5 mL DMF 溶液中。之后超声除气 30 min，室温反应 24 h。用 TLC 监测反应完全后，加入饱和碳酸氢钠淬灭，用乙酸乙酯萃取，用无水硫酸钠干燥后浓缩得到衍生物 **1a**。

化合物 **1a**：淡黄色固体，收率 77%，m.p. 166 ～ 174 ℃。ESI-MS *m/z*：2078.8 [M ＋ H] $^+$；^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：12.37（s，1H），7.87（s，1H），7.66（s，1H），7.54（s，1H），7.29（s，1H），7.19（dd，*J* ＝ 8.4，2.6 Hz，1H），6.51（s，1H），6.48（dd，*J* ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），6.45（s，1H），6.29（s，1H），6.10（dd，*J* ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），5.88 ～ 5.81（m，2H），5.74（d，*J* ＝ 8.4 Hz，1H），5.49 ～ 5.43（m，2H），5.43 ～ 5.33（m，6H），5.31（s，1H），5.07（m，2H），4.88（m，2H），4.48（m，1H），4.35（m，1H），4.30 ～ 4.20（m，3H），4.20 ～ 4.11（m，2H），4.11 ～ 4.05（m，2H），4.02（m，1H），4.01 ～ 3.95（m，3H），3.93（s，3H），3.89（s，2H），3.74（s，3H），3.51 ～ 3.44（m，1H），3.38 ～ 3.34（m，1H），3.33（s，3H），3.28 ～ 3.25（m，1H），3.21（m，1H），3.14（m，3H），3.05（s，3H），2.99（m，1H），2.95 ～ 2.88（m，2H），2.86（d，*J* ＝ 9.6 Hz，1H），2.79（m，2H），2.70（d，*J* ＝ 15.6 Hz，1H），2.61（s，3H），2.46（s，3H），2.42（d，*J* ＝ 4.8 Hz，1H），2.27（d，*J* ＝ 14.4 Hz，1H），2.14 ～ 1.97（m，36H），1.77（s，3H），1.63（s，3H），1.11（t，*J* ＝ 7.2 Hz，1H）；^{13}C NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：171.9，170.6，170.5，170.5，170.3，170.3，170.0，170.0，169.9，169.9，169.4，169.2，168.9，156.2，152.1，149.4，148.6，148.2，145.6，145.5，144.8，144.3，138.1，133.8，132.9，132.5，129.6，128.4，127.5，125.4，121.7，121.4，121.3，120.8，120.7，120.4，112.1，106.1，105.9，95.9，95.9，85.1，75.3，75.2，75.2，75.2，72.4，72.4，70.9，70.5，70.0，69.9，69.2，69.2，68.7，68.7，67.9，67.8，64.1，62.5，62.4，61.4，61.4，61.2，59.9，56.2，55.7，55.5，53.5，52.3，47.9，43.0，42.4，40.6，39.9，38.8，29.1，27.5，20.8，20.7，20.7，20.7，20.6，20.6，20.0，19.8。

参考上述方法合成化合物 **2a** ～ **5a**。化合物 **2a**：淡黄色固体，收率 88%，m.p. 133 ～ 138 ℃。ESI-MS *m/z*：1502.6 [M ＋ H] $^+$；^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：12.39（s，1H），7.89（s，1H），7.72（s，1H），7.58（s，1H），7.29（d，*J* ＝ 2.4 Hz，1H），7.19（d，*J* ＝ 2.4 Hz，1H），6.57 ～ 6.54（m，1H），6.52（s，1H），6.44（s，1H），6.30（s，1H），6.15 ～ 6.10（m，1H），6.01（d，*J* ＝ 2.4 Hz，1H），5.97（dd，*J* ＝ 3.6，2.4 Hz，1H），5.91（d，*J* ＝ 3.6 Hz，1H），5.89（d，*J* ＝ 9.0 Hz，1H），5.86（d，*J* ＝ 3.0 Hz，2H），5.76（dd，*J* ＝ 8.4，3.7 Hz，1H），5.34（t，*J* ＝ 9.0 Hz，1H），5.30 ～ 5.25（m，1H），4.30（m，2H），4.02（m，1H），3.97（m，1H），3.94（s，3H），3.84（m，2H），3.78（m，1H），3.73（s，3H），3.73 ～ 3.70（m，1H），3.48（m，1H），3.32（s，4H），3.29 ～ 3.24（m，2H），3.23 ～ 3.15（m，2H），3.14 ～ 3.07（m，2H），3.06（s，3H），3.01 ～ 2.85（m，5H），2.73（m，3H），2.61（s，3H），2.49（m，1H），2.46（s，3H），2.32（d，*J* ＝ 14.4 Hz，1H），2.15（s，3H），2.08（s，3H），2.06 ～ 2.02（m，12H），2.01（s，3H），1.97（s，3H）；^{13}C NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：172.0，170.5，170.4，170.4，169.7，169.6，169.6，169.4，169.4，169.3，156.2，152.0，149.2，148.7，148.2，145.8，145.7，145.0，144.3，138.0，133.6，132.9，132.3，129.7，128.1，127.6，125.4，122.5，122.2，121.5，121.2，121.0，120.9，120.6，112.2，106.2，106.0，83.5，83.3，72.1，72.0，68.7，68.2，67.8，66.1，65.9，64.2，61.4，61.2，61.2，60.4，60.0，56.3，55.7，55.4，47.9，44.9，43.1，42.2，40.7，39.9，38.8，28.9，27.8，24.4，21.1，20.7，20.7，20.6，20.6，20.6，20.6，20.5，14.2。

化合物 **3a**：淡黄色固体，收率 75%，m.p. 163 ～ 172 ℃。ESI-MS *m/z*：1358.5 [M ＋ H] $^+$；^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：12.08（s，1H），7.67（s，1H），7.65（s，1H），7.53（s，1H），7.30（dd，*J* ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），7.19（dd，*J* ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），6.52（dd，*J* ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），6.49（d，*J* ＝ 8.4 Hz，1H），6.45（d，*J* ＝ 3.6 Hz，1H），6.31 ～ 6.27（m，1H），6.15 ～ 6.10（m，1H），6.00 ～ 5.94（m，1H），5.86（m，1H），5.81 ～ 5.78（m，1H），5.78 ～ 5.75（m，1H），5.55（m，1H），5.41（m，1H），5.20（m，1H），5.03（m，1H），4.03（m，1H），3.99 ～ 3.96（m，1H），3.94（s，3H），3.85（m，1H），3.78（m，1H），3.73（s，3H），3.72 ～ 3.68（m，1H），3.47（m，2H），3.34（s，3H），3.28（m，1H），3.25 ～ 3.18（m，2H），3.05（s，3H），3.04 ～ 2.98（m，3H），2.95 ～ 2.85（m，

5H），2.79 ～ 2.69（m，3H），2.61（s，3H），2.38（m，3H），2.36（m，1H），2.22（s，3H），2.17（s，2H），2.13 ～ 2.09（m，2H），2.06（s，3H），2.03 ～ 1.97（m，4H），1.76（m，4H）；^{13}C NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：172.1，170.4，169.7，169.6，169.4，169.2，168.7，152.0，148.7，145.5，145.2，138.0，132.9，129.7，121.5，120.6，112.2，105.8，89.8，83.4，82.9，74.2，70.7，68.3，68.0，67.8，65.8，65.7，64.1，63.7，63.2，61.2，60.4，60.0，56.3，55.7，55.5，52.3，49.0，45.0，42.4，42.2，40.7，40.6，38.8，29.7，24.5，21.1，20.7，20.7，20.6，20.5，20.3，20.1，20.1，14.2，13.7，13.2，11.3。

化合物 **4a**：淡黄色固体，收率 90%，m.p. 211 ～ 220 ℃。ESI-MS *m/z*：1386.6 [M ＋ H] $^+$；^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：12.36（s，1H），7.94（s，1H），7.65（s，1H），7.59（s，1H），7.29 ～ 7.25（m，1H），7.17（dd，J ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），6.52 ～ 6.47（m，2H），6.45（s，1H），6.31（s，1H），6.10 ～ 6.04（m，1H），6.01（dd，J ＝ 3.6，2.4 Hz，1H），5.98（dd，J ＝ 3.6，2.4 Hz，1H），5.91 ～ 5.87（m，1H），5.84 ～ 5.80（m，2H），5.78（dd，J ＝ 7.2，2.4 Hz，1H），5.72（dd，J ＝ 9.0，3.6 Hz，1H），5.15（t，J ＝ 9.0 Hz，1H），5.05（t，J ＝ 9.0 Hz，1H），3.94（s，3H），3.84（m，2H），3.73（s，3H），3.67 ～ 3.62（m，1H），3.47（d，J ＝ 13.2 Hz，1H），3.37（d，J ＝ 3.6 Hz，1H），3.34（s，3H），3.27 ～ 3.24（m，2H），3.22 ～ 3.18（m，1H），3.14 ～ 3.11（m，1H），3.09（d，J ＝ 3.6 Hz，1H），3.07 ～ 3.04（m，1H），3.02（s，3H），2.98（m，1H），2.90（m，2H），2.76（m，1H），2.72（t，J ＝ 7.2 Hz，1H），2.69 ～ 2.65（m，1H），2.62（s，3H），2.54 ～ 2.46（m，2H），2.43（s，1H），2.39（s，3H），2.29（d，J ＝ 14.4 Hz，1H），2.15（s，5H），2.10（s，1H），2.07（s，3H），2.02（s，3H），1.99（d，J ＝ 4.8 Hz，1H），1.97（s，3H），1.94（s，2H），1.20（d，J ＝ 6.0 Hz，3H），0.88（t，J ＝ 6.0 Hz，3H）；^{13}C NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：172.1，170.0，169.9，169.8，169.8，169.5，169.3，156.4，152.0，149.3，148.8，148.3，145.7，145.6，144.7，144.4，138.2，132.9，132.5，129.6，128.1，127.6，125.0，122.5，121.9，121.7，121.6，121.3，120.6，120.4，112.2，106.1，105.9，83.8，83.7，70.8，70.6，69.8，69.0，68.8，68.4，68.4，64.1，61.0，60.4，59.9，56.2，55.7，55.5，48.7，45.0，43.2，42.2，40.5，40.2，38.7，28.9，28.6，24.5，20.8，20.7，20.6，20.6，20.6，20.5，17.5，17.2，17.1，16.9，14.2。

化合物 **5a**：白色固体，收率 85%，m.p. 162 ～ 170 ℃。ESI-MS *m/z*：1358.5 [M ＋ H] $^+$；^{1}H NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：12.08（s，1H），7.67（d，J ＝ 2.4 Hz，1H），7.65（s，1H），7.53（s，1H），7.30（dd，J ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），7.19（dd，J ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），6.52（dd，J ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），6.49（d，J ＝ 8.4 Hz，1H），6.45（d，J ＝ 3.6 Hz，1H），6.29（d，J ＝ 9.6 Hz，1H），6.14 ～ 6.11（m，1H），5.99 ～ 5.92（m，1H），5.87（s，1H），5.87 ～ 5.80（m，1H），5.80 ～ 5.78（m，1H），5.77（m，1H），5.57 ～ 5.50（m，1H），5.41（dd，J ＝ 9.0，3.0 Hz，1H），5.20（m，1H），5.03（m，1H），4.02（m，1H），4.00 ～ 3.94（m，3H），3.94（s，3H），3.85（m，1H），3.78（d，J ＝ 9.6 Hz，1H），3.73（s，3H），3.73 ～ 3.67（m，1H），3.47（m，2H），3.34（s，3H），3.28（m，1H），3.25 ～ 3.17（m，2H），3.05（s，3H），3.04 ～ 2.98（m，3H），2.92（m，5H），2.81 ～ 2.63（m，4H），2.61（s，3H），2.40 ～ 2.34（m，4H），2.22（s，3H），2.17（s，3H），2.12 ～ 2.08（m，2H），2.05（d，J ＝ 5.4 Hz，3H），2.02 ～ 1.98（m，3H），1.76（m，4H）；^{13}C NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：170.3，170.2，170.0，169.9，168.9，168.8，152.0，152.0，149.2，148.2，138.0，132.8，129.8，128.2，125.9，125.6，124.5，121.4，121.2，120.9，120.8，120.2，112.3，105.9，86.6，86.5，70.6，70.6，68.0，67.9，67.8，67.6，67.2，66.8，61.3，61.2，60.1，60.0，56.2，56.2，55.7，55.7，55.6，55.5，49.0，44.8，42.9，41.8，40.9，40.6，21.5，21.0，20.9，20.7，20.6，20.6，20.5，20.2，19.8。

2.3.3　化合物 **b** 的合成（以 **1b** 为例）　取衍生物 **1a**（166 mg，0.08 mmol）和甲醇钠（26 mg，0.5 mmol）溶解在 3 mL 甲醇中，室温反应 2 h。TLC 监测反应完全后，用 5%HCl 活化的阳离子交换树脂调节 pH 至中性，之后滤除阳离子交换树脂，旋干甲醇得终产物粗品 **1b**。之后以 CH_2Cl_2/

MeOH（*V*/*V* = 4∶1）作为洗脱剂，通过硅胶柱色谱法纯化样品。

化合物 **1b**：淡黄色固体，收率 99%，m.p. 290 ～ 297 ℃。ESI-MS *m*/*z*：1490.6 [M + H]$^+$；^{1}H NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：12.27（s，1H），8.09（d，*J* = 51.6 Hz，2H），7.89（d，*J* = 2.4 Hz，1H），7.38（dd，*J* = 8.2，2.1 Hz，1H），7.17（dd，*J* = 8.1，2.6 Hz，1H），6.59（s，1H），6.47 ～ 6.33（m，3H），6.11（dd，*J* = 8.4，2.1 Hz，1H），5.76（m，3H），5.63（m，1H），5.55（m，2H），5.49（d，*J* = 6.0 Hz，1H），5.43（d，*J* = 6.0 Hz，1H），5.05（t，*J* = 4.7 Hz，2H），4.98（d，*J* = 5.4 Hz，3H），4.58（m，3H），4.09（s，2H），3.87～3.74（m，6H），3.38（s，4H），3.71 ～ 3.60（m，10H），3.60 ～ 3.52（m，4H），3.51 ～ 3.45（m，6H），3.28（m，6H），3.21 ～ 3.03（m，7H），3.03 ～ 2.91（m，2H），2.88（s，3H），2.88 ～ 2.76（m，4H），2.76 ～ 2.59（m，3H），2.48（s，6H），2.43（d，*J* = 15.6 Hz，1H），2.34（s，3H），2.16（d，*J* = 14.4 Hz，1H）；^{13}C NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ：172.3，156.6，152.1，149.2，148.9，148.4，144.8，144.7，144.4，144.3，138.2，133.5，133.3，130.4，128.3，127.8，125.2，122.4，121.7，121.6，120.9，120.7，112.9，107.0，106.9，104.2，87.3，87.3，80.4，78.1，78.1，76.0，75.7，73.7，72.3，72.2，71.0，68.6，63.2，61.2，60.9，60.5，59.6，56.4，56.0，56.0，55.4，49.1，47.6，44.7，42.8，41.9，41.8，40.8，40.4，28.6，28.1，24.5，20.3，11.5。

参考 **1b** 合成方法合成 **2b** ～ **5b**。化合物 **2b**：淡黄色固体，收率 91%，m.p. 280 ～ 291 ℃。ESI-MS *m*/*z*：1166.5 [M + H]$^+$；^{1}H NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：12.17（s，1H），8.08（s，1H），7.94（s，1H），7.90（s，1H），7.39（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），7.19（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），6.62（s，1H），6.46 ～ 6.40（m，2H），6.39（m，1H），6.12（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），5.88（d，*J* = 3.6 Hz，1H），5.80（d，*J* = 3.6 Hz，1H），5.76（s，1H），5.29（s，2H），5.05（s，3H），4.65（s，2H），4.33（m，2H），3.96（s，2H），3.86（m，1H），3.79（s，3H），3.67（s，3H），3.65（d，*J* = 8.4 Hz，2H），3.59（s，4H），3.55 ～ 3.52（m，8H），3.25 ～ 3.19（m，3H），3.08（m，2H），2.99 ～ 2.91（m，2H），2.89（m，3H），2.87（s，4H），2.86～2.79（m，4H），2.74（d，*J* = 13.2 Hz，2H），2.56（s，2H），2.42（d，*J* = 15.6 Hz，1H），2.27（s，2H），2.13（d，*J* = 14.4 Hz，1H），1.91（s，1H）；^{13}C NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ：172.1，156.4，152.1，149.2，148.7，148.4，144.9，144.5，144.2，138.2，133.3，130.3，127.7，125.1，123.1，122.7，121.6，121.5，120.8，120.7，112.9，106.9，86.1，86.0，79.0，78.5，78.4，71.5，71.5，68.7，68.6，67.7，67.5，63.2，61.2，61.0，60.8，59.6，56.3，56.0，56.0，55.4，49.1，48.3，44.7，42.1，40.6，40.4，28.1，21.6，20.3。

化合物 **3b**：淡黄色固体，收率 90%，m.p. 201 ～ 211 ℃。ESI-MS *m*/*z*：1106.5 [M + H]$^+$；^{1}H NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：12.24（s，1H），8.05（s，1H），7.96（s，1H），7.88（s，1H），7.38（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），7.18（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），6.59（s，1H），6.43 ～ 6.30（m，3H），6.11（dd，*J* = 8.4，2.4 Hz，1H），5.81（dd，*J* = 14.4，5.4 Hz，1H），5.75（d，*J* = 1.8 Hz，1H），5.41（dd，*J* = 12.6，9.0 Hz，2H），5.16（dd，*J* = 45.6，6.0 Hz，2H），5.01（s，1H），4.68（d，*J* = 7.8 Hz，1H），4.66 ～ 4.61（m，2H），3.99（m，2H），3.82（d，*J* = 7.8 Hz，1H），3.78（d，*J* = 2.4 Hz，3H），3.74（m，2H），3.67（s，4H），3.64（m，2H），3.55 ～ 3.47（m，5H），3.17 ～ 3.04（m，4H），3.04 ～ 2.88（m，4H），2.88（s，3H），2.81（m，5H），2.67（d，*J* = 12.0 Hz，2H），2.32（s，3H），2.13（d，*J* = 14.4 Hz，1H）；^{13}C NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ：172.3，156.4，152.1，149.3，148.4，144.9，144.8，144.4，144.1，138.2，134.6，133.2，130.3，129.1，127.7，125.2，122.0，121.6，120.7，112.9，106.9，88.5，88.4，82.6，78.7，74.2，69.8，68.8，63.4，61.2，60.7，59.6，56.3，56.0，55.9，55.4，44.9，42.5，40.8，40.4，37.1，25.2，20.3。

化合物 **4b**：淡黄色固体，收率 94%，m.p. 219 ～ 233 ℃。ESI-MS *m*/*z*：1134.5 [M + H]$^+$；^{1}H NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：12.00（s，1H），8.04（d，*J* = 12.4 Hz，1H），7.89（d，*J* = 23.4 Hz，1H），7.82（d，*J* = 11.4 Hz，1H），7.42 ～ 7.35（m，1H），7.17（td，*J* = 7.2，2.4 Hz，1H），6.60（d，*J* = 8.4 Hz，1H），

6.43 ～ 6.37（m，2H），6.34（d，J ＝ 6.0 Hz，1H），6.14 ～ 6.06（m，1H），5.88（dd，J ＝ 18.0，4.8 Hz，1H），5.84 ～ 5.79（m，1H），5.76 ～ 5.72（m，1H），5.31（d，J ＝ 22.6 Hz，2H），5.01（s，3H），4.36（d，J ＝ 3.0 Hz，1H），4.28（t，J ＝ 3.6 Hz，1H），3.89 ～ 3.79（m，4H），3.77（s，5H），3.72（d，J ＝ 6.6 Hz，1H），3.67（s，5H），3.63（d，J ＝ 9.6 Hz，2H），3.30（m，3H），3.27（s，4H），3.12（m，8H），2.97 ～ 2.90（m，2H），2.89 ～ 2.83（m，6H），2.83 ～ 2.75（m，4H），2.72 ～ 2.62（m，4H），2.40～2.33（m，1H），2.25（d，J＝ 9.6 Hz，1H），2.20（s，2H），2.10 ～ 2.05（m，1H），1.12（m，3H），0.97（d，J ＝ 6.0 Hz，2H），0.94（d，J＝6.0 Hz，1H），0.90（d，J＝6.0 Hz，1H），0.83（dd，J＝6.0，3.0 Hz，2H）；^{13}C NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ：172.1，169.6，152.1，149.1，148.7，148.3，145.1，144.8，144.6，144.2，138.1，133.2，125.1，123.4，122.7，121.6，121.4，120.9，106.9，86.6，86.3，86.2，75.3，73.5，73.4，72.6，72.4，71.7，71.6，71.4，71.3，71.0，70.9，69.1，68.9，63.2，59.5，56.4，56.0，56.0，55.9，49.3，44.7，42.0，40.7，40.4，29.0，24.7，22.5，20.9，20.3，18.2，17.9，17.8，17.8。

化合物 **5b**：白色固体，收率 93%，m.p. 201 ～ 232 ℃。ESI-MS m/z：1106.5 [M ＋ H]$^+$；^{1}H NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：12.08（s，1H），8.36（s，2H），8.06（s，1H），7.91（s，1H），7.83（s，1H），7.39（dd，J＝8.4，2.4 Hz，1H），7.18（dd，J ＝ 8.4，2.4 Hz，1H），6.60（s，1H），6.48～6.36（m，3H），6.11（dd，J＝8.4，2.4 Hz，1H），5.76（s，1H），5.35（dd，J ＝ 22.2，9.0 Hz，2H），4.02（t，J ＝ 9.0 Hz，3H），3.97（t，J ＝ 9.0 Hz，3H），3.85 ～ 3.81（m，3H），3.79（s，3H），3.78 ～ 3.69（m，8H），3.68（s，3H），3.67～3.61（m，5H），3.55（dd，J＝9.0，3.0 Hz，2H），3.51（dd，J＝9.0，3.0 Hz，2H），3.29（s，3H），3.17 ～ 3.05（m，4H），2.92（d，J＝5.4 Hz，1H），2.88（s，3H），2.86 ～ 2.78（m，5H），2.77 ～ 2.74（m，1H），2.68（d，J＝13.8 Hz，2H），2.51（dd，J＝3.6，1.8 Hz，6H），2.39（d，J ＝ 16.2 Hz，1H），2.29（s，3H），2.12（d，J＝14.4 Hz，1H），1.88（s，1H）；^{13}C NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ：177.0，171.4，161.0，156.8，154.0，153.1，153.0，149.7，149.5，149.4，148.8，142.9，139.5，138.0，135.0，133.9，133.0，132.5，130.2，126.9，126.4，126.2，125.6，125.4，117.6，111.6，93.4，78.5，78.4，74.5，74.5，74.4，74.3，73.5，68.1，66.0，64.3，61.1，60.7，60.7，53.1，49.6，47.6，47.2，45.5，45.2，41.8，33.7，32.9，30.0，25.1。

2.4　汉防己甲素 C-14 位糖苷衍生物溶解度测定

本课题通过 pkCSM 途径对汉防己甲素衍生物溶解度进行预测，之后进行验证[24]。称取样品各 2 mg，除样品 **1b** 逐次加入蒸馏水 2 μL 外，其余样品逐次加入蒸馏水 20 μL，超声 10 min，静置，30 min 内无可见的溶质颗粒，则认为完全溶解。重复三次得出水溶性结果见表 2。水溶性趋势与预测结果一致，表明汉防己甲素衍生物水溶性得到了极大改善。

表 2　水溶性结果

Tab 2　Water solubility

化合物	水溶性 /（mg • mL^{-1}）
汉防己甲素	NA
1b	1000 ～ 1100
2b	33 ～ 40
3b	25 ～ 33
4b	17 ～ 20
5b	25 ～ 33

3　讨论

本研究以汉防己甲素为起始原料，经过硝化反应、还原反应、酰胺缩合反应、点击化学反应和消去反应得到新型汉防己甲素衍生物 11 个。通过 pkCSM 途径对汉防己甲素衍生物进行溶解度预测，之后进行水溶性测试，结果表明衍生物水溶性相比于汉防己甲素原料得到了极大提升。其中 **1b** 汉防己甲素麦芽糖衍生物提升最大，可达到 1000 ～ 1100 mg • mL^{-1}。

汉防己甲素几乎不溶于水，而目前国内外针对提升汉防己甲素水溶性的研究很少。糖不仅拥有极好的亲水性，同时参与生命系统中多种关键反应，研究意义更大。本课题组在前期研究基础上进行路线优化，避免引入不稳定基团溴代糖和叠氮化钠，提升合成糖叠氮衍生物时的安全和效率；另外在合成中间体 **M3** 时将催化剂改为 HBTU 和 DIPEA，产率极大提升。最重要的是设计合成与两个寡糖相连的糖苷类衍生物 **1b** ～ **5b**，让汉防己甲素衍生物水溶性得到了明显提升，具备进一步研究的意义。接下来可对目标化合物进

行抗肿瘤活性测试及药代动力学实验，以期得到可口服给药的活性较好的汉防己甲素类药物。

参考文献

[1] Zhong Z，Qian Z，Zhang XU，et al. Tetrandrine prevents bone loss in ovariectomized mice by inhibiting RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. Front Pharmacol，2020，10：1530.

[2] Li G，Li WR，Jin YG，et al. Tetrandrine attenuated doxorubicin-induced acute cardiac injury in mice [J]. Biomed Res Int，2020，2020：2616024.

[3] Guo YB，Pei XH. Tetrandrine-induced autophagy in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell through the inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. Evid-Based Compl Alt，2019，2019：7517431.

[4] Bhagya N，Chandrashekar KR. Tetrandrine and cancer-an overview on the molecular approach [J]. Biomed Pharmacother，2018，97：624-632.

[5] Liao D，Zhang W，Gupta P，et al. Tetrandrine interaction with ABCB1 reverses multidrug resistance in cancer cells through competition with anti-cancer drugs followed by downregulation of ABCB1 expression [J]. Molecules，2019，24（23）：4383.

[6] Niu N，Qu TL，Xu JF，et al. Synthesis of 5-alkynyltetrandrine derivatives and evaluation of their anticancer activity on A549 cell lines [J]. Anti-Cancer Agents Med Chem，2019，19（12）：1454-1462.

[7] Shi C，Khan SA，Wang KP，et al. Improved delivery of the natural anticancer drug tetrandrine [J]. Int J Pharm，2015，479（1）：41-51.

[8] Hu SC，Yang J，Chen C，et al. Design，synthesis of novel tetrandrine-14-l-amino acid and tetrandrine-14-l-amino acid-urea derivatives as potential anti-cancer agents [J]. Molecules，2020，25（7）：1738.

[9] Liu YZ，Huang L，Sun QY，et al. Syntheses and anti-cancer activities of derivatives of tetrandrine and fangchinoline [J]. Chem Res Chin Univ，2014，30：937-940.

[10] Song JR，Lan JJ，Chen C，et al. Design，synthesis and bioactivity investigation of tetrandrine derivatives as potential anti-cancer agents [J]. Med Chem Comm，2018，9（7）：1131-1141.

[11] Lan JJ，Wang N，Huang L，et al. Design and synthesis of novel tetrandrine derivatives as potential anti-tumor agents against human hepatocellular carcinoma [J]. Med Chem，2017，127：554-566.

[12] Jiang TB，Xie GT，Zeng ZR，et al. A novel class of C14-sulfonate-tetrandrine derivatives as potential chemotherapeutic agents for hepatocellular carcinoma [J]. Front Chem，2023，10：1107824.

[13] Wang YC，Zhang RH，Hu SC，et al. Design，synthesis，and biological evaluation of N14-amino acid-substituted tetrandrine derivatives as potential anti-tumor agents against human colorectal cancer [J]. Molecules，2022，27（13）：4040.

[14] Gostyńska A，Czerniel J，Kuźmińska J，et al. Honokiol-loaded nanoemulsion for glioblastoma treatment：statistical optimization，physicochemical characterization，and an in vitro toxicity assay [J]. Pharmaceutics，2023，15（2）：448.

[15] 孟启，朱信辉，蒋卫华，等 . 水溶性氮杂环修饰小檗碱衍生物的合成 [J]. 化工进展，2019，38（11）：5066-5073.

[16] 张萌 . 双苄基异喹啉类化合物合成及应用研究 [D]. 济南：山东师范大学，2014.

[17] 李格非，荆杰，罗振扬，等 . 无保护糖基化反应研究进展 [J]. 有机化学，2023，43（6）：1991.

[18] Grymel M，Pastuch-Gawołek G，Lalik A，et al. Glycoconjugation of betulin derivatives using copper-catalyzed 1，3-dipolar azido-alkyne cycloaddition reaction and a preliminary assay of cytotoxicity of the obtained compounds [J]. Molecules，2020，25（24）：6019.

[19] Abere TA，Okoto PE，Agoreyo FO. Antidiarrhoea and toxicological evaluation of the leaf extract of *Dissotis rotundifolia* triana（Melastomataceae）[J]. Bmc Complem Altern M，2010，10（1）：1-7.

[20] 宋俊蓉 . 汉防己甲、乙素糖苷化衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 贵阳：贵州大学，2018.

[21] Pires DEV，Blundell TL，Ascher DB. pkCSM：predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures [J]. J Med Chem，2015，58（9）：4066-4072.

[22] Yang JG，Zhang T，Tian CY，et al. Multi-enzyme systems and recombinant cells for synthesis of valuable saccharides：advances and perspectives [J]. Biotechnol Adv，2019，37（7）：107406.

[23] Song H，Allison SJ，Brabec V，et al. Glycoconjugated metallohelices have improved nuclear delivery and suppress tumour growth in vivo [J]. Angewandte Chemie，2020，132（34）：14785-14793.

[24] 曹馨元，刘晓峰，尹永霞，等 .*β*-谷甾醇及其衍生物的溶解性特征及抗抑郁活性研究 [J]. 宁夏医学杂志，2021，43（5）：436-438.

（收稿日期：2023-12-15；修回日期：2024-01-22）

基于 LC/GC-MS 和网络药理学探讨大黄 - 桃仁药对逐瘀泻热的作用机制

黄建萍，井亚江，王七龙，邹远荣，夏泽冰，王红艳，彭亮，张岗，高静，颜永刚*（陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心/“秦药”研发重点实验室，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 分析大黄 - 桃仁药对水煎液的化学成分，探讨其逐瘀泻热的药效物质及作用机制。**方法** 采用 UPLC-TOF-MS、GC-MS 对大黄 - 桃仁药对水煎液进行成分分析，结合网络药理学方法构建大黄 - 桃仁药对逐瘀泻热的“疾病 - 成分 - 靶点”网络，筛选目标信号通路。采用间隔 24 h 两次大鼠尾静脉注射内毒素脂多糖复制“瘀热”大鼠模型，通过大鼠体温变化，血液流变、凝血四项（TT、PT、APTT、FIB）、炎症因子水平、氧化应激水平等的测定对大黄 - 桃仁药对逐瘀泻热进行药效评价。通过分子对接技术、实时荧光定量聚合酶链式反应（RT-qPCR）对预测的核心靶点进行验证。**结果** 从大黄 - 桃仁药对水煎液中鉴定得到化合物 64 个，网络药理学分析结果表明大黄 - 桃仁药对中芦荟大黄素、圣草酚、表没食子儿茶素没食子酸酯、原花青素等核心成分，通过作用于 AKT1、PTGS2、SRC、IL1B、TNF 等核心靶点，调控 VEGF、MAPK、IL-17、TNF 等通路达到逐瘀泻热的目的。动物实验结果表明，大黄 - 桃仁药对给药后，模型大鼠的氧化应激（NO、SOD、MDA）、凝血四项、血液流变、体温等指标均向正常回调，大黄 - 桃仁药对能够降低炎症因子 IL-1β、IL-17、TNF-α 含量以及核心靶点 AKT1、SRC、MYC、EGFR、PTGS2、TP53 mRNA 表达。**结论** 圣草酚、芦荟大黄素、原花青素、没食子酸儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯等化合物为大黄 - 桃仁药对逐瘀泻热的药效物质。大黄 - 桃仁药对通过多靶点，多通路调控机体炎症、氧化应激、血管生成、血管内皮等方面发挥逐瘀泻热作用。

关键词：大黄 - 桃仁药对；逐瘀泻热；UPLC-TOF-MS；GC-MS；网络药理学；药效学实验
中图分类号：R285，R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0892-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.011

Active ingredients and mechanism of Rhubarb-Peach kernel pair in removing blood stasis and purging heat based GC-MS and network pharmacology

HUANG Jian-ping, JING Ya-jiang, WANG Qi-long, ZOU Yuan-rong, XIA Ze-bing, WANG Hong-yan, PENG Liang, ZHANG Gang, GAO Jing, YAN Yong-gang* (*Shaanxi Engineering Research Center for Application and Development of Chinese Medicine in Qinling Mountains/Key Laboratory of Qin Medicine Research and Development*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To analyze the chemical compositions of the decoction of Rhubarb-Peach kernel pair, and to determine the pharmacodynamic substances and mechanism of action in removing blood stasis and purging heat. **Methods** UPLC-TOF-MS and GC-MS were used to analyze the composition of Rhubarb-Peach kernel pair decoction. Network pharmacology was used to establish the “disease-component-target” network of Rhubarb-Peach kernel pair and screen the target signaling pathways. The rat model of stasis-heat was replicated by tail vein injection of endotoxin lipopolysaccharide twice at an interval of 24 hours. The efficacy of Rhubarb-Peach kernel pair was evaluated with changes in

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973592）；陕西省中医药管理局项目（No.2021-GJ-JC004）。
作者简介：黄建萍，女，在读硕士研究生，主要从事中药配伍与中药药效成分研究，email：2281814076@qq.com *通信作者：颜永刚，男，教授，主要从事中药资源开发与中药配伍研究，email：yunfeng828@163.com

body temperature, blood rheology, four coagulation items (TT, PT, APTT, and FIB), inflammatory factor levels, and oxidative stress levels in rats. The predicted core targets were verified by molecular docking and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **Results** Totally 64 compounds of Rhubarb-Peach kernel pair decoction were identified. Network pharmacological indicated that the core components of Rhubarb-Peach kernel pair, such as aloe-emodin, eriodictyol, epigallocatechin gallate, and procyanidin modulated the pathways of VEGF, MAPK, IL-17, and TNF to remove blood stasis and purge heat through the core targets, such as AKT1, PTGS2, SRC, IL1B and TNF. Docking between the active ingredients and core targets molecules were favorable. The animal experiments showed that after the Rhubarb-Peach kernel pair treatment, the oxidative stress (NO, SOD, and MDA), four coagulation items, blood rheology, body temperature and other indicators of the blood of stasis-heat model rats all returned to normal levels. Rhubarb-Peach kernel pair reduced the contents of inflammatory factors IL-1β, IL-17, and TNF-α, as well as the expression of core targets, namely AKT1, SRC, MYC, EGFR, PTGS2, and TP53 mRNA. **Conclusion** Compounds such as eriodictyol, aloe-emodin, procyanidin, catechin gallte, and epigallocatechin gallate are the material basis for Rhubarb-Peach kernel pair to remove blood stasis and purge heat. Through multi-target and multi-pathway regulation of the inflammation, oxidative stress, angiogenesis and vascular endothelium, Rhubarb-Peach kernel pair helps remove the blood stasis and purge heat.

Key words: Rhubarb-Peach kernel pair; remove blood stasis and purge heat; UPLC-TOF-MS; GC-MS; network pharmacology; pharmacodynamic experiment

大黄 - 桃仁药对（DT）使用历史悠久，是著名的逐瘀泻热药对，首载于《伤寒论》中的桃核承气汤、抵当汤、抵当丸，还常应用于各类活血化瘀方剂中，如大黄牡丹汤、下瘀血汤等[1]。大黄苦寒，既能清积泻热，又能活血化瘀，其主要化学成分为蒽醌类、二苯乙烯类、鞣质类等[2]。桃仁性平，味苦、甘，祛瘀泻热，其主要化学成分为挥发油、氰苷、氨基酸等[3]。两药配伍，刚柔并济，药少力专，使清热之力大增，活血又不伤血，以达到治疗瘀热互结病证的目的[4]。现代药理与临床研究发现，DT 对瘀热互结所致的糖尿病及其并发症、中风后遗症[5]、脑卒中[6]等疾病有很好的治疗作用。但目前对其发挥逐瘀泻热功效的物质基础和作用机制却鲜有报道。药物所含有的物质成分是药物发挥疗效的关键，也是解析其发挥药效作用机制的基础。已有报道考察的大多是蒽醌类成分[7-11]，对 DT 全成分的表征尚不全面，还需进一步阐明 DT 物质基础，解析其逐瘀泻热的作用机制。UPLC-TOF-MS、GC-MS 能够快速分离和鉴定中药的复杂成分，在中药的成分分析及质量控制方面具有一定的优势，两者结合能够较全面地表征中药的化学成分。网络药理学融合了多学科的概念和方法，借助计算机网络构建“成分 - 靶点 - 通路”关系，从整体上分析多成分中药的作用机制。本研究通过 GC-MS、UPLC-TOF-MS、网络药理学、分子对接技术，多角度探讨 DT 发挥逐瘀泻热功效的物质基础及作用机制，并通过构建大鼠“瘀热”模型探讨 DT 治疗效果，分析结果并加以验证，以期为 DT 临床应用提供科学依据。

1　材料

1.1　实验动物

雌性 8 周龄 SPF 级 SD 大鼠，体重（200±20）g[成都达硕实验动物有限公司，动物合格证号：SCXK（川）2020-030]，饲养于陕西中医药大学中药药理实验室。本实验符合实验动物伦理相关规定和管理条例，得到陕西中医药大学动物伦理委员会批准 [批件号：SUCMDL20210930001]。

1.2　试药

大黄（批号：20201212，产地：青海省果洛州达日县），桃仁（批号：20201224，产地：甘肃省平凉市静宁县），经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为蓼科植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 的干燥根和根茎、蔷薇科植物山桃 *Prunus davidiana*（Carr.）Franch. 的干燥成熟种子[9]。临用前，大黄炮制为熟大黄，桃仁去皮尖，粉碎过 40 目筛。

吡啶（阿达玛斯试剂有限公司），甲氧胺盐（上海 TCI 公司），脂多糖（LPS）、核糖醇（美国 Sigma 公司），双（三甲基硅基）三氟乙酰胺（BSTFA，美国 REGIS Technologies 公司），饱和脂肪酸甲酯（德国 Dr. Ehrenstorfer 公司）；甲

醇、甲酸、乙酸铵（分析纯，美国 Thermo Fisher 公司）；纯化水自制。凝血酶时间（TT）、凝血酶原时间（PT）、活化部分凝血活酶时间（APTT）、血浆纤维蛋白原（FIB）检测试剂盒（泰州中勤世帝生物技术有限公司）；大鼠白细胞介素 -1β（IL-1β）、白细胞介素 -17（IL-17）酶联免疫试剂盒（批号分别为 ERC007.96、ERC170.96，欣博盛生物）；肿瘤坏死因子 α（TNF-α）（美国 Invitrogen 公司）；一氧化氮（NO）、丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒（南京建成生物工程研究所）；5×SmArt 反转录预混液、2×qPCR SmArt 预混液（SYBR Green）（笛医生物）。

1.3　仪器

明澈 D24UV 纯水仪（德国 MerckMillipore）；PEGASUSHT 质谱仪（美国 LECO）；Q Exactive HF 质谱仪、Vanquish UHPLC 色谱仪（美国 Thermo Fisher）；7890A 气相色谱仪（美国 Agilent）；Infinite 200 Pro 酶标仪（瑞士 Tecan）；LG-R-80A 全自动血液流变学仪（北京世帝科学仪器公司）；LG-PABER-1 血小板聚集凝血因子分析仪（北京世帝科学仪器公司）；MT-JC218 数字式电子体温计（深圳家康科技有限公司）；TC-96/G/H（b）B 基因扩增仪（杭州博日科技股份有限公司）；K5800 自动超微量分光光度计（凯奥科技有限公司）。

2　方法与结果

2.1　DT 化学成分分析

2.1.1　供试品溶液制备　取大黄 - 桃仁 1∶1 混合粉末，加 10 倍量水浸泡 60 min，煎煮 60 min，过滤，滤渣加 8 倍量水煎煮 30 min，过滤，合并两次滤液，浓缩至 0.1 g • mL^{-1}，即得供试品溶液。

① UPLC-TOF-MS 样品前处理：取样品溶液 100 μL，加甲醇 400 μL，涡旋振荡 5 min，冰浴静置 5 min，15 000 r • min^{-1}、4 ℃离心 10 min。取上清液加纯水稀释至甲醇质量分数 53%，15 000 r • min^{-1}、4 ℃离心 10 min，取上清液。

② GC-MS 处理条件：取样品溶液 2 mL，加 450 μL 甲醇 - 水（3∶1）及 10 μL 核糖醇，涡旋振荡 30 s，35 Hz 研磨 4 min，0 ℃超声 5 min，15 000 r • min^{-1}、4 ℃离心 15 min。取 100 μL 真空干燥，加入 60 μL 甲氧胺盐试剂混匀，烘 30 min；加入 80 μL BSTFA（含有 1%TMCS）于 70 ℃烘 1.5 h，冷却至室温。

2.1.2　UPLC-TOF-MS 条件

① 色谱条件：色谱柱为 HyperilGold Column C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：0.1% 甲酸（正离子模式 A）/5 mmol 乙酸铵（负离子模式 A）- 甲醇（B）；梯度洗脱（0 ～ 1.5 min，98%A，1.5 ～ 12 min，98% ～ 0%A，12 ～ 14 min，0%A，14 ～ 14.1 min，0% ～ 98%A，14.1 ～ 17.0 min，98%A）；柱温：40 ℃；流速：0.2 mL • min^{-1}；进样量：1.0 μL。

② 质谱条件：采用电喷雾离子源（ESI），源喷雾电压：3.2 kV；鞘气流速：40 L • min^{-1}；辅助气流：10 L • min^{-1}；鞘气和辅助气为氮气；加热毛细管温度：320 ℃；毛细管电压：35 V；质量扫描范围：*m/z* 100 ～ 1050。

2.1.3　GC-MS 条件　色谱柱：DB-5MS（30 mm×250 mm×0.25 μm）；载气：高纯氦气；流速：1.0 mL • min^{-1}；气相进样口温度：280 ℃；柱箱升温程序：起始温度 50 ℃保持 1 min，10 ℃ • min^{-1} 速率升温到 310 ℃，保持 8 min；进样量：1 μL；质谱接口温度（传输线温度）：280 ℃；EI 离子源温度：250 ℃；电离电压：－ 70 eV；质量扫描范围：*m/z* 50 ～ 500；扫描速率：12.5 spetra • s^{-1}；溶剂延迟：6.25 min。

2.1.4　化学成分鉴定

① UPLC-TOF-MS：原始数据使用 CD3.1 数据进行峰提取、峰对齐等分析，比对 mzCloud、mzVault、MassList 数据库以及现有文献进行化合物鉴定。

② GC-MS：原始数据使用 ChromaTOF 软件（V4.3x，LECO）进行峰提取、基线矫正等分析，根据质谱匹配度、保留时间指数匹配等比对 LECO-Fiehn Rtx5 数据库结合现有文献进行化合物鉴定。

结果如表 1 所示，从 DT 水煎液共鉴定出 64 个化学成分，包括蒽醌、黄酮、鞣质、二苯乙烯、脂肪酸、氰苷等化合物。获得 DT 水煎液 UPLC-TOF-MS 正、负离子模式下的总离子流（TIC）图（见图 1）；GC-MS 的离子流图（见图 2）。

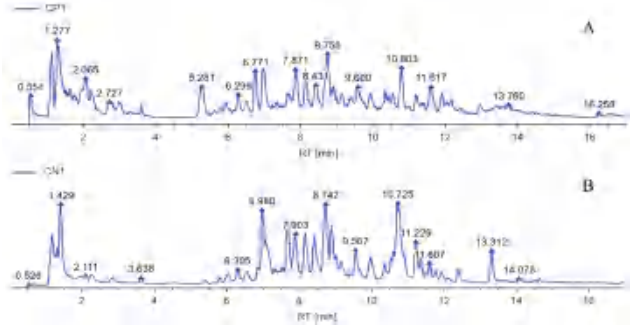


图 1　DT 在 UPLC-TOF-MS 正（A）、负（B）离子模式下的 TIC 图

Fig 1　TIC diagram of DT in UPLC-TOF-MS positive（A）and negative（B）ion modes

2.2　网络药理学分析

2.2.1　靶点的预测与筛选　以 UPLC-TOF-MS 和 GC-MS 鉴定的成分为基础，检索 PubChem 数据库

表 1　DT 水煎液中化学成分的鉴定

Tab 1　Identification of chemical constituents in DT decoction

编号	化合物	分子式	保留时间 /min	*m/z*	类型	检测方式	文献	来源
1	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	1.139	191.019	有机酸类	$[M+H]^-$	[11]	桃仁
2	L- 天冬氨酸	$C_4H_7NO_4$	1.228	132.030	氨基酸类	$[M+H]^-$	[7]	桃仁
3	*α*- 乳糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1.256	387.114	糖类	$[M+H]^-$	[7]	桃仁
4	L- 赖氨酸	$C_6H_{14}N_2O_2$	1.285	145.098	氨基酸类	$[M+H]^-$	[7]	桃仁
5	尿嘧啶	$C_4H_4N_2O_2$	1.694	111.020	核苷酸类	$[M+H]^-$	[7]	桃仁
6	山柰酚 -3- 龙胆二糖苷	$C_{27}H_{30}O_{16}$	5.816	609.146	黄酮类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
7	（－）- 没食子酸儿茶素	$C_{22}H_{18}O_{10}$	6.702	441.081	鞣质类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
8	番泻苷 A	$C_{42}H_{38}O_{20}$	6.855	861.189	蒽酮类	$[M+H]^-$	[12]	大黄
9	儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	6.984	289.071	鞣质类	$[M+H]^-$	[12]	大黄
10	表没食子儿茶素	$C_{15}H_{14}O_7$	7.041	259.061	鞣质类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
11	大黄酸 -8- 葡萄糖苷	$C_{21}H_{18}O_{11}$	7.107	445.077	蒽醌类	$[M+H]^-$	[12]	大黄
12	1，8- 二羟基蒽醌	$C_{14}H_8O_4$	7.107	239.035	蒽醌类	$[M+H]^-$	[12]	大黄
13	表没食子儿茶素没食子酸酯（EGCG）	$C_{22}H_{18}O_{11}$	7.553	457.077	鞣质类	$[M+H]^-$	[12]	大黄
14	原花青素 B_1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	7.627	577.134	鞣质类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
15	番泻苷 C	$C_{42}H_{40}O_{19}$	7.955	847.208	蒽酮类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
16	白藜芦醇	$C_{14}H_{12}O_3$	8.156	227.071	二苯乙烯类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
17	柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	8.305	579.172	黄酮类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
18	没食子酸	$C_7H_6O_5$	8.396	169.014	鞣质类	$[M+H]^-$	[7]	桃仁
19	表儿茶素没食子酸酯	$C_{22}H_{18}O_{10}$	8.537	441.082	鞣质类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
20	杨梅素 -3-*O*- 半乳糖苷	$C_{21}H_{20}O_{13}$	8.610	479.083	黄酮类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
21	三叶海棠素	$C_{21}H_{20}O_9$	8.835	415.102	黄酮类	$[M+H]^-$	[2，12]	大黄
22	D（－）- 苦杏仁苷	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	9.009	456.151	氰苷类	$[M+H]^-$	[11]	桃仁
23	番泻苷 B	$C_{42}H_{38}O_{20}$	9.574	861.188	蒽酮类	$[M+H]^-$	[12]	大黄
24	圣草酚	$C_{15}H_{12}O_6$	10.020	287.056	黄酮类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
25	*ε*- 葡萄素	$C_{28}H_{22}O_6$	10.183	453.134	二苯乙烯类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
26	柚皮素查尔酮	$C_{15}H_{12}O_5$	10.634	253.050	黄酮类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
27	大黄酸	$C_{15}H_8O_6$	10.718	283.024	蒽醌类	$[M+H]^-$	[12]	大黄
28	根皮素	$C_{15}H_{14}O_5$	10.819	273.076	黄酮类	$[M+H]^-$	[7]	桃仁
29	香橙素	$C_{15}H_{12}O_6$	11.234	287.056	黄酮类	$[M+H]^-$	[2]	大黄
30	DL- 精氨酸	$C_6H_{14}N_4O_2$	1.288	175.119	氨基酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
31	L- 苏氨酸	$C_4H_9NO_3$	1.318	120.066	氨基酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
32	L- 谷氨酸	$C_5H_9NO_4$	1.325	148.060	氨基酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
33	脯氨酸	$C_5H_9NO_2$	1.399	116.071	氨基酸类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
34	胞苷	$C_9H_{13}N_3O_5$	1.475	244.093	核苷酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
35	胞嘧啶	$C_4H_5N_3O$	1.476	112.051	核苷酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
36	腺嘌呤	$C_5H_5N_5$	1.557	136.062	核苷酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
37	L- 缬氨酸	$C_5H_{11}NO_2$	1.679	118.086	氨基酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
38	L- 酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	2.280	182.081	氨基酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
39	腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	2.781	268.104	核苷酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
40	2'- 脱氧腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_3$	3.059	252.109	核苷酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
41	鸟嘌呤	$C_5H_5N_5O$	3.082	152.057	核苷酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
42	（－）- 表没食子儿茶素	$C_{15}H_{14}O_7$	5.379	307.081	鞣质类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
43	原花青素 B_2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	6.359	579.149	鞣质类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
44	*cis*- 白藜芦醇	$C_{14}H_{12}O_3$	7.260	229.086	二苯乙烯类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
45	（*R*）- 野黑樱苷	$C_{14}H_{17}NO_6$	7.678	296.113	氰苷类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁
46	大黄酚 -8-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_9$	7.773	439.102	蒽醌类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
47	白皮杉醇	$C_{14}H_{12}O_4$	8.082	245.081	二苯乙烯类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
48	没食子酸儿茶素	$C_{22}H_{18}O_{10}$	8.423	443.097	鞣质类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
49	紫檀芪	$C_{16}H_{16}O_3$	8.789	257.117	二苯乙烯类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
50	芦荟大黄素	$C_{15}H_{10}O_5$	9.038	271.060	蒽醌类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
27	大黄酸	$C_{15}H_8O_6$	9.445	285.039	蒽醌类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
51	柚皮素	$C_{15}H_{12}O_5$	9.463	273.076	黄酮类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
52	脱氧土大黄苷	$C_{21}H_{24}O_8$	9.926	405.155	二苯乙烯类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
53	丹叶大黄素 -3'-*O*- 葡萄糖苷	$C_{21}H_{24}O_9$	10.116	421.150	二苯乙烯类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
54	异丹叶大黄素	$C_{15}H_{14}O_4$	10.409	259.097	二苯乙烯类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
55	虎杖苷	$C_{20}H_{22}O_8$	10.587	391.138	二苯乙烯类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
56	组氨酸	$C_6H_9N_3O_2$	11.079	311.146	氨基酸类	$[M+H]^+$	[7]	桃仁

续表 1

编号	化合物	分子式	保留时间 /min	*m/z*	类型	检测方式	文献	来源
57	山柰酚	$C_{15}H_{10}O_6$	11.283	287.055	黄酮类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
58	大黄素	$C_{15}H_{10}O_5$	11.426	271.060	蒽醌类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
59	牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	11.480	455.095	黄酮类	$[M+H]^+$	[2]	大黄
60	苯甲酸	$C_7H_6O_2$	10.223	122.12	有机酸类	GC-MS	[3]	桃仁
61	甘油	$C_3H_8O_3$	10.497	92.09	醇类	GC-MS	[3]	桃仁
18	没食子酸	$C_7H_6O_5$	18.569	170.12	鞣质类	GC-MS	[3]	桃仁
62	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	19.463	256.42	脂肪酸类	GC-MS	[3]	桃仁
63	油酸	$C_{18}H_{34}O_2$	21.027	282.50	脂肪酸类	GC-MS	[3]	桃仁
64	硬脂酸	$C_{18}H_{36}O_2$	21.260	284.50	脂肪酸类	GC-MS	[3]	桃仁

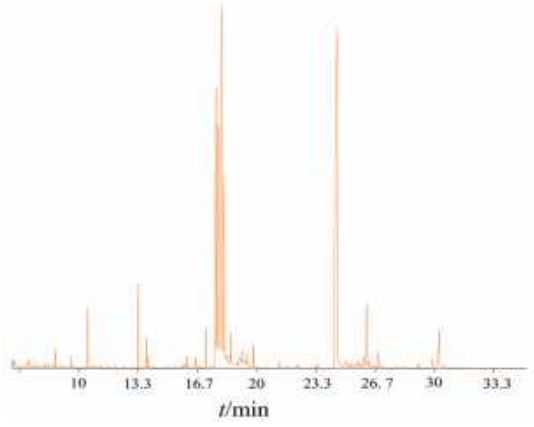


图 2　DT GC-MS 的 TIC 图

Fig 2　GC-MS TIC diagram of DT

（https：//PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/）获得化学成分 Canonical SMILES，导入 SwissTargetPrediction 数据库（http：//www.SwissTargetPrediction.ch/），获得药物靶点 615 个。以“fever”“thrombus”“blood block”“blood stasis”为关键词，检索 GeneCards 数据库（https：//www.genecards.org/），获得疾病靶点 17 530 个。借助 Uniprot 数据库（https：//legacy.uniprot.org/）进行靶点校正，删除重复项。通过 Venny 平台（https：//bioinfogp.cnb.csic.es/tools/Venny/），获得 598 个交集靶点。

2.2.2　PPI 网络分析　将 598 个交集靶点导入 STRING 数据库（https：//cn.STRING-db.org/），获取蛋白相互作用关系，以“tsv”格式导入 Cytoscape 3.7.2。以网络节点度值分布（Degree 值）大于 100，介数中心性（BC）、接近中心性（CC）大于平均数为条件进行筛选，获得丝氨酸 / 苏氨酸激酶 1（AKT1）、肿瘤坏死因子（TNF）、非受体酪氨酸激酶（SRC）等 36 个 DT 发挥逐瘀泻热作用的核心靶点，并构建蛋白互作网络（PPI），见图 3。

2.2.3　成分 - 靶点 - 疾病网络构建　将 DT 活性成分、核心靶点、疾病导入到 Cytoscape 3.7.2 软件，建立“成分 - 靶点 - 疾病”网络图，该网络共有 84 个节点，332 条相互作用连线，见图 4。通过分析网络图发现，DT 通过多成分、多靶点发挥逐瘀泻热作用。应用 Network Analyzer 分析对网络进行分析，以 Degree 值大于中位数，最终得到 20 个关键活性成分，包括圣草酚、芦荟大黄素、山柰酚、原花青素 B_1 等化合物。

2.2.4　GO 功能和 KEGG 通路富集分析　将交集靶点输入 DAVID 数据库（https：//DAVID.ncifcrf.gov/），Select Identifier 选择“official gene symbol”，物种选择“homo sapiens”，进行基因功能富集分析（GO）和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，使用微生信平台（http：//www.bioinformatics.com.cn/）绘制 GO 和 KEGG 富集分析气泡图。GO 功能分析确定 1705 个条目，包括生物过程（BP）1193 条、细胞组分（CC）155 条、分子功能（MF）357 条。其中 BP 主要涉及凋亡过程的负调控、炎症、对 LPS 的响应及血小板活化等；CC 主要涉及质膜、细胞质、神经元投射及突触前膜等；MF 主要参与氧化还原酶活性、血红素结合、一氧化氮合酶调节子活性等。分别选取排名前 10 的条目绘制 GO 功能富集分析图，见图 5A。KEGG 富集分析确定 196 条通路，主要涉及 MAPK、HIF-1、ErbB、VEGF、TNF、IL-17、血管平滑肌收缩、血小板活化等信号通路。选取排名前 30 的通路绘制 KEGG 通路富集分析图，见图 5B。

2.3　*分子对接*

选取 PPI 网络中 Degree 值前 20 的核心靶点和 20 个与“瘀热”相关的关键活性成分进行分子对接。利用 RCSB PDB（https：//www.RCSB PDBus.org/），PubChem 数据库及 Autodocktool1.5.6 软件获取分子对接所需相关文件格式。借助 Autodocking vina1.2.0 进行分子对接。除油酸、棕榈酸外，结合能均小于 $-5\ kcal \cdot mol^{-1}$，见图 6A，其中没食子酸儿茶素、EGCG、原花青素 B_1、原花青素 B_2、芦荟大黄素、圣草酚与各靶点对接活性最好。使用 Pymol 对结合自由能最小的构象进行可视化，见图 6B。

2.4　*药效学实验*

2.4.1　试药的制备　同“2.1.1”项下方法制备 DT 水煎液。

2.4.2　“瘀热”大鼠模型的建立，分组及给药　大鼠随机分为空白组、模型组、DT 组，每组 9 只。DT 水煎液给药剂量为 $7\ g \cdot kg^{-1}$，空白组、模型

图 3　DT 逐瘀泻热核心靶点 PPI 网络图

Fig 3　Core target PPI network diagram for remove blood stasis and purge heat of DT

组给予等体积生理盐水，每日给药一次，连续灌胃 21 d。21 d 后，模型组与 DT 组采用间隔 24 h 重复致毒法，尾静脉注射 LPS 50 μg • kg^{-1}，复制“瘀热”模型[10]。空白组尾静脉注射等体积生理盐水，造模后 0.5 h 灌胃给药。

2.4.3　体征变化　对各组大鼠体征变化进行观察。与空白组相比，模型组出现体温上升，耸毛、眼球充血、精神萎靡，进食量减少，活动减少、反应迟钝症状。

2.4.4　体温变化　造模后 0.5、1.5、2、4、5、6、7 h 测定各组大鼠肛温。以空白组 0 h 体温为基础体温，以各时间点大鼠体温与基础体温的差值（ΔT，℃）为观察指标。与空白组相比，造模 1.5 h 后模型组与 DT 组体温明显上升；与模型组相比，DT 组体温在 2 h 时开始下降，7 h 后 DT 组体温恢复正常，见图 7。结果表明，DT 能够改善“瘀热”模型大鼠体温升高的病理状况。

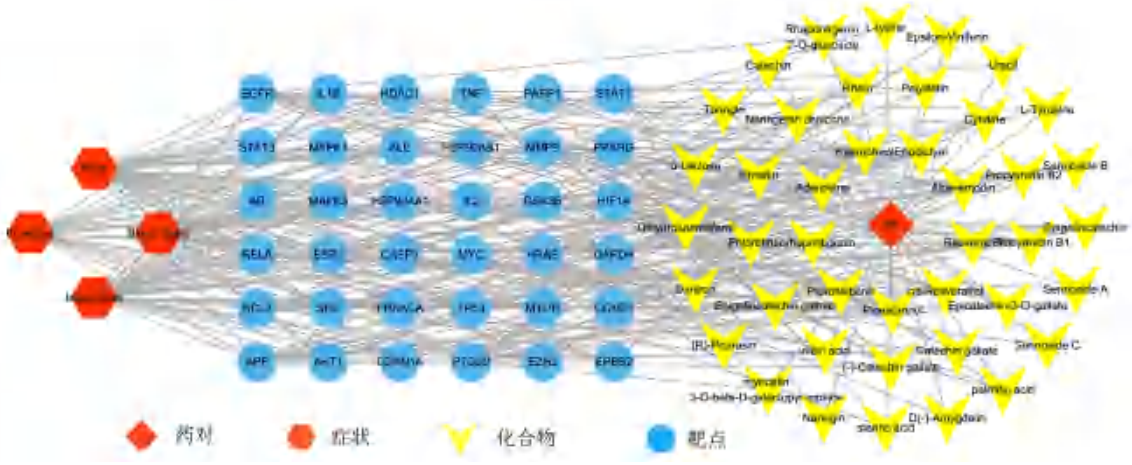


图 4　DT 逐瘀泻热成分 - 靶点 - 疾病网络图

Fig 4　Component-target-disease network diagram for remove blood stasis and purge heat of DT

2.4.5　对血液流变及凝血功能的影响　造模后 2 h，采用 3% 戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉取血至肝素钠抗凝管，测定全血黏度（WBV），分离血浆测定血浆黏度（PV）。与空白组相比，模型组 WBV、PV 升高；与模型组相比，DT 组 WBV、PV 降低，见图 8。采血至 3.8% 枸橼酸钠 1∶9 抗凝管，分离血浆测定 PT、APTT、TT、FIB。与空白组相比，模型组 FIB 升高，TT、PT 及 APTT 降低；与模型组相比，DT 组 FIB 降低，TT、PT 及 APTT 升高，见图 9。结果表明，DT 能够改善“瘀热”模型大鼠血液黏、浓、凝、聚的病理状况。

2.4.6　各组大鼠血清中 NO、MDA、SOD、IL-1β、TNF-α、IL-17 含量　分离血清，ELISA 法测定 IL-17、IL1β、TNF-α 含量，试剂盒法测定 SOD、MDA、NO 含量。与空白组相比，模型组 IL-17、IL-1β、TNF-α、NO 及 MDA 含量升高，SOD 含量下降；与模型组相比，DT 组 IL-17、IL-1β、TNF-α、NO 及 MDA 含量下降，SOD 含量升高，见图 10。结果表明，DT 能够改善“瘀热”模型大鼠炎症及氧化应激的病理状况。

2.4.7　RT-qPCR 法检测全血相关基因表达　Trizol 法提取各组全血总 RNA，按照反转录试剂盒步骤合成 cDNA，进行 RT-qPCR。以 GAPDH 为内参，$2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达，引物序列见表 2。结果如图 11 所示，与空白组相比，模型组 AKT1、SRC、MYC、EGFR、PTGS2、TP53 mRNA 表达升高；与模型组相比，DT 组 AKT1、SRC、MYC、EGFR、PTGS2、TP53 mRNA 表达降低。

2.5　数据统计及分析

本研究运用 SPSS 26.0 和仙桃学术（https：//www.xiantaozi.com/）进行数据分析及图表绘制，组间差异使用单因素方差分析（One-way ANOVA），$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

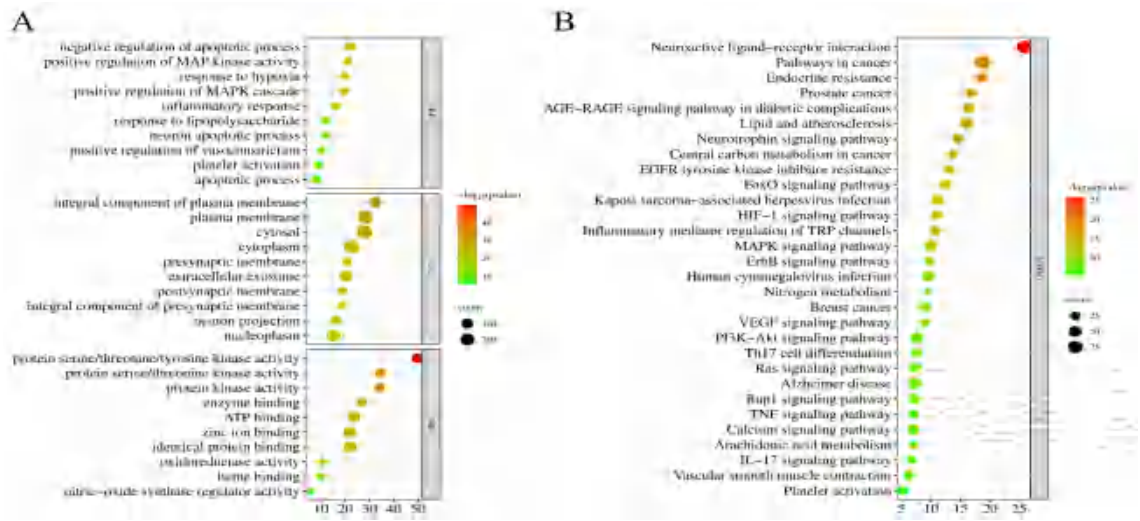


图 5　DT 逐瘀泻热 GO 与 KEGG 富集分析

Fig 5　Enrichment analysis of GO and KEGG for remove blood stasis and purge heat of DT

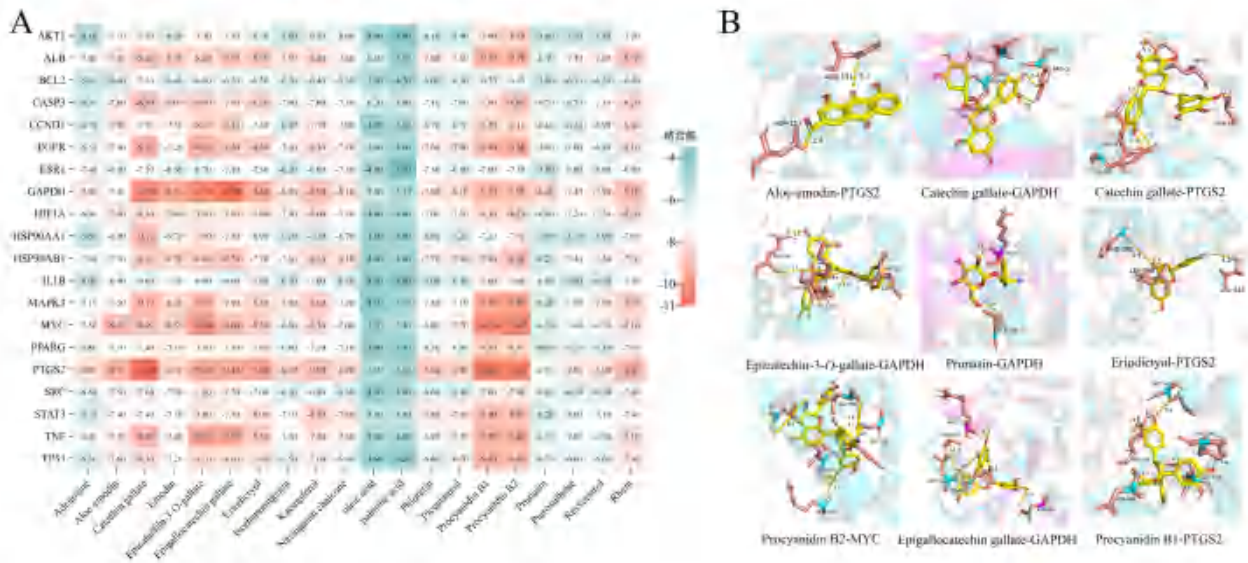


图 6　DT 逐瘀泻热分子对接结果的热图（A）及模式图（部分）（B）

Fig 6　Thermal map of molecular docking（A）and pattern diagram（part）（B）for remove blood stasis and purge heat of DT

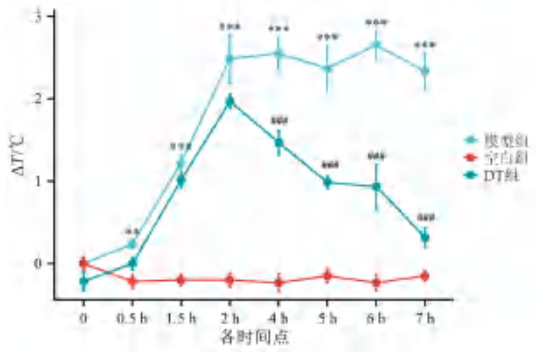


图 7　DT 对“瘀热”大鼠体温的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Fig 7　Effect of DT on the body temperature of “stasis-heat” rats（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与模型组比较，$^{\#\#\#}P<0.001$。

Note：Compared with the blank group，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；compared with the model group，$^{\#\#\#}P<0.001$.

3　讨论

传统方剂以其“辨证论治”与“整体观念”的理论基础，形成了传统中药方剂组方复杂、化学成分信息繁多的特点，且中药方剂发挥相应功效借助于多靶点、多通路的作用特点也使得现代药理对于传统中药作用于机体的物质基础与分子机制仍处于探索阶段。“药对”作为中药配伍中的最小单位[13]，作为传统方剂的基础，相较于传统方剂较为固定。药对研究可作为复方研究的重要切入点，既是沟通单味药和复方的有效途径[14]，也为 DT 扩大药用范围提供思路。

现代研究认为“热”，主要与体内脏器、组织损伤及炎症有关。“瘀”的病理现象与血流动力学异常、凝血系统异常、血栓、机体氧化及抗氧化平衡失调等[15]因素密切相关。药效学实验从血

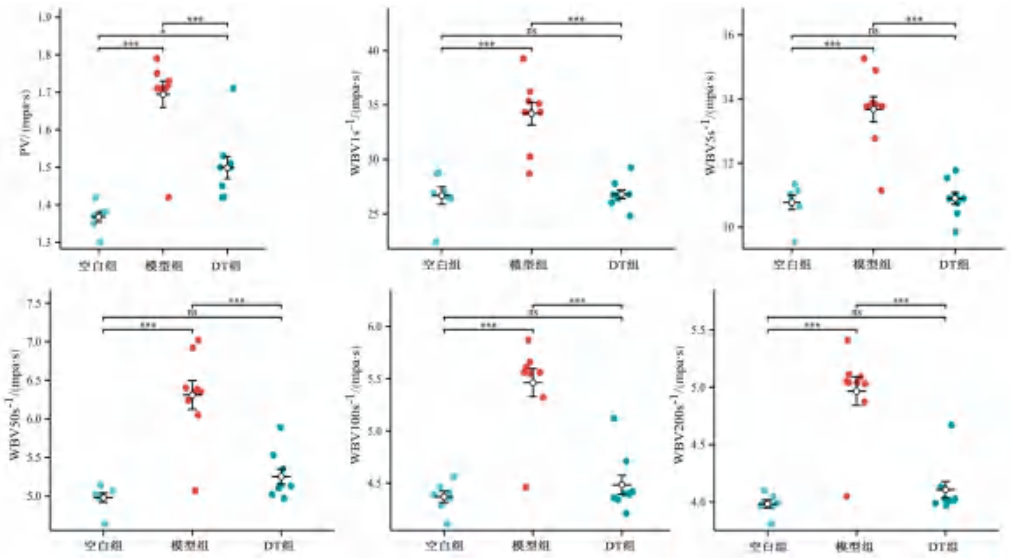


图 8　DT 对“瘀热”大鼠血液流变学的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$，$^{***}P<0.001$）

Fig 8　Effect of DT on hemorrheology of “stasis-heat” rats（$\bar{x}\pm s$，$n=9$，$^{***}P<0.001$）

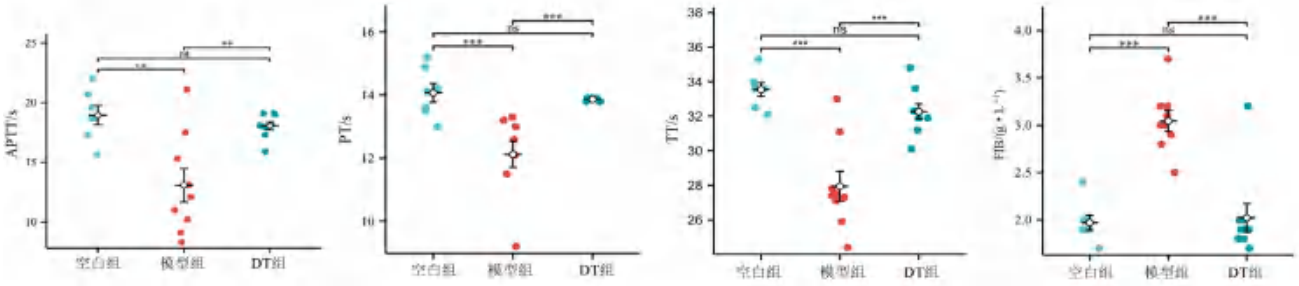


图 9　DT 对“瘀热”大鼠凝血功能的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）

Fig 9　Effect of DT on coagulation function of “stasis-heat” rats（$\bar{x}\pm s$，$n=9$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）

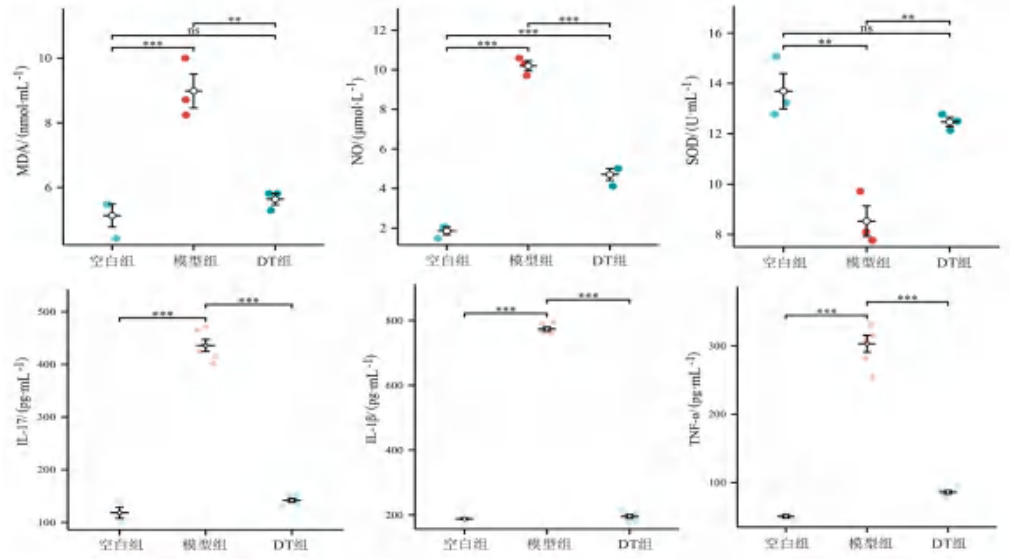


图 10　DT 对大鼠血清中 NO、MDA、SOD、IL-1β、TNF-α、IL-17 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）

Fig 10　Effect of DT on the levels of NO，MDA，SOD，IL-1β，TNF-α and IL-17 in the serum of rats（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）

液黏、浓、凝、聚状态及体温等方面来考察 DT 逐瘀泻热功效，DT 组“瘀热”模型大鼠体温变化、一般体征、血液流变、凝血指标、炎症因子、SOD、MDA 及 NO 均显著改善，机体中细胞产生的 NO 会对细胞产生氧化作用，导致细胞毒性，而血液中 SOD 能降低血清氧化应激水平达到血管保护目的。结果表明 DT 对内毒素所致的大鼠血瘀、发热、发炎、氧化应激具有治疗或干预作用。

表 2　目的基因引物序列

Tab 2　Primer sequences of target gene

引物名称	上游引物序列	下游引物序列	序列长度 /bp
AKT1	TCGTGTGGCAAGATGTGTAT	GAGCTGTGAACTCCTCATCAA	102
SRC	GAGTCTGCTGGACTTTCTCAAG	CATAGTTCATCCGCTCCACATAG	116
PTGS2	CCAGAGCAGAGAGATGAAATACC	GGCATCGATGTCATGGTAGAG	142
MYC	GTCTCTACTCACCAGCACAATTA	CGGTTGTTGCTGATCTGTTTC	116
TP53	TCCGACTATACCACTATCCACTAC	GCACAAACACGAACCTCAAAG	149
EGFR	CCTGGAAGAGACCTGCATTATC	CAGAGCTGTCAAACCCACTAC	109
GAPDH	ACTCCCATTCTTCCACCTTTG	CCCTGTTGCTGTAGCCATATT	105

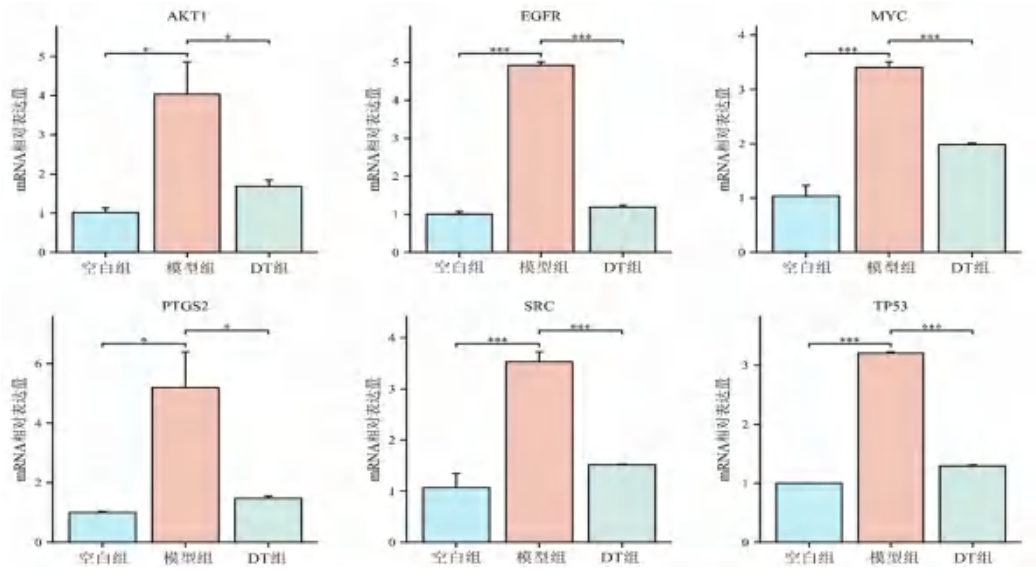


图 11　各组大鼠 AKT1、SRC、MYC、EGFR、PTGS2、TP53 的 mRNA 表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$）

Fig 11　Effect of AKT1，SRC，MYC，EGFR，PTGS2 and TP53 mRNA expression in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$）

本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 和 GC-MS 技术从 DT 水煎液中鉴定出 64 个化合物，包括蒽醌、黄酮、鞣质、二苯乙烯、脂肪酸、氰苷等化合物，并结合网络药理学研究方法对其逐瘀泻热的作用机制进行了初步探讨。结果表明，DT 发挥逐瘀泻热功效的潜在活性成分有圣草酚、芦荟大黄素、原花青素、EGCG 等。其中圣草酚能够降低 LPS 诱导的 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的分泌，下调 IL-1β 诱导的软骨细胞中诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、环氧化酶 -2（COX-2）的表达，减少前列腺素 E2（PGE2）和 NO 的产生 [16]。大黄素、大黄酸、芦荟大黄素等具有良好的抗炎、解热镇痛、抗肿瘤等活性 [17]。EGCG 通过抗氧化应激、炎症反应和调节凋亡信号通路发挥神经保护作用 [18]。原花青素能抑制血栓形成，减少血管壁上胆固醇沉积，具有抗动脉粥样硬化的作用 [19]。本研究通过对 PPI 网络和 KEGG 通路分析发现，DT 可能作用于 AKT1、IL1B、PTGS2、TNF、SRC 等核心靶点，调控 VEGF、MAPK、IL-17、TNF 等通路发挥逐瘀泻热的作用。通过分子对接和 RT-qPCR 技术对上述成分和靶点进行验证，其中没食子酸儿茶素、EGCG、原花青素 B_1、原花青素 B_2、芦荟大黄素、圣草酚与各靶点对接活性最好。RT-qPCR 结果发现 DT 通过下调全血 AKT1、SRC、MYC、EGFR、PTGS2、TP53 mRNA 的相对表达来发挥逐瘀泻热的作用。通过对炎症因子及氧化应激指标观测发现，DT 能够降低“瘀热”大鼠血清中 NO、MDA、SOD、IL-1β、TNF-α、IL-17 的含量。研究表明，当机体出现炎症反应，所产生的致热原 PGE2 会通过 cAMP 使得下丘脑体温调定点上调，增加产热 [20]。同时，花生四烯酸及其代谢产物作为体内重要的炎症介质，会受到环加氧酶 2（PTGS2）作用向 PGE2 进行转化，从而引起体温升高。Wang 等 [21] 研究发现人体感染人体巨噬细胞（HCMV）同样会引起机体发热，HCMV 感染和激活可能是发热的新危险因素。TNF-α 在免疫调节、发热、炎症反应、抑制肿瘤形成等过程中发挥重要作用。IL-1β 能影响凝血和纤溶，具有促血栓作用 [22]。Lee 等 [23] 通过对 AKT1 在血管系统中的 EC 自主功能进行表征，结果表明，EC 的 AKT1 消融可降低一氧化氮合酶（eNOS）的磷酸化，增加离体血管收缩力，升高机体舒张压。SRC 与内皮型 eNOS 在 VEGF 刺激下，能促进 NO 从内皮细胞的释　放 [24]。AKT1、MYC、EGFR、PTGS2、TP53、

TNF、IL1B 是 MAPK 通路上的靶点，抑制该通路能减轻血管内皮细胞的损伤，该通路也参与炎症反应[25]。IL-17A 和 IL-17F 通过诱导编码 TNF、IL-1、MMP9 的基因表达，参与炎症和宿主防御感染的过程。IL-17A 还能诱导软骨细胞中 COX-2 的表达[26]。

因此，DT 发挥逐瘀泻热功效的作用机制主要包括：① 调控氧化应激指标含量；② 降低炎症因子 TNF-α、IL-17、IL-1β 的含量，调控 IL-17、TNF 等信号通路；③ 降低大鼠全血 AKT1、SRC、MYC、EGFR、PTGS2、TP53 mRNA 的表达，调控 MAPK、VEGF 等信号通路维持血管生成平衡。本研究结果表明，DT 通过多靶点、多通路调控“瘀热”的发展，通过维持血管生成平衡、抑制血栓形成、抗炎、抗氧化等机制以达到“不使瘀血久蓄，不使热与瘀结”的目的，为后续研究大黄 - 桃仁药对及大黄、桃仁协同增效的作用机制奠定了基础。

参考文献

[1] 张仲景 . 伤寒论 [M]. 赵开美本 . 北京：北京科学技术出版社 . 2016：46-47.

[2] 鲁郡兰 . 连花清瘟胶囊中大黄成分的药代动力学研究 [D]. 天津：天津中医药大学，2021.

[3] 颜永刚，裴瑾，万德光 . 桃仁脂溶性成分 GC-MS 法分析 [A]// 第七届全国药用植物和植物药学术研讨会暨新疆第二届药用植物学国际学术研讨会论文集 [C]. 乌鲁木齐：2007.

[4] 何赛萍，徐晓东，高欣杰，等 . 桃核承气汤对热瘀大鼠模型血液流变学和凝血指标的影响 [J]. 浙江中医学院学报，2003，26（6）：56-58.

[5] 章浩军，刘启华，曾萍 .《伤寒论》便血证治规律 [J]. 河南中医，2019，39（4）：492-495.

[6] Pei LH，Shen X，Yan YG，et al. Virtual screening of the multi-pathway and multi-gene regulatory molecular mechanism of dachengqi decoction in the treatment of stroke based on network pharmacology [J]. Comb Chem High T Scr，2020，23（8）：775-787.

[7] 张聪聪，王长虹，李兴佳，等 . 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析桃仁化学成分及快速测定苦杏仁苷和野黑樱苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（4）：347-355.

[8] 颜永刚，尹立敏，王红艳，等 . 大黄 - 桃仁药对不同配比对大黄中 10 种成分提取量的影响 [J]. 中药材，2016，39（7）：1578-1581.

[9] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：24，290.

[10] 何赛萍，徐晓东，楼正青，等 . 论蓄血证及动物模型的制作 [J]. 浙江中医学院学报，2002，25（6）：13-14.

[11] 陈瑾 . 平性药蒲黄、桃仁、王不留行调节寒、热不同血瘀证的物质基础初步研究 [D]. 南宁：广西中医药大学，2019.

[12] 张聪聪，刘瀚泽，王永丽，等 . UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS 法同时测定大黄 - 桃仁药对中 16 种成分及其溶出规律探究 [J]. 中成药，2022，44（4）：1177-1183.

[13] 田林，傅春升，张学顺 . 中药配伍中的药对配对原则及依据 [J]. 医学研究杂志，2009，38（8）：103-105.

[14] 宋佳，高晓霞，田俊生，等 . 中药药对配伍机制的现代研究 [J]. 中草药，2017，48（21）：4367-4374.

[15] 王若光，尤昭玲 . 试析血瘀形成及现代研究对血瘀认识的深化 [J]. 中国中医药科技，2001，7（4）：272-276.

[16] 吕凤，杜倩，奚鑫，等 . 圣草酚药理作用研究进展 [J]. 中草药，2019，50（23）：5907-5912.

[17] 曹强，郭亚菲，叶蕾蕾，等 . 大黄及其活性成分抗炎作用及机制的研究进展 [J]. 中草药，2022，53（22）：7285-7294.

[18] 杨祥伟，连福明 . 表没食子儿茶素没食子酸酯的神经系统药理学作用及机制研究进展 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（14）：2032-2040.

[19] 丁阳平，童华荣 . 原花青素的药理作用研究进展 [J]. 中南药学，2007，5（2）：161-163.

[20] 裴丽珊，沈霞，颜永刚，等 . 基于血管内皮生长因子信号通路 / 肿瘤坏死因子信号通路的桃核承气汤防治脑卒中双向调节分子网络机制 [J]. 药学学报，2020，55（5）：898-906.

[21] Wang C，Zhu YH，Chen PL，et al. Altered serum human cytomegalovirus microRNA levels are common and closely associated with the inflammatory status in patients with fever [J]. Front Immunol，2022，13：1079259.

[22] Van Minkelen R，De Visser MC，Houwing-Duistermaat JJ，et al. Haplotypes of IL1B，IL1RN，IL1R1，and IL1R2 and the risk of venous thrombosis [J]. Arterioscler，2007，27（6）：1486-1491.

[23] Lee MY，Gamez-Mendez A，Zhang J，et al. Endothelial cell autonomous role of Akt1：regulation of vascular tone and ischemia-induced arteriogenesis [J]. Arterioscler，2018，38（4）：870-879.

[24] 伍鹏龙，魏盟，朱伟 . Src 信号通路及在心力衰竭病理生理中的作用 [J]. 国际心血管病杂志，2013，40（1）：6-8.

[25] 田丁阳，张敬，杨宏博，等 . 通过调控 MAPK 通路治疗心脑血管疾病研究进展 [J]. 中医学报，2023，38（6）：1216-1222.

[26] Iwakura Y，Ishigame H，Saijo S，et al. Functional specialization of interleukin-17 family members [J]. Immunity，2011，34（2）：149-162.

（收稿日期：2023-09-08；修回日期：2023-11-08）

基于 NF-κB 通路研究平肝活血合剂对脑缺血再灌注损伤的作用机制

刘宗梅[1]，王晓玲[2]，宋发萍[2]，姚硕[1]，唐勇[2*]（1. 陕西中医药大学第一临床医学院，陕西 咸阳 712046；2. 安康市中医医院，陕西 安康 725000）

摘要：目的 探讨平肝活血合剂对脑缺血再灌注损伤（CIRI）的作用机制。**方法** 采用线栓法制备 CIRI 模型。SD 大鼠随机分为假手术组，模型组，平肝活血合剂低、中、高剂量组（2.08、4.16、8.32 mL·kg^{-1}），阳性对照组（丁苯酞软胶囊 6.25 mg·kg^{-1}），每组 10 只。灌胃治疗 7 d，每日 1 次。造模后第 1、3、7 日观察大鼠神经功能评分。给药 7 日后观察大鼠脑缺血组织病理改变，测定脑梗死体积百分比，检测血清肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 -1β（IL-1β）、白细胞介素 -8（IL-8）的水平，脑缺血组织中的 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 表达，脑缺血组织中磷酸化的 NF-κB 抑制蛋白 α（p-IκBα）、核转录因子 -κBp65（NF-κBp65）、磷酸化的核转录因子 -κBp65（p-NF-κBp65）蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较，模型组大鼠给药 7 日后 Longa 评分显著升高，右脑出现鲜明的苍白色梗死灶（$P < 0.01$），TNF-α、IL-1β、IL-8 及 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 表达均显著上升，p-IκBα、NF-κBp65、p-NF-κBp65 蛋白表达均明显上调（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。HE 染色显示脑缺血组织区网状结构疏松，细胞错乱、结构缺损甚至萎缩变形、数量变少，核固缩及碎裂。与模型组比较，给药 7 日后平肝活血合剂各剂量组 Longa 评分显著降低，其余检测指标亦明显下降（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。**结论** 平肝活血合剂可显著改善 CIRI 的炎症因子水平，减轻脑损伤，其机制可能与调控 NF-κB 信号通路有关。

关键词：平肝活血合剂；脑缺血再灌注损伤；炎症抑制；NF-κB 信号通路
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0902-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.012

Mechanism of Pinggan Huoxue mixture on cerebral ischemia reperfusion injury based on the NF-κB pathway

LIU Zong-mei[1], WANG Xiao-ling[2], SONG Fa-ping[2], YAO Shuo[1], TANG Yong[2*] (1. *The First Clinical Medical College*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Ankang Shaanxi* 725000)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Pinggan Huoxue mixture on cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI). **Methods** CIRI model was induced by suture-occlusion method. SD rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, Pinggan Huoxue mixture low-dose, medium-dose, and high-dose groups (2.08, 4.16, and 8.32 mL·kg^{-1}), and a positive control group (butylphthalein soft capsules at 6.25 mg·kg^{-1}), with 10 rats in each group. Each group was given water or drug intragastrically, once a day, for consecutive 7 days. The neurological function scores was observed on the 1st, 3rd, and 7th day after the modeling. After 7 days of administration, the pathological changes in rats cerebral ischemic tissue were observed, and the percentage of cerebral infarction volume was measured. The serum tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-8 levels and TNF-α, IL-1β, IL-8 mRNA expression, and NF-κB inhibitory protein α (p-IκBα), nuclear transcription

基金项目：陕西省中医药管理局课题（No.2021-GJ-JC011）；陕西省 2021 年度中医药传承创新暨“秦药”开发重点科学研究项目（No.2021-01-GJ-019）；第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目。
作者简介：刘宗梅，女，硕士，主要从事脑血管病的研究，email：1401631215@qq.com *通信作者：唐勇，男，主任医师，主要从事脑血管病的研究，email：tangyong1981xin@163.com

factor-κBp65 (NF-κBp65), phosphorylated nuclear transcription factors-κBp65 (p-NF-κBp65) protein expression in the ischemic brain tissue were also detected. **Results** Compared with the sham operation group, the Longa score of the model group significantly increased after 7 days of administration, and a distinct pale infarct lesion appeared in the right brain ($P < 0.01$). TNF-α, IL-1β, IL-8 and TNF-α, IL-1β, IL-8 mRNA expressions were significantly increased ($P < 0.01$), while the protein expressions of p-IκBα, NF-κBp65 and p-NF-κBp65 were significantly upregulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HE staining showed a loose network structure in the ischemic tissue area of the brain, with disordered cells, structural defects, and even atrophy and deformation, reduced quantity, nuclear pyknosis and fragmentation. Compared with the model group, after 7 days of administration, the Longa scores of rats in each dose groups on the 7th day of intervention were significantly decreased, and other detection indicators were also decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Pinggan Huoxue mixture can greatly improve the levels of inflammatory factors in CIRI and alleviate brain injury, whose mechanism is related to the regulation of the NF-κB signaling pathway.

Key words: Pinggan Huoxue mixture; cerebral ischemia-reperfusion injury; inflammatory suppression; NF-κB signaling pathway

缺血性卒中约占卒中总数的 80%，早期再灌注是急性缺血性卒中的首要治疗手段，但可能导致缺血区脑组织再次受到损伤甚至出现不可逆的脑功能障碍，即脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia reperfusion injury，CIRI）[1]，其机制主要与离子代谢紊乱、炎性反应、氧化应激、自由基损伤及神经细胞凋亡等有关[2]。中药复方制剂可通过多靶点、多层次对 CIRI 发挥治疗作用[3]。

平肝活血合剂是陕西省名中医王晓玲历经十余年研发的院内制剂，内含天麻、赤芍、三七、益母草、竹茹 5 味药，有平肝熄风、活血化瘀、清热化痰之效。前期临床研究证实该方能明显减轻缺血性中风患者临床症状，改善神经功能缺损[4]；能够改善 CIRI 大鼠神经功能评分，保护脑神经及抑制细胞凋亡[5]，但剂型改变后尚未开展对 CIRI 作用机制的实验研究。本研究通过平肝活血合剂对 CIRI 模型大鼠的干预，探究该药对 CIRI 的作用机制，为中药治疗中风病探索理论依据。

1　材料

1.1　动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只，体重（200±20）g[成都达硕实验有限公司，许可证号 SCXK（川）：2020-030]。自由进食及饮水，适应性喂养一周。

1.2　试药

平肝活血合剂（安康市中医医院，批号：Z20210148000）；丁苯酞软胶囊（石药集团恩必普药业有限公司，批号：H20050299）；β-actin 抗体、抗鼠 p-IκBα 单克隆抗体、抗鼠 NF-κBp65 单克隆抗体、抗鼠 p-NF-κBp65 单克隆抗体（Cell Signaling Technology 公司，批号分别为：3700、2694、8242、3033S）；BCA 蛋白定量检测试剂盒、苏木 - 伊红染色试剂盒（Servicebio，批号分别为：G2026、G1003）；大鼠肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）ELISA 试剂盒（Invitrogen，批号：88-7340）；大鼠白细胞介素（IL）-1β ELISA 试剂盒（杭州联科生物技术股份有限公司，批号：EK301B/3-02）；大鼠 IL-8 ELISA 试剂盒（欣博盛生物科技有限公司，批号：ERC008）。

1.3　仪器

高速组织研磨仪（Servicebio 公司）；高速离心机（Eppendorf 公司）；组织脱水机、组织包埋机（湖北泰维科技有限公司）；超声波细胞破碎仪（宁波新芝生物科技有限公司）；台式高速冷冻离心机 [大龙兴创实验仪器（北京）有限公司]。

2　方法

2.1　动物造模

大鼠适应性喂养 1 周后，参照文献[6]造模，具体如下：2% 戊巴比妥钠（40 mg·kg^{-1}）腹腔麻醉后，分离暴露左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉，结扎颈外动脉，夹闭颈总动脉及颈内动脉，将线栓沿着颈总动脉切口处插入，直至遇到阻力且线栓上的刻度与切口重合时即停止，结扎切口下方，松开动脉夹，1 h 之后拔出线栓并缝合伤口。参照 Zea-Longa[7] 评分：0 分为无症状；1 分为不能完全伸展对侧前爪；2 分为向对侧转圈，可有追尾现象；3 分为向对侧倾倒；4 分为无自主活动伴意识丧失。评分 1 ～ 3 分视为造模成功。假手术组分离血管后不插线栓。

2.2　分组与给药

80 只大鼠取 10 只作为假手术组（SHAM），其余按照“2.1”项下方法造模，65 只造模成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组（MACO/R），阳性对照组（POSITIVE，丁苯酞软胶囊 6.25 mg • kg^{-1}，按照人与大鼠体表面积折算的等效剂量比较表换算[8]），平肝活血合剂低、中、高剂量组（PGHX-L、PGHX-M、PGHX-H，2.08、4.16、8.32 mL • kg^{-1}，按临床等效剂量的 50%、100%、200% 设置），每组 10 只。按照 10 mL • kg^{-1} 的体积灌胃，每日 1 次，连续 7 d。假手术组和模型组以等量生理盐水灌胃。

2.3　神经功能缺损评分[7]

观察各组大鼠造模后第 1、3、7 日的 Zea-Longa 评分。

2.4　炎性因子检测

给药 7 d 后，腹腔麻醉后腹主动脉取血，置于 4 ℃冰箱过夜，次日离心取血清，－ 80 ℃保存。严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF-α、IL-1β 和 IL-8 水平。

2.5　TTC 和 HE 染色

TTC 染色：给药 7 d 后，每组取 3 只大鼠在冰上取出全脑，于－ 20 ℃冰箱冷冻 30 min，将冻存的脑组织切成五等份，厚约 2 mm/ 片，将切片放入 2%TTC 溶液染色缸中，避光水浴加热 30 min，翻转脑片使其充分染色，4% 多聚甲醛固定，按顺序摆放在蓝色背景布上拍照。

HE 染色：给药 7 d 后，每组取 4 只大鼠，行心脏灌注固定后在冰上取脑组织浸泡于 4% 多聚甲醛中，1 周后进行石蜡包埋，将脑组织石蜡切片常规脱蜡后，苏木精染色液浸染后，水洗返蓝、伊红染色 1 min 后，再次脱水透明封片，在 200 倍镜下观察。

2.6　qRT-PCR 检测

给药 7 d 后，每组取 3 只大鼠，麻醉后在冰袋上取出右脑。取适量脑组织采用 Trizol 法提取 RNA 并逆转录成 cDNA，以 GAPDH 为内参。反应体系为：10 μLSYBRqPCR MasterMix，0.4 μL 上游引物，0.4 μL 下游引物，2 μLcDNA 稀释剂，7.2 μL ddH_2O。TNF-α、IL-1β、IL-8 引物由上海生工有限公司合成，引物序列见表 1。采用 95 ℃ 30 s 预变性，40 次循环（变性 95 ℃ 5 s，退火 60 ℃延长 30 s），用实时荧光 PCR 仪进行常规熔解曲线分析测定 C_t 值，以 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 相对定量法比较各组靶标 mRNA 表达的差异。

2.7　Western blot 检测相关蛋白表达水平

表 1　引物序列信息

Tab 1　Primer sequence information

基因		引物序列（5'→ 3'）
TNF-α	F	ACTGAACTTCGGGGTGATCG
	R	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
IL-1β	F	GGATGGGACTTCCTTGGTGT
	R	GGAATGGGCAGTGCTGTAGT
IL-8	F	GCACAGCCCTCTCAGTTGGAA
	R	GCAGAAGATGGCAGTCCTGT
Gapdh	F	GGCAAGTTCAACGGCACAGTC
	R	CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG

取“2.6”项下脑组织 50 mg 置于离心管中，加入 1 mL RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min，裂解液移至 EP 管中，4 ℃、13 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液。BCA 法测定蛋白质，取 20 μL 蛋白进行电泳分离，PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h，一抗按照 1∶1000 稀释后 4 ℃摇床孵育过夜，洗膜后加入 1∶10 000 比例稀释的荧光二抗孵育液，室温避光孵育 2 h 后用缓冲液重复洗涤 3 次，用 Odyssey 双色红外激光成像系统成像并拍照，Image J 软件分析各蛋白条带灰度值，以 β-actin 为内参。

2.8　统计分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，数据用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较用单因素方差分析，组间两两差异对比选用 LSD 法。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　各组大鼠 Longa 评分比较

给药后第 1、3、7 日，与假手术组比较，模型组评分明显升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，给药后第 3 日平肝活血合剂高剂量组评分明显降低（$P < 0.05$）；给药后第 7 日，阳性对照组及平肝活血合剂低、中、高剂量组评分均明显降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。见表 2。

3.2　各组大鼠血清炎性因子比较

与假手术组比较，模型组 TNF-α、IL-1β 和 IL-8 水平显著升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，阳性对照组及平肝活血合剂低、中、高剂量组 TNF-α、IL-1β 和 IL-8 水平显著降低（$P < 0.01$）。与阳性对照组比较，平肝活血合剂低剂量组 TNF-α 及高剂量组 IL-8 表达有显著性差异（$P < 0.05$）。见图 1。

3.3　各组大鼠脑梗死体积比较

与假手术组比较，模型组大鼠右脑出现鲜明的苍白色梗死灶（$P < 0.01$）；与模型组比较，平肝活血合剂中、高剂量组及阳性对照组脑梗死体积百分比均显著降低（$P < 0.01$）。与阳性对照组比较，平肝活血合剂低、高剂量组脑梗死体积百

表 2　各组大鼠神经功能评分 (n = 10，分)

Tab 2　Neurological function scores of rats in each group (n = 10, points)

组别	第 1 日	第 3 日	第 7 日
SHAM	0	0	0
MACO/R	2.7±0.48**	3.1±0.74**	3.2±0.63**
POSITIVE	2.2±0.42	2.0±0.47	1.3±0.48$^{\#\#}$
PGHX-L	2.3±0.67	2.4±0.52	1.7±0.48$^{\#}$
PGHX-M	2.4±0.52	1.9±0.57	1.5±0.53$^{\#}$
PGHX-H	2.6±0.52	1.8±0.42$^{\#}$	1.3±0.48$^{\#\#}$

注：与假手术组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the SHAM group，$^{**}P < 0.01$；compared with the MACO/R group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

分比有显著性差异（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。结果见图 2、3。

3.4　各组大鼠脑缺血组织病理形态变化

HE 染色结果显示，假手术组脑组织结构正常，神经细胞排列整齐、细胞完整、数量丰富，胞核清晰可见；与假手术组比较，模型组部分脑缺血组织区网状结构疏松，细胞错乱、结构缺损甚至萎缩变形、数量变少，核固缩及碎裂；与模型组比较，阳性对照组及平肝活血合剂低、中、高剂量组神经细胞萎缩程度均有所改善、数量增加，脑组织病理损伤均有不同程度的减轻。具体见图 4。

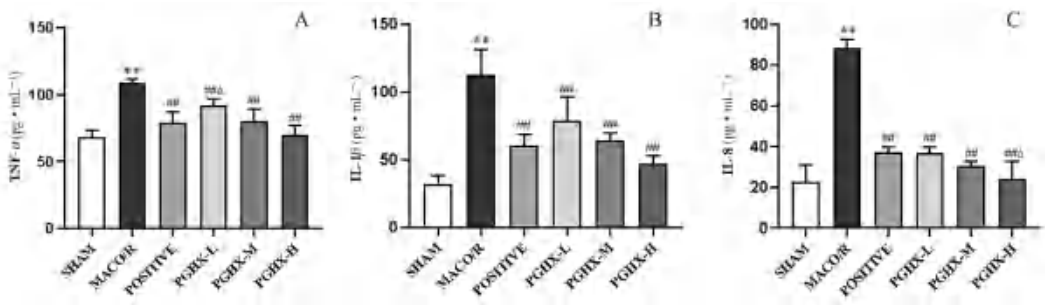


图 1　各组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-8 水平比较（n = 10）

Fig 1　Serum TNF-α, IL-1β, and IL-8 levels in rats of each group (n = 10)

注：与假手术组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与阳性对照组比较，$^{\triangle}P < 0.05$。

Note：Compared with the SHAM group，$^{**}P < 0.01$；compared with the MACO/R group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the POSITIVE group，$^{\triangle}P < 0.05$.

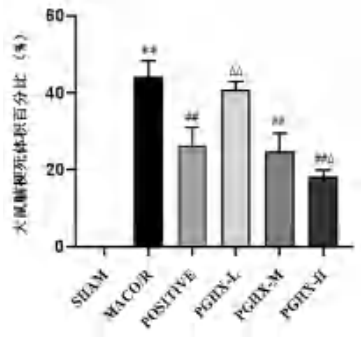


图 2　各组大鼠脑梗死体积百分比（n = 3）

Fig 2　Percentage of cerebral infarction volume in each group of rats (n = 3)

注：与假手术组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与阳性对照组比较，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

Note：Compared with the SHAM group，$^{**}P < 0.01$；compared with the MACO/R group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the POSITIVE group，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$.

3.5　各组大鼠脑缺血组织中 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 表达

与假手术组比较，模型组 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 表达均显著上升（$P < 0.01$）；与模型组比较，阳性对照组及平肝活血合剂低、中、高剂量组 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 表达均明显降低（$P < 0.01$）。与阳性对照组比较，平肝活血合剂低剂量组 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 及中剂量组 TNF-α、IL-8 mRNA 表达均显著升高（$P < 0.01$）。见图 5。

3.6　各组大鼠脑缺血组织 p-IκBα、NF-κBp65、p-NF-κBp65 蛋白表达

与假手术组比较，模型组 p-IκBα、NF-κBp65、p-NF-κBp65 蛋白表达均明显上调（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；与模型组比较，阳性对照组及平肝活血合剂低、中、高剂量组 p-IκBα、p-NF-κBp65、NF-κBp65 蛋白表达均显著下调（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。与阳性对照组比较，平肝活血合剂中剂量组 NF-κBp65 及高剂量组 p-IκBα、p-NF-κBp65、NF-κBp65 蛋白表达均显著下调（$P < 0.05$）。见图 6。

4　讨论

缺血性卒中因高发病率、高致残率和高死亡率引起广泛关注[9]，属中医学“中风”病，最早记载于《金匮要略》：“夫风之为病，当半身不遂……中风使然”[10]。该病以风、火、痰、瘀、虚相兼为病，阴阳失调、气血逆乱于脑而发。平肝活血合剂处方配伍符合中风病基本病机，临床使用有效。为探索中风病“风、火、痰、瘀”损

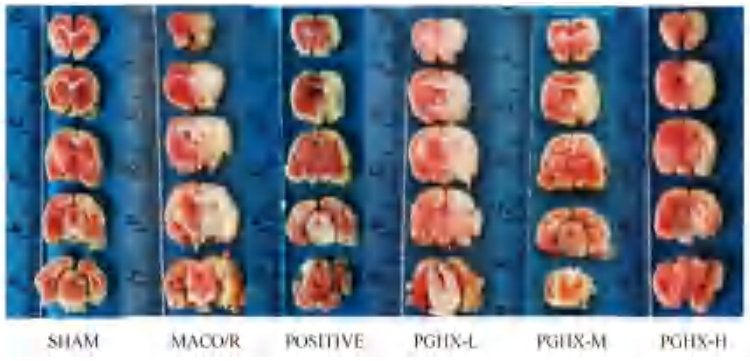


图 3　各组大鼠脑组织 TTC 染色结果

Fig 3　TTC staining of brain tissue in each group of rats

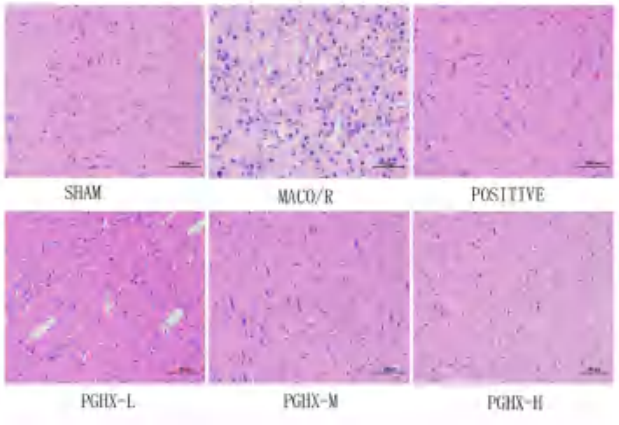


图 4　各组大鼠脑组织病理变化（×200）

Fig 4　Pathological changes in brain tissue of rats in each group（×200）

伤脑络与卒中后炎症反应相关而设计本研究。

炎症反应是 CIRI 造成脑损伤的主要因素 [11]，NF-κB 信号通路广泛参与炎性反应过程，是炎症反应的经典信号通路，可激活大量炎性因子的释放从而引发炎症级联反应 [12-13]。NF-κB 是广泛存在于细胞质的一类炎性信号蛋白，由 p65、p50 两个亚基组成转录因子，大部分位于神经细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞的表面，p65 是判断炎症反应程度的标志物 [14]。在未受刺激的细胞中，NF-κBp50/65 与其抑制蛋白 IκB 结合形成 NF-κBp50/p65-IκBα 三聚体的形式存在，处于失活状态。当受到刺激后，复合 IκB 激酶（IKK）被激活使 IκB 蛋白快速磷酸化（p-IκBα）、泛素化和蛋

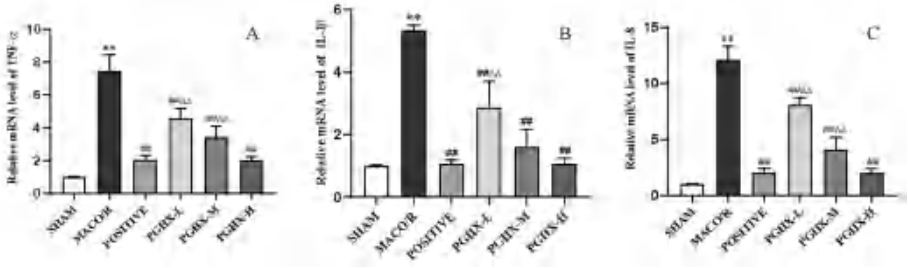


图 5　各组大鼠脑缺血组织中 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 表达情况（$n = 3$）

Fig 5　Expression of TNF-α, IL-1β, and IL-8 mRNA in cerebral ischemic tissues of rats in each group（$n = 3$）

注：与假手术组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与阳性对照组比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

Note：Compared with the SHAM group, $^{**}P < 0.01$; compared with the MACO/R group, $^{\#\#}P < 0.01$; compared with the POSITIVE group, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$.

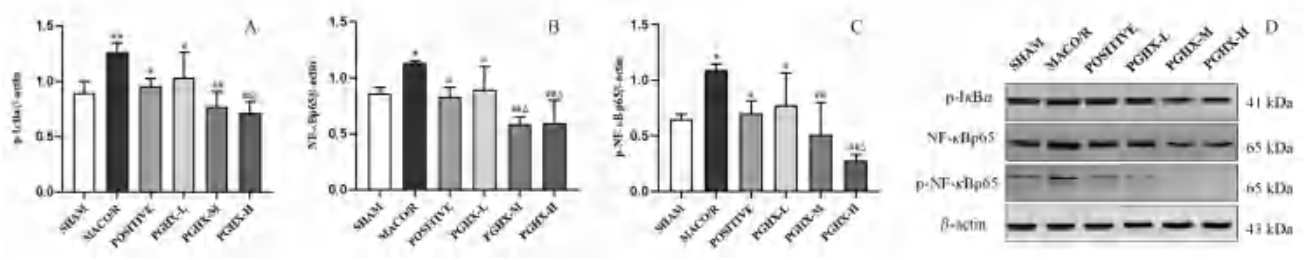


图 6　各组大鼠 p-IκBα、p-NF-κBp65、NF-κBp65 蛋白表达及电泳图（$n = 3$）

Fig 6　Protein expression and electrophoresis patterns of p-IκBα, P-NF-κBp65, and NF-κBp65 in each group（$n = 3$）

注：与假手术组比较，$^{*}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与阳性对照组比较，$^{\triangle}P < 0.01$。

Note：Compared with the SHAM group, $^{*}P < 0.01$; compared with the MACO/R group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; compared with the POSITIVE group, $^{\triangle}P < 0.01$.

白酶体降解，NF-κB 二聚体入核并激活炎性反应过程。作为脑缺血后炎症级联反应的起始因子，NF-κB 可调节缺血再灌注损伤过程中炎症介质的产生和免疫反应，诱导多种炎症因子的表达，比如 TNF-α、IL-1β、IL-8 等，进而诱发炎症级联反应 [15-16]。TNF-α 是炎性反应的始动因子，在缺血发作时就存在于脑细胞中。IL-1β 是细胞中 IL-1 的主要存在形式，它可诱导趋化因子的表达、促进白细胞的浸润 [17]。IL-8 可使细胞间黏附作用增强，在脑缺血早期显著升高，可加重脑梗死患者脑细胞的损伤，IL-1β 和 TNF-α 水平可影响 CIRI 的严重程度。此外，TNF-α、IL-1β、IL-8 等细胞因子的大量表达可二次诱导 NF-κB 的激活，造成炎性损伤的恶性循环。王璐等 [18] 发现在脑卒中发生后由于促细胞因子的高表达，可激活 NF-κB 的经典途径，进一步触发下游促炎、促凋亡机制导致病情进展。吴艺帆等 [19] 的研究证实三七总皂苷可抑制 NF-κB 诱导的炎症反应，减轻急性脑梗死造成的脑损伤，发挥脑保护作用。

本研究发现模型组 Longa 评分显著升高，右脑出现苍白色梗死灶，TNF-α、IL-1β、IL-8 及 TNF-α、IL-1β、IL-8 mRNA 表达水平均明显升高，HE 染色显示脑缺血组织区网状结构疏松，细胞错乱、结构缺损甚至萎缩变形、数量变少，核固缩及碎裂。经给予平肝活血合剂治疗后可逆转这一现象，说明平肝活血合剂可能是通过抑制炎症反应对 CIRI 发挥治疗作用。Western blot 结果显示模型组 p-IκBα、NF-κBp65 和 p-NF-κBp65 蛋白表达均明显升高，药物干预后各给药组相关蛋白的表达水平均显著降低。所有结果表明平肝活血合剂可能通过抑制 NF-κB 信号通路相关蛋白表达对 CIRI 起到治疗作用。

综上所述，平肝活血合剂具有平肝熄风、活血化瘀、清热化痰功效可能与减轻 CIRI 脑损伤相关，其机制可能是通过抑制 NF-κB 信号通路，调控炎性因子的释放从而发挥作用。

参考文献

[1] Guan X，Li ZH，Zhu S，et al. Galangin attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibition of ferroptosis through activating the SLC7A11/GPX4 axis in gerbils [J]. Life Sci，2021，264：118660.

[2] Hu Y，Dong YD，Wu YC，et al. AMPK inhibitor BML-275 induces neuroprotection through decreasing cytc and AIF expression after transient brain ischemia [J]. Bioorg Med Chem，2021，52：116522.

[3] 齐大河，丁萌萌，王可欣，等 . 中医药干预脑缺血再灌注损伤的信号通路研究进展 [J]. 中医学报，2023，38（8）：1666-1674.

[4] 陈亮，王晓玲，唐勇，等 . 自拟方平肝活血散治疗缺血性中风急性期风痰瘀阻证的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践，2023，8（28）：102-105.

[5] 宋发萍，张洁，唐勇，等 . 平肝活血散对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响及作用机制初探 [J]. 中国药房，2022，33（24）：2999-3004.

[6] 陈晓娟，肖宗宇，潘琪，等 . 改良线栓法大鼠脑缺血再灌注损伤模型的建立 [J]. 中国医学创新，2015，12（3）：24-27.

[7] 卢小叶，吕倩忆，李棋龙，等 . Zea-Longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究 [J]. 湖南中医药大学学报，2021，41（9）：1356-1360.

[8] 徐叔云，卞如濂，陈修 . 药理实验方法学 [M]. 3 版 . 北京：人民卫生出版社，2002：202-204.

[9] Alva-Díaz C，Huerta-Rosario A，Pacheco-Barrios K，et al. Neurological diseases in Peru：a systematic analysis of the global burden disease study [J]. Arq Neuropsiquiatr，2020，78（5）：282-289.

[10] 丁元庆，陈哲，唐赛雪 .《金匮要略》对中风研究的贡献与影响 [J]. 山东中医药大学学报，2020，44（5）：468-472.

[11] Przykaza Ł. Understanding the connection between common stroke comorb idities，their associated inflammation，and the course of the cerebral ischemia/reperfusion cascade [J]. Front Immunol，2021，12：782569.

[12] Chen DC，Ning FY，Zhang JY，et al. NF-κB pathway took part in the development of apoptosis mediated by miR-15a and oxidative stress via mitochondrial pathway in ammonia-treated chicken splenic lymphocytes [J]. Sci Total Environ，2020，729：139017.

[13] Verma S，Dutta A，Dahiya A，et al. Quercetin-3-rutinoside alleviates radiation-induced lung inflammation and fibrosis via regulation of NF-κB/TGF-β1 signaling [J]. Phytomedicine，2022，99：154004.

[14] 袁泉良，张庆东，郭跃，等 . 基于 NF-κB p65 通路研究自拟五倍子汤对大鼠肛瘘术后镇痛及炎症抑制的作用机制 [J]. 中医学报，2023，38（10）：2175-2181.

[15] 张静雯，李培杰 . 肾缺血 - 再灌注损伤中核因子 -κB 的研究进展 [J]. 中国急救医学，2022，42（4）：364-369.

[16] Yang XZ，Li F，Liu Y，et al. Study on the correlation between NF-κB and central fatigue [J]. J Mol Neurosci，2021，71（10）：1975-1986.

[17] Ying WG，Yuan F，He P，et al. Inhibition of Notch1 protects against IL-1β-induced inflammation and cartilage destruction in temporomandibular chondrocytes [J]. Mol Med Rep，2017，15（6）：4391-4397.

[18] 王璐，蔚懿，姚慧芳，等 . NF-κB 信号通路与缺血性脑卒中关系及中药干预研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2023，25（6）：194-199.

[19] 吴艺帆，傅晨，罗超琴，等 . 三七总皂苷调控 cGAS/STING/NF-κB 通路对急性脑梗死大鼠炎症反应的影响 [J]. 北京中医药，2021，40（10）：1061-1065.

（收稿日期：2023-10-20；修回日期：2023-12-08）

阿戈美拉汀离子液体贴片的制备及体外透皮研究

杜卓芳[1, 2]，符渝昕[1, 2]，程泽能[1, 2*]（1. 中南大学湘雅药学院，长沙 410000；2. 湖南慧泽生物医药科技有限公司，长沙 410000）

摘要：目的 制备阿戈美拉汀离子液体透皮贴片并对其进行质量评价。**方法** 通过药物析晶、体外释放和渗透情况选择处方所用辅料；通过离子交换反应制备阿戈美拉汀 - 多库酯离子液体，并采用傅里叶变换红外光谱和磁共振波谱对其进行表征；通过溶剂蒸发法制备透皮贴片，对离子液体贴片的含量均匀性、体外释放及体外渗透性能进行质量评价。**结果** 阿戈美拉汀离子液体贴片制备后，表面光滑透明，重量面积比为 167 g·m^{-2}，单位面积含药量为 2.5 mg·cm^{-2}；含量均匀度符合药典标准；体外释放速率为（478.31±0.87）μg/（cm^2·$h^{1/2}$）；体外渗透速率为（24.38±3.93）μg/（cm^2·h）；24 h 的累计透过量为（545.86±93.08）μg·cm^{-2}，透过率为（21.78±3.85）%。**结论** 阿戈美拉汀离子液体通过增大贴片的载药量，显著提高贴片的透皮效果，使得透皮贴剂有望成为阿戈美拉汀的新型给药制剂。

关键词：阿戈美拉汀；离子液体；透皮贴片；体外渗透试验
中图分类号：R945 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0908-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.013

Preparation and in vitro transdermal research of agomelatine ionic liquid patch

DU Zhuo-fang[1, 2], FU Yu-xin[1, 2], CHENG Ze-neng[1, 2*] (1. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410000; 2. *Hunan Huize Bio-pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Changsha* 410000)

Abstract: Objective To prepare transdermal patch of agomelatine ionic liquids and evaluate its quality. **Methods** The excipients used in the prescription were selected by drug precipitation, in vitro release and in vitro permeation. Agomelatine-docusate ionic liquid was prepared by ion-exchange reaction and the physicochemical properties of this ionic liquid were systematically characterized by FT-IR and NMR. The transdermal patches were prepared by solvent evaporation, and the content uniformity, in vitro release and in vitro permeation of ionic liquid patches were evaluated. **Results** The prepared agomelatine ionic liquid patch had smooth and transparent surface, the weight area ratio was 167 g·m^{-2}, and the drug content per unit area was 2.5 mg·cm^{-2}. The content uniformity met pharmacopoeia standards. The in vitro release rate was (478.31±0.87) μg/ (cm^2·$h^{1/2}$). The permeation rate in vitro was (24.38±3.93) μg/ (cm^2·h). The cumulative permeation amount was (545.86±93.08) μg·cm^{-2} at 24 h, and the permeability was (21.78±3.85)%. **Conclusion** The agomelatine ionic liquid significantly improves the transdermal effect of the patch by increasing drug-carrying capacity of the patch, enabling transdermal patches to be a novel delivery formulation for agomelatine.

Key words: agomelatine; ionic liquid; transdermal patch; in vitro permeation test

阿戈美拉汀（agomelatine，AGM）是一种新型抗抑郁药物，其作用机制突破了传统单胺类递质系统，与单胺再摄取抑制剂、单胺受体拮抗剂以及单胺氧化酶抑制剂不同，AGM 通过激活褪黑素受体 1（melatonin receptor 1，MT_1）和褪黑素受体 2（MT_2），以及拮抗 5-羟色胺

作者简介：杜卓芳，女，硕士研究生，主要从事创新制剂研究，email：690643251@qq.com *通信作者：程泽能，男，教授，主要从事生物药剂学和药物动力学研究，email：chengzn@csu.edu.cn

2c（5-hydroxytryptamine 2c，5-HT_{2C}）受体，在发挥抗抑郁疗效的同时兼具调节生物节律的作用。AGM已上市的口服制剂，推荐剂量为25 mg•d^{-1}。药物口服后吸收迅速且良好（≥ 80%），但吸收后经肝脏细胞色素 P4501A2（cytochrome P4501A2，CYP1A2）酶快速代谢，存在严重的首过效应，导致药物绝对生物利用度很低（口服治疗剂量的绝对生物利用度＜ 5%）[1]。如何通过有效的方式来减少 AGM 的首过效应、提升其生物利用度已成为亟须解决的问题。

经皮给药系统（transdermal drug delivery systems，TDDS）是一种前瞻性的给药策略，弥补了传统给药系统，包括口服和注射方法的局限性，这种非侵入性的给药途径既方便又具有缓释作用[2]。首先，TDDS可减少给药次数，延长给药时间。其次，将之用于睡眠、反应迟钝或无法吞咽口服药物的患者，可随时取出药物以停止给药，大大提高了患者的依从性。同时，TDDS还可以通过控制药物的释放降低血药浓度的波动和毒副作用[3]。更重要的是，TDDS可以避免药物在肝脏中的首过效应，从而防止药物在胃肠道中被分解破坏，提高了药物的生物利用度[4]。本研究拟通过改良剂型的方法来提高 AGM 的生物利用度。

离子液体是由有机阳离子和有机或无机阴离子组成的有机盐类[5]，在 100 ℃以下为液态[6]。第三代离子液体活性药物成分 - 离子液体（active pharmaceutical ingredient-ionic liquids，API-ILs），其含有的活性药物成分为阳离子、阴离子或两者兼有[7]。与固体药物相比，API-ILs具有更高的溶解度[8]、更高的渗透性[9]和更好的热稳定性[10]。本研究首次成功制备了 AGM- 多库酯离子液体（agomelatine-docusate ionic liquids，[AGM][DC]ILs），并将制备的 [AGM][DC]ILs 进一步配制成透皮贴片。通过体外渗透试验评价其体外渗透性能，为经皮用 AGM 制剂的制备及体内药动学评价提供依据。

1 材料

1.1 仪器

SQP QUINTIX224-1CN型万分之一天平、SECURA225D-1CN型十万分之一天平（德国赛多利斯）；BA310Pol型偏光显微镜（厦门麦克奥迪）；1260 Infinity-DAD型高效液相色谱仪（美国安捷伦）；FE28型pH计（瑞士梅特勒）；Vortex-5型涡旋混合仪（上海嘉鹏）；KS-7200D型超声波清洗器（昆山洁力美）；MMS_4Pro型多联磁力搅拌器（浙江群安）；C&D360型涂布机、DHC-6TD型透皮扩散试验仪（美国LOGAN）。

1.2 试药

AGM对照品（江西同和，批号：209-20211206U，纯度：99.5%）；肉豆蔻酸异丙酯（上海阿拉丁）；多库酯钠（安徽安耐吉）；稀盐酸、油酸（湖南尔康制药）；水杨酸异辛酯（上海源叶生物）；丙烯酸酯压敏胶（批号：87-4098、87-2516，德国汉高）；硅酮压敏胶（批号：SRS7-4502 美国杜邦）；甲醇（HPLC级，CINC）；乙酸乙酯、氢氧化钠、磷酸二氢钾、磷酸（AR级，国药集团）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

中谱红AQ-C18柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相水相:有机相（35∶65）(水相：2.27 g磷酸二氢钾于1.0 L超纯水中，磷酸调pH至2.5；有机相：甲醇）；检测波长230 nm；流速1.0 mL • min^{-1}；柱温50 ℃；进样量10 μL。

2.2 AGM透皮贴片的制备工艺

将AGM、促渗剂、压敏胶和溶剂依次加入烧杯中，加入磁力搅拌子，在室温下以600 r • min^{-1}搅拌60 min。搅拌均匀的胶液静置，等待气泡消失。将胶液涂布在氟素离型膜上，70 ℃下干燥30 min。最后，层压背衬膜，即可得到贴片。

2.3 AGM贴片的处方筛选

2.3.1 压敏胶种类考察 选择DURO-TAK87-4098、DURO-TAK87-2516和Liveo BIO-PSA SRS7-4502这3种类型的压敏胶，并根据各固体含量计算称样量，使载药量达到5%。其中，压敏胶含量占比为80%，促渗剂的含量占比为15%。将一定量的乙酸乙酯加入混合物中，并在充分搅拌后，进行涂布和干燥。在显微镜下观察析晶情况，结果见图1。由DURO-TAK87-2516和Liveo BIO-PSA SRS7-4502型压敏胶制备的贴片出现了药物析出问题，因此选择DURO-TAK87-4098型压敏胶进行后续实验。

2.3.2 促渗剂种类考察 称取AGM各1.5 g，分别加入一定量的DURO-TAK87-4098型压敏胶，溶解后搅拌均匀，分别加入肉豆蔻酸异丙酯（isopropyl myristate，IPM）、水杨酸异辛酯、油酸含量为15%的促渗剂，载药量为5%，制备4种不同的透皮贴片[11]。以贴片中AGM的累计渗透量（$Q_{24\,h}$）和渗透速率（*Jss*）为指标，研究不同种类的促渗剂对透皮贴片的药物成分透过量的影响，相关结果如表1所示。与无促渗剂组相比，各种促渗剂均有增强药物渗透的作用，其促渗显著作用顺序依次为：IPM ＞水杨酸异辛酯＞油酸。15% IPM对AGM的$Q_{24\,h}$为（77.68±22.37）μg • cm^{-2}，促渗效果是无促

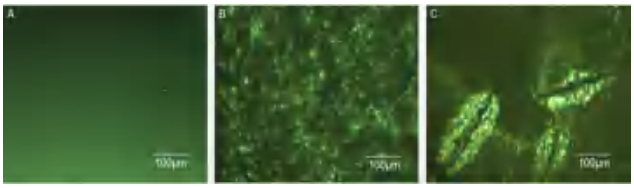


图 1　不同类型压敏胶制备贴片的显微图片（×10）

Fig 1　Micrographs of patches prepared with different types of pressure sensitive adhesives（×10）

A. DURO-TAK87-4098；B. DURO-TAK87-2516；C. Liveo BIO-PSA SRS7-4502

渗剂组的 1.91 倍。因此，选择 15% IPM 作为最佳的透皮贴剂促渗剂。

2.4　离子液体制备及表征

2.4.1　离子液体制备　称取 AGM 适量置锥形瓶，加乙酸乙酯∶水（2∶1）的混合溶剂溶解后，滴加等摩尔量的稀盐酸，并加入等摩尔的多库酯钠，室温下以 400 r • min^{-1} 的速度搅拌过夜。之后用乙酸乙酯洗涤水层 2 次，收集乙酸乙酯层，并用冷水洗涤 1 次。取乙酸乙酯层，加入无水硫酸钠除水，过滤，旋转蒸发除去乙酸乙酯。最后，在 60 ℃下真空干燥 48 h。如图 2A 所示，等摩尔比的 [AGM][DC]ILs 是通过 AGM 和多库酯钠之间的离子交换反应制备而成。图 2B 显示，[AGM][DC]ILs 在 25 ℃下呈微黄透明的黏稠液体，具有一定的流动性。

表 1　不同促渗剂处方贴片体外渗透结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 1　In vitro permeation of different penetration enhancers（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	$Q_{24\,h}$/（μg • cm^{-2}）	累计渗透曲线方程	r^2	Jss/[μg/（cm^2 • h）]	累计渗透率（$R_{24\,h}$）/%
无促渗剂组	40.7±4.52	$Q=1.78t-2.25$	0.9989	1.78±0.19	6.28±0.54
IPM 组	77.68±22.37	$Q=3.42t-4.46$	0.9982	3.42±0.97	12.62±3.37
水杨酸异辛酯组	50.84±1.76	$Q=2.18t-1.92$	0.9995	2.18±0.08	7.44±0.10
油酸组	41.64±3.77	$Q=1.84t-3.67$	0.9916	1.84±0.16	5.9±0.51

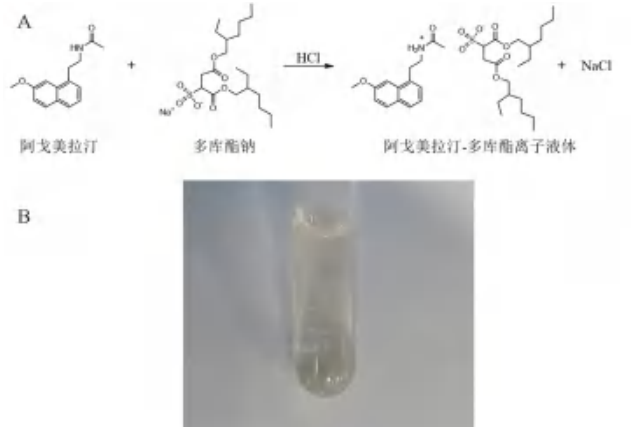


图 2　[AGM][DC]ILs 的合成方案（A）以及室温下的外观（B）

Fig 2　Synthetic scheme（A）and the appearance at room temperature（B）of [AGM][DC]ILs

2.4.2　^{1}H NMR　从图 3 可以看出，在 0.85（G，-CH_3）处的特征峰为多库酯基中甲基的信号峰；7.17（A，Ar-H）、7.26（B，Ar-H）、7.33（C，Ar-H）、7.68（D，Ar-H）和 7.81（E，Ar-H）对应为 AGM 中的萘环上氢的信号峰。两者的积分比为 12∶6，进一步说明 AGM 和多库酯钠按等摩尔反应，实验成功制备出 [AGM][DC]ILs。

2.4.3　FT-IR　图 4 为 [AGM][DC]ILs 的红外光谱图，其中 3291 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应于 [AGM][DC]ILs 中 AGM 中仲胺的官能团（-NH-），1557 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应于酰胺Ⅱ带，1627 cm^{-1}、1603 cm^{-1} 和 1512 cm^{-1} 对应于芳环骨架伸缩振动，1255 cm^{-1} 和 1047 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应于醚键（C-O）的伸缩振动；2961 cm^{-1} 和 2931 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应为离子液体中多库酯基中的甲基（-CH_3）基团，1734 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应于酯羰基（-C ＝ O），1217 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应为酯基中碳氧键 [-C（＝ O）-O] 的伸缩振动。查阅已有的文献报道 [12]，发现 AGM 和多库酯钠只是通过离子键进行结合，因此 [AGM][DC]ILs 的红外光谱图与 AGM 和多库酯钠的红外光谱图相比，并没有出现新的特征峰。

2.5　离子液体透皮贴片的含量均匀性

合格的透皮贴剂应具有良好的含量均匀度，按照《中国药典》2020 年版四部含量均匀度检查法（通则 0941），对所制备的贴片进行含量均匀度的测定。按 “2.2” 项下方法制备 [AGM][DC]ILs 透皮贴片，其中 AGM 占比为 15%，IPM 占比为 15%。表面光滑透明，重量面积比为 167 g • m^{-2}，单位面积含药量为 2.5 mg • cm^{-2}。将样品裁剪成相同大小的 10 片贴片，使用甲醇超声提取 20 min，使用 0.45 μm 有机系滤膜过滤提取液，得到滤液样品。然后，分别测定每个单剂以标示量为 100 的相对含量 X_i。根据测定结果求得相对含量的均值 $\bar{X}=89.22$，标准差 $S=2.28$，标示量与均值之差的绝对值 $A=10.78$。根据规定，若 $A+2.2S\leqslant L$，则供试品的含量均匀度符合规定，其中透皮贴剂的 $L=25.0$。本研究所制备的贴片满足要求（$A+2.2S=15.79$）。表明该透皮贴片的含量均匀度符合《中国药典》2020 年版的规定。

2.6　离子液体透皮贴片体外释放研究

透皮贴片的体外释放试验是制剂开发和

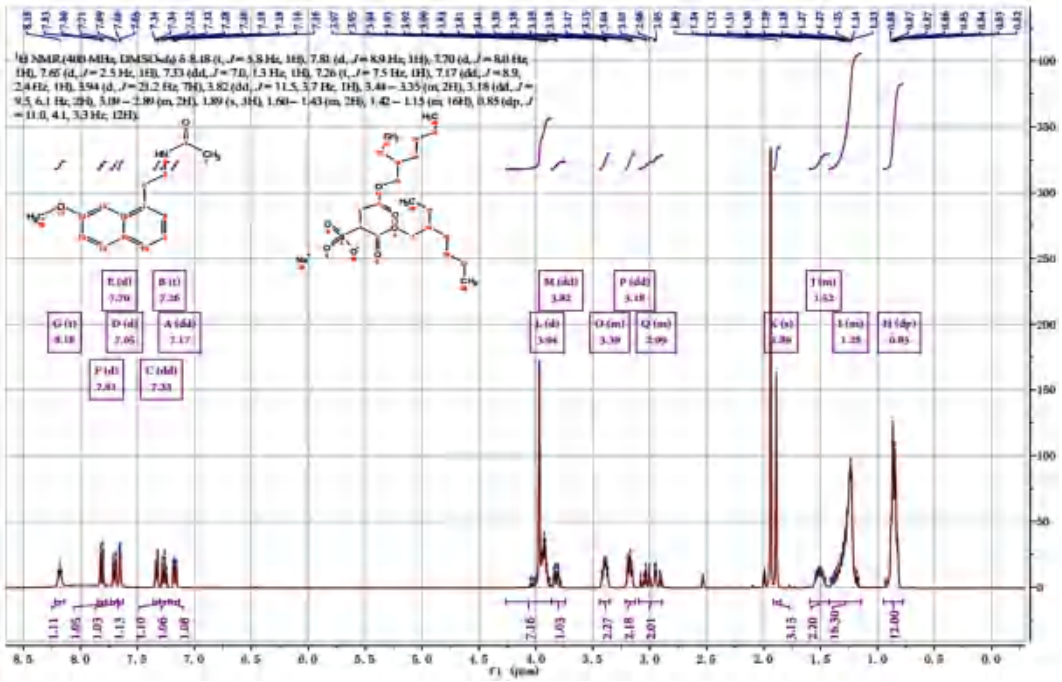


图 3　[AGM][DC]ILs 的核磁氢谱图

Fig 3　^{1}H NMR spectra of [AGM][DC]ILs

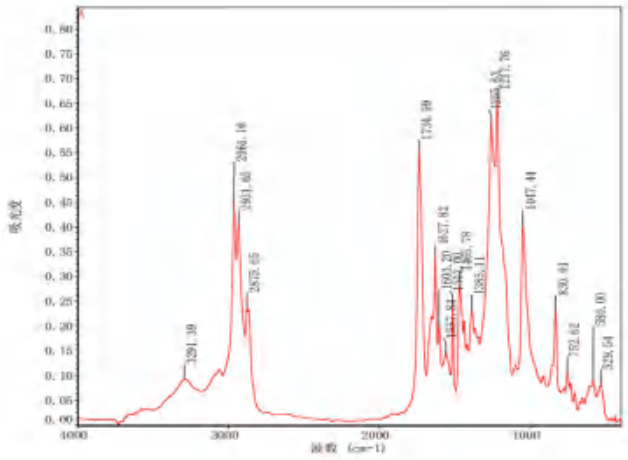


图 4　[AGM][DC]ILs 的红外光谱图

Fig 4　FT-IR spectra of [AGM][DC]ILs

质量控制的重要项目。从胶药混合型（drug in adhesive，DIA）贴的基质中释放药物是其通过皮肤屏障运输以获得治疗效果的必要步骤[13]。

按照“2.2”项下方法制备 3 批 [AGM][DC]ILs 透皮贴片，实验组 1 为 12.8% [AGM][DC]ILs（相当于 5% 的 AGM），不加入促渗剂；实验组 2 为 13% [AGM][DC]ILs（相当于 5% 的 AGM），其中促渗剂 IPM 的占比为 15%；实验组 3 为 38.4% [AGM][DC]ILs（相当于 15% 的 AGM），其中促渗剂 IPM 的占比为 15%。这三组贴片表面光滑，没有药物析出。

采用纵向扩散池法测定贴片的释放度。首先，将 [AGM][DC]ILs 透皮贴片裁切成直径 15 mm 的圆片，并将其黏附于硝酸纤维素膜上。然后，将膜固定在扩散池与接收池之间。扩散池的容积为 12 mL，扩散面积为 1.766 cm^2，水浴温度保持在（32.0±0.5）℃[14]，接收液为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液，搅拌速度为 600 r • min^{-1}。分别在 0.5、1、2、4、6、8 h 时取出 12 mL 接收液，并补充相同体积和温度的新鲜接收液。然后，测定扩散池中药物透过到接收池中的溶液的药物量，并根据公式（1）和（2）计算累计释放量和累计释放速率（见表 2）。结果发现透皮贴剂对溶出介质中 API 的释放过程可以描述为聚合物基质的扩散控制过程，其中释放量与时间的平方根呈线性关系（$r > 0.98$），符合 Higuchi 模型[15]。使用 Higuchi 模型绘制单位面积累计释放的药物量与时间平方根之间的图形，具体见图 5，释放速率则为 Q_t 与时间平方根曲线的回归线斜率。每个样本重复分析三次。

$$Q_t = \frac{C_n \times V + \sum C_{n-1} \times V_n}{A} \qquad (1)$$

$$R_t = \frac{Q_t}{M_0} \qquad (2)$$

式中，Q_t 为单位面积的累计释放量（μg•cm^{-2}），C_n 为第 n 次的药物质量浓度（μg • mL^{-1}）；V 为接收液的体积（mL）；V_n 为取样体积（mL）；A 为药物有效扩散面积（cm^2）；R_t 为单位面积的累计释放率（%）；M_0 为贴片的单位面积含药量（μg • cm^{-2}）。

表 2　体外释放参数 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 2　Parameters of in vitro release ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

组别	$Q_{8\,h}$/（μg·cm^{-2}）	释放曲线方程	释放速率 /[μg/（cm^2·h$^{1/2}$）]	r^2	$R_{8\,h}$/%
实验组 1	216.86±0.29	$Q=93.46\sqrt{t}-45.40$	93.46±0.38	0.9980	35.83±0.61
实验组 2	374.27±5.81	$Q=161.92\sqrt{t}-76.59$	161.92±1.93	0.9982	59.06±0.26
实验组 3	1080.03±0.94	$Q=478.31\sqrt{t}-263.50$	478.31±0.87	0.9963	45.77±0.61

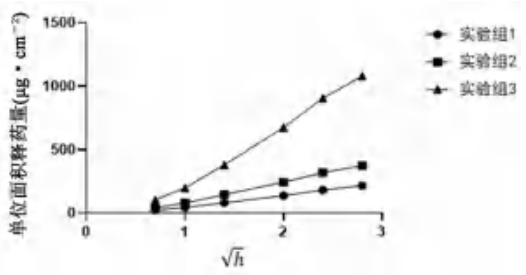


图 5　[AGM][DC]ILs 透皮贴片的体外释放曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 5　In vitro release profiles of [AGM][DC]ILs patches（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

2.7　离子液体透皮贴片体外渗透研究

使用与人体皮肤组成、渗透性极为相似的低月龄巴马香猪皮，采用纵向扩散池对“2.6”项下三组贴片进行试验 [600 r·min^{-1}；(32.0±0.5）℃；PBS 7.4]，在 1、2、4、6、8、12、24 h 时取样，接收液经过 0.45 μm 滤膜滤过后，测定其峰面积。根据公式（1）和（2）计算累计渗透量和累计渗透率，并绘制 *Q-t* 曲线（见图 6）。通过外推曲线与横坐标的交点，可以得到时滞时间（T_{lag}）。从表 3 中可以看出，[AGM][DC]ILs 的累计渗透量和时间呈良好的线性关系（$r>0.98$），体外经皮渗透行为符合零级动力学方程，即在 24 h 内，体外渗透速率接近恒速，作用时间较长，说明该经皮给药制剂具有长效控释的特性。当加入浓度为 15% 的促渗剂 IPM 时，实验组 2 的 *Jss* 是实验组 1（不含促渗剂）的 3.77 倍，24 h 累计渗透量 $Q_{24\,h}$ 是实验组 1 的 3.75 倍；当将 [AGM][DC]ILs 载药量提高 3 倍时，实验组 3 的 *Jss* 和 $Q_{24\,h}$ 分别是实验组 2 的 4.58 倍和 4.56 倍。可以看出，加入促渗剂和提高载药量都能显著提高 [AGM][DC]ILs 的渗透效果。

表 3　体外渗透参数 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 3　Parameters of in vitro permeation ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

组别	$Q_{24\,h}$/（μg·cm^{-2}）	累计渗透曲线方程	*Jss*/[μg/（cm^2·h）]	T_{lag}/h	r^2	$R_{24\,h}$/%
实验组 1	31.96±5.52	$Q=1.41t-2.45$	1.41±0.23	1.79±0.41	0.9937	5.40±1.15
实验组 2	119.71±31.89	$Q=5.32t-11.91$	5.32±1.41	2.33±0.56	0.9842	16.72±4.45
实验组 3	545.86±93.08	$Q=24.38t-32.05$	24.38±3.93	1.41±0.91	0.9908	21.78±3.85

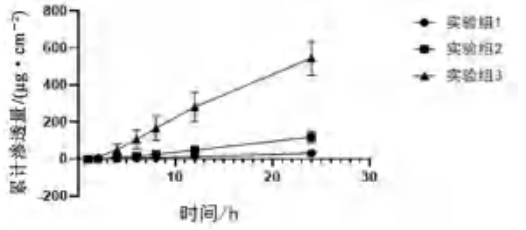


图 6　[AGM][DC]ILs 透皮贴片的体外渗透曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 6　In vitro permeation profiles of [AGM][DC]ILs patches（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3　讨论

对于以被动扩散为原理的 DIA 型透皮贴剂，贴剂中药物浓度对其渗透行为影响较大。药物浓度越高，渗透速率越快，越有利于达到治疗浓度；然而，药物浓度过高超过基质自身的载药能力时，贴片往往会产生结晶或冷流现象，导致贴片无法使用 [16]。因此，根据药物在基质中的溶解性和基质的载药能力来决定载药量是非常重要的。本文选择了文献 [17-18] 中常用的几种压敏胶，制备出 5% 载药量的贴片，并通过观察药物析出情况，筛选出了载药量更高的 DURO-TAK87-4098 型丙烯酸酯压敏胶作为基质。

化学渗透促进剂是透皮贴剂中常用的渗透增强方法，可以进入角质层，并与其成分相互作用，暂时降低角质层的屏障作用，而不会对细胞造成重大损害 [19]。本研究选择了促渗效果较好且安全性高的脂肪酸及其酯类化合物作为促渗剂，制备含 15% 促渗剂的贴片，并进行了体外渗透试验，比较了 3 种贴片的药物 *Jss*、$Q_{24\,h}$ 和 $R_{24\,h}$，最终选择了具有最佳促渗效果的 IPM 作为促渗剂。

已有研究表明，将 API 制备成离子液体，不仅可以增加药物的溶解度，还能增强药物的渗透能力 [20]。本文参考了相关文献，将 AGM 作为阳离子，多库酯钠作为阴离子，合成 [AGM][DC]ILs，并将其制备成贴片后进行了体外渗透研究。在相同 5% 载药量的情况下，由 [AGM][DC]ILs 制备的贴片具有较高的 $Q_{24\,h}$，为（119.71±31.89）μg·cm^{-2}，*Jss* 为（5.32±1.41）μg/（cm^2·h），$R_{24\,h}$ 为（16.72±4.45）%；而由 AGM 制备的贴片，其 $Q_{24\,h}$ 为（77.68±22.37）μg·cm^{-2}，*Jss* 为（3.42±0.97）μg/（cm^2·h），$R_{24\,h}$ 为（12.62±3.37）%。这表明离子液体促进了

AGM的透皮递送，但影响并不显著。因此我们将离子液体的关注点转移到增加药物溶解度的方向，制备出了载药量为15%的离子液体透皮贴片。由 [AGM][DC]ILs制备成的贴片具有良好的形态特征，无药物析出现象，而由AGM制备的贴片，在载药量为8%时就开始出现药物析出。结果显示，载药量为15%的 [AGM][DC]ILs透皮贴片的 $Q_{24\,h}$ 为（545.86±93.08）μg·cm^{-2}，*Jss* 为（24.38±3.93）μg/（cm^2·h），$R_{24\,h}$ 为（21.78±3.85）%，相较于5%AGM的贴片，药物的累计渗透量提升了7倍。同时，本文还通过体外释放试验验证了贴片的载药量越大，药物从基质中释放的速度越快。

本文通过体外渗透试验对 [AGM][DC]ILs 透皮贴片进行了评价，结果表明，将AGM制备成离子液体可以显著提高贴片的载药量，解决药物析出的问题，极大提升了AGM的渗透速率和透过量。本文制备的贴片单位面积含药量为2.5 mg·cm^{-2}，当贴片面积为10 cm^{2}时，与原研口服制剂的日推荐用量相符。根据贴片的 $Q_{24\,h}$ 计算，10 cm^2 大小贴片的累计渗透量为5.5 mg/贴，透过皮肤进入体内的利用率达22%，远大于口服治疗剂量的绝对生物利用度（小于5%）。综上所述，本研究制备的 [AGM][DC]ILs 透皮贴片具有良好的透皮性能，通过透皮给药的方式，有望避免肝脏的首过效应，提高AGM的生物利用度，为AGM临床应用问题的解决与新剂型的研发提供了新思路。然而，本文还未进行体内药代动力学研究，因此透皮贴剂提高生物利用度的想法还需要进一步证实。

参考文献

[1] 洪武，司天梅，李凌江，等，阿戈美拉汀治疗抑郁症临床应用专家建议[J]. 中国新药与临床杂志，2018，37（11）：601-607.

[2] Tijani AO，Nunez E，Singh K，et al. Transdermal route：a viable option for systemic delivery of antidepressants [J]. J Pharm Sci，2021，110（9）：3129-3149.

[3] Jeong WY，Kwon M，Choi HE，et al. Recent advances in transdermal drug delivery systems：a review [J]. Biomaterials Research，2021，25（1）：24.

[4] 刘孟斯，姜典卓，岳志华，等. 国内外透皮贴剂申报上市进展及药学研究探讨[J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（8）：866-869.

[5] Ferraz R，Branco LC，Prudêncio C，et al. Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients [J]. Chem Med Chem，2011，6（6）：975-985.

[6] Gouveia W，Jorge TF，Martins S，et al. Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials [J]. Chemosphere，2014，104：51-56.

[7] Hough WL，Śmiglak M，Rodríguez H，et al. The third evolution of ionic liquids：active pharmaceutical ingredients [J]. New J Chem，2007，31：1429-1436.

[8] Balk A，Wiest J，Widmer T，et al. Transformation of acidic poorly water soluble drugs into ionic liquids [J]. Eur J Pharm Biopharm，2015，94：73-82.

[9] Florindo C，Araújo JMM，Alves F，et al. Evaluation of solubility and partition properties of ampicillin-based ionic liquids [J]. Int J Pharm，2013，456（2）：553-559.

[10] Balk A，Holzgrabe U，Meinel L.‘Pro et contra’ionic liquid drugs-challenges and opportunities for pharmaceutical translation [J]. Eur J Pharm Biopharm，2015，94：291-304.

[11] 刘鑫鑫，李鑫，崔闻宇，等. 环孢多肽A透皮贴剂的制备及其体外经皮渗透试验研究[J]. 中南药学，2022，20（11）：2565-2570.

[12] 庄玉凤. 阿戈美拉汀的合成[D]. 上海：华东理工大学，2014.

[13] Nair AB，Gupta S，Al-Dhubiab BE，et al. Effective therapeutic delivery and bioavailability enhancement of pioglitazone using drug in adhesive transdermal patch [J]. Pharmaceutics，2019，11（7）：359.

[14] USP. General Chapters 1724：semisolid drug products-performance tests [S]. 2022，PF48（3）.

[15] Østergaard J，Meng-Lund E，Larsen SW，et al. Real-time UV imaging of nicotine release from transdermal patch [J]. Pharm Res，2010，27（12）：2614-23.

[16] Wokovich AM，Prodduturi S，Doub WH，et al. Transdermal drug delivery system（TDDS）adhesion as a critical safety，efficacy and quality attribute [J]. Eur J Pharm Biopharm，2006，64（1）：1-8.

[17] 何淑旺. 妥洛特罗透皮贴剂的研制及产业化研究[D]. 济南：山东大学，2021.

[18] 韩雪. 卡巴拉汀长效透皮系统的构建[D]. 大连：大连理工大学，2023.

[19] 江霞，马迅，刘万卉，等. 透皮贴剂渗透性研究进展[J]. 中国药事，2023，37（3）：312-320.

[20] Yang D，Liu C，Ding D，et al. The molecular design of drug-ionic liquids for transdermal drug delivery：mechanistic study of counterions structure on complex formation and skin permeation [J]. Int J Pharm，2021，602：120560.

（收稿日期：2023-11-09；修回日期：2023-12-25）

身痛逐瘀汤对 CIA 模型大鼠预防及治疗的作用研究

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

摘要：目的 探究身痛逐瘀汤对胶原诱导 Lewis 大鼠关节炎模型（CIA 模型）大鼠的预防效果及治疗作用。**方法** 将 42 只大鼠随机分为空白组，模型组，甲氨蝶呤组（0.9 mg • kg^{-1}），预防给药组（身痛逐瘀汤，9 g • kg^{-1}），身痛逐瘀汤低（4.5 g • kg^{-1}）、中（9 g • kg^{-1}）、高（18 g • kg^{-1}）剂量组，每组 6 只，除空白组外，其余各组使用胶原对 Lewis 大鼠进行二次免疫构建 CIA 模型。实验中每周两次记录动物状态、关节炎评分、足容积及痛阈值，实验终点检测大鼠血液流变学变化，使用 ELISA 法测定大鼠血清中 IL-10、TGF-β、IL-17、TNF-α、MMP1、MMP13、RANKL 的表达，使用 HE 染色、番红固绿染色观察其踝关节组织的病理变化并进行组织病理学评分。**结果** 与模型组相比，身痛逐瘀汤各剂量组的关节炎评分、痛阈值、足肿胀率均降低，其中身痛逐瘀汤中、高剂量组效果显著；身痛逐瘀汤中、高剂量组的低、中、高切全血黏度，血浆黏度、血沉及血沉方程 K 值显著降低；各剂量组促进抑炎因子 IL-10 的表达升高，促炎因子 TGF-β、IL-17、TNF-α 的表达降低，抑制骨损伤相关炎症因子 MMP-1、MMP-13、RANKL 的含量，减轻病理损伤，高剂量组治疗效果显著；身痛逐瘀汤预防给药组在大鼠关节炎评分、痛阈值、足肿胀率、血清炎症因子及病理切片的结果均优于身痛逐瘀汤各治疗剂量组。**结论** 身痛逐瘀汤对 CIA 模型大鼠具有良好的预防效果及治疗作用，可以有效缓解大鼠的关节炎症状，减轻疼痛，改善血液流变，抑制炎症，改善病理损伤。

关键词：身痛逐瘀汤；CIA 模型；预防给药；药效作用
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0914-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.014

Preventive and therapeutic effect of Shentong Zhuyu decoction on CIA model rats

LI Lin-yu[1, 2, 3], ZHANG Zi-yuan[2, 3, 5], LI Zi-yi[1, 2, 3], ZHAO Fei[2], CHANG Yan[2, 4*] (1. *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Innostar Biotechnology Nantong Co.*, *Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226133; 3. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226133; 4. *Shanghai Innostar Bio-Technology Co.*, *Ltd.*, *Shanghai* 201203; 5. *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective To determine the preventive and therapeutic effect of Shentong Zhuyu decoction on collagen-induced Lewis rat arthritis model (CIA model) rats. **Methods** Totally 42 rats were randomly divided into a blank group, a model group, a methotrexate group (0.9 mg • kg^{-1}), a preventive administration group (Shentong Zhuyu decoction, 9 g • kg^{-1}), and Shentong Zhuyu decoction low- (4.5 g • kg^{-1}), medium- (9 g • kg^{-1}), high- (18 g • kg^{-1}) dose groups, with 6 rats in each group. Except for the blank group, the CIA model of Lewis rats was constructed by using collagen for secondary immunization in other groups. During the experiment, animal status, arthritis score, foot volume and pain threshold were recorded twice a week. The changes in hemorheology were detected at the end point of the experiment. The expressions of IL-10, TGF-β, IL-17, TNF-α, MMP1, MMP13 and RANKL in the serum of rats were determined by enzyme-linked immunosorbent

基金项目：江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设（No. BM2021002）。
作者简介：李淋雨，女，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：lyli.hm@simm.ac.cn *__通信作者__：常艳，女，研究员，博士研究生导师，主要从事药理及毒理学研究，email：ychang@innostar.cn

assay. The pathological changes and histopathological scores of the ankle joint were observed by HE staining and safranin-fast green staining. **Results** Compared with the model group, the arthritis scores, pain thresholds, and foot swelling rates in each dose groups of Shentong Zhuyu decoction were all reduced, among which the medium- and high-dose groups of Shentong Zhuyu decoction had more significant effect. The low, medium and high shear whole blood viscosity, plasma viscosity, erythrocyte sedimentation rate and erythrocyte sedimentation rate equation K value in the medium- and high-dose treatment groups were greatly reduced. The content of anti-inflammation factor IL-10 increased in each dose treatment group, and the expression of the pro-inflammatory factors TGF-*β*, IL-17, and TNF-*α*, and inhibited the expression of bone damage-related serum inflammatory factors MMP-1, MMP-13, and RANKL all inhibited. Reduction of pathological damage was obvious in the high-dose group. In the Shentong Zhuyu decoction preventive administration group, the arthritis scores, pain thresholds, foot swelling rates, serum inflammatory factors and pathological sections were all better than those in the Shentong Zhuyu decoction therapeutic dose groups. **Conclusion** Shentong Zhuyu decoction has good preventive and therapeutic effect on CIA models rats, which effectively alleviate arthritis symptoms, reduce pain, improve blood rheology, inhibit inflammation and reduce pathological damage in rats.

Key words: Shentong Zhuyu decoction; CIA model; preventive medication; pharmacodynamic effect

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种慢性炎症性自身免疫性疾病，发病特点主要为关节功能损害，涉及双侧多个关节，同时伴发全身多系统损害。在全球范围内 RA 的患病率达到人口的 0.5% ～ 1.0%，且逐年上升，2019 年其在中国大陆的发病率为 0.30%[1-2]，根据部分地区流行性病学调查发现，居住在潮湿、寒冷地区及长期从事体力劳动的人群更易患 RA[3-10]，并且患病率受性别、年龄等影响，而相关研究表明早期诊断治疗可以避免近 90% 患者关节损伤的进展 [11]，因此在易患关节炎人群中对于关节炎的预防尤为重要。RA 的特点是肌腱发炎，导致软骨破坏和骨侵蚀，RA 患者的运动功能降低，并且累及呼吸、肾脏、心脏等系统，严重影响患者的生活及工作，造成巨大的经济损失。西医对于 RA 的治疗多使用非甾体抗炎药、糖皮质激素及抗风湿类药物，尽管这些药物治疗起效快，能迅速缓解症状，但治疗靶点单一，不良反应大，且长期疗效差，费用昂贵；中医药治疗则可以多靶点治疗，不良反应少，从长期治疗来看，其辨证论治、一人一方的形式更有利于患者病情的整体恢复，并且治疗成本更低。

RA 在中医理论中被认为是“痹症”，由于经络阻滞、关节凝滞，致使全身气血运行不畅，与 RA 患者产生血液流变学改变、血液微循环障碍不谋而合。因此能够活血祛瘀、祛风除湿、利痹止痛的经典名方身痛逐瘀汤开始被运用于 RA 的治疗。原方由秦艽、川芎、桃仁、红花、甘草、羌活、没药、当归、五灵脂、香附、牛膝、地龙 12 味药组成。在现代研究中，身痛逐瘀汤被证实具有镇痛抗炎、抗凝血、抗氧化、保护骨组织等药理作用 [12-22]，保护骨组织的机制被发现与 AMPK/Sirt1 信号通路、PI3K/Akt 通路 [23]、Wnt/*β*-catenin 信号通路有关。临床上，身痛逐瘀汤可以单用或者联合中药、西药等来治疗诸多疾病，如关节炎、腰椎间盘突出以及麻痹、疼痛相关疾病 [24-32]，治疗疾病种类繁多。但其是否能用于预防 RA 及对 RA 的治疗药效及机制并不明确。

IL-10 作为一种炎症与免疫抑制因子，具有较强的抗炎及免疫抑制活性，能够抑制促炎因子的表达；TGF-*β* 是免疫稳态和免疫耐受的重要促进因子，能够抑制免疫系统多种成分的扩张和功能；IL-17 是炎症反应中重要的细胞因子，能够激活各种细胞因子和趋化因子发挥促炎作用；TNF-*α* 由多种免疫细胞、上皮细胞、内皮细胞和肿瘤细胞产生，在炎症、免疫系统发育、细胞凋亡和脂质代谢中发挥着核心作用 [33]。这些炎症因子在 RA 中共同作用，促进病程进展，而现代研究发现身痛逐瘀汤能显著抑制白细胞介素（IL）-10、转化生长因子 -*β*（TGF-*β*）、IL-17、肿瘤坏死因子 -*α*（TNF-*α*）等炎症因子，发挥抗炎作用 [34-35]，抑制 RA 的发展。目前 RA 难以根治，原因在于 RA 的病因复杂，尤其是骨破坏的发病机制目前仍未明确。骨破坏的产生机制复杂，研究表明，RANK/ 破骨细胞分化因子（RANKL）/OPG、炎症机制、细胞因子、基质金属蛋白酶

（MMPs）等共同参与骨破坏[36]。因此本文应用身痛逐瘀汤在胶原诱导关节炎（CIA）模型大鼠上进行预防及给药治疗，以揭示其对 RA 是否具有预防作用，探究其对 RA 的活血、镇痛、利痹、抗炎、骨保护等药效作用，为日后用于临床治疗 RA 及治疗机制的研究提供理论基础。

1　材料

1.1　动物

42 只雌性 Lewis 大鼠，（170±10）g（北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司，质量合格证号：422023600001549，IACUC 批准号：IACUC-2023-r-139）。实验前先适应性饲养 1 周，温度：20 ～ 25 ℃，湿度：40% ～ 70%，SPF 级通风系统，每 12 h 明暗交替。

1.2　试药

秦艽、五灵脂（邵阳神农中药科技发展有限公司，批号：220201、220301），川芎、香附（广东汇群中药饮片股份有限公司，批号：20220401、20210901），桃仁、羌活、没药、当归（四川固康药业有限责任公司，批号：220101、210601、210502、200902），红花、川牛膝、地龙（康美药业股份有限公司，批号：220102001、220200041、220101571），甘草（石家庄市诚信中药材有限公司，批号：211202）；甲氨蝶呤片（上海上药信谊药厂有限公司，批号：036220302）；牛Ⅱ型胶原（CⅡ）（Chondrex，批号：220176）；不完全弗氏佐剂（IFA）（SIGMA，批号：SLCJ8244）；TNF-α、IL-10、TGF-β、IL-17、MMP1、MMP13、RANKL 检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号：H052-1-2、H009-1-2、H034-1-2、H14-1、H146-5、H459-1、H284）；改良番红固绿软骨染色试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，批号：G1371）。

1.3　仪器

IKA/T10 型高速均质机（IKA 设备上海有限公司）；足容积测量仪（Ugo Basile）；SA705 型冷热板测痛仪（江苏赛昂斯生物科技有限公司）；LBY-N6C 全自动血流变仪（北京普利生仪器有限公司）；i3x 酶标仪 [美谷分子仪器（上海）有限公司]。

2　方法

2.1　受试药物的制备

2.1.1　甲氨蝶呤混悬液制备　用蒸馏水将甲氨蝶呤配制成质量浓度为 0.125 g • L^{-1} 甲氨蝶呤混悬液，现配现用。

2.1.2　身痛逐瘀汤制备　将身痛逐瘀汤中药饮片中加入药材 7 倍量的水浸泡 30 min 后煎煮 1 h，用纱布过滤出药液，再加 7 倍量水煎煮 0.5 h，用纱布过滤药液，合并两次药液浓缩至质量浓度 1.8 g • mL^{-1}，4 ℃保存备用。

2.2　胶原乳剂的制备

将牛Ⅱ型胶原蛋白在 4 ℃下溶解在 100 mmol • L^{-1} 乙酸中，过夜；使用高速均质机（30 000 r • min^{-1}）将等体积的 IFA 和胶原蛋白溶液在冰上乳化 1 h，得Ⅱ型胶原蛋白终质量浓度为 2 mg•mL^{-1}。

2.3　造模

将 42 只大鼠随机分为空白组（6 只）、预防给药组（PA）（6 只）、造模组（30 只）。第 0 日即 Day0，将预防给药组和造模组的动物在尾巴底部（0.1 mL）和背部的两个部位（每个部位 0.2 mL）皮内注射 CⅡ/IFA 乳剂。初次免疫后第 7 日即 Day7 以同样剂量注射，加强免疫。空白组注射等体积生理盐水。自第 14 日起开始对大鼠关节炎进行评分，当大鼠的至少一只足及踝关节发生肿胀，且关节炎评分≥ 4 分，视为造模成功。

2.4　分组及给药

将 30 只造模成功的大鼠随机分为模型组，甲氨蝶呤组，身痛逐瘀汤（STZYT）低、中、高剂量组。身痛逐瘀汤按照人与大鼠给药剂量换算，中剂量（9 g • kg^{-1}）即为人临床等效剂量。预防给药组自 Day0 开始给予身痛逐瘀汤中剂量（9 g • kg^{-1}），灌胃给药，每日一次，直至实验终点；身痛逐瘀汤低（4.5 g • kg^{-1}）、中（9 g • kg^{-1}）、高（18 g • kg^{-1}）剂量组自造模成功分组后开始给予身痛逐瘀汤，灌胃给药，连续 28 d；甲氨蝶呤组自造模成功后开始给予甲氨蝶呤混悬液（0.9 mg • kg^{-1}），灌胃给药，每周一次，连续 28 d；空白组和模型组给予等体积生理盐水，灌胃给药，每日一次，连续 28 d。

2.5　观察指标与检测

动物在末次给药后禁食不禁水 12 h，肌内注射舒泰（1 mL • kg^{-1}），从大鼠腹主动脉采血 4 mL，放血后安乐死。大鼠处死后，从踝关节以上 2 ～ 3 cm 开始截取踝关节，保持踝关节的完整性，截取的踝关节用 10% 中性甲醛固定。

2.5.1　一般临床观察　所有动物实验期间每周两次，观察摄食情况，精神状态，皮肤毛发情况，活动程度并称量体重等。

2.5.2　关节炎评分　采用关节炎指数评分评估大鼠关节炎炎症严重程度。于二次免疫后开始观察第一次，以后每周两次观察足肿胀情况，同时对足爪炎症程度进行评分，采用 4 分制的评分标准，以 0 ～ 4 分记录，累计得分即为每只大鼠的关节炎指数，每只大鼠最高分为 16 分，评分标准见表 1。

表 1　CIA 大鼠模型评分标准 [37]

Tab 1　Scoring criteria for CIA rat model[37]

分数 / 分	标准
0	关节正常，无明显红肿
1	单一趾关节发生炎症红肿
2	两个以上（包括两个）趾关节发生红肿，但没达到整个脚掌，或整个脚掌轻微红肿
3	整个脚掌炎症红肿
4	整个脚掌严重红肿，或踝关节变形、强直

2.5.3　大鼠足容积检测　测量前统一在待测大鼠踝关节上描画测量标线，借助大鼠足容积测量仪进行测量。操作者左手捉持大鼠前肢下，右手捉持后膝关节处并使其后足伸直，利用右小指做支点，托手架做依托，缓慢放入加有生理盐水的测量杯中，当测量标线与液面重叠时读数，测量后校零。每只大鼠每足重复检测 3 次，每周测量两次。关节肿胀度计算如下：肿胀率（%）＝（造模后容积－造模前容积）/ 造模前容积 ×100%。

2.5.4　大鼠痛阈值测定　在明亮、安静环境下，将冷热板测痛仪温度调节至（55±0.5）℃，记录将大鼠投入热板仪内至出现舔后足或剧烈挣扎的时间，达到 60 s 则停止测试，时间按 60 s 计。自动物第一次免疫后开始每周两次对大鼠的痛阈值进行测量。

2.5.5　血液学检测　收集 2 mL 全血于肝素抗凝管中，使用普利生 LBY-N6C 全自动血流变仪检测血液流变学，验证身痛逐瘀汤的活血化瘀作用；收集 1.5 mL 全血于分离胶 - 促凝采血管中，使用低温离心机分离出血清（3000 g，5 min，4 ℃），通过酶联免疫吸附法（ELISA）检测血清中 TNF-α、IL-17、IL-10、TGF-β、MMP1、MMP13、RANKL 指标，检测身痛逐瘀汤对炎症因子的作用。

2.5.6　病理观察

① HE 染色：取大鼠踝关节，10% 甲醛固定，经脱钙、石蜡包埋后制成切片，进行 HE 染色，光镜下观察软骨及滑膜组织的病理变化，评分标准见表 2。

表 2　HE 染色评分标准 [38]

Tab 2　Scoring criteria for HE staining[38]

评分 / 分	细胞增生	炎症浸润	血管生成
0	1 ～ 3 层	没有炎症细胞	没有新生血管
1	3 ～ 4 层	炎症细胞散在分布	轻度新生血管生成
2	5 ～ 6 层	炎症细胞弥漫分布	中度新生血管生成
3	＞ 6 层	形成生发中心或淋巴滤泡	重度新生血管生成

② 番红固绿染色：将准备好的石蜡切片进行番红固绿染色，于倒置显微镜下观察并拍照，通过 Mankin’s 评分对组织切片进行评分。评分标准按结构完整性（0 ～ 6 分）、软骨细胞数量（0 ～ 2 分）、潮线的完整性（0 ～ 2 分）、染色情况（1 ～ 4 分）进行评价，总计 14 分。结构完整性分为正常、表面不规则、表面不规则及血管翳形成、裂隙深达软骨移行层、裂隙深达软骨放射层、裂隙深达软骨钙化层、结构完全破坏。软骨细胞数量分为正常、弥散性血管数量增多、增生型细胞簇。潮线完整性分为完整和有血管穿过。

2.6　统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，数据均采用均数 ± 标准误表示，组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 值进行检验，当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠一般临床状态的影响

模型建立成功后，模型组动物摄食量减少，精神状态变差，皮肤毛发粗糙无光泽，活动程度降低。预防给药组动物摄食量、精神状态、皮肤毛发与空白组无明显差异。经给药治疗后，身痛逐瘀汤低、中、高剂量组的动物随着给药天数增加，状态逐渐恢复。

3.2　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠关节炎评分的影响

造模后，模型组评分较空白组显著上升。预防给药组的评分上升，但显著低于模型组和甲氨蝶呤组；经给药治疗后（Day43），各剂量组关节炎评分下降，中、高剂量组的关节炎评分较模型组显著降低，表明身痛逐瘀汤各剂量组的治疗效果显著，且呈剂量依赖性，见表 3。说明身痛逐瘀汤能有效缓解 CIA 模型大鼠红肿热的症状。

3.3　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠足肿胀率的影响

动物造模前各组足肿胀率无显著差异，造模后，模型组足肿胀率较空白组显著上升；预防给药组的足肿胀率显著低于模型组；给药治疗后，身痛逐瘀汤中、高剂量组的足肿胀率较模型组显著降低，且随剂量升高而降低，见表 4。模型组动物的关节在实验终点的红肿热现象依旧较明显，经给药治疗后的动物足趾颜色显著改善，手触温度降低，提示身痛逐瘀汤能有效降低关节炎大鼠的足肿胀（见图 2）。

3.4　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠痛阈值的影响

实验发现，终点时模型组的痛阈值显著高于空白组；预防给药组的痛阈值较空白组无显著差异；给药治疗后，身痛逐瘀汤中、高剂量组的痛阈值较模型组显著下降，且治疗效果呈剂量依赖性，提示身痛逐瘀汤具有良好的镇痛作用，见表 5。

3.5　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠血液学的影响

3.5.1　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠血液流变学的影响　动物造模后，血液流变学相关指标均有所升

表 3　身痛逐瘀汤对大鼠关节炎评分的影响 (分，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of Shentong Zhuyu decoction on arthritis scores in rats (point，$\bar{x}\pm s$)

组别	Day8	Day16	Day22	Day32	Day43
空白组	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	0.00	5.50±1.00**	8.00±3.27**	12.25±2.63**	13.75±2.63$^{**\triangle\triangle}$
甲氨蝶呤组	0.00	5.50±1.00**	8.75±2.22**	11.50±1.29**	10.00±0.82$^{**\#\#}$
预防给药组	0.00	2.00±2.45$^{\#\#\triangle\triangle}$	3.00±2.45$^{\#\#\triangle\triangle}$	3.75±3.30$^{\#\#\triangle\triangle}$	4.25±2.63$^{**\#\#\triangle\triangle}$
STZYT 低剂量组	0.00	5.25±0.96**	8.50±1.73**	12.00±4.55**	12.75±1.89**
STZYT 中剂量组	0.00	5.75±1.26**	7.75±3.30**	10.25±3.50**	11.00±1.83$^{**\#}$
STZYT 高剂量组	0.00	6.00±1.63**	10.50±1.73**	15.00±2.00**	9.50±1.29$^{**\#\#}$

注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与甲氨蝶呤组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

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

表 4　身痛逐瘀汤对大鼠足肿胀率的影响 (%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of Shentong Zhuyu decoction on paw swelling rate in rats (%，$\bar{x}\pm s$)

组别	Day8	Day22	Day32	Day43
空白组	3.93±3.86	19.62±4.33	25.30±1.91	25.66±2.53
模型组	3.84±4.37	83.04±29.59**	86.72±22.20**	74.39±9.47$^{**\triangle}$
甲氨蝶呤组	2.36±2.87	97.36±19.21**	72.97±11.40**	60.89±4.30$^{**\#}$
预防给药组	2.91±2.68	58.09±37.26$^{*\triangle\triangle}$	60.89±25.82$^{**\#}$	48.04±17.64$^{**\#\#}$
STZYT 低剂量组	3.29±3.53	99.56±20.46**	87.86±16.82**	72.17±6.56**
STZYT 中剂量组	1.98±2.29	81.88±30.61**	64.74±21.16**	57.44±18.73$^{**\#}$
STZYT 高剂量组	1.63±2.17	115.43±14.62$^{**\#}$	79.71±3.30**	54.16±7.87$^{**\#\#}$

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与甲氨蝶呤组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

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

图 2　各组大鼠后足肿胀示意图

Fig 2　Schematic diagram of hind paw swelling of rats in each group

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 甲氨蝶呤组（MTX group）；D. 预防给药组（preventive administration group）；E. STZYT 低剂量组（Shentong Zhuyu decoction low-dose group）；F. STZYT 中剂量组（Shentong Zhuyu decoction medium-dose group）；G. STZYT 高剂量组（Shentong Zhuyu decoction high-dose group）

表 5　身痛逐瘀汤对大鼠痛阈值的影响 (s，$\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Effect of Shentong Zhuyu decoction on pain threshold in rats (s，$\bar{x}\pm s$)

组别	Day1	Day11	Day22	Day32	Day43
空白组	3.04±0.45	4.09±1.23	4.45±1.11	4.90±1.44	3.43±1.42
模型组	3.48±0.64	7.01±1.08**	13.69±5.31**	16.44±7.36**	11.04±3.38$^{**\triangle}$
甲氨蝶呤组	3.46±0.27	5.82±1.47	17.26±5.44**	13.89±6.16**	7.42±1.56$^{**\#}$
预防给药组	3.12±0.75	6.80±1.04**	10.11±3.94$^{*\triangle\triangle}$	6.37±1.68$^{\#\#\triangle\triangle}$	4.64±1.47$^{\#\#}$
STZYT 低剂量组	3.58±0.55	6.83±2.51**	12.68±4.85***	12.04±2.42*	8.46±3.57**
STZYT 中剂量组	3.41±0.50	7.67±0.98$^{**\triangle}$	12.36±1.15***	11.33±3.13*	6.25±1.23$^{\#}$
STZYT 高剂量组	3.01±0.70	6.57±0.71**	16.24±3.05**	8.40±2.03$^{\#\triangle}$	5.32±1.48$^{\#}$

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与甲氨蝶呤组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；compared with the model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the MTX group，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$.

高，经给药治疗后，身痛逐瘀汤中、高剂量组的低、中、高切全血黏度，血浆黏度、血沉及血沉方程 K 值显著降低，提示身痛逐瘀汤具有显著的活血化瘀作用，见图 3。

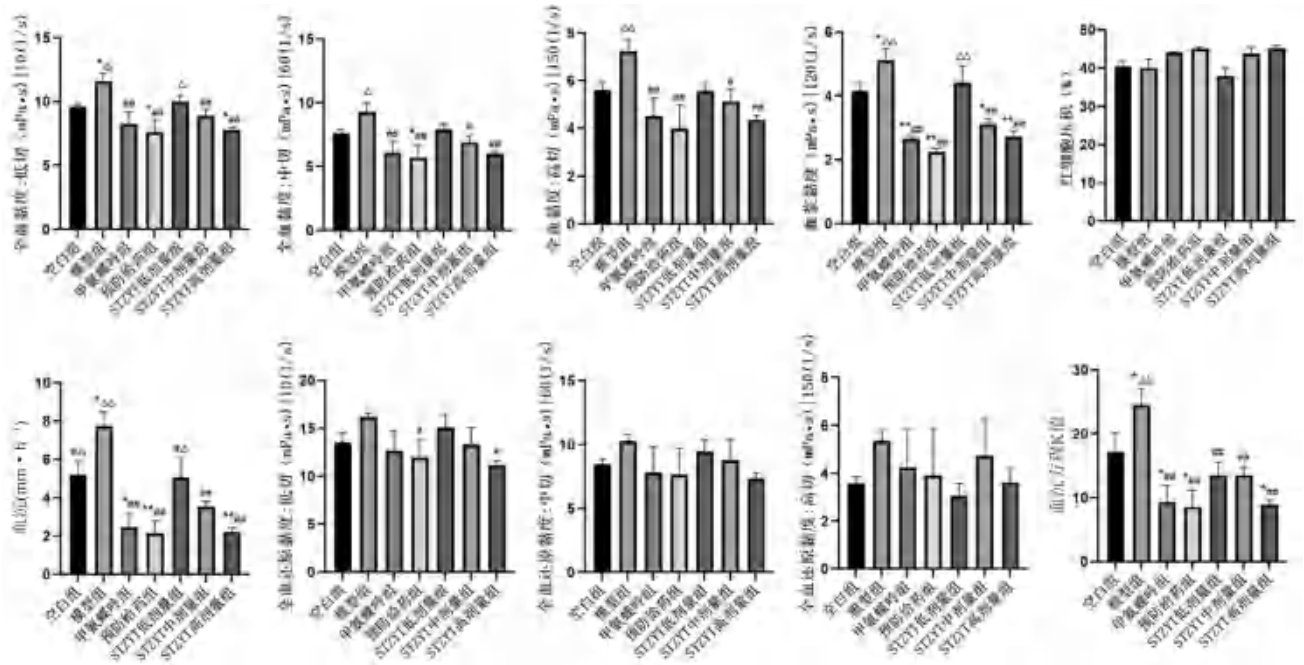


图 3　身痛逐瘀汤对大鼠血液流变学的影响

Fig 3　Effect of Shentong Zhuyu decoction on hemorrheology in rats

注：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与甲氨蝶呤组比较，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

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

3.5.2　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠血清炎症因子的影响

抗炎因子 IL-10 在模型组的血清中含量较空白组降低，预防给药组的含量较空白组有所升高但不显著；身痛逐瘀汤各剂量组的血清 IL-10 含量上升，其中身痛逐瘀汤高剂量组较模型组显著升高，效果优于甲氨蝶呤组。模型组血清中促炎因子 TGF-β、IL-17、TNF-α 的表达水平较空白组显著升高；预防给药组的 TGF-β、IL-17 含量较空白组升高但无统计学意义，且 TGF-β、IL-17、TNF-α 含量显著低于模型组；经身痛逐瘀汤治疗后，大鼠的血清炎症因子表达降低，中、高剂量组的效果显著。实验表明身痛逐瘀汤对 CIA 模型具有显著的抗炎作用，见图 4。

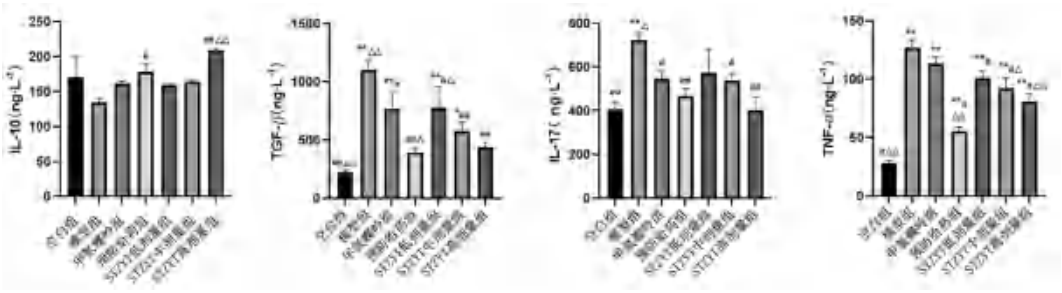


图 4　身痛逐瘀汤对大鼠血清 IL-10、TGF-β、IL-17、TNF-α 含量的影响

Fig 4　Effect of Shentong Zhuyu decoction on the serum IL-10，TGF-β，IL-17，and TNF-α contents in rats

注：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与甲氨蝶呤组比较，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

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

模型组的血清 MMP-1、MMP-13、RANKL 含量较空白组显著上升；预防给药组的 MMP-1、MMP-13 含量较空白组上升但差异无统计学意义，MMP-1、MMP-13、RANKL 含量显著低于模型组和甲氨蝶呤组；给药治疗后，各剂量组的含量较模型组下降，其中高剂量组效果显著，且效果明显优于阳性药组。提示身痛逐瘀汤对 MMP-1、MMP-13、RANKL 具有显著抑制作用，见图 5。

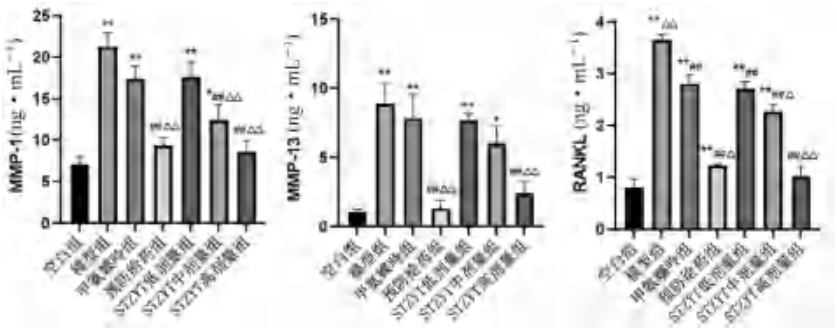


图 5　身痛逐瘀汤对大鼠血清 MMP-1、MMP-13、RANKL 含量的影响

Fig 5　Effect of Shentong Zhuyu decoction on the serum MMP-1，MMP-13 and RANKL contents in rats

注：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与甲氨蝶呤组比较，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

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

3.6　身痛逐瘀汤对 CIA 大鼠病理学的影响

模型组的 HE 染色和番红固绿染色评分较空白组显著上升；预防给药组的评分显著低于模型组，且优于各给药组；经给药治疗后，各组染色评分下降，其中 HE 染色中、高剂量组评分显著低于模型组，番红固绿染色的高剂量组评分显著低于模型组。

3.6.1　HE 染色　空白组关节软骨结构完整，无病变异常。模型组关节软骨细胞重度增生，增生层数大于 6 层，可见炎症细胞弥漫分布（绿色箭头），可见重度新生血管生成（蓝色箭头）。预防给药组关节软骨细胞仅轻微增生，未发现炎症细胞浸润及新生血管，预防效果显著。经给予身痛逐瘀汤治疗后，各治疗组关节软骨细胞增生未见明显改善，但炎症细胞数量有所减少，新生血管生成减少，高剂量组效果明显，见图 6。

3.6.2　番红固绿染色　空白组关节处软骨结构完整，软骨细胞数量正常，潮线完整，番红固绿染色情况良好。模型组关节处软骨结构被完全破坏，软骨细胞数量增多，呈现增生性细胞簇，难以观察到潮线结构，番红固绿染色中度失色。预防给药组动物软骨结构完整，软骨细胞数量显著减少，潮线完整，番红固绿染色情况良好，预防效果良好。经给药治疗后，各给药组的软骨结构未见改善，软骨细胞数量有所减少，潮线结构有所恢复，番红固绿染色情况有所改善，见图 7。

4　讨论

RA 是一种慢性自身免疫性疾病，在其发病过程中，患者承受极大的痛苦 [39]。而调研发现，年龄、性别、居住环境以及劳作强度等均对患病与否和患病程度有所影响，针对这些影响因素，可以锁定高危易患 RA 人群，为他们提供预防方案。本实验中采用身痛逐瘀汤进行预防治疗，结果发现，预防给药组的动物较造模组呈现发病现象更晚、发病的进程更缓慢、程度更轻。发病过程中，动物的状态较身痛逐瘀汤各剂量组和甲氨蝶呤组好，各指标显示动物的关节炎程度较轻，骨损伤极小。显示身痛逐瘀汤具有显著的预防 RA 的作用，可以为易感 RA 的人群提供有效的防治方剂。

在中医中，RA 又称为“痹病”，全身气血运行不畅，形成痹症。身痛逐瘀汤则通过逐瘀止痛来治疗 RA，本实验通过检测大鼠痛阈值和血液流变学，验证了身痛逐瘀汤具有显著的止痛及活血通痹的作用，可以有效缓解气血凝滞的症状。但甲氨蝶呤组血液流变学的影响优于身痛逐瘀汤中剂量组，与高剂量组无明显差异。提示高剂量身痛逐瘀汤与甲氨蝶呤混悬液的治疗效果相当，可能与其通过改善局部淤血状态、降低毛细血管通透性来达到活血化瘀的作用有关。

细胞因子在疾病发生与发展过程中起重要作用，其中 IL-10 及 TGF-β 为主要的致炎细胞因子，可作用于多种免疫细胞，IL-17、TNF-α 等通过介导 NK 信号，促进破骨细胞形成，使血管增生、滑膜增厚、血管翳形成，最终导致关节炎症及骨破坏加重；RANKL 诱导破骨细胞促进骨破坏，同时表达 MMPs，加速软骨降解，这些细胞因子共同发挥作用，促进 CIA 大鼠骨破坏。本实验中，模型组的 IL-10 显著下降，TGF-β、IL-17、TNF-α、MMP-1、MMP-13、RANKL 水平显著上升，提示模型建立成功。经治疗后，血清炎症因子含量显著改善，且病理结果显示，治疗后踝关节处炎症减轻，软骨破坏减少。提示身痛逐瘀汤能够显著抑制炎症反应，抑制骨破坏发生。

此外，研究结果显示，经给药治疗后，各剂量组关节炎评分和足肿胀率下降，高剂量组的关节炎评分及足肿胀率较模型组显著好转；各剂量组的血清 IL-10 含量上升，其中身痛逐瘀汤高剂

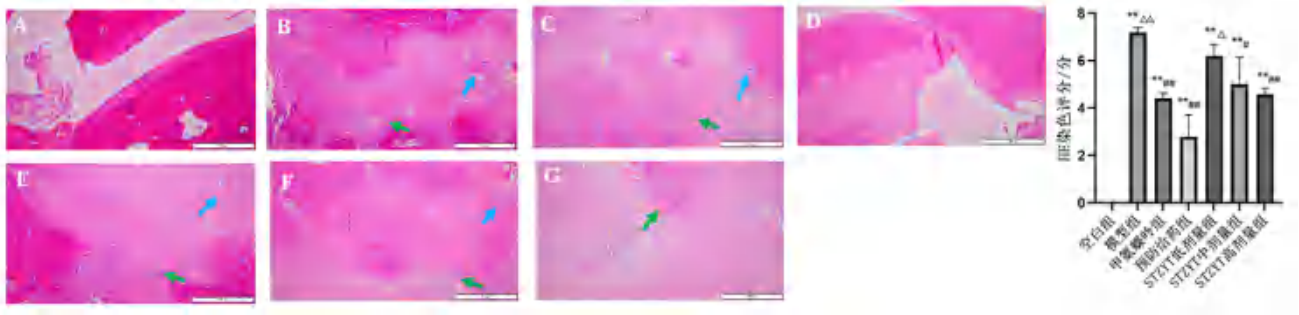


图 6　大鼠踝关节 HE 染色代表图（×100）

Fig 6　Representative images of HE staining of rat ankle joint（×100）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 甲氨蝶呤组（MTX group）；D. 预防给药组（prophylactic administration group）；E. STZYT 低剂量组（Shentong Zhuyu decoction low-dose group）；F. STZYT 中剂量组（Shentong Zhuyu decoction medium-dose group）；G. STZYT 高剂量组（Shentong Zhuyu decoction high-dose group）

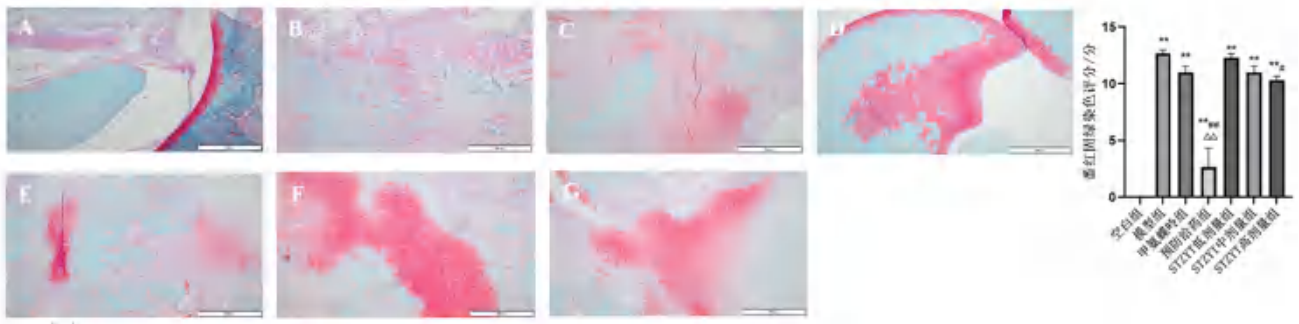


图 7　大鼠踝关节番红固绿染色代表图（×100）

Fig 7　Representative images of safranin-fast green staining of rat ankle joints（×100）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 甲氨蝶呤组（MTX group）；D. 预防给药组（prophylactic administration group）；E. STZYT 低剂量组（Shentong Zhuyu decoction low-dose group）；F. STZYT 中剂量组（Shentong Zhuyu decoction medium-dose group）；G. STZYT 高剂量组（Shentong Zhuyu decoction high-dose group）

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与甲氨蝶呤组比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$。

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

量组较模型组显著升高；促炎因子 TGF-β、IL-17、TNF-α 均有所改善；血清 MMP-1、MMP-13、RANKL 含量较模型组下降。提示身痛逐瘀汤各剂量组的治疗效果呈剂量依赖性，且剂量越高，治疗效果越好，推测其原因可能是身痛逐瘀汤高剂量组中的活性组分含量较高，通过多成分、多途径、多靶点发挥抗炎作用，达到较好的治疗效果。

综上所述，身痛逐瘀汤对 Lewis 大鼠构建的 CIA 模型具有显著的预防及治疗作用，能够缓解 RA 红肿热痛的症状，改善血液循环，抑制炎症反应，减轻大鼠踝关节骨破坏，为易感 RA 的人群提供预防方案，为患者提供新的治疗思路及方剂。现代研究中对于身痛逐瘀汤的物质基础研究及机制研究均不明确，而本实验验证其对 RA 显著的药效作用，初步探究其机制，以期后续有更多的学者参与研究身痛逐瘀汤的物质基础及机制，为 RA 患者开发新的治疗方案。

参考文献

[1] Smolen JS，Aletaha D，Mcinnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet，2016，388（10055）：2023-2038.

[2] Vos T，Lim SS，Abbafati C，et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories，1990—2019：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet，2020，396（10258）：1204-1222.

[3] 曾宪国，陈波，曾方，等 . 广西南宁市壮族人群类风湿关节炎的流行病学调查 [J]. 中华流行病学杂志，2007，28（11）：1127-1129.

[4] 沈洁，汪霞，刘晓明 . 临安地区成年人群类风湿性关节炎患病率调查 [J]. 山西中医，2021，37（3）：47-49.

[5] 贺叶彬，胡鲲，苏军，等 . 贵州省黔南州农村少数民族 20 ～ 79 岁居民类风湿关节炎流行病学调查 [J]. 现代预防医学，2020，47（2）：219-222，227.

[6] 胡鲲，苏军，陈新春，等 . 贵州黔南地区 20 ～ 79 岁农村居民类风湿关节炎患病现状及危险因素 [J]. 中国公共卫生，2019，35（7）：813-817.

[7] 慕婷婷，杜小正，亢永良，等 . 兰州市城关区类风湿关节炎的现况研究 [J]. 甘肃科学学报，2018，30（6）：65-68.
[8] 任庆杰，王辉，曹津，等 . 嘉兴地区类风湿关节炎患病现状及其危险因素分析 [J]. 实用预防医学，2021，28（1）：88-90.
[9] 汪太中，万姜敏，陈红，等 . 重庆市綦江区类风湿关节炎流行病学调查 [J]. 风湿病与关节炎，2018，7（1）：32-34，50.
[10] 张嘉怡，戎娜，李贞 . 郑州市居民类风湿关节炎筛查结果分析 [J]. 华南预防医学，2021，47（11）：1458-1460.
[11] Aletaha D，Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis：a review [J]. JAMA，2018，320（13）：1360-1372.
[12] 戴红红，曲芳 . 加减身痛逐瘀汤联合普瑞巴林治疗卒中后丘脑痛临床观察 [J]. 中国中医药现代远程教育，2022，20（17）：127-129.
[13] 裴忠霞 . 身痛逐瘀汤联合针刺对膝关节置换术后患者疼痛的影响 [J]. 中国中医药现代远程教育，2023，21（3）：108-110.
[14] 漆利军，谢韦君，周晋华 . “加减身痛逐瘀汤”经神阙穴贴敷联合三阶梯止痛药疗法治疗癌性疼痛的临床效果观察 [J]. 临床和实验医学杂志，2022，21（18）：1937-1940.
[15] 佟德民，孙凤杰，冯福盈，等 . 身痛逐瘀汤对大鼠中重度退变腰椎间盘髓核内 TNF-α、IL-1β 的影响 [J]. 中国中医急症，2019，28（4）：603-606.
[16] 常有军，邱恒，马天洪 . 身痛逐瘀汤对大鼠变性腰椎间盘内 TNF-α、IL-1α、IL-6、MMP-3 的影响 [J]. 西部医学，2017，29（8）：1046-1050.
[17] 李世强 . 加味身痛逐瘀汤配合针刺对腰椎间盘突出症患者腰椎功能及 IL-2、IL-10 水平的影响 [J]. 光明中医，2020，35（24）：3852-3855.
[18] 罗灿科，赵淼坚 . 身痛逐瘀汤内服联合伤科黄水外敷对内固定治疗胫骨平台骨折患者膝关节功能及 IL-6、CRP 水平的影响 [J]. 中外医学研究，2021，19（23）：147-149.
[19] 陈涛 . 身痛逐瘀汤提高淋巴管回流功能治疗类风湿关节炎的研究 [D]. 上海：上海中医药大学，2020.
[20] 梅鹏飞 . 身痛逐瘀汤预防全髋关节置换术后深静脉血栓形成的临床研究 [D]. 南宁：广西中医药大学，2020.
[21] 王政臻，黄俊卿，杨彬，等 . 基于 AMPK/Sirt1 信号通路探讨身痛逐瘀汤含药血清对膝骨性关节炎大鼠软骨细胞的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（16）：33-42.
[22] 韩鹏勃，蒋锋，刘柱，等 . 加味身痛逐瘀汤调控 Wnt/β-catenin 信号通路对大鼠骨质疏松症的防治作用 [J]. 陕西中医，2020，41（6）：715-719.
[23] 陈江，刘志超，张帆，等 . 身痛逐瘀汤对人髓核细胞模型 PI3K/Akt 信号通路 Bad、Caspase-9、GSK-3β 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志，2019，26（9）：48-54.
[24] 闫振超，段荣章 . 身痛逐瘀汤在痰瘀互阻型类风湿关节炎中的应用研究 [J]. 中国药物滥用防治杂志，2023，29（1）：148-151.
[25] 邹震，张旭桥，郭绍勇 . 身痛逐瘀汤治疗膝关节骨性关节炎疗效观察 [J]. 现代医药卫生，2015，31（5）：738-739.
[26] 江占亮 . 身痛逐瘀汤治疗腰椎间盘突出症（瘀血阻滞型）的疗效观察 [D]. 长春：长春中医药大学，2022.
[27] 蒋文辉 . 针灸配合身痛逐瘀汤治疗风湿关节痛临床观察 [J]. 临床医药文献电子杂志，2018，5（94）：170.
[28] 姜福超 . 身痛逐瘀汤配合针刺治疗腰椎间盘突出症临床观察 [J]. 中国中医药现代远程教育，2023，21（8）：89-91.
[29] 沈世英，陈洋，刘静利，等 . 加味身痛逐瘀汤联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎临床研究 [J]. 实用中医药杂志，2022，38（1）：93-94.
[30] 易腾达，张书萌，王莎莎，等 . 身痛逐瘀贴辅助治疗瘀血型膝骨关节炎患者的效果 [J]. 中国医药导报，2022，19（9）：87-90.
[31] 刘帅 . 身痛逐瘀汤治疗脑梗死后半身麻木患者的效果分析 [J]. 中国冶金工业医学杂志，2021，38（1）：100-101.
[32] 雷鹏远，李仲明，吴晓刚，等 . 身痛逐瘀汤对前列腺癌骨转移患者疼痛程度及血清 PSA、ALP 的影响 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志，2020，4（18）：68-70.
[33] 李东薇，穆柏辰，窦德强，等 . 甘草附子汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清和关节液中 IL-1β、IL-10 及 TNF-α 含量的影响 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（12）：6355-6358.
[34] Junqueira SC，Dos Santos Coelho I，Lieberknecht V，et al. Inosine，an endogenous purine nucleoside，suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis：a role for A2A aenosine receptor [J]. Mol Neurobiol，2017，54（5）：3271-3285.
[35] 杨冬 . 身痛逐瘀汤对大鼠腰椎间盘髓核细胞凋亡相关因子的作用 [J]. 实用中医内科杂志，2010，24（6）：35-36.
[36] 徐子涵，蔡辉 . IL-17 在类风湿关节炎关节破坏中的作用 [J]. 现代中西医结合杂志，2016，25（16）：1821-1824.
[37] 钱凯，郑雪霞，李海鸿，等 . 甘草附子汤调控 NF-κB 信号通路抑制胶原诱导型关节炎小鼠骨质破坏的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（23）：1-9.
[38] 梁菁菁 . ZNRF3 对类风湿关节炎滑膜增殖和炎症的作用及其分子机制 [D]. 上海：中国人民解放军海军军医大学，2019.
[39] 杨艳，侯文雪，魏传君，等 . 类风湿关节炎患者幸福度调查及影响因素分析 [J]. 心理月刊，2023，18（6）：40-42，45.

（收稿日期：2023-09-26；修回日期：2023-11-27）

基于 Box-Behnken 响应面法与 BP 神经网络优化雪莲药渣化学成分提取工艺

艾尼玩尔·买提库尔班[1]，马桂芝[1]，滕亮[2*]（1. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830011；2. 新疆医科大学第一附属医院药学部，乌鲁木齐　830054）

摘要：目的　优化雪莲药渣提取工艺。**方法**　在测得提取液中绿原酸、芦丁和多糖含量的基础上采用层次分析法（AHP）赋权得到综合评分。以料液比、提取时间和提取次数为考察因素，以综合评分为优选指标，运用 Box-Behnken 响应面设计和 BP 神经网络优化雪莲药渣化学成分的提取工艺。**结果**　Box-Behnken 响应面法优化的提取工艺为加 9 倍量水回流提取 3 次，每次提取 42 min。选择响应面试验中的 17 组数据作为训练数据和验证数据，BP 神经网络预测的优选的提取工艺为加 6 倍量水回流提取 3 次，每次煎煮 30 min。验证试验结果表明，BP 神经网络优化工艺实际综合评分高于响应面法实际综合评分，提示 BP 神经网络预测的优选的提取工艺更为合理。**结论**　BP 神经网络预测的优选的提取工艺合理、稳定、可行，可为雪莲药渣的二次开发利用提供参考。

关键词：雪莲；Box-Behnken 响应面法；BP 神经网络；层次分析法；提取工艺
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0923-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.015

Optimization of extraction of dregs of *Saussurea involucrata* after ethanol extraction based on Box-Behnken response surface methodology and BP neural network

Ainiwaner Maitikuerban[1], MA Gui-zhi[1], TENG Liang[2*] (1. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 2. *Department of Pharmacy*, *The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830054)

Abstract: Objective　To optimize the extraction of dregs of *Saussurea involucrata* after ethanol extraction. **Methods**　Based on the content of chlorogenic acid, rutin and polysaccharides in the extract, the analytic hierarchy process (AHP) was used to assign weights to obtain a comprehensive score. The extraction for the chemical constituents of dregs was optimized with a composite score as a preference index. Material liquid ratio, extraction time, and extraction times served as factors. To accomplish this, the Box-Behnken response surface design and BP neural network were used. **Results**　The extraction conditions were optimized by the Box-Behnken response surface methodol as follows: reflux extraction being conducted with 9 times of water for 42 min, repeating 3 times. Seventeen sets of data were selected from the response surface test for training and validation. The BP neural network predicted the preferred extraction to be adding six times of water to reflux the extraction for 3 times, followed by decoction for 30 min each time. The validation test demonstrated that the BP neural network optimization achieved a higher actual comprehensive score than that of the response surface method, indicating a more reasonable extraction progress by the BP neural network. **Conclusion**　The extraction progress by the BP neural network outlined in this paper is reasonable, stable and viable. It serves as a useful reference for the secondary development and utilisation of dregs of *Saussurea involucrata*.

Key words: *Saussurea involucrata*; Box-Behnken response surface methodology; BP neural network; analytic hierarchy process; extraction technology

基金项目：新疆维吾尔自治区重点研发计划项目（No.2017B03013-2）。

作者简介：艾尼玩尔·买提库尔班，男，硕士，主要从事中药（民族药）新药研究，email：an-war@qq.com　**通信作者：**滕亮，男，教授，主任药师，硕士研究生导师，主要从事药剂学相关工作，email：tl750212@126.com

天山雪莲（*Saussurea involucrata* Kar.et Kir）又名“雪荷花”，为菊科风毛菊属多年生草本植物，始见于藏药文献《月王药物》，清代《本草纲目拾遗》也有记载[1]。中医认为该药材具有散寒除湿、活血通经、抗炎镇痛、收缩子宫等功效[2]。现代药学研究发现，天山雪莲主要含有黄酮类、苯丙素类、生物碱类、倍半萜类、挥发油类、多糖类等活性成分，具有抗菌、抗炎、止痛、抗肿瘤等生物活性[3-4]。前期市场调研发现，新疆地区的雪莲注射液多采用醇提工艺制备，醇提后的雪莲药渣依然含有黄酮类、苯丙素类和多糖类等水溶性抗炎活性成分，此类成分可能未被充分利用，存在潜在的药用资源浪费。为此，有必要开展雪莲药渣抗炎活性成分的二次利用研究。

当前，研究者多采用响应面试验设计和正交试验设计进行中药提取工艺的优化。但响应面试验存在一定的局限性，即所有试验是基于单因素选择的试验点，当试验点的选择不合适时，则得不到理想的优化效果[5]。BP 神经网络是指基于误差逆传播算法的多层前馈网络。利用 BP 神经网络建立模型，可以模拟范围更广，弥补响应面试验的不足。随着人工智能的发展，BP 神经网络结合 Box-Behnken 响应面法被广泛应用于中药工艺优化[6-7]。

因此，本研究拟以液料比、提取时间和提取次数为考察因素，以药渣提取液中绿原酸、芦丁和多糖提取率为考察指标，在响应面试验的基础上结合 BP 神经网络数学模型优选雪莲药渣的提取工艺，为充分利用雪莲药材资源提供依据。

1　材料

1.1　仪器

LC-20AD HPLC 色谱仪，UV1900 紫外可见分光光度计（日本岛津公司）；SQP 电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司，d = 0.1 mg]。

1.2　试药

天山雪莲药渣，新疆华圣元医药科技有限公司惠赠；对照品芦丁（批号：0080-9504，中国食品药品检定研究院，纯度≥ 98%）；绿原酸（批号：Y20A11K111541，纯度≥ 98%）、无水葡萄糖（批号：S22J12H137237，纯度≥ 98%）（上海源叶生物科技有限公司）；甲醇、乙腈（色谱纯，Thermo Fisher 公司）；其他为分析纯，水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　雪莲多糖的含量测定及方法学考察

2.1.1　葡萄糖对照品溶液的制备　取适量无水葡萄糖对照品，105 ℃干燥至恒重，精密称取，置于 25 mL 棕色量瓶中，用蒸馏水溶解稀释至刻度，摇匀，得每 1 mL 含葡萄糖 1.0 mg 的对照品溶液。

2.1.2　雪莲供试品溶液的制备　精密称取雪莲药渣约 5.0 g，置于圆底烧瓶中，以 6 倍量水，加热回流提取 3 次，每次回流提取时间为 30 min，滤过，合并滤液，以蒸馏水定容至 250 mL，静置后取出上清液 1.0 mL，再用蒸馏水定容至 25 mL，摇匀，即得供试品溶液，备用。

2.1.3　显色方法及测定波长选择　精密移取雪莲供试品溶液与葡萄糖对照品溶液各 1.0 mL，分别置于 10 mL 试管中，加入 0.5 mL 的 5% 苯酚试液，摇匀，缓慢加入 4.0 mL 浓硫酸，摇匀，置 40 ℃水浴中 25 min，取出，冷却 10 min，另以 1.0 mL 水，同上操作，作空白溶液，完成显色后，用双光束紫外分光光度仪在 200 ～ 600 nm 进行扫描，得到多糖类成分的最大吸收波长为 481 nm，且空白溶液无吸收。

2.1.4　标准曲线的绘制　精密移取葡萄糖对照品溶液（1.0 mg • mL^{-1}）0、0.5、1.0、2.0、3.0 与 4.0 mL，分别置于 100 mL 的量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，摇匀。分别取 1.0 mL置于 10 mL 试管中，按“2.1.3”项下方法显色，于 481 nm 处测定吸光度值（A），以葡萄糖质量浓度（c）为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程为 $Y = 0.0049X + 0.0027$（$r = 0.9996$），表明葡萄糖在 5 ～ 40 μg • mL^{-1} 与吸光度线性关系良好。

2.1.5　精密度试验　精密移取供试品溶液适量，按“2.1.3”项下方法显色并连续测定 6 次，测定吸光度值。结果显示 *RSD* 为 1.0%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

2.1.6　重复性试验　按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，再按“2.1.3”项下方法显色和测定。结果多糖平均含量为（104.031±2.552）mg • g^{-1}，*RSD* 为 2.5%（$n = 6$），表明该方法重复性良好。

2.1.7　稳定性试验　取同一批供试品溶液按“2.1.3”项下方法显色，室温放置，分别于 0、30、60、90、120 min，测定吸光度值。结果显示 *RSD* 为 2.9%（$n = 5$），表明供试品溶液显色后在 120 min 内稳定性良好。

2.1.8　加样回收试验　精密移取 6 份已知含量的雪莲药渣供试品溶液，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 的量精密加入葡萄糖对照品，按“2.1.3”项下方法操作，测定吸光度值。结果显示，多糖的平均回收率为 100.43%（*RSD* = 2.9%），表明该方法准确度良好。

2.2　绿原酸与芦丁的含量测定及方法学考察[8]

2.2.1　混合对照品溶液的制备　精密称取绿原酸对照品 1.2 mg、芦丁对照品（120 ℃干燥至恒重）

0.9 mg，置于 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得每 1 mL 含绿原酸 0.048 mg、芦丁 0.031 mg 混合对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液的制备　精密称取雪莲药渣 5.0 g，置于圆底烧瓶中，以 6 倍量水，加热回流提取 3 次，每次回流提取时间为 30 min；滤过，合并滤液，滤液浓缩至适量后，以蒸馏水定容至 250 mL，静置，取上清液以 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液，备用。

2.2.3　色谱条件　色谱柱为 Inertsil ODS-SPC$_{18}$（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.4% 磷酸溶液（B）（梯度：0 ～ 6 min，15%A；6 ～ 25 min，15% ～ 30%A；25 ～ 40 min，30% ～ 40%A，40 ～ 45 min，40% ～ 15%A）；检测波长为 340 nm；柱温为 30 ℃；流速为 1.0 mL・min^{-1}；进样体积为 10 μL。

2.2.4　专属性试验　分别精密移取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液（甲醇）适量，按“2.2.3”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，结果见图 1。结果显示，色谱峰分离良好，非目标成分对待测成分的测定均无干扰，表明该方法专属性良好。

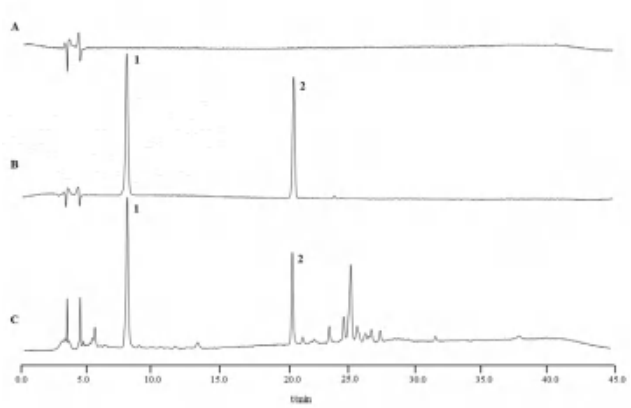


图 1　绿原酸和芦丁 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of chlorogenic acid and rutin

A. 阴性样品溶液（negative sample solution）；B. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；C. 供试品溶液（sample solution）；1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 芦丁（rutin）

2.2.5　线性关系考察　精密移取混合对照品溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mL，分别置于 5.0 mL 的量瓶中，加甲醇稀释至刻度，各取 10 μL，按“2.2.3”项下色谱条件进样分析，记录峰面积，以峰面积为纵坐标、对照品质量浓度为横坐标，进行线性回归，得绿原酸和芦丁的回归方程分别为 $Y=4.22\times10^4X-2.58\times10^3$（$r=0.9997$）、$Y=1.63\times10^4X-613.7$（$r=0.9998$），表明绿原酸和芦丁分别在 0.96 ～ 4.8 μg・mL^{-1}、0.72 ～ 3.6 μg・mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.2.6　精密度试验　精密移取供试品溶液适量，按“2.2.3”项下色谱条件连续进样 6 次测定。结果绿原酸、芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 0.51%、0.72%（$n=6$），表明仪器的精密度良好。

2.2.7　重复性试验　按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定。结果绿原酸、芦丁平均含量分别为（1.007±0.018）、（1.150±0.022）mg・g^{-1}，*RSD* 分别为 1.8%、1.9%（$n=6$），表明该方法重复性良好。

2.2.8　稳定性试验　取同一供试品溶液，分别于室温放置 0、2、4、6、8、12、24 h 时，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定。结果绿原酸、芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 1.8%、2.5%（$n=7$），表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.2.9　加样回收试验　精密称取已知绿原酸、芦丁含量的雪莲药渣共 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 的量精密加入绿原酸和芦丁对照品溶液适量，按“2.2.2”项下方法制备，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定。结果显示，绿原酸、芦丁的平均加样回收率分别为 99.17%、100.75%，*RSD* 分别为 2.4%、2.0%（$n=6$），表明该方法准确度良好。

2.3　雪莲药渣化学成分的提取工艺研究

2.3.1　工艺优选指标[9]　根据文献报道的绿原酸、芦丁及多糖类成分对抗炎活性的贡献，采用层次分析法（AHP）将指标性成分的相对权重指数加以量化，即把三项指标分为 3 个层次，并确定各指标的优先排序为：绿原酸提取率＝芦丁提取率＞多糖提取率。SPSSPRO 软件计算结果表明绿原酸提取率的权重为 40.0%，芦丁提取率的权重为 40.0%，多糖提取率的权重为 20.0%，最大特征根为 3.0。根据随机一致性指标 *RI* 表查到对应的 *RI* 值为 0.525，因此 $CR=CI/RI=0.00<0.10$，（公式中 *CI* 为一致性指标；*CR* 为一致性比率；*RI* 为随机一致性指标，$CR<0.10$ 才能通过一致性检验）。通过一次性检验，权重系数合理。据此，确定综合评分公式为：综合评分＝（绿原酸提取率 / 绿原酸最大提取率）×40 ＋（芦丁提取率 / 芦丁最大提取率）×40 ＋（多糖提取率 / 多糖最大提取率）×20。

2.3.2　单因素考察　对影响提取率的主要因素料液比、提取时间和提取次数进行单因素实验，考察料液比（1∶5、1∶10、1∶15、1∶20、1∶25）（g/mL）、提取时间（30、60、90、120、150 min）和提取次数（1、2、3、4 次）对雪莲药渣提取率的影响，结果见图 2。

综合考虑时间成本，当料液比为 1∶10 时，综合评分最高。提取时间由 30 min 增至 60 min 时，综合评分升高趋势明显，当提取时间超过 60 min 时，综合评分呈下降趋势。提取次数到达 2 次的时候，综合评分最高，提取次数超过 2 次之后综合评分开始下降。

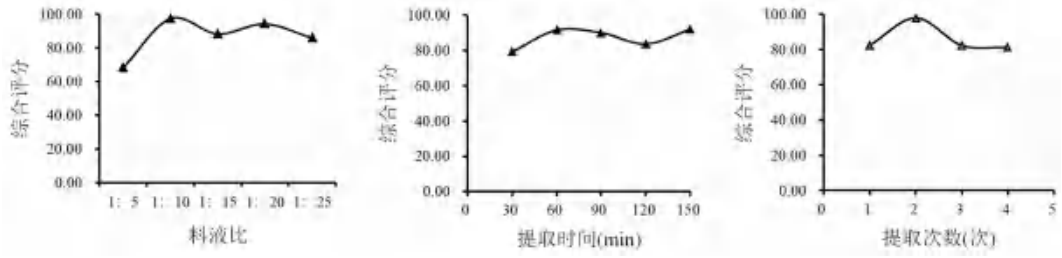


图 2　料液比、提取时间、提取次数对提取率的影响

Fig 2　Effect of material liquid ratio，extraction time，and extraction times on extraction rate

2.3.3　Box-Behnken 响应面法　根据单因素试验结果，选择料液比（A，1∶5、1∶10、1∶15）、提取时间（B，30、60、90 min）、提取次数（C，1、2、3 次）作为变量，以－1、0、1 代表变量水平，进行 17 组试验，具体因素水平和结果见表 1、2。

表 1　试验因素与水平表

Tab 1　Experimental factor and level

水平	因素		
	A 料液比	B 提取时间 /min	C 提取次数 / 次
－1	1∶5	30	1
0	1∶10	60	2
1	1∶15	90	3

以料液比（A）、提取时间（B）和提取次数（C）为自变量，以综合评分（S）为响应值，采用 Design-Expert 13.0 软件对表 2 中的试验结果进行数据处理，得到回归方程为 $S = 80.76 + 2.22A - 2.97B + 11.49C + 4.66AB - 5.54AC - 5.59BC - 0.906A^2 - 7.42B^2 - 7.89C^2$。对模型进行方差分析，结果见表 3。

如表 3 所示，模型 P 值为 0.001 ＜ 0.01，说明拟合的模型具有显著性；失拟项 P 值为 0.909 ＞ 0.05，即失拟度没有显著性差异，说明未知因素对试验的影响相对较小，可应用此模型来开展预测与研究；相关系数 $R^2 = 0.9479$，表明方程拟合程度较好，相关度良好，实验误差小，预测 $R_{pre}^2 = 0.8320$ 与调整 $R_{adj}^2 = 0.8810$ 基本一致，说明该模型可以预测雪莲药渣的提取过程；差异系数（CV）＝ 6.31%，说明本研究的可信度和准确度高。3 个因素对综合评分影响程度从大到小依次为 C ＞ B ＞ A。

表 2　试验设计方案及结果

Tab 2　Experimental design scheme and results

试验号	因素			指标			综合评分
	A 料液比	B 提取时间 /min	C 提取次数 / 次	绿原酸提取率 /%	芦丁提取率 /%	多糖提取率 /%	
1	1∶5	30	2	1.580	1.795	5.52	69.67
2	1∶15	30	2	1.422	1.652	4.81	63.11
3	1∶5	90	2	1.275	1.152	8.05	56.14
4	1∶15	90	2	1.466	1.457	10.16	68.23
5	1∶5	60	1	1.066	1.146	2.73	44.41
6	1∶15	60	1	1.405	1.673	3.74	61.60
7	1∶5	60	3	1.534	1.587	13.81	77.11
8	1∶15	60	3	1.485	1.560	11.34	72.14
9	1∶10	30	1	1.347	1.371	1.23	51.54
10	1∶10	90	1	1.194	1.208	7.64	55.02
11	1∶10	30	3	2.118	2.256	4.88	87.06
12	1∶10	90	3	1.402	1.510	10.32	68.20
13	1∶10	60	2	1.740	1.760	8.64	76.58
14	1∶10	60	2	1.902	1.993	10.37	86.28
15	1∶10	60	2	1.762	1.910	11.69	84.08
16	1∶10	60	2	1.563	1.561	11.25	73.50
17	1∶10	60	2	1.787	1.973	10.11	83.37

通过 Design-Expert 13.0 软件获得二次回归方程等高线与响应面图，结果见图 3。根据图 3 及数据处理结果确定优选提取工艺条件为料液比为 1∶9、提取时间为 42 min、提取次数为 3 次。

表 3　回归模型的方差分析结果

Tab 3　Variance analysis of regression model

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	2438.17	9.000	270.91	14.16	0.001
A	39.36	1.000	39.36	2.06	0.1946
B	70.71	1.000	70.71	3.7	0.096
C	1056.53	1.000	1056.53	55.21	0.0001
AB	86.91	1.000	86.91	4.54	0.0706
AC	122.88	1.000	122.88	6.42	0.039
BC	124.82	1.000	124.82	6.52	0.0379
A^2	345.41	1.000	345.41	18.05	0.0038
B^2	231.74	1.000	231.74	12.11	0.0103
C^2	262.09	1.000	262.09	13.7	0.0076
残差	133.95	7.000	19.14		
失拟项	15.43	3.000	5.14	0.1736	0.909
纯误差	118.52	4.000	29.63		
综合	2572.12	16.000			

2.4　BP 神经网络优化工艺

2.4.1　BP 神经网络模型建立　BP 神经网络是一种层状的网络结构，分为输入层、隐藏层和输出层。输入层信号依次传过各隐藏层，然后传到输出层，每一层的输出只影响下一层的输出 [10]。该研究 BP 神经网络的输入层共 3 个节点，分别为料液比、提取时间和提取次数，输出层共 1 个节点即综合评分。其原理见图 4。

2.4.2　BP 神经网络训练及结果 [11]　运用 Matlab 软件 R2016a 进行编程，构建 1 个 3-3-1 的神经网络模型并对试验结果进行训练预测。选择响应面试验中的 17 组数据作为训练数据和验证数据。设置 1 个隐藏层，隐藏层节点个数可根据 kolmogrov 定理确定，即 $n_2=\sqrt{n_1+m+1}+a$，其中 n_2 是隐藏层节点个数，n_1 是输入层节点个数，m 是输出层节点个数，$a=1\sim10$。本研究隐藏层节点个数是介于

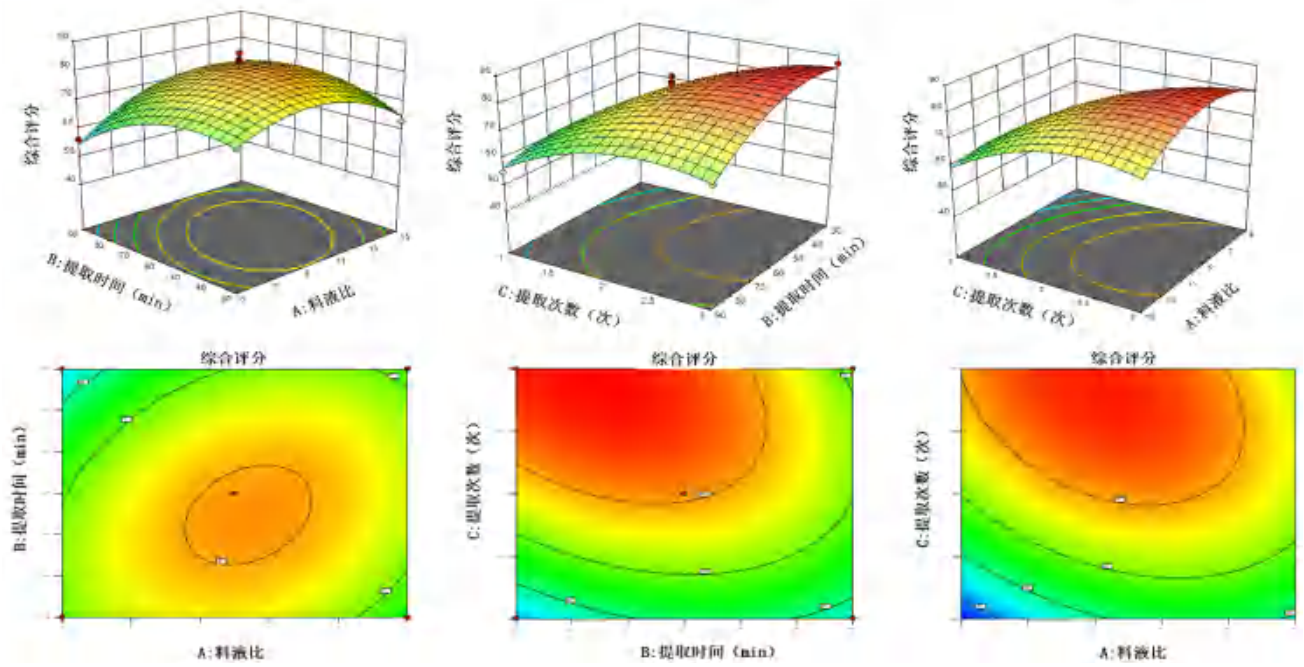


图 3　各因素间相互作用的响应面图及等高线图

Fig 3　Response surface and contour plots of the interactions between factors

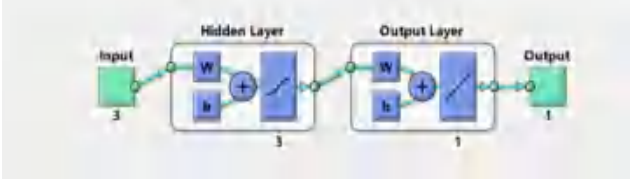


图 4　BP 神经网络结构示意图

Fig 4　BP neural network structure

3.24 ～ 12.24 的整数。通过测试不同节点个数的网络，发现隐藏层节点个数为 3 个时，网络训练精度足够高。设定网络训练最大迭代次数为 1000，学习率为 0.01，训练误差阈值为 0.000 001。BP 神经网络训练过程与结果见图 5。

均方误差（MSE）越小，说明神经网络模型描述实验数据的精确度越高 [12]。由图 5A 可知，随着模型训练步数的增大，MSE 不断减小，逐渐趋近于最优值；第 7 步时，BP 达最优验证性能，其 MSE ＝ 0.000 49（＜ 0.01），表明 BP 的训练收敛速度较快且非常稳定，建立的模型可以用于后续的试验分析。

BP 训练出的模型，其拟合回归系数 *R* 值表示目标值和输出值之间的相关程度，为进一步评估训练模型的性能，绘制了训练、验证、测试以及预测

集的散点图。由图 5 可知，拟合曲线在 $Y = X$ 附近散射，说明试验值和预测值之间兼容性较好 [13]。结果表明，训练回归曲线相关系数 $r = 0.9883$，验证回归曲线相关系数 $r = 0.9930$，测试回归曲线相关系数 $r = 0.9980$，总回归曲线相关系数 $r = 0.9492$。一般当 MSE 的值越小，r 值越接近于 1，说明拟合程度越好。由图 5B 可知，在该模型中试验总的预测值与真实值误差较小，表明模型稳定可靠，仿真能力较强，能很好地描述雪莲药渣水提工艺参数与综合评分之间的非线性映射关系 [14]。

2.4.3　BP 神经网络仿真模拟预测 [15]　固定任意 2 个因素的水平值，以适宜的梯度改变剩余因素的水平值，响应面试验中提取时间为 30 ～ 90 min，每间隔 10 min 设一个水平，共 7 个水平；料液比为 1∶5 ～ 1∶15，每间隔 1 倍料液比，共 11 个水平；提取次数 1 ～ 3 次，设为 3 个水平；新增的因素水平任意组合可得到 231 种不同的组合，采用上述完成训练的神经网络进行仿真模拟预测，寻找最佳工艺参数。BP 优化的雪莲药渣提取工艺为：提取料液比 1∶6、提取时间 30 min、提取次数 3 次。预测综合评分为 88.99。

2.5　提取工艺验证试验

平行取 6 份雪莲药渣，分别按响应面试验、BP 优化的提取工艺进行 3 次验证，结果见表 4。BP 模型优化工艺的综合评分高于响应面优化工艺的综合评分（$P < 0.05$），而且工艺稳定、重复性良好。最终确定的工艺为：提取料液比 1∶6、提取时间 30 min、提取次数 3 次。

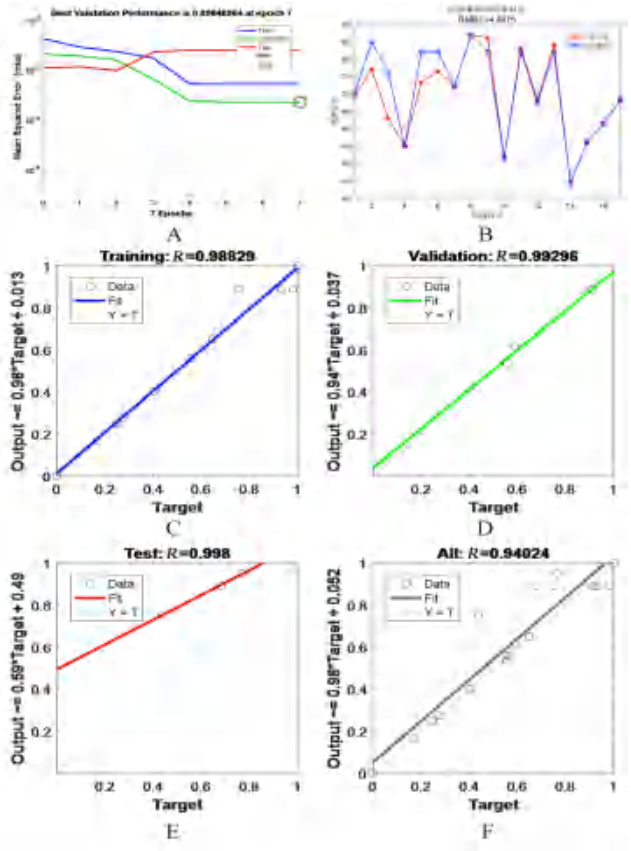


图 5　BP 神经网络训练过程与结果

Fig 5　BP neural network training process and results

A. 均方误差图（mean square error）；B. BP 神经网络可靠性验证试验（BP neural network reliability validation test）；C. 训练回归曲线（training-regression curve）；D. 验证回归曲线（validation-regression curve）；E. 测试回归曲线（test-regression curve）；F. 总回归曲线（total-regression curve）

表 4　提取工艺验证试验结果 ($n = 3$)

Tab 4　Extraction validation tests ($n = 3$)

组别	绿原酸含量 /（mg • g^{-1}）	芦丁含量 /（mg • g^{-1}）	多糖含量 /（mg • g^{-1}）	综合评分 / 分	平均值 / 分	*RSD*/%
响应面优化组	1.033	1.056	108.530	87.84	87.05	1.6
	1.074	0.904	116.698	85.48		
	0.987	1.128	103.695	87.83		
BP 优化组	1.065	0.928	148.577	90.21	90.72	1.7
	1.047	1.144	95.204	89.47		
	1.062	1.215	96.113	92.47		

3　讨论

雪莲醇提后药渣可能存在黄酮类、苯丙素类和多糖等抗炎活性成分 [16-20]。2020 年版《中国药典》采用 HPLC 法测定天山雪莲中芦丁和绿原酸含量作为质量控制依据，而多糖为天山雪莲药渣中主要的水溶性成分且含量较高。本课题后期的开发研究是围绕新疆贵重药材——天山雪莲药渣的抗炎活性成分进行的，因此主要选择具有抗炎活性的成分（绿原酸、芦丁、多糖）的提取率作为工艺优选指标。

本文采用高效液相色谱法测定提取液中芦丁和绿原酸的含量，为了兼顾两种化学分的色谱行为，本文在预试验中比较了乙腈 -0.4% 磷酸水溶液、乙腈 - 水、甲醇 - 水、甲醇 -0.4% 磷酸水溶液等不同流动相的等度洗脱及不同比例梯度洗脱效果，结果表明，以乙腈 -0.4% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时，雪莲水提液中芦丁和绿原酸色谱峰的出峰时间适宜、分离效果良好且基线平稳。

本文采用苯酚 - 硫酸法测定提取液中多糖含量，预试验结果表明显色反应的显色时间、显色

温度、浓硫酸和苯酚用量的变化均影响测定结果。由于显色反应时所用浓硫酸和苯酚用量与多糖的组成成分有关，过量浓硫酸可造成显色物质分解[21]，为此本文对测定雪莲多糖的苯酚 - 硫酸法操作条件进行了优化，并最终确定“2.1.3”中相关操作。

影响中药提取效果的各因素、水平具有多维度、非线性的特点。BP 神经网络具有较强的自主学习和适应能力，擅长处理多变量、非线性的复杂数据。在不增加试验次数的前提下，BP 神经网络算法可对复杂的试验数据进行拟合与预测，在一定的范围内进行全局寻优，以弥补响应面试验中的不足。

由试验结果可知单因素试验结果与响应面法及 BP 神经网络优化结果并不一致，这是因为本文进行单因素试验的目的主要是获得各因素可能影响综合评分的水平范围，且单因素试验设计无法考察因素间可能存在的交互作用。而响应面法数据处理表明料液比（A）与提取时间（B）以及提取时间（B）和提取次数（C）的交互作用可能是有意义的。响应面法及 BP 神经网络优化结果也并不完全一致，主要表现在 BP 神经网络所确定的料液比、提取时间更为经济，但两者均确定提取次数为 3 次，提示三因素中仅有提取次数是具有统计学影响的因素（统计分析结果见表 4）。同时也提示三因素及其可能的交互作用与综合评分之间的关系可能是非线性的，此时采用 BP 神经网络进行数据处理更为合适。本文研究结果提示在对多因素试验设计的结果进行数据处理时可以尝试采用多种数据处理方法，以期获得更为全面的分析结果。

本研究主要根据再次开发目标要求，围绕雪莲药渣中已知抗炎活性成分进行研究。但雪莲药材成分复杂，功效多样，在后续研究中会对药渣中其他未知成分进行系统的化学成分分析，为拓宽研究方向奠定基础。

参考文献

[1] 李君山，蔡少青 . 雪莲花类药材的化学和药理研究进展 [J]. 中国药学杂志，1998，33（8）：449-452.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：5.

[3] Han XL，Su D，Xian XY，et al. Inhibitory effects of *Saussurea involucrata*（Kar. et Kir. ）Sch. -Bip on adjuvant arthritis in rats [J]. J Ethnopharmacol，2016，194：228-235.

[4] 杨璐铭，陈虎彪，郭乔如，等 . 雪莲的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药学学报，2020，55（7）：1466-1477.

[5] 薛宏坤，刘成海，刘钗，等 . 响应面法和遗传算法 - 神经网络模型优化微波萃取蓝莓中花青素工艺 [J]. 食品科学，2018，39（16）：280-288.

[6] 庄思远，周旭，李彦杰，等 . 猪苓中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选分离及质谱分析 [J]. 现代食品科技，2023，39（11）：58-67.

[7] 吴双凤，张薇，徐科一，等 . Box-Behnken 响应面法和反向传播神经网络优化丹参酮类提取物的渗漉工艺 [J]. 中国药师，2022，25（11）：1939-1944.

[8] 夏提古丽·塔西买买提，赵媛，刘艺，等 . 熵权法 - 层次分析法结合 Box-Behnken 响应面法优化雪莲益肾方的提取工艺 [J]. 中国药房，2023，34（15）：1858-1862.

[9] 吴振起，杨雯惠，张天宇，等 . BP 神经网络结合 AHP 综合评分法优选甘露消毒汤提取工艺 [J]. 时珍国医国药，2022，33（11）：2662-2665.

[10] 王宝才，李国铎，徐志伟 . BP-ANN 结合正交试验设计优化大黄总蒽醌醇提工艺 [J]. 中国药师，2022，25（5）：893-897.

[11] 富宇，李倩，刘澎 . 改进的 BP 神经网络算法的研究与应用 [J]. 计算机与数字工程，2019，47（5）：1037-1041.

[12] 未志胜，詹萍，田洪磊，等 . 基于 GA-BP 神经网络的鹰嘴豆美拉德肽的定向制备 [J]. 中国食品学报，2019，19（9）：147-153.

[13] 彭腾腾，范彬，尹盼盼，等 . 遗传算法结合反向传播神经网络优化牡丹花粉硬糖制备工艺 [J]. 中国食品添加剂，2023，34（6）：235-244.

[14] Jia WK，Zhao DA，Ding L. An optimized RBF neural network algorithm based on partial least squares and genetic algorithm for classification of small sample [J]. Appl Soft Comput，2016，48：373-384.

[15] 王娣，陈娟，鲁文静，等 . 正交试验联合反向传播人工神经网络优选熄风止动颗粒提取工艺 [J]. 儿科药学杂志，2022，28（1）：27-30.

[16] Pan S，Zhu ZG. A new flavonol from saussurea involucrate with anti-inflammatory activity [J]. Nat Prod Commun，2021，16（5）：35-60.

[17] Liu G，Kamilijiang M，Abuduwaili A，et al. Isolation，structure elucidation，and biological activity of polysaccharides from *Saussurea involucrata* [J]. Int J Biol Macromol，2022，222（PA）：154-166.

[18] Shan LY，Li W，Brian C，et al. Total flavonoids from *Saussurea involucrata* attenuate inflammation in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages via modulating p65，c-Jun，and IRF3 signaling pathways [J]. Asian Pac J Trop Biomed，2021，11（6）：273-284.

[19] 翟科峰，段红，邢建国，等 . 天山雪莲提取物纯化前后各部位抗炎镇痛作用 [J]. 中国医院药学杂志，2010，30（5）：374-377.

[20] 刘光荣，敢小双，太美灵，等 . 天山雪莲多糖外用对特应性皮炎小鼠的改善作用研究 [J]. 日用化学工业，2022，52（7）：704-709.

[21] 王彦平，娄芳慧，陈月英，等 . 苯酚 - 硫酸法测定紫山药多糖含量的条件优化 [J]. 食品研究与开发，2021，42（4）：170-174.

（收稿日期：2023-12-11；修回日期：2024-01-20）

基于 UPLC-QQQ-MS 技术的仙灵脾颗粒体内药代动力学研究

王月鑫[1]，王帅[1, 2, 3]，杨欣欣[1, 2, 3]，李天娇[1, 2, 3]，赵琳[1*]，包永睿[1, 2, 3*]，孟宪生[1, 2, 3]（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116600；2. 辽宁省中药多维分析专业技术创新中心，辽宁 大连 116600；3. 辽宁省现代中药研究工程实验室，辽宁 大连 116600）

摘要：目的 研究仙灵脾颗粒中主要成分在大鼠血浆内的药代动力学及整合药代动力学行为，以探讨其长期临床用药时间间隔的合理性。**方法** 取 12 只雄性 SD 大鼠，随机分组后给予给药组大鼠仙灵脾颗粒 8.1 g/（kg • d），连续给药 7 d 后，于给药前及给药后 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12 h 大鼠眼眶后静脉丛取血 0.5 mL，通过 UPLC-QQQ-MS 技术测定大鼠血浆内不同时间点淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷Ⅱ、淫羊藿次苷Ⅰ及宝藿苷Ⅰ的血药浓度，并分别赋予 8 个成分抗骨质疏松药效权重系数进行整合，采用 DAS 3.2.8 软件计算血浆药代动力学参数并得到血药浓度 - 时间曲线。**结果** 大鼠连续多次给药后，8 种成分在血浆内的药代动力学参数：t_{max} 均为 0.5 h，C_{max} 为 1.36 ～ 48.76 ng • mL^{-1}，$t_{1/2}$ 为 8.50 ～ 81.40 h，$AUC_{0\sim t}$ 为 14.52 ～ 138.19 ng • mL^{-1} • h，$MRT_{0\sim t}$ 为 3.27 ～ 5.96 h；扣除 0 h 时间点血药浓度后所有成分在血浆内的药代动力学参数：t_{max} 均为 0.5 h，C_{max} 为 0.18 ～ 40.37 ng • mL^{-1}，$t_{1/2}$ 为 1.00 ～ 3.00 h，$AUC_{0\sim t}$ 为 0.40 ～ 37.49 ng • mL^{-1} • h，$MRT_{0\sim t}$ 为 1.51 ～ 4.41 h；8 种成分赋予抗骨质疏松药效权重后，整合药代动力学参数：t_{max} = 0.5 h、$t_{1/2}$ =（1.92±0.42）h。**结论** 通过对仙灵脾颗粒血浆内药代动力学进行研究，阐明了其临床给药时间间隔的合理性，同时为仙灵脾颗粒抗骨质疏松药效物质基础研究提供依据及参考。

关键词：仙灵脾颗粒；黄酮类；UPLC-QQQ-MS；药物代谢规律；整合药代动力学
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0930-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.016

In vivo pharmacokinetics of Xianlingpi granules based on UPLC-QQQ-MS

WANG Yue-xin[1], WANG Shuai[1, 2, 3], YANG Xin-xin[1, 2, 3], LI Tian-jiao[1, 2, 3], ZHAO Lin[1*], BAO Yong-rui[1, 2, 3*], MENG Xian-sheng[1, 2, 3] (1. *College of Pharmacy*, *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116600; 2. *Liaoning Technical Innovation Center for Multi-Dimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116600; 3. *Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory*, *Dalian Liaoning* 116600)

Abstract: Objective To determine the pharmacokinetics and integrative pharmacokinetic behaviours of the main components of Xianlingpi granules in rat plasma, and the rational of the time interval for long-term clinical dosing of Xianlingpi granules. **Methods** Totally 12 male SD rats were divided into two groups randomly (a treatment group and a blank group), and the rats in the treatment group were given Xianlingpi granules at 8.1 g/ (kg • d). After 7 days of continuous intragastric administration, 0.5 mL blood was collected from the retor-orbital venous plexus of the rats before the dose and at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 12 h after the administration. The concentration of epimedoside A, epimedin A, epimedin

基金项目：辽宁省科技厅揭榜挂帅项目（No.2021JH1/10400058）。
作者简介：王月鑫，女，在读硕士研究生，主要从事药物分析与药物制剂研究，email：1440419776@qq.com *通信作者：赵琳，男，副教授，主要从事中药制剂及质量控制研究，email：zhao3lin@126.com；包永睿，男，博士，正高级实验师，主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究，email：byr1026@163.com

B, epimedin C, icariin, baohuoside Ⅱ, icariside Ⅰ, and baohuoside Ⅰ in the rat plasma at different time points were determined with UPLC-QQQ-MS, and intergrated weight coefficients were assigned for the anti-osteoporosis efficacy of 8 components respectively. DAS 3.2.8 software was used to calculate the pharmacokinetic parameters of the plasma and obtain the plasma concentration-time profiles. **Results** After multiple consecutive administrations in the rats, the intraplasma pharmacokinetic parameters of the 8 components showed t_{max} of 0.5 h, C_{max} of 1.36 ～ 48.76 ng • mL^{-1}, $t_{1/2}$ of 8.50 ～ 81.40 h, an $AUC_{0\sim t}$ of 14.52 ～ 138.19 ng • mL^{-1} • h, and $MRT_{0\sim t}$ of 3.27 ～ 5.96 h. After deducting the concentration of plasma components at the time point of 0 h, the t_{max} of all components in the plasma was 0.5 h, C_{max} was 0.18 ～ 40.37 ng • mL^{-1}, $t_{1/2}$ was 1.00 ～ 3.00 h, $AUC_{0\sim t}$ was 0.40 ～ 37.49 ng • mL^{-1} • h and $MRT_{0\sim t}$ was 1.51 ～ 4.41 h. After assigning weight coefficients to the anti-osteoporosis efficacy of the 8 components, the pharmacokinetic parameters for component integration such as t_{max} was 0.5 h, and $t_{1/2}$ was (1.92±0.42) h. **Conclusion** By studying the pharmacokinetic in plasma, the rationality of the clinical administration time interval of Xianlingpi granules is elucidated, providing reference for the material basis for the anti-osteoporosis efficacy of Xianlingpi granules.

Key words: Xianlingpi granule; flavonoid; UPLC-QQQ-MS/MS; pharmacokinetics; component integrated pharmacokinetics

仙灵脾颗粒是淫羊藿水提物及其辅料经制剂加工制得的中成药，收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》第十册，临床用于治疗阳痿遗精、筋骨痿软、胸闷头晕等疾病，是常用的温肾助阳药物。仙灵脾颗粒以黄酮类成分为主，含有大量淫羊藿苷等成分，具有提高免疫功能、抗骨质疏松、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖、抗抑郁等多种作用[1-4]。目前有关仙灵脾颗粒的相关报道多集中于其质量控制及制备工艺优化等方面，其体内药代动力学研究尚未见报道，且仙灵脾颗粒在疾病治疗过程中，通常需要服用 2 ～ 6 个月才能达到治疗目的，对于需要长期服用仙灵脾颗粒的患者而言，药物在体内的药代动力学行为尤为重要[5-8]。因此本研究通过连续多次给药，采用血药浓度法、液质联用（UPLC-QQQ-MS）法测定仙灵脾颗粒中淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷Ⅱ、淫羊藿次苷Ⅰ、宝藿苷Ⅰ在大鼠体内含量，利用 DAS 3.2.8 软件考察各成分的药代动力学特征。本研究通过建立整合药代动力学模型，对大鼠血浆内 8 种成分赋予抗骨质疏松药效权重系数并进行整合分析，阐述仙灵脾颗粒临床长期服用时间间隔的合理性，以期为其临床合理应用及药效研究奠定基础。

1　材料

1.1　试药

仙灵脾颗粒（批号：210401，规格：10 g/ 袋，丹东药业集团有限公司）；淫羊藿苷、淫羊藿属苷 A、宝藿苷Ⅰ、宝藿苷Ⅱ、淫羊藿次苷Ⅰ、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、甲氨蝶呤（批号：wkq21042608、wkq21091610、wkq21071508、wkq21081105、wkq21071908、wkq21060111、wkq21071613、wkq21031304、wkq19031902，四川省维克奇生物科技有限公司，纯度均≥ 98%）；乙腈（质谱级，德国默克集团）；甲酸（质谱级，赛默飞世尔公司）。

1.2　仪器

Agilent 6495 三重四极杆质谱仪、Agilent 1290 型超高效液相色谱仪系统（美国 Agilent 公司）；Sartorius CP225D 电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；22331 Hamburg 高速低温离心机（Eppendorf 公司）。

1.3　动物

雄性 SD 大鼠 12 只，体重（200±20）g [辽宁长生生物技术股份有限公司，许可证号 SCXK（辽）2020-0001]，实验前适应性饲养 1 周，大鼠给药前禁食 12 h，自由饮水。

2　方法与结果

2.1　分析条件

2.1.1　色谱条件　Agilent Poroshell 120 SB-C18（4.6 mm×100 mm，2.7 μm）色谱柱；流动相 0.1% 甲酸水（A）- 乙腈（B）；梯度洗脱（0 ～ 10 min，0% ～ 25%B；10 ～ 28 min，25% ～ 55%B；28 ～ 38 min，55% ～ 100%B）；流速 0.4 mL • min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 5 μL。

2.1.2　质谱条件　电喷雾离子源（ESI）；正、负

离子模式下进行多反应监测（MRM）；干燥气体流速 11 L·min^{-1}；干燥气体温度 150 ℃；毛细管电压 3500 V；雾化器压力 25 psig；鞘气温度 350 ℃；碰撞电压 380 V；鞘气流速 12 L·min^{-1}。每个分析物碰撞能量见表 1。

表 1　9 个成分质谱参数

Tab 1　Mass spectrometry parameters for 9 components

成分	保留时间 /min	检测模式	母离子	碎片离子	碰撞能量 /eV
甲氨蝶呤（内标）	9.43	－	453.2	324.0	25
淫羊藿属苷 A	15.07	－	661.2	351.1	50
朝藿定 A	17.01	＋	839.3	675.1	50
朝藿定 B	17.34	＋	809.3	645.3	45
朝藿定 C	17.59	＋	823.3	659.3	50
淫羊藿苷	18.29	－	721.2	367.0	30
宝藿苷Ⅱ	23.25	－	499.2	352.9	25
淫羊藿次苷Ⅰ	25.66	－	575.2	366.9	35
宝藿苷Ⅰ	27.57	－	513.2	366.0	30

2.2　溶液制备

2.2.1　对照品溶液配制　精密称取淫羊藿苷、淫羊藿属苷 A、宝藿苷Ⅰ、宝藿苷Ⅱ、淫羊藿次苷Ⅰ、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 对照品适量，用甲醇配制并稀释成含有淫羊藿苷、淫羊藿属苷 A、宝藿苷Ⅰ、宝藿苷Ⅱ、淫羊藿次苷Ⅰ、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 1.243、0.590、0.468、0.658、0.443、0.600、1.080、0.468 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，经逐级定量稀释后得到对照品梯度溶液。

2.2.2　内标溶液的配制　精密称取内标甲氨蝶呤适量，加甲醇溶解并稀释成质量浓度为 1.0 μg·mL^{-1} 的内标溶液。

2.3　给药与样品采集

将 SD 大鼠随机分为给药组和空白组，每组 6 只，给药组大鼠灌胃仙灵脾颗粒 8.1 g/（kg·d），空白组给予相同体积的生理盐水，每日两次，连续给药 7 d，取材前 12 h 禁食不禁水。给药组大鼠于给药前及给药后 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12 h 眼眶后静脉丛取血约 0.5 mL 于肝素钠的 EP 管中，空白组一次性眼眶后静脉丛取血，摇匀后静置 30 min，5000 r·min^{-1} 离心 10 min，取血浆于－ 80 ℃保存。

2.4　血浆样品的预处理

吸取血浆样品 200 μL 置于 1.5 mL 的 EP 管中，依次加入 100 μL 内标溶液、500 μL 甲醇沉淀蛋白，涡旋混合 2 min，样品溶液在 4 ℃、12 000 r·min^{-1} 下离心 10 min。上清液在 30 ℃下用氮气吹干，残留物用 50 μL 甲醇复溶，涡旋 2 min，12 000 r·min^{-1} 下 4 ℃离心 10 min，取上清液 30 μL 分析。

2.5　方法学验证

2.5.1　专属性考察　取大鼠空白血浆、加入混合对照品及内标物的空白血浆、大鼠给药 1 h 后的血浆样品，按“2.4”项下方法处理并进行分析，比较 3 组样品的色谱图，结果见图 1，各成分峰形、分离度良好，表明血浆中内源性物质对样品含量测定无明显干扰。

2.5.2　线性关系和定量限　取大鼠空白血浆，加入混合对照品 20 μL，分别配制系列标准血浆样品，按“2.4”项下方法处理并进行分析，测定并记录色谱图，以待测物与相应内标的色谱峰面积比为纵坐标（Y），各分析物质量浓度为横坐标（X）进行线性回归。取空白血浆按“2.4”项下血浆样品处理方法操作，制备低浓度血浆样品，以色谱峰信噪比 $S/N > 10$ 时的浓度作为各个待测成分的定量限，结果见表 2。

2.5.3　准确度与精密度　取大鼠空白血浆配制淫羊藿属苷 A（28.8、3.6、0.9 ng·mL^{-1}）、朝藿定 A（28.8、3.6、0.9 ng·mL^{-1}）、朝藿定 B（108.8、13.6、3.4 ng·mL^{-1}）、朝藿定 C（6.4、0.8、0.2 ng·mL^{-1}）、淫羊藿苷（249.6、31.2、7.8 ng·mL^{-1}）、宝藿苷Ⅱ（9.6、1.2、0.3 ng·mL^{-1}）、淫羊藿次苷Ⅰ（6.4、0.8、0.2 ng·mL^{-1}）和宝藿苷Ⅰ（22.4、2.8、0.7 ng·mL^{-1}）高、中、低 3 个浓度的质量控制（QC）样品，按“2.4”项下方法操作，每个样品平行处理 6 份，连续测定 3 d，计算准确度与精密度和质控样品的日内、日间准确度在 89.82% ～ 108.80%，日内、日间精密度 *RSD* 在 1.64% ～ 11.53%，符合生物样品测定要求。

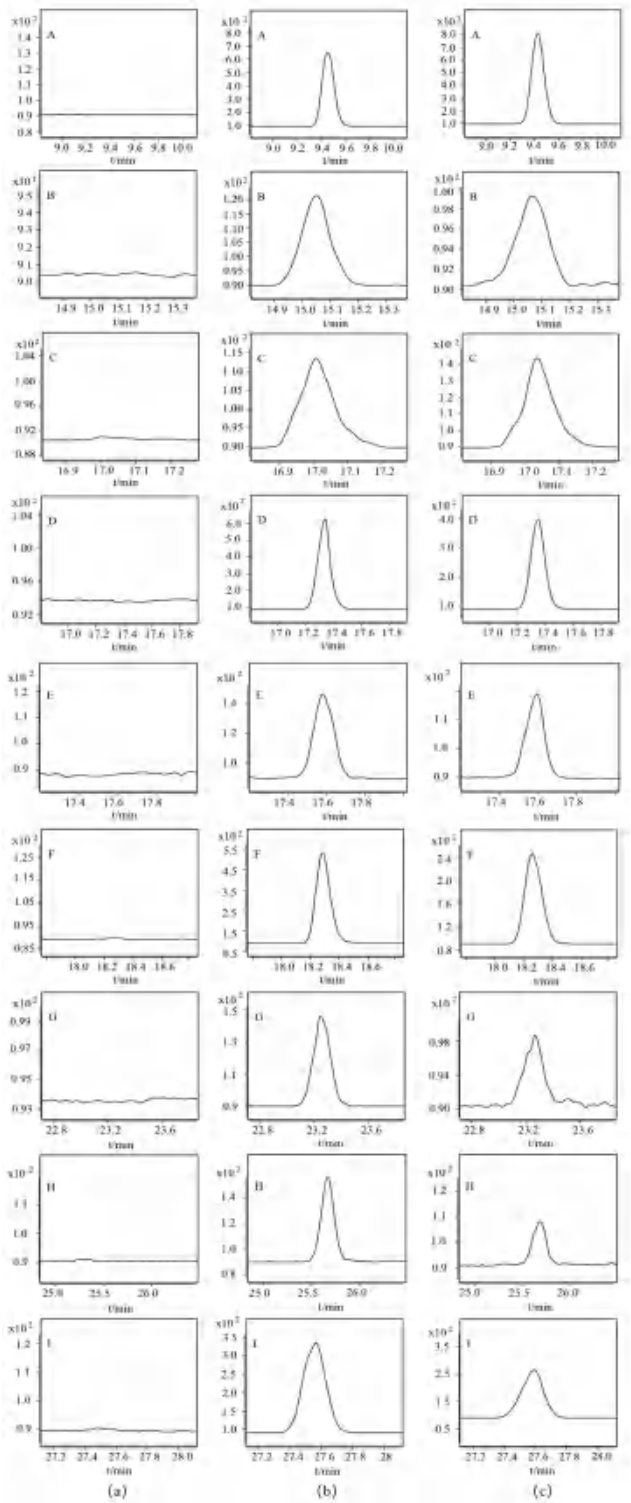


图 1　大鼠血浆中 8 种成分及内标的多反应监测图

Fig 1　MRM of 8 components and IS in the rat plasma

a. 空白血浆（blank plasma sample）；b. 空白血浆加对照品和内标（blank plasma spiked with reference materials and IS separately）；c. 给药 1 h 后血浆（plasma sample 1 h after the oral administration of Xianlingpi granules）；A. 甲氨蝶呤（methotrexate）；B. 淫羊藿属苷 A（epimedoside A）；C. 朝藿定 A（epimedin A）；D. 朝藿定 B（epimedin B）；E. 朝藿定 C（epimedin C）；F. 淫羊藿苷（icariin）；G. 宝藿苷Ⅱ（baohuoside Ⅱ）；H. 淫羊藿次苷Ⅰ（H icariside Ⅰ）；I. 宝藿苷Ⅰ（baohuoside Ⅰ）

2.5.4　提取回收率与基质效应　分别配制高、中、低 3 个质量浓度的 QC 样品，按“2.4”项下方法操作，测得待测物峰面积与内标峰面积之比为 A_1；取空白血浆进行沉蛋白处理后，吸取上清液并分别加入对照品及内标溶液，使所含对照品质量浓度与 QC 一致，得峰面积比 A_2；取上述相应质量浓度的混合对照品溶液，同上述方法处理分析，得峰面积比 A_3，且每个浓度样品平行处理 6 份。A_1 与 A_2 的比值为提取回收率，A_2 与 A_3 的比值为基质效应。结果显示大鼠血浆内淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷Ⅱ、淫羊藿次苷Ⅰ和宝藿苷Ⅰ提取回收率在 85.04% ～ 95.62%，*RSD* 均在 15% 以下，说明该提取方法符合要求；基质效应在 92.42% ～ 102.91%，*RSD* 均在 15% 以下，表明无明显血浆基质效应，符合生物样品测定要求。

2.5.5　稳定性　配制高、中、低 3 个质量浓度的 QC 样品，每个浓度样品平行处理 6 份，分别考察室温放置 4 h、4 ℃下放置 24 h、－ 80 ℃下反复冻融 3 次及冷冻放置 2 周的稳定性。结果表明血浆在上述条件下的 *RSD* 均小于 15%，表明该方法稳定性良好，符合生物样品测定要求。

2.5.6　药代动力学研究　大鼠体内药代动力学研究给药、取血方案和血浆样品处理方法如“2.3”及“2.4”项下所述，血浆样品按“2.1”项下方法处理，计算不同时间点血药浓度，扣除 0 h 血药浓度，绘制血药浓度 - 时间曲线图，见图 2。所得数据用 DAS 3.2.8 数据处理软件中的非房室模型分析方法拟合各药代动力学参数，获得血药浓度达峰时间（t_{max}）、达峰浓度（C_{max}）、半衰期（$t_{1/2}$）、药时曲线下面积（*AUC*）及平均滞留时间（*MRT*）等药代动力学参数，见表 3、4。结果显示，仙灵脾颗粒中所测定的 8 种成分吸收较快，在 0.5 h 达到最大血药浓度，各个成分 C_{max} 依次为淫羊藿苷＞朝藿定 A ＞朝藿定 B ＞朝藿定 C ＞淫羊藿属苷 A ＞宝藿苷Ⅰ＞宝藿苷Ⅱ＞淫羊藿次苷Ⅰ。

2.5.7　整合药代动力学研究　经课题组前期研究[9]，将淫羊藿属苷 A（1）、朝藿定 A（2）、朝藿定 B（3）、朝藿定 C（4）、淫羊藿苷（5）、宝藿苷Ⅱ（6）、淫羊藿次苷Ⅰ（7）和宝藿苷Ⅰ（8）成分分别赋予不同的权重系数，通过归一化法将 8 个成分每个时间点下的血药浓度进行归一化处理，分别乘以各自的权重系数后求和，计算得到整合血药浓度，公式如下。

表 2　8 种成分线性关系

Tab 2　Linearity of 8 components

成分	回归方程	r	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	定量限 /（ng • mL^{-1}）
淫羊藿属苷 A	$Y=9.80\times10^{-4}X+3.60\times10^{-4}$	0.9975	0.5 ～ 236.4	0.5
朝藿定 A	$Y=6.90\times10^{-4}X-2.80\times10^{-4}$	0.9947	0.9 ～ 240.5	0.9
朝藿定 B	$Y=8.39\times10^{-3}X-6.00\times10^{-4}$	0.9976	1.4 ～ 431.6	1.4
朝藿定 C	$Y=7.32\times10^{-3}X-3.90\times10^{-3}$	0.9942	0.2 ～ 186.7	0.2
淫羊藿苷	$Y=5.62\times10^{-3}X-0.116$	0.9932	3.9 ～ 497.5	3.9
宝藿苷Ⅱ	$Y=1.63\times10^{-2}X-0.105\times10$	0.9912	0.3 ～ 262.6	0.3
淫羊藿次苷Ⅰ	$Y=9.95\times10^{-2}X-0.485$	0.9930	0.2 ～ 177.5	0.2
宝藿苷Ⅰ	$Y=2.42\times10^{-2}X-0.0776$	0.9971	0.7 ～ 186.6	0.7

表 3　8 种成分药代动力学参数（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab 3　Pharmacokinetic parameters of 8 components（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

成分	t_{max}/h	C_{max}/（ng • mL^{-1}）	$t_{1/2}$/h	$AUC_{0\sim t}$/（ng • h • mL^{-1}）	$MRT_{0\sim t}$/h
淫羊藿属苷 A	0.5	6.59±0.75	8.50±2.21	16.08±3.54	4.34±0.07
朝藿定 A	0.5	34.03±1.26	13.11±3.09	62.79±9.33	4.07±0.05
朝藿定 B	0.5	15.76±1.18	14.80±5.87	32.01±6.23	4.34±0.09
朝藿定 C	0.5	10.44±1.21	35.10±17.59	18.15±1.32	3.27±0.18
淫羊藿苷	0.5	48.76±3.98	28.07±14.69	138.19±45.35	4.81±0.81
宝藿苷Ⅱ	0.5	2.19±1.12	81.40±27.49	20.87±0.95	5.92±0.02
淫羊藿次苷Ⅰ	0.5	1.36±0.44	23.07±18.89	14.52±4.99	5.96±0.01
宝藿苷Ⅰ	0.5	5.32±0.91	19.27±4.69	23.58±0.44	5.22±0.04

表 4　8 种成分扣除 0 h 血药浓度药代动力学参数（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab 4　Pharmacokinetic parameters of 8 components after deducting of 0 h plasma components concentration（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

成分	t_{max}/h	C_{max}/（ng • mL^{-1}）	$t_{1/2}$/h	$AUC_{0\sim t}$/（ng • h • mL^{-1}）	$MRT_{0\sim t}$/h
淫羊藿属苷 A	0.5	5.85±0.11	1.21±0.84	7.27±1.28	2.32±0.15
朝藿定 A	0.5	31.27±0.18	1.06±0.64	29.72±0.98	1.93±0.12
朝藿定 B	0.5	14.09±1.14	1.00±0.27	18.83±0.98	2.11±0.14
朝藿定 C	0.5	9.84±0.16	2.68±1.24	11.00±2.44	1.51±0.15
淫羊藿苷	0.5	40.37±2.56	1.22±0.47	37.49±3.51	2.41±0.17
宝藿苷Ⅱ	0.5	0.54±0.11	1.86±1.19	1.06±0.14	4.41±0.29
淫羊藿次苷Ⅰ	0.5	0.18±0.54	3.00±0.94	0.40±0.06	4.37±0.50
宝藿苷Ⅰ	0.5	3.87±0.11	1.49±0.33	6.13±1.47	3.00±0.20

$C_T=W_1\times C_1+W_2\times C_2+\cdots\cdots+W_n\times C_n$（公式 A）

式中，n 代表本实验检测的 8 个成分；C 为归一化后浓度；$W_{1\sim n}$ 表示上述成分在 8 种成分各自权重系数；C_T 为权重系数校正后仙灵脾颗粒在大鼠体内的综合浓度。

通过对仙灵脾颗粒中 8 个成分血药浓度数据进行整合处理，经 DAS 3.2.8 数据处理软件中的非房室模型分析方法拟合各药代动力学参数，其整合后药代动力学主要参数为：t_{max} 0.5 h、$t_{1/2}$（1.92±0.42）h、$AUC_{0\sim t}$（9.24±0.48）ng•h•mL^{-1}、$MRT_{0\sim t}$（3.06±0.16）h，结果见图 3。

3　讨论

本实验前期考察，鉴别出仙灵脾颗粒中含有淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷Ⅱ、淫羊藿次苷Ⅰ及宝藿苷Ⅰ成分。大鼠多次连续口服仙灵脾颗粒后，采用 UPLC-QQQ-MS 技术对其体内原形入血成分进行检测分析。大鼠血浆内 8 种成分均在 0.5 h 达到血药浓度峰值，具有较快吸收能力，进入血液循环后迅速达峰发挥药效。在研究过程中我们发现淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷Ⅱ及淫羊藿次苷Ⅰ具有明显的双峰现象，且各个成分中 C_{max} 与 $AUC_{0\sim t}$ 值均不大，这可能与口服给药后的肝肠循环或其他循环有关[10-11]，具体原因有待下一步实验验证。

目前药代动力学研究大多以其中的一个或几个化学成分为检测指标，且中药提取物经口服入体内后各种成分之间易发生复杂的相互作用，极易改变主要药效成分在体内药代动力学过程，难以完全反

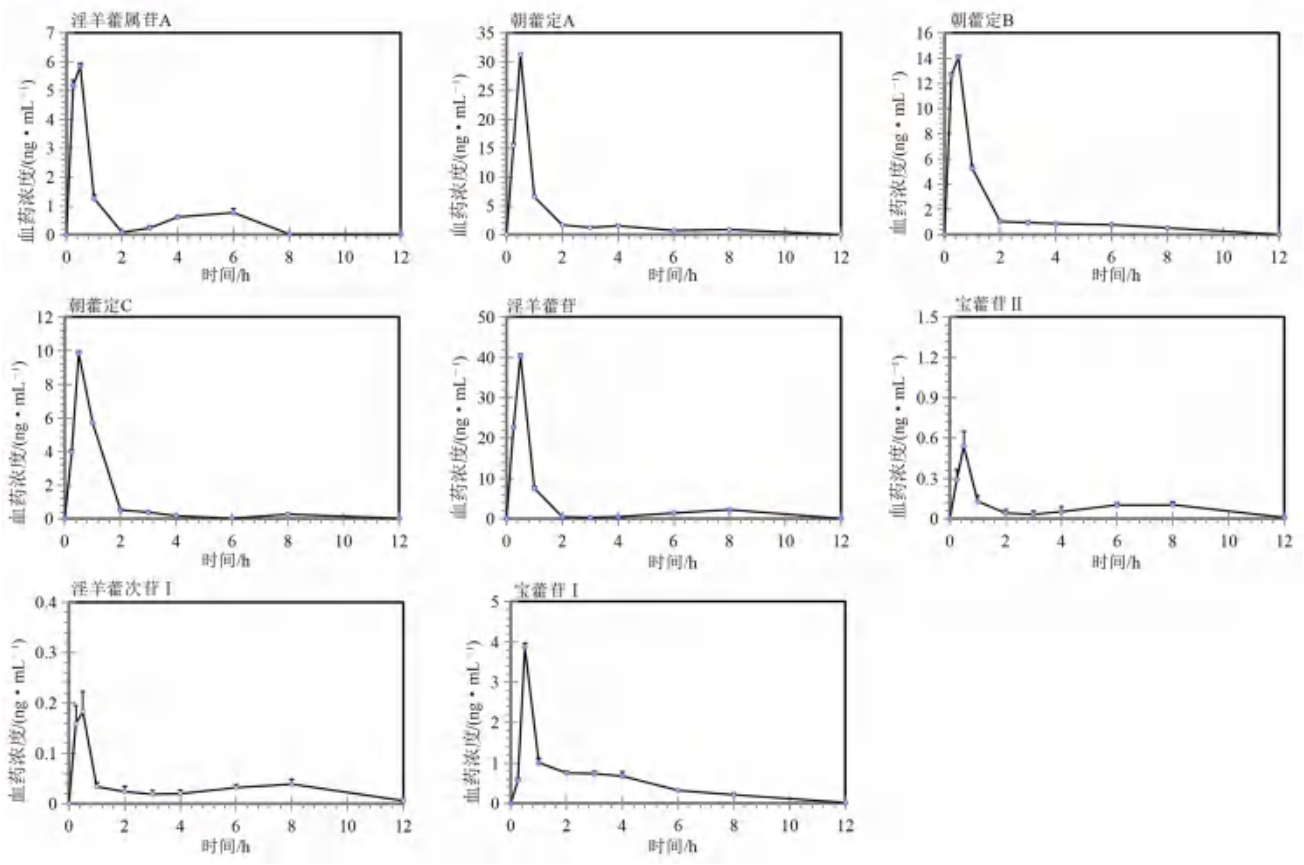


图 2　大鼠灌胃仙灵脾颗粒后 8 种成分的血药浓度 - 时间曲线（n = 6）

Fig 2　Plasma concentration-time profiles of 8 components of Xianlingpi granules after intragastric administration in the rats（n = 6）

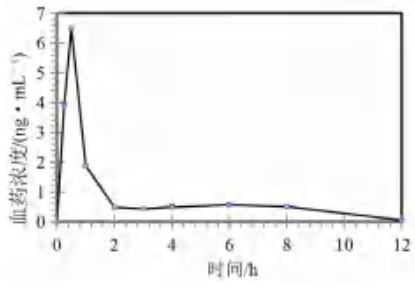


图 3　8 种成分整合血药浓度 - 时间曲线（n = 6）

Fig 3　Integrated plasma concentration-time profiles of the 8 components（n = 6）

映药物整体的药代动力学规律 [12-13]。本实验通过多成分整合药代动力学模型，发现 8 种成分整合血药浓度 - 时间曲线与单个成分血药浓度 - 时间曲线进行比较，发现仙灵脾颗粒中单体成分相互影响，经成分整合可更直观地反映整体药代动力学规律，为仙灵脾颗粒抗骨质疏松药效研究奠定基础。

本实验中所选用的 8 个化学成分与淫羊藿临床治疗的药效有极大的相关性。研究报道 [14] 由淫羊藿属苷 A、宝藿苷Ⅰ及宝藿苷Ⅱ等成分构成的淫羊藿黄酮类提取物，在卵巢骨质疏松大鼠中可以刺激骨形成、抑制骨流失和骨吸收。Xia 等 [15] 证明淫羊藿叶提取物中主要活性成分淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 可调节氧化应激反应、炎症因子水平及细胞凋亡引起的损伤。訾慧等 [16] 发现淫羊藿次苷Ⅰ通过激活 BMP/Runx2/Osx 信号通路相关基因表达，从而促进对大鼠骨髓间充质干细胞的成骨转化。因此，上述指标可以作为评价仙灵脾颗粒复方制剂的药效成分。

本实验在血药浓度数据处理中采用扣除 0 h 时间点血药浓度的方法，将未扣除与扣除 0 h 时间点的数据进行比较，单个成分及整合成分的血药浓度达峰时间一致，均为 t_{max} = 0.5 h，而相对扣除 0 h 时间点成分数据的 $t_{1/2}$、*AUC* 及 *MRT* 均有增大，这与仙灵脾颗粒长期给药后，有效成分在血浆内达到较为稳定的血药浓度有关。扣除 0 h 点的整合药代动力学半衰期为（1.92±0.42）h，若需要维持血浆内成分浓度相对稳定，经 4 ～ 5 个半衰期代谢后可再次服用药物，这与仙灵脾颗粒临床每 8 h 给药一次的时间间隔相同，因此说明仙灵脾颗粒临床给药时间间隔合理。通过对血浆内药代动力学规律进行研究，为仙灵脾颗粒临床长期合理用药及抗骨质疏松药效物质基础研究提供依据及参考，在后续研究工作中仍需对仙灵脾颗粒中活性成分的组织分布规律、主要的蓄积

器官以及蓄积程度进行探索。

参考文献

[1] Li HF，Guan XY，Yang WZ，et al. Antioxidant flavonoids from Epimedium wushanense [J]. Fitoterapia，2012，83（1）：44-48.

[2] Lu Y，Luo QL，Jia XB，et al. Multidisciplinary strategies to enhance therapeutic effects of flavonoids from Epimedii Folium：integration of herbal medicine，enzyme engineering，and nanotechnology [J]. J Pharm Anal，2023，13（3）：239-254.

[3] 欧阳慧子，何俊 . 淫羊藿化学成分分析及其药代动力学研究进展 [J]. 天津中医药大学学报，2019，38（3）：219-227.

[4] 李莉，王嘉瑞，王晶，等 . 淫羊藿的主要化学成分及药理作用研究进展和质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊，2023，41（11）：143-151.

[5] 贾辉，马宏达，胡北，等 . 复方仙灵脾颗粒质量标准研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2014，16（12）：51-53.

[6] 马纪伟，闫冬良 . RE-HPLC 法测定仙灵脾颗粒中淫羊藿苷的含量 [J]. 中国医药指南，2013，11（21）：459-460.

[7] 郭冬，薛佩芸，穆庆丽，等 . 淫羊藿配方颗粒制备工艺优化及一致性评价 [J]. 中国药业，2020，29（11）：38-41.

[8] 王海坤，吴娜，李存明，等 . 口服淫羊藿类中成药治疗绝经后骨质疏松的贝叶斯网状 Meta 分析 [J]. 中草药，2021，43（20）：6309-6322.

[9] 李天娇，于洋，王帅，等 . 仙灵脾颗粒体外抗骨质疏松作用及谱效关系研究 [J]. 时珍国医国药，2023，34（7）：1573-1576.

[10] 陈曦，马越鸣，钟杰 . 药物浓度 - 时间曲线双峰现象研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志，2012，31（8）：432-437.

[11] Wu YP，Meng XS，Bao YR，et al. Pharmacokinetic study of four flavones of Glycyrrhiza in rat plasma using HPLC-MS [J]. J Ethnopharmacol，2013，148（1）：266-270.

[12] 曹璐靖，詹淑玉，姬翔宇，等 . 近五年中药提取物多成分药代动力学研究进展 [J]. 中国中药杂志，2021，46（13）：3270-3287.

[13] 刘聪燕，高霞，陈彦，等 . 淫羊藿总黄酮在骨质疏松大鼠体内的药代动力学行为 [J]. 中成药，2017，39（8）：1595-1600.

[14] Zhao BJ，Wang J，Song J，et al. Beneficial effects of a flavonoid fraction of herba Epimedii on bone metabolism in ovariectomized rats [J]. Planta Med，2016，82（4）：322-329.

[15] Xia J，Hu JN，Wang Z，et al. Based on network pharmacology and molecular docking to explore the protective effect of Epimedii Folium extract on cisplatin-induced intestinal injury in mice [J]. Front Pharmacol，2022，13：1040504.

[16] 訾慧，范颖，蒋宁，等 . 淫羊藿次苷Ⅰ及淫羊藿次苷Ⅱ通过 BMP/Runx2/Osx 信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志，2019，25（5）：690-695.

（收稿日期：2023-11-23；修回日期：2024-02-25）

Box-Behnken 效应面法优化盐酸达克罗宁温敏凝胶的处方工艺

李娇[1，2，3]，潘娇娇[1，2，3]，徐丽芝[1，2，3]，陈卫东[1]，王淑君[4*]，杨瑞[5*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；3. 江苏艾迪纳米生物医药有限公司，江苏　南通　226100；4. 沈阳药科大学，沈阳　110016；5. 辽宁中医药大学附属第二医院，沈阳　110034）

摘要：目的　制备盐酸达克罗宁温敏凝胶（DH-Gel），并对其进行稳定性、体外释放和刺激性考察。**方法**　以胶凝温度为评价指标，采用单因素试验和 Box-Behnken 效应面法优化 DH-Gel 处方；以性状、pH、胶凝温度、药物含量变化为评价指标，考察 DH-Gel 在不同条件下的稳定性；以扩散池法考察凝胶体外释药行为；采用家兔眼刺激性试验考察 DH-Gel 的刺激性。**结果**　最佳处方是盐酸达克罗宁用量为 1%，泊洛沙姆 407 用量为 19.39%，泊洛沙姆 188 用量为 1.96%，羟丙基甲基纤维素用量为 0.30%，苯甲酸钠用量为 0.01%；在高温和低温条件下稳定性良好；凝胶的体外释药遵从 Ritger-Peppas 动力学方程，为 Fick 扩散；DH-Gel 组刺激性程度小于盐酸达克罗宁溶液组。**结论**　制备的 DH-Gel 具有理想的胶凝温度，能使药物更持久有效地黏附在给药部位，具有给药方便等优点。

关键词：盐酸达克罗宁；温敏凝胶；Box-Behnken 效应面法；体外释放

中图分类号：R945　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0936-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.017

作者简介：李娇，女，在读硕士研究生，主要从事药物新剂型研究，email：727125396 @qq.com　*通信作者：王淑君，女，教授，博士研究生导师，主要从事药物新剂型与药代动力学研究，email：1252116911@qq.com；杨瑞，女，硕士研究生导师，主要从事药物新剂型与药代动力学研究，email：yang_rui1983@163.com

Formula optimization of dyclonine hydrochloride thermosensitive gel by Box-Behnken response surface methodology

LI Jiao[1, 2, 3], PAN Jiao-jiao[1, 2, 3], XU Li-zhi[1, 2, 3], CHEN Wei-dong[1], WANG Shu-jun[4*], YANG Rui[5*] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226133; 3. *Jiangsu Aidi Nano-Biomedical Co.*, *Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226100; 4. *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 5. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110034)

Abstract: Objective To prepare dyclonine hydrochloride thermosensitive gel (DH-Gel), and to determine its stability, in vitro release and irritation. **Methods** The gelation temperature was taken as the evaluation index. The formula of DH-Gel was optimized by single factor test and Box-Behnken response surface methodology. The changes in character, pH, gelation temperature and drug content were used as evaluation indexes, and the stability of DH-Gel under different conditions was measured. The drug release behavior of the gel was determined by diffusion pool method. The irritation of DH-Gel was investigated by rabbit eye irritation test. **Results** The best formula of DH-Gel was dyclonine hydrochloride 1%, poloxamer 407 19.39%, poloxamer 188 1.96%, hydroxypropyl methyl cellulose 0.30%, and sodium benzoate 0.01%. The preparation was stable under both high and low temperature. The drug release was in compliance with Ritger-Peppas equation. Dyclonine hydrochloride release from the thermosensitive gel displayed the Fick's diffusion. The irritation degree of the DH-Gel group was lower than that of dyclonine hydrochloride solution group. **Conclusion** DH-Gel prepared in this experiment has an ideal gelation temperature, which can make the drug adhere to the drug site more persistently and effectively, facilitating the administration.

Key words: dyclonine hydrochloride; thermosensitive gel; Box-Behnken response surface methodology; in vitro release

盐酸达克罗宁（dyclonine hydrochloride，DH）化学名为 4- 丁氧基 -3- 哌啶基苯丙酮盐酸盐，是一种强效的局部止痒剂和麻醉剂，可缓解患者皮肤和黏膜的瘙痒和疼痛 [1]。DH 是一种起效快、毒性低、安全性高的局部麻醉剂，其黏膜麻醉效果优于丁卡因和利多卡因，可安全应用于对布比卡因和普鲁卡因过敏的患者 [2]。DH 不宜用于注射麻醉和浸润麻醉，故已上市并广泛应用于临床的制剂较少，仅有几种传统的口含制剂（如膜剂、胶浆剂、口服乳剂等）和外用制剂（如洗剂、乳膏剂等）[3-4]。该药主要以胶浆的形式广泛应用于内窥镜检查和全身麻醉插管，相比于温敏凝胶，胶浆的流动性较高，口服后滞留于腔道的时间较短 [5]。

与传统的溶液、胶浆相比，原位型温敏凝胶结合了液体与半固体制剂的优点，可以液体形式到达咽喉及腔道并原位凝胶化 [6]，有利于其在内窥镜术中腔道的滞留 [5]，从而增强局麻效果。故本研究以泊洛沙姆 407（poloxamer 407，P407）和泊洛沙姆 188（poloxamer 188，P188）为基质制备温度诱导的原位凝胶体系，并加入羟丙基甲基纤维素（hydroxypropyl methyl cellulose，HPMC）以增强温敏凝胶的黏附性 [7]，降低唾液对药物的稀释作用 [8]。本研究在单因素考察的基础上，采用 Box-Behnken 设计 - 效应面法对处方进行优化，应用所建立的分析方法对其进行体外释放研究，为盐酸达克罗宁温敏凝胶（dyclonine hydrochloride thermosensitive gel，DH-Gel）的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

DF-101S 型集热式磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；TDZ4K 型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；ST3100 型 pH 计（奥豪斯仪器常州有限公司）；LC-20AT 型岛津高效液相色谱仪（日本岛津公司）；PX85Z 型分析天平（奥豪斯仪器有限公司，精度：0.01 mg）；SHA-C 型数显水浴恒温振荡器（常州荣华仪器制造有限公司）；Phenom Pharos G2 型场发射扫描电镜（赛默飞世尔科技公司）。

1.2 试药

盐酸达克罗宁原料药（批号：DKLN201201，纯度：99%，南京海润医药有限公司）；盐酸达克罗宁对照品（批号：100423-201102，纯度：99.8%，

中国食品药品检定研究院）；泊洛沙姆 407（批号：GNE03821B）、泊洛沙姆 188（批号：GND17422B）（巴斯夫股份公司）；羧甲基纤维素钠（批号：20210107，国药集团化学试剂有限公司）；羟丙基甲基纤维素（HPMC，批号：C375878）、壳聚糖（批号：C13856485）、黄原胶（批号：C14265304）、海藻酸钠（批号：C13600351）（上海麦克林生化科技有限公司）；液相所用试剂为色谱级，水为纯化水，其余试剂均为分析纯。

1.3　*实验动物*

普通级日本大耳白兔，体重 2 ～ 2.5 kg，由辽宁长生生物技术股份有限公司提供，许可证号：SCXK（辽）2020-0001。

2　方法与结果

2.1　*盐酸达克罗宁含量测定方法的建立* [9]

2.1.1　色谱条件　色谱柱：Phenomenex Luna C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈 - 磷酸二氢钾溶液（0.002 mol • L^{-1}）＝ 40∶60（*V/V*），磷酸调节 pH 至 3.0；检测波长：254 nm；流速：1 mL • min^{-1}；进样量：20 μL。

2.1.2　溶液的配制　① 对照品溶液：取盐酸达克罗宁对照品适量，精密称定，以溶剂（0.001 mol • L^{-1} 磷酸）溶解并定量稀释制成质量浓度为 1 mg • mL^{-1} 的储备液。精密移取储备液适量，加溶剂依次稀释为 50、80、100、120、150 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液。② 供试品溶液：取 DH-Gel 0.25 mL 置 25 mL 量瓶中，以溶剂稀释并定容，摇匀，滤过即得供试品溶液。③ 空白辅料溶液：制备不含盐酸达克罗宁的空白温敏凝胶，取 0.25 mL 置 25 mL 量瓶中，以溶剂稀释并定容，摇匀，滤过即得空白辅料溶液。

2.1.3　专属性　取“2.1.2”项下对照品溶液、供试品溶液、空白辅料溶液按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，结果表明，空白辅料不干扰检测，说明该方法专属性良好（见图 1）。

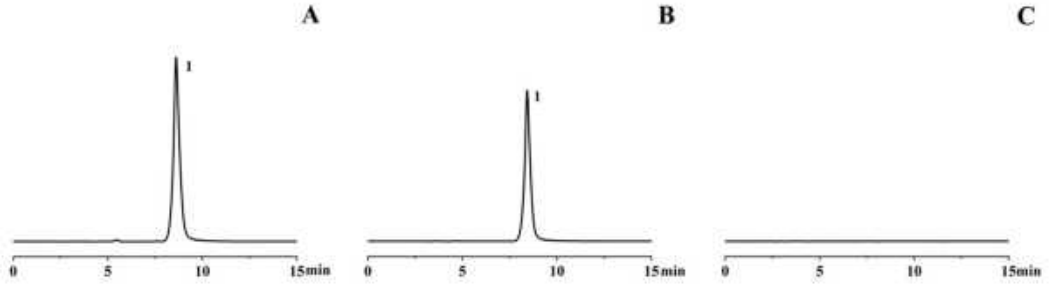


图 1　盐酸达克罗宁温敏凝胶处方工艺的单因素试验结果

Fig 1　Single factor test of formulation and process of dyclonine hydrochloride thermosensitive gel

A. 对照品溶液（reference solution）；B. 供试品溶液（test solution）；C. 空白辅料溶液（blank excipient solution）；1. 盐酸达克罗宁（dyclonine hydrochloride）

2.1.4　线性范围　取“2.1.2”项下系列对照品溶液进样测定，以浓度（*c*）为横坐标，色谱峰面积（*A*）为纵坐标，进行线性回归，得标准曲线方程 $A = 1.900\times10^{4}c - 1.834\times10^{4}$（$r = 0.9999$），盐酸达克罗宁在 50 ～ 150 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.5　精密度　取质量浓度为 100 μg • mL^{-1} 的对照品溶液连续进样 6 次，测得精密度 *RSD* 为 0.060%，表明该仪器精密度良好。

2.1.6　稳定性　取供试品溶液、对照品溶液室温条件下于 0、4、8、12、20、24 h 进样检测。测得 24 h 内供试品溶液稳定性 *RSD* 为 0.43%，对照品溶液稳定性 *RSD* 为 0.30%，表明该方法稳定性良好。

2.1.7　回收试验　分别精密称取盐酸达克罗宁原料药 8.0、10.0、12.0 mg，配制成相当于主药测定浓度的 80%、100%、120% 的样品各 3 份，再精密称定辅料适量（辅料加入量均为 100% 处方比例的空白辅料），即得低、中、高浓度的 3 组样品，每组 3 份。稀释至标准曲线范围内，进样分析，测得 3 组样品低、中、高浓度的回收率分别为 98.00%、100.97%、98.02%，*RSD* 分别为 0.76%、1.2%、1.5%，表明该方法准确度良好。

2.1.8　重复性　按照“2.1.2”项下方法平行配制 6 份供试品溶液进样测定，测得供试品含量平均值为 97.8%，重复性 *RSD* 分别为 0.76%、1.2%、1.5%，表明该方法重复性良好。

2.2　*DH-Gel 制备工艺*

采用冷溶法制备 DH-Gel[10]。精密称取处方量的盐酸达克罗宁置于西林瓶中，加入适量纯化水，超声使药物溶解。精密称取 P407 5.82 g、P188 0.60 g、HPMC 90 mg、苯甲酸钠 3 mg 加入上述西林瓶中，在冰浴条件下于磁力搅拌器上搅拌 30 min，在 4 ℃冰箱中放置 12 h 以上，充分溶胀，即得 DH-Gel。

2.3　*胶凝温度及胶凝时间的测定*

采用倒置法测定胶凝温度（T_g）[11]。将制备好的 DH-Gel 置于西林瓶中，在 25.0 ℃水浴中以 0.5 ～ 1.0 ℃ • min^{-1} 速率升温。每升温 1 ℃即取出西林瓶，倒置观察凝胶 5 s 内是否流动；若流动，继续升温，至液面流动缓慢后每隔 0.5 ℃后恒温 1 min，继续倒置，直至不再流动，若 5 s 内不再流动，此时的温度即为胶凝温度，每个样品重复 3 次。

取 DH-Gel 2 mL，置于西林瓶中，将样品预热至 20 ℃后，置于 60 ℃恒温水浴中并开始计时，待样品从流动的液体变为不可流动的半固体时，停止计时，所得时间即为胶凝时间 [12]。重复测定 3 次。

2.4　*黏附力的测定*

采用位移法测定黏附力 [13]。制备猪黏蛋白（2%）- 琼脂（1%）凝胶均匀涂抹于玻璃板上，4 ～ 8 ℃放置 3 h 后，在室温、相对湿度 75% 的条件下平衡放置 1 h，作为黏膜黏附组织的模型。将温敏凝胶滴在玻璃板的一端，玻璃板呈 90° 放置，记录 3 批温敏凝胶流动到玻璃板底部的时间，凝胶的黏附力与时间成正比。

2.5　*单因素考察*

以胶凝温度为评价指标，固定 P188 的比例为 2%，HPMC 的比例为 0.3%，考察 P407 用量（17%、18%、19%、20%、21%）；固定 P407 的比例为 19%，HPMC 的比例为 0.3%，考察 P188 用量（1.0%、2.5%、4.0%、5.5%、7.0%）；固定 P407 的比例为 19%，P188 的比例为 2%，考察 HPMC 用量（0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%）。结果见图 2，在上述范围内 P407 用量越高，胶凝温度越低；P188 用量越高，胶凝温度越高；相比于 P407 和 P188，HPMC 用量对胶凝温度的影响较小。最终选择用量为 19%P407、2%P188、0.3%HPMC。

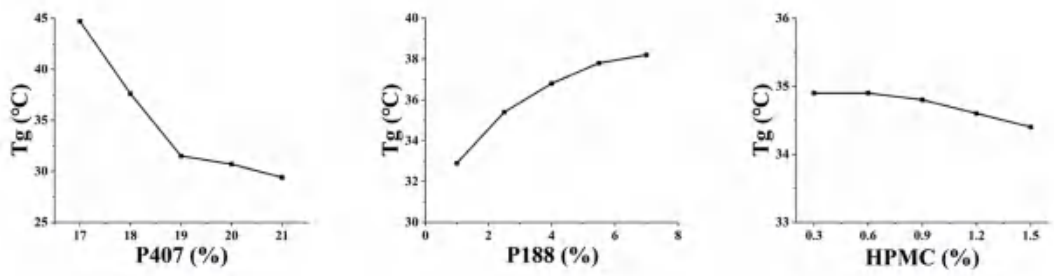


图 2　单因素试验结果

Fig 2　Univariate test results

以胶凝温度和黏附力为主要评价指标，固定 P407 的比例为 19%，P188 的比例为 2%，考察了 0.3% 的生物黏附剂（壳聚糖、黄原胶、羧甲基纤维素钠、海藻酸钠和 HPMC）的效果。结果见表 1，含海藻酸钠、黄原胶、HPMC 配方的黏膜黏附力较好，其他黏附剂均导致胶凝温度显著升高；黄原胶在水中溶解性不好，在溶胀相同时间下，含黄原胶的配方无法形成澄清的凝胶溶液。综合考虑胶凝温度、黏附力以及溶解情况，选择 HPMC 作为 DH-Gel 的黏附剂。固定其余辅料用量，考察 0.01% 苯甲酸钠 [5] 是否对胶凝温度和胶凝时间造成影响。结果显示苯甲酸钠对胶凝无显著影响。

表 1　生物黏附剂筛选试验结果

Tab 1　Bioadhesive screening test

生物黏附剂	胶凝温度 /℃	胶凝时间 /s
—	35.9	18.12
壳聚糖	37.6	23.49
黄原胶	36.4	44.90
羧甲基纤维素钠	39.5	23.20
海藻酸钠	39.7	43.98
HPMC	36.4	47.43

2.6　*Box-Behnken 效应面法优化温敏凝胶基质处方*

根据单因素试验的结果，选取 P407（*A*）、P188（*B*）、HPMC（*C*）3 个因素进行考察，P407 的用量为 18% ～ 20%，P188 的用量为 1% ～ 3%，HPMC 的用量为 0.1% ～ 0.5%，以胶凝温度（T_g）和胶凝时间（*t*）为评价指标，使用 Design-expert 13.0 软件进行试验设计，3 因素 3 水平进行试验，试验因素水平见表 2，试验设计与结果见表 3。

表 2　Box-Behnken 效应面法试验因素水平

Tab 2　Factor and level of Box-Behnken response surface methodology

水平	因素		
	A/%	*B*/%	*C*/%
−1	18	1	0.1
0	19	2	0.3
1	20	3	0.5

2.6.1　模型拟合　应用 Design-expert 13 软件对试验数据进行拟合，得到胶凝温度的拟合方程为：$T_g = 35.2 - 3A + 3.45B - 0.25C - 0.25AB + 0.2AC - 0.1BC + 0.525A^2 - 0.525B^2 + 0.025C^2$（$R^2 = 0.9954$，$P < 0.0001$）。胶凝时间的拟合方程为：$t = 23.18 - 9.60A + 9.49B - 0.54C -$

表 3　Box-Behnken 效应面法试验设计与结果

Tab 3　Design and results of Box-Behnken response surface methodology

No.	*A*/%	*B*/%	*C*/%	胶凝温度 /℃	胶凝时间 /s
1	19	2	0.3	35.2	25.6
2	19	1	0.1	31.4	15.8
3	18	2	0.5	38.5	36.4
4	20	1	0.3	29.2	10.2
5	20	2	0.1	32.6	19.2
6	19	2	0.3	35.6	24.1
7	19	2	0.3	34.7	22.5
8	18	1	0.3	34.3	28.4
9	19	1	0.5	31.1	16.6
10	20	3	0.3	35.6	26.5
11	18	2	0.1	39.4	38.8
12	19	3	0.1	38.5	37.4
13	20	2	0.5	32.5	18.1
14	19	3	0.5	37.8	35.8
15	18	3	0.3	41.7	47.2
16	19	2	0.3	35.1	22.7
17	19	2	0.3	35.4	21.0

$0.62AB + 0.32AC - 0.60BC + 3.31A^2 + 1.59B^2 + 1.63C^2$（$R^2 = 0.9889$，$P < 0.0001$）。

结果显示，上述拟合方程均高度显著，差异有统计学意义；失拟项 $P > 0.05$，差异不显著，表明上述模型拟合度和可信度良好，回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的关系。影响顺序：P407 用量 > P188 用量 > HPMC 用量。利用 Design-expert 13 软件绘制的三维效应面图见图 3。

2.6.2　优化工艺验证　通过 Design-expert 13 软件进行响应面优化，根据口咽部及食道的生理温度范围为 34 ～ 36 ℃，凝胶制剂的胶凝温度应接近或低于该范围为宜，故设定目标胶凝温度为 34 ℃，胶凝时间设定为最短，得到最优处方：盐酸达克罗宁用量为 1%，P407 用量为 19.39%，P188 用量为 1.96%，HPMC 用量为 0.30%，苯甲酸钠用量为 0.01%。按优化工艺平行制备 3 批温敏凝胶，分别测定胶凝温度与胶凝时间。测定结果见表 4，偏差结果显示，DH-Gel 模型可靠。

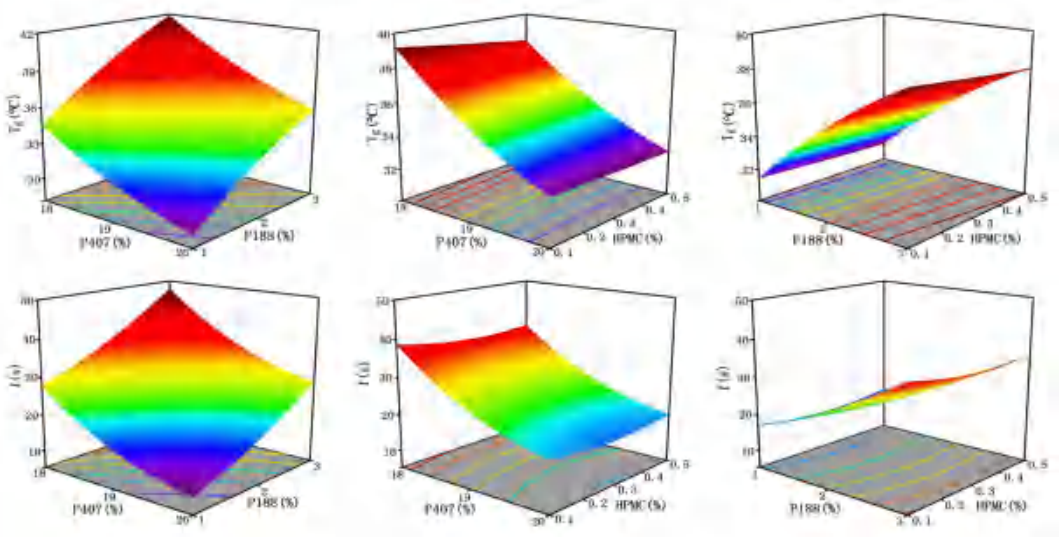


图 3　*A*、*B*、*C* 对胶凝温度及胶凝时间影响的效应面图

Fig 3　Response surface of effect of variables *A*, *B*, *C* on gelation temperature and gelation time

表 4　预测值与实测值比较

Tab 4　Predicted values with measured values

编号	胶凝温度 /℃		偏差 /%	胶凝时间 /s		偏差 /%
	预测值	实测值		预测值	实测值	
1	34.0	34.2	0.21	19.64	19.1	1.40
2		34.1			21.9	
3		34.5			20.6	

2.7　扫描电镜观察微观形态

先将空白凝胶和 DH-Gel 制成冻干粉，取适量凝胶粉末，采用场发射扫描电镜（SEM）观察凝胶表面的微观结构形态，结果见图 4。

2.8　稳定性考察

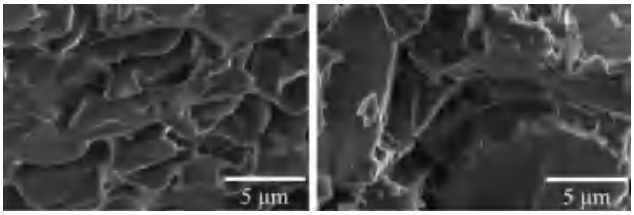


图 4　温敏凝胶 SEM 图

Fig 4　SEM image of thermosensitive gel

A. 空白凝胶（blank gel）；B. 盐酸达克罗宁温敏凝胶（DH-Gel）

将制备的 DH-Gel 分别置于高温（60 ℃）、低温（－ 20 ℃）避光保存 10 d 及室温 4500 lx 光照条件下连续照射 10 d，在第 0、5、10 日取样，观察样品恢复至室温后其性状、pH、胶凝温度、药物含量变化。结果见表 5。在 3 种贮存条件下，

盐酸达克罗宁含量未发生明显改变，但光照条件下 DH-Gel 的 pH 值相较于另外两组试验有明显降低，胶凝温度明显升高。表明 DH-Gel 在高温和低温条件下稳定性良好。

表 5　DH-Gel 稳定性试验结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 5　Stability test of DH-Gel ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

贮存条件	放置时间 /d	性状	pH	胶凝温度 /℃	盐酸达克罗宁含量 /%
高温	0	无色澄清透	6.84±0.02	34.1±0.32	99.5±1.08
	5	明溶液	6.84±0.01	34.4±0.31	99.7±1.01
	10		6.83±0.03	34.2±0.50	99.3±1.01
低温	0	无色澄清透	6.93±0.08	33.9±0.35	99.0±0.67
	5	明溶液	6.92±0.05	34.2±0.95	98.6±0.40
	10		6.88±0.07	34.6±0.75	98.6±0.47
光照	0	无色澄清透	6.85±0.04	34.3±0.72	99.3±1.32
	5	明溶液	6.03±0.03	34.7±0.45	98.6±0.57
	10		5.19±0.10	35.8±0.06	97.9±0.85

2.9　释放行为研究

采用扩散池法考察了 DH-Gel 的体外释药行为 [6]。将半透膜（MYM biological technology company limited，MW：3500）固定于 Franz 扩散池上，扩散池面积为 1.96 cm^2，释放介质为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液，接收池容量为 16 mL，透皮扩散仪内置磁力搅拌子，转速为 100 $r \cdot min^{-1}$，水浴温度为 34 ℃，将 0.5 g 温敏凝胶加入供给池中，使其均匀分散在半透膜表面。分别于 0.5、1、2、4、6 h 从接收池中取出接收液 1 mL，立即补加相同体积、相同温度的接收液。经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，采用高效液相色谱法测定药物含量，计算累计释放百分率（Q）。结果见表 6，各时间点的药物累计释放百分率标准差 SD 均＜ 2.0%，说明本制剂的批内均一性良好。

表 6　DH-Gel 体外释放试验结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 6　In vitro release of DH-Gel ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

取样时间 /h	累计释放百分率 /%
0.5	49.36±1.29
1	61.67±0.97
2	73.82±0.84
4	81.91±1.70
6	84.69±1.92

以时间（t）为横坐标，累计释放百分率（Q）为纵坐标，绘制累计释放曲线，结果见图 5，分别用零级动力学、一级动力学、Higuchi 动力学、Ritger-Peppas 动力学方程拟合 DH-Gel 的累计释放曲线，初步研究了 DH-Gel 的体外释放规律。Ritger-Peppas 模型中的 n 为释放指数，DH-Gel 的 n 值为 0.20，小于 0.45，表明 DH 从温敏凝胶中的释放是 Fick 扩散 [14]，且符合 Ritger-Peppas 模型（见表 7）。

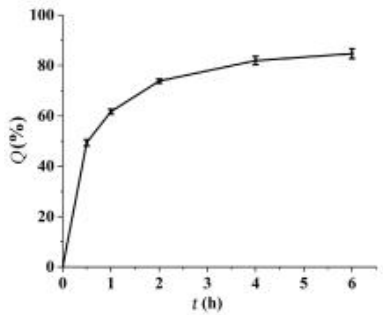


图 5　DH-Gel 体外释放曲线

Fig 5　In vitro release profiles of DH-Gel

表 7　DH-Gel 释药动力学模型拟合方程及相关系数

Tab 7　Fitting equation and correlation coefficients for the in vitro release of DH-Gel

动力学模型	方程	R^2
零级	$Q=5.80t+54.70$	0.7340
一级	$\ln(1-Q/81.39)=-1.60t$	0.9083
Higuchi	$Q=19.69t^{1/2}+40.55$	0.8714
Ritger-Peppas	$Q=60.80t^{0.20}$	0.9371

2.10　家兔眼刺激性试验

将家兔随机分组，每组 3 只，在实验前 24 h 检查家兔双眼。采用同体左右侧自身对比法 [15]，家兔左眼给予生理盐水作为对照组，右眼给予 1% 盐酸达克罗宁溶液或 DH-Gel 作为实验组，给药量均为 0.1 mL，给药后使上下眼睑被动闭合 10 s，于给药后的 1、2、4、24、48、72 h 内观察家兔眼部刺激性反应情况。根据《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》中的眼刺激性试验项，判断刺激程度 [16]，评分结果见表 8，盐酸达克罗宁溶液和 DH-Gel 分别给药后，家兔眼部的刺激性总评分均在 4 ～ 8.9，表明盐酸达克罗宁溶液和 DH-Gel 给药后对家兔眼睛有轻度刺激性。DH-Gel 组刺激性程度小于盐酸达克罗宁溶液组。

表 8　盐酸达克罗宁溶液 /DH-Gel 对兔眼刺激性评价结果 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 8　Evaluation results of irritation of dyclonine hydrochloride solution/DH-Gel for rabbit eyes ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

组别	眼组织刺激性评价计分					总分
	结膜充血	结膜分泌	结膜水肿	虹膜	角膜	
生理盐水组	0	0.1±0.06	0	0	0	0.1±0.06
盐酸达克罗宁溶液组	1.3±0.20	2.2±0.02	2.1±0.20	0	2.2±0.30	7.8±0.72
DH-Gel 组	0.7±0.50	1.8±0.08	1.4±0.09	0	1.6±0.08	5.5±0.75

3 讨论

温敏凝胶是研究较为广泛的原位凝胶之一，其优点在于，以原位凝胶为载体，可直接给药至患处，提高药物的生物利用度，组织亲和力强，给药后可在用药部位发生相转变，形成半固体凝胶，高度亲水性的三维网格结构可以延长药物在给药部位的滞留时间[17]；常用的温敏凝胶基质为泊洛沙姆，其毒性低，刺激性小，生物相容性好，泊洛沙姆中常选用 P407，单纯的 P407 溶液胶凝温度较低，一般低于 30 ℃，故加入 P188 可获得理想的胶凝温度[18]。

盐酸达克罗宁对于咽喉、食道等上消化道内窥镜黏膜部位的局部麻醉面临的挑战包括食道蠕动收缩和吞咽唾液的稀释，导致腔道表面的药物迅速流失。目前已有研究评估了生物黏附剂在食道给药中的作用。Krause 等[19]报道了 HPMC 和羧甲基纤维素钠具有良好的食道滞留能力。司佩茹等[5]以 P407 和 P188 为基质制备了 DH-Gel。本研究进一步优化，筛选了几种生物黏附剂，发现仅黄原胶和 HPMC 没有明显改变 DH-Gel 胶凝温度，其他生物黏附剂均导致 DH-Gel 胶凝温度显著升高，故最终选用了 HPMC，其黏附机制为纤维素与黏液黏蛋白之间的氢键、范德华力等作用[20]。

本文首先通过单因素考察确定范围，再采用 Box-Behnken 效应面法优化精确的处方配比参数。参考相关文献以及预试验，确定 P407 的浓度范围为 18% ～ 20%，P188 的浓度范围为 1% ～ 3%，HPMC 的浓度范围为 0.1% ～ 0.5%；验证试验表明，实测值与预测值的偏差＜ 2%，表明所拟合的数学模型在因素优化过程可行，模型预测准确性较高。

DH-Gel 在光照条件下连续照射 10 d，pH 值和胶凝温度均有明显变化，这表明该制剂需要避光贮存，且内外包装的选择要重点考察强光试验影响，避免制剂的性状发生改变。预试验显示在 pH 7.4 的生理环境下，盐酸达克罗宁在 5 ～ 6 h 内较稳定，故采用扩散池考察了 DH-Gel 在 6 h 内的体外释药行为，但仍存在一定的局限性，这种静态模型与口咽部、食道环境有所差距，还有待进行体内试验进一步验证。

后续试验还需对 DH-Gel 的局部麻醉作用进行深入系统研究，进一步完善 DH-Gel 用于黏膜麻醉的药效和作用机制，为 DH-Gel 的开发、临床应用提供参考。

参考文献

[1] 许开敢 . 盐酸达克罗宁胶浆临床应用的研究进展 [J]. 临床合理用药，2023，16（12）：179-181.

[2] 李唯，张博文，李龙江 . 盐酸达克罗宁胶浆在咽反射敏感患者阻生齿拔除术中的应用 [J]. 实用口腔医学杂志，2023，39（5）：642-647.

[3] 毛宗惠 . HPLC 法测定复方盐酸达克罗宁乳膏中盐酸达克罗宁含量 [J]. 世界最新医学信息文摘，2015，15（18）：37-39.

[4] 袁利杰，陈杰，郑子栋，等 . 谷固醇达克罗宁膜质量标准研究 [J]. 中国药品标准，2014，15（6）：419-422.

[5] 司佩茹，周红建，杨显伟，等 . 温敏型盐酸达克罗宁胶液的制备及质量评价 [J]. 医学信息，2021，34（14）：66-69.

[6] 种思茹，彭汐涯，王欣茹，等 . 酮咯酸氨丁三醇鼻用温敏凝胶的制备及体外释放研究 [J]. 中南药学，2023，21（4）：857-863.

[7] Zhang Q，Li XL，Jasti BR. Role of physicochemical properties of some grades of hydroxypropyl methylcellulose on in vitro mucoadhesion [J]. Int J Pharm，2021，609：121218.

[8] Shanthi CL，Donovan MD. Evaluation of bioadhesive gels for local action in the esophagus [J]. Int J Pharm，2023，642：123115.

[9] The United States Pharmacopieial Convention. United States Pharmacopeia [S]. 2023：3358.

[10] Timur SS，Şahin A，Aytekin E，et al. Design and in vitro evaluation of tenofovir-loaded vaginal gels for the prevention of HIV infections [J]. Pharm Dev Technol，2018，23（3）：301-310.

[11] Wang T，Chen LM，Shen TT，et al. Preparation and properties of a novel thermo-sensitive hydrogel based on chitosan/hydroxypropyl methylcellulose/glycerol [J]. Int J Biol Macromol，2016，93：775-782.

[12] 樊慧敏，丛志新，谷福根 . 盐酸多奈哌齐鼻用温敏原位凝胶的制备及其体外性质评价 [J]. 中南药学，2018，16（9）：1194-1199.

[13] 董芙蓉，刘莉，陈志良，等 . 芷冰鼻腔原位凝胶剂的质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（4）：19-22.

[14] 张昆，熊磊，程欣，等 . 苍艾油传递体凝胶的制备及其体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（14）：1385-1389.

[15] 尹茂山，李峥，尹华静，等 . 药物制剂安全性研究评价的常见问题讨论 [J]. 中国临床药理学杂志，2023，39（11）：1667-1672.

[16] 国家食品药品监督管理局 . 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2014.

[17] 张秋菊，黑晶，刘晨，等 . 几种药物、载体和附加剂对泊洛沙姆体系胶凝行为的影响 [J]. 中成药，2014，36（7）：1397-1401.

[18] 周巧云，张朝晖，潘俊芳，等 . 泊洛沙姆为载体的疏水性药物新剂型研究进展 [J]. 中国现代应用药学，2011，28（4）：315-319.

[19] Krause J，Brokmann F，Rosenbaum C，et al. The challenges of drug delivery to the esophagus and how to overcome them [J]. Expert Opin Drug Del，2022，19（2）：119-131.

[20] 赵行 . 口腔黏膜黏附材料的研究进展 [J]. 华西口腔医学杂志，2023，41（1）：1-10.

（收稿日期：2023-10-05；修回日期：2023-12-20）

鞣花酸通过 TLR4-SRC/MAPK/NF-κB 途径抑制脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应

乌里盼·托乎达阿里[1]，丁宛婷[1]，孙媛[1]，周茂杰[1]，姚雨含[2]，赵军[1, 2*]（1. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830011；2. 新疆药物研究所维吾尔药重点实验室，乌鲁木齐　830004）

摘要：目的　基于 Toll 样受体 4（TLR4）- 酪氨酸激酶（SRC）/ 丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）/ 核转录因子 -κB（NF-κB）通路探讨鞣花酸的抗炎机制。**方法**　采用不同浓度（0、0.5、5、25、50、75、100 μmol•L^{-1}）鞣花酸对 RAW264.7 巨噬细胞 [或脂多糖（LPS）诱导的 RAW264.7 细胞] 干预 24 h，噻唑蓝（MTT）法检测 RAW264.7 巨噬细胞存活率，筛选最适给药浓度。实验分为空白对照组，模型组（0.5 mg • L^{-1} LPS），阳性对照地塞米松组（10 μmol • L^{-1}），鞣花酸（5、25、50 μmol • L^{-1}）给药组。Griess 法检测细胞上清液中一氧化氮（NO）的含量；采用 ELISA 法检测细胞上清液中前列腺素 -2（PGE_2）、白细胞介素 -6（IL-6）、白细胞介素 -1β（IL-1β）和肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）的表达水平；采用 Western blot 法检测诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、环氧合酶 -2（COX-2）蛋白以及 TLR4-SRC/MAPK/NF-κB 通路相关蛋白的表达水平。**结果**　MTT 结果筛选出鞣花酸的干预浓度为 5 ～ 50 μmol • L^{-1}。与空白对照组比较，模型组 PGE_2、NO 和炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 表达显著升高（$P < 0.01$）；炎症标志物 iNOS、COX-2 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.01$），说明炎症模型建立成功。与模型组比较，鞣花酸能显著抑制 LPS 诱导 NO、PGE_2 的产生和降低 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平（$P < 0.05$，$P < 0.01$），降低 iNOS、COX-2 蛋白表达水平（$P < 0.05$，$P < 0.01$），且呈浓度依赖性；显著抑制 TLR4 蛋白的表达水平以及 SRC、P38、JNK、p65、IκBα 蛋白的磷酸化水平，并呈浓度依赖性。但对 ERK1/2 蛋白磷酸化没有显示出明显的抑制作用。**结论**　鞣花酸可能通过 TLR4-SRC/MAPK/NF-κB 信号通路的调控抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应，具体的调控机制有待进一步研究。

关键词：鞣花酸；抗炎作用；RAW264.7 巨噬细胞；SRC 蛋白激酶；MAPK 通路；NF-κB 通路
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0943-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.018

Inhibition of ellagic acid on lipopolysaccharids-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophage through TLR4-SRC/MAPK/NF-κB pathway

Wulipan Tuohudaali[1], DING Wan-ting[1], SUN Yuan[1], ZHOU Mao-jie[1], YAO Yu-han[2], ZHAO Jun[1, 2*] (1. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi*　830011; 2. *Key Laboratory for Uighur Medicine*, *Institute of Materia Medica of Xinjiang*, *Urumqi*　830004)

Abstract: Objective　To determine the anti-inflammation mechanism of ellagic acid based on Toll-like receptor 4 (TLR4)-tyrosine kinase (SRC)/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ nuclear transcription factor-κB (NF-κB) pathway. **Methods**　Different concentrations (0, 0.5, 5, 25, 50, 75, and 100 μmol • L^{-1}) of ellagic acid were used to treat RAW264.7 macrophage [or lipopolysaccharids (LPS)-induced RAW264.7 cells] for 24 hours. MTT assay was used to detect the viability of RAW264.7 macrophages and screen the optimal concentration. The experiment was divided into a blank control group, a model group (0.5 mg • L^{-1} LPS), a dexamethasone group (10 μmol • L^{-1}), and three ellagic acid (5, 25, and 50 μmol • L^{-1}) treatment groups. Griess method was adopted to detect the content of nitric oxide (NO) in the cell culture supernatant, and enzyme-

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目（No. 2021D01D14）。
作者简介：乌里盼·托乎达阿里，女，硕士研究生，主要从事中药与天然产物的研究与开发，email：2815146671@qq.com　*通信作者：赵军，男，研究员，博士研究生导师，主要从事中药与天然产物的研究与开发，email：zhaojun21cn@163.com

linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting the expression levels of prostaglandin E_2 (PGE_2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the cell culture supernatant. Western blot was applied to detect the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) protein, and TLR4-SRC/MAPK/NF-κB pathway-related proteins. **Results** MTT showed that the intervention concentration of ellagic acid was 5 ～ 50 μmol • L^{-1}. Compared with the blank control group, the expression levels of PGE_2, NO, IL-6, IL-1β, and TNF-α in the model group were significantly increased ($P < 0.01$); the expression levels of inflammatory markers iNOS and COX-2 protein were significantly increased ($P < 0.01$), indicating that the inflammatory model was successfully established. Compared with the model group, ellagic acid significantly inhibited LPS-induced NO, PGE_2, TNF-α, IL-1β, and IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced the expression levels of iNOS and COX-2 protein ($P < 0.05$, $P < 0.01$), in a concentration-dependent manner. Moreover, it also significantly inhibited the expression levels of TLR4 protein and the phosphorylation levels of SRC, P38, JNK, p65, and IκBα protein, showing a concentration-dependent effect. However, it did not show a significant inhibitory effect on the phosphorylation of ERK1/2 protein. **Conclusion** Ellagic acid may inhibit the inflammatory responses of LPS-induced RAW264.7 macrophages by regulating the TLR4-SRC/MAPK/NF-κB signaling pathway, while the specific regulatory mechanism requires further verification.

Key words: ellagic acid; anti-inflammatory effect; RAW264.7 macrophage; SRC protein kinase; MAPK pathway; NF-κB pathway

鞣花单宁类成分和鞣花酸（ellagic acid，EA）是一种广泛分布于多种植物中的天然多酚类化合物，其中以鞣花单宁类为代表的多酚类成分进入体内后可水解生成鞣花酸[1-2]。鞣花酸是富含此类成分中药民族药发挥药效的重要单体化合物。炎症是机体对各种损伤因素产生的一种特异性免疫反应，它可以消除有害刺激，启动愈合过程。然而，炎症反应一旦失控，会损伤正常组织，引起各种急慢性炎症性疾病[3-4]。鞣花酸具有抗菌抗炎、抗病毒、抗肿瘤、降血脂、降血糖、预防骨质疏松及免疫调控等多种生物活性，对溃疡性结肠炎、急性肺损伤、皮肤炎症以及类风湿关节炎等疾病均有较好的防治作用[5-7]。

脂多糖（LPS）是革兰氏阴性菌外膜的表面成分，与 Toll 样受体（TLR4）结合后，通过髓样分化因子（MyD）88 途径，激活丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）和核转录因子 κB（NF-κB）等下游信号通路，释放大量炎症因子，引起急性炎症反应[8-9]。研究发现 SRC 信号途径在这一过程中发挥了最重要的作用。SRC 是一种膜相关的非受体酪氨酸激酶，在 LPS 刺激的巨噬细胞中介导了其所触发的信号传导通路，抑制 SRC 的激活可抑制其下游信号传导途径，如 MAPK、NF-κB 等[10]。因此，开发具有 SRC 抑制作用的药物可能是 LPS 诱导的急性炎症的有效治疗策略。基于此，本文探讨鞣花酸对 TLR4-SRC/MAPK/NF-κB 通路的影响及其抗炎作用的分子机制，以期为该化合物的开发应用提供依据。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7（武汉普诺赛生命科技有限公司）。

1.2 试药

鞣花酸（成都曼思特生物科技有限公司，批号：A0741）；LPS（Sigma 公司，批号：L2880）；地塞米松（DEX）、二甲基亚砜（DMSO）和噻唑蓝（MTT）（索莱宝生物科技有限公司，批号分别为 D8040、D8371、M8180）；白细胞介素（IL）-6、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、IL-1β、前列腺素 -2（PGE_2）ELISA 试剂盒（Elabscience 公司，批号分别为 E-EL-M0044C、E-EL-M3063、EL-M0037c 和 E-EL-0034c）；一氧化氮（NO）试剂盒（Biyuntian 公司，批号：S0021S）；BCA 蛋白定量试剂盒（Thermo 公司，批号：UB276926）；特超敏 ECL 化学发光底物（Biosharp 公司，批号：BL520A）；诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、环氧合酶 -2（COX-2）、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 P38（p-P38）、丝裂原活化蛋白激酶 P38（P38）、细胞外调节激酶（ERK1/2）、磷酸化 C-jun 氨基末端激酶（p-JNK）、C-jun 氨基末端激酶（JNK）、磷酸化酪氨酸激酶

（p-SRC）、酪氨酸激酶（SRC）、p-IκBα抗体和山羊抗兔 IgG HL（美国 Abcam 公司，批号分别为 ab179800、ab178945、ab195049、ab170099、ab184699、ab76572、ab179461、ab185617、ab133283、ab133462、ab205179）；TLR4 抗体（美国 Affinity 公司，批号：AF7017）；内参 GAPDH（美国 Boster 公司，批号：BA2913）；细胞外调节激酶（p-ERK1/2）、p-p65、p65、IκBα抗体（美国 CST 公司，批号分别为 4376T、3033T、8242T、4814T）。

1.3 仪器

SW-CJ-2FD 超净工作台（苏州净化设备公司）；HC-301 高速冷冻离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；HF240 二氧化碳培养箱、Multiskan GO 全波长酶标仪（赛默飞世尔仪器有限公司）；水平和垂直电泳槽、转移槽（美国 Bio-Rad 公司）；Azure600 化学发光成像系统（北京深蓝云生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 细胞培养及药物制备

RAW264.7 细胞于含 DMEM ＋ 10%FBS ＋ 1% 双抗培养基中培养。精密称取鞣花酸及地塞米松，以 DMSO 溶解后稀释配制成浓度为 100 μmol • L^{-1} 母液（DMSO 含量小于 0.02%），0.22 μm 微孔滤膜过滤，－ 80 ℃保存备用。

2.2 MTT 法测定细胞活力

选择生长状态良好的 RAW264.7 巨噬细胞，当细胞密度长到 80% 左右时，将细胞接种在 96 孔板中，每孔 100 μL（6000 个细胞 / 孔），孵育 24 h 后，加入 0.5 mg • L^{-1} LPS 及 0、0.5、5、25、50、75、100 μmol • L^{-1} 的鞣花酸干预 24 h，同时设置空白对照组（含 0.02%DMSO 溶剂）。培养 24 h 后，每孔加入 20 μL 的 MTT（5 g • L^{-1}）试剂，继续培养 4 h，弃去培养液，加入 150 μL 的 DMSO 试剂（避光操作），全波长酶标仪检测各孔在 490 nm 处的吸光度值。

2.3 实验分组及处理

将 RAW264.7 巨噬细胞分为空白对照组（含 0.02% DMSO 的培养基），模型组，阳性对照组，鞣花酸低、中、高剂量组。当 RAW264.7 巨噬细胞密度达 90% 时，轻轻吹打细胞，离心，收集细胞沉淀，接种于 6 孔板中（5×10^5 • mL^{-1}），培养 24 h。模型组用 0.5 mg • L^{-1} LPS 干预 6 h，药物组与阳性药物组用 0.5 mg • L^{-1} LPS 干预 6 h 后分别加入不同浓度的鞣花酸（5、25、50 μmol • L^{-1}）和地塞米松（10 μmol • L^{-1}）干预 12 h，空白对照组不做处理。

2.4 Griess 法测定 NO 浓度

按照“2.3”项下方法进行分组处理，干预结束后收集细胞上清液，离心。将提前稀释好的标准品及细胞上清液按 50 μL/ 孔接种于 96 孔板中，各孔中加入 50 μL 的 Griess Reagent Ⅰ及 Griess Reagent Ⅱ试剂，使用全波长酶标仪测定吸光度值（540 nm），检测细胞上清液中 NO 分泌情况。

2.5 炎症介质 PGE_2 和促炎细胞因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量的检测

按照“2.3”项下方法进行分组处理，干预结束后收集细胞上清液并离心，通过试剂盒说明书测定上清液中 PGE_2 和 IL-6、IL-1β、TNF-α 分泌情况。使用酶标仪在 450 nm 下测定吸光度值。

2.6 分子对接

从 PBD 数据库（https：//www.rcsb.org/）中下载 SRC 的 PDB 格式文件。使用 Auto Dock Tools 1.5.6 软件将 SRC 结构进行去水加氢处理，并且进行电荷计算，保存为 PDBQT 格式文件。采用 Chem Draw 18.0 对鞣花酸结构进行建构与优化，得到鞣花酸二维结构，运用 Open bebol GUL 软件将其转换为 PDBQT 格式文件。利用 Auto Dock vina 软件对其进行分子对接，使用 Discovery Studio 及 PyMOL 软件画出结合模式示意图。

2.7 Western blot 法检测相关蛋白的表达

按照“2.3”项下方法进行分组处理，提取蛋白，根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定各组蛋白浓度，进行蛋白定量。各组蛋白加入相应体积的 5×Loading Buffer 及 PBS 后 100 ℃变性 10 min，－ 20 ℃保存。按照 20 μg 上样，进行 SDS-PAGE 电泳，电转，将蛋白转移至 PVDF 膜上。采用 1×TBST 漂洗 PVDF 膜 5 min×4 次后放入脱脂奶粉中封闭 2 h，将膜置于稀释好的一抗（COX-2、iNOS、p-P38、P38、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JNK、JNK、p-SRC、SRC、TLR4、p-p65、p65、p-IκBα、IκBα、GAPDH）中，4 ℃摇床上过夜。第二日早上用 1×TBST 洗膜 5 min×4 次，置于摇床上室温避光孵育山羊抗兔 IgG 二抗 1.5 h（稀释比例 1∶10 000），ECL 显影液显影，使用 Image J 软件对 Western blot 蛋白条带图进行结果分析。

2.8 数据统计与分析

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析，结果以均数 ± 标准差表示。通过单因素方差分析（ANOVA）确定组间均数比较差异，$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鞣花酸对 RAW264.7 细胞活力的影响

如图 1 所示，与空白对照组相比，鞣花酸在 75 μmol • L^{-1} 时 RAW264.7 细胞存活率显著

降低（$P < 0.01$），且存活率小于 80%；同时 75 μmol • L^{-1} 的鞣花酸对 LPS 干预的 RAW264.7 细胞也产生了同样的效果。因此采用 5 ～ 50 μmol • L^{-1} 的鞣花酸开展后续实验。

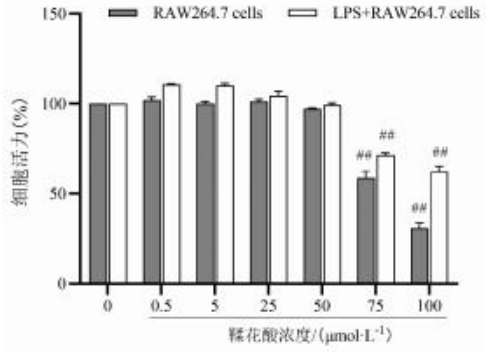


图 1　鞣花酸对 RAW264.7 巨噬细胞活力的影响

Fig 1　Effect of ellagic acid on RAW264.7 macrophages activity

注：与空白对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank control group，$^{\#\#}P < 0.01$.

3.2　鞣花酸对 LPS 致 RAW 264.7 炎症细胞 PGE_2、NO、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平的影响

如表 1 所示，与空白对照组比较，LPS 干预导致 RAW264.7 巨噬细胞炎症介质 PGE_2、NO 含量和促炎细胞因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平显著升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，鞣花酸（5、25、50 μmol • L^{-1}）能以剂量依赖的方式显著抑制 LPS 诱导 NO 和 PGE_2 的过量产生（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；同时，鞣花酸（25、50 μmol • L^{-1}）和阳性对照组（10 μmol • L^{-1}）均可使细胞炎性因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 表达显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

3.3　鞣花酸对 iNOS 和 COX-2 蛋白表达水平的影响

如图 2 所示，与空白对照组比较，模型组细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达量显著增加（$P < 0.01$）；与模型组比较，鞣花酸呈剂量依赖性地显著降低了 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

表 1　鞣花酸对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 PGE_2、NO、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 释放的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

Tab 1　Effect of ellagic acid on PGE_2，NO，IL-6，IL-1β and TNF-α contents in LPS induced RAW264.7 macrophages ($\bar{x}\pm s$，$n = 3$)

组别	剂量 /（μmol • L^{-1}）	PGE_2/（ng • L^{-1}）	NO/（mmol • L^{-1}）	IL-6/（μg • L^{-1}）	IL-1β/（μg • L^{-1}）	TNF-α/（μg • L^{-1}）
空白对照组	—	44.95±8.30	1.00±00	6.4±1.09	1.15±0.21	5.9±1.55
模型组	—	848.07±193.67$^{\#\#}$	6.00±0.29$^{\#\#}$	43.00±6.87$^{\#\#}$	16.71±3.18$^{\#\#}$	213.79±13.55$^{\#\#}$
阳性对照组	10	259.30±22.24**	4.09±0.42**	22.27±9.45*	8.20±3.51*	100.25±23.89**
鞣花酸低剂量组	5	634.70±107.39*	4.90±0.44**	46.68±13.57	9.31±2.78	219.06±11.9
鞣花酸中剂量组	25	342.70±42.45**	2.60±0.06**	25.65±12.14*	9.65±3.54*	157.45±12.42*
鞣花酸高剂量组	50	259.31±26.16**	1.88±0.03**	13.50±2.69**	7.67±0.82**	103.72±16.22**

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

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

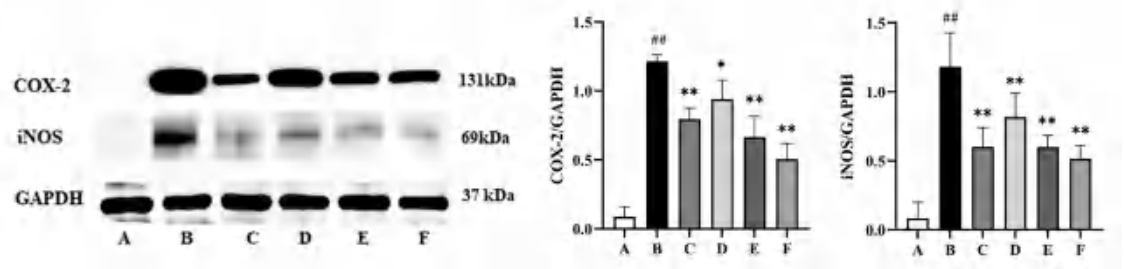


图 2　鞣花酸对脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

Fig 2　Effect of ellagic acid on the expression of iNOS and COX-2 protein in RAW264.7 macrophages

A. 空白对照组（blank control group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性对照组（positive group）；D ～ F. 鞣花酸低、中、高剂量组（low，middle，high dose ellagic acid group）

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

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

3.4　鞣花酸对 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞 TLR4 和 SRC 蛋白表达水平的影响

分子对接研究结果显示，鞣花酸和 SRC 有非常强的结合活性，结合能为－ 36 kJ • mol^{-1}，鞣花酸和 ARG-158、LYS-198、PTR-101、GLU-162、GLN-147 氨基酸结合形成经典氢键，这使得复合体更加稳定（见图 3），说明该成分可能通过靶向 SRC 蛋白发挥抗炎作用。进一步利用 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型进行实验验证。结果如图 4 所示，与空白对照组比较，LPS 干预后，RAW 264.7 细胞 TLR4和 SRC 蛋白表达水平显著增加（$P < 0.01$）。鞣花酸呈剂量依赖性地显著降低了 TLR4 和 p-SRC/SRC 蛋白的表达。

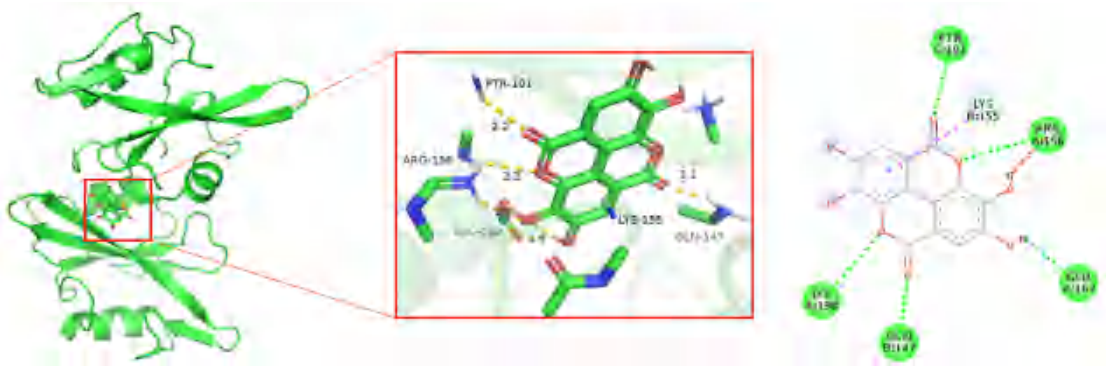


图 3　鞣花酸与 SRC 的分子对接模式

Fig 3　Molecular docking model of ellagic acid and SRC

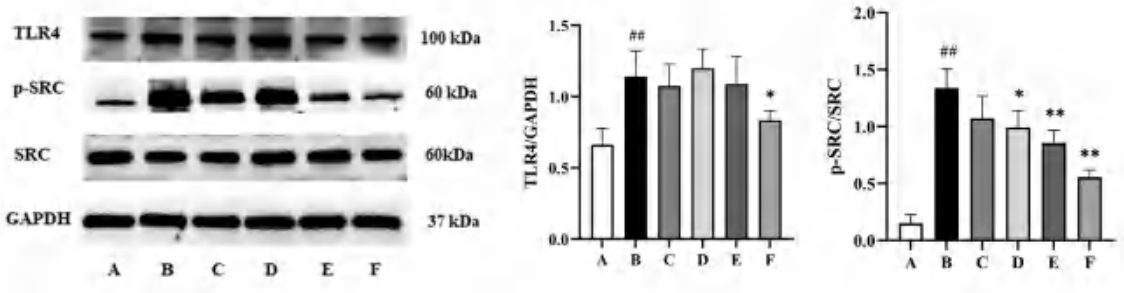


图 4　鞣花酸对脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞 TLR4、SRC、p-SRC 蛋白表达的影响

Fig 4　Effect of ellagic acid on the expression of TLR4，SRC，p-SRC protein in RAW264.7 macrophages

A. 空白对照组（blank control group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性对照组（positive group）；D ～ F. 鞣花酸低、中、高剂量组（low，middle，high dose ellagic acid group）

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

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

3.5　鞣花酸对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平的影响

如图 5 所示，与空白对照组比较，LPS 组显著增加了 RAW264.7 细胞中 p-P38/P38、p-ERK1/2/ERK1/2、p-JNK/JNK 蛋白的表达水平（$P < 0.05$）。与模型组比较，鞣花酸能显著抑制 p-P38/P38、p-JNK/JNK 蛋白的表达水平，但鞣花酸对 p-ERK1/2/ERK1/2 蛋白表达水平没有显著抑制作用。

3.6　鞣花酸对 LPS 诱导 RAW264.7 炎症细胞 NF-κB 信号通路的影响

如图 6 所示，与空白对照组比较，LPS 干预显著增加了 RAW 264.7 细胞中 p65 和 IκBα 磷酸化蛋白表达水平（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。鞣花酸（25、50 μmol • L^{-1}）能显著抑制 LPS 激活 RAW264.7 巨噬细胞中 NF-κB p65 蛋白的磷酸化（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。由于 IκBα 磷酸化和降解可促进 NF-κB 易位到细胞核，本研究进一步评估了鞣花酸是否影响 LPS 活化细胞中 IκBα 磷酸化。结果显示鞣花酸（50 μmol • L^{-1}）也能显著抑制 LPS 激活的 RAW264.7 炎症细胞中 IκBα 的磷酸化（$P < 0.05$）。

4　讨论

研究显示，SRC 与 TLR4 形成复合物的 CD14 和 SRC 缔合参与了 LPS/TLR4 介导的炎症反应[11-13]。LPS 刺激增加了 RAW264.7 细胞中膜蛋白 TLR4 的表达和胞内 SRC 的磷酸化，鞣花酸和 SRC 蛋白有很强的结合能力，可抑制 SRC 的磷酸化，本文的分子对接及细胞实验均验证了这一结果。TLR4-SRC 激活后可启动下游 MyD 88 的募集，随后诱发下游信号传导通路丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）和转录因子 NF-κB 通路的激活，致使 TNF-α、IL-1β、IL-6、COX-2、PGE_2 和 NO 等炎性细胞因子及炎症介质大量分泌，引起炎症反应[14-16]。本实验结果显示鞣花酸能显著抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS、COX-2、NO、PGE_2、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的分泌水平，说明鞣花酸具有显著的抗炎作用。

MAPKs 包含三个亚家族（P38、ERK1/2 和 JNK 蛋白），参与调节各种细胞活动如细胞增殖、分化、凋亡以及先天性免疫反应，也能调控下游的 NF-κB 信号途径等，是一个重要的炎症信号通路，与 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 iNOS 等炎症基因的调控密切相关[17-18]。此外，NF-κB p65 是经典炎症通路中的转录因子，在失活状态下与细胞质中的抑制蛋白 IκBα 结合。IκBα 被磷酸化后，p65 磷

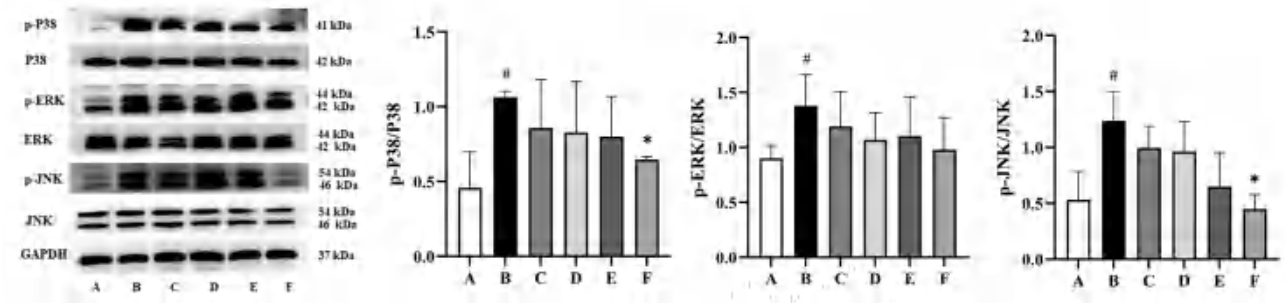


图 5　鞣花酸对 PS 诱导 RAW264.7 细胞中 MAPK 相关蛋白表达的影响

Fig 5　Effect of ellagic acid on the MAPK relative proteins in RAW264.7 macrophage

A. 空白对照组（blank control group）；B 模型组（model group）；C 阳性对照组（positive group）；D ～ F. 鞣花酸低、中、高剂量组（low，middle，high dose ellagic acid group）

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

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

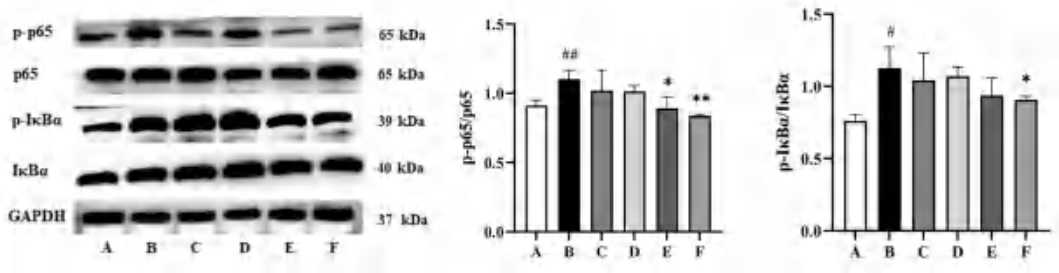


图 6　鞣花酸对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞 NF-κB 信号通路的影响

Fig 6　Effect of ellagic acid on the expression of NF-κB signaling pathway related proteins in LPS induced RAW 264.7 macrophage

A. 空白对照组（blank control group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性对照组（positive group）；D ～ F. 鞣花酸低、中、高剂量组（low，middle，high dose ellagic acid group）

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

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

酸化激活后游离 NF-κB 易位至细胞核，诱导炎症因子的产生[19]。体内和体外实验研究表明，对于 LPS 诱导的炎症反应，都伴随着 MAPKs 和 NF-κB 信号途径的活化[20-22]。本实验结果显示鞣花酸高剂量组能够显著抑制 MAPK 途径中 P38、JNK 蛋白的磷酸化水平以及 NF-κB 信号途径中 IκBα、p65 蛋白的磷酸化，以上结果说明，鞣花酸可通过靶向 SRC 蛋白及其下游信号途径 MAPKs 和 NF-κB 信号通路的调控发挥抗炎作用。本研究结果可为鞣花酸的开发利用提供理论依据。

参考文献

[1] 郭增军，谭林，徐颖，等 . 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性 [J]. 天然产物研究与开发，2010，22（3）：519-540.

[2] 陈玫伶，勾玲，卢海啸，等 . 鞣花酸药理作用研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2023，25（1）：196-202.

[3] Panigrahy D，Gilligan MM，Serhan CN，et al. Resolution of inflammation：an organizing principle in biology and medicine [J]. Pharmacol Ther，2021，227：107879.

[4] Verotta L，Panzella L，Antenucci S，et al. Fermented pomegranate wastes as sustainable source of ellagic acid：antioxidant properties，anti-inflammatory action，and controlled release under simulated digestion conditions [J]. Food Chem，2018，246：129-136.

[5] Evtyugin DD，Magina S，Evtuguin DV，et al. Recent advances in the production and applications of ellagic acid and its derivatives. A review [J]. Molecules，2020，25（12）：2745.

[6] 范高福，胥振国，刘修树，等 . 植物提取物鞣花酸的药理作用及制剂研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学，2016，35（12）：3562-3568.

[7] 刘静文，邵茗，刘江文，等 . 鞣花酸调控 NLRP3/Caspase-1 信号通路改善脂多糖诱导的小鼠肠道炎症 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2023，32（5）：532-536.

[8] 徐群，蒋双双，程魁，等 . 靶向 Toll 样受体的免疫调节剂研究进展 [J]. 药学进展，2016，40（1）：42-55.

[9] Wu LC，Du LL，Ju QQ，et al. Silencing TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway alleviated inflammation of corneal epithelial cells infected by ISE [J]. Inflammation，2021，44（2）：633-644.

[10] Brian BF，Freedman TS，et al. The SRC-family Kinase Lyn in immunoreceptor signaling [J]. Endocrinology，2021，162（10）：152.

[11] Płóciennikowska A，Hromada-Judycka A，Kinga B，et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci，2015，72：557-581.
[12] Szilveszter KP，Tamás N，Attila M，et al. Tyrosine kinases in autoimmune and inflammatory skin diseases [J]. Front Immunol，2019，10：1862.
[13] Fu YJ，Xu B，Huang SW，et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF-κB p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14 [J]. Acta Pharmacol Sin，2021，42（1）：88-96.
[14] 徐愉林，秦莎莎，祝赫，等 . 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血小板 Src，Akt 和 p38MAPK 蛋白的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（5）：135-140.
[15] Ren Q，Guo F，Tao SB，et al. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF-κB p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice [J]. Biomed Pharmacother，2020，122：109772.
[16] 姜勇 .LPS 介导细胞激活的信号转导：从 CD14 到 p38MAPK 通路的研究 [J]. 生理科学进展，1999，30（1）：29-34.
[17] Chen J，Wang LH，Yuan M，et al. Update on the roles of rice MAPK cascades [J]. Int J Mol Sci，2021，22（4）：1679.
[18] Yong HY，Koh MS，Moon A，et al. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer [J]. Expert Opin Investig Drugs，2009，18（12）：1893-1905.
[19] 李子舜，赵长普，陈仁伍，等 . 中医药基于 NF-κB 信号通路治疗肝纤维化的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（23）：275-282.
[20] 李玉婷，雷志强，游宇，等 . 基于 TLR4/NF-κB/NLRP3 通路探讨补阳还五汤调控巨噬细胞极化的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（19）：18-25.
[21] Park MY，Ha SE，Kim HH，et al. Scutellarein inhibits LPS-induced inflammation through NF-κB/MAPKs signaling pathway in RAW264.7 cells [J]. Molecules，2022，27（12）：3782.
[22] Fu YJ，Xu B，Huang SW，et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF-κB p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14 [J]. Acta Pharmacol Sin，2021，42（1）：88-96.

（收稿日期：2023-11-16；修回日期：2024-02-25）

基于新绿原酸的紫外吸收和电化学双信号响应的 Al^{3+} 分析新方法研究

魏文凤，董永亮，张自品*（安徽中医药大学 药学院，合肥　230012）

摘要：目的　利用新绿原酸（NCGA）与 Al^{3+} 的相互作用，建立一种基于 NCGA 的紫外吸收和电化学双信号响应的 Al^{3+} 分析新方法。**方法**　基于 NCGA 与单壁碳纳米管（CNTs）之间的 π-π 堆积作用，构建了 NCGA/CNTs/GC 电极。利用差分脉冲（DPV）技术和修饰电极在＋ 0.23 V 的氧化电流的下降对 Al^{3+} 进行定量分析。基于 NCGA 对 Al^{3+} 在 325 nm 处的吸收降低同时伴随 365 nm 新峰生成的紫外光谱响应，并且在 277 和 340 nm 处出现等吸收点，利用 365 nm 和 325 nm 处的吸光度值之比（A_{365}/A_{325}）对 Al^{3+} 进行定量分析。**结果**　基于 NCGA 的分析方法对 Al^{3+} 的紫外吸收在 0.1 ～ 100 μmol • L^{-1} 呈现出良好的线性关系，检测限为 0.034 μmol • L^{-1}；基于 NCGA 的修饰电极对 Al^{3+} 的电流响应在 0.01 ～ 0.1，0.1 ～ 10 和 10 ～ 100 μmol • L^{-1} 呈现良好的线性关系，检测限为 0.45 nmol • L^{-1}。生理浓度的其他金属离子和生理活性物质对两种信号测定方法均无明显干扰。在 NCGA 的紫外分析方法和电化学分析方法下，大鼠血清的加标回收率分别为 97.4% ～ 101%（n ＝ 3）和 98.5% ～ 99.4%（n ＝ 3）。**结论**　本方法具有良好的线性、选择性和准确度，并被成功用于大鼠中 Al^{3+} 的准确定量。该方法有望应用于 Al^{3+} 相关的生理和病理事件研究。

关键词：新绿原酸；Al^{3+}；双信号响应；修饰电极；紫外吸收；电化学分析
中图分类号：R313　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0949-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.019

基金项目：安徽省自然科学基金面上项目（No. 2008085MH293）；安徽省高校自然科研项目重点项目（No. 2022AH050459）。
作者简介：魏文凤，女，硕士研究生，主要从事药物分析新方法研究，email：1325163099@qq.com　*通信作者：张自品，女，教授，博士研究生导师，主要从事药物电化学分析及活体分析化学研究，email：zpzhang@ahtcm.edu.cn

UV absorption/electrochemistry dual-readout method for Al^{3+} detection based on neochlorogenic acid

WEI Wen-feng, DONG Yong-liang, ZHANG Zi-pin* (*College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To develop a novel dual-readout method for the detection of Al^{3+} in biological samples based on the interactions between neochlorogenic acid (NCGA) and Al^{3+} via electrochemical and spectroscopic properties of NCGA. **Methods** NCGA was immobilized onto the glass carbon (GC) electrode surface via single-walled carbon nanotubes (CNTs) through π-π interactions to generate an NCGA/CNTs/GC electrode. Once immersed in Al^{3+} solution, the modified electrodes showed a current decrease in the oxidation peak at + 0.23 V (*vs*. Ag/AgCl) due to the interactions-driven binding of Al^{3+} on the surface of electrodes, which validated Al^{3+} detection with the current decrease of the NCGA/CNTs/GC electrode as the electrochemical signal readout. Upon addition of Al^{3+} into NCGA solution, the UV-vis absorbance of NCGA significantly decreased in NCGA at 325 nm and generated a new absorption band centred at 365 nm with a clear isosbestic points at 277 and 340 nm unchanged, which enabled the Al^{3+} quantification with the ration of absorbance at 365 nm to 325 nm (i.e., A_{365}/A_{325}) as the absorption readout. **Results** The NCGA-based anlytical method for Al^{3+} showed dynamic linear concentration of Al^{3+} at 0.1 ～ 100 μmol • L^{-1} with a detection limit of 0.034 μmol • L^{-1} and ranges of 0.01 ～ 0.1 μmol • L^{-1}, 0.1 ～ 10 μmol • L^{-1}, and 10 ～ 100 μmol • L^{-1} with a detection limit of 0.45 nmol • L^{-1}. The method based on both the UV absorption and electrochemical analysis was highly selective against other metal ions and coexisting species in the biological samples within their physiological concentrations. As with the animal experiment, the dual-readout method proved selective and effective for Al^{3+} quantification in the rat serum. The spiked recoveries for serum sample ranged 97.4% ～ 101% (n = 3) for the UV absorption and 98.5% ～ 99.4% (n = 3) for the electrochemical analysis, respectively. **Conclusion** The method is linear, selective, and accurate, and can be used for the accurate quantification of Al^{3+} in the rat serum, facilitating more applications in physiological and pathological research associated with Al^{3+}.

Key words: neochlorogenic acid; Al^{3+}; dual-readout; modified electrode; UV absorption; electrochemical analysis

铝是地壳中含量最丰富的金属元素，它以多种化学形式存在于环境中，Al^{3+}广泛用于食品添加剂、药品和疫苗等。研究表明多种神经系统疾病，比如阿尔茨海默病、帕金森病、脑病等均和体内的 Al^{3+}水平成正相关[1-3]。因此，检测生物样品中的 Al^{3+}含量具有重要的生理学意义。Al^{3+}的传统分析方法包括电感耦合等离子体发射光谱法（ICP-OES）[4]、电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）等[5]，这些方法存在仪器设备昂贵，操作过程复杂烦琐，需要专业人员操作等问题。目前报道的 Al^{3+}分析新方法包括基于化学合成的亚胺席夫碱、罗丹明或香豆素等新型衍生物的荧光分析方法[6-8]，以及基于席夫碱、巯基化 8-羟基喹啉或冠醚类离子载体修饰电极的电化学分析方法[9-11]，但是方法中所需的荧光探针或电化学探针合成步骤复杂、耗时。因此，建立简单有效、快速的 Al^{3+}分析方法十分有必要。

本课题组致力于基于物质的结构特点和理化性质，利用物质间相互作用来设计电极表界面和光学传感界面，进而建立高灵敏度、高选择性的生物传感学新方法。绿原酸（CGA）及其同分异构体新绿原酸（NCGA），是由咖啡酸与奎尼酸形成的缩酚酸，如图 1 所示。其分子结构中有酯键、羧基及多元酚结构，具有丰富的配位化学特点，可以和金属离子配位[12]。此外，CGA 具有共轭结构以及邻二酚羟基团，表现出良好的光学和电化学氧化还原活性。因此，本工作中计划引入 CGA 或 NCGA 作为 Al^{3+}的识别元件和探针来设计 Al^{3+}的电极表界面和光学传感界面来构建 Al^{3+}的双信号响应分析方法。如图 1 所示，基于

NCGA、CGA 与单壁碳纳米管（CNTs）之间的 π-π 堆积作用，分别将 NCGA 和 CGA 修饰于电极表面，构建了 NCGA/CNTs/GC 和 CGA/CNTs/GC 的修饰电极。修饰电极和 Al^{3+} 作用后，其伏安曲线（$E_{½}$ ＝＋ 0.23 V）的氧化峰电流明显下降。向 NCGA 或 CGA 溶液中加入 Al^{3+} 后，NCGA 或 CGA 在 325 nm 处的特征吸收峰吸光度降低，同时 365 nm 处有新的吸收峰生成。基于修饰电极电流的下降和紫外光谱在 365 nm 和 325 nm 处的吸光度值之比（A_{365}/A_{325}）可以对 Al^{3+} 进行定量分析。我们比较了基于 CGA 和 NCGA 对 Al^{3+} 的电化学和紫外可见响应，结果表明 NCGA 对 Al^{3+} 有更好的响应，现报道如下。

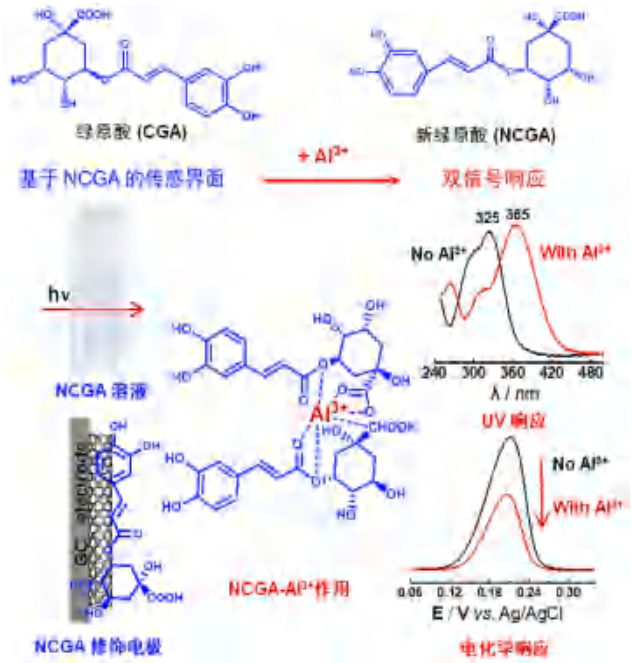


图 1　基于新绿原酸进行 Al^{3+} 的紫外吸收以及电化学双信号检测的原理示意图

Fig 1　Illustration of the UV absorption and electrochemistry dual-readout strategy for Al^{3+} detection based on NCGA

1　试药和仪器

新绿原酸（NCGA，批号：103460，纯度：99%，上海永恒生物科技有限公司）；绿原酸（CGA，批号：F1701138，纯度：98%）、无水乙醇、磷酸二氢钾、三（羟甲基）氨基甲烷盐酸盐（Tris）（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；三氯化铝（安徽泽升科技有限公司）；单壁碳纳米管（CNTs）（中国科学院成都有机化学有限公司）；其他试剂均为分析纯，实验用水均来自 Milli-Q 去离子水过滤系统。

CHI 730E 型电化学工作站（上海辰华有限公司）；UV-8000 紫外分光光度计（上海元析仪器有限公司）；EX125DZH 十万分之一天平（上海奥豪斯仪器有限公司）；KQ-50DB 数控超声波清洗仪器（昆山超声仪器有限公司）；PHS-3C 酸度计（成都世纪方舟科技有限公司）。

2　方法

2.1　UV 测试

用 UV-8000 紫外分光光度计记录紫外光谱，光谱范围为 250 ～ 500 nm，空白溶液为 0.01 mol • L^{-1} Tris-HCl（pH 7.0）。进行选择性实验时为了消除不同溶剂背景信号的差异对结果采用“归一化”处理，其中 NCGA-Al^{3+} 混合溶液的 A_{365}/A_{325} 为 1，实际样品测量时利用 A_{365}/A_{325} 进行定量。测量均使用 1 cm 方形石英比色皿，所有的光谱实验均在室温下进行。

2.2　电极制备

采用三电极体系，以玻碳电极（GC，直径 3 mm）修饰电极作为工作电极，Ag/AgCl（饱和 KCl）作为参比电极，铂丝作为对电极。GC 电极在使用前，先用砂纸抛光，再分别用粒径为 3.0、1.0 和 0.05 mm 的 Al_2O_3 粉末水浆依次抛光，然后用去离子水冲洗电极表面，置于无水乙醇和水中各超声清洗 3 min、N_2 吹干，获得干净的电极镜面备用。

将 0.5 mg 的 CNTs 分散在 1.0 mL 无水乙醇溶液中，超声 15 min 以获得均匀的分散液，取 6 mL 均匀滴涂到 GC 电极表面，并在红外灯下干燥以蒸发溶剂，得到 CNTs/GC 电极。将 CNTs/GC 电极分别在 50 μmol • L^{-1} 的 NCGA 水溶液或 50 μmol • L^{-1} 的 CGA 水溶液中浸泡 10 min 使 NCGA 或 CGA 达到饱和吸附，从溶液中取出电极、用去离子水冲洗以除去松散吸附的 NCGA 或 CGA，即获得 NCGA/CNTs/GC 电极和 CGA/CNTs/GC 电极。

2.3　电化学测试

采用三电极体系，以 NCGA/CNTs/GC 电极和 CGA/CNTs/GC 电极为工作电极、Ag/AgCl（饱和 KCl）为参比电极、铂丝为对电极，使用循环伏安（CV）和差分脉冲（DPV）技术进行电化学测试。利用 CV 技术比较 NCGA/CNTs/GC 和 CGA/CNTs/GC 修饰电极对 Al^{3+} 的电化学响应时，为了消除不同修饰电极之间基础电流的差异，对两种修饰电极的基础电流值采用“归一化”处理。采用 DPV 技术进行 Al^{3+} 的电化学测试，脉冲幅度为 0.05 V，脉冲宽度为 0.05 s，采样宽度为 0.0167 s，扫描电位范围为 0.05 ～ 0.35 V。采用 NCGA/CNTs/GC 电极的电流下降率（$\triangle I/I_0$）对 Al^{3+} 进行定量。$\triangle I$ 为 I 和 I_0 的差值，其中，I_0 为修饰电极在 0.1 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）中的 DPV 响应的峰电流

值，即基础电流值，I为修饰电极在 Al^{3+}水溶液中浸泡 10 min 后置于 0.1 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）中的 DPV 响应峰值电流。所有电化学实验均在室温下进行。

2.4 *动物实验和实际样品测试*

成年雄性 Sprague Dawley 大鼠 6 只（200 ～ 250 g，安徽中医药大学动物实验中心），在 12 h/12 h 的明暗交替环境下，可自由饮水饮食，所有动物实验均经安徽中医药大学动物伦理委员会批准。大鼠用 0.8% 戊巴比妥麻醉，从大鼠腹主动脉采集血液转移到含有乙二胺四乙酸抗凝剂的离心管中，3000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液得到血清。向 2 mL 含有 4 μL 血清的 0.01 mol • L^{-1} Tris-HCl（pH 7.0）溶液中加入 10 mmol • L^{-1} NCGA 作为紫外测试底液，向测试底液中加入 0.38、3.13，80 mmol • L^{-1} Al^{3+}水溶液后进行紫外测试、以 1 mL 含有 2 μL 血清的 0.1 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）溶液作为电化学测试底液，向测试底液中加入 0.03、1、80 mmol • L^{-1} Al^{3+}溶液后进行电化学 DPV 测试，计算加标回收率，每个加标浓度重复测定 3 次。实验结束后将动物用戊巴比妥麻醉后断头处死。

3　结果和讨论

3.1 *CGA 和 NCGA 与 Al^{3+}相互作用的紫外吸收和电化学表征*

CGA 与 NCGA 在 290 ～ 360 nm 处有一强吸收带，如图 2A（黑线）和 2B（蓝线）所示。325 nm 处紫外吸收峰归属于咖啡酸部分的酯基 C ＝ O 的 π-π* 跃迁，295 nm 处归因于羰基上的 p 轨道向 π* 轨道跃迁（n-π*）[13]。向溶液中加入 50 μmol • L^{-1} Al^{3+}水溶液，325 nm 处的吸收降低同时伴随 365 nm 新峰生成，如红线所示。说明 CGA、NCGA 与 Al^{3+}发生了相互作用并生成了相应的配合物。CGA 和 NCGA 和 Al^{3+}相互作用之后，A_{365}/A_{325} 分别为 0.79 和 0.91，说明 NCGA 对 Al^{3+}的作用更强，对 Al^{3+}的紫外吸收响应更为灵敏，可能是由于 NCGA 和 CGA 空间构象的差异导致了与 Al^{3+}作用的差异 [14]。为进一步比较 CGA、NCGA 对 Al^{3+}的紫外光谱响应，比较了两者和不同浓度 Al^{3+}作用后的 A_{365}/A_{325}，结果如图 2C 所示，NCGA（蓝线）对 Al^{3+}的响应明显优于 CGA（黑线）。CGA/CNTs/GC 和 NCGA/CNTs/GC 的修饰电极在 0.01 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）中在 $E_{½}$ ＝ ＋ 0.23 V（*vs.* Ag/AgCl）有一对可逆氧化还原峰，如图 2D（黑线）和 2E（蓝线）所示，这归属于 CGA 与 NCGA 苯二酚的氧化 [15]。CGA/CNTs/GC 和 NCGA/CNTs/GC 电极在 100 μmol • L^{-1} Al^{3+}水溶液中孵育 10 min 后置于 0.01 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）中进行循环伏安（CV）测试，电流分别下降了 8.3% 和 15.8%。电流下降是由于 CGA、NCGA 与 Al^{3+}之间的相互作用导致 Al^{3+}吸附在电极表面，形成了电活性较差的 CGA-Al^{3+}、NCGA-Al^{3+}复合物。进一步采用 DPV 技术就两种修饰电极对 Al^{3+}的响应进行比较，结果如图 2F 所示。NCGA/CNTs 修饰电极（蓝线）的电流下降率与 Al^{3+}在 0.01 ～ 1 μmol • L^{-1} 和 1 ～ 10 μmol • L^{-1} 内呈现出良好的线性关系，其线性方程分别为 $\triangle I/I_0 = 3.86C + 0.13$（$r = 0.99$）和 $\triangle I/I_0 = 0.017C + 0.55$（$r = 0.98$）。而 CGA/CNTs 修饰电极（黑线）的电流下降率与 Al^{3+}浓度在 0.01 ～ 10 μmol • L^{-1} 内不呈现线性关系。上述电化学结果表明 NCGA 和 Al^{3+}有更强的相互作用，导致 NCGA 比 CGA 对 Al^{3+}有更好的电流响应。

3.2 *基于 NCGA 的 Al^{3+}的紫外吸收 / 电化学双信号响应的分析新方法的方法学考察*

3.2.1　线性关系　如图 3A 所示，随着 Al^{3+}浓度的增加，325 nm 处的吸收降低同时伴随 365 nm 新峰生成，277 nm 和 340 nm 处的等吸收点不变。A_{365}/A_{325} 与 Al^{3+}的浓度在 0.1 ～ 100 μmol • L^{-1} 呈现出良好的线性关系。其线性方程为 $A_{365}/A_{325} = 0.017C + 0.29$（$r = 0.99$）。根据检测限 ＝ $3\sigma/k$，计算基于紫外吸收法的检测限为 0.034 μmol • L^{-1}，其中，σ 为 10 μmol • L^{-1} NCGA 在空白溶液中重复测量 19 次吸光度比值 A_{365}/A_{325} 的标准偏差，k 为斜率。图 3B 为 NCGA/CNTs/GC 修饰电极对不同浓度 Al^{3+}的 DPV 电流响应。由图 3 可知，随着 Al^{3+}浓度的增加，电极的电流逐渐下降，其电流下降率与 Al^{3+}浓度在 0.01 ～ 0.1 μmol • L^{-1}（$\triangle I/I_0 = 3.86C + 0.13$，$r = 0.99$）、0.1 ～ 10 μmol•$L^{-1}$（$\triangle I/I_0 = 0.017C + 0.55$，$r = 0.98$）和 10 ～ 100 μmol•$L^{-1}$（$\triangle I/I_0 = 0.0014C + 0.71$，$r = 0.97$）内呈现出良好的线性关系。检测限为 0.45 nmol • L^{-1}。

3.2.2　选择性　方法的选择性对于生理环境下复杂生物样品的分析至关重要，因此本研究考察了生物样品中共存的其他金属离子以及生理活性物质包括葡萄糖（GLU）、尿酸（UA）和抗坏血酸（AA）对该方法的干扰。如图 4A 所示，当分别往含有 10 μmol • L^{-1} NCGA 的 10 mmol • L^{-1} Tris-HCl（pH 7.4）溶液中加入生理浓度的各干扰金属离子和生理活性物质时，10 μmol • L^{-1} Na^+、4 μmol • L^{-1} K^+、20 μmol • L^{-1} Zn^{2+}、1 mmol • L^{-1} Ca^{2+}、1 mmol • L^{-1} Mg^{2+} 以 及 5 mmol • L^{-1} GLU、0.2 mmol • L^{-1} UA 和 2 μmol • L^{-1} AA 的 A_{365}/A_{325} 响应最大不超过 Al^{3+}响应的 5%，说明基于 NCGA 的紫外分析方法对生理环境下共存的大多数金属离子以及其他生理活性物质具有很好的抗干扰能力。值得注意的是，5 μmol • L^{-1} Cu^{2+}、2 μmol • L^{-1} Fe^{2+}、

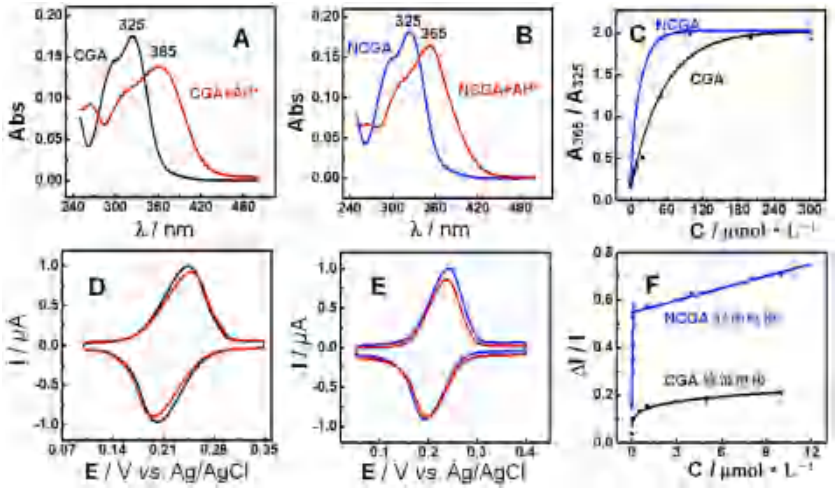


图 2　CGA（黑线）、NCGA（蓝线）与 Al^{3+}作用（红线）的紫外吸收响应（A、B、C）及循环伏安响应（D、E，F）比较

Fig 2　UV absorption（A，B，and C）and cyclic voltammetry（D，E，and F）responses of CGA（black lines）and NCGA（blue lines）toward Al^{3+}（red lines）

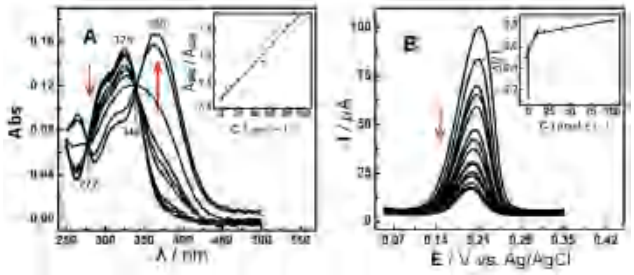


图 3　不同浓度 Al^{3+}在 NCGA 溶液中的紫外吸收响应（A）和 NCGA/CNTs/GC 电极上的差分脉冲响应（B）

Fig 3　UV absorption responses of NCGA（A）and DPV responses of NCGA/CNTs/GC electrode（B）toward different concentrations of Al^{3+}

2 μmol • L^{-1} Fe^{3+}在 NCGA 体系产生了明显的紫外响应，这是由于这三种金属离子和 NCGA 之间存在一定的配位作用[16]，后续研究我们将筛选合适的掩蔽剂来消除这三种金属离子的光谱学干扰。电化学测试结果如图 4B 所示，结果表明除了 Cu^{2+}、Fe^{2+}和 Fe^{3+}外，其他金属离子在 NCGA/CNTs/GC 修饰电极上不产生明显的电流信号。同时，电化学活性物 AA、GLU 和 UA 对修饰电极的电流响应也不产生明显干扰。因此本方法对 Al^{3+}具有一定的选择性。

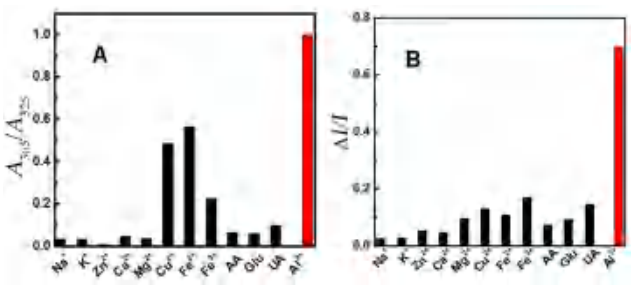


图 4　干扰物质和 Al^{3+}对 NCGA 紫外响应（A）及电化学响应（B）的柱状图

Fig 4　Histograms of the UV absorption（A）and electrochmical（B）responses of NCGA toward the interfering substances and Al^{3+}

为了进一步考察基于 NCGA 的紫外 / 电化学双信号响应的分析方法的选择性，对实际生物样品大鼠血清分别进行了紫外和电化学测定，结果如图 5 所示。10 μmol • L^{-1} NCGA 在 325 nm 和 365 nm 的紫外吸收在 2 mL 0.01 μmol • L^{-1} Tris-HCl（pH 7.0）缓冲溶液中和含有 4 μL 血清的 0.01 mol • L^{-1} Tris-HCl（pH 7.0）缓冲溶液中完全重合（见图 5A）。NCGA/CNTs/GC 电极在 1 mL 0.1 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）缓冲溶液的 DPV 曲线和含有 2 μL 血清的 0.1 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）缓冲溶液中完全重合，如图 5B 所示，这表明大鼠血清中生理浓度的 Al^{3+}经稀释后低于本方法的检测限，未被检出。同时也说明血清中内源性物质对本方法不干扰，该方法对稀释 500 倍的血清具有很好的选择性，可进一步用于实际样品中 Al^{3+}的检测。

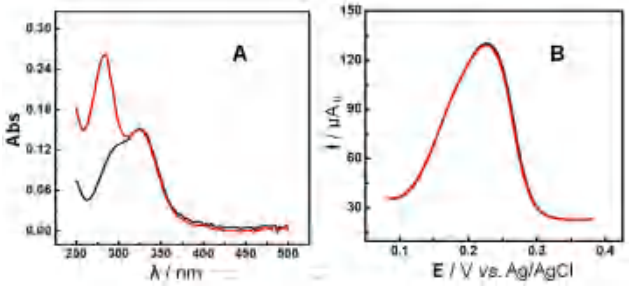


图 5　加入大鼠血清前（黑线）、后（红线）的紫外吸收（A）和差分脉冲（B）响应

Fig 5　UV absorption（A）and DPV（B）responses before（black lines）and after（red lines）adding rat serum

3.3　生物样品检测

以 2 mL 含有 4 μL 血清的 0.01 mol • L^{-1} Tris-HCl（pH 7.0）溶液中加入 10 μmol • L^{-1} NCGA 作为紫外测试底液，分别加入高、中、低浓度的 Al^{3+}

溶液进行紫外测试，每个浓度重复测定 3 次，计算加标回收率，结果表明其加标回收率在 97.4% ～ 101%，*RSD* 在 0.62% ～ 2.1%。以 1 mL 含有 2 μL 血清的 0.1 mol • L^{-1} PBS（pH 7.0）溶液作为电化学测试底液，以 NCGA/CNTs/GC 修饰电极为工作电极，分别加入高、中、低浓度的 Al^{3+}溶液后进行电化学 DPV 测试，每个浓度重复测定 3 次，计算加标回收率，结果表明其加标回收率在 98.5% ～ 99.4%，*RSD* 在 0.49% ～ 3.6%。回收率和精密度良好，测定结果准确可靠。

4 小结

基于 NCGA 与 Al^{3+}的相互作用，利用 NCGA 同时作为识别元件和紫外 / 电化学探针，本研究报道了一种紫外吸收 / 电化学双信号响应的 Al^{3+}分析新方法。方法操作简单、灵敏度和选择性良好，能够实现 Al^{3+}的快速定量检测，可用于大鼠血清中的 Al^{3+}的精准测量。该方法有望应用于 Al^{3+}相关的生理病理事件研究。

参考文献

[1] Good PF，Olanow CW，Perl DP. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson’s disease：a LAMMA study [J]. Brain Res，1992，593（2）：343-346.

[2] Verstraeten SV，Aimo L，Oteiza PI. Aluminium and lead：molecular mechanisms of brain toxicity [J]. Arch Toxicol，2008，82：789-802.

[3] Flaten TP. Aluminium as a risk factor in Alzheimer’s disease，with emphasis on drinking water [J] Brain Res Bull，2001，55（2）：187-196.

[4] Bianchi F，Maffini M，Mangia A，et al. Experimental design optimization for the ICP-AES determination of Li，Na，K，Al，Fe，Mn and Zn in human serum [J]. J Pharm Anal，2007，43（2）：659-665.

[5] Zheng F，Hu B. Novel bimodal porous *N*-（2-aminoethyl）-3-aminopropyltrimethoxysilane-silica monolithic capillary microextraction and its application to the fractionation of aluminum in rainwater and fruit juice by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Spectrochim Acta Part B At Spectrosc，2008，63（1）：9-18.

[6] Mu YL，Zhang CJ，Gao ZL，et al. A highly selective colorimetric，absorption and fluorescence probe for Al^{3+}detection based on a new Schiff base compound [J]. Synth Met，2020，262：116334.

[7] Qin JC，Fu ZH，Tian LM，et al. Study on synthesis and fluorescence property of rhodamine-naphthalene conjugate [J]. Spectrochim Acta A，2020，229：117868.

[8] Zhu Q，Li L，Mu L，et al. A ratiometric Al^{3+} ion probe based on the coumarin-quinoline FRET system [J]. J Photochem，2016，328：217-224.

[9] Deka K，Das DK. Schiff base modified Pt electrode as sensor for detecting Al（Ⅲ）and Pb（Ⅱ）[J]. J Indian Chem Soc 2017，56（8）：832-837.

[10] Shervedani RK，Rezvaninia Z，Sabzyan H，et al. Characterization of gold-thiol-8-hydroxyquinoline self-assembled monolayers for selective recognition of aluminum ion using voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy [J]. Anal Chim Acta，2014，825：34-41.

[11] Esmaelpourfarkhani M，Rounaghi GH，Arbab-Zavar MH. Construction of a new aluminum（Ⅲ）cation selective electrode based on 12-crown-4 as an ionophore [J]. J Braz Chem Soc，2015，26：963-969.

[12] Kalinowska M，Gryko K，Gołębiewska E，et al. Fe（Ⅲ）and Cu（Ⅱ）complexes of chlorogenic acid：spectroscopic，thermal，anti-/pro-oxidant，and cytotoxic studies [J]. Materials，2022，15（19）：6832.

[13] Marković S，Tošović J，Marković JMD. Synergic application of spectroscopic and theoretical methods to the chlorogenic acid structure elucidation [J]. Spectrochim Acta A，2016，164：67-75.

[14] Navarro-Orcajada S，Matencio A，Vicente-Herrero C，et al. Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid，in comparison with chlorogenic acid [J]. Sci Rep，2021，11（1）：3275.

[15] Takahashi S，Wada R，Muguruma H，et al. Analysis of chlorogenic acids in coffee with a multi-walled carbon nanotube electrode [J]. Food Anal Methods，2020，13：923-932.

（收稿日期：2023-11-27；修回日期：2023-12-27）

马缨丹中一个 2，3- 环氧角鲨烯环化酶基因 *LaOSC1* 的鉴定和克隆

高蝶娜，范志高，冯时茵（广州中医药大学第一附属医院，广州　510405）

摘要：目的　鉴定并克隆药用植物马缨丹体内活性成分三萜皂苷生物合成途径的关键限速酶基因 2，3- 环氧角鲨烯环化酶基因。**方法**　基于序列比对法，从马缨丹的转录组数据中鉴定出候选 2，3- 环氧角鲨烯环化酶基因，利用生物信息学软件分析其序列特征、预测其编码蛋白的生化特征及其进化关系，设计特异性引物从马缨丹 cDNA 中扩增该基因并构建克隆载体。**结果**　成功鉴定出一个 2，3- 环氧角鲨烯环化酶基因 *LaOSC1*，该基因具备 *OSC* 基因特有的保守功能域。进化分析结果提示其可能编码 *β*-AS 蛋白，可催化 2，3- 环氧角鲨烯形成 *β*- 香树脂醇，并成功构建了 *LaOSC1* 的克隆载体。**结论**　成功鉴定并克隆了马缨丹中一个 2，3- 环氧角鲨烯环化酶基因 *LaOSC1*，为后续对马缨丹体内活性成分的生物合成途径研究奠定了基础。

关键词：马缨丹；2，3- 环氧角鲨烯环化酶；基因克隆
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0955-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.020

Identification and cloning of a 2, 3-oxidosqualene cyclase gene *LaOSC1* from *Lantana camara*

GAO Die-na, FAN Zhi-gao, FENG Shi-yin (*The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine*, *Guangzhou*　510405)

Abstract: Objective　To identify and clone candidate 2, 3-oxidosqualene cyclase gene, a rate-limiting enzyme involved in the biosynthetic pathway of active triterpenoid components, in the medicinal plant *Lantana camara*. **Methods**　Candidate squalene 2, 3-oxidosqualene cyclase gene was identified from transcriptome data of *Lantana camara* based on sequence similarity comparison. Its sequence characteristics, biological characteristics of its coding protein, and evolutionary relationship were analyzed by bioinformatics softwares. Specific primers were designed to amplify the squalene 2, 3-oxidosqualene cyclase gene from cDNA of *Lantana camara* and construct the clone vector. **Results**　A 2, 3-oxidosqualene cyclase gene *LaOSC1* with the conserved domain of *OSC* gene was successfully identified, whose coding protein might catalyze the formation of beta-amyrin from 2, 3-oxidosqualene cyclase. The phylogenetic tree suggested that it might encode *β*-amyrin synthase protein, and the cloning vector of *LaOSC1* was successfully constructed. **Conclusion**　*LaOSC1*, a 2, 3-oxidosqualene cyclase gene from *Lantana camara*, is successfully identified and cloned, which lays a foundation for the subsequent study of the biosynthetic pathway of active components in *Lantana camara*.

Key words: *Lantana camara*; 2, 3-oxidosqualene cyclase; gene cloning

马缨丹 *Lantana camara* L. 是一种马鞭草科马鞭草属的灌木植物，原产于美洲，在我国南方各省均有分布，多为野外逸生，亦有栽培。马缨丹别名五色梅、七变花、如意草等，是一种最常见的入侵物种。马缨丹的根、叶和花均可作药用，具有清热解毒的功效，花还可止血，叶还可祛风止痒，根还可散结 [1]。

除了挥发油类化合物 [2-3]，马缨丹的主要化学成分为三萜类化合物，以齐墩果烷型三萜皂苷为主 [4-5]。据文献报道，马缨丹的三萜皂苷不仅具有

作者简介：高蝶娜，女，本科在读，主要从事中药质量评价研究，email：m13512779846@163.com

抗肿瘤等药理活性[6-7]，同时还具有杀虫[8]、化感作用[9]。因此，三萜皂苷的含量是评价马缨丹质量的一个重要指标。

三萜皂苷的生物合成起始于 MVA 途径，形成重要的中间体异戊烯基焦磷酸盐（IPP）；两个单元的 IPP 与其同分异构体二甲基烯丙基焦磷酸盐（DMAPP）缩合生成另一个重要的底物法尼基焦磷酸（FPP）；接着，两个单元的 FPP 缩合形成长链状的角鲨烯，再进一步被氧化为 2，3- 环氧角鲨烯，2，3- 环氧角鲨烯经过角鲨烯环化酶（oxidosqualene cyclase，OSC）催化，即可生成相应的三萜母核[10]。因此，研究马缨丹中的 OSC 可以为其活性三萜皂苷的生物合成与积累研究奠定基础。

本研究通过序列比对的方法，从马缨丹转录组数据中鉴定候选的 2，3- 环氧角鲨烯环化酶基因并进行生物信息学分析，并成功从叶片 cDNA 中扩增和克隆得到该基因，可为进一步揭示马缨丹中活性成分的生物合成途径奠定基础。

1　材料

1.1　生物材料

马缨丹样品采自广东省广州市火炉山，经广州中医药大学第一附属医院药剂科冯时茵药师鉴定为马缨丹 *Lantana camara* L.。趁鲜用流水清洗叶片表面并用吸水纸吸干，然后剪取叶片迅速置于液氮中速冻，于－ 80 ℃保存，用于总 RNA 的提取。大肠埃希菌 *Escherichia coli* Rosseta 感受态细胞为实验室自备。

1.2　生化试剂

复杂植物 RNA 快速提取试剂盒（RN53）（北京艾莱德生物科技有限公司）；cDNA 第一链合成试剂盒（北京擎科生物科技股份有限公司）；FastPfu DNA 聚合酶（广州鼎国生物技术有限公司）；零背景克隆载体 *pEASY-Blunt*（北京全式金生物公司）；DNA 切胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒（Takara）；引物合成及 Sanger 测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

2　方法

2.1　基因鉴定与生物信息学分析

利用已报道其他物种的 OSC 蛋白序列为参照，采用 TBtools 进行本地 blast，与马缨丹的转录组拼接序列进行比对，获取候选蛋白序列及其相应的核苷酸序列。接着利用 NCBI 的 ORF finder 进行 CDS 区的预测。采用在线工具 HMM search 对候选基因进行保守功能域的检测。采用 Mega X 对 LaOSC1 与 11 个已报道功能的其他物种的 OSC（见表 1）进行多种序列比对，利用 Neighbor-joining（NJ）法构建系统进化树，Bootstrap 值设置为 1000。

表 1　用于进化分析的其他植物来源 OSC 信息

Tab 1　Other plant-derived OSC information used for evolutionary analysis

登录号	蛋白名称	来源植物	简写
BAA76902.1	cycloartenol synthase	*Glycyrrhiza glabra*	GgCAS
BAA33460.1	cycloartenol synthase	*Panax ginseng*	PgCAS
ABF57670.1	lanosterol synthase	*Arabidopsis thaliana*	AtLaS
BAA33462.1	lanosterol synthase	*Panax ginseng*	PgLaS
AEX99665.1	mixed amyrin synthase	*Catharanthus roseus*	CrASab
AIS39793.1	mixed amyrin synthase	*Ilex asprella*	IaASab
BAA89815.1	beta-amyrin synthase	*Glycyrrhiza glabra*	GgASb
CAD23247.1	beta-amyrin synthase	*Medicago truncatula*	MtASb
ACA13386.1	beta-amyrin synthase	*Artemisia annua*	AaASb
BAB83087.1	lupeol synthase	*Betula platyphylla*	BpLuS
BAA86932.1	lupeol synthase	*Taraxacum officinale*	ToLuS

利用在线工具 Swiss-model 进行蛋白质结构预测，发现 LaOSC1 与木榄 Bruguiera gymnorhiza 的 Beta-amyrin synthase（A8CDT2.1.A）具有最高的序列相似性。设定 A8CDT2.1.A 为参照，进行 LaOSC1 蛋白模型的构建，默认参数。采用在线工具 Protparam 进行蛋白质理化性质预测；采用在线工具 SignalP 6.0 进行蛋白质信号肽预测；采用在线工具 WoLFPSORT 进行亚细胞定位预测。

2.2　马缨丹叶片总 RNA 提取及 cDNA 合成

取马缨丹新鲜叶片，置于液氮预冷的研钵中，在液氮中迅速研磨成极细的粉末状。迅速将适量（约 0.1 g）粉末装入具有 1 mL 裂解液的 1.5 mL EP 管中，按照试剂盒说明书进行总 RNA 的提取。吸取 5 μL 总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行水平电泳，并用超微量紫外分光光度计检测其浓度。质量合格的样品使用 cDNA 合成试剂盒反转录成 cDNA。

2.3　*LaOSC1* 基因的扩增与克隆

根据转录组拼接所得的转录本信息获得的 *LaOSC1* 基因 CDS 序列，采用 Primer premier 软件设计特异性引物（见表 2）。PCR 反应体系为：2×Pfu PCR Green Mix 25 μL，引物（10 μmol • L^{-1}）各 1 μL，cDNA 模板 4 μL，ddH_2O 补至 50 μL。PCR 反应温度程序为：94 ℃，5 min，32 个循环（94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min）；72 ℃，5 min。扩增完成后，用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行水平电泳，对目的片段（2300 bp）进行切胶回收和 DNA 纯化，采用超微量紫外分光光度计检测其浓度。接着，将纯化的目的片段与 *pEASY-*

Blunt 零背景克隆载体按照相应比例进行连接，转入感受态细胞 Trans T1 中，活化后将菌液均匀涂布于含有氨苄西林抗性的 LB 培养基上，37 ℃过夜培养，挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 验证，挑选阳性克隆进行测序。

表 2　*LaOSC1* 引物设计

Tab 2　Primer design for *LaOSC1*

引物名称	引物序列（5'→3'）
LaOSC1-F	ATGTGGAGACTTAAGATTGC
LaOSC1-R	TTAAGGAAGTGCAACGTGAT

3　结果与分析

3.1　*LaOSC1* 编码蛋白保守基序的分析

本文在马缨丹的转录组数据中挖掘得到一个 *OSC* 基因的转录本。该转录本全长 2481 nt，命名为 *LaOSC1*。根据 ORF finder 的预测，*LaOSC1* 基因的开放阅读框（open reading frame，ORF）长度为 2274 nt，编码一个长度为 757 aa 的蛋白质。

HMM 在线工具预测结果显示，*LaOSC1* 的氨基酸序列包含 *OSC* 基因所必需的两个保守功能域，包括 N 端（98 ～ 405 nt，PF13249）和 C 端（414 ～ 752 nt，PF13243），如图 1 所示。

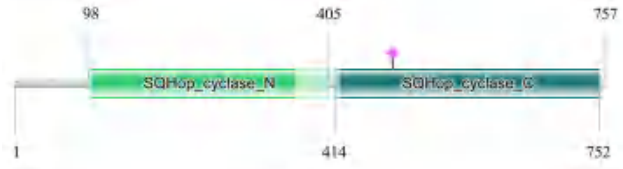


图 1　*LaOSC1* 的保守功能域分布

Fig 1　Conserved domain of *LaOSC1*

3.2　*LaOSC1* 的系统发育分析

利用 *LaOSC1* 与已报道的 10 个其他植物来源 *OSC* 基因的氨基酸序列构建邻接法系统进化树。由结果可知，根据酶功能产物的不同 *OSC* 基因被聚为不同的分支，包括合成 *β*- 香树脂醇（beta-amyrin）的 ASb，同时合成 *α*- 香树脂醇（alpha-amyrin）和 *β*- 香树脂醇的 ASab，合成羽扇豆醇（lupeol）的 LuS，合成羊毛甾醇（lanosterol）的 LaS，以及合成环占屯阿醇（cycloartenol）的 CAS，共 5 个分支。*LaOSC1* 归属于 ASb 分支（见图 2）。该分支的 OSC 可将底物 2，3- 环氧角鲨烯直接转化为五环三萜 *β*- 香树脂醇，即齐墩果烷型三萜的母核。这提示候选的 LaOSC1 很可能是一个 ASb 蛋白。

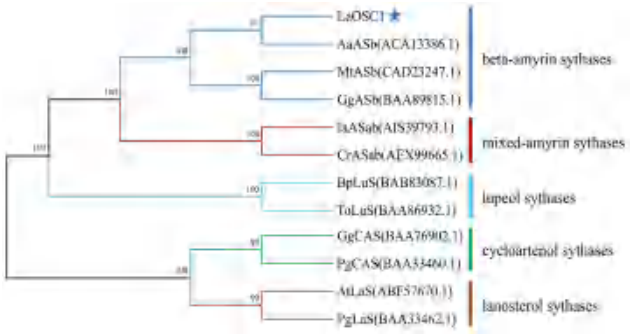


图 2　*LaOSC1* 的系统进化树

Fig 2　Phylogenetic tree of *LaOSC1*

为了更详细地了解与蛋白生化功能相关的序列特征，本研究利用 *LaOSC1* 基因与 3 个明确报道的 *β*- 香树脂醇合酶基因的氨基酸序列进行了多重序列比对，并从中发出了 4 个 QW 基序、1 个 SDCTAE 基序和 1 个 MWCYCR 基序（见图 3）。其中 QW 基序可以强化酶的结构，稳定其碳正离子中间体 [11]；SDCTAE 基序与底物的结合有关；MWCYCR 基序则与其产物特异性有关 [12]。

3.3　LaOSC1 的蛋白结构预测

本研究利用 swiss-model 在线工具对 LaOSC1 进行蛋白结构预测。初步的序列相似性结果发现，LaOSC1 与数据库中的木榄（*Bruguiera gymnorhiza*）*β*- 香树脂醇合酶（A8CDT2.1.A）具有 81.88% 的序列一致性。以该蛋白模型作为参照进行 LaOSC1 的蛋白结构预测，结果两者呈现出高度相似的蛋白结构（见图 4）。

3.4　LaOSC1 蛋白性质预测

通过预测，LaOSC1 蛋白分子量为 87.28 kDa，等电点为 5.87，不稳定系数为 47.69，表明该蛋白不稳定。脂溶性指数为 78.85，亲水性平均值（GRAVY）为－0.323，提示该蛋白为亲水性蛋白。通过 SignalP 分析发现，*LaOSC1* 基因编码的蛋白不存在信号肽；WoLFPSO-RT 预测表明，*LaOSC1* 编码的蛋白定位于细胞质。在线网站的预测仅能提供参考，具体的结果仍需要通过亚细胞定位实验进行进一步的验证。

3.5　*LaOSC1* 基因的扩增与克隆

利用试剂盒法提取马缨丹叶片的总 RNA，取 $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ 且电泳条带较为完整的样品（见图 5A）进行后续实验。将质量合格的总 RNA 反转录成 cDNA，接着用特异性引物成功扩增出 *LaOSC1* 的 CDS 序列（见图 5B）。然后，利用一步克隆法将纯化的扩增产物连接至 *pEASY* 载体，转化至感受态大肠埃希菌中，利用 PCR 筛选出阳性菌（见

图 3　*LaOSC1* 的多重氨基酸序列比对

Fig 3　Multiple sequence alignment of *LaOSC1*

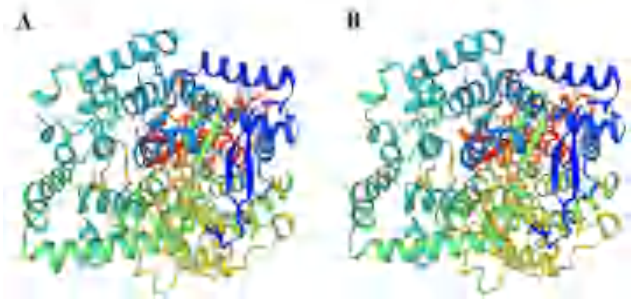


图 4　参考蛋白 A8CDT2.1.A（A）和 LaOSC1（B）的蛋白结构预测

Fig 4　Protein structure prediction of reference protein A8CDT2.1.A（A）and LaOSC1（B）

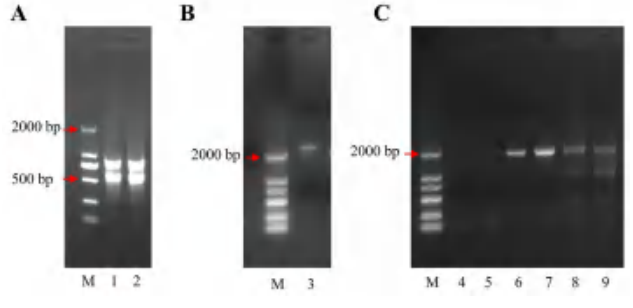


图 5　马缨丹叶片 RNA 提取、*LaOSC1* 基因扩增以及菌落 PCR 结果图

Fig 5　RNA extraction of the leaves of *Lantana camara*，gene amplification of *LaOSC1*，and colony PCR

A. 马缨丹 RNA 电泳结果（RNA electrophoresis）；B. *LaOSC1* 扩增结果（gene PCR of *LaOSC1*）；C. LaOSC1 菌落 PCR 结果（colony PCR of *LaOSC1*）；M. DNA 标记物（DNA markers）；1 ～ 2. 马缨丹叶片 RNA（RNA extracted from the leaves）；3. *LaOSC1* 基因扩增子（*LaOSC1* gene amplicon）；4 ～ 5. 空白对照（negative control）；6 ～ 9. 菌落 PCR 扩增子 01 ～ 04（colony PCR amplicons 01 ～ 04）

图 5C）。取阳性菌株进行扩大培养，提取重组质粒，并进行 Sanger 测序验证。测序结果表明，*LaOSC1* 的 CDS 区域与转录组预测的序列相似度达 100%（见图 6）。以上实验说明本文成功扩增并获得 *LaOSC1* 的重组质粒。

4　讨论

本文从马缨丹的转录组中筛选得到一个具有全长的 *OSC* 基因转录本，并通过系列的生物信息分析技术获得了相应的 ORF 序列、氨基酸序列、保守功能域及基序预测、蛋白结构与性质预测等一系列结果，最后成功地扩增和克隆出该基因。

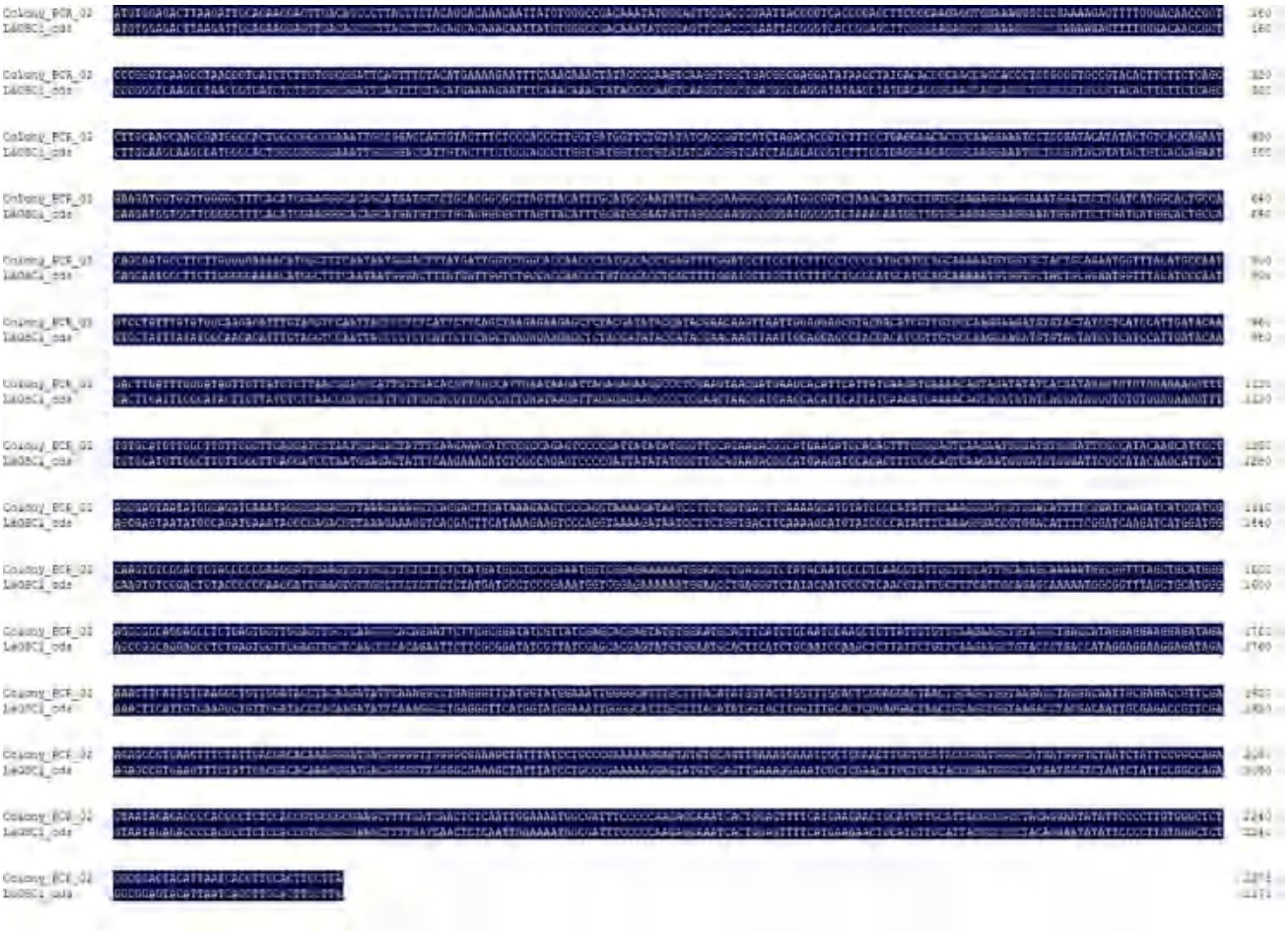


图 6　*LaOSC1* 的菌落 PCR 扩增子与转录组预测的序列比对结果

Fig 6　Sequence alignment of colony PCR amplicon and transcriptome prediction of *LaOSC1*

这些结果为后续 LaOSC1 的酶功能验证奠定了坚实的基础。

对底物 2，3- 氧化鲨烯的环化是三萜类和甾醇类化合物生物合成途径的一个关键步骤，产生了不同的母核类型。按照结构类型不同，三萜母核包括链状和环状（1 ～ 5 环）[13]。目前已报道从植物中发现了一百多种不同骨架的三萜类化合物 [14]，说明可能存在相应数量的不同的 OSC。

事实上，2，3- 氧化鲨烯可被环化为两种不同形式，一种是生成三萜骨架的“椅 - 椅 - 椅”式，另一种是生成甾醇的“椅 - 船 - 椅”式。本文构建的进化树中，LaOSC1 与香树脂醇合酶和羽扇豆醇合酶聚为一支，而环占屯阿醇合酶与羊毛甾醇合酶聚为一支；前者的产物即“椅 - 椅 - 椅”式，后者的产物即“椅 - 船 - 椅”式。

OSC 是一个多基因家族。许多物种呈现出多 *OSC* 基因的现象，比如拟南芥基因组中有 13 个 *OSC* 基因 [15]，水稻基因组中有 12 个 *OSC* 基因 [16]。据报道，研究人员从马缨丹体内分离鉴定出多种三萜皂苷，包括齐墩果烷型、熊果烷型和羽扇豆烷型 [4]。所以，可以预测马缨丹体内很可能也存在着多个 *OSC* 基因以及多功能 *OSC* 基因。

本文鉴定和克隆的 LaOSC1 的系统进化分析提示其很可能为 ASb，催化 2，3- 氧化鲨烯生成 *β*- 香树脂醇，即齐墩果烷型的三萜皂苷母核。因此，LaOSC1 与香树脂醇合酶 AS、羽扇豆醇合酶 LuS 的亲缘关系较近，其酶活产物均为“椅 - 椅 - 椅”式的三萜类母核；而羊毛甾醇合酶 LaS 和环占屯阿醇合酶 CAS 则催化生成“椅 - 船 - 椅”式甾醇类母核。三萜皂苷具有多种良好的药理活性 [17-18]，药用价值高，因此研究马缨丹的三萜生物合成有助于其药用资源的开发利用。

参考文献

[1] 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，1998.

[2] 王如意，周伟明，陈柳生，等 . HS-SPME-GC-MS 联用分析五色梅不同部位中挥发性成分 [J]. 中成药，2016，38（8）：1862-1865.

[3] 高泽正，吴伟坚，吴建雄，等 . 固相微萃取气质联用分析马樱丹花的挥发性化学成分 [J]. 中草药，2004，35（12）：21-22.
[4] 何泽源，李金玲，梁秋浪，等 . 壮药马缨丹化学成分和药理作用研究进展及药理活性物质基础分析 [J]. 中药材，2021，44（3）：741-748.
[5] 马伟杰，肖定军，邓松之 . 马缨丹叶的三萜类化学成分研究 [J]. 广州化学，2004，29（4）：14-19.
[6] 莫云雁，李安，黄祖良 . 五色梅根三萜类物质镇痛和抗炎的实验研究 [J]. 时珍国医国药，2004，15（8）：477-478.
[7] Shamsee ZR，Al-Saffar AZ，Al-Shanon AF，et al. Cytotoxic and cell cycle arrest induction of pentacyclic triterpenoides separated from *Lantana camara* leaves against MCF-7 cell line in vitro [J]. Mol Biol Rep，2019，46（1）：381-390.
[8] 冼继东，庞雄飞，曾玲 . 异源次生化合物对美洲斑潜蝇种群控制作用的田间试验 [J]. 应用生态学报，2003，14（1）：97-100.
[9] 戚春林，谢贵水，李剑碧 . 不同生境中马缨丹不同部位水提液的化感效应研究 [J]. 中国农学通报，2013，29（9）：184-189.
[10] 罗祖良，张凯伦，马小军，等 . 三萜皂苷的合成生物学研究进展 [J]. 中草药，2016，47（10）：1806-1814.
[11] Abe I，Prestwich GD. Active site mapping of affinity labeled rat oxidosqualene cyclase [J]. J Biol Chem，1994，269：802-804.
[12] Kushiro T，Shibuya M，Masuda K，et al. Mutational studies on triterpene synthases：engineering lupeol synthase into b-amyrin synthase [J]. J Am Chem Soc，2000，122：6816-6824.
[13] Dewick PW. Medicinal natural products：a biosynthetic approach [M]. 2 New York：John Wiley & Sons，LTD；2002.
[14] Wang J，Guo YH，Yin X，et al. Diverse triterpene skeletons are derived from the expansion and divergent evolution of 2，3-oxidosqualene cyclases in plants [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol，2022，57（2）：113-132.
[15] Morlacchi P，Wilson WK，Xiong Q，et al. Product profile of PEN3：the last unexamined oxidosqualene cyclase in Arabidopsis thaliana [J]. Org Let，2009，11（12）：2627-2630.
[16] Thimmappa R，Geisler K，Louveau T，et al. Triterpene biosynthesis in plants [J]. Annu Rev Plant Biol，2014，65：225-257.
[17] 杨怡侠，刘天龙，刘晶，等 . 黄芪三萜皂苷通过抑制 TLR-4/NF-κB p65 信号调节的炎症反应而发挥保护病毒性心肌炎的作用研究 [J]. 中南药学，2018，16（12）：1705-1709.
[18] 许福春，杜茂波 . 阿里红总三萜酸的制备及其抗哮喘作用研究 [J]. 中南药学，2023，21（8）：2053-2058.

（收稿日期：2023-11-17；修回日期：2023-12-17）

外水相组成对醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球理化性质的影响

郑明秀[1]，刘磊[1]，梁荣财[1, 2*]（1. 烟台大学药学院，烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心，分子药理和药物评价教育部重点实验室（烟台大学），山东 烟台 264005；2. 山东绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室，山东 烟台 264003）

摘要：目的 采用 *W/O/W* 和 *O/W* 乳化溶剂挥发法制备醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球，考察在外部水相中加入不同浓度的氯化钠和甘露醇对所制备微球理化性质的影响。**方法** 醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球采用 *W/O/W* 和 *O/W* 乳化溶剂挥发法制备，以微球的表面形态、内部形态、粒径、载药量、体外累计释放行为、结构和晶型来评价不同浓度的添加剂对两种制备方法所制得微球的影响。**结果** 采用 *W/O/W* 制备的微球增加外水相中氯化钠的浓度，微球载药量增加、粒径减小、突释量降低、微球表面及内部孔洞减少；增加外水相中甘露醇的浓度，微球载药量增加、粒径减小，突释量降低、微球表面孔洞减少，内部孔洞未减少；*O/W* 法制备的微球增加水相中氯化钠和甘露醇的浓度，微球载药量增加、粒径减小、突释量降低、微球表面及内部孔洞减少。**结论** 通过增加外部水相中添加剂的浓度，有效改善了醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球的结构和性质。

关键词：醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球；氯化钠；甘露醇；乳化溶剂挥发法
中图分类号：R943 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0960-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.021

作者简介：郑明秀，女，硕士，主要从事长效缓控释制剂研究，email：mingxiu1228@163.com *通信作者：梁荣财，男，博士，副教授，主要从事长效缓控释制剂研究，email：liangrongcai@luye.com

Effect of external aqueous phase composition on the physicochemical properties of goserelin acetate PLGA microspheres

ZHENG Ming-xiu[1], LIU Lei[1], LIANG Rong-cai[1, 2*] (1. *School of Pharmacy*, *Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong*, *Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation* (*Yantai University*), *Ministry of Education*, *Yantai University*, *Yantai Shandong* 264005; 2. *State Key Laboratory of Long-acting and Targeting Drug Delivery System*, *Shandong Luye Pharmaceutical Co*., *Ltd.*, *Yantai Shandong* 264003)

Abstract: Objective To determine the effect of sodium chloride and mannitol in the outer aqueous phase on the physicochemical properties of the goserelin acetate PLGA microspheres. **Methods** Goserelin acetate PLGA microspheres were prepared by *W/O/W* and *O/W* emulsion-solvent evaporation methods. The effects of different concentrations of sodium chloride and mannitol on the microspheres were evaluated in terms of surface morphology, internal morphology, particle size, drug loading, in vitro release, structure and crystal form. **Results** For microspheres prepared by *W/O/W* method, an increase in the concentration of both sodium chloride and mannitol in the outer aqueous phase resulted in an increase in drug loading, a decrease in particle size and burst release, and a reduction in surface pores. Sodium chloride instead of mannitol reducted the internal pores of the microspheres. For microspheres prepared by the *O/W* method, an increase in the concentration of both additives resulted in an increase in drug loading, a decrease in particle size and burst release, and a reduction in both surface and internal pores of the microspheres. **Conclusion** By increasing the concentration of sodium chloride and mannitol in the outer aqueous phase, the structure and properties of goserelin acetate PLGA microspheres are effectively improved.

Key words: goserelin acetate PLGA microsphere; sodium chloride; mannitol; emulsified solvent evaporation method

聚乳酸 - 乙醇酸共聚物（PLGA）是一种具有生物相容性和生物可降解性的聚合物[1-2]，广泛用于多肽或蛋白质缓释剂型的载体。PLGA 微球[3]作为一种长效释放产品（LARS）的有效剂型，通过将药物分散或包裹在其中，使酶不易将药物分解，提高药物的稳定性，减少给药频率，从而能够缓控释给药，提高患者用药依从性和对药物的耐受性，以此达到治疗疾病的目的[4]。

戈舍瑞林是一种具有良好水溶性的小分子人工合成多肽，具有物理和化学稳定性，是一种用于治疗前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜异位症等疾病的促性腺激素释放激素（gondaotropin-releasing hormone，GnRH）的类似物[5]，且比 GnRH 有着更长的血浆清除半衰期，更高的药效，在治疗过程中能够有效地降低循环中促性腺激素（黄体生成素和卵泡刺激素）和性激素的水平[6]，但是停药后这一作用便消失，为了能够长期给药，非常有必要将其开发成长效注射剂。PLGA 微球能够实现长期给药，但在制备 PLGA 微球时当有机溶剂从乳滴迁移至外水相中时，药物可能从乳滴扩散到外水相中，在微球变硬时聚集在微球表面，药物的溶解和扩散会导致药物突释[7-8]。这种突释效应会使大量的药物在短时间内释放导致血药浓度升高甚至高于中毒水平，进而引起一系列不良反应[9]，对后期药物的释放产生影响、达不到对疾病的治疗效果。因此通过在外部水相中加入不同浓度的添加剂来减轻渗透效应[10]，使微球表面孔道、内部结构发生变化，从而减慢药物向微球表面或近表面迁移，可有效减少药物的突释[7，11]。

本研究通过向外水相中加入不同浓度的氯化钠、甘露醇，考察不同添加剂在不同的制备方法中对醋酸戈舍瑞林微球理化性质的影响，为后续考察外水相组成对多肽类微球结构和性质影响的研究提供参考。

1 材料

T25 型高速均质机（德国 IKA 公司）；高速剪切分散乳化机（上海依卡机电制造有限公司）；1260 型高效液相色谱仪（Agilent 公司）；马尔文 3000 粒度仪（Malvern Instruments 公司）；Phenom XL 型台式扫描电子显微镜（荷兰 Phenom 公司）；GL21M 高速冷冻离心机（长沙湘智离心机仪器有限公司）；数显搅拌器（上海申生科技

有限公司）；FreeZone 型冻干机（美国 Labconco 公司）；SHZ-88 水浴恒温振荡器（江苏金怡仪器科技有限公司）；D2 PHASER 型 X 射线衍射仪（德国 Bruker 公司）；Nicole Tis 10 红外分光光度仪（美国 Thermo 公司）；万分之一电子天平（华志科学仪器有限公司）。

醋酸戈舍瑞林（Bachem Ag 公司）；PLGA（5050 2A，山东绿叶制药有限公司）；甘露醇溶液（山东齐鲁药业有限公司）；二氯甲烷、氯化钠（国药集团化学试剂有限公司）；聚乙烯醇（PVA）、溴化钾（美国 Sigma 公司）；磷酸（天津市科密欧化学试剂开发中心）；其余试剂均为色谱纯。

2　方法与结果

2.1　高效液相色谱条件

色谱柱：Agilent C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈∶水（0.5% 磷酸）＝ 25∶75（*V*/*V*）；柱温：40 ℃；流速：1 mL·min^{-1}；检测波长：220 nm；进样量：10 μL。醋酸戈舍瑞林的保留时间为 7.14 min。

2.2　醋酸戈舍瑞林微球的制备

2.2.1　*W/O/W* 乳化溶剂挥发法　将 PLGA 溶解于二氯甲烷中，形成油相（*O*），醋酸戈舍瑞林溶解于水中溶解，形成内水相（W_1），将内水相加入油相并在冰水浴下以 21 000 r·min^{-1} 的速度均质以形成初乳（W_1/O），将初乳缓慢加入 1% PVA（分别加入不同浓度的氯化钠和甘露醇）的外水相中，在高速剪切分散机中均质 2 min，形成复乳（*W/O/W*），并在机械搅拌器下固化 4 h，并将所得的溶液用离子水冲洗 3 次并过 100 目和 1200 目筛网，冷冻干燥后收球。

2.2.2　*O/W* 乳化溶剂挥发法　将醋酸戈舍瑞林和 PLGA 分别用冰醋酸和二氯甲烷溶解，将溶解的醋酸戈舍瑞林 - 冰醋酸溶液和 PLGA- 二氯甲烷溶液在 400 r·min^{-1} 磁力搅拌下混合均匀，形成油相（O），将油相转移到水相（含 1%PVA），用高速剪切分散机均质 2 min，形成水包油乳状液。乳液在机械搅拌器下固化 4 h，将所得溶液用去离子水冲洗 3 次并过 100 目和 1200 目筛网，冷冻干燥后收球。

2.3　粒径、载药量及包封率

使用马尔文 3000 粒度仪测定微球的粒径。以超纯水为分散介质，取适量微球加入分散介质中，超声 1 min，使微球分散均匀，平行测定三次，取平均值作为测量结果。

精密称取醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球 20 mg 于 10 mL 量瓶中，加入 2 mL 乙腈使其超声分散后，缓慢滴加 0.1% 的醋酸溶液，边加边振摇，并稀释至刻度，摇匀，以 13 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，按“2.1”项下色谱条件测定醋酸戈舍瑞林的含量。分别以下式计算其载药量和包封率：

载药量（%）＝微球中醋酸戈舍瑞林的重量 / 微球总重量 ×100%

包封率（%）＝实际载药量 / 理论载药量 ×100%

W/O/W 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球随着外水相中氯化钠和甘露醇浓度的增加，内水相中浓度保持不变的条件下，载药量和包封率增加，粒径减小（见表 1）。*O/W* 法制备的微球的载药量和包封率相较于 *W/O/W* 法降低，*O/W* 法制备的微球在水相中加入氯化钠使得载药量和包封率增加，粒径减小；水相中甘露醇的加入使得载药量和包封率增加，粒径减小（见表 2）。

表 1　不同浓度氯化钠及甘露醇对 *W/O/W* 法所制的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球的影响

Tab 1　Effect of different concentrations of sodium chloride and mannitol on goserelin acetate PLGA microspheres by *W/O/W* method

添加剂	浓度 /%	实际载药量 /%	包封率 /%	粒径 /μm
氯化钠	0	4.14±0.11	89.64±2.38	46.1±1.20
	0.5	4.18±0.13	90.48±2.81	44.3±0.90
	1	4.25±0.15	91.99±3.25	42.7±1.50
	2	4.31±0.14	93.29±3.03	40.2±1.30
	3	4.38±0.17	94.81±3.78	39.1±0.98
甘露醇	0	4.14±0.11	89.64±2.38	46.1±1.20
	0.5	4.17±0.17	90.25±3.78	45.9±0.95
	1	4.22±0.16	91.34±3.47	45.6±1.10
	2	4.28±0.14	92.64±3.68	43.2±0.90
	3	4.33±0.13	93.72±2.81	41.3±2.10

表 2　不同浓度氯化钠及甘露醇对 *O/W* 法所制的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球的影响

Tab 2　Effect of different concentrations of sodium chloride and mannitol on goserelin acetate PLGA microspheres by *O/W* method

添加剂	浓度 /%	实际载药量 /%	包封率 /%	粒径 /μm
氯化钠	0	3.39±0.11	73.37±2.38	47.9±1.40
	1	3.87±0.14	83.77±3.04	45.2±2.00
	3	3.61±0.18	78.14±3.90	46.9±1.30
甘露醇	0	3.39±0.11	73.37±2.38	47.9±1.40
	1	3.49±0.07	75.54±1.52	46.7±2.90
	3	4.04±0.12	87.45±2.60	44.9±2.10

2.4　表面及内部形态

取适量微球样品于导电胶上，真空条件下喷金处理后放置于扫描电镜下观察微球表面形态。取适量微球样品于培养皿中，在培养皿中加入适量液氮使微球冷冻后，用刀片将微球快速切割并黏附固定在导电胶上，真空条件下喷金处理后放

置于扫描电镜下观察微球内部形态。

结果 *W/O/W* 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球在外水相中没有加入氯化钠和甘露醇时，表面和内部有着相对均匀的孔洞，随着外水相中氯化钠浓度的增加，微球表面的孔洞逐渐减少，内部孔洞的结构也逐渐减小，当氯化钠浓度为 3%，微球表面及内部均无孔洞；随着外水相中甘露醇浓度的增加，微球表面孔洞减少，内部孔洞不存在减少的现象（见图 1）。对比 *W/O/W* 法和 *O/W* 法制备的微球在外水相中没有加入添加剂时，*O/W* 法所制的微球表面孔洞减少，内部几乎无孔洞，而在增加了氯化钠和甘露醇之后，微球表面和内部均无孔洞（见图 2）。

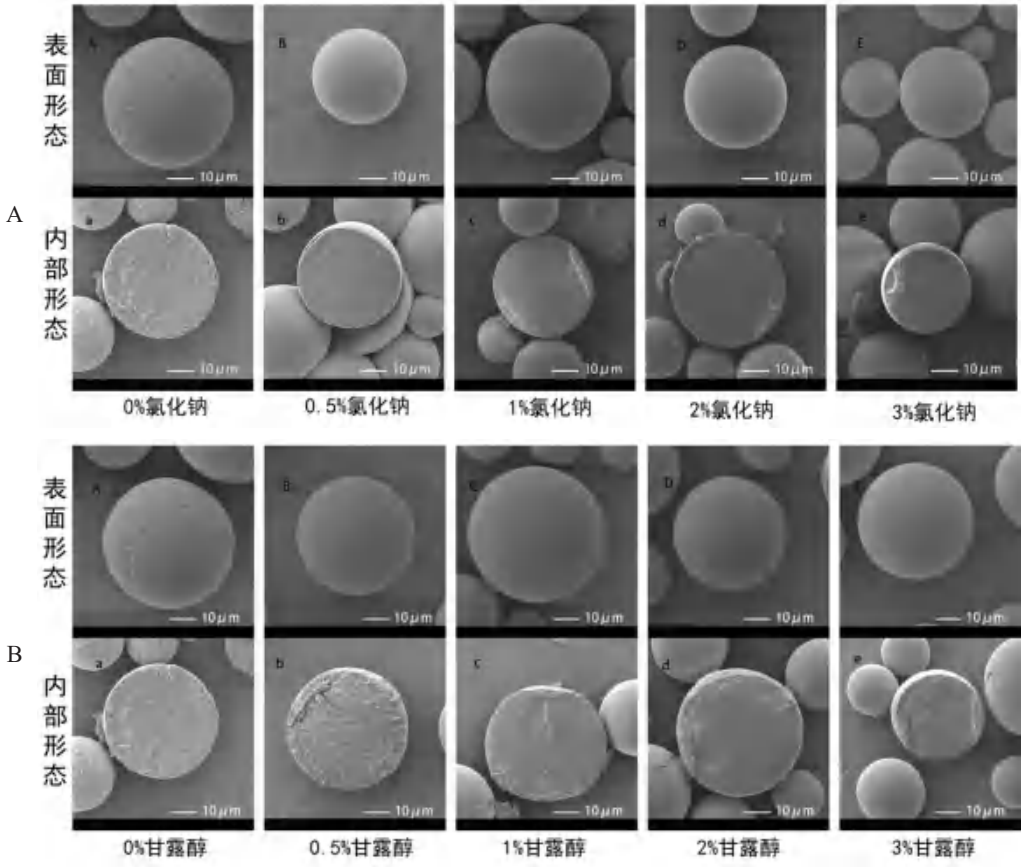


图 1　不同浓度氯化钠（A）及甘露醇（B）采用 *W/O/W* 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球的 SEM 图（×2500）

Fig 1　SEM map of goserelin acetate PLGA microspheres prepared by *W/O/W* method with different concentrations of sodium chloride（A）and mannitol（B）（×2500）

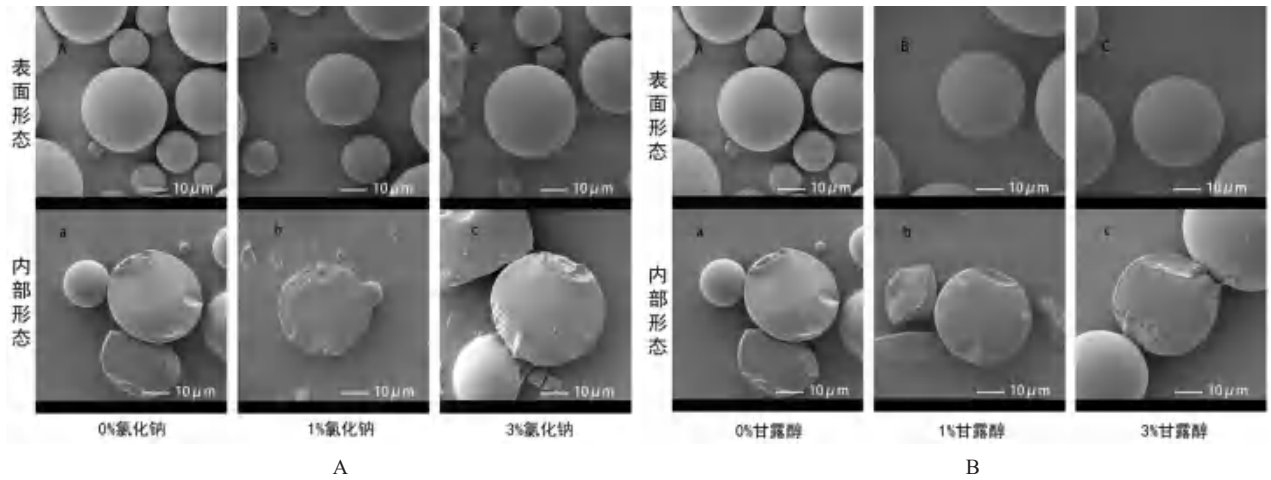


图 2　不同浓度氯化钠（A）及甘露醇（B）采用 *O/W* 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球的 SEM（×2500）

Fig 2　SEM of goserelin acetate PLGA microspheres prepared by *O/W* method with different concentrations of sodium chloride（A）and mannitol（B）（×2500）

2.5 体外加速释放

精密称取 20 mg 微球于 20 mL 离心管中，以 5 mL5% 甲醇 - 水溶液作为释放介质，设置恒温水浴振荡器温度为 45 ℃，转速为 50 r • min^{-1}。分别于 1 h、2 h、8 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、9 d、11 d 取出离心管，以 3600 r•min^{-1} 离心 5 min 后取上清液 4 mL 作为供试液，同时补加 4 mL 相同温度的释放介质，涡旋混匀后放回振荡器中振荡，按“2.1”项下条件测定醋酸戈舍瑞林含量，计算醋酸戈舍瑞林微球的释放度，以时间为横坐标，药物累计释放度为纵坐标，绘制药物的累计释放曲线，结果见图 3 ～ 4。

W/O/W 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球在外水相中加入不同浓度的氯化钠和甘露醇后，随着外水相中氯化钠浓度的升高，1 h 药物的突释量由（3.88±0.22）% 降至（2.63±0.09）%，微球的药物释放总量均较完全；随着外水相中甘露醇浓度的升高，1 h 的药物突释量由（3.88±0.22）% 降至（3.00±0.12）%，后期药物的释放速率相对较快。*O/W* 法制备的微球药物在 1 h 的突释量低于 *W/O/W* 法制备的微球，随着水相中氯化钠浓度的升高，1 h 的药物突释量从（3.15±0.11）% 降至（2.60±0.06）%；随着水相中甘露醇浓度的升高，1 h 的药物突释量从（3.15±0.11）% 降至（2.47±0.05）%。

2.6 粉末 X 射线衍射分析（PXRD）

分别取适量微球于样品盘中，使用 X 射线衍射仪在 5° ～ 50°（2^{θ}）范围内以步长 0.02024°，0.1 s/ 步的速度对微球进行快速扫描，扫描电压为 10 kV，电流为 30 mA。

几种样品的图谱均没有结晶峰，说明醋酸戈舍瑞林原料药、PLGA、空白微球、醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球均以无定形状态存在（见图 5）。

2.7 红外测定

分别称取 2 mg 微球和 200 mg 溴化钾放入玛瑙研钵中进行充分研磨，将其平铺于压模内，转移至压片机中制样 2 min 后在 4000 ～ 500 cm^{-1} 范围内进行红外光谱的检测。

图 6 中醋酸戈舍瑞林的红外特征峰显示，醋酸戈舍瑞林的酰胺羰基伸缩振动峰（$\nu_{C=O}$，1630 cm^{-1}）、N-H 伸缩振动峰（ν_{N-H}，3280 cm^{-1}）没有明显移动。由于微球中药物含量较低，随着 PLGA 的加入，醋酸戈舍瑞林的特征峰变小。

3 讨论

3.1 粒径、载药量及包封率

W/O/W 乳状液中的有机相类似于半透膜，水可自由穿过，液滴的收缩或者膨胀取决于内外水相的渗透梯度 [12]，外水相中氯化钠、甘露醇的加入逆转了水由内水相向外水相的转移，使内部水相液滴收缩并保持较小，外水相中氯化钠、甘露醇浓度增加会导致渗透压增加，减少药物逃逸到外水相中 [13-14]，甘露醇的存在可以保持微球结构的完整性，减少微球在固化过程中的聚集 [15]，从而增加微球的包封率和载药量。

O/W 法不适用于亲水性药物的包埋，在乳剂形成过程中，亲水性药物会进入到水相中，从而导致药物的损失 [16]。油水两相形成的渗透压差减少了药物由油相向水相的迁移 [13]，水相中的水也难以包封于微球中，使得微球的包封率、载药量增加，粒径减小。

3.2 表面及内部形态

W/O/W 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球在外水相中加入氯化钠可以使孔隙率增加这一现象逆转，随着外水相中氯化钠浓度的增加，外水相的渗透压升高，使药物难以从内水相逃逸的同时显示出光滑的微球表面和内部无孔洞的现象 [17]。在外水相中加入甘露醇，随着甘露醇浓度的增加，微球表面出现一层“薄膜”的存在，存在这种现象的原因可能是甘露醇在一定程度上可以改变热力学稳定参数 [18]，在微球固化过程中，甘露醇可能吸附在微球表面以及分布在微球周围，有助于增强微球内部稳定性、固化微球和减少药物的扩散 [19]，加之内外水相的渗透压差，使得微球表面的孔洞得以闭合。

O/W 法制备的微球在固化过程中有机溶剂较难挥发，油相中的亲水性药物容易进入到水相 [16]，因此，微球内部和表面更加致密。加入氯化钠和甘露醇同样可使外水相渗透压升高，使油相中的药物不易扩散到水相的同时显示出微球表面和内部是光滑致密的。

3.3 体外加速释放

W/O/W 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球当外水相中不加氯化钠时，微球中存在药物与外部交换的“通道”，被包封的药物很容易从这些通道释放出去，导致药物快速释放 [17]。而加入氯化钠后微球中药物与外部交换的通道减少，不会通过通道快速扩散，同时大部分药物分布在微球核心附近的位置，减少了药物在微球表面的润湿，因此药物的突释量降低。后期药物的释放由于微球内部药物扩散至微球表面，同时 PLGA 中的聚合物链断裂产生酸性物质，酸性物质使得 pH 降低，催化降解反应，加速了 PLGA 的降解，微球的整体被侵蚀，从而加速了药物的释放 [20-21]。氯化钠的加入使得微球有着更紧密的结构，因此微球的整体释放速率相

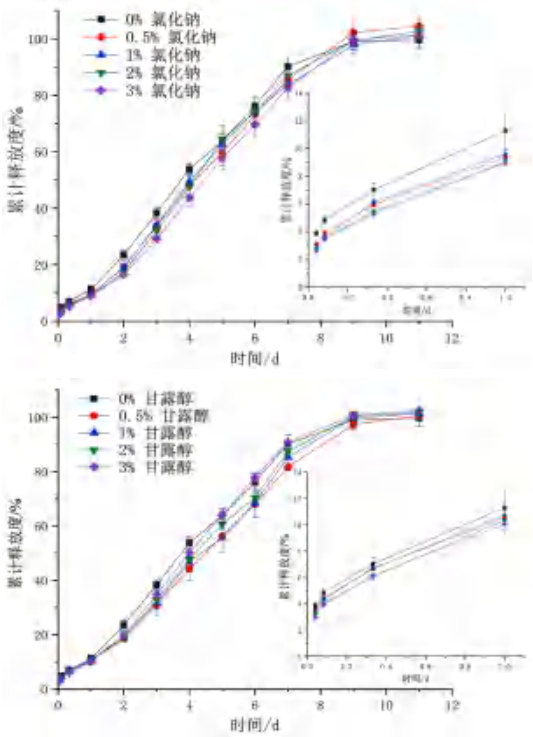


图 3　不同浓度氯化钠及甘露醇对 *W/O/W* 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球的体外累计释放曲线

Fig 3　In vitro cumulative release profiles of goserelin acetate PLGA microspheres prepared by *W/O/W* method with different concentrations of sodium chloride and mannitol

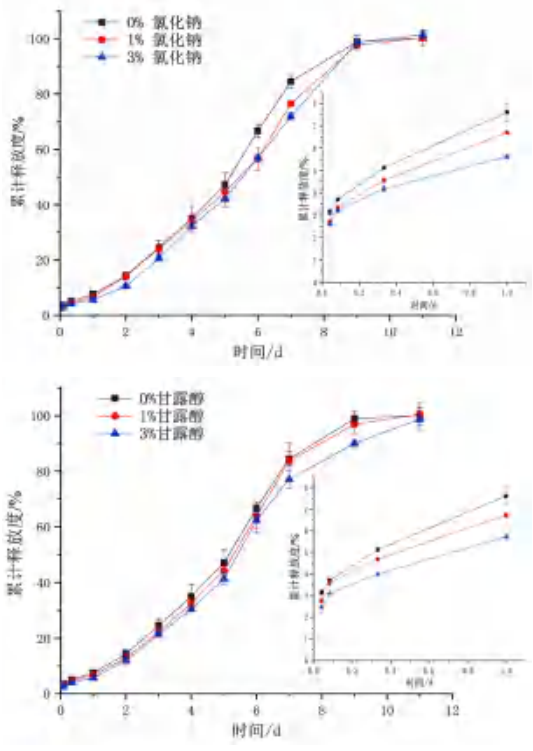


图 4　不同浓度氯化钠及甘露醇对 *O/W* 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球的体外累计释放曲线

Fig 4　In vitro cumulative release profiles of goserelin acetate PLGA microspheres prepared by *O/W* method with different concentrations of sodium chloride and mannitol

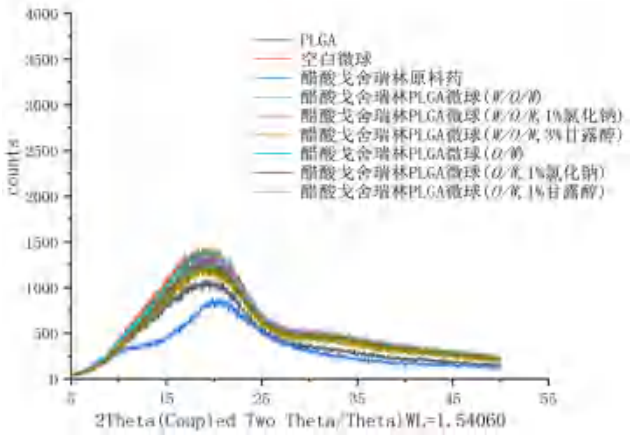


图 5　不同醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球样品的粉末 X 射线衍射结果

Fig 5　Powder X-ray diffraction plots of different goserelin acetate PLGA microsphere samples

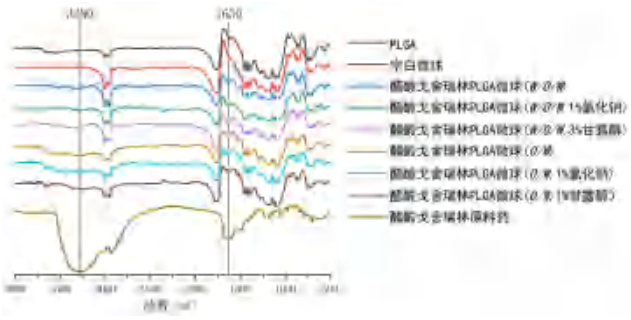


图 6　不同醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球样品的红外特征峰

Fig 6　Infrared characteristic peaks of different goserelin acetate PLGA microspheres samples

对较慢。随着外水相中甘露醇浓度的升高，微球表面逐渐形成了没有孔洞的类似于薄膜的结构，使得药物的突释量降低，随着药物的释放，微球表面的薄膜结构逐渐崩解，微球内部因孔洞较多，结构较为疏松，加快了 PLGA 降解产生的酸性物质在微球中的扩散，最终微球中药物释放完全 [22]。

O/W 法制备的微球孔洞少，减少了药物从孔洞的释放。水相中分别加入氯化钠和甘露醇使得微球表面和内部更加光滑致密，减少了水分子对微球的渗透，药物难以快速从微球中释放，使得突释量降低。到后期 PLGA 的酸性降解产物加速了 PLGA 基质的降解 [23]，使得药物快速释放出来。

3.4　粉末 X 射线衍射分析（PXRD）

微球的制备过程并未改变其物理状态 [21]，在不同方法制备微球的外水相中加入不同的添加剂均不会对药物的晶型产生影响。

3.5　红外测定

不同方法制备的微球在外水相中加入不同添加剂前后没有发生化学相互作用 [24]，只是通过物理吸附结合在一起 [25]。

4　结论

本研究考察了在外水相中加入不同浓度的甘露醇和氯化钠对 *W*/*O*/*W* 法和 *O*/*W* 法制备的醋酸戈舍瑞林 PLGA 微球理化性质的影响。通过对微球粒径、载药量、包封率、表面形态、内部形态、体外加速释放、粉末 X 射线衍射分析及红外测定分析得出在外水相中加入添加剂可有效改善微球的结构和性质。

参考文献

[1] Li XY，Jiang XY. Microfluidics for producing poly（lactic-co-glycolic acid）-based pharmaceutical nanoparticles [J]. Adv Drug Deliv Rev，2018，128：101-114.

[2] Park K，Otte A，Sharifi F，et al. Formulation composition，manufacturing process，and characterization of poly（lactide-co-glycolide）microparticles [J]. J Control Release，2021，329：1150-1161.

[3] Su Y，Zhang BL，Sun RW，et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery：recent advances in research and application [J]. Drug Deliv，2021，28（1）：1397-1418.

[4] Shi NQ，Zhou J，Walker J，et al. Microencapsulation of luteinizing hormone-releasing hormone agonist in poly（lactic-co-glycolic acid）microspheres by spray-drying [J]. J Control Release，2020，321：756-772.

[5] Bahl A，Rajappa S，Rawal S，et al. A review of clinical evidence to assess differences in efficacy and safety of luteinizing hormone-releasing hormone（LHRH）agonist（goserelin）and LHRH antagonist（degarelix）[J]. Indian J Cancer，2022，59（Supplement）：S160-S174.

[6] Cheung J，Lokman NA，Abraham RD，et al. Reduced gonadotrophin receptor expression is associated with a more aggressive ovarian cancer phenotype [J]. Int J Mol Sci，2020，22（1）：71.

[7] Allison SD. Analysis of initial burst in PLGA microparticles [J]. Expert Opin Drug Deliv，2008，5（6）：615-628.

[8] Ito F，Fujimori H，Honnami H，et al. Control of drug loading efficiency and drug release behavior in preparation of hydrophilic-drug-containing monodisperse PLGA microspheres [J]. J Mater Sci Mater Med，2010，21（5）：1563-1571.

[9] Laracuente ML，Yu MH，McHugh KJ. Zero-order drug delivery：state of the art and future prospects [J]. J Control Release，2020，327：834-856.

[10] Li L，Li ZG，Guo YX，et al. Preparation of uniform-sized GeXIVA[1，2]-loaded PLGA microspheres as long-effective release system with high encapsulation efficiency [J]. Drug Deliv，2022，29（1）：2283-2295.

[11] 谢兰桂，刘玉玲 . 多肽蛋白类药物的长效注射微球突释控制技术研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2006，37（9）：639-643.

[12] He XY，Liu JW，Song T，et al. Effects of water-soluble additive on the release profile and pharmacodynamics of triptorelin loaded in PLGA microspheres [J]. Drug Dev Ind Pharm，2023，49（5）：357-366.

[13] Martín-Sabroso C，Fraguas-Sánchez AI，Aparicio-Blanco J，et al. Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles [J]. Int J Pharm，2015，480（481-482）：427-436.

[14] Shi C，Meng R，Li K. Preparation and in vitro evaluation of tetrandrine-loaded composite microspheres embedded with PLGA nanoparticles [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi，2016，41（5）：838-844.

[15] Joyce P，Whitby CP，Prestidge CA. Bioactive hybrid particles from poly（D，L-lactide-co-glycolide）nanoparticle stabilized lipid droplets [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2015，7（31）：17460-17470.

[16] Butreddy A，Gaddam RP，Kommineni N，et al. PLGA/PLA-based long-acting injectable depot microspheres in clinical use：production and characterization overview for protein/peptide delivery [J]. Int J Mol Sci，2021，22（16）：8884.

[17] Beig A，Ackermann R，Wang Y，et al. Minimizing the initial burst of octreotide acetate from glucose star PLGA microspheres prepared by the solvent evaporation method [J]. Int J Pharm，2022，624：121842.

[18] Thakral S，Sonje J，Munjal B，et al. Mannitol as an excipient for lyophilized injectable formulations [J]. J Pharm Sci，2023，112（1）：19-35.

[19] Wu LB，Zhang J，Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles [J]. Adv Drug Deliv Rev，2011，63（6）：456-469.

[20] Shirangi M，Hennink WE，Somsen GW，et al. Acylation of arginine in goserelin-loaded PLGA microspheres [J]. Eur J Pharm Biopharm，2016，99：18-23.

[21] Xiao PF，Qi P，Chen J，et al. The effect of polymer blends on initial release regulation and in vitro-in vivo relationship of peptides loaded PLGA-hydrogel microspheres [J]. Int J Pharm，2020，591：119964.

[22] 王梦迪，薛英，冷广意，等 . 醋酸戈舍瑞林微球的体内外相关性研究 [J]. 药学学报，2019，54（1）：159-165.

[23] Ren TY，Chen J，Qi P，et al. Goserelin/PLGA solid dispersion used to prepare long-acting microspheres with reduced initial release and reduced fluctuation of drug serum concentration in vivo [J]. Int J Pharm，2022，615：121474.

[24] Qi P，Bu RX，Zhang H，et al. Goserelin acetate loaded poloxamer hydrogel in PLGA microspheres：core-shell di-depot intramuscular sustained release delivery system [J]. Mol Pharm，2019，16（8）：3502-3513.

[25] Guo SW，Wang X，Gao ZL，et al. Easy fabrication of poly(butyl acrylate)/silicon dioxide core-shell composite microspheres through ultrasonically initiated encapsulation emulsion polymerization [J].Ultrason Sonochem，2018，48：19-29.

（收稿日期：2023-09-25；修回日期：2023-12-05）

不同基原枳实水煎液黄酮类成分及抗氧化活性差异研究

赵香玉，熊英，刘永富，卢轩，李宗年，邓可众*（江西中医药大学药学院，南昌　330004）

摘要：目的　比较不同基原枳实水煎液黄酮类成分和抗氧化活性差异，为枳实的质量评价和临床用药提供参考。**方法**　建立 HPLC 法同时测定枳实水煎液中 8 种黄酮类成分（芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素）的含量，结合多元统计分析化学成分差异；采用 DPPH 法和 ABTS 法测定不同基原枳实水煎液的抗氧化活性，以灰色关联度分析和双变量相关性分析评价枳实水煎液中 8 种成分含量与抗氧化活性的相关性。**结果**　含量测定及统计分析结果表明不同基原枳实水煎液主要差异成分为柚皮苷和新橙皮苷，其中甜橙枳实水煎液中几乎不含柚皮苷和新橙皮苷，而酸橙枳实水煎液中这两种成分含量较高；抗氧化活性结果表明酸橙枳实水煎液抗氧化活性显著优于甜橙枳实水煎液（$P < 0.05$）；灰色关联度分析和双变量相关性分析显示，酸橙枳实水煎液中抗氧化作用的核心药效组分是橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素；甜橙枳实水煎液抗氧化作用的核心药效组分是芸香柚皮苷、橙皮素、川陈皮素。**结论**　本研究建立了 HPLC 法同时测定枳实水煎液中 8 种黄酮类成分的含量；不同基原枳实水煎液黄酮类成分含量与抗氧化能力均存在差异。

关键词：枳实；水煎液；含量测定；抗氧化；多元统计分析；相关性
中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0967-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.022

Flavonoids and antioxidant activity of water decoction prepared by Aurantii Fructus Immaturus from different origins

ZHAO Xiang-yu, XIONG Ying, LIU Yong-fu, LU Xuan, LI Zong-nian, DENG Ke-zhong* (*College of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective　To compare the differences in flavonoid components and antioxidant activity of water decoctions by Aurantii Fructus Immaturus of different origins, and to provide reference for the quality evaluation and clinical use of Aurantii Fructus Immaturus. **Methods**　HPLC method was used to simultaneously determine 8 flavonoid components (narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin, hesperetin, nobiletin and tangeretin) in the water decoction of Aurantii Fructus Immaturus. The differential chemical compositions were screened by multivariate statistics. The antioxidant activities of water decoction from different origins of Aurantii Fructus Immaturus were determined by 1, 1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) method and 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) method. The correlation between the content of 8 components and antioxidant activity in the water decoction of Aurantii Fructus Immaturus was evaluated by grey correlation and bivariate correlation analysis. **Results**　The main differential components in the water decoction of different origins of Aurantii Fructus Immaturus were naringin and neohesperidin. There was almost no naringin and neohesperidin in the water decoction of Citrus sinensis, while these two components were higher in the water decoction of Citrus aurantium. The antioxidant activity of the water decoction of Citrus aurantium was significantly better than that of Citrus sinensis ($P < 0.05$). Grey correlation and bivariate correlation analysis showed that the core pharmacodynamic

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.81960709）；江西省大学生创新创业计划（No.202210412320）。
作者简介：赵香玉，女，硕士研究生，主要从事中药质量评价研究，email：15994142006@163.com　*通信作者：邓可众，男，博士，教授，主要从事中药品质评价研究，email：dengkezhong@126.com

components for the antioxidant effect in the water decoction of Citrus aurantium included hesperidin, neohesperidin and nobiletin; while the core pharmacodynamic components for antioxidant effect in the water decoction of Citrus sinensis were narirutin, hesperetin and nobiletin. **Conclusion** The HPLC method is established for the determination of 8 flavonoids in the water decoction of Aurantii Fructus Immaturus, with differences in the content of flavonoids and antioxidant capacity in water decoctions of different origins of Aurantii Fructus Immaturus.

Key words: Aurantii Fructus Immaturus; water decoction; content determination; antioxidant; multivariate statistical analysis; correlation

枳实（Aurantii Fructus Immaturus）为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果[1]，黄酮类化合物是枳实中含量较高的一类成分，主要包含芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素和桔皮素等[2]。焦士蓉等[3]研究表明枳实提取物能有效清除羟基自由基、超氧阴离子自由基、1，1- 二苯基 -2- 三硝基苯（DPPH）自由基，具有抑制脂质过氧化作用。贾富霞等[4]发现酸橙枳实抗氧化药效效应是由多个黄酮类组分协同作用的结果，进一步证实了枳实黄酮类成分具有良好的抗氧化能力，而抗氧化剂可有效预防心血管疾病的发生[5]。汤剂是枳实临床使用最广泛的一种剂型，常选用枳实经方枳实薤白桂枝汤治疗心绞痛、冠心病等[6]。但目前对于枳实水煎液含量测定及抗氧化活性的相关研究较少。

枳实作为一味多基原药材，其主要来源为酸橙枳实与甜橙枳实。研究表明，不同基原枳实化学成分存在差异，甜橙枳实中几乎不含柚皮苷和新橙皮苷[7-10]，但不同基原枳实水煎液成分及抗氧化活性差异未见报道。因此，本研究建立对枳实水煎液 8 种黄酮类成分（芸香柚皮苷，柚皮苷，橙皮苷，新橙皮苷，柚皮素，橙皮素，川陈皮素，桔皮素）的含量测定方法，并结合多元统计方法，筛选出酸橙枳实与甜橙枳实水煎液的差异性标志物，将所测成分含量与抗氧化活性进行相关性分析，旨在对不同基原枳实水煎液黄酮类成分及抗氧化活性进行差异研究，为枳实相关制剂质量控制及临床用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters E2695 高效液相色谱仪（上海沃特世科技有限公司）；KQ-500DV 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Mettler Toledo XS3DU 百万分之一电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；HH-2 型恒温水浴锅（江苏省金坛市医疗仪器厂）；OBS-2100 旋转蒸发仪（上海爱朗仪器有限公司）；SpectraMax iD3 型多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）。

1.2 试药

对照品柚皮苷（批号：110722-202108）、新橙皮苷（批号：111857-202106）（质量分数均≥ 98%，中国食品药品检定研究院），对照品芸香柚皮苷（批号：wkq21050615）、橙皮苷（批号：wkq21010611）、桔皮素（批号：wkq21091208）（质量分数均≥ 98%，四川维克奇生物技术有限公司），对照品柚皮素（批号：21596DST2208）、橙皮素（批号：20184DST2208）（质量分数均≥ 98%，北京瑞达恒辉科技发展有限公司），对照品川陈皮素（质量分数≥ 98%，批号：PS000224，成都普思生物科技股份有限公司），DPPH（批号：M27HS179342，上海源叶生物科技有限公司）；2，2'- 联氮双（3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸）二铵盐（批号：C13182603，上海麦克林生化科技有限公司）；色谱级乙腈、甲醇、乙酸（安徽天地高纯溶剂有限公司）；分析级甲醇（西陇科学股份有限公司）；娃哈哈纯净水（杭州娃哈哈有限公司）。

酸橙、甜橙枳实饮片均购于亳州市正睿药业有限公司，共 20 批，其中酸橙枳实饮片 10 批（S1 ～ S10），甜橙枳实饮片 10 批（T1 ～ T10），枳实饮片来源信息见表 1。枳实饮片经江西中医药大学药学院中药鉴定学科组邓可众教授按照 2020 年版《中国药典》（一部）标准及相关规定检验合格后备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Waters C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相：乙腈（A）-0.1% 乙酸水（B），梯度洗脱条件（0 ～ 20 min，18%A；20 ～ 30 min，18% ～ 25%A；30 ～ 35 min，25%A；35 ～ 45 min，25% ～ 29%A；

表 1　枳实饮片来源信息

Tab 1　Source information of Auarantii Fructus Immaturus decoction pieces

编号	来源	编号	来源
S1	酸橙	T1	甜橙
S2	酸橙	T2	甜橙
S3	酸橙	T3	甜橙
S4	酸橙	T4	甜橙
S5	酸橙	T5	甜橙
S6	酸橙	T6	甜橙
S7	酸橙	T7	甜橙
S8	酸橙	T8	甜橙
S9	酸橙	T9	甜橙
S10	酸橙	T10	甜橙

45 ～ 55 min，29% ～ 42%A；55 ～ 75 min，42%A）；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测波长：283 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2　对照品溶液的制备

分别取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素对照品适量，精密称定，分别加入一定量的甲醇配制成质量浓度为 0.424 mg•mL^{-1} 芸香柚皮苷、2.870 mg•mL^{-1} 柚皮苷、2.680 mg•mL^{-1} 橙皮苷、2.990 mg • mL^{-1} 新橙皮苷、0.333 mg • mL^{-1} 柚皮素、0.269 mg • mL^{-1} 橙皮素、0.104 mg • mL^{-1} 川陈皮素、0.135 mg•mL^{-1} 桔皮素对照品溶液，即得。

2.3　枳实水煎液的制备

按枳实薤白桂枝汤处方中枳实剂量和加水量[11]，取枳实饮片 12 g 放置煎煮锅中，加入 1000 mL 水浸泡 30 min，煎煮两次，每次 30 min，滤过，合并两次滤液，浓缩定容至 300 mL，摇匀，得生药质量浓度为 0.04 g • mL^{-1} 的枳实饮片水煎液。

2.4　供试品溶液的制备

取“2.3”项下枳实饮片水煎液适量，3000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，精密量取 5 mL 药液置 100 mL 梨形瓶中旋干，加甲醇 10 mL 超声溶解，摇匀，过 0.22 μm 滤膜，取续滤液，即得。空白溶剂无干扰，色谱图见图 1。

2.5　方法学考察

2.5.1　线性关系考察　分别吸取“2.2”项下的对照品溶液 0.1、0.5、1、2、5、10 mL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释定容至刻度，混匀，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后，按照“2.1”项下色谱条件进样，以对照品质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*），绘制标准曲线，得线性回归方程、线性范围及相关系数（*r*），见表 2。结果显示，8 种对照品在相应质量浓度范围内线性关系良好。

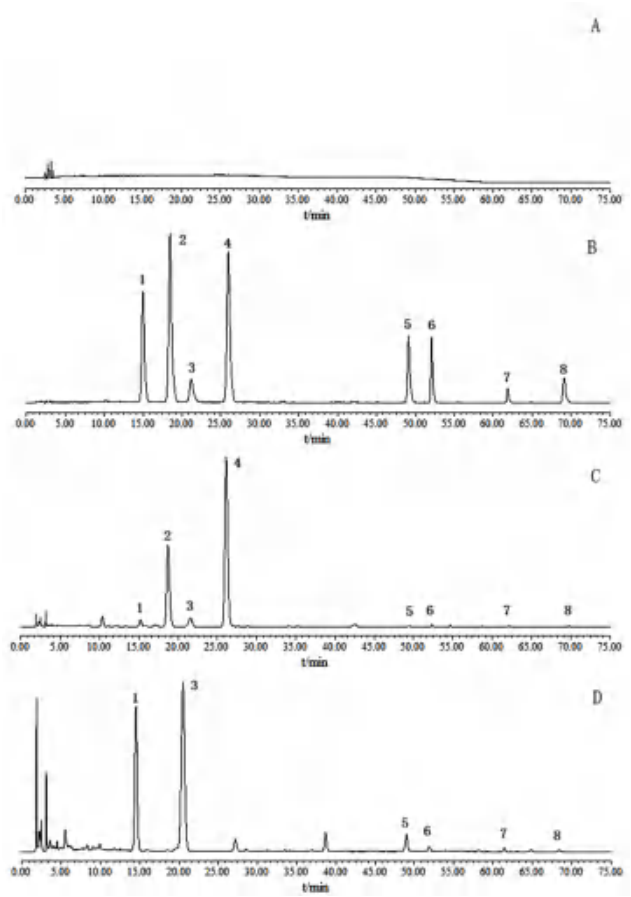


图 1　空白溶剂（A）、混合对照品溶液（B）、酸橙枳实供试品溶液（C）、甜橙枳实供试品溶液（D）的 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of blank solution（A），mixed reference solution（B），Citrus aurantium test solution（C），and Citrus sinensis test solution（D）

1. 芸香柚皮苷（narirutin）；2. 柚皮苷（naringin）；3. 橙皮苷（hesperidin）；4. 新橙皮苷（neohesperidin）；5. 柚皮素（naringenin）；6. 橙皮素（hespertin）；7. 川陈皮素（nobiletin）；8. 桔皮素（tangeretin）

2.5.2　精密度试验　精密移取“2.4”项下制备的枳实（S2）的供试品溶液 10 μL，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素峰面积的 *RSD* 值为 0.37%、0.18%、0.20%、0.13%、0.21%、0.22%、1.1%、0.39%，均＜ 1%，表明仪器精密度良好。

2.5.3　稳定性试验　精密移取“2.4”项下制备的枳实（S2）的供试品溶液，分别在 0、4、8、12、24、48 h 后，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素峰面积的 *RSD* 值为 1.4%、1.2%、1.4%、1.4%、2.0%、2.8%、2.2%、2.7%，均＜ 3%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.4　重复性试验　平行制备 6 份同一批枳实（S2）的供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件测

表 2　8 种成分的回归方程与线性范围

Tab 2　Regression equations and linearity for 8 components

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg・mL^{-1}）
芸香柚皮苷	$Y=3.661\times10^4X+2.914\times10^4$	0.9995	4.24 ～ 424
柚皮苷	$Y=1.461\times10^4X+3.583\times10^5$	0.9995	28.7 ～ 2870
橙皮苷	$Y=1.393\times10^4X+4.101\times10^5$	0.9998	26.8 ～ 2680
新橙皮苷	$Y=1.597\times10^4X+8.642\times10^5$	0.9994	29.9 ～ 2990
柚皮素	$Y=7.470\times10^4X+1.346\times10^5$	0.9991	3.33 ～ 333
橙皮素	$Y=3.586\times10^4X+1.177\times10^5$	0.9998	2.69 ～ 269
川陈皮素	$Y=1.837\times10^4X+3.340\times10^3$	0.9997	1.04 ～ 104
桔皮素	$Y=2.431\times10^4X-1.425\times10^4$	0.9994	1.35 ～ 135

定，计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素峰面积的 *RSD* 值为 2.3%、2.1%、1.6%、2.0%、1.8%、2.3%、1.7%、2.5%，均＜ 3%，表明方法重复性良好。

2.5.5　加样回收试验　精密量取已知含量的枳实（S10）水煎液 1 mL 加水稀释至 5 mL，加入适量的芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品溶液，按“2.4”项下方法制备供试品溶液；精密量取已知含量的枳实（S10）水煎液 5 mL，添加一定量的柚皮素、橙皮素、川陈皮素、桔皮素对照品溶液，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，将以上所得供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算各成分的加样回收率与 *RSD* 值，结果表明，8 种成分的平均加样回收率在 98% ～ 104%，*RSD* 值均小于 3%，表明方法的准确度符合要求。

2.6　样品的含量测定

称取 20 批枳实饮片，制成枳实水煎液，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并分别计算 8 种成分的含量，平行 3 份，取平均值。结果表明，酸橙水煎液总黄酮含量大于甜橙水煎液；除芸香柚皮苷和橙皮苷外，酸橙水煎液各成分含量均值均大于甜橙水煎液，见表 3。

表 3　枳实水煎液中 8 种成分的含量测定结果（*n* ＝ 3，mg・mL^{-1}）

Tab 3　Content determination results of 8 flavonoid components in water decoctions of Aurantii Fructus Immaturus（*n* ＝ 3，mg・mL^{-1}）

	样品	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	柚皮素	橙皮素	川陈皮素	桔皮素	黄酮总量
酸橙	S1	0.084	2.315	0.934	7.398	0.024	0.033	0.013	0.011	10.812
	S2	0.145	3.783	1.169	8.538	0.016	0.017	0.010	0.011	13.689
	S3	0.136	3.497	0.810	6.134	0.007	0.006	0.010	0.012	10.612
	S4	0.190	3.993	1.375	8.229	0.011	0.010	0.006	0.007	13.821
	S5	0.115	3.287	0.999	8.014	0.016	0.017	0.011	0.013	12.472
	S6	0.186	5.293	0.602	5.301	0.030	0.010	0.016	0.016	11.454
	S7	0.220	5.046	0.496	4.608	0.025	0.007	0.016	0.016	10.434
	S8	0.259	5.929	0.507	4.111	0.014	0.027	0.021	0.020	10.888
	S9	0.129	2.641	0.482	4.023	0.015	0.006	0.003	0.005	7.304
	S10	0.222	5.289	0.814	6.678	0.040	0.016	0.014	0.015	13.088
	均值	0.169	4.107	0.819	6.303	0.020	0.015	0.012	0.013	11.457
甜橙	T1	0.180	—	1.995	0.021	0.004	0.001	0.017	—	2.218
	T2	0.133	—	1.558	—	0.004	0.001	0.004	—	1.700
	T3	0.087	—	1.762	0.022	0.003	0.002	—	—	1.876
	T4	0.142	—	1.726	—	0.007	0.002	0.010	0.003	1.890
	T5	0.121	—	1.535	—	0.005	0.002	0.009	0.004	1.676
	T6	0.069	—	1.587	—	0.004	0.004	0.011	0.004	1.679
	T7	0.320	—	1.765	—	0.031	0.011	0.004	0.005	2.136
	T8	0.362	—	2.437	—	0.049	0.010	0.004	—	2.862
	T9	0.239	—	1.588	0.026	0.009	0.003	0.003	0.006	1.874
	T10	0.370	—	2.513	—	0.025	0.006	0.005	—	2.919
	均值	0.202	—	1.847	0.023	0.014	0.004	0.007	0.004	2.083

注（Note）：“—”表示未检出（“－”means no detection）。

2.7　多元统计分析

2.7.1　聚类分析（CA）　将 20 批枳实样品 8 种成分含量导入 SPSS 21.0 软件进行系统聚类分析，当距离为 10 时，其中酸橙样品（T1 ～ T10）聚为第 1 类，甜橙样品（S1 ～ S10）聚为第 2 类，不同基原的水煎液之间存在差异，见图 2。

2.7.2　主成分分析（PCA）　在 CA 基础上，对含量测定数据进行 PCA 处理，模型参数为 $R^2X=0.803$，$Q^2=0.624$。20 批枳实样品可分为两类，酸橙枳实水煎液（S1 ～ S10）为一类，在第Ⅱ和第Ⅲ象限均有分布，甜橙枳实水煎液（T1 ～ T10）为一类，主要集中在第Ⅰ和第Ⅳ象限（见图 3），其结果与 CA 一致。

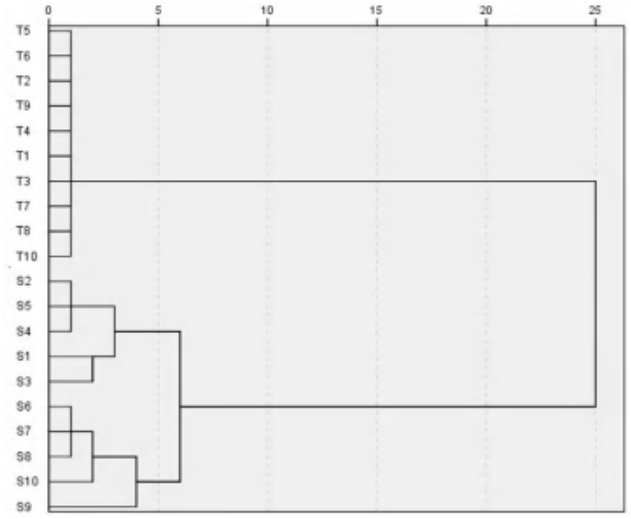


图 2　20 批枳实水煎液聚类分析图

Fig 2　CA diagram of 20 batches of Aurantii Fructus Immaturus water decoctions

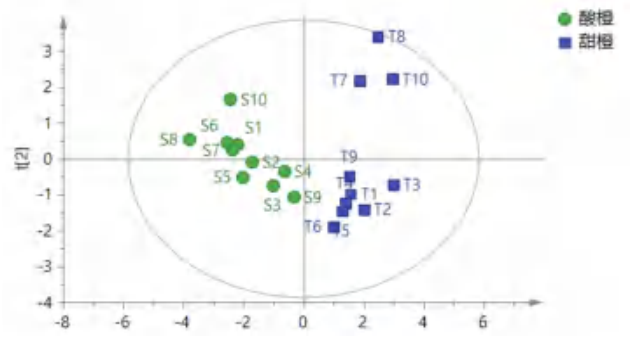


图 3　20 批枳实水煎液主成分分析图

Fig 3　PCA diagram of 20 batches of Aurantii Fructus Immaturus water decoctions

2.7.3　正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）　将 20 批枳实样品 8 种成分含量数据导入 SIMCA-P14.0 软件进行 OPLS-DA 分析（见图 4）。在得分散点图中，酸橙枳实水煎液和甜橙枳实水煎液被显著区分为两大类。结合变量重要性投影（VIP）值对 8 种成分的 VIP 大小进行排列（见图 5）。VIP 越大，对应变量对分类的贡献就越大，以 VIP ＞ 1 为标准，筛选出造成不同基原枳实水煎液差异的两种成分，即新橙皮苷、柚皮苷。

2.8　枳实水煎液抗氧化活性测定

2.8.1　DPPH 溶液的制备　精密称定 0.001 g 的 DPPH 粉末置于 25 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容，配制成浓度为 0.1 mmol • L^{-1} 的 DPPH 溶液避光保存备用。

2.8.2　ABTS 溶液的制备　根据 Liu 等 [12] 的方法稍作修改进行测定，精密称定 38.4 mg 的 ABTS 粉末置于 10 mL 量瓶中，用水溶解并定容至刻度，配制成浓度为 7 mmol • L^{-1} 的 ABTS 溶液（避光）；精密称定 8.8

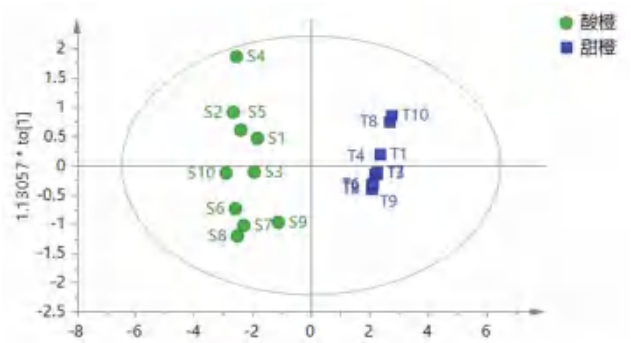


图 4　20 批枳实水煎液正交偏最小二乘法 - 判别分析图

Fig 4　OPLS-DA diagram of 20 batches of Aurantii Fructus Immaturus water decoctions

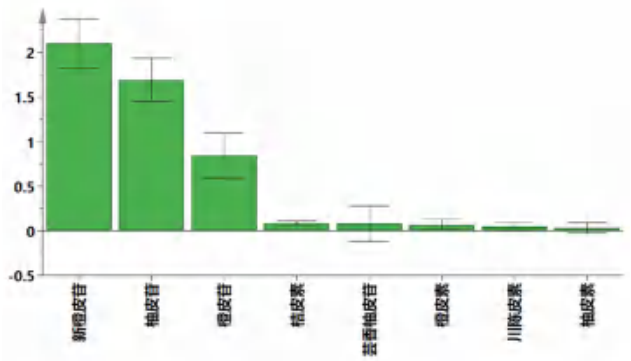


图 5　20 批枳实水煎液 VIP 值图

Fig 5　VIP diagram of 20 batches of Aurantii Fructus Immaturus water decoctions

mg 过硫酸钾粉末置于 10 mL 量瓶中，配制成浓度为 1.63 mmol • L^{-1} 的过硫酸钾溶液（避光）。两者等体积混合，避光反应 12 h，将母液用甲醇稀释至光密度（*OD*）值在 734 nm 处为 0.7±0.02，即稀释 40 倍备用。

2.8.3　DPPH 自由基清除能力的测定　将“2.4”项下制备的各供试品溶液用甲醇稀释 80 倍，分别吸取 100 μL 样品溶液加入至 100 μL 的 DPPH 醇溶液中作为样品组（A_1），以 100 μL 样品溶液加入 100 μL 的甲醇作为空白组（A_2），对照组则是 100 μL 的 DPPH 醇溶液加入 100 μL 的甲醇（A_3）。分别置于 96 孔板中，每组设置 3 个平行样，室温避光 30 min，在 517 nm 处测定吸光度（*A*）。根据公式清除率（%）＝[1 －（A_1 － A_2）/A_3]×100% 计算 20 批枳实水煎液 DDPH 自由基清除率均值，结果见表 4。

2.8.4　ABTS 自由基清除能力的测定　将“2.4”项下各供试品溶液用甲醇稀释 80 倍，分别吸取 50 μL 样品溶液加入至 150 μL 的 ABTS 醇溶液中作为样品组（A_1），以 50 μL 样品溶液加入 150 μL 的甲醇作为空白组（A_2），对照组则是 150 μL 的 ABTS 醇溶液加入 50 μL 的甲醇（A_3）。分别置于 96 孔板中，每组设置 3 个平行样，室温避光 15 min，734 nm 处

测定吸光度。按“2.8.3”项下公式计算 20 批枳实水煎液 ABTS 自由基清除率均值，结果见表 4。

表 4　20 批枳实水煎液的抗氧化活性测定结果 (n = 3)

Tab 4　Antioxidant activity of 20 batches of Aurantii Fructus Immaturus water decoctions (n = 3)

样品	DPPH 自由基清除率 /%	ABTS 自由基清除率 /%
S1	68.734±0.886	60.981±2.440
S2	89.314±1.539	77.867±0.981
S3	83.132±1.585	70.206±2.143
S4	87.312±1.930	72.002±2.590
S5	78.639±0.788	65.901±1.851
S6	73.510±0.292	62.212±0.525
S7	76.547±1.360	67.697±0.599
S8	69.315±2.007	59.868±2.959
S9	57.643±1.432	39.616±2.222
S10	58.181±1.400	47.249±1.487
T1	65.134±1.928	46.550±3.294
T2	60.116±1.734	48.354±0.990
T3	56.577±2.42	49.927±1.727
T4	55.994±2.279	44.107±1.802
T5	67.653±1.426	51.358±2.383
T6	58.804±1.526	40.847±2.005
T7	75.537±1.315	50.568±1.696
T8	56.745±1.274	37.768±0.629
T9	59.528±1.024	47.410±0.367
T10	70.353±0.984	54.637±1.082

2.8.5　酸橙与甜橙水煎液抗氧化活性差异　采用 SPSS 21.0 软件，对不同基原枳实水煎液抗氧化活性进行独立样品 t 检验。结果表明，说明不同枳实水煎液在两种抗氧化活性指标上均具有统计学差异（$P < 0.05$），均值可知酸橙枳实水煎液抗氧化活性显著优于甜橙枳实水煎液。结果见表 5。

表 5　20 批枳实水煎液抗氧化活性对比结果

Tab 5　Antioxidant activity of 20 batches of Aurantii Fructus Immaturus water decoctions

自由基	分组	清除率 /%
DPPH	酸橙	74.308±10.886
	甜橙	62.621±6.246*
ABTS	酸橙	62.360±11.498
	甜橙	47.153±5.078*

注（Note）：与酸橙比较，*$P < 0.05$（Compared with Citrus aurantium，*$P < 0.05$）。

2.9　8 种成分的含量与抗氧化活性的相关性分析

2.9.1　灰色关联度分析　采用 Excel 2019 软件对枳实水煎液 8 种成分的含量与抗氧化活性进行灰色关联度分析。做均值化处理，以前者为比较序列，后者为参考序列，计算差序列、关联系数，最后计算关联度，关联度越大，表明该组分对抗氧化活性的关联性越强 [13]。对于 DPPH 自由基清除法，酸橙水煎液中（关联系数＞ 0.6）抗氧化活性成分贡献大小依次排序是新橙皮苷＞橙皮苷＞桔皮素＞川陈皮素＞柚皮素＞柚皮苷＞橙皮素；甜橙水煎液中的抗氧化活性成分贡献大小依次排序是橙皮苷＞芸香柚皮苷＞川陈皮素＞柚皮素＞橙皮素。对于 ABTS 自由基清除法，酸橙水煎液中的抗氧化活性成分贡献大小依次排序是新橙皮苷＞橙皮苷＞桔皮素＞川陈皮素＞柚皮素＞橙皮素＞柚皮苷，甜橙水煎液中的抗氧化活性成分贡献大小依次排序是橙皮苷＞芸香柚皮苷＞川陈皮素＞柚皮素＞橙皮素，结果见表 6。

表 6　枳实水煎液中 8 种成分含量与抗氧化活性的灰色关联系数

Tab 6　Grey correlation coefficient of 8 components content in Aurantii Fructus Immaturus water decoctions and antioxidant activity

成分	DPPH 法		ABTS 法	
	酸橙水煎液	甜橙水煎液	酸橙水煎液	甜橙水煎液
芸香柚皮苷	0.594	0.927	0.578	0.921
柚皮苷	0.657	无关联	0.635	无关联
橙皮苷	0.827	0.976	0.843	0.969
新橙皮苷	0.828	无关联	0.857	无关联
柚皮素	0.728	0.791	0.750	0.792
橙皮素	0.652	0.717	0.677	0.724
川陈皮素	0.755	0.911	0.766	0.905
桔皮素	0.770	无关联	0.781	无关联

2.9.2　Pearson 相关性分析　采用 SPSS 21.0 软件对枳实水煎液 8 种成分的含量与抗氧化活性进行 Pearson 相关性分析。结果表明，在酸橙水煎液中，与 DPPH 自由基清除率成正相关的成分，相关性由大到小依次是橙皮苷＞新橙皮苷＞川陈皮素；与 ABTS 自由基清除率成正相关的成分，相关性由大到小依次是橙皮苷＞新橙皮苷＞川陈皮素＞柚皮苷。在甜橙水煎液中，与 DPPH 自由基清除率成正相关的成分，相关性由大到小依次排序是橙皮素＞芸香柚皮苷＞柚皮素＞橙皮苷＞川陈皮素；与 ABTS 自由基清除率成正相关的成分，相关性由大到小依次是新橙皮苷＞芸香柚皮苷＞橙皮素＞川陈皮素，结果见表 7。

表 7　枳实水煎液中 8 种成分含量与抗氧化活性的双变量相关系数

Tab 7　Bivariate correlation coefficient of 8 components content in Aurantii Fructus Immaturus water decoctions and antioxidant activity

成分	DPPH 法		ABTS 法	
	酸橙水煎液	甜橙水煎液	酸橙水煎液	甜橙水煎液
芸香柚皮苷	－0.088	0.490	－0.037	0.093
柚皮苷	－0.058	无关联	0.035	无关联
橙皮苷	0.648	0.209	0.575	－0.056
新橙皮苷	0.582	－0.251	0.555	0.096
柚皮素	－0.473	0.311	－0.389	－0.163
橙皮素	－0.213	0.536	－0.045	0.069
川陈皮素	0.212	0.187	0.389	0.036
桔皮素	－0.374	无关联	－0.232	无关联

橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素是酸橙枳实水煎液黄酮类抗氧化作用的核心组分；芸香柚皮苷、

橙皮素、川陈皮素是甜橙枳实水煎液黄酮类抗氧化作用的核心组分。在酸橙水煎液当中，芸香柚皮苷与 DPPH 及 ABTS 自由基清除率成负相关；而在甜橙水煎液当中，其成分与 DPPH 及 ABTS 自由基清除率成正相关。在酸橙水煎液当中，橙皮素与 DPPH 及 ABTS 自由基清除率成负相关；而在甜橙水煎液当中，其成分与 DPPH 及 ABTS 自由基清除率成正相关。

3　讨论

3.1　枳实水煎液的含量测定条件考察

本研究对检测波长、流动相等色谱条件进行了考察。含量测定时选用紫外检测器全波长对样品进行扫描，黄酮类成分在 283 nm 处有最大吸收且分离度较好，此时响应值高，灵敏度大，便于检测。考察了乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 磷酸水溶液和乙腈 -0.1% 乙酸水溶液，发现用乙腈 - 水为流动相时柚皮苷和新橙皮苷均出现明显拖尾现象，乙腈 -0.1% 磷酸水溶液分离度优于乙腈 - 水，但峰形差，最终确定流动相为乙腈 -0.1% 乙酸水溶液，其峰形稳定，分离度好。之后又对色谱条件中流动相比例进行考察，发现以 18% ～ 42% 甲醇梯度洗脱时各成分质谱响应最优，并可在 75 min 内完成测定。

3.2　不同基原枳实水煎液中黄酮类成分差异和抗氧化结果分析

本研究含量测定结果表明酸橙枳实水煎液中总黄酮含量高于甜橙枳实水煎液，抗氧化结果表明不同基原枳实水煎液在 DPPH 与 ABTS 中均具有抗氧化能力，酸橙枳实水煎液抗氧化效果优于甜橙枳实水煎液。8 种主要黄酮成分含量与抗氧化活性的相关性分析结果表明，不同基原枳实水煎液抗氧化活性组分具有差异，抗氧化的结果并不是单一组分起效，而是由多个组分协同作用产生的。因此，可将总黄酮作为不同基原枳实药材或者水煎剂的质控指标，对于酸橙枳实可选择抗氧化活性核心组分橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素，对于甜橙枳实可选择抗氧化活性核心组分芸香柚皮苷、橙皮素、川陈皮素作为药材或者水煎剂的质控指标。两种药材抗氧化作用差异及核心组分的不同佐证了不同基原枳实品质优劣，与临床中多选用酸橙枳实相一致。芸香柚皮苷和橙皮素在甜橙水煎液中与 DPPH 及 ABTS 自由基清除率成正相关，而在酸橙水煎液中成负相关，可能与这些黄酮类成分在抗氧化中的相互作用有关，其机制还有待进一步研究。

综上所述，本文建立了高效液相色谱法同时测定枳实水煎液中 8 种黄酮类成分的含量测定方法，并利用多元统计学分析进行数据处理，将化学成分与抗氧化活性相结合，综合对比不同基原枳实水煎液成分与药理活性的差异，为枳实的临床用药提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：63.

[2] 张霄潇，李正勇，马玉玲，等 . 中药枳实的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（2）：185-190.

[3] 焦士蓉，马力，黄承钰，等 . 枳实提取物的体外抗氧化作用研究 [J]. 中药材，2008，31（1）：113-116.

[4] 贾富霞，王秀娟，罗容 . 酸橙枳实黄酮类抗氧化活性的药效组分研究 [J]. 世界中医药，2021，16（15）：2261-2265.

[5] 王研，温新宝，秦翠萍，等 . 丹参提取物体外抗氧化活性研究 [J]. 西北农业学报，2011，20（11）：160-163.

[6] 石姗，孔祥英 . 枳实薤白桂枝汤治疗冠心病心绞痛的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18（45）：111-112.

[7] 陆超颖，王佳丽，王洪兰，等 . 不同基原枳实药材的质量差异评价研究 [J]. 中草药，2022，53（14）：4493-4503.

[8] 曾鸿莲，刘振丽，宋志前，等 . 不同品种枳实 HPLC 指纹图谱及成分含量差异性研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（17）：3272-3278.

[9] 张振霞，郑玉忠，梁丽娟，等 . 酸橙和甜橙 2 种枳实药材 HPLC 指纹图谱研究及其柚皮苷和辛弗林含量分析 [J]. 中国药房，2011，22（39）：3711-3714.

[10] 刘永富，熊英，赵香玉，等 . HPLC 测定枳实导滞丸中枳实所含 6 种成分及其药材基原分析 [J]. 中南药学，2023，21（3）：767-771.

[11] 唐晓章，刘红霞，陈仁文，等 . 经典名方枳实薤白桂枝汤的古代文献与现代临床应用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（8）：174-185.

[12] Liu XY，Chen YX，Wu LX，et al. Optimization of polysaccharides extraction from Dictyophora indusiata and determination of its antioxidant activity [J]. Int J Biol Macromol，2017，103：175-181.

[13] 林希光，陈昕，孟江，等 . 基于谱效关系筛选橘核抗氧化活性质量标志物 [J]. 中药材，2023，46（1）：130-136.

（收稿日期：2023-10-26；修回日期：2023-12-03）

流苏石斛的黄酮类成分及其对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤的保护作用研究

王靖雯[1]，徐晓娜[2]，张海浪[1]，雷果平[1]，徐伟[3, 4]，杨云芝[3, 4*]（1. 南充市食品药品检验所，四川 南充 637000；2. 中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京 210000；3. 南充市中医医院中药制剂中心，四川 南充 637000；4. 筋骨病中医药防治南充市重点实验室，四川 南充 637000）

摘要：目的 研究流苏石斛的黄酮类成分及其对皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用。**方法** 采用聚酰胺树脂、葡聚糖凝胶、硅胶柱色谱等方法进行成分分离，通过核磁共振波谱分析与鉴定结构；采用体外细胞实验对所得化合物进行活性检测。**结果** 从流苏石斛中分离得到 10 个黄酮及其苷类成分，分别鉴定为新西兰牡荆苷Ⅱ（**1**）、异佛莱心苷（**2**）、佛莱心苷（**3**）、芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖 -8-*C*-*β*-D- 异鼠李糖苷（**4**）、芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 阿拉伯糖 -8-*C*-*β*-L- 阿拉伯糖苷（**5**）、芹菜素 -6，8- 二 -*C*-*α*-L- 阿拉伯糖苷（**6**）、金圣草黄素 -7-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷（**7**）、芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖苷（**8**）、异牡荆素（**9**）和芹菜素（**10**），其中化合物 **3** ～ **6**、**8** ～ **10** 可显著提高皮质酮诱导损伤的 PC12 细胞的存活率。**结论** 化合物 **4**、**5**、**7** ～ **10** 为首次从该种植物中分离得到，化合物 **5**、**7**、**8** 为首次从该属植物中分离得到；化合物 **3** ～ **6**、**8** ～ **10** 对皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤具有一定的神经保护作用。

关键词：流苏石斛；化学成分；黄酮；PC12 细胞
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0974-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.023

Flavonoids from *Dendrobium fimbriatum* and its protective effect on corticosterone-induced PC12 cell damage

WANG Jing-wen[1], XU Xiao-na[2], ZHANG Hai-lang[1], LEI Guo-ping[1], XU Wei[3, 4], YANG Yun-zhi[3, 4*] (1. *Nanchong Institute for Food and Drug Control*, *Nanchong Sichuan* 637000; 2. *School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210000; 3. *Traditional Chinese Medicine Preparation Center*, *Nanchong Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Nanchong Sichuan* 637000; 4. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Skeletal Muscle Disease in Nanchong*, *Nanchong Sichuan* 637000)

Abstract: Objective To determine flavonoid components from *Dendrobium fimbriatum* and its protective effect on PC12 cell damage induced by corticosterone. **Methods** The compounds were separated and purified by polyamide resin, Sephadex LH-20 column chromatography, and silica gel column chromatography. The structures of the isolated compounds were analyzed and identified with nuclear magnetic resonance spectroscopy. The activity of the compounds was tested by in vitro cell assay. **Results** Totally 10 flavonoids and their glycosides were isolated from *Dendrobium fimbriatum*, and identified as vicenin-2 (**1**), isoviolanthin (**2**), violanthin (**3**), apigenin-6-*C*-*α*-L-rhamnosyl-8-*C*-*β*-D-quinovoside (**4**), apigenin-6-*C*-*α*-L-arabinosyl-8-*C*-*β*-D-arabinoside (**5**), apigenin-6, 8-di-*C*-*α*-L-arabinoside (**6**), chryseriol-7-*O*-*β*-D-glucoside (**7**), apigenin-6-*C*-*α*-L-rhamnoside (**8**), isovitexin (**9**), and apigenin (**10**). Compounds **3** ～ **6** and **8** ～ **10** significantly improved the survival rate of PC12 cell damage induced by corticosterone. **Conclusion** Compounds **4**, **5**, and **7** ～ **10** have been isolated from *Dendrobium fimbriatum* for the first time. Compounds **5**, **7** and **8** have been isolated from *Dendrobium* for the first time. Compounds **3** ～ **6**

基金项目：南充市科技计划项目（No.22YYJCYJ0062；No.22ZXKTYJ0012）；四川省科技计划项目（No.2021YFS0270）。
作者简介：王靖雯，女，硕士，主要从事成分分析与药理活性研究，email：1281427142@qq.com *通信作者：杨云芝，女，主任中药师，主要从事中药成分分析与质量控制研究，email：449215268@qq.com

and **8** ～ **10** show neuroprotective effect on PC12 cell damage induced by corticosterone.
Key words: *Dendrobium fimbriatum*; chemical constituent; flavonoid; PC12 cell

流苏石斛（*Dendrobium fimbriatum* Hook.）为兰科（Orchidaceae）石斛属（*Dendrobium*）多年生草本植物，主要分布于广西、贵州、云南、四川等地，具有益胃生津、滋阴清热的功效，可用于治疗热病津伤，口干烦渴，胃阴不足，食少干呕，病后虚热不退，阴虚火旺，骨蒸劳热，目暗不明，筋骨痿软，是中药石斛的重要来源之一[1-3]。中药石斛包括铁皮石斛（*Dendrobium officinale* Kimura et Migo）、金钗石斛（*Dendrobium nobile* Lindl.）、霍山石斛（*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng）、鼓槌石斛（*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.）和流苏石斛（*Dendrobium fimbriatum* Hook.），其中铁皮石斛、金钗石斛均已被证实具有抗抑郁作用，而流苏石斛无此方面研究[4-7]。李志斌等[8]通过 HPLC-ESI-MS^n 技术检测发现流苏石斛中含有大量黄酮碳苷类成分，而石斛中的黄酮碳苷类成分抗抑郁作用尚未见报道。为了解流苏石斛黄酮碳苷类成分的抗抑郁作用，本研究采用大孔吸附树脂和聚酰胺树脂富集流苏石斛煎煮液中的黄酮类成分，并采用葡聚糖凝胶柱色谱、硅胶柱色谱等分离手段对流苏石斛黄酮类成分进行系统分离，共分离鉴定出 10 个黄酮类化合物，分别为新西兰牡荆苷Ⅱ（**1**）、异佛莱心苷（**2**）、佛莱心苷（**3**）、芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖 -8-*C*-*β*-D- 异鼠李糖苷（**4**）、芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 阿拉伯糖 -8-*C*-*β*-L- 阿拉伯糖苷（**5**）、芹菜素 -6，8- 二 -*C*-*α*-L- 阿拉伯糖苷（**6**）、金圣草黄素 -7-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷（**7**）、芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖苷（**8**）、异牡荆素（**9**）和芹菜素（**10**）。

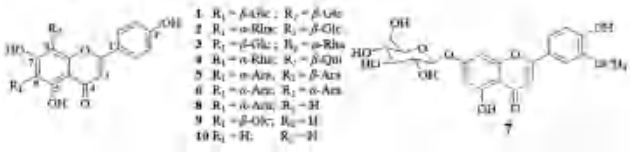


图 1　化合物 **1** ～ **10** 的结构式

Fig 1　Structural formula of compounds **1** ～ **10**

1　材料

1.1　仪器

Bruker Avance Ⅲ-400 核磁共振仪、Ultimate 3000 型高效液相色谱仪、Bruker Daltonics MS 质谱仪（德国布鲁克公司），Multiskan FC 酶标仪 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；SGWX-4 显微熔点器（上海仪电物理光学仪器有限公司）；二氧化碳培养箱（无锡沃信仪器有限公司）；HR40-IIA2 型生物安全柜（青岛海尔股份有限公司）；ES1035B 分析天平（上海力辰科技仪器有限公司）；RE-1102 型旋转蒸发仪（上海嘉鹏科技有限公司）；G-100S 型超声波清洗器（深圳市歌能清洗设备有限公司）；DGL-75X 立式蒸汽灭菌器（江苏登冠医疗器械有限公司）。

1.2　试药

AB-8 大孔树脂（河北沧州宝恩化工有限公司）；葡聚糖凝胶 LH-20（湖南汇百侍生物科技有限公司）；硅胶（100 ～ 200 目）和硅胶 GF254 薄层板（青岛海洋化工厂）；MCI CHP-20（75 ～ 150 μm）（日本三菱公司）；二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、二甲基亚砜等均为市售分析纯；RPMI 1640[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；盐酸氟西汀（礼来苏州制药有限公司）；CCK-8 试剂（南京建成生物工程研究所）；大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 细胞（中国科学院典型培养物保存委员会细胞库）。

实验药材由成都新荷花中药饮片股份有限公司提供，批号为 210408-10，产地为四川省北川羌族自治县，经南充市中医医院杨云芝主任中药师鉴定为兰科石斛属植物流苏石斛 *Dendrobium fimbriatum* Hook. 的干燥茎。

2　提取分离

取流苏石斛中药饮片 2 kg，粉碎为粗粉后第一次加 10 倍量水煎煮 2 h，第二次加 8 倍量水煎煮 1 h，过滤，合并滤液减压浓缩至适量，加入活化后的 AB-8 大孔树脂，吸附过夜，装柱，分别用 5 倍柱体积的 15%、65%、95% 乙醇洗脱液；收集 65% 乙醇洗脱部位浓缩至适量，加聚酰胺树脂吸附过夜，装柱，分别用 5 倍柱体积的 20%、60%、95% 乙醇洗脱，收集 60% 乙醇洗脱液，减压浓缩至浸膏（182.4 g）。60% 乙醇洗脱部位用硅胶柱色谱分离，以二氯甲烷 - 乙醇为溶剂系统进行梯度洗脱（1∶0，9∶1，8∶2，7∶3，6∶4，5∶5，0∶1），采用高效液相色谱仪检测，检测波长为 280 nm，对相似馏分进行合并，得 7 个组分 Fr. 1 ～ Fr. 7。组分 Fr. 2、Fr. 3 经 MCI 柱色谱洗脱、葡聚糖凝胶 LH-20 分子筛获得化合物 **1**（89.4 mg）、化合物 **2**（63.7 mg）、化合物 **3**（52.3 mg），经硅胶柱色谱得化合物 **4**（37.9 mg）；组分 Fr. 4 经 PR-C18 反相柱色谱洗脱、葡聚糖凝胶 LH-20 分子筛获得化合物 **5**（118.6 mg）、化合物 **6**（54.1 mg）、化合物 **7**（22.3 mg），经硅胶柱色谱得化合物 **9**（21.4 mg），经重结晶得化合物 **8**（18.6 mg）；组分 Fr. 5 经 PR-

C18 反相柱色谱洗脱后重结晶获得化合物 **10**（36.3 mg）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：黄色粉末（甲醇）；$C_{27}H_{30}O_{15}$；mp：234 ～ 236 ℃；ESI-MS *m/z*：595.1 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，C_5D_5N）δ_H：14.55（1H，s，5-OH），8.28（2H，d，J = 8.0 Hz，H-2'，6'），7.27（2H，d，J = 8.7 Hz，H-3'，5'），6.63（1H，s，H-3），5.89（1H，d，J = 9.7 Hz，H-1"），5.76（1H，d，J = 9.2 Hz，H-1'"）；^{13}C-NMR（100 MHz，C_5D_5N）δ_C：164.9（C-2），103.6（C-3），183.4（C-4），160.5（C-5），108.8（C-6），163.1（C-7），106.8（C-8），156.6（C-9），105.5（C-10），122.8（C-1'），130.0（C-2'，6'），117.1（C-3'，5'），162.7（C-4'），75.6（C-1"），73.3（C-2"），81.1（C-3"），72.6（C-4"），83.8（C-5"），61.3（C-6"），76.6（C-1'"），74.7（C-2'"），80.1（C-3'"），70.8（C-4'"），83.1（C-5'"），63.4（C-6'"）。以上数据与文献 [9-10] 报道的新西兰牡荆苷Ⅱ数据一致，故确定化合物 **1** 为新西兰牡荆苷Ⅱ。

化合物 **2**：黄色粉末（甲醇）；$C_{27}H_{30}O_{14}$；mp：234 ～ 236 ℃；ESI-MS *m/z*：579.1 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，C_5D_5N）δ_H：14.49（1H，s，5-OH），8.35（2H，d，J = 8.6 Hz，H-2'，6'），7.30（2H，d，J = 8.6 Hz，H-3'，5'），6.73（1H，s，H-3），5.93（1H，d，J = 10.3 Hz，H-1'"），5.75（1H，s，H-1"），1.65（3H，d，J = 6.0 Hz，H-6"）；^{13}C-NMR（100 MHz，C_5D_5N）δ_C：165.1（C-2），103.4（C-3），183.2（C-4），159.0（C-5），108.3（C-6），164.0（C-7），106.3（C-8），156.5（C-9），104.6（C-10），122.8（C-1'），130.0（C-2'，6'），117.2（C-3'，5'），163.0（C-4'），77.0（C-1"），73.7（C-2"），74.0（C-3"），76.3（C-4"），79.0（C-5"），19.1（C-6"），75.7（C-1'"），73.3（C-2'"），81.2（C-3'"），72.5（C-4'"），83.5（C-5'"），63.2（C-6'"）。以上数据与文献 [11] 报道的异佛莱心苷数据一致，故确定化合物 **2** 为异佛莱心苷。

化合物 **3**：黄色粉末（甲醇）；$C_{27}H_{30}O_{14}$；mp：218 ～ 220 ℃；ESI-MS *m/z*：579.1 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ_H：7.33（2H，d，J = 8.3 Hz，H-2'，6'），6.36（2H，d，J = 8.0 Hz，H-3'，5'），5.82（1H，s，H-3），4.67（1H，d，J = 10.3 Hz，H-1"），4.60（1H，s，H-1'"），0.76（3H，d，J = 6.0 Hz，H-6'"）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ_C：164.4（C-2），101.9（C-3），182.1（C-4），157.1（C-5），106.3（C-6），162.5（C-7），104.3（C-8），155.3（C-9），103.3（C-10），121.5（C-1'），128.6（C-2'，6'），115.6（C-3'，5'），161.3（C-4'），74.0（C-1"），71.8（C-2"），79.0（C-3"），71.0（C-4"），81.5（C-5"），61.7（C-6"），75.8（C-1'"），72.3（C-2'"），71.5（C-3'"），74.3（C-4'"），77.4（C-5'"），17.3（C-6'"）。以上数据与文献 [12] 报道的佛莱心苷数据一致，故确定化合物 **3** 为佛莱心苷。

化合物 **4**：黄色粉末（甲醇）；$C_{27}H_{30}O_{13}$；mp：210 ～ 212 ℃；ESI-MS *m/z*：563.1 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ_H：13.85（1H，s，5-OH），8.05（2H，br s，H-2'，6'），6.93（2H，d，J = 8.0 Hz，H-3'，5'），6.80（1H，s，H-3），5.14（1H，br s，H-1"），4.66（1H，d，J = 4.6 Hz，H-1'"），1.28（3H，d，J = 5.6 Hz，H-6'"），1.15（3H，d，J = 6.3 Hz，H-6"）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ_C：163.7（C-2），102.1（C-3），182.4（C-4），159.1（C-5），108.7（C-6），161.3（C-7），103.4（C-8），156.2（C-9），103.4（C-10），121.5（C-1'），128.9（C-2'，6'），115.8（C-3'，5'），161.3（C-4'），75.0（C-1"），72.1（C-2"），74.2（C-3"），71.7（C-4"），77.2（C-5"），18.3（C-6"），73.6（C-1'"），72.1（C-2'"），75.0（C-3'"），71.7（C-4'"），74.5（C-5'"），17.1（C-6'"）。以上数据与文献 [13] 报道的芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖 -8-*C*-*β*-D- 异鼠李糖苷的数据一致，故确定化合物 **4** 为芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖 -8-*C*-*β*-D- 异鼠李糖苷。

化合物 **5**：黄色粉末（甲醇）；$C_{25}H_{26}O_{13}$；mp：193 ～ 195 ℃；ESI-MS *m/z*：535.1 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ_H：13.93（1H，s，5-OH），7.71（2H，dr s，H-2'，6'），6.58（2H，d，J = 8.2 Hz，H-3'，5'），6.16（1H，s，H-3），4.48（1H，d，J = 9.4 Hz，H-1"），4.82（1H，dr s，H-1'"）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ_C：165.8（C-2），99.3（C-3），179.7（C-4），160.6（C-5），106.8（C-6），162.4（C-7），103.8（C-8），156.6（C-9），97.8（C-10），122.5（C-1'），128.5（C-2'，6'），117.6（C-3'，5'），160.7（C-4'），76.2（C-1"），70.8（C-2"），77.8（C-3"），70.8（C-4"），71.0（C-5"），71.2（C-1'"），73.7（C-2'"），71.5（C-3'"），62.7（C-4'"），68.8（C-5'"）。以上数据与文献 [14] 报道的芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 阿拉伯糖 -8-*C*-*β*-L- 阿拉伯糖苷数据一致，故确定化合物 **5** 为芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 阿拉伯糖 -8-*C*-*β*-L- 阿拉伯糖苷。

化合物 **6**：黄色粉末（甲醇）；$C_{25}H_{26}O_{13}$；mp：201 ～ 203 ℃；ESI-MS *m/z*：535.1 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ_H：7.97（2H，d，J = 8.8 Hz，H-2'，6'），7.01（2H，d，J = 8.8

Hz，H-3'，5'），6.52（1H，s，H-3），5.18（1H，d，J = 9.8 Hz，H-1"），4.34（1H，t，J = 9.2 Hz，H-2"），3.64（1H，t，J = 8.3 Hz，H-3"），3.97（1H，m，H-4"），4.12（1H，m，H-5"a），3.43（1H，m，H-5"b），5.04（1H，J = 9.4 Hz，H-1'"），4.63（1H，t，J = 9.3 Hz，H-2'"），3.64（1H，t，J = 8.3 Hz，H-3'"），3.81（1H，m，H-4'"），3.99（1H，m，H-5'"a），3.82（1H，m，H-5'"b）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ_C：160.5（C-2），101.3（C-3），179.6（C-4），160.5（C-5），108.1（C-6），160.8（C-7），104.7（C-8），156.4（C-9），97.8（C-10），122.9（C-1'），127.8（C-2'，6'），115.6（C-3'，5'），161.8（C-4'），76.3（C-1"），71.2（C-2"），79.5（C-3"），70.6（C-4"），70.7（C-5"），75.8（C-1'"），72.6（C-2'"），79.5（C-3'"），69.3（C-4'"），69.8（C-5'"）。以上数据与文献[14]报道的芹菜素 -6，8- 二 -*C*-*α*-L- 阿拉伯糖苷数据一致，故确定化合物 **6** 为芹菜素 -6，8- 二 -*C*-*α*-L- 阿拉伯糖苷。

化合物 **7**：黄色针晶（甲醇）；$C_{22}H_{22}O_{11}$；mp：251 ～ 253 ℃；ESI-MS *m/z*：463.1 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ_H：7.40（1H，d，J = 8.2 Hz，H-5'），7.33（1H，dd，J = 8.2，2.3 Hz，H-6'），7.31（1H，d，J = 2.1 Hz，H-5），7.26（1H，d，J = 2.1 Hz，H-8），6.85（1H，d，J = 2.3 Hz，H-2'），6.92（1H，s，H-3），5.34（1H，d，J = 6.3 Hz，H-1"），3.85（3H，s，3'-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ_C：161.2（C-2），102.1（C-3），181.6（C-4），161.0（C-5），107.1（C-6），160.5（C-7），105.7（C-8），157.2（C-9），102.4（C-10），122.4（C-1'），110.7（C-2'），149.4（C-3'），146.1（C-4'），117.2（C-5'），121.7（C-6'），100.9（C-1"），71.7（C-2"），77.8（C-3"），70.5（C-4"），78.6（C-5"），63.6（C-6"），55.6（3'-OCH_3）。以上数据与文献[15]报道的金圣草黄素 -7-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷数据一致，故确定化合物 **7** 为金圣草黄素 -7-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷。

化合物 **8**：黄色针晶（甲醇）；$C_{21}H_{20}O_9$；mp：225 ～ 227 ℃；ESI-MS *m/z*：417.1 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ_H：14.07（1H，s，5-OH），8.33（2H，d，J = 8.5 Hz，H-2'，6'），6.92（2H，d，J = 8.5 Hz，H-3'，5'），6.86（1H，s，H-3），6.94（1H，s，H-8），5.07（1H，s，H-1"），1.28（3H，d，J = 6.0 Hz，H-6"）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ_C：164.8（C-2），103.7（C-3），182.8（C-4），157.6（C-5），107.4（C-6），162.5（C-7），105.4（C-8），155.6（C-9），102.2（C-10），121.5（C-1'），130.2（C-2'，6'），116.4（C-3'，5'），161.7（C-4'），75.5（C-1"），72.6（C-2"），75.0（C-3"），72.2（C-4"），77.7（C-5"），18.7（C-6"）。以上数据与文献[16]报道的芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖苷数据一致，故确定化合物 **8** 为芹菜素 -6-*C*-*α*-L- 鼠李糖苷。

化合物 **9**：黄色粉末（甲醇）；$C_{21}H_{20}O_{10}$；mp：240 ～ 242 ℃；ESI-MS *m/z*：433.1 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ_H：13.74（1H，s，5-OH），8.03（2H，d，J = 8.5 Hz，H-2'，6'），6.97（2H，d，J = 8.5 Hz，H-3'，5'），6.80（1H，s，H-3），6.91（1H，s，H-8），4.76（1H，d，J = 10.0 Hz，H-1"）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ_C：164.4（C-2），103.0（C-3），182.5（C-4），157.8（C-5），107.8（C-6），163.6（C-7），105.4（C-8），155.6（C-9），102.7（C-10），122.0（C-1'），129.4（C-2'，6'），116.5（C-3'，5'），161.7（C-4'），75.4（C-1"），72.8（C-2"），79.2（C-3"），71.3（C-4"），82.3（C-5"），61.9（C-6"）。以上数据与文献[17]报道的异牡荆素数据一致，故确定化合物 **9** 为异牡荆素。

化合物 **10**：黄色针晶（甲醇）；$C_{15}H_{10}O_5$；mp：345 ～ 347 ℃；ESI-MS *m/z*：271.0 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ_H：13.83（1H，s，5-OH），8.11（2H，d，J = 8.5 Hz，H-2'，6'），6.67（2H，d，J = 8.5 Hz，H-3'，5'），6.72（1H，s，H-3），6.60（1H，s，H-8）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ_C：166.1（C-2），105.0（C-3），184.1（C-4），158.9（C-5），108.6（C-6），163.7（C-7），106.7（C-8），156.8（C-9），103.4（C-10），122.7（C-1'），131.5（C-2'，6'），117.7（C-3'，5'），162.9（C-4'）。以上数据与文献[18]报道的芹菜素数据一致，故确定化合物 **10** 为芹菜素。

4 单体化合物对皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用

实验设置空白组、模型组、阳性药组、各单体化合物组，每组设置 4 个复孔，重复 3 次。PC12 细胞置于含完全培养基（含 DMEM 高糖培养基，10% 胎牛血清，1% 双抗）的 T25 细胞培养瓶中，于 37 ℃、5% CO_2、相对湿度为 90% 的培养箱中孵育，取对数生长期细胞用于测试。取细胞悬液（1×10^5 个 • mL^{-1}）接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，孵育 24 h 后，除空白组外，其余各组分别加入终浓度为 100 μmol • L^{-1} 的皮质酮，空白组加入等体积的培养基，诱导损伤 48 h 后，吸弃培养基，空白组和模型组加入 100 μL 的无血清培养基；阳性药组加入 100 μL 含盐酸氟西汀浓度为 10 μmol • L^{-1}

的无血清培养基；不同单体化合物组加入 100 μL 含不同单体化合物浓度为 10 μmol • L^{-1} 的无血清培养基。培养 24 h 后，采用 CCK-8 法在 450 nm 处测定各孔吸光度（A），计算 PC12 细胞存活率，细胞存活率（%）＝$A_{实验组}/A_{空白组}$ ×100%[19-20]。实验数据采用平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，使用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析。运用单因素方差分析进行组间差异比较，$P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

实验结果显示，与空白组比较，模型组的 PC12 细胞的存活率显著降低（$P < 0.001$）。与模型组相比，化合物 **3** ～ **6**、**8** ～ **10** 可显著提高皮质酮诱导损伤的 PC12 细胞的存活率（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

表 1　各单体化合物对皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用（$n = 3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Protective effect of each monomer compound on corticosterone-induced PC12 cell damage ($n = 3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	细胞存活率 /%	组别	细胞存活率 /%
空白组	100.00±5.83	化合物 **5**	68.57±6.48*
模型组	52.82±6.50$^{\#\#\#}$	化合物 **6**	67.20±5.26*
阳性药组	85.21±4.18**	化合物 **7**	51.79±1.65
化合物 **1**	62.08±4.12	化合物 **8**	71.40±5.26**
化合物 **2**	63.07±6.81	化合物 **9**	69.65±3.36**
化合物 **3**	65.04±5.84*	化合物 **10**	74.18±4.78**
化合物 **4**	67.16±5.20*		

注：与空白组比较，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{\#\#\#}P < 0.001$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

5　讨论

抑郁症是一种精神障碍类疾病，主要表现为情绪低落，兴趣减低，悲观，思维迟缓，缺乏主动性等。下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴与应激密切相关，该轴释放的肾上腺激素主要功能是刺激促肾上腺皮质激素的分泌，进而增加糖皮质激素的分泌，调控应激时的情绪行为反应[21-23]。PC12 细胞来源于大鼠肾上腺髓质肿瘤，具有典型的神经内分泌细胞特征，其表面含有丰富的高表达糖皮质激素受体而普遍应用于抗抑郁[24-25]，其中高浓度的皮质酮诱导 PC12 细胞损伤模型应用广泛，不同类型的抗抑郁药物对皮质酮损伤的 PC12 细胞都具有保护作用[26]。

本研究采用皮质酮诱导 PC12 细胞损伤模型对从流苏石斛中所分离的 9 个化合物进行体外抗抑郁活性筛选，发现化合物 **3** ～ **6**、**8** ～ **10** 对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤具有一定的神经保护作用，提示流苏石斛黄酮类成分可能具有一定的抗抑郁作用，且物质基础与芹菜素及其碳苷类成分有关。另外，通过结构对比发现，以芹菜素为母核的黄酮碳苷类化合物 C-6 位与 C-8 位同时有两个糖取代基的化合物对皮质酮诱导损伤的 PC12 细胞的保护作用活性弱于单个糖取代基弱于无糖取代基，C-7 位羟基糖基化后活性消失。故推测芹菜素及其碳苷类成分的 7 位羟基可能是起活性作用的关键基团，化合物 **1** ～ **6**、**8** ～ **10** 表现出不同的活性可能是由于 C-6 位与 C-8 位取代基产生的位阻不同所致，值得进一步研究。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会 . 中国植物志（第 19 卷）[M]. 北京：科学出版社，1999：90.

[2] 斯金平，张媛，罗毅波，等 . 石斛与铁皮石斛关系的本草考证 [J]. 中国中药杂志，2017，42（10）：2001-2005.

[3] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：94-97，295-296.

[4] Yang Y，Fan L，Peng Y，et al. Alcohol-soluble polysaccharides from *Dendrobium officinale* flowers as an antidepressant by regulating the gut-brain axis [J]. Int J Biol Macromol，2022，216：836-849.

[5] Zhu Y，Liu MQ，Cao C，et al. *Dendrobium officinale* flos increases neurotrophic factor expression in the hippocampus of chronic unpredictable mild stress-exposed mice and in astrocyte primary culture and potentiates NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells [J]. Phytother Res，2021，35（5）：2665-2677.

[6] Xiong TW，Liu B，Wu Q，et al. Beneficial effects of *Dendrobium nobile* Lindl. Alkaloids（DNLA）on anxiety and depression induced by chronic unpredictable stress in rats [J]. Brain Res，2021，1771：147647.

[7] Xiong TW，Liu B，Wu Q，et al. The protective effects of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids（DNLA）against CUMS-induced anxiety/depression and hippocampal transcriptome changes in rats [J]. Pharmacol Res，2023，7：100250.

[8] 李志斌，孟元君，胡莉，等 . 基于 HPLC-ESI-MS^n 技术的流苏石斛黄酮类化学成分分析 [J]. 中药新药与临床药理，2022，33（9）：1254-1260.

[9] 朱慧，宋启示 . 竹叶兰化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发，2008，20（1）：5-7.

[10] Velozo LSM，Ferreira MJP，Santos MIS，et al. *C*-glycosyl flavones from *Peperomia blanda* [J]. Fitoterapia，2009，80（2）：119-122.

[11] Carnat AP，Carnat A，Fraisse D，et al. Violarvensin，a new flavone di-*C*-glycoside from *Viola arvensis* [J]. J Nat Prod，1998，61（2）：272-274.

[12] Xing SP，Yu WX，Zhang XF，et al. Isoviolanthin extracted from *Dendrobium officinale* reverses TGF-β1-mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells via deactivating the TGF-β/Smad and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. Int J Mol Sci，2018，19（6）：1556.

[13] 冯海林，彭崇胜，李晓波 . 铁皮石斛叶中黄酮碳苷类成分分离，鉴定及抑制 α- 葡萄糖苷酶活性研究 [J]. 中国药房，2022，33（18）：2187-2191.

[14] Xie C，Veitch NC，Houghton PJ，et al. Flavone *C*-glycosides from *Viola yedoensis* M Akino [J]. Chem Pharm Bull，2003，51（10）：1204-1207.
[15] 钟凤娥，李胜华，江贤方，等 . 独脚金的化学成分研究 [J]. 湖南林业科技，2018，45（5）：63-67.
[16] 贾陆，毕跃峰，敬林林，等 . 地桃花化学成分研究 [J]. 中国药学杂志，2010，45（14）：1054-1056.
[17] 李艳平，郑传奎，何红平 . 三点金地上部分的化学成分研究 [J]. 中药材，2019，42（1）：87-90.
[18] 沈杰，蔡汶甫，林鹏，等 . 舌叶紫菀化学成分的研究 [J]. 中药材，2022，45（1）：89-94.
[19] 刘艳，刘爽，彭紫琪，等 . 五味子根的化学成分研究 [J]. 中草药，2022，53（19）：5959-5970.
[20] 姜保平，杨瑞武，刘新民，等 . 木豆素 A 对皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 药学学报，2012，47（5）：600-603.
[21] Lu J，Xu XF，Huang YQ，et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China：a cross-sectional epidemiological study [J]. Lancet Psychiat，2021，8（11）：981-990.
[22] 朱文娴，袁国桢 . 中西医结合治疗抑郁症的临床研究现状 [J]. 现代中西医结合杂志，2019，28（27）：3075-3078.
[23] 龚金炎，吴晓琴，毛建卫，等 . 黄酮类化合物抗抑郁作用的研究进展 [J]. 中草药，2011，42（1）：195-200.
[24] Wu FF，Li HQ，Zhao LZ，et al. Protective effects of aqueous extract from *Acanthopanax senticosus* against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. J Ethnopharmacol，2013，148（3）：861-868.
[25] Jiang YM，Li ZY，Liu YM，et al. Neuroprotective effect of water extract of *Panax ginseng* on corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells and its underlying molecule mechanisms [J]. J Ethnopharmacol，2015，159：102-112.
[26] Li YF，Liu YQ，Huang WC，et al. Cytoprotective effect is one of common action pathways for antidepressants [J]. Acta Pharmacol Sin，2003，24（10）：996-1000.

（收稿日期：2023-09-04；修回日期：2023-10-03）

复方葛根汤调控 IL-6/STAT3 和铁死亡通路抑制在体结肠癌发展

钱玲[1]，赵斌[1]，饶江泉[1]，徐恩惠[1]，陈慧[1, 3]，杨潮[1, 3]，罗小泉[1*]，陈来[1, 2, 3*]（1. 江西中医药大学，南昌　330004；2. 江西省中药药理重点实验室，南昌　330004；3. 江西省癌症技术转化工程研究中心，南昌　330004）

摘要：目的　探究复方葛根汤在体抗结肠癌的分子机制。**方法**　建立 HCT116 细胞荷瘤小鼠模型，每日以 1.0 g·kg^{-1} 的剂量灌胃给予复方葛根汤或等体积生理盐水，每 3 日测量一次体重和瘤体大小，连续给药 23 d；Western blot 检测铁死亡通路、IL-6 通路和细胞迁移相关蛋白。**结果**　与对照组相比，复方葛根汤显著抑制 HCT116 细胞衍生瘤体增长，显著上调铁死亡相关蛋白 ACSL4、PTGS2，而明显下调 SLC7A11、GPX4，还显著下调 IL-6、p-STAT3/STAT3 比及其下游蛋白 MMP2、TWIST 和 MMP7 水平。**结论**　复方葛根汤能显著抑制体内结肠癌发展，其机制可能为通过抑制 IL-6/STAT3 和诱导铁死亡通路。

关键词：复方葛根汤；在体结肠癌；IL-6/STAT3 通路；铁死亡
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0979-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.024

Inhibition effect of Compound Gegen decoction on the development of colon cancer in vivo by regulating IL-6/STAT3 and ferroptosis pathway

QIAN Ling[1], ZHAO Bin[1], RAO Jiang-quan[1], XU En-hui[1], CHEN Hui[1, 3], YANG Chao[1, 3], LUO Xiao-quan[1*], CHEN Lai[1, 2, 3*] (1. *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 2. *Jiangxi Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology*, *Nanchang* 330004; 3. *Jiangxi Engineering Research Center for Translational Cancer Technology*, *Nanchang* 330004)

基金项目：江西省卫生与健康委员会科技项目（No.202211419）；江西省科技计划项目（No.20212BCD46005）；江西省中医药管理局科技项目（No.2022B1051）。

作者简介：钱玲，女，硕士研究生，主要从事中药抗肿瘤药效与药理机制研究，email：qlcz1214@163.com　*通信作者：陈来，男，教授，硕士研究生导师，主要从事中药抗肿瘤药效与药理机制研究，email：chlai3383@foxmail.com；罗小泉，男，教授，硕士研究生导师，主要从事疾病动物模型研制及中药药效研究，email：lxqdjl@126.com

Abstract: Objective To determine the molecular mechanism of Compound Gegen decoction (CGD) inhibiting colon cancer in vivo. **Methods** The HCT116 cell-derived tumor bearing mouse model was established and daily given CGD or equal volume saline intragastrically at the dose of 1.0 g • kg^{-1} for 23 days, and the weight and tumor size were measured once every three days. The ferroptosis pathway, IL-6 pathway and cell migration-related proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, CGD greatly inhibited the growth of HCT116 cell-derived tumor in vivo. Ferroptosis-related proteins ACSL4 and PTGS2 were much up-regulated, while SLC7A11 and GPX4 were obviously down-regulated, and IL-6, p-STAT3/STAT3 ratio and its downstream proteins MMP2, TWIST and MMP7 were all greatly down-regulated. **Conclusion** CGD can inhibit the growth of colon cancer in vivo, whose mechanism may be through inhibiting IL-6/STAT3 and inducing ferroptosis pathway.

Key words: Compound Gegen decoction; colon cancer in vivo; IL-6/STAT3 pathway; ferroptosis

2020 年全球前十位癌症数据统计结果显示，结直肠癌发病率第三，死亡率第二，严重影响着人们的生命健康[1]。近年来，中药逐步应用于肿瘤临床诊断治疗，“人瘤共存”的观点讲究提高患者生存质量而未必消除肿瘤，尽可能预防或延缓肿瘤的复发转移，并在一定程度控制甚至缩小瘤体[2]。复方葛根汤是经典名方葛根芩连汤的加味复方，是山东省中医院肿瘤科二级教授齐元富医家收录的临床经验方，由葛根、黄芩、黄连、黄柏、木香、白头翁、白花蛇舌草、秦艽、泽泻、槟榔、当归、白术、苍术、甘草 14 味中药组成，具有清热利湿、散结消积的功效，用于治疗湿热下注证型结直肠癌，具有显著药效[3]，然而其调控结直肠癌在体增长作用分子机制迄今未明。本课题组前期研究发现复方葛根汤能够抑制 HCT116 细胞增长和迁移，基于前期实验，本研究拟构建结肠癌 HCT116 细胞衍生的 BALB/c 裸鼠异位移植肿瘤模型，探究复方葛根汤对在体结肠癌的药效作用及其分子机制。

1 材料

1.1 仪器与试药

麻醉机（瑞沃德生命科技有限公司），生物安全柜、高速冷冻离心机（上海立申科学仪器有限公司），多功能酶标仪（TECAN），化学发光仪（美国 BIO-RAD 公司），分析天平 [梅特勒托利仪器（上海）有限公司]，冷冻干燥机 [博医康（北京）仪器有限公司]。

异氟烷（瑞沃德生命科技有限公司，批号：R510-22），舒泰 50（法国维克有限公司，批号：83887905），BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号：20201ES76）、三色预染蛋白质分子量标准（批号：G9214100）[翌圣生物科技（上海）股份有限公司]，生理盐水（武汉塞维尔生物科技有限公司，批号：G4702），IL-6 抗体、*β*-actin 抗体、山羊抗小鼠 IgG（华安生物科技有限公司，批号分别为 EM1701-58、EW21002、HA1006），STAT3 抗体、MMP2 抗体、TWIST 抗体、MMP7 抗体、PTGS2 抗体、GPX4 抗体（北京索莱宝科技有限公司，批号分别为 K000124M、K002140P、K009993P、K001731P、K001561P、K003083P），p-STAT3 抗体（Abcepta，批号：AP67183），SLC7A11 抗体（上海碧云天生物科技有限公司，批号：AF7992），ACSL4 抗体（Proteintech，批号：00107404），山羊抗兔 IgG（Biosharp，批号：BL003A），粉葛、甘草片、苍术（广西紫云轩中药科技有限公司，批号分别为 GX211201、GX220101、GX211201），黄芩片、秦艽、泽泻、槟榔、木香、白头翁、白花蛇舌草、白术（安徽协和成药业饮片有限公司，批号分别为 21122104、18090402、22020829、21030809、21111107、21080410、21080904、20112404），黄连片、黄柏（四川新荷花中药饮片股份有限公司，批号分别为 D2201061、D2110017），当归（岷县顺兴和中药材有限责任公司，批号：211228），所有药材均购自江西省南昌市南昌大参林连锁药店有限公司，经江西中医药大学王朝晖副教授鉴定，符合 2020 年版《中国药典》规定。

1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 裸鼠，雌性，6 ～ 8 周龄 [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0004，SYXK（赣）2022-0002]。动物饲养在 SPF 级设施中，每日保障得到充足的饲料和饮水，并保持 12 h/12 h 昼夜的节律；动物实验过程严格按照保障动物福利的规则进行并获得了江西中医药大学伦理委员会批准（批件号：JZLLSC20210079）。

2 方法

2.1 复方葛根汤的制备

分别称取粉葛 20 g、黄芩 10 g、黄连 5 g、黄柏 10 g、秦艽 20 g、泽泻 20 g、苍术 15 g、当归 10 g、

槟榔 15 g、白头翁 20 g、白花蛇舌草 20 g、白术 15 g、生甘草 10 g，10 倍量超纯水浸泡 30 min，在煎煮完成前 10 min 加入 10 g 木香，自动煎药 2 h。纱布过滤后得到第一次煎煮液。药渣中加入 10 倍量超纯水，自动煎药 2 h，进行第二次煎煮。纱布过滤，合并两次煎液。旋转蒸发浓缩至 600 mL 左右，4 ℃、8000 r • min^{-1} 离心 10 min，上清液继续旋转蒸发浓缩至 100 mL 左右冻干成粉。

精密称取少量冻干粉，生理盐水溶解，8000 r • min^{-1}、4 ℃离心 10 min，取上清液静置过夜，10 000 r • min^{-1}、4 ℃离心 10 min，取上清液调节质量浓度至 250 mg•mL^{-1}。0.22 μm 微孔滤膜过滤待用。

2.2　人 HCT116 结肠癌裸鼠异位移植瘤模型建立

SPF 级 BALB/c 裸鼠，雌性，6 周龄，10 只，取体积约 2 mm×2 mm×2 mm 的结肠癌 HCT116 瘤块接种于裸鼠背部靠近腋下的部位，建立人 HCT116 结肠癌裸鼠异体移植瘤模型 [4]。

2.3　实验分组及给药方法

接瘤第 7 日，伤口愈合，游标卡尺测量每只动物瘤体的长和宽，随机分成对照组和复方葛根汤组，每组 5 只。复方葛根汤组以 1.0 g • kg^{-1} 剂量每日灌胃复方葛根汤，对照组灌胃等体积的生理盐水，连续给药 23 d，每 3 日称量体重和测量瘤体大小，第 23 日给药后 24 h 即第 24 日结束实验。

2.4　观察和检测指标

每日观察裸鼠的饮食情况、精神状况、给药后的反应、粪便情况和裸鼠生存情况。每 3 日称量裸鼠体重并测量瘤体的长和宽。实验终末使用舒泰 50 麻醉裸鼠，按组别活体拍照裸鼠荷瘤形态；采用脱颈椎法处死，剥离瘤体和各脏器，观察复方葛根汤组与对照组各脏器形态大小和颜色有无异常，分析天平称取瘤体重量和各脏器重量。瘤体增长大小（mm^3）＝最终瘤体大小－第一次瘤体大小；瘤体体积（mm^3）＝长 × 宽 × 高 /2；抑瘤率（%）＝（平均生理盐水组瘤重－平均葛根汤组瘤重）/ 平均生理盐水组瘤重 ×100%；脏器指数（%）＝脏器重量 / 体重 ×100%。

2.5　Western blot 法检测相关蛋白表达水平

提取组织总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，每组取三个样本用于 Western blot 检测。SDS-PAGE 凝胶电泳，以恒压 80 V、20 min，120 V 直至结束两步进行电泳；以恒流 200 mA，90 min 进行转膜；5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h；4 ℃摇床孵育一抗过夜，洗膜；室温摇床孵育二抗 1 h，洗膜；ECL 试剂显色，化学发光仪显影并拍照。用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.6　统计学分析

使用 GraphPad Prism 6.02 分析软件对所得结果进行统计学处理，数据以平均值 ± 标准差表示，两组之间比较采用 *t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　复方葛根汤对体内 HCT116 细胞衍生的异位移植肿瘤生长的影响

结果如图 1 所示，与对照组相比，复方葛根汤组显著降低了肿瘤体积增长速率（$P < 0.05$、$P < 0.01$），并且抑制作用随时间延长而增强。与对照组相比，复方葛根汤组显著降低了肿瘤重量（$P < 0.05$），抑瘤率为 56.48%，表明复方葛根汤能显著抑制体内结肠癌的增长。

3.2　复方葛根汤对脏器指数的影响

与对照组相比，复方葛根汤对各脏器没有显著影响，见表 1。脏器的形态和颜色也没有差异。

表 1　复方葛根汤对 HCT116 结肠癌荷瘤小鼠各脏器指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of Compound Gegen decoction on various organ indexes of HCT116 colon cancer bearing mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	心脏指数	肝脏指数	肺脏指数	脾脏指数	肾脏指数
对照组	0.0073±0.0019	0.0645±0.0091	0.0086±0.0006	0.0079±0.0016	0.0164±0.0024
复方葛根汤组	0.0060±0.0008	0.0612±0.0025	0.0096±0.0009	0.0099±0.0034	0.0183±0.0009
P	0.2256	0.4564	0.0790	0.2627	0.1362

3.3　复方葛根汤对铁死亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比，复方葛根汤显著下调 SLC7A11（$P < 0.01$）、GPX4（$P < 0.05$）蛋白水平，显著上调铁死亡相关蛋白 PTGS2（$P < 0.01$）、ACSL4（$P < 0.05$）蛋白水平，见图 2。结果表明，复方葛根汤可以调控铁死亡相关蛋白，可能通过诱导细胞铁死亡而抑制在体结肠癌的增长。

3.4　复方葛根汤对 IL-6/STAT3 通路及其下游蛋白的水平的影响

与对照组相比，复方葛根汤组瘤体中 STAT3 蛋白表达没有差异，但复方葛根汤显著下调 IL-6（$P < 0.001$）、p-STAT3（$P < 0.05$）蛋白及 IL-6/STAT3 通路下游因子 TWIST（$P < 0.05$）、MMP2（$P < 0.01$）、MMP7（$P < 0.001$）蛋白的表达水平，见图 3，结果表明：复方葛根汤可通过抑制 IL-6/STAT3 通路而下调其下游迁移相关因子，提示该方能通过抑制 IL-6/STAT3/TWIST/MMP2/MMP7 通路抑制在体结肠癌细胞迁移。

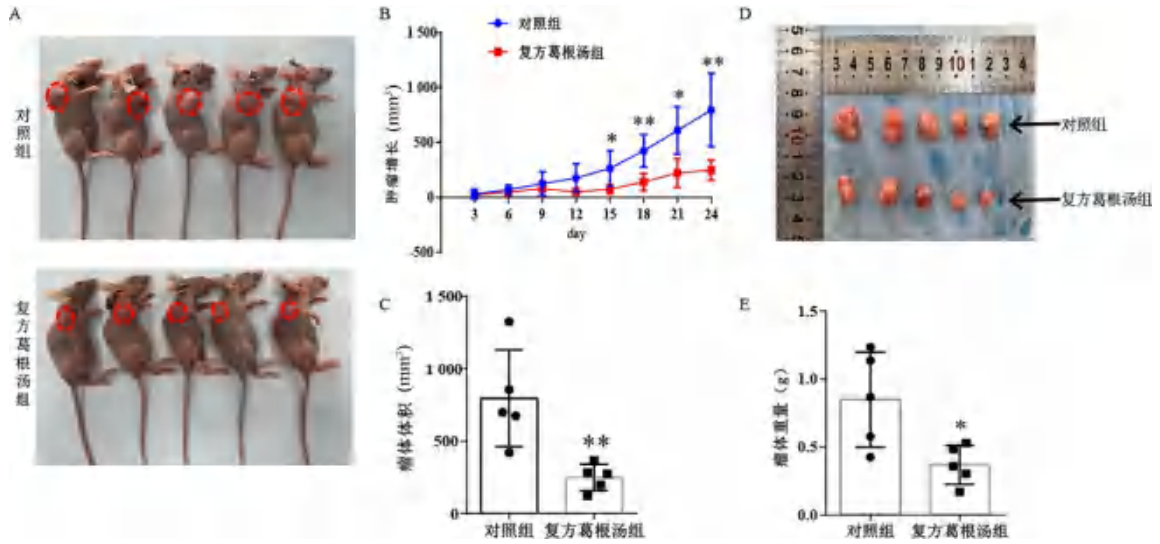


图 1　复方葛根汤对裸鼠异位移植结肠癌生长的影响

Fig 1　Effect of Compound Gegen decoction on the growth of xeno-transplanted colon cancer in nude mice

注（Note）：A. 红色虚线圈显示瘤体部位（tumor in the nude mice marked with red dotted circles）；B. 肿瘤体积增长曲线（tumor volume growth curve）；C. 瘤体体积（tumor volume）；D. 实验终末时瘤体（tumor at the end of the experiment）；E. 实验终末时瘤体重量（tumor weight at the end of the experiment）；与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

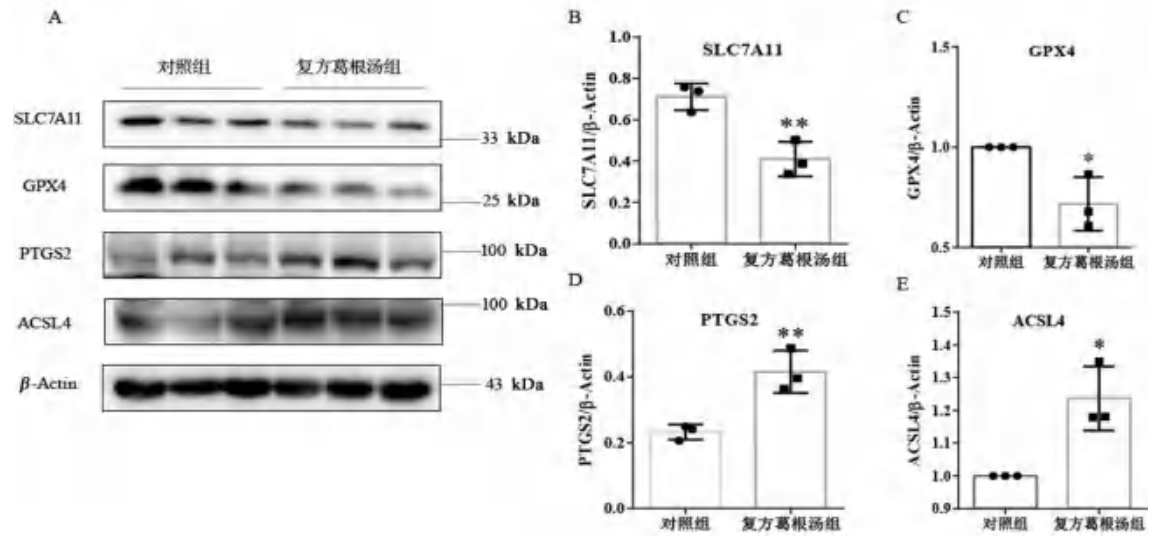


图 2　复方葛根汤对铁死亡相关蛋白表达的影响

Fig 2　Effect of Compound Gegen decoction on the expression of ferroptosis-related proteins

注（Note）：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

4　讨论

铁死亡是近些年发现的一种不同于细胞凋亡、坏死、焦亡和自噬的程序性细胞死亡方式，具有铁离子依赖性，它是由小分子物质诱导发生氧化导致的细胞死亡[5]，其特征表现为细胞内脂质活性氧（ROS）的生成与降解失衡，特别是谷胱甘肽过氧化物酶（GPXs-Px）导致细胞抗氧化能力降低、ROS 堆积，最终引起细胞氧化性死亡[6]。有文献报道 STAT3 与氧化反应相关，且可能是铁死亡的潜在调节剂[7]。STAT3 可通过结合 *SLC7A11* 和 *GPX4* 基因启动子中的保守应答元件直接调节 GPX4 和 SLC7A11 的表达来触发铁死亡[8]。SLC7A11 参与细胞内胱氨酸还原为半胱氨酸以及谷胱甘肽（GSH）合成过程，进而影响 GPX4 的活性[9]。本研究中 Western blot 数据结果显示：复方葛根汤能够显著降低瘤体中 p-STAT3/STAT3 的比值，下调 SLC7A11、GPX4 蛋白的表达。说明复方葛根汤可能通过调控 STAT3/SLC7A11/GPX4 信号通路诱导铁死亡抑制结肠癌生长。

IL-6/STAT3 通路在多种类型肿瘤的侵袭和转移方面起重要作用，IL-6 水平升高能磷酸化和激活 STAT3，p-STAT3 入核调控 MMP2[10]、TWIST[11] 表达升高。本研究中 Western blot 实验数据显示，复方葛根汤显著下调了 IL-6 水平和 p-STAT3/STAT3 比

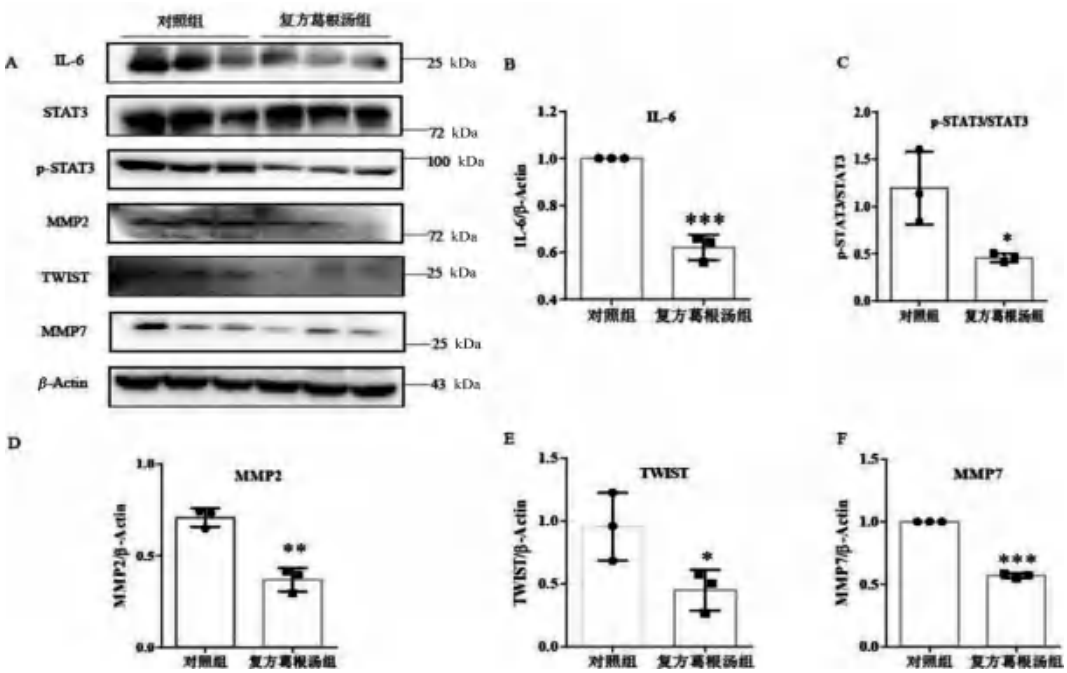


图 3　复方葛根汤对 IL-6/STAT3 通路及其下游因子的影响

Fig 3　Effect of compound Gegen decoction on IL-6/STAT3 pathway and its downstream factors

注（Note）：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

值，降低了下游靶点 MMP2、TWIST 的水平。与对照组相比，复方葛根汤还能下调 MMP7 水平，而 MMP7 在结直肠癌转移中起重要作用[12]。据报道，IL-6/STAT3 通路能在人类胰腺炎和胰腺导管腺癌发展中上调 MMP7[13]，本研究数据进一步表明 MMP7 也可能在结直肠癌中受该通路的调控。有报道显示，MMP7 能切割 CD95 死亡受体的氨基末端而将信号转向非凋亡途径[14]，提示 MMP7 在促进结直肠癌的存活中也能发挥作用。

综上所述，复方葛根汤能通过抑制 IL-6/STAT3 通路下调 GPX4、SLC7A11 蛋白的表达，结合 PTGS2、ACSL4 蛋白表达上调诱导铁死亡而抑制在体结肠癌增长，并能通过抑制 IL-6/STAT3 通路下调 TWIST/MMP2 水平抑制结肠癌的迁移，还能通过下调 MMP7 抑制结肠癌细胞迁移和死亡抗性。本研究揭示复方葛根汤在体抗结肠癌分子机制，为其临床应用提供了实验数据支持。

参考文献

[1] 刘宗超，李哲轩，张阳，等 . 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志，2021，7（2）：1-13.

[2] 王晓群，贾英杰 . 中医药治疗恶性肿瘤的特色优势与思考 [J]. 时珍国医国药，2016，27（12）：3072-3074.

[3] 齐元富 . 肿瘤病经方论治 [M]. 北京：人民卫生出版社，2007：242.

[4] 李华云，李芹，刘明华，等 . 克癌新丸对裸鼠结肠癌细胞 HCT116 移植瘤生长的抑制作用 [J]. 中国药学杂志，2017，52（18）：1609-1613.

[5] 周文博，孔晨飞，秦高伟，等 . 铁死亡发生机制的研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展，2018，45（1）：16-22.

[6] 曾杰，陈玉宝，徐晓玉 . 铁死亡相关机制、调控手段及相关疾病研究进展 [J]. 中国药学杂志，2017，52（4）：253-257.

[7] Chun KS，Jang JH，Kim DH. Perspectives regarding the intersections between STAT3 and oxidative metabolism in cancer [J]. Cells，2020，9（10）：2202.

[8] Ouyang SM，Li HX，Lou LL，et al. Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer [J]. Redox Biol，2022，52：102317.

[9] Li J，Cao F，Yin HL，et al. Ferroptosis：past，present and future [J]. Cell Death Dis，2020，11（2）：88.

[10] Byun HJ，Darvin P，Kang DY，et al. Silibinin downregulates MMP2 expression via JAK2/STAT3 pathway and inhibits the migration and invasive potential in MDA-MB-231 cells [J]. Oncol Rep，2017，37（6）：3270-3278.

[11] Luo YM，Cui YH，Cao XC，et al. 8-Bromo-7-methoxychrysin-blocked STAT3/TWIST axis inhibits the stemness of cancer stem cell-like cell originated from SMMC-7721 cells [J]. Acta Bioch Bioph Sin，2017，49（5）：458-464.

[12] Gao YY，Nan XX，Shi XJ，et al. SREBP1 promotes the invasion of colorectal cancer accompanied upregulation of MMP7 expression and NF-κB pathway activation [J]. BMC Cancer，2019，19（1）：685.

[13] Fukuda A，Wang SC，Morris JP，et al. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression [J]. Cancer Cell，2011，19（4）：441-455.

[14] Kenji SF，Kurma K，Collet B，et al. MMP7 cleavage of amino-terminal CD95 death receptor switches signaling toward non-apoptotic pathways [J]. Cell Death Dis，2022，13（10）：895.

（收稿日期：2023-04-27；修回日期：2024-01-25）

基于质量源于设计理念的降脂护肝方提取工艺研究

吴作敏[1]，李恒[1]，王韵旨[1]，宁萌[1]，郭丽[1]，李宜涵[1]，金少举[2]，王瑞[1, 3, 4*]（1. 漯河市中心医院药学部，河南 漯河 462000；2. 漯河医学高等专科学校，河南 漯河 462000；3. 河南省中药制剂与加工中医药重点实验室，河南 漯河 462000；4. 河南省中药制剂现代化技术研发与临床应用工程研究中心，河南 漯河 462000）

摘要：目的 基于质量源于设计理念，优化降脂护肝方的提取工艺。**方法** 以提取次数、提取时间、加水倍量为关键工艺参数（CPPs），应用正交设计从黄芪甲苷、甜菜碱、多糖含量及出膏率 4 项潜在关键质量属性（CQAs）中筛选 CPPs 对应的 CQAs，通过 Box-Behnken 设计确定 CQAs，并建立数学模型分析 CPPs 与 CQAs 之间的交互作用，最后建立设计空间并验证。**结果** 根据 Box-Behnken 试验确定甜菜碱的含量与出膏率为 CQAs。通过设计空间的优化，得到最佳提取工艺为加 10 倍量水，提取 3 次，每次 1.5 h。**结论** 本研究优选的提取工艺稳定可靠，可为降脂护肝方的制备及质量控制提供参考。

关键词：质量源于设计；降脂护肝方；提取工艺；Box-Behnken 设计；设计空间
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-0984-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.025

Extraction of Jiangzhi Hugan prescription based on concept of quality by design

WU Zuo-min[1], LI Heng[1], WANG Yun-zhi[1], NING Meng[1], GUO Li[1], LI Yi-han[1], JIN Shao-ju[2], WANG Rui[1, 3, 4*] (1. *Department of Pharmacy*, *Luohe Central Hospital*, *Luohe Henan* 462000; 2. *Luohe Medical College*, *Luohe Henan* 462000; 3. *Henan Key Laboratory of TCM Preparations and Processing*, *Luohe Henan* 462000; 4. *Henan Engineering Research Center of TCM Preparation Modernization and Clinical Application*, *Luohe Henan* 462000)

Abstract: Objective To optimize the extraction of Jiangzhi Hugan prescription (JZHG) based on the concept of quality by design. **Methods** The number of extractions, extraction time and the times of water addition were used as the critical process parameters (CPPs). The orthogonal design was adopted to screen the critical quality attributes (CQAs) corresponding to CPPs from four potential CQAs, namely the content of astragaloside Ⅳ, betaine, polysaccharide and the extraction amount of solid matter. The CQAs were determined by Box-Behnken design. The mathematical model was established to determine the interaction between CPPs and CQAs. The design space of the JZHG extraction was established and verified. **Results** The content of betaine and the extraction amount of solid matter were determined as CQAs in the extraction by the variance analysis of Box-Behnken experiment. Through the optimization of the design space, the optimum extraction process was obtained as follows: adding 10 times of water, 3 extractions, and each extraction 1.5 h. **Conclusion** The optimized extraction is stable and reliable, which provides reference for the process development and quality control of JZHG.

Key words: quality by design; Jiangzhi Hugan prescription; extraction process; Box-Behnken design; design space

基金项目：河南省中医药科学研究专项课题（No.2022ZY1195）；漯河市重大科技创新专项（漯财预指 [2022]478 号）；漯河医学高等专科学校创新创业发展能力提升工程科技类项目（No.2021LYZKJXM043）。

作者简介：吴作敏，女，主管药师，主要从事中药制剂研发与药理学研究，email：wuzuomin8165@163.com *通信作者：王瑞，男，主任药师，主要从事中药制剂学研究，email：wangrui556116@163.com

高脂血症以血脂或脂蛋白水平异常为特征，是动脉硬化、心脑血管病的主要危险因素之一[1-2]，其发病率逐年升高，且呈低龄化趋势[3]。西医治疗高脂血症需长期使用他汀类、贝特类等药物，其不良反应较多，如易导致胃肠道反应、肝功能损伤等，致患者用药依从性和耐受性降低[4]。在中医学上高脂血症属于“痰饮”“血浊”等范畴，以健脾化湿，行气化痰，活血祛瘀，补益肝肾为治疗原则，在辨证立法基础上，遣药组方，从整体上改变人体病理状态，改善机体功能，疗效显著[5]。降脂护肝方（Jiangzhi Hugan prescription，JZHG）由黄芪、枸杞子、灵芝、山楂配伍而成，具有健脾益气、化痰散瘀、补益肝肾之功效，用于高脂血症的治疗，疗效较好[6-9]。该处方长期采用水煎煮形式应用于临床，但提取工艺重要参数尚不明确，制剂质量不稳定，限制了其临床推广及进一步开发应用。

质量源于设计理念（quality by design，QbD）以保障产品质量为目的，设计科学实验，借助数学模型，探索关键质量属性（critical quality attributes，CQAs）与关键工艺参数（critical process parameters，CPPs）间的关系，建立稳健的设计空间并验证[10]，该理念逐渐应用于中药制剂工艺研究中，探索更加符合实际生产过程的制备工艺[11-12]。本研究基于QbD理念，采用单因素考察结合正交试验筛选处方提取工艺中CPPs对应的CQAs，利用Box-Behnken设计确定CQAs，并建立设计空间，优选提取工艺，以期为后续研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪（美国Agilent公司），Milli-Q型纯水机（美国Millipore公司），AUW-120D型十万分之一电子天平、1900型紫外分光光度计（日本Shimadzu公司），DHG-9030电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司），JY2002型多功能电子天平（上海衡平仪器仪表厂），5810R低温高速离心机（德国Eppendorf公司）。

1.2 试药

黄芪甲苷对照品（批号：DSTDH001501，纯度：99.75%）、甜菜碱对照品（批号：DSTDT19032015，纯度：99.29%）、无水葡萄糖对照品（批号：DST200529，纯度：99.06%）（成都德思特生物技术有限公司）。黄芪饮片（批号：200201）、枸杞子饮片（批号：201069）、灵芝饮片（批号：11201227159A）、山楂饮片（批号：200401）（河南鸿博药业有限公司，经河南省中药制剂与加工中医药重点实验室副主任中药师于晓涛鉴定，质量均符合2020年版《中国药典》相关要求）；乙腈、甲醇为色谱纯，其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 降脂护肝方提取液的制备

按处方配比称取黄芪、灵芝等中药饮片，共计96 g，加一定量的水，室温浸泡30 min后，加热回流提取一定时间和一定次数后，趁热过滤，合并滤液，减压浓缩，加水定容至200 mL，即得降脂护肝方提取液。

2.2 潜在CQAs与CPPs的筛选

查阅相关文献，基于处方各药味的药理活性研究[8，13-15]及2020年版《中国药典》一部中的相关规定，以黄芪甲苷、甜菜碱、多糖含量及出膏率作为降脂护肝方提取工艺的潜在CQAs。本研究选择工艺可控性较强的提取次数、提取时间、加水倍量作为CPPs。

2.3 指标成分含量测定

2.3.1 黄芪甲苷含量测定

① 对照品溶液的制备：精密称取黄芪甲苷对照品适量，加甲醇制成质量浓度为1.10 mg·mL^{-1}的黄芪甲苷对照品溶液，备用。

② 供试品溶液的制备：精密吸取“2.1”项下提取液10 mL，置于分液漏斗中，加水饱和正丁醇萃取3次，每次15 mL，合并正丁醇层，加氨试液萃取2次，每次10 mL，弃去氨水层，正丁醇层水浴蒸干，残渣加甲醇溶解并定容至2 mL量瓶中，摇匀，0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液即得供试品溶液[16]。

③ 缺黄芪阴性样品溶液的制备：按照“2.1”项下方法制备缺黄芪的阴性样品提取液，再按照②项下方法制备缺黄芪阴性样品溶液。

④ 色谱条件[16]：色谱柱为Agilent ZORBAX SB C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水（32∶68）；柱温30 ℃；流速1.0 mL·min^{-1}；进样量10 μL；Agilent 1260 Infinity ELSD：雾化温度30 ℃；蒸发温度50 ℃；气体流速1.4 SLM。

⑤ 专属性试验：取黄芪甲苷对照品溶液、阴性样品溶液、供试品溶液进样分析，结果见图1；可见主峰分离度良好，且阴性样品溶液无干扰。

⑥ 线性关系考察：精密移取“2.3.1”项下黄芪甲苷对照品溶液，用甲醇逐级稀释，进样分析，记录峰面积。以对照品质量浓度的对数作横坐标（X），峰面积的对数作纵坐标（Y），得回归方程为$Y = 1.7524X + 8.1589$，$R^2 = 0.9996$，线性范围为0.1375～1.10 mg·mL^{-1}。

在方法学考察中，黄芪甲苷精密度试验*RSD*为1.7%（$n = 6$）；稳定性试验*RSD*为1.3%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好；重复性试验*RSD*为0.69%（$n = 6$）；平均加样回收率为98.61%，*RSD*为2.2%（$n = 6$）。

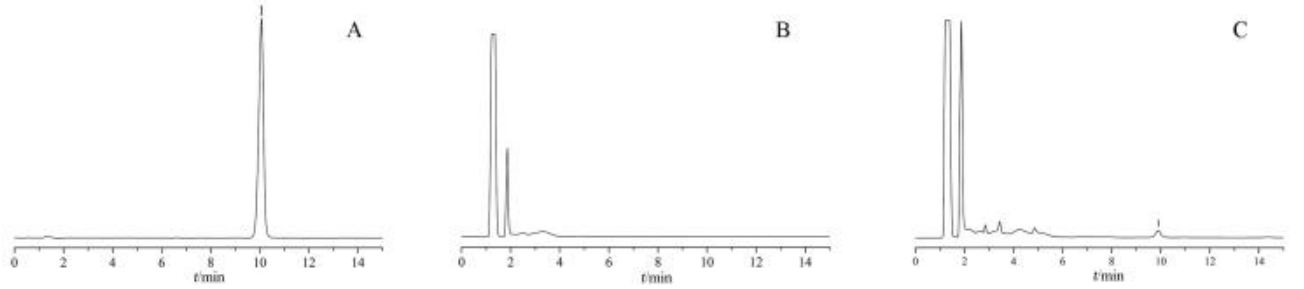


图 1　黄芪甲苷专属性测定 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of specificity determination of astragaloside

A. 黄芪甲苷对照品溶液（astragaloside Ⅳ reference substance）；B. 缺黄芪阴性样品溶液（negative sample with out Astragalus membranaceus）；C. 供试品溶液（test solution）；1. 黄芪甲苷（astragaloside Ⅳ）

2.3.2　甜菜碱含量测定

① 对照品溶液的制备：精密称取甜菜碱对照品适量，加纯化水溶解制成质量浓度为 1.00 mg • mL^{-1} 的对照品溶液，备用。

② 供试品溶液的制备：取“2.1”项下的提取液 10 mL，置棕色具塞锥形瓶中，加甲醇 15 mL，密塞，摇匀，精密称定重量，超声（功率 250 W，频率 25 kHz）处理 30 min，取出，放冷，补足减失重量，摇匀，4000 r • min^{-1} 离心 10 min。精密吸取上清液 1.5 mL，置 5 mL 量瓶中，用 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得 [17]。

③ 缺枸杞子阴性样品溶液的制备：按照“2.1”项下方法制备缺枸杞子的阴性样品提取液，再按照“2.3.2”项下方法②制备缺枸杞子阴性样品溶液。

④ 色谱条件 [17]：色谱柱为 YMC-Trart Diol-Hilic（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为水（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 3.0 min，90%B；3.0 ～ 8.0 min，90% ～ 88%B；8.0 ～ 20.0 min，88% ～ 80%B）；流速 1.0 mL • min^{-1}；柱温 25 ℃；进样量 10 μL；Agilent 1260 Infinity ELSD：雾化温度 45 ℃；蒸发温度 45 ℃；气体流速 1.4 SLM。

⑤ 专属性试验：取甜菜碱对照品溶液、缺枸杞子阴性样品溶液、供试品溶液进样分析，结果见图 2；可见主峰分离度良好，且阴性样品溶液无干扰。

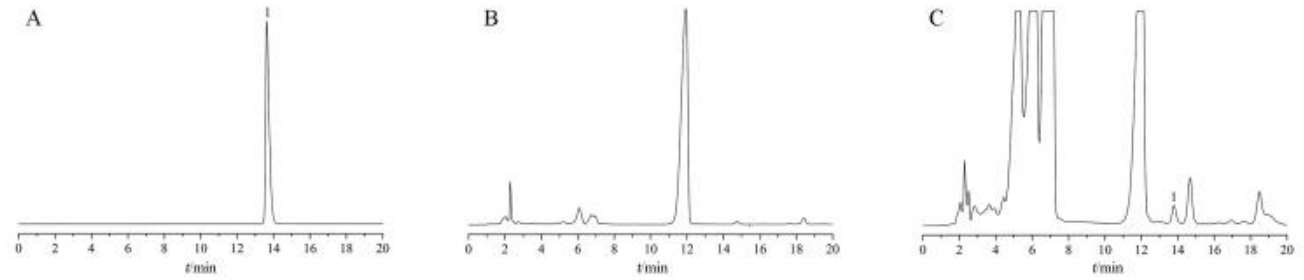


图 2　甜菜碱专属性测定 HPLC 图

Fig 2　HPLC chromatogram of specificity determination of betain

A. 甜菜碱对照品溶液（betaine reference substance）；B. 缺枸杞子阴性样品溶液（negative sample without Lycium）；C. 供试品溶液（test solution）；1. 甜菜碱（betaine）

⑥ 线性关系考察：精密移取“2.3.2”项下的甜菜碱对照品溶液，用纯化水逐级稀释，进样分析，以对照品质量浓度的对数作横坐标（X），峰面积的对数作纵坐标（Y）进行线性回归，得回归方程为 $Y = 1.6921X + 9.4612$，$R^2 = 0.9999$，线性范围为 0.0625 ～ 1.00 mg • mL^{-1}。

在方法学考察中，甜菜碱精密度试验 *RSD* 为 1.6%（$n = 6$）；稳定性试验 *RSD* 为 0.47%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好；重复性试验 *RSD* 为 0.98%（$n = 6$）；平均加样回收率为 99.38%，*RSD* 为 2.7%（$n = 6$）。

2.3.3　多糖含量测定

① 对照品溶液的制备：精密称取 105 ℃干燥至恒重的无水葡萄糖对照品适量，加纯水溶解制成质量浓度为 0.131 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。

② 供试品溶液的制备：取“2.1”项下 5 mL 提取液，加 20 mL 无水乙醇，摇匀，冷藏过夜，4000 r • min^{-1} 离心 10 min，倾倒出上层溶液，留取沉淀，挥至无醇味，加适量纯化水振摇，于 60 ℃水浴加热溶解，放凉至室温，用纯化水定容

至 100 mL 后取 1 mL 用纯化水稀释 10 倍即得供试品溶液 [18]。精密吸取供试品溶液 1 mL，按照“2.3.3”项下方法，测定供试品溶液中多糖含量。

③ 线性关系的考察：精密移取“2.3.3”项下无水葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、1.0、1.2 mL，分别置于 25 mL 的具塞试管中，各加蒸馏水至 2.0 mL，再分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL，摇匀后迅速在试管中加入浓硫酸 5.0 mL，摇匀后置于水浴锅中 40 ℃保温加热 15 min，取出冰水冷却 10 min，以 1 号样品作为对照，在 490 nm 处测定吸光度 [19]。以吸光度值为纵坐标（Y），葡萄糖含量为横坐标（X），绘制标准曲线，计算回归方程为 $Y = 0.0021X - 0.0245$，$R^2 = 0.9992$，线性范围为 26.2 ～ 157.2 μg。

在方法学考察中，多糖精密度试验 *RSD* 为 1.2%（$n = 6$）；稳定性试验 *RSD* 为 1.1%（$n = 6$），表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好，应在 8 h 内完成测定；重复性试验 *RSD* 为 1.6%（$n = 6$）；平均加样回收率为 99.45%，*RSD* 为 2.2%（$n = 6$）。

2.3.4　出膏率的测定　精密吸取“2.1”项下降脂护肝方提取液 20 mL 置于干燥至恒重的蒸发皿中，95 ℃水浴蒸干后转移至 105 ℃的鼓风干燥箱中干燥 5 h，再转移至干燥器内冷却后精密称重。出膏率（%）= [W×（V/20）]/M×100%[20]，W 为 20 mL 提取液中的固体物质量，V 为样品提取液总体积（200 mL），M 为处方药味总质量。

2.4　单因素试验初步筛选 CPPs

固定浸泡时间为 30 min，提取时间为 1 h，加水倍量为 8 倍，考察不同提取次数（1 ～ 5 次）对出膏率、黄芪甲苷、甜菜碱及多糖的含量的影响；固定浸泡时间为 30 min，加水倍量为 8 倍，提取次数为 1 次，考察不同提取时间（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h）对上述 4 项指标的影响；固定浸泡时间为 30 min，提取次数为 1 次，提取时间为 1 h，考察不同加水倍量（6、8、10、12、14 倍）对上述 4 项指标的影响。单因素试验结果见图 3，综合考虑试验因素对各指标的影响，确定提取次数为 1 ～ 3 次，提取时间为 1 ～ 2 h，加水倍量为 8 ～ 12 倍，进行后续研究。

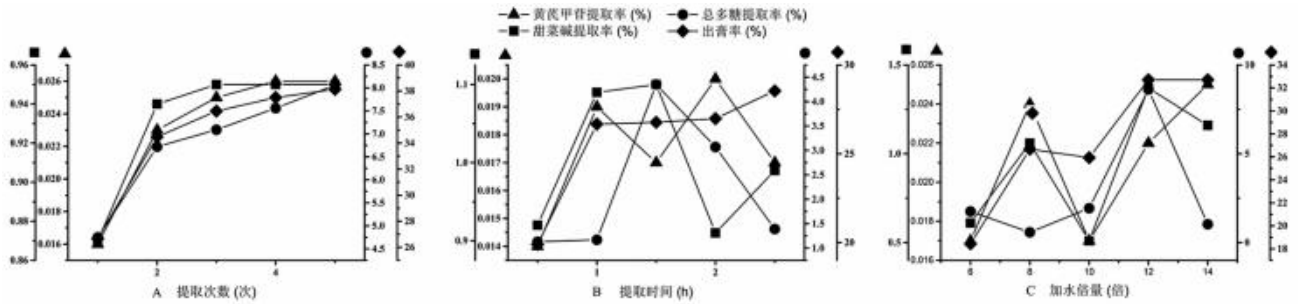


图 3　降脂护肝方提取工艺单因素考察试验结果

Fig 3　Single factor test for extraction process of Jiangzhi Hugan prescription

2.5　正交试验设计筛选 CQAs

为筛选降脂护肝提取液的 CQAs，基于单因素试验结果，采用正交试验设计 [21]，以提取次数、提取时间、加水倍量为考察因素，每个考察因素设置 3 个水平，进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，测定 4 种潜在 CQAs，因素水平见表 1，结果见表 2。对测定结果分别进行方差分析，结果见表 3。由表 3 可知，提取次数（A）对甜菜碱含量、出膏率有显著影响（$P < 0.05$）；其他 CPPs 与潜在 CQAs 间不存在显著关联。据此，初步确定甜菜碱含量、出膏率为降脂护肝方提取工艺的 CQAs。

表 1　降脂护肝方提取工艺正交试验因素水平表

Tab 1　Factor and level of orthogonal test test for extraction process of Jiangzhi Hugan prescription

水平	因素		
	提取次数 / 次	提取时间 / h	加水倍量 / 倍
1	1	1	8
2	2	1.5	10
3	3	2.0	12

2.6　Box-Behnken 设计确定 CQAs 及关系模型的建立

为进一步确定降脂护肝方提取工艺的 CQAs，本研究通过 Design-Expert 10.0 软件，以提取次数、提取时间、加水倍量为考察因素，黄芪甲苷、甜菜碱、多糖含量及出膏率为响应值，进行 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平试验，得到 17 个试验，其中中心点试验重复 5 次，具体见表 4，方差分析见表 5。由结果可知，4 项指标的一项式（linear）模型均具有显著性，同时失拟值不显著；而在交互二项式（2FI）模型拟合中，黄芪甲苷含量回归模型不显著，其他 3 项指标回归模型均具有显著性，且失拟值不显著。对方程拟合相关系数 R^2 对比分析发现，黄芪甲苷含量、多糖含量对应的 R^2 均小于 0.7，表明两者对应的模型不能解释绝大部分响应值的变

表 2　降脂护肝方提取工艺正交试验设计及响应值

Tab 2　Orthogonal test design and response value test for extraction process of Jiangzhi Hugan prescription

序号	A 提取次数 / 次	B 提取时间 / h	C 加水倍量 / 倍	含量 /（mg • g^{-1}）			出膏率 /%
				黄芪甲苷	甜菜碱	多糖	
1	1	1.0	8	0.27	8.14	87.72	23.53
2	1	1.5	10	0.48	9.75	83.35	28.33
3	1	2.0	12	0.45	8.34	114.07	27.91
4	2	1.0	10	0.41	12.16	112.10	33.84
5	2	1.5	12	0.36	13.22	118.06	34.67
6	2	2.0	8	0.22	12.66	102.34	31.92
7	3	1.0	12	0.38	13.28	145.04	36.34
8	3	1.5	8	0.37	15.17	125.17	36.40
9	3	2.0	10	0.57	18.09	214.80	34.22

化，即两者对应的模型拟合度较差，不能用该模型进行分析，即黄芪甲苷含量、多糖含量与 CPPs 间无法建立准确的关系模型；甜菜碱含量、出膏率的交互二项式模型 R^2 均大于一项式模型 R^2，因此选择交互二项式模型，两指标对应的二项式模型的 R^2 分别是 0.7686 和 0.8509，表明两者对应的模型拟合度较好，可用于预测甜菜碱的含量（Y_2）与出膏率（Y_4）的实际情况 [22]。甜菜碱含量、出膏率对应的二次项拟合方程分别是 $Y_2 = 14.23 + 2.12X_1 + 0.57X_2 + 0.66X_3 + 0.49X_1X_2 - 0.27X_1X_3 - 0.49X_2X_3$ 和 $Y_4 = 31.63 + 5.06X_1 + 0.88X_2 + 0.60X_3 + 0.31X_1X_2 - 0.91X_1X_3 - 0.49X_2X_3$。综合正交设计与 Box-Behnken 设计试验方差分析结果，确定甜菜碱含量（Y_2）、出膏率（Y_4）作为降脂护肝方提取工艺的 CQAs。

表 3　方差分析结果

Tab 3　Variance analysis

方差来源	黄芪甲苷含量				甜菜碱含量				多糖含量				出膏率			
	离差平方和	自由度	均方	F	离差平方和	自由度	均方	F	离差平方和	自由度	均方	F	离差平方和	自由度	均方	F
A	0.02	2	0.01	4.43	69.30	2	34.68	21.96	7272.25	2	3636.13	4.92	134.31	2	67.15	22.96
B	0.01	2	0.00	1.48	5.78	2	2.89	1.83	2081.99	2	1041.00	1.41	6.79	2	3.40	1.16
C	0.06	2	0.03	14.33	4.92	2	2.45	1.55	1551.07	2	775.54	1.05	8.56	2	4.28	1.46
D	0.00	2	0.00	1.00	3.16	2	1.58	1.00	1476.89	2	738.44	1.00	5.85	2	2.93	1.00

注：$F(0.05) = 19$，$F(0.01) = 99$。

表 4　降脂护肝方提取工艺 Box-Behnken 设计与响应值

Tab 4　Box-Behnken test design and responce value for extraction process of Jiangzhi Hugan prescription

序号	X_1 提取次数 / 次	X_2 提取时间 / h	X_3 加水倍量 / 倍	含量 /（mg • g^{-1}）			Y_4 出膏率 /%
				Y_1 黄芪甲苷	Y_2 甜菜碱	Y_3 多糖	
1	1	1	10	0.17	11.49	52.62	24.86
2	3	1	10	0.33	15.23	107.05	33.08
3	1	2	10	0.22	12.72	61.97	25.70
4	3	2	10	0.59	18.44	217.77	35.15
5	1	1.5	8	0.20	10.98	49.69	23.85
6	3	1.5	8	0.35	15.28	129.22	37.05
7	1	1.5	12	0.20	12.16	68.49	26.54
8	3	1.5	12	0.34	15.39	144.56	36.12
9	2	1	8	0.37	12.31	115.91	30.80
10	2	2	8	0.22	13.37	107.95	33.83
11	2	1	12	0.30	15.27	174.23	33.29
12	2	2	12	0.23	14.37	126.14	34.36
13	2	1.5	10	0.40	14.22	119.69	32.78
14	2	1.5	10	0.40	14.92	153.11	32.26
15	2	1.5	10	0.40	14.21	133.70	33.13
16	2	1.5	10	0.38	14.57	126.78	32.67
17	2	1.5	10	0.38	14.94	118.45	31.31

由方差分析结果可见提取次数（X_1）对 Y_2 和 Y_4 均有显著影响（$P < 0.01$），根据 CPPs 的 P 值的大小推测各参数对 Y_2 和 Y_4 的影响程度，Y_2 二项式回归模型中 X_1、X_2、X_3 的 P 值分别为 0.0004、0.1901、0.1389，Y_4 二项式回归模型中 X_1、X_2、X_3 的 P 值分别为 < 0.0001、0.2340、0.4083，即 3 个影响因素对 Y_2 的影响程度依次是提取次数（X_1）>加水倍量（X_3）>提取时间（X_2），对 Y_4 的影响程度依次是提取次数（X_1）>提取时间（X_2）>加水倍量（X_3）。

2.7　基于设计空间的控制策略

结合实际情况，利用软件 Design-Expert 10，设定工艺优化目标为甜菜碱含量≥ 14.75 mg • g^{-1}、出膏率≥ 29.64%（最大量的 80%），设计空间置信区间为 95%，建立设计空间并以 Overlay Plot 展示，结果如图 4 所示，其中亮黄色区域即为置信度 95% 的设计空间，其内部所有点的预测值均符合工艺目标，暗黄色区域为风险区域，灰色区域为设计空间外区域，不能达到优化目标。由图 4 可知提取次数为 1 次、2 次时不存在满足工艺目标的设计空间，因此选择提取次数为 3 次。由图 4 可以看出满足条件的设计空间的 CPPs 范围为：加水 8 ～ 12 倍，提取 3 次，每次 1.0 ～ 2.0 h。结合实际生产，最终确定降脂护肝方水提工艺为加水浸泡 30 min，提取 3 次，每次 1.5 h，加水倍量为 10 倍。

为验证设计空间的可靠性，选取提取次数为 3 次时设计空间内 4 个不同点进行验证，具体试

表 5　方差分析

Tab 5　Variance analysis

变异来源	Y_1 黄芪甲苷含量（F）		Y_2 甜菜碱含量（F）		Y_3 多糖含量（F）		Y_4 出膏率（F）	
	linear	2FI	linear	2FI	linear	2FI	linear	2FI
总模型	3.82*	1.96*	11.72**	5.54*	7.04**	4.22*	21.59**	9.51**
X_1	11.25**	10.01*	30.09**	27.00**	18.82**	19.49**	62.06**	53.52**
X_2	0.12	0.11	2.20	1.98	0.58	0.60	1.86	1.6
X_3	0.086	0.077	2.88	2.59	1.72	1.78	0.86	0.74
X_1X_2	—	1.35	—	0.73	—	2.99	—	0.099
X_1X_3	—	9.795×10^{-3}	—	0.21	—	3.483×10^{-3}	—	0.86
X_2X_3	—	0.21	—	0.72	—	0.47	—	0.25
失拟值	0.0518	1.53	1.43	1.74	6.00	5.87	4.13	5.46
R^2	0.4685	0.5404	0.7301	0.7686	0.6189	0.6770	0.8329	0.8509

注（Note）：*$P<0.05$，**$P<0.01$。

验结果见表 6，结果表明，设计空间内的点均达到预设目标，而置信区间的点未完全达到目标要求，表明在设计空间内操作能够实现预期目标。其中点 1 即为最佳工艺点，其评价指标甜菜碱含量及出膏率的 *RSD* 值均小于 3.0%，说明该工艺稳定性及重现性良好。

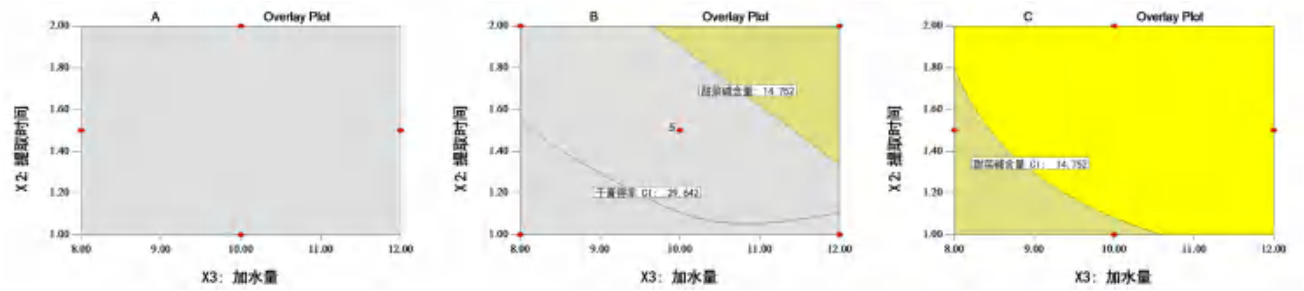


图 4　降脂护肝方提取工艺设计空间

Fig 4　Design space of alcohol extraction process of Jiangzhi Hugan prescription

A. 提取 1 次（extract once）；B. 提取 2 次（extract twice）；C. 提取 3 次（extract three times）

表 6　设计空间验证结果（$n=3$）

Tab 6　Verification of design space（$n=3$）

No.	加水量 / 倍	提取时间 /h	甜菜碱含量 /（mg·g^{-1}）	出膏率 /%
1（空间内）	10	1.5	16.43±0.03	42.16±0.83
2（空间内）	9	1.5	15.13±0.01	39.00±0.96
3（置信区间）	8.5	1.0	13.94±0.02	37.26±1.07
4（置信区间）	9.0	1.0	16.21±0.01	35.79±0.78

3　讨论

黄芪、枸杞子、灵芝、山楂等药材中多含有多糖类、皂苷类、黄酮类、生物碱类、有机酸类等水溶性成分，一般可通过加水煎煮将药效成分提取浓缩，有效减少制剂服用量同时增强其药效[23-24]。黄芪甲苷、甜菜碱分别是为黄芪、枸杞子药材中含量丰富的皂苷类及生物碱类成分，且黄芪、枸杞子、灵芝、山楂等饮片中均含有大量的多糖类成分。现代药理研究证实黄芪甲苷、甜菜碱、多糖等均有调节血脂的作用，其中黄芪甲苷可通过调控 NLRP3 炎性小体相关蛋白的表达改善糖尿病动脉粥样硬化早期大鼠的血脂及炎症状态，对高血脂引起的动脉硬化具有保护作用；甜菜碱对高血脂小鼠体重增加具有明显抑制作用，同时可改善小鼠血脂水平，提高血清、肝脏中自由基清除力等[9, 14, 25-27]。出膏率常作为提取液的评价指标，出膏率是中药材经提取后获得物质量的重要指标，本研究涉及的处方中黄芪、枸杞子、灵芝、山楂等药材含有的大量水溶性成分，均随水提而溶出，具有较高出膏率。据文献报道，黄芪出膏率可达 30.39%，枸杞子标准汤剂出膏率约为 68.7%，因此选择黄芪甲苷、甜菜碱、多糖含量及出膏率作为潜在的 CQAs[28-29]。

国家药品监督管理局药品审评中心发布的《中药复方制剂生产工艺研究指导原则（试行）》，明确中药复方制剂生产工艺研究应遵循“质量源于设计”“整体质量评价”等原则[30]。应用质量源于设计理念可实现设计空间的建立，而单因素试验中合理选择因素与水平是正确建立设计空间的前提。本研究通过文献调研及预试验确定提取次数、提取时间和加水倍量作为降脂护肝方提取工艺的 CPPs，以黄芪甲苷、甜菜碱、多糖的含量及出膏率为评价指标，应用单因素试验并结合正交设计显示提取次数对甜菜碱的含量与出膏率有显著影响，初步筛选出甜菜碱的含量与出膏率是降脂护肝方提取工艺的 CQAs。

响应面法在中药制剂制备工艺研究方面广泛

应用[31]。本研究通过 Box-Behnken 试验，发现提取次数虽对各响应值均有显著的影响，但黄芪甲苷、多糖含量与 CPPs 间无法建立准确的数学模型，综合考虑正交试验与 Box-Behnken 试验结果确定甜菜碱的含量与出膏率为提取工艺的 CQAs，同时通过设定指标成分目标范围，建立设计空间，实现设计空间内提取液质量稳定可靠。在设计空间内，加水量较低时，单次提取时间相对延长，导致浓缩时间滞后，影响生产效率，且指标成分含量相对降低，在保证指标成分含量相对较高的情况下，同时结合实际生产，确定最佳工艺为加水浸泡 30 min，提取 3 次，每次 1.5 h，加水倍量为 10 倍。并进行验证，在设计空间内改变工艺参数时，产品可达到预期目标，说明提取工艺稳定、灵活且制剂质量可靠，为制剂开发及质量控制提供参考。

参考文献

[1] Packard CJ，Boren J，Taskinen MR. Causes and consequences of hypertriglyceridemia [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2020，11（252）：1-15.

[2] 曹梦霞，李凤娟，任璐，等 . 基于血栓弹力图的凝块溶解时间与 ACS 合并高脂血症患者再发心肌梗死的相关性研究 [J]. 临床心血管病杂志，2022，38（5）：378-383.

[3] Xu YH，Niu YF，Gao Y，et al. Borapetoside E，a clerodane diterpenoid extracted from tinospora crispa，improves hyperglycemia and hyperlipidemia in high-fat-diet-induced type 2 diabetes mice [J]. Jnat Prod，2017，80（8）：2319-2327.

[4] 胡静 . 降血脂药物的临床使用情况和合理用药分析 [J]. 中国药物与临床，2020，20（12）：2044-2045.

[5] 唐启盛 . 中医临床诊疗指南释义：气血津液分册 [M]. 北京：中国中医药出版社，2017：54-56.

[6] 陈琼 . 黄芪、当归有效组分及其组合物对 APoE 小鼠动脉粥样硬化的干预作用研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2021.

[7] 崔桂玉，白剑，苗兰英，等 . 枸杞子对非酒精性脂肪肝辅助性 T 细胞 17 和相关细胞因子的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（3）：309-312.

[8] 窦彦丽，陈金鳌 . 灵芝多糖结合有氧运动对高脂血症小鼠的降脂和抗氧化水平的影响 [J]. 食品工业科技，2022，43（9）：372-380.

[9] 高雪婧，罗思奕，汤凯洁，等 . 山楂粗糖蛋白对高脂小鼠降脂及抗氧化作用的初步研究 [J]. 食品与发酵工业，2021，47（1）：138-142.

[10] Debnath S，Raj VP，Prasanth G，et al. Quality by design：a modern approach to pharmaceutical development [J]. IAJPS，2013，3（7）：5248-5255.

[11] 刘玉娟，王永洁，邓莉莉，等 . 基于质量源于设计理念的中药制剂工艺研究进展 [J]. 中国现代中药，2022，24（3）：523-528.

[12] 吴志生，石涵芬，曾敬其，等 . QbD 理念的名医名方创研：脱敏定喘颗粒工艺优化研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（20）：4322-4328.

[13] 宋艳梅，张启立，崔治家，等 . 枸杞子化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 华西药学杂志，2022，37（2）：206-213.

[14] 葛凡，王文恺，朱景天，等 . 黄芪甲苷通过 NLRP3 炎性小体调节糖尿病动脉粥样硬化早期大鼠血脂及炎症因子的研究 [J]. 南京中医药大学学报，2021，37（3）：383-387.

[15] 崔雅楠，穆迎春，韩刚，等 . 水产品中甜菜碱的功能特性、检测方法及其含量研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（16）：6431-6438.

[16] 梁会，蒋玲，张雪，等 . 医院制剂补肺胶囊提取工艺提升研究 [J]. 时珍国医国药，2022，33（8）：1904-1907.

[17] 胡颖，徐鑫，张春阳，等 . 不同品种来源枸杞子多糖及甜菜碱含量测定和比较分析 [J]. 中国现代中药，2022，24（12）：2383-2390.

[18] 唐静，袁秀芝 . BP 神经网络结合遗传算法优化黄芪多糖提取工艺 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（15）：1609-1611，1623.

[19] 王瑞海，叶迎，许京，等 . 甘肃红芪和黄芪总多糖含量测定对比 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（22）：77-83.

[20] 梅佳华，崔利利，郝佳旭，等 . 基于质量源于设计理念的复方蜘蛛香醇提工艺研究 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（8）：774-780.

[21] 随家宁，陈海燕，冯婷，等 . 基于层次分析法多指标优选三方益子方的水提工艺 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2341-2347.

[22] 杨艳玲，李花花，黄嘉怡，等 . 基于质量源于设计（QbD）理念的经典名方桃红四物汤的提取工艺研究 [J]. 中草药，2022，53（2）：403-412.

[23] 戴瑜婷，张雪燕，王艺璇，等 . 黄芪的现代研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志，2022，47（7）：1754-1764.

[24] 罗虹建，林冬梅，王联福，等 . 灵芝活性成分分析与质量评价研究进展 [J]. 药物分析杂志，2023，43（1）：51-60.

[25] 郑俊，段晨晨，邢燕青，等 . 黄芪多糖通过肠道菌群对脾虚水湿不化大鼠胃肠功能的影响 [J]. 时珍国医国药，2022，33（5）：1029-1032.

[26] 金莉莉，于炎巧，朱晓玉，等 . 甜菜碱及叶酸的降血脂和抗氧化作用 [J]. 辽宁大学学报（自然科学版），2019，46（2）：142-150.

[27] 邵伟，郑梦荷，徐丽云，等 . 添喂枸杞多糖改善动物机体微循环机制及应用 [J]. 中国饲料，2021，683（15）：6-11.

[28] 冉鑫，万玲娟，李金田，等 . 黄芪提取及提取液陶瓷膜超滤纯化工艺研究 [J]. 中草药，2022，53（19）：6035-6043.

[29] 黄燕明，陈桂生，李雪银，等 . 枸杞子标准汤剂制备及质量标准研究 [J]. 亚太传统医药，2022，18（5）：69-74.

[30] 陈霞，阳长明，陈浩，等 . 基于中药复方制剂特点的中药复方制剂生产工艺研究 [J]. 中草药，2021，52（19）：5807-5813.

[31] 孙萌，刘雪纯，赵玥瑛，等 . Box-Behnken 设计 - 响应面法优化经典名方散偏汤的提取工艺 [J]. 中南药学，2023，21（2）：357-362.

（收稿日期：2023-09-04；修回日期：2023-10-31）

综述

小胶质细胞调控阿尔茨海默病中微管相关蛋白的研究进展

王亚男，何玲*（中国药科大学药学院，南京　211198）

摘要：小胶质细胞是构成大脑先天免疫系统的重要细胞，可帮助维持中枢神经系统稳态，保护神经元免受致病性损伤。近年来，随着微管相关蛋白（tau）在阿尔茨海默病（AD）发病机制中关联度的加深，小胶质细胞对 tau 蛋白的调控作用也逐渐被揭示。髓细胞触发受体 2（TREM2）已被列为 AD 的风险因素之一，在小胶质细胞功能和 tau 蛋白病理中起重要调节作用。本文总结归纳了小胶质细胞对 AD 病理下 tau 蛋白的调控作用，并探讨了 TREM2 对两者的影响，以期为 AD 的机制研究和治疗提供帮助。

关键词：小胶质细胞；tau 蛋白；阿尔茨海默病；髓细胞触发受体 2

中图分类号：R749.16　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0991-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.026

Advance in regulation of microglial cells on tau proteins in Alzheimer’s disease

WANG Ya-nan, HE Ling* (*School of Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198)

Abstract: Microglia cells are important cells that constitute the innate immune system of the brain, which help maintain the homeostasis of the central nervous system and protect the neurons from pathogenic damage. In recent years, as the close association between microtubule-associated unit (tau) and the pathogenesis of Alzheimer’s disease (AD) has been revealed so has the regulatory role of microglial cells on tau proteins. The triggering receptor on myeloid cells 2 (TREM2) has been identified as a risk factor for AD, playing an important regulatory role in microglial function and tau proteins pathology. This article summarized the regulation of microglia on tau proteins in AD pathology, and explored the impact of TREM2 on both, in the hope of providing insights into the mechanism and treatment of AD.

Key words: microglial cell; tau protein; Alzheimer’s disease; triggering receptor expressed on myeloid cells 2

阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）是一种慢性退行性神经功能病变，俗称“老年痴呆”，是痴呆症的主要成因之一。AD 的症状表现为记忆力下降、认知功能障碍、执行功能受损，甚至发展到后期，患者自理能力逐渐丧失，这对社会整体保障、医疗从业人员和 AD 患者的家庭来说都是一个巨大的挑战[1]。AD 的病理学特征包括脑内淀粉样蛋白（amyloid β-protein，Aβ）沉积和神经纤维缠结（neurofibrillary tangles，NFTs）[2]。近期研究发现，相比 Aβ 沉积，tau 蛋白病变与 AD 病理的发展相关性更强[3]。在 AD 病理下，正常的 tau 蛋白被过度磷酸化并聚集成有毒性的 NFTs，导致大量突触和神经元丧失，这与 AD 的严重程度成正相关[4]。而小胶质细胞及其介导的神经炎症反应被证明可以调节 tau 蛋白的聚集、传播、吞噬、磷酸化等，与 tau 病理有着复杂而紧密的相互作用[5-6]。髓细胞触发受体 2（triggering receptor expressed on myeloid cells 2，

基金项目：中国博士后科学基金第 71 批面上项目（No.2022M713476）。

作者简介：王亚男，女，硕士，主要从事阿尔茨海默病药理研究，email：wangyn1010@126.com　*通信作者：何玲，女，教授，主要从事神经退行性疾病靶点及机制研究，email：heling92@hotmail.com

TREM2）已被证明是 AD 的风险因素之一，高表达于小胶质细胞，并对小胶质细胞的功能进行调控，同时影响着 tau 蛋白的传播与磷酸化等 [7]。因此，本文结合近年来国内外的研究，对小胶质细胞调控 tau 蛋白，以及 TREM2 在小胶质细胞和 tau 蛋白病理中的作用进行了系统的总结与讨论，以期为 AD 机制的研究提供参考。

1 小胶质细胞

小胶质细胞是中枢神经系统的驻留免疫细胞，占中枢神经系统总细胞的 5% ～ 12%[8]，它起源于胚胎卵黄囊中的原始髓系前体 [9]，在中枢神经系统组织维持、病原体防御和损伤反应中起着至关重要的作用 [10]。

静息状态下，小胶质细胞可分泌多种神经营养因子以促进神经元生长和再生，参与神经保护和内稳态的维持 [8]。在受到脑损伤等病理刺激时，小胶质细胞被激活，转化为反应性或活化的小胶质细胞，形态上形成分支，功能上具有增殖、迁移和有效吞噬病原体和细胞碎片的能力 [11-12]。活化的小胶质细胞会分泌出大量自由基、趋化因子、前列腺素和炎症因子等，一方面可以介导损伤组织愈合，而另一方面可能引发细胞死亡和神经功能障碍，该功能有益还是有害往往取决于其损伤和激活的程度 [10]。

在传统分型中，将小胶质细胞分为 M1 促炎型和 M2 抑炎型，是其识别周围环境危险信号后的两种极端状态。M1 型小胶质细胞释放活性氧和促炎细胞因子，如肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-1β、IL-6[9]，而 M2 型则通过脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）及转化生长因子 β（transforming growth factor-beta，TGF-β）等的释放，参与抗炎和营养支持 [8]。近年研究发现，一些激活的小胶质细胞表达了一种独特的基因程序，这些细胞被称为“疾病相关的小胶质细胞（disease-associated microglia，DAM）”。DAM 表达 AD 相关基因，如 *TREM2*，并负责下调“稳态基因”，如 *Mef2a*、*Jun*、*P2ry12*、*Cx3cr1*、*Tmem119* 等。

此外，小胶质细胞的功能也与年龄密切相关。在衰老大脑中，大脑稳态的紊乱可导致胶质细胞活化，反应性小胶质细胞密度增加 [13]，皮层与海马中可观察到更多阿米巴样小胶质细胞。如将脑内衰老的小胶质细胞替换为新生小胶质细胞，替换的小胶质细胞能够重新承担起其在中枢神经系统内的生理功能，这可能成为治疗 AD 等老年病的潜在策略 [14]。

20 世纪 90 年代，小胶质细胞被证明与 Aβ 和 tau 蛋白有相互作用 [15-16]。在 AD 的早期阶段，小胶质细胞吞噬和清除病理性的 Aβ 或 tau 蛋白 [8]，并以蛋白激酶 c 依赖的方式被激活，吞噬异常神经元 [17]。然而，小胶质细胞的持续激活会导致炎症因子持续释放，从而加剧 Aβ 的积累、tau 蛋白传播和神经元的死亡，最终促进 AD 的进展 [13]。

2 tau 蛋白

Tau 蛋白是一种微管相关蛋白，主要在中枢神经系统的神经元内表达，少量在少突胶质细胞中表达 [18-19]。人类 tau 蛋白由 17q21 染色体上的微管相关蛋白 tau（microtubule-associated protein tau，*MAPT*）基因编码 [20]，具有多种生理功能，包括促进微管聚合，稳定微管组装，促进神经细胞生长发育等。

Tau 蛋白受到多种翻译后修饰的影响，包括磷酸化、糖基化、泛素化、乙酰化等 [20]，其中，以磷酸化最为常见。磷酸化后，tau 蛋白与微管结合力降低，从而促进微管聚集，损害神经元完整性 [21]。神经退行性疾病中有关 tau 蛋白病变的所有过程都涉及其磷酸化，多发生于 C 端富含脯氨酸的位点。在 AD 中，tau 的过度磷酸化导致聚集体和 NFTs 的形成，研究表明，Ser 409 位点的磷酸化是微管结合和 tau 聚集的关键 [22]。与 tau 蛋白的过度磷酸化有关的酶主要是糖原合成酶激酶 -3β（glycogen synthase kinase-3beta，GSK-3β）和细胞周期素依赖蛋白激酶 5（cyclin-dependent kinase5，CDK5）[23-24]，其中 GSK-3β 尤为重要，其表达水平和活性变化在 NFTs 形成早期就能被同步检测到。

Tau 蛋白可以在细胞间传播。大量研究支持 tau 蛋白以朊病毒样方式传播 [25-26]，即某些错误折叠的 tau 构象进入受体细胞，触发细胞内原生 tau 的构象转换，称为“播种”，并使这些 tau 种子在细胞间传播。Tau 蛋白进入细胞有多种方式。在正常生理状态下，聚集体和单体 tau 能够经肌动蛋白介导进入其他细胞 [27]，或经由不依赖于外部动力的内吞作用进入细胞。在病理状况下，Aβ 是 tau 蛋白在大脑中跨突触扩散的激发者 [28]，Aβ 沉积周围具有更多的 tau 蛋白缠结，并且 Aβ 与颞下回内的 tau 蛋白相互作用，可加速皮质 tau 蛋白的广泛传播 [29]。神经胶质细胞也参与了 tau 蛋白的播种和扩散 [30]，尤其是小胶质细胞。

3 小胶质细胞对 tau 蛋白的作用

3.1 小胶质细胞吞噬 tau 蛋白

过量的 tau 蛋白能以生理或病理的方式释放到细胞外介质中，并被周围的神经元内化，这一过程有助于其在整个大脑中的扩散。而受损的神经元会通过外泌体、神经递质、膜渗漏等多种机制将有害的 tau 低聚物释放出来，从而被小胶质细胞吞噬清除 [15]。当小胶质细胞被外源给予含 tau 条件培养基时，tau 的“播种”被减少，并且该作用不会被 TNF-α 或脂多糖（LPS）等炎症相关因素影响。该证据支持了小胶质细胞在一定程度上能够吸收和分解具有种子活性的 tau 蛋白 [30]。有研究表明，小胶质细胞可能通过细胞表面受体感知细胞外 tau 蛋白并介导趋化和吞噬作用。如小胶质细胞膜受体 P2Y12R 可与细胞外 tau 寡聚物直接相互作用，促进双向信号传导，产生定向趋化和受体介导的吞噬反应 [31]。而 Bolos 等 [32] 则证明细胞外 tau 蛋白能够与 CX3CR1 的 N 端多肽结合，促进 tau 蛋白在小胶质细胞中的内化。

小胶质细胞不仅可以吞噬细胞外 tau 蛋白，也可吞噬含有聚集性 tau 蛋白的受损突触或神经元。相关研究大多聚焦在炎症信号诱导吞噬活性方面，研究者们认为炎性小胶质细胞主要通过接收含 tau 神经元暴露的“eat me”磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）信号，并释放调理素（如 MFGE8）进行吞噬 [33]。而当小胶质细胞被含有 tau 蛋白聚集物的神经元激活并将该神经元摄取后，小胶质细胞将成为一种 tau 蛋白聚集物的扩散载体，此时它的吞噬能力相应降低 [5]。

3.2 小胶质细胞与 tau 蛋白的扩散

小胶质细胞在促进 tau 蛋白的病理扩散中起直接作用。有研究表明，rTg4510 tau 蛋白病小鼠和 AD 患者脑内的小胶质细胞中均具有稳定的 tau 种子，原代提取的该小胶质细胞可将 tau 种子释放到条件培养基当中，诱导其他细胞中的 tau 聚集 [30]，从而实现 tau 蛋白的病理性扩散。而在 AD 早期，消耗小胶质细胞可大大降低 tau 从内嗅皮质到海马齿状回的传播与扩散，降低齿状回兴奋性 [34]。

小胶质细胞可经多种方式促进 tau 蛋白扩散。研究表明，小胶质细胞在体内和体外均能释放出含 tau 的外泌体 [34-35]，这可能是小胶质细胞直接传播 tau 蛋白的方式。此外，小胶质细胞还分泌可能加剧 tau 蛋白在神经元中传播的因子 [36]，这些因子与神经元表面受体结合后，触发特定的细胞内信号级联反应，加速 tau 的传播与扩散。并且，小胶质细胞的炎症反应对 tau 蛋白传播有促进作用。研究人员向分化的 SH-SY5Y 和 N-tera2/D1 神经元细胞中加入炎症诱导剂 LPS 刺激后的小胶质细胞的条件培养基，可以观察到大量 Aβ 和 tau 的产生和释放，并且这种作用可以被非甾体抗炎药及抗炎细胞因子阻断 [37]。另有研究者认为，小胶质细胞对 tau 种子的传播受到 Aβ 的介导 [29]：一方面，Aβ 与小胶质细胞表面受体结合，刺激促炎细胞因子和其他调节因子释放，从而促进 tau 种子的传播；另一方面，Aβ 还可以直接影响小胶质细胞的代谢和功能，导致小胶质细胞的炎症反应和神经元损伤，进而加速 tau 蛋白的病理扩散。

此外，研究发现，NF-κB 激活是小胶质细胞介导 tau 蛋白扩散所必需的。Wang 等 [6] 发现激活核转录因子 -kappa B（nuclear transcription factor kappa B，NF-κB）信号可以驱动小胶质细胞介导的 tau 蛋白传播。实验表明，敲除小胶质细胞中的 NF-κB 可显著抑制 tau 病理蛋白的传播，过表达 NF-κB 则对 tau 蛋白传播有促进作用；与此结论对应的是，在老年 PS19 小鼠中，抑制小胶质细胞中的 NF-κB 可显著改善 tau 蛋白介导的学习记忆障碍。

3.3 神经炎症与 tau 病理

神经炎症是 AD 病理过程的重要特征之一，炎症反应的增加会导致神经元损伤和凋亡，加速疾病的进展 [38]。小胶质细胞在调节神经炎症反应中起着重要作用。在 AD 患者脑中，小胶质细胞被激活并释放炎性介质，如 TNF-α、IL-1β 和一氧化氮（NO），从而促进神经炎症反应，导致神经元损伤 [9]。此外，激活的小胶质细胞还会参与淀粉样蛋白斑块的清除和形成，进一步加剧神经炎症。

临床证据表明，在 AD 的发病机制中，炎症反应的升高可能比异常 NFTs 更早出现 [39-40]，它与 tau 病理有着复杂而紧密的联系。

神经炎症反应及小胶质细胞的激活可能对 tau 蛋白的磷酸化具有调控作用。有研究人员用 LPS 诱导小鼠神经炎症模型，发现在炎症时，小鼠脑内小胶质细胞激活，伴随着 tau 蛋白过度磷酸化和异常聚集增多 [41]。在神经元 - 小胶质细胞共培养实验中，向培养基中加入炎症因子 IL-1β，可导致神经元内 tau 蛋白的磷酸化显著增加，这种调控可能是通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinase，MAPK）产生的 [42]。而在 AD 模型小鼠中显示小胶质细胞还能够通过影响 GSK-3β 的表达加剧 tau 的磷酸化 [43]。

目前，TNF-α 表达水平的变化是炎症诱导 tau 病理学说最有力的证据，而该炎症因子几乎只在

小胶质细胞中表达。TNF-α 能够诱导活性氧产生，并在体外培养的神经元中引起 tau 蛋白聚集 [44]。此外，NLRP3-ASC 炎性小体也参与了 tau 的病理传播。在小胶质细胞摄取和溶酶体分选 tau 种子后，聚集的 tau 种子激活小胶质细胞中 NLRP3-ASC 炎性小体，而给予 NLRP3 抑制剂可显著降低 tau 种子的病理性聚集，体现了 NLRP3/ASC 轴的激活对 tau 种子传播的促进作用 [45]。

总的来说，小胶质细胞的激活和神经炎症因子的释放可通过直接或间接途径加剧 tau 病理，导致神经元损伤和认知障碍，最终加重 AD[46-47]。

4 tau 对小胶质细胞的作用

小胶质细胞对 tau 的吞噬、扩散、磷酸化等有调节作用，同时，tau 对于小胶质细胞也具有调控功能。

在 AD 患者死后的大脑中，研究人员在携带 tau 内含物的神经元周围发现了活化的小胶质细胞 [48]，在这些小胶质细胞内，同样发现了 tau 蛋白相关物质 [30]。正如 Brelstaff 等 [33] 的报道，含有聚集 tau 的神经元可以感知病理 tau 信号，外化 PS，激活小胶质细胞的吞噬功能。

有研究表明，外源性 tau 3R/4R 蛋白可被聚谷氨酰胺结合蛋白 1（polyglutamine-binding protein 1，PQBP1）感知并产生相互作用，从而激活环 GMP-AMP 合成酶（cyclic GMP-AMP synthase，cGAS）- 干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon genes，STING）途径，触发小胶质细胞免疫反应，间接诱导神经元细胞死亡 [49]。PQBP1 在小胶质细胞中的表达对该过程至关重要，它是介导 NF-κB 核易位、NF-κB 依赖性炎症基因转录的关键蛋白，可诱发小鼠的认知障碍。另有研究表明，致病性 tau 还可以激活小胶质细胞中的 cGAS 和Ⅰ型干扰素（type Ⅰ interferon，IFN-Ⅰ）反应。在 tau 蛋白病小鼠中，基因消融 cGAS 降低了小胶质细胞 IFN-Ⅰ反应，保留了突触完整性，并改善了小鼠的认知功能障碍 [50]。为了研究何种形式的 tau 蛋白在小胶质细胞激活中发挥主要功能，Perea 等 [51] 用过度磷酸化、去磷酸化或非磷酸化形式的 tau 处理原代培养小胶质细胞，发现非磷酸化和去磷酸化形式的 tau 激活了小胶质细胞中的 p38 MAPK 途径，从而引发促炎反应。

此外，tau 低聚物可以经由外泌体的方式传播到邻近的小胶质细胞，从而直接调节小胶质细胞的能量代谢，或通过谷氨酰胺代谢途径和多胺途径间接影响其能量代谢。Tau 低聚物还可以通过影响小胶质细胞代谢重编程，进而改变神经炎症微环境 [52]。

5 TREM2 在小胶质细胞和 tau 蛋白中的作用

TREM2 是一种跨膜受体，于 2000 年被认定为免疫球蛋白超家族的一员，其结构包含一个细胞外免疫球蛋白样结构域、一个跨膜结构域和一个细胞质尾巴。TREM2 主要表达在外周巨噬细胞、树突状细胞、粒细胞等髓系细胞中，而在中枢神经系统中仅高表达于小胶质细胞，参与小胶质细胞的增殖、存活、迁移和吞噬 [53]。研究显示，*TREM2* 基因中的 R47H 突变，会使晚发性 AD 的风险增加 2 ～ 4 倍 [54-55]，该突变也被认为是 AD 的最强免疫特异性遗传风险因素。TREM2 对小胶质细胞和 tau 蛋白均有调控作用。

TREM2 可调节小胶质细胞极化，主要体现在对 M1/M2 表达水平的影响上。过表达 *TREM2* 可降低一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）表达和促炎细胞因子分泌，抑制 M1 型小胶质细胞表达，同时，能增加精氨酸酶 1（Arginase 1，Arg1）和抗炎因子水平，促进小胶质细胞向 M2 型极化 [56]，从而改善神经炎症。这体现了 TREM2 在神经保护方面的积极作用。但 M1/M2 分型方式对于小胶质细胞的复杂形态变化来说略显笼统，TREM2 在此方面的作用及机制仍需进一步研究。

其次，TREM2 可抑制小胶质细胞过度的神经炎症。在体内实验中，敲除 *TREM2* 显著增加了 P301S[56] 和 5×FAD[57] 小鼠脑内促炎因子的表达水平，加剧了神经炎症反应，加重了小鼠认知障碍。体外研究显示，在原代培养的小鼠小胶质细胞中敲除 *TREM2*，可导致促炎因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的显著上调，而 *TREM2* 过表达则可显著改善 LPS 诱导的神经炎症 [58]。TREM2 调控神经炎症的机制被认为是经由了 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路 [59]。具体来说，TREM2 与 DAP12 蛋白结合，形成 TREM2-DAP12 复合物，激活下游的信号传导分子 PI3K；激活的 PI3K 将细胞膜上的磷脂酰肌醇二磷酸（PIP2）转化为磷脂酰肌醇三磷酸（PIP3）；PIP3 招募并激活 AKT，进而抑制 GSK-3β 的活性。这种抑制作用通过 AKT 激酶对 GSK-3β 的磷酸化（即 p-GSK-3β）来实现 [60]（见图 1）。一方面，GSK-3β 磷酸化后活性降低，对 NF-κB 等下游蛋白的磷酸化和激活作用减弱 [61]，导致炎症因子释放减少，神经炎症减轻；另一方面，磷酸化的 GSK-3β 对下游靶标的磷酸化作用减弱，最终

使 tau 蛋白磷酸化减少，改善 AD 病理症状 [62-63]。也有少量研究显示，TREM2 的表达影响 BDNF/TrkB 信号通路，并调控 TLR4 蛋白水平，这些指标均与神经炎症相关联，但其具体机制仍需进一步探究 [59]。

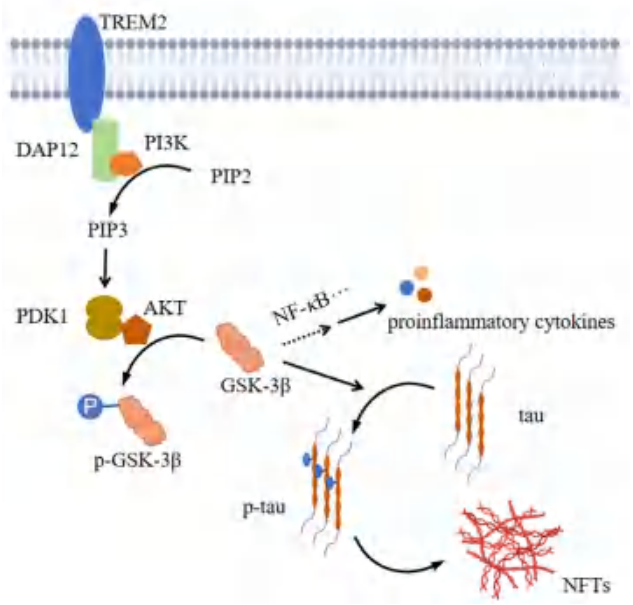


图 1　TREM2 调节 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路示意图

Fig 1　Schematic diagram of TREM2 regulating the PI3K/AKT/GSK-3β signaling pathway

此外，TREM2 还与小胶质细胞脂质代谢密切相关。TREM2 是胆固醇转运代谢的关键调节因子，若其功能丧失，则小胶质细胞上的胆固醇无法去除，胆固醇酯大量积累 [64]，最终导致脂质、胆固醇代谢受损引发神经系统疾病，如 AD。

TREM2 可以调节小胶质细胞对 Aβ 和 NFTs 的吞噬作用。目前，TREM2 已被确定是一种淀粉样蛋白受体，它对低聚物形式的 Aβ 的亲和力高于单体形式 [65]。斑块相关的小胶质细胞已被证明含有斑块来源的物质，这表明它们具有吞噬斑块成分的能力 [66]。而这种斑块吞噬能力因 *TREM2* 缺陷而受损，表明小胶质细胞对 Aβ 的吞噬受到 TREM2 调节 [65]。且 TREM2 缺乏会导致斑块修剪受损，斑块增大，紧实度降低，如在 5xFAD 小鼠脑中敲除 *TREM2* 会导致 Aβ 斑块疏松，并向周围弥漫性扩展，提示 TREM2 在 Aβ 的吞噬、压缩和致密化中起重要作用 [67]。

TREM2 对 tau 病理影响的研究尚处于早期阶段，但具有重要价值。Lee-Gosselin 等 [68] 将人 AD-tau 注射到 WT 和 Trem2$^{-/-}$ 小鼠大脑中，通过组织学分析，发现注射 AD-Tau 的 WT 小鼠中 Iba1 阳性小胶质细胞数量增加，而 Trem2$^{-/-}$ 小鼠中对应区域未观察到这种增加，且 tau 扩散显著减少。该研究证明 *TREM2* 缺乏会削弱小胶质细胞的激活，减少其对 tau 的扩散作用 [68]。*TREM2* 对 tau 蛋白的磷酸化也有调控作用。在 P301S 小鼠中，敲除 *TREM2* 可导致小鼠脑内促炎细胞因子表达增多，加剧 tau 蛋白的过度磷酸化，诱发小鼠的行为缺陷和神经退行性病变 [69]。过表达 *TREM2* 则会引发相反的结果，同时使得小胶质细胞稳态基因表达升高 [56]。体外实验同样支持该结论：*TREM2* 可以抑制小胶质细胞激活和促炎信号传导对 tau 蛋白磷酸化的影响 [70]。有研究发现，*TREM2* 对小胶质细胞功能和 tau 传播的调节与疾病进程相关 [62]，具体机制仍需进一步研究。

6　总结与展望

小胶质细胞是中枢神经系统的固有免疫细胞，是大脑的第一道防线，在生理状态和病理状态下都发挥着十分重要的作用 [8]。过去几年间，研究者们致力于研究小胶质细胞与 Aβ 间的关联，期望通过前者降低 Aβ 的聚积达到治疗痴呆症的功效。但鉴于相关临床试验的结果一直不尽如人意，目前的努力重点已转向小胶质细胞及炎症反应与 tau 蛋白的相互作用。

小胶质细胞对 tau 的调控表现在多个方面，包括吞噬异常聚集的 tau 蛋白 [15]，促进 tau 蛋白扩散和传播 [6]，以及通过神经炎症反应影响 tau 蛋白磷酸化 [71]。这些方面影响着 tau 蛋白自身的折叠以及它在脑中的传播或聚集，在 AD 病理中尤为重要。目前已了解到，在 tau 蛋白病小鼠中改善小胶质细胞功能可以在一定程度上抑制病理性 tau 蛋白及 NFTs，改善小鼠认知记忆。相关治疗方向主要分为两大类：小胶质细胞再生和小胶质细胞功能改善。小胶质细胞再生可以逆转突触改变，减轻老年小鼠的认知障碍 [72]，目前主要途径为神经干细胞（neural stem cells，NSCs）治疗。NSCs 具有自我更新和多向分化潜能，将其移植到 AD 动物模型中，可以促进小胶质细胞的再生和功能恢复。研究发现，将人类胎儿脑组织来源的干细胞（HuCNS-SC 细胞）移植到 AD 小鼠大脑中，可以促进小胶质细胞的再生和 tau 蛋白的清除，从而改善记忆和认知功能 [73]。其机制主要涉及 NSCs 的分化和迁移，以及神经营养因子的释放作用。除此以外，也可通过转导因子诱导脑内其他细胞转化为小胶质细胞，以促进小胶质细胞的再生 [74]。而小胶质细胞功能改善的方法包括：①寻找小胶质细胞特定分子靶点及对应药物以抑制小胶质细胞的过度激活，如 CX3CR1 拮抗剂（如

AZD8797）[75]、PPARγ激动剂（如 pioglitazone）等[76]，减轻过度的神经炎症，从而缓解 tau 蛋白异常聚集；② 开发药物以干预小胶质细胞对 tau 蛋白磷酸化的识别和响应，从而促进磷酸化 tau 的吞噬和清除；③ 通过 TREM2 等免疫调节因子改善小胶质细胞功能，减少病理性 tau 蛋白的扩散[7]。这些途径均可作为调控小胶质细胞以改善 AD 的潜在策略。

另有一些研究显示，小胶质细胞在发育、成年和老年大脑中的功能均具有性别差异性。发育阶段，小胶质细胞可促进雄性小鼠大脑“雄性化”，如加以干扰，可能影响成年期的性行为[77]，而在雌性小鼠中并无对应变化[78]。在成年期，与雌性相比，雄性小鼠大脑中的小胶质细胞对炎症刺激的反应性更强[79]。而在 AD 等老年病情况下，雌性小鼠的小胶质细胞激活比例比雄性小鼠更多，更早地出现功能失调[80]。在雌性小鼠中，衰老的小胶质细胞比例更高，这与 tau 蛋白病或 AD 的发展相关性更强[81]。并且 AD 发病及 tau 蛋白病理本身也同样具有性别差异性[82]，与小胶质细胞性别差异的具体关联还未研究透彻，但性别差异的议题仍然是值得讨论的。

总的来说，研究小胶质细胞对 AD 情况下 tau 病理的治疗具有深远的意义，小胶质细胞的具体调控功能在不同疾病、不同病程阶段、不同患者个体差异等环境下有着复杂的变化，其影响可能是有益的，也可能是有害的，需要结合具体病理情况进行综合考量。

参考文献

[1] Jia LF，Quan MN，Fu Y，et al. Dementia in China：epidemiology，clinical management，and research advances [J]. Lancet Neurol，2020，19（1）：81-92.

[2] Kinney JW，Bemiller SM，Murtishaw AS，et al. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer’s disease [J]. Alzheimers Dement（N Y），2018，4：575-590.

[3] Huber CM，Yee C，May T，et al. Cognitive decline in preclinical Alzheimer’s disease：amyloid-beta versus tauopathy [J]. J Alzheimers Dis，2018，61（1）：265-281.

[4] Gao Y，Tan L，Yu JT，et al. Tau in Alzheimer’s disease：mechanisms and therapeutic strategies [J]. Curr Alzheimer Res，2018，15（3）：283-300.

[5] Brelstaff JH，Mason M，Katsinelos T，et al. Microglia become hypofunctional and release metalloproteases and tau seeds when phagocytosing live neurons with P301S tau aggregates [J]. Sci Adv，2021，7（43）：eabg4980.

[6] Wang C，Fan L，Khawaja RR，et al. Microglial NF-kappaB drives tau spreading and toxicity in a mouse model of tauopathy [J]. Nat Commun，2022，13（1）：1969.

[7] Zhu B，Liu Y，Hwang S，et al. Trem2 deletion enhances tau dispersion and pathology through microglia exosomes [J]. Mol Neurodegener，2022，17（1）：58.

[8] Hickman S，Izzy S，Sen P，et al. Microglia in neurodegeneration [J]. Nat Neurosci，2018，21（10）：1359-1369.

[9] Perdiguero EG，Klapproth K，Schulz C，et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors [J]. Nature，2015，518（7540）：547-551.

[10] Nayak D，Roth TL，Mcgavern DB. Microglia development and function [J]. Annu Rev Immunol，2014，32：367-402.

[11] Diaz-Aparicio I，Beccari S，Abiega O，et al. Clearing the corpses：regulatory mechanisms，novel tools，and therapeutic potential of harnessing microglial phagocytosis in the diseased brain [J]. Neural Regen Res，2016，11（10）：1533-1539.

[12] Sierra A，Tremblay ME，Wake H. Never-resting microglia：physiological roles in the healthy brain and pathological implications [J]. Front Cell Neurosci，2014，8：240.

[13] Kettenmann H，Hanisch UK，Noda M，et al. Physiology of microglia [J]. Physiol Rev，2011，91（2）：461-553.

[14] Han JM，Zhu KY，Zhang XM，et al. Enforced microglial depletion and repopulation as a promising strategy for the treatment of neurological disorders [J]. Glia，2019，67（2）：217-231.

[15] Cras P，Kawai M，Siedlak S，et al. Microglia are associated with the extracellular neurofibrillary tangles of Alzheimer disease [J]. Brain Res，1991，558（2）：312-314.

[16] Khoury JE，Hickman SE，Thomas CA，et al. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils [J]. Nature，1996，382（6593）：716-719.

[17] Pampuscenko K，Morkuniene R，Sneideris T，et al. Extracellular tau induces microglial phagocytosis of living neurons in cell cultures [J]. J Neurochem，2020，154（3）：316-329.

[18] Lopresti P，Szuchet S，Papasozomenos SC，et al. Functional implications for the microtubule-associated protein tau：localization in oligodendrocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1995，92（22）：10369-10373.

[19] Zhang Y，Sloan SA，Clarke LE，et al. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse [J]. Neuron，2016，89（1）：37-53.

[20] Tapia-Rojas C，Cabezas-Opazo F，Deaton CA，et al. It’s all about tau [J]. Pro Neurobiol，2019，175：54-76.

[21] Grundke-Iqbal I，Iqbal K，Tung YC，et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau（tau）in Alzheimer cytoskeletal pathology [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1986，83（13）：4913-4917.

[22] De Vos A，Anandhakumar J，Van Den Brande J，et al. Yeast as a model system to study tau biology [J]. Int J Alzheimers Dis，2011，2011：428970.

[23] Chauhan N，Paliwal S，Jain S，et al. GSK-3beta and its inhibitors in Alzheimer’s disease：a recent update [J]. Mini Rev Med Chem，2022，22（22）：2881-2895.

[24] Requejo-Aguilar R. Cdk5 and aberrant cell cycle activation at

the core of neurodegeneration [J]. Neural Regen Res，2023，18（6）：1186-1190.
[25] Kaufman SK，Sanders DW，Thomas TL，et al. Tau prion strains dictate patterns of cell pathology，progression rate，and regional vulnerability in vivo [J]. Neuron，2016，92（4）：796-812.
[26] Clavaguera F，Akatsu H，Fraser G，et al. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2013，110（23）：9535-9540.
[27] Evans LD，Wassmer T，Fraser G，et al. Extracellular monomeric and aggregated tau efficiently enter human neurons through overlapping but distinct pathways [J]. Cell Rep，2018，22（13）：3612-3624.
[28] He Z，Guo JL，Mcbride JD，et al. Amyloid-beta plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation [J]. Nat Med，2018，24（1）：29-38.
[29] Lee WJ，Brown JA，Kim HR，et al. Regional Aβ-tau interactions promote onset and acceleration of Alzheimer's disease tau spreading [J]. Neuron，2022，110（12）：1932-1943.
[30] Hopp SC，Lin Y，Oakley D，et al. The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease [J]. J Neuroinflammation，2018，15（1）：269.
[31] Das R，Chinnathambi S. Microglial remodeling of actin network by Tau oligomers，via G protein-coupled purinergic receptor，P2Y12R-driven chemotaxis [J]. Traffic，2021，22（5）：153-170.
[32] Bolos M，Llorens-Martin M，Perea JR，et al. Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia [J]. Mol Neurodegener，2017，12（1）：59.
[33] Brelstaff J，Tolkovsky AM，Ghetti B，et al. Living neurons with tau filaments aberrantly expose phosphatidylserine and are phagocytosed by microglia [J]. Cell Rep，2018，24（8）：1939-1948.
[34] Asai H，Ikezu S，Tsunoda S，et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation [J]. Nat Neurosci，2015，18（11）：1584-1593.
[35] Jain N，Ulrich JD. TREM2 and microglia exosomes：a potential highway for pathological tau [J]. Mol Neurodegener，2022，17（1）：73.
[36] Maphis N，Xu GX，Kokiko-Cochran ON，et al. Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain [J]. Brain，2015，138（Pt 6）：1738-1755.
[37] Lee M，Mcgeer E，Mcgeer PL. Activated human microglia stimulate neuroblastoma cells to upregulate production of beta amyloid protein and tau：implications for Alzheimer's disease pathogenesis [J]. Neurobiol Aging，2015，36（1）：42-52.
[38] Lessmann V，Kartalou GI，Endres T，et al. Repurposing drugs against Alzheimer's disease：can the anti-multiple sclerosis drug fingolimod（FTY720）effectively tackle inflammation processes in AD? [J]. J Neural Transm（Vienna），2023，130（8）：1003-1012.
[39] Engelhart MJ，Geerlings MI，Meijer J，et al. Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia：the rotterdam study [J]. Arch Neurol，2004，61（5）：668-672.
[40] Henry CJ，Huang Y，Wynne AM，et al. Peripheral lipopolysaccharide（LPS）challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines [J]. Brain Behav Immun，2009，23（3）：309-317.
[41] Liu J，Wang D，Li SQ，et al. Suppression of LPS-induced tau hyperphosphorylation by serum amyloid A [J]. J Neuroinflammation，2016，13：28.
[42] Li Y，Liu L，Barger SW，et al. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway [J]. J Neurosci，2003，23（5）：1605-1611.
[43] Sen T，Saha P，Jiang T，et al. Sulfhydration of AKT triggers Tau-phosphorylation by activating glycogen synthase kinase 3β in Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2020，117（8）：4418-4427.
[44] Gomez-Arboledas A，Davila JC，Sanchez-Mejias E，et al. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease [J]. Glia，2018，66（3）：637-653.
[45] Stancu IC，Cremers N，Vanrusselt H，et al. Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo [J]. Acta Neuropathol，2019，137（4）：599-617.
[46] Kitazawa M，Cheng D，Tsukamoto MR，et al. Blocking IL-1 signaling rescues cognition，attenuates tau pathology，and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model [J]. J Immunol，2011，187（12）：6539-6549.
[47] Leyns CEG，Holtzman DM. Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies [J]. Mol Neurodegener，2017，12（1）：50.
[48] Perea JR，Llorens-Martin M，Avila J，et al. The role of microglia in the spread of tau：relevance for tauopathies [J]. Front Cell Neurosci，2018，12：172.
[49] Jin M，Shiwaku H，Tanaka H，et al. Tau activates microglia via the PQBP1-cGAS-STING pathway to promote brain inflammation [J]. Nat Commun，2021，12（1）：6565.
[50] Udeochu JC，Amin S，Huang Y，et al. Tau activation of microglial cGAS-IFN reduces MEF2C-mediated cognitive resilience [J]. Nat Neurosci，2023，26（5）：737-750.
[51] Perea JR，Avila J，Bolos M. Dephosphorylated rather than hyperphosphorylated Tau triggers a pro-inflammatory profile in microglia through the p38 MAPK pathway [J]. Exp Neurol，2018，310：14-21.
[52] Zhao YX，Liu BH，Wang J，et al. Abeta and Tau regulate microglia metabolism via exosomes in Alzheimer's disease [J]. Biomedicines，2022，10（8）：1800.
[53] Schmid CD，Sautkulis LN，Danielson PE，et al. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia [J]. J Neurochem，2002，83（6）：1309-1320.

[54] Lu YJ，Liu W，Wang X. TREM2 variants and risk of Alzheimer’s disease：a meta-analysis [J]. Neurol Sci，2015，36（10）：1881-1888.
[55] Kim B，Suh E，Nguyen AT，et al. TREM2 risk variants are associated with atypical Alzheimer’s disease [J]. Acta Neuropathol，2022，144（6）：1085-1102.
[56] Jiang T，Zhang YD，Chen Q，et al. TREM2 modifies microglial phenotype and provides neuroprotection in P301S tau transgenic mice [J]. Neuropharmacology，2016，105：196-206.
[57] Wang YP，Lin Y，Wang LH，et al. TREM2 ameliorates neuroinflammatory response and cognitive impairment via PI3K/AKT/FoxO3a signaling pathway in Alzheimer’s disease mice [J]. Aging（Albany NY），2020，12（20）：20862-20879.
[58] He GL，Luo Z，Shen TT，et al. TREM2 regulates heat acclimation-induced microglial M2 polarization involving the PI3K-Akt pathway following EMF exposure [J]. Front Cell Neurosci，2019，13：591.
[59] Xu MJ，Yang YF，Peng J，et al. Effects of Alpinae Oxyphyllae Fructus on microglial polarization in a LPS-induced BV2 cells model of neuroinflammation via TREM2 [J]. J Ethnopharmacol，2023，302（Pt A）：115914.
[60] Zhong L，Chen XF，Wang TT，et al. Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival [J]. J Exp Med，2017，214（3）：597-607.
[61] Mao HJ，Zhao Y，Lei L，et al. Selenoprotein S regulates tumorigenesis of clear cell renal cell carcinoma through AKT/GSK3beta/NF-kappaB signaling pathway [J]. Gene，2022，832：146559.
[62] Jay TR，Hirsch AM，Broihier ML，et al. Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer’s disease [J]. J Neurosci，2017，37（3）：637-647.
[63] Jiang T，Tan L，Zhu XC，et al. Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease [J]. Neuropsychopharmacology，2014，39（13）：2949-2962.
[64] Nugent AA，Lin K，Lengerich BV，et al. TREM2 regulates microglial cholesterol metabolism upon chronic phagocytic challenge [J]. Neuron，2020，105（5）：837-854.
[65] Zhao YJ，Wu XL，Li XG，et al. TREM2 is a receptor for beta-amyloid that mediates microglial function [J]. Neuron，2018，97（5）：1023-1031.
[66] Keren-Shaul H，Spinrad A，Weiner A，et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer’s disease [J]. Cell，2017，169（7）：1276-1290.
[67] Ulland TK，Colonna M. TREM2-a key player in microglial biology and Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurol，2018，14（11）：667-675.
[68] Lee-Gosselin A，Jury-Garfe N，You Y，et al. TREM2-deficient microglia attenuate tau spreading in vivo [J]. Cells，2023，12（12）：1597.
[69] Jiang T，Tan L，Zhu XC，et al. Silencing of TREM2 exacerbates tau pathology，neurodegenerative changes，and spatial learning deficits in P301S tau transgenic mice [J]. Neurobiol Aging，2015，36（12）：3176-3186.
[70] Jiang T，Zhang YD，Gao Q，et al. TREM2 ameliorates neuronal tau pathology through suppression of microglial inflammatory response [J]. Inflammation，2018，41（3）：811-823.
[71] Carmona-Abellan M，Martinez-Valbuena I，Marcilla I，et al. Microglia is associated with p-Tau aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative diseases [J]. Neurol Sci，2021，42（4）：1473-1482.
[72] Elmore MRP，Hohsfield LA，Kramar EA，et al. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive，synaptic，and neuronal deficits in mice [J]. Aging Cell，2018，17（6）：e12832.
[73] Ager RR，Davis JL，Agazaryan A，et al. Human neural stem cells improve cognition and promote synaptic growth in two complementary transgenic models of Alzheimer’s disease and neuronal loss [J]. Hippocampus，2015，25（7）：813-826.
[74] Magnusson JP，Goritz C，Tatarishvili J，et al. A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse [J]. Science，2014，346（6206）：237-241.
[75] Cardona AE，Pioro EP，Sasse ME，et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor [J]. Nat Neurosci，2006，9（7）：917-924.
[76] Heneka MT，Klockgether T，Feinstein DL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo [J]. J Neurosci，2000，20（18）：6862-6867.
[77] Lenz KM，Nugent BM，Haliyur R，et al. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior [J]. J Neurosci，2013，33（7）：2761-2772.
[78] Hanamsagar R，Alter MD，Block CS，et al. Generation of a microglial developmental index in mice and in humans reveals a sex difference in maturation and immune reactivity [J]. Glia，2017，65（9）：1504-1520.
[79] Villa A，Gelosa P，Castiglioni L，et al. Sex-specific features of microglia from adult mice [J]. Cell Rep，2018，23（12）：3501-3511.
[80] Mangold CA，Masser DR，Stanford DR，et al. CNS-wide sexually dimorphic induction of the major histocompatibility complex 1 pathway with aging [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci，2017，72（1）：16-29.
[81] Mangold CA，Wronowski B，Du M，et al. Sexually divergent induction of microglial-associated neuroinflammation with hippocampal aging [J]. J Neuroinflammation，2017，14（1）：141.
[82] Mielke MM. Sex and gender differences in Alzheimer’s disease dementia [J]. Psychiatr Times，2018，35（11）：14-17.

（收稿日期：2023-09-19；修回日期：2023-11-12）

铁死亡在胰腺疾病中的研究进展

孙银[1]，李鹏洲[2]，李荣[2*]（1.南华大学药物药理研究所，湖南　衡阳　421001；2. 南华大学附属第二医院药学部，湖南　衡阳　421001）

摘要：铁死亡是一种新型的细胞死亡调控模式，近年来受到国内外学者的高度重视。研究发现，铁死亡不仅能够加剧胰腺炎的进展，而且能够增强胰腺癌对化疗药物的敏感性，尤其是对吉西他滨。本文主要总结了国内外铁死亡在胰腺疾病中的研究进展和相关作用机制，以期为胰腺疾病的防治提供发展方向，并对关键性问题提供建议，以促进铁死亡在防治胰腺疾病中的应用。

关键词：铁死亡；胰腺炎；胰腺癌；糖尿病

中图分类号：R735.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-0999-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.027

Advances in the study of ferroptosis in pancreatic diseases

SUN Yin[1], LI Peng-zhou[2], LI Rong[2*] (1. *Institute of Pharmaceutical Pharmacology*, *University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001; 2. *Department of Pharmacy*, *The Second Affiliated Hospital of South University of China*, *Hengyang Hunan* 421001)

Abstract: Ferroptosis, a novel mode of cell death regulation, has gathered much attention from domestic and international scholars in recent years. This mechanism of cell death exacerbates the progression of pancreatitis and enhances the sensitivity of pancreatic cancer to chemotherapeutic drugs, especially gemcitabine. This article aims to summarize the research progress and related mechanisms of ferroptosis in pancreatic diseases both domestically and internationally, and provide a direction for the prevention and treatment of pancreatic diseases. Moreover, it also provides suggestions to critical issues, optimizing the application of ferroptosis in the prevention and treatment of pancreatic diseases.

Key words: ferroptosis; pancreatitis; pancreatic cancer; diabetes

胰腺在人体消化系统中发挥重要作用，帮助消化，调节血糖[1]。胰腺炎和胰腺癌的高发病率和死亡率给全球医疗保健系统带来了巨大压力。急性胰腺炎（AP）的主要特征是胰腺的急性炎症，如果不及时有效地治疗，可能会导致严重的并发症，甚至危及生命。胰腺癌通常在晚期才能被诊断出来，其预后较差，治疗方案也有限，生存率较低。近年来，人们越来越重视揭示驱动这些胰腺疾病的复杂分子和细胞机制，识别与胰腺炎和胰腺癌相关的关键基因改变、信号通路、免疫反应和环境因素，为其治疗干预提供了新途径。通过深入了解这些潜在机制，可以更好地了解疾病进展、早期检测、风险评估和靶向治疗的发展。然而，随着生活水平的提高，胰腺炎、胰腺癌和糖尿病等胰腺疾病的发病率也在不断上升。胰腺疾病种类繁多，其诊断和治疗具有挑战性，寻找有效的胰腺疾病治疗方法变得越来越迫切。

细胞死亡调节是一种有前途的治疗方法，通过药物或基因手段选择性地杀死肿瘤细胞，同时确保健康细胞的存活[2]。铁死亡是一种新型的细胞死亡调控模式，国内外学者广泛关注其机制和作用，其中铁离子积累和脂质过氧化物水平升高是导致细胞氧化死亡的原因[3]。铁死亡的发生涉及细胞脂质代谢失调，尤其是脂质过氧化物的积累，谷胱甘肽（GSH）等重要抗氧化分子的缺乏，以及抗氧化系统如谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）活性的降低[4]。GPX4 在解毒脂质过氧

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2022JJ50159；No.2021SK51709）。

作者简介：孙银，男，硕士，主要从事胰腺炎重症化机制研究，email：sunyin0119@163.com　*通信作者：李荣，女，主任药师，硕士研究生导师，主要从事抗肿瘤药物心脏毒性防治临床与基础研究，email：1991020015@usc.edu.cn

化物和防止细胞损伤方面扮演着关键角色。此外，铁代谢异常促进活性氧（ROS）的产生，导致细胞发生铁死亡[5]。研究发现铁死亡不仅能够破坏肿瘤微环境[6]，而且加剧因重症急性胰腺炎（SAP）引起的全身性器官损伤[7]。此外，高铁血症与糖尿病及其并发症密切相关[8]。近年来，对铁死亡机制及其在各种疾病中的影响有了重大进展，但仍缺乏系统性综述，深入讨论其在胰腺疾病中的作用和机制仍然是必要的。本文旨在深入探讨铁死亡的主要机制及其对胰腺疾病的影响，以期为胰腺疾病的预防和治疗提供指导。

1　铁死亡的分子机制

Dixon 等[3]于 2012 年首次提出铁死亡是由于铁积累无法控制，进而导致有毒脂质过氧化物水平升高，最终导致细胞氧化死亡。铁死亡是一种独特的、调节性的细胞死亡形式，其不仅在细胞形态上与其他传统的细胞死亡形式不同，而且也不具有细胞膜破裂、凋亡囊泡及自噬囊泡形成等典型死亡细胞特征。相反，铁死亡的特征有线粒体收缩、膜密度增加以及线粒体嵴的减少或消失[4]。相关研究表明，铁死亡主要是通过影响细胞内铁稳态和脂质过氧化代谢过程而发生[3]。然而，铁死亡的确切调控机制仍有待深入探索。本文将概述已发现的铁死亡相关机制（见图 1）。

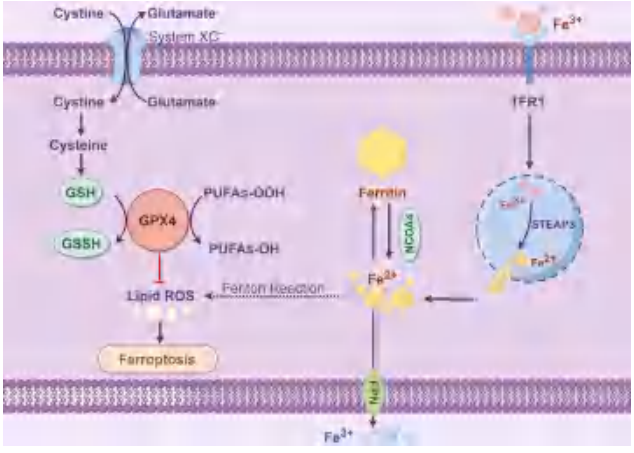


图 1　铁死亡的主要机制

Fig 1　Main mechanisms of ferroptosis

1.1　铁代谢失调介导铁死亡

铁代谢在维持细胞内铁浓度以及生物体生命活动的正常运行方面具有重要作用[4]。然而，铁代谢失调会导致过量的游离铁与氧气产生反应，增加细胞内脂质过氧化，最终导致细胞死亡。从肠道中吸收的 Fe^{2+} 被氰化铜氧化为 Fe^{3+}，与细胞膜上的转铁蛋白（TF）结合成 TF-Fe^{3+} 复合物。接着，这个复合物与细胞膜上的转铁蛋白受体 1（TFR1）结合，通过内吞作用被细胞内化。最后，Fe^{3+} 在前列腺跨膜 2 抗原受体（STEAP3）的作用下被还原为 Fe^{2+}，从而维持机体代谢稳态，多余的 Fe^{2+} 则又通过细胞膜上的铁蛋白（FPN）转换成 Fe^{3+} 并排出细胞。这一铁代谢过程严格调节生物体内的细胞铁浓度[5]。研究发现，氨基酸缺乏会在依赖血清的条件下加速体内细胞铁的氧化过程[9]。敲除或者抑制热休克蛋白 β-1（HSPB1）能够增强 erastin 诱导的铁死亡，而这与细胞内游离铁以及 TFR1 表达的增加密切相关[10]。这表明 TF 是铁死亡过程中的一个重要因素。此外，铁死亡会导致细胞内 ROS 的增加，引发 FPN 的降解以及 TF 的过度表达，最后导致细胞内游离铁水平失控[11]。这形成了一个恶性循环，进一步加速了细胞铁死亡的发生。骨髓间充质干细胞可以通过其衍生的外泌体来抑制 STEAP3 的表达，进而降低细胞内游离铁的水平，从而减轻铁死亡对肝细胞的损伤[12]。所以，当细胞内铁代谢失调，以及细胞膜上的 TF 载体超负荷时，会有大量的游离铁被转运到细胞内，引起铁死亡。

1.2　抑制 XC^- 系统介导 GSH 耗竭导致铁死亡

XC^- 系统由 SLC7A11 和 SLC3A2 两个亚基组成，并在机体抗氧化系统中发挥重要作用。研究发现，在 XC^- 系统的参与下，胱氨酸（cystine）和谷氨酸（glutamate）以 1∶1 的比例进出细胞交换，从而使胱氨酸在细胞内被还原为半胱氨酸（cysteine），并参与 GSH 的合成[13]。其次，XC^- 系统两个亚基的表达活性在多种病理模型中与铁死亡水平密切相关。选择性上调 SLC7A11，提高 GSH 水平，可以有效抑制心肌细胞的铁死亡，进而降低心肌病的发生风险[14]；RBMS1，一种 RNA 结合蛋白，通过抑制 SLC7A11 的翻译，从而调节铁死亡进程，参与肺癌发病过程[15]。在前列腺癌模型中，研究发现使用 RSL3 治疗可以降低 SLC3A2 的表达，导致肿瘤细胞铁死亡，还能显著降低肿瘤细胞的生长和迁移情况[16]。总的来说，抑制 XC^- 系统将导致细胞内半胱氨酸水平降低，从而导致 GSH 合成不足和 GPX 活性降低，增加氧化应激和脂质过氧化，最后导致细胞铁死亡。但是，一些研究表明，使用如 erastin 和 sorafenib 等铁氧化诱导剂针对 XC^- 系统并不会导致细胞铁死亡，这可能是由于 GSH 的替代合成路径可以帮助细胞避免铁死亡。敲除半胱氨酸 -tRNA 合成酶（CARS），可诱导转硫途径，增加半胱氨酸的合成，并抑制 erastin 诱导的细胞铁死亡[17]。

1.3　GPX4 失活引发铁死亡

GPX4 作为 GPX 家族的一个关键成员，对细胞的抗氧化防御起着重要作用，它可以将脂质

过氧化过程中的关键物质不饱和脂肪酸（PUFAs-OOH）转化为脂醇（PUFAs-OH），并将还原型GSH转换成氧化型谷胱甘肽（GSSH），以此来防止ROS的产生[18]。当GPX4失活或被抑制，可导致细胞的抗氧化能力降低，脂质过氧化和ROS增加，最后引发细胞铁死亡。RSL3是铁死亡的诱导剂，能够直接导致GPX4失活并增加脂质的过氧化，最后引发铁死亡[19]。肾脏的成纤维细胞中缺乏GPX4，可能会导致细胞铁死亡[20]。另外，SLC7A11介导的胱氨酸摄取能激活mTORC1靶点，并促进GPX4的合成，延长细胞的存活周期[21]。α-生育酚有能力抑制细胞凋亡诱导因子，从而逆转由GPX4失活所诱导的脂质过氧化过程，进而避免细胞铁死亡的发生[22]。这些研究结果进一步证实了GPX4阻断或失活是导致细胞铁死亡的重要原因。

总的来说，目前已发现的铁死亡的主要机制是铁代谢紊乱、XC^-系统抑制和GPX4失活，但也存在通过其他途径调节铁死亡的报道。如甲硫氨酸可以通过三磷酸腺苷（ATP）依赖性方式合成半胱氨酸，进而防止由GSH缺乏引发的铁死亡[23]。因此，铁死亡的调控机制仍需要进一步的研究。近年来，越来越多的研究表明，在胰腺疾病中，铁的代谢常出现异常。例如，在慢性胰腺炎患者中，血清铁水平升高；而在胰腺癌患者中，血清铁水平则降低[24-25]。异常的铁代谢与胰腺疾病的发生发展存在密切关联，铁死亡在胰腺炎和胰腺癌的发生发展中发挥着重要作用。对铁死亡的深入研究有助于我们进一步了解胰腺疾病的发病机制，并为胰腺疾病的治疗提供新的思路和靶点。

2 铁死亡加剧胰腺炎

在临床上，胰腺炎根据表型被分为急性胰腺炎（AP）和慢性胰腺炎（CP）两种[26]。AP是胃肠道疾病的常见住院治疗原因，其发病率和死亡率高，且带来重大的社会负担。如果AP未得到妥善处理，可能会发展为CP。AP发展为CP会导致持续的炎症和胰腺结构变化。尽管目前铁死亡在胰腺炎的治疗中应用不多，但有研究报道铁死亡与胰腺炎的某些发病机制，如胰腺纤维化和炎症因子的释放有关。这为胰腺炎的治疗提供了新的研究方向。

2.1 铁死亡介导的胰蛋白酶激活使AP恶化

胰蛋白酶的过早激活是AP的关键事件之一[27]。使用编码人的*PRSS1R122H*基因诱导建立AP小鼠模型，此模型表明胰蛋白酶基因表达增加会导致小鼠的DNA损伤，同时伴随细胞凋亡增加和炎性细胞浸润[28-29]。这表明胰蛋白酶活性的增加是导致小鼠对胰腺炎敏感的机制，而且胰蛋白酶的水平与胰腺炎的严重程度存在正相关关系。Liu等[30]发现胰蛋白酶增强会导致腺泡细胞丙二醛（MDA）水平和8-羟基-2脱氧鸟苷（氧化DNA损伤的产物）水平增加，并使AP大鼠的存活周期降低，而添加胰蛋白酶抑制剂STI或铁死亡抑制剂则可逆转这一过程。这表明，胰蛋白酶活化会增强胰腺腺泡细胞对铁死亡的敏感性，这种敏化作用会加剧AP的严重程度。组蛋白B（CTSB）是启动铁死亡的关键介质，它可以通过降解或灭活GPX4来实现[31-32]。然而，Halangk等[33]发现$CTSB^{-/-}$ SAP大鼠胰腺中胰蛋白酶活性和腺泡组织坏死程度显著降低，这说明组织蛋白酶B是决定胰蛋白酶原激活程度和腺泡细胞坏死程度的重要因素，铁死亡可能通过增强CTSB的再分配过程从而加剧AP恶化。He等[34]发现，抑制磺胺嘧啶-1（Srxn 1一种内源性抗氧化蛋白酶）的表达会促进ROS产生、MDA增加和GSH减少，并最终导致腺泡细胞凋亡，且Srxn 1在SAP中表达降低。进一步研究证明ROS诱导的内质网应激和CTSB激活抑制Srxn 1从而减弱了AP的腺泡损伤，表明抑制ROS/内质网应激/CTSB轴会减轻AP腺泡损伤和炎症。因此，通过药理学手段阻止细胞铁死亡以抑制胰蛋白酶原的激活，可能是预防和治疗胰腺炎的一种新方法。

2.2 铁死亡介导加剧SAP的器官损伤

根据最新的AP严重程度分级，中度和SAP均伴有不同程度的器官损伤，而SAP可能出现持续性（超过48 h）的器官功能障碍和感染性坏死[35]。多项研究表明，铁死亡会加速由SAP引发的器官损伤的进展。Ma等[36]利用胆酸钠逆流灌注建立的SAP大鼠模型，发现大鼠肾组织中脂质过氧化增加和线粒体萎缩，同时，GPX4和重肽铁蛋白（FTH1）的蛋白水平显著下降，这些结果提示铁死亡可能参与SAP引发的肾损伤。在SAP大鼠中，24 h后使用Lip-1（一种强效且特异的铁死亡抑制剂），发现其能降低肾组织中的MDA水平，增加GSH和GPX4的活性，并明显改善线粒体的形态。这些指标变化表明，抑制铁死亡可以减轻SAP引起的肾损伤，并帮助恢复肾功能。Ma等[37]进一步研究发现，Lip-1可以降低SAP大鼠中肠上皮细胞的脂质过氧化水平，从而减轻肠道损伤。这表明，抑制铁死亡有助于改善SAP诱导的肠屏障损伤，并阻止细菌的转运。青衣汤是源自传统中药配方大柴胡汤的产品，已被证明在临床实践中对SAP患者具有显著疗效[38]。Ge等[39]

发现，给予 SAP 大鼠青衣汤后 24 h，其肺组织中 GPX4 和 SLC7A11 的活性增加，肺组织的细胞凋亡率降低。然而，铁死亡诱导剂却翻转了这些指标，并抵消了青衣汤对 SAP 大鼠肺部组织的保护作用，这表明铁死亡会加剧 SAP 引起的肺损伤。李建等 [40] 在逆行灌注牛磺胆酸钠构建的 SAP 大鼠肝组织中，发现 MDA、ROS、4- 羟基壬烯醛（4-HNE）的水平和铁含量都显著增加。进一步分析铁死亡相关蛋白和基因后，他们证实铁死亡参与了 SAP 引发的肝损伤，并发现抑制细胞铁死亡可以有效改善 SAP 大鼠的肝损伤。这些研究结果都表明，铁死亡参与了由 SAP 引发的器官损伤过程，因此，抑制铁死亡有可能成为改善 SAP 症状的新靶点。

2.3 铁死亡加剧 CP 的胰腺纤维化

由胰腺星状细胞（PSC）活化引起的持久纤维化是 CP 的一个病理特征 [41]。铁死亡可以通过激活 PSC 来加重 CP 细胞的纤维化。已有研究证明 PSC 通过产生基质金属蛋白酶（MMP）和金属蛋白酶组织抑制剂（TIMP）来促进胶原蛋白合成，从而维持胰腺纤维化 [42]。Yang 等 [43] 发现，在对 CP 大鼠给予 L- 半胱氨酸饮食后，它们的腺泡组织中 α- 平滑肌肌动蛋白（αSMA）的阳性面积、PSC 中 MDA 水平以及 TIMP1 水平均下降，这表明 L- 半胱氨酸可以通过抑制 PSC 的活化来抑制胰腺纤维化。这暗示抑制半胱氨酸转运可能会激发细胞铁死亡，从而促进 PSC 的活化，加速胰腺纤维化的进展。这需要更多的体外实验来验证。已证明转化生长因子 -β1（TGF-β1）通过自分泌 MMP-3 和 MMP-9 减少胶原降解，从而增强纤维形成，是细胞外基质产生和 PSC 活化的关键调节因子 [44]。然而，Zhang 等 [45-46] 在胰腺纤维化模型大鼠中发现 TGF-β1 信号上调，ROS 水平增加，PSC 转化成肌纤维细胞表型。给予 GSH 或 TGF-β 通路抑制剂治疗后，这些变化得到缓解，表明 GSH 可以通过阻断体内 ROS/TGF-β 信号传导通路来抑制 PSC 激活诱导的胰腺纤维化。Shek 等 [47] 发现，乙醇代谢的氧化途径会产生 ROS，刺激 PSC 的活化。ROS 通过修饰不饱和磷脂、糖脂和胆固醇，形成如 MDA、4-HNE 等醛类混合物，与细胞脂质过氧化和细胞外基质沉积的增强密切相关。Bachem 等 [48] 发现，给予氧化应激抑制剂会降低 PSC 中 α-SMA 的蛋白表达和荧光强度，这表明细胞内 ROS 水平的增加会加速 PSC 的激活，从而促进胰腺纤维化。此外，体外实验表明，当 PSC 与坏死腺泡细胞共同培养时，PSC 会吞噬坏死腺泡细胞并诱导自身死亡，但随着培养时间的延长，未死亡的部分 PSC 会被激活并开始增殖 [49]。因此，铁死亡可通过阻断 ROS/TGF-β1/GSH 通路或诱导腺泡细胞死亡来加剧胰腺纤维化的进展。

3 铁死亡与胰腺癌

胰腺癌是一种致命的恶性肿瘤，被称为“癌中之王”[45]。胰腺癌早期症状不明显，并且对大多数化疗药物耐药，因此诊断和治疗胰腺癌非常困难 [50-51]。铁死亡可降低肿瘤细胞对化疗药物的耐药性，并抑制肿瘤生长。因此，通过基因干预或药理途径特异性诱导肿瘤细胞铁死亡可以为治疗胰腺癌带来希望。

3.1 游离铁增加诱导胰腺癌铁死亡

铁是维持机体正常功能所必需的微量元素之一。研究发现，肿瘤细胞因其增殖和侵袭速度快，对铁的需求量大，这使得肿瘤细胞对铁死亡更为敏感 [52-53]。铁调素通过下调转铁蛋白受体，抑制 Fe^{2+} 的外排，从而抑制细胞内的铁过载 [54]。王怀涛等 [55] 发现，鲁斯可皂苷以剂量依赖性方式显著上调 TF 的表达，并降低铁调素的表达，导致细胞内 Fe^{2+} 浓度和 ROS 水平增加，诱导胰腺癌细胞发生铁死亡，最终导致肿瘤细胞活力下降并提高细胞生存周期。赵枭雄 [56] 发现，以人参皂苷 Rg_3 为基质的铁基纳米药物可在胰腺癌中特异性释放大量 Fe^{2+}，并发生 Fenton 反应，产生大量 ROS，从而诱导胰腺癌细胞发生铁死亡，发挥抗肿瘤作用。Wang 等 [57] 发现，NEDD4-like E3 泛素蛋白连接酶（NEDD4L）通过结合乳转铁蛋白（LTF），抑制铁的转运，限制过多的 Fe^{2+} 进入胰腺癌细胞中，降低细胞内 ROS 水平和脂质过氧化，从而抑制胰腺癌细胞的铁死亡。上述研究表明，游离铁的增加会提高肿瘤细胞的 ROS 水平和脂质过氧化，从而启动胰腺癌细胞的铁死亡。

3.2 自噬紊乱诱导胰腺癌铁死亡

自噬在胰腺癌细胞生长和肿瘤发生中起着关键作用。研究表明，在人类 PDAC 从癌前胰腺上皮内肿瘤（PanINs）向晚期肿瘤的转变过程中，自噬及自噬相关基因呈现上调趋势 [52]。研究发现，某些选择性自噬（铁蛋白自噬、伴侣介导自噬和脂肪自噬）会诱导铁积累和脂质过氧化，最终导致铁死亡 [58-69]。Hou 等 [59] 发现，在调节铁死亡的过程中，自噬相关基因（ATG）起着核心作用，在特异性敲除人胰腺癌细胞系（*PANC1* 和 *PANC2.03*）中的 ATG5 和 ATG7 后，细胞内 Fe^{2+} 水平和 MDA 含量显著降低，并抑制了 erastin 诱导的生长抑制。这表明在胰腺癌细胞中，铁死亡在一定程度上依赖于自噬。铁蛋白是细胞内的铁储存蛋白复合物，其表达增加会抑制铁死亡。核

受体辅激活子 4（NCOA4）是铁蛋白自噬的选择性受体，它可以通过降解铁蛋白来维持细胞内不稳定的铁池，并将铁释放到细胞质中[60]。Naiara 等[61]发现，PDAC 细胞系的 NCOA4 表达水平高，会增强铁蛋白自噬，从而引起小鼠胰腺严重异常，胰腺重量显著降低，最终导致 PDAC 的发生及生存率降低。相反，抑制 NCOA4 所介导的铁蛋白自噬过程可延缓肿瘤进展并提高生存率。且铁蛋白自噬特征的低表达与人类 PDAC 的总体生存率和无病生存期的改善显著相关。这表明抑制 NCOA4 介导的铁蛋白自噬不仅会抑制 PDAC 的进展，也可作为 PDAC 的预后标志。Hu 等[62]证明，缺失 PIR（一种铁结合核蛋白）会启动 HMGB1 诱导的自噬依赖性铁死亡，从而导致胰腺癌细胞 DNA 损伤的增加。因此，通过调控 ATG5-ATG7-NCOA4 通路或其他自噬相关调节因子，可以诱导肿瘤细胞的自噬紊乱，并最终导致 PADC 细胞的铁死亡。

3.3 抑制谷氨酰胺（Gln）代谢重编程以诱导胰腺癌铁死亡

Gln 代谢重编程是胰腺癌细胞生存的主要燃料[63]。抑制 Gln 代谢重编程会导致肿瘤细胞中 ROS 和 MDA 水平升高，使胰腺癌细胞发生铁死亡。胰腺癌与其他肿瘤不同[64]，其独特的缺氧区域使得 Gln 代谢高于其他细胞。研究表明，谷草转氨酶 1（GOT1）在胰腺癌缺氧的肿瘤微环境中，将 Gln 代谢为 NADPH，以维持胰腺癌细胞的氧化还原平衡和增殖需求[65]。Kremer 等[6]发现抑制 GOT1 不仅可以抑制 Gln 代谢介导的胰腺癌细胞增殖，而且可以提高游离铁的水平，提高胰腺癌细胞对铁死亡诱导剂的敏感性。值得一提的是，在 GOT1 缺失情况下，外源给予 GSH 可以使胰腺癌细胞存活。这说明联合应用 GOT1 抑制剂和铁死亡诱导剂是治疗胰腺癌的可选方案。蔡华忠[66]发现，erastin 在诱导 *PANC1* 发生铁死亡过程中，会降低细胞内 GPX4 和谷氨酰胺酶 1（GLS1）的表达。敲低 GLS1 后，胰腺癌细胞内的 Fe^{2+}、MDA 和脂质 ROS 的含量上升，并且胰腺癌对铁死亡的敏感性增加。这表明 GLS1 是铁死亡的负调控因子，上调 GLS1 会增加体内 Gln 的水平并抑制癌细胞发生铁死亡。SLC1A5 是 Gln 转运体，它广泛存在于肿瘤细胞中。研究发现，SLC1A5 通过增加 Gln 的摄取，从而促进膜脂质的氧化，是铁死亡的正调节剂[67]。Xu 等[68]证明了 SLC1A5 在胰腺癌中高表达，其促进了胰腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移，同时也增加了胰腺癌对铁死亡的敏感性。此外，Gln 可通过 XC^- 系统转运介导半胱氨酸，半胱氨酸是 GSH 合成的限速步骤[69]。这说明抑制 Gln 代谢重编程可以通过诱导铁死亡来抑制胰腺癌细胞的增殖。

3.4 线粒体功能障碍诱导胰腺癌铁死亡

胰腺癌细胞的线粒体高度碎片化，极大地促进了肿瘤细胞的生长和转移[70]。线粒体功能障碍不仅会削弱抗氧化屏障，导致 ROS 产生并最终导致铁死亡，还会减少肿瘤细胞的能量摄入[71]。用核苷类似物扎西他滨（zacitabine）处理 PANC1 等细胞会导致肿瘤细胞线粒体功能障碍，表现为线粒体 DNA 损伤、ATP 生成减少和 ROS 水平升高，最终导致铁死亡[72]。相关实验进一步表明，干扰素反应的刺激 STING1 通过增加线粒体融合程度介导 ROS 产生和脂质过氧化，最终促进人胰腺癌细胞的铁死亡[73]。靶向肌铁蛋白（myoferlin）会导致有丝分裂增加，进而诱导释放更多游离铁，提高胰腺癌细胞的游离铁水平，以诱导其铁死亡[74]。然而，一项实验表明，砷通过降低线粒体膜电位和提高线粒体 ROS 水平诱导胰腺功能障碍和铁死亡[75]。这表明线粒体功能障碍会增加癌细胞内的 ROS 水平并导致胰腺癌发生铁死亡。因此，如何在不损伤正常细胞线粒体功能的前提下，特异性地诱导肿瘤细胞的功能障碍，从而实现胰腺癌细胞的铁死亡，仍然是亟待探索的方向。

3.5 铁死亡提高胰腺癌对化疗药物的敏感性

胰腺癌高耐药性是胰腺癌患者总生存期和预后差的主要原因[76]，其中铁死亡有助于提高细胞对化疗药物的敏感性。吉西他滨是胰腺癌的一线化疗药物。但 RNA 测序数据表明，胰腺癌对吉西他滨耐药的过程中 SLC7A11 和 SLC3A2 上调[77]。柳氮磺吡啶是 SLC7A11 的抑制剂，在与吉西他滨联合使用时可以显著抑制胰腺癌细胞的生长，并增强吉西他滨的疗效[78]。研究表明，GSH 与肿瘤的耐药性和侵袭性成正相关[79]。吉西他滨诱导 ROS 在肿瘤细胞中积累，通过促进 *GSH* 基因的转录来降低 ROS 水平，从而导致 PDAC 对吉西他滨的内在耐药性产生[80]。吉西他滨能够刺激内源性 ROS 的产生，而铁死亡诱导剂能够通过耗竭 GSH 来抑制 ROS 的清除。当两者联合使用时，可以引发强烈的氧化应激反应，从而导致胰腺癌细胞的死亡。热休克蛋白家族 A 成员 5（HSPA5）能够通过抑制 GPX4 的降解来防止脂质过氧化，进一步抑制 PDAC 细胞的铁死亡。Zhu 等[81]发现，当 HSPA5 抑制剂和吉西他滨联合使用时，可以显著延长 PDAC 小鼠的寿命，并且显著增强吉西他滨的抗肿瘤活性，这是通过诱发 PDAC 的铁死亡来实现的。羰基还原酶 1（CBR1）是一种 NADPH 还

原性酶，能够抑制化疗过程中的氧化应激，从而保护肿瘤细胞。Zhou 等[82]发现，白杨素能够直接与 CBR1 结合并抑制其活性，进一步诱导 FTH1 的降解，从而释放大量的 Fe^{2+} 并产生高活性的羟基自由基，促进胰腺癌的铁死亡。上述研究表明，铁死亡能够增强胰腺癌对化疗药物的敏感性，显著提高胰腺癌患者的存活率。

4　铁死亡加速糖尿病进展

糖尿病是由于胰腺炎症导致胰岛细胞丢失和胰腺外分泌不足而引起的一种疾病[83]。胰岛 β 细胞中的抗氧化酶水平相比正常细胞更低，而高血糖状态下大量 ROS 的产生，使得胰岛 β 细胞对铁死亡更为敏感[84]。在 2 型糖尿病（T2DM）小鼠中，铁死亡会导致胰岛 β 细胞的丢失和功能障碍。然而，在高血糖状态下添加铁死亡抑制剂可以延长小鼠的存活时间[85]。人胰腺 β 细胞在铁死亡诱导剂的作用下，胰岛素分泌能力明显下降，然而，使用铁死亡抑制剂去铁胺（DFO）可以恢复其分泌能力[86]。长期的氧化应激是引发 T2DM 的关键因素，它可能导致胰岛素分泌的紊乱和胰岛素抵抗的形成[87]。隐绿原酸可以通过激活 XC^- 系统 /GPX4 来降低氧化应激程度，提高胰岛素的分泌能力，并增强糖尿病模型细胞的活力[88]。在小鼠胰腺 β 细胞 MIN6 细胞中，Zhang 等[89]观察到白藜芦醇能够缓解内质网应激，并通过上调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）的表达来抑制 MDA 诱导的脂质过氧化，进一步抑制铁死亡，从而提升胰岛素的分泌能力并实现胰岛功能的修复。芍药苷具有显著的抗炎、抗氧化和降血糖特性，能在临床上有效改善糖尿病病情。连李斌等[90]发现芍药苷通过激活蛋白激酶 B/ 核因子红细胞 -2 相关因子 2/ 谷胱甘肽过氧化酶 4（Akt/Nrf2/GPX4）通路，能够降低胰腺组织中的 ROS 含量和脂质过氧化水平，进而改善线粒体功能，缓解胰腺损伤，提高妊娠糖尿病小鼠的存活周期。综上，铁死亡能够增强氧化应激程度，导致胰岛 β 细胞的损伤，从而加速糖尿病的进展。

5　讨论

铁死亡是由于细胞内铁蓄积导致毒性脂质过氧化物水平升高而引起的一种细胞氧化性死亡形式[3]。铁死亡与多种胰腺疾病有关，包括胰腺炎、胰腺癌和 T2DM 等，如图 2 所示。

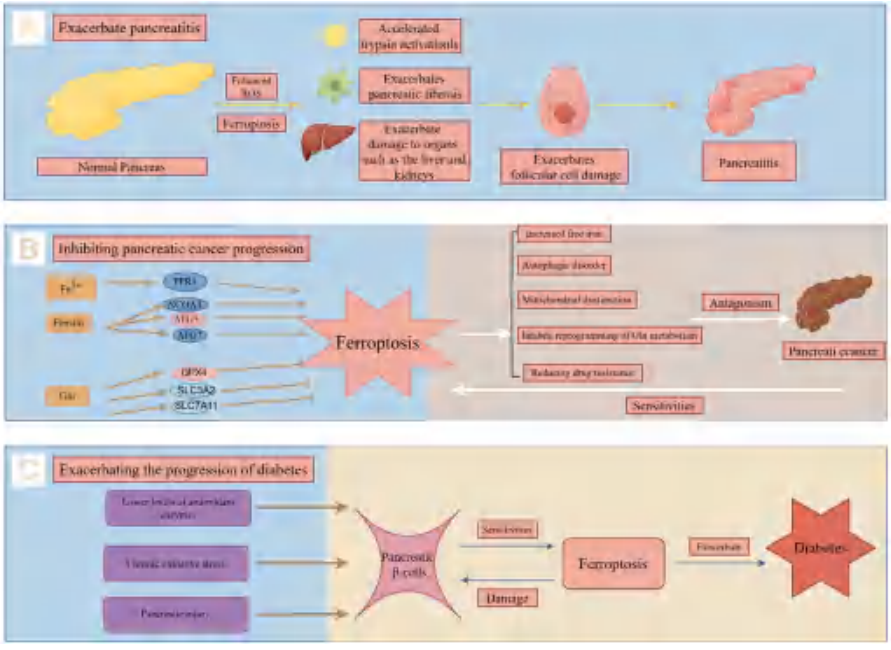


图 2　铁死亡在胰腺疾病中的作用

Fig 2　Role of ferroptosis in pancreatic disease

对于铁死亡与胰腺炎之间的关系，本文主要归纳出以下几点：① 已被激活的胰蛋白酶增强了胰腺腺泡细胞对铁死亡的敏感性，显著增加了腺泡细胞损伤程度，从而促进胰腺炎的发展；② 铁死亡广泛参与了由 SAP 引发的相关器官损伤过程；③ 铁死亡或坏死腺泡细胞加速了 PSC 的激活，从而促进了 CP 的胰腺纤维化过程。基于这些，可以推断出胰腺炎对铁死亡是非常敏感的，铁死亡能够加剧病情的发展。然而，铁死亡在胰腺炎中的作用研究依旧处于起步阶段，还有许多问题需要研究解决。例如，铁死亡在胰腺炎中的特异性生物标志物仍需探索；SAP 引发的相关器官损伤是否存在铁死亡的敏感性差异；其他胰腺相关成纤维细胞是否也对铁死亡敏感仍待研究。

铁死亡与胰腺癌之间的关系可以归纳为以下几点：① 胰腺癌发生时，肿瘤细胞对铁的需求更大，这使得胰腺癌对游离铁的显著增加引发的铁死亡更为敏感；② 通过调控 ATG5-ATG7-NCOA4 通路或其他自噬相关调节因子，可以诱导肿瘤细胞的自噬紊乱，并最终导致 PADC 细胞的铁死亡；③ 铁死亡可通过抑制 Gln 代谢重编程过程，从而抑制肿瘤细胞的增殖；④ 线粒体功能障碍会削弱肿瘤细胞的抗氧化屏障，使得胰腺癌对铁死亡敏感性增加；⑤ 铁死亡削弱了肿瘤细胞的耐药性和侵袭性，有助于提高胰腺癌患者的存活率。这些发现表明，靶向铁死亡相关通路可能是治疗胰腺癌的一种有前景的策略，但仍有一些问题需要进一步探讨。例如，如何确定特异性诱导胰腺癌细胞铁死亡的阈值以避免加重胰腺炎，铁死亡在自噬中的作用、联系和其对人类胰腺癌细胞的影响，铁死亡对胰腺癌诊断标志物探索的影响等问题。

过量的铁可能会增加 T2DM 的风险。一方面，胰岛 β 细胞存在较低水平抗氧化酶，抗氧化应激能力不足；另一方面，铁死亡可加剧胰腺损伤，使得胰岛素的分泌能力下降。目前关于铁死亡与糖尿病之间的关系研究仍然十分有限，存在许多问题，这需要更多的科学研究来明确。例如，铁死亡对胰岛 α 细胞是否存在影响；铁死亡抑制剂与胰岛素的联用是协同作用还是拮抗作用；不同的糖尿病并发症是否存在铁死亡敏感度差异，以及是否需要选用不同类型的铁死亡抑制剂。因此，我们应从多因素、多角度入手，注重细胞内外环境、不同器官组织之间的前后变化，建立系统的动态观察体系，以完善胰腺疾病中铁死亡的发生机制和治疗靶点，从而为防治胰腺疾病提供新的思路和策略。

参考文献

[1] Zhou Q，Melton DA. Pancreas regeneration [J]. Nature，2018，557（7705）：351-358.

[2] Chen X，Kang R，Kroemer G，et al. Broadening horizons：the role of ferroptosis in cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol，2021，18（5）：280-296.

[3] Dixon SJ，Lemberg KM，Lamprecht MR，et al. Ferroptosis：an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell，2012，149（5）：1060-1072.

[4] Rodopulo AK. Oxidation of tartaric acid in wine in the presence of heavy metal salts（activation of oxygen by iron）[J]. Izv Akad Nauk SSSR Biol，1951，3（3）：115-128.

[5] Li J，Cao F，Yin HL，et al. Ferroptosis：past，present and future [J]. Cell Death Dis，2020，11（2）：88.

[6] Kremer DM，Nelson BS，Lin L，et al. GOT1 inhibition promotes pancreatic cancer cell death by ferroptosis [J]. Nat Commun，2021，12（1）：4860.

[7] Li HY，Wu D，Zhang HD，et al. New insights into regulatory cell death and acute pancreatitis [J]. Heliyon，2023，9（7）：e18036.

[8] Abdul Y，Li W，Ward R，et al. Deferoxamine treatment prevents post-stroke vasoregression and neurovascular unit remodeling leading to improved functional outcomes in type 2 male diabetic rats：role of endothelial ferroptosis [J]. Transl Stroke Res，2021，12（4）：615-630.

[9] Gao MH，Monian P，Quadri N，et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. Mol Cell，2015，59（2）：298-308.

[10] Sun X，Ou Z，Xie M，et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death [J]. Oncogene，2015，34（45）：5617-5625.

[11] Park EH，Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation [J]. Cell death Dis，2019，10（11）：822.

[12] Wu LL，Tian X，Zuo HW，et al. MiR-124-3p delivered by exosomes from heme oxygenase-1 modified bone marrow mesenchymal stem cells inhibits ferroptosis to attenuate ischemia-reperfusion injury in steatotic grafts [J]. J Nanobiotechnology，2022，20（1）：196.

[13] Wang LY，Liu YC，Du TT，et al. ATF3 promotes erastin-induced ferroptosis by suppressing system Xc [J]. Cell Death Differ，2020，27（2）：662-675.

[14] Fang XX，Cai ZX，Wang H，et al. Loss of cardiac ferritin h facilitates cardiomyopathy via Slc7a11-mediated ferroptosis [J]. Circ Res，2020，127（4）：486-501.

[15] Zhang WJ，Sun Y，Bai L，et al. RBMS1 regulates lung cancer ferroptosis through translational control of SLC7A11 [J]. J Clin Invest，2021，131（22）：e152067.

[16] Gho CA，Hsu E，Aslan M，et al. Ferroptosis inducers are a novel therapeutic approach for advanced prostate cancer [J]. Cancer Res，2021，81（6）：1583-1594.

[17] Hayano M，Yang WS，Corn CK，et al. Loss of cysteinyl-tRNA synthetase（CARS）induces the transsulfuration pathway and inhibits ferroptosis induced by cystine deprivation [J]. Cell Death Differ，2016，23（2）：270-278.

[18] Forcina GC，Dixon SJ. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis [J]. Proteomics，2019，19（18）：e1800311.

[19] Yang WS，SriRamaratnam R，Welsch ME，et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. Cell，2014，156（1-2）：317-331.

[20] Friedmann Angeli JP，Schneider M，Proneth B，et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. Nat Cell Biol，2014，16（12）：1180-1191.

[21] Zhang YL，Swanda RV，Nie LT，et al. MTORC1 couples cyst（e）ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation [J]. Nat Commun，2021，12（1）：1589.

[22] Seiler A，Schneider M，Förster H，et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent-and AIF-mediated cell death [J]. Cell Metab，

2008，8（3）：237-248.
[23] McBean GJ. The transsulfuration pathway：a source of cysteine for glutathione in astrocytes [J]. Amino Acids，2012，42（1）：199-205.
[24] Chen G，Guo GQ，Zhou XD，et al. Potential mechanism of ferroptosis in pancreatic cancer [J]. Oncol Lett，2020，19（1）：579-587.
[25] Kimita WD，Ko JY，Li XY，et al. Associations between iron homeostasis and pancreatic enzymes after an attack of pancreatitis [J]. Pancreas，2022，51（10）：1277-1283.
[26] Mayerle J，Sendler M，Hegyi E，et al. Genetics，cell biology，and pathophysiology of pancreatitis [J]. Gastroenterology，2019，156（7）：1951-1968.
[27] Ji BA，Gaiser S，Chen XQ，et al. Intracellular trypsin induces pancreatic acinar cell death but not NF-kappaB activation [J]. J Biol Chem，2009，284（26）：17488-17498.
[28] Gui F，Zhang YB，Wan JH，et al. Trypsin activity governs increased susceptibility to pancreatitis in mice expressing human PRSS1R122H [J]. J Clin Invest，2020，130（1）：189-202.
[29] Huang HJ，Swidnicka-Siergiejko AK，Daniluk JS，et al. Transgenic expression of PRSS1R122H sensitizes mice to pancreatitis [J]. Gastroenterology，2020，158（4）：1072-1082.
[30] Liu K，Liu J，Zou BR，et al. Trypsin-mediated sensitization to ferroptosis increases the severity of pancreatitis in mice [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol，2022，13（2）：483-500.
[31] Kuang FM，Liu J，Li CF，et al. Cathepsin B is a mediator of organelle-specific initiation of ferroptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun，2020，533（4）：1464-1469.
[32] Canli Ö，Alankuş YB，Grootjans S，et al. Glutathione peroxidase 4 prevents necroptosis in mouse erythroid precursors [J]. Blood，2016，127（1）：139-148.
[33] Halangk W，Lerch MM，Brand NB，et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis [J]. J Clin Invest，2000，106（6）：773-781.
[34] He J，Ma MM，Li DM，et al. Sulfiredoxin-1 attenuates injury and inflammation in acute pancreatitis through the ROS/ER stress/Cathepsin B axis [J]. Cell Death Dis，2021，12（7）：626.
[35] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组 . 中国急性胰腺炎诊治指南（2021）[J]. 浙江实用医学 . 2021，26（6）：511-519，535.
[36] Ma DL，Li C，Jiang PL，et al. Inhibition of ferroptosis attenuates acute kidney injury in rats with severe acute pancreatitis [J]. Dig Dis Sci，2021，66（2）：483-492.
[37] Ma DL，Jiang PL，Jiang YJ，et al. Effects of lipid peroxidation mediated ferroptosis on severe acute pancreatitis-induced intestinal barrier injury and bacterial translocation [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，22（6）：6644576.
[38] Yang CT，Wang TT，Chen J，et al. Traditional chinese medicine formulas alleviate acute pancreatitis：pharmacological activities and mechanisms [J]. Pancreas，2021，50（10）：1348-1356.
[39] Ge P，Luo YL，Yang Q，et al. Ferroptosis in rat lung tissue during severe acute pancreatitis-associated acute lung injury：protection of qingyi decoction [J]. Oxid Med Cell Longev，2023，58（27）：613.
[40] 李建，常东鸽，霍刘斌，等 . 齐墩果酸通过 Nrf2 抑制铁死亡并减轻重症急性胰腺炎大鼠肝损伤 [J]. 中国病理生理杂志，2022，38（8）：1470-1477.
[41] Jin GH，Hong WL，Guo YY，et al. Molecular mechanism of pancreatic stellate cells activation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. J Cancer，2020，11（6）：1505-1515.
[42] Masamune A，Watanabe T，Kikuta K，et al. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol，2009，7（11 Suppl）：S48-S54.
[43] Yang LJ，Shen JQ，He SS，et al. L-cysteine administration attenuates pancreatic fibrosis induced by TNBS in rats by inhibiting the activation of pancreatic stellate cell [J]. PLoS One，2012，7（2）：e31807.
[44] Bynigeri RR，Jakkampudi A，Jangala R，et al. Pancreatic stellate cell：Pandora’s box for pancreatic disease biology [J]. World J Gastroenterol，2017，23（3）：382-405.
[45] Zhang JT，Bai J，Zhou Q，et al. Glutathione prevents high glucose-induced pancreatic fibrosis by suppressing pancreatic stellate cell activation via the ROS/TGFβ/SMAD pathway [J]. Cell Death Dis，2022，13（5）：440.
[46] Yan B，Cheng L，Jiang ZD，et al. Resveratrol inhibits ROS-promoted activation and glycolysis of pancreatic stellate cells via suppression of miR-21 [J]. Oxid Med Cell Longev，2018，13（46）：958.
[47] Shek FWT，Benyon RC，Walker FM，et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis [J]. Am J Pathol，2002，160（5）：1787-1798.
[48] Bachem MG，Zhou ZF，Zhou SX，et al. Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis [J]. J Gastroenterol Hepatol，2006，21（Suppl 3）：S92-S96.
[49] Shimizu K. Pancreatic stellate cells：molecular mechanism of pancreatic fibrosis [J]. J Gastroenterol Hepatol，2008，23（Suppl 1）：S119-S121.
[50] Li DH，Xie KP，Wolff R，et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet，2023，8：17.
[51] Goral VD. Pancreatic cancer：pathogenesis and diagnosis [J]. Asian Pac J Cancer Prev，2015，16（14）：5619-5624.
[52] Yang SH，Wang XX，Contino GM，et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth [J]. Genes Dev，2011，25（7）：717-729.
[53] Theil EC. Iron，ferritin，and nutrition [J]. Annu Rev Nutr，2004，24（12）：327-343.
[54] Julián-Serrano S，Yuan FC，Wheeler W，et al. Hepcidin-regulating iron metabolism genes and pancreatic ductal adenocarcinoma：a pathway analysis of genome-wide association studies [J]. Am J Clin Nutr，2021，114（4）：1408-1417.
[55] 王怀涛，高峰，谭晓冬 . 鲁斯可皂苷元通过诱导铁死亡对胰腺癌细胞的抑制作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2022，38（15）：1787-1791.
[56] 赵枭雄 . 多模铁基纳米药物联合纳秒脉冲抗肿瘤疗效及其机制研究 [D]. 北京：北京科技大学，2023.
[57] Wang Y，Liu Y，Liu J，et al. NEDD4L-mediated LTF protein degradation limits ferroptosis [J]. Biochem Biophys Res

Commun，2020，531（4）：581-587.
[58] Liu J，Kuang FM，Tang DL，et al. Autophagy-dependent ferroptosis：machinery and regulation [J]. Cell Chem Biol，2020，27（4）：420-435.
[59] Hou W，Xie YC，Song XX，et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. Autophagy，2016，12（8）：1425-1428.
[60] Mancias JD，Wang XX，Gygi SP，et al. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy [J]. Nature，2014，509（7498）：105-109.
[61] Santana CN，Del RMQ，Kapner KS，et al. NCOA4-mediated ferritinophagy is a pancreatic cancer dependency via maintenance of iron bioavailability for iron-sulfur cluster proteins [J]. Cancer Discov，2022，12（9）：2180-2197.
[62] Hu NJ，Bai LL，Dai EY，et al. Pirin is a nuclear redox-sensitive modulator of autophagy-dependent ferroptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun，2021，536（12）：100-106.
[63] Regel I，Kong B，Raulefs S，et al. Energy metabolism and proliferation in pancreatic carcinogenesis [J]. Langenbecks Arch Surg，2012，397（4）：507-512.
[64] Vaupel P，Thews O，Kelleher DK. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia：regarding Koong et al [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys，2001，50（4）：1099-1100.
[65] Son J，Lyssiotis CA，Ying HQ，et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway [J]. Nature，2013，496（7443）：101-105.
[66] 蔡华忠 . GLS1 调节胰腺癌铁死亡抵抗的作用机制及其靶向治疗研究 [D]. 镇江：江苏大学，2022.
[67] Zhang Y，Dong P，Liu NA，et al. TRIM6 reduces ferroptosis and chemosensitivity by targeting SLC1A5 in lung cancer [J]. Oxid Med Cell Longev，2023，98（8）：100.
[68] Xu FS，Wang H，Pei HH，et al. SLC1A5 prefers to play as an accomplice rather than an opponent in pancreatic adenocarcinoma [J]. Front Cell Dev Biol，2022，10（9）：800925.
[69] Altman BJ，Stine ZE，Dang CV. From Krebs to clinic：glutamine metabolism to cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer，2016，16（11）：749.
[70] Yu MF，Nguyen ND，Huang YQ，et al. Mitochondrial fusion exploits a therapeutic vulnerability of pancreatic cancer [J]. JCI Insight，2019，5（16）：e126915.
[71] Gao MH，Yi JM，Zhu JJ，et al. Role of mitochondria in ferroptosis [J]. Mol Cell，2019，73（2）：354-363.
[72] Li CF，Zhang Y，Liu J，et al. Mitochondrial DNA stress triggers autophagy-dependent ferroptotic death [J]. Autophagy，2021，17（4）：948-960.
[73] Li CF，Liu J，Hou W，et al. STING1 promotes ferroptosis through MFN1/2-dependent mitochondrial fusion [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9（1）：698679.
[74] Rademaker G，Boumahd Y，Peiffer R，et al. Myoferlin targeting triggers mitophagy and primes ferroptosis in pancreatic cancer cells [J]. Redox Biol，2022，53（9）：102324.
[75] Wei S，Qiu TM，Yao XF，et al. Arsenic induces pancreatic dysfunction and ferroptosis via mitochondrial ROS-autophagy-lysosomal pathway [J]. J Hazard Mater，2020，384（3）：121390.
[76] Vincent A，Herman J，Schulick R，et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet，2011，378（9791）：607-620.
[77] Tang R，Hua J，Xu J，et al. The role of ferroptosis regulators in the prognosis，immune activity and gemcitabine resistance of pancreatic cancer [J]. Ann Transl Med，2020，8（21）：1347.
[78] Lo M，Ling V，Low C，et al. Potential use of the anti-inflammatory drug，sulfasalazine，for targeted therapy of pancreatic cancer [J]. Curr Oncol，2010，17（3）：9-16.
[79] Wang YQ，Shang WT，Xiong JP，et al. Activable nanoparticle for tumor aggressiveness and drug resistance prediction by glutathione heterogeneous imaging [J]. J Biomed Nanotechnol，2021，17（7）：1339-1348.
[80] Yang JH，Xu J，Zhang B，et al. Ferroptosis：at the crossroad of gemcitabine resistance and tumorigenesis in pancreatic cancer [J]. Int J Mol Sci，2021，22（20）：10944.
[81] Zhu S，Zhang QH，Sun XF，et al. HSPA5 regulates ferroptotic cell death in cancer cells [J]. Cancer Res，2017，77（8）：2064-2077.
[82] Zhou L，Yang C，Zhong WL，et al. Chrysin induces autophagy-dependent ferroptosis to increase chemosensitivity to gemcitabine by targeting CBR1 in pancreatic cancer cells [J]. Biochem Pharmacol，2021，193（10）：114813.
[83] Andersen DK，Korc M，Petersen GM，et al. Diabetes，pancreatogenic diabetes，and pancreatic cancer [J]. Diabetes，2017，66（5）：1103-1110.
[84] Lenzen S. Oxidative stress：the vulnerable beta-cell [J]. Biochem Soc Trans，2008，36（Pt3）：343-347.
[85] Li D，Jiang CJ，Mei GB，et al. Quercetin alleviates ferroptosis of pancreatic β cells in type 2 diabetes [J]. Nutrients，2020，12（10）：2954.
[86] Bruni A，Pepper AR，Pawlick RL，et al. Ferroptosis-inducing agents compromise in vitro human islet viability and function [J]. Cell Death Dis，2018，9（6）：595.
[87] Rehman K，Akash MSH. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus：how are they interlinked? [J]. J Cell Biochem，2017，118（11）：3577-3585.
[88] Zhou Y. The Protective effects of cryptochlorogenic acid on β-cells function in diabetes in vivo and vitro via inhibition of ferroptosis [J]. Diabetes Metab Syndr Obes，2020，13（1）：1921-1931.
[89] Zhang XH，Jiang LP，Chen HB，et al. Resveratrol protected acrolein-induced ferroptosis and insulin secretion dysfunction via ER-stress-related PERK pathway in MIN6 cells [J]. Toxicology，2022，465（10）：153048.
[90] 连李斌，陈蓓，段蓓 . 芍药苷调节 Akt/Nrf2/GPX4 通路对妊娠糖尿病大鼠铁死亡的影响 [J]. 中国优生与遗传杂志，2023，31（1）：22-26.

（收稿日期：2023-09-06；修回日期：2023-10-20）

何首乌肝损伤机制及减毒方法研究进展

刘思雨[1]，李敏[1]，唐瑜[1]，张依娜[1]，欧莉[1]，卫培峰[2]，高峰[1*]（1. 陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046；2. 陕西中医药大学第二附属医院，陕西 咸阳 712099）

摘要：何首乌 *Polygonum multiforum* Thunb. 是临床常用滋补中药，同时作为一种保健中药在药膳和食膳中广泛应用，但是近年来由于不时出现何首乌及其制品致肝损伤的报道，引起了研究者的警觉及关注。本文通过整理分析关于何首乌致肝损伤的国内外临床相关报道，从何首乌致肝毒性的物质基础二苯乙烯苷类、蒽醌类化合物和没食子酸等成分及其潜在肝毒性机制（包括代谢酶改变、氧化应激、炎症反应、线粒体损伤、肝细胞异常凋亡等方面）进行归纳总结，探讨炮制减毒和配伍减毒两种减毒方法对何首乌肝毒性的影响和机制。

关键词：何首乌；肝毒性；炮制；配伍；减毒增效

中图分类号：R285，R969 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-1008-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.028

Research progress on the mechanism of liver injury by polygonum multiflorum and attenuation and synergism

LIU Si-yu[1], LI Min[1], TANG Yu[1], ZHANG Yi-na[1], OU Li[1], WEI Pei-feng[2], GAO Feng[1*] (1. *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712099)

Abstract: Polygonum multiflorum, commonly used as a nourishing traditional Chinese medicine in clinical practice, has been widely used as a health-promoting herb in medicinal diets and culinary preparations. However, in recent years, there have been occasional reports of liver injury associated with polygonum multiflorum and its products, causing much attention. This paper summarized relevant domestic and international clinical reports on polygonum multiflorum-induced liver damage. Based on the constituents of stilbene glycosides, anthraquinones and gallic acid of polygonum multiflorum and their mechanism of action, as well as potential mechanisms of liver toxicity such as altered metabolism enzymes, oxidative stress, inflammatory responses, mitochondrial damage, and abnormal hepatocyte apoptosis, were analyzed to explore the effect and mechanism of detoxification methods, including processing and compatibility, on reducing the hepatotoxicity of polygonum multiflorum.

Key words: polygonum multiflorum; liver toxicity; processing; compatibility; attenuated toxicity and enhanced efficacy

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根[1]。有生首乌和制首乌两种规格[1]：生用具有解毒、消痈、截疟、润肠通便等功效；炮制后具有补肝肾、强筋骨、乌须发、化浊降脂等功效。现代药理研究发现，何首乌生品具有解热、抗菌、抗炎、泻下等作用，制品具有保肝、抗氧化、抗衰老、抗动脉粥样硬化等作用[2-3]。何首乌生品具有毒性，因此临床上都将其炮制后使用，炮制后的何首乌经开发形成多种剂型，如复方首乌补液、首乌丸、七宝美髯丹等。经炮制、配伍后的制首乌毒性大大降低且疗效增加，但仍有研究显示，何首乌及其制剂长期服用

基金项目：陕西省科技厅重点项目（No.2021JQ-728）。

作者简介：刘思雨，女，在读硕士研究生，主要从事中药药效与毒理评价及应用方面的研究，email：876683718@qq.com **通信作者：**高峰，女，副教授，主要从事中药药性理论研究，email：7204612@qq.com

会导致一定的肝损伤[4]。中华中医药学会、中成药分会等对何首乌的使用进行了安全精准的用药与风险防控[5]。此外，国家药品监督管理局发公告称，应注意口服何首乌致肝损伤的风险。因此，本文通过结合近年来的相关研究和综述，对何首乌致肝损伤的临床报道、肝损伤成分、毒理机制及减毒方法等进行综述，以期为何首乌致肝损伤的进一步研究及临床合理用药提供科学依据。

1 何首乌单方或复方致肝损伤临床案例

近年来，何首乌及其制剂在临床上使用较为常见。2022 年，一名 65 岁女性在摄入何首乌后 17 d 出现严重肝毒性和粒细胞缺乏症，并且 Roussel-Uclaf 因果关系评价结果显示肝毒性与何首乌之间存在极可能的关系[6]。另有研究报道，一位 48 岁的墨西哥女性因瘙痒和恶心进行就诊，患者自述每日饮用含何首乌的脂质代谢茶，考虑是何首乌所致的药物性肝损伤[7]。Banarova 等[8]报道称，一位 33 岁的健康女性在临床服用何首乌丸后，出现恶心、黄疸的症状，诊断为何首乌的中毒性肝炎。邵艳玲等[9]报道一男性患者因治疗白发服用何首乌及黑芝麻 2 个月，诊断为药物性肝损伤，在终止服用何首乌后住院 30 d 治愈。Cho 等[10]报道，一位 34 岁的韩国男子连续 30 d 饮用何首乌所制白酒和茶，因出现疲劳和黄疸加重就医，被诊断为何首乌所致的药物性肝损伤。有文献分别对 140 例和 39 例何首乌及其制剂所致的药物性肝损伤进行总结分析，发现单用何首乌组患者全部为肝细胞损伤型，复方何首乌组患者以肝细胞损伤型为主（89.29%），且单味何首乌所致的药物性肝损伤人数大于复方何首乌的药物性肝损伤人数[11-12]。综上所述，何首乌在应用过程中具有一定的肝毒性，与合用其他药物相比，单用何首乌所致的药物性肝损伤更加常见。

2 何首乌肝损伤成分研究

何首乌所含活性成分主要为二苯乙烯苷类、蒽醌类、多糖类、鞣质类等[13]。其中没食子酸经研究发现为导致何首乌特异性肝毒性的潜在成分[14]。

2.1 二苯乙烯苷类

潘韵铮[15]通过体外复合细胞实验和体内实验发现，在体外复合细胞实验中顺式和反式二苯乙烯苷均可以提高 THP-1 巨噬细胞的白细胞介素（IL）-1β 水平；在体内实验中顺式二苯乙烯苷和脂多糖（LPS）联用可以显著升高大鼠血清中的谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）水平，提高肝脏组织中的高迁移率族蛋白 1（HMGB1）、Toll 样受体 4（TLR4）、髓样分化因子（MYD88）、核因子 κB（NF-κB）的表达水平，促进 NLRP3 炎症小体的激活。Meng 等[16]对二苯乙烯苷体内实验的研究结果显示，顺式二苯乙烯苷可能通过抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 -γ（PPAR-γ）而诱导免疫特异性肝损伤，推测顺式二苯乙烯苷可能是何首乌特异性毒性的关键性成分。颜玉静等[17]建立 2D、3D 细胞模型对二苯乙烯苷的肝毒性进行研究，结果显示，二苯乙烯苷在 3D 模型中对人肝癌细胞（HepaRG）的抑制作用强于 2D 模型，且在 3D 模型的碱性彗星实验中，二苯乙烯苷高剂量组的细胞凋亡率显著升高。有体外实验研究结果显示，在 LPS 的特异质模型上二苯乙烯苷可以诱导人正常肝细胞（L02）的细胞凋亡，且细胞抑制率和凋亡率与二苯乙烯苷的浓度成正相关。

此外，也有研究表明何首乌的肝毒性与大黄素在体内的吸收代谢有关。林艳等[18]指出二苯乙烯苷类可以促进大黄素的吸收从而诱导肝损伤的发生。Yu 等[19]研究发现，经二苯乙烯苷处理后的人结直肠腺癌细胞（Caco-2 细胞）对大黄素的吸收增强，大黄素在人肝微粒体中的代谢受到抑制。Wang 等[20]研究明确表明，二苯乙烯苷联合给药可提高大黄素体内聚集，从而诱导血浆大黄素成分增加和肝蛋白内合，增强小鼠对大黄素肝毒性的易感性；并且二苯乙烯苷抑制了大黄素氧化代谢的细胞色素 P4502C19（CYP2C19）和细胞色素 P4503A4 酶（CYP3A4）途径，从而使大黄素蓄积引起肝损伤。

2.2 蒽醌类成分

汪祺等[21]构建了大鼠原代肝微组织评价体系，并且制备不同浓度何首乌蒽醌类成分药液（其中大黄酸给药浓度分别为 0、0.1、1.3、9、27 mg • L^{-1}，大黄素型单蒽酮给药浓度分别为 0、0.03、0.1、0.3、1.3 mg • L^{-1}，大黄素 -8-*O*-β-D- 葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素的给药浓度均分别为 0、1.5、4.4、13.3、40、120 mg • L^{-1}），分别孵育 24、72、168 h，以评价何首乌中主要蒽醌类单体成分的肝毒性，结果发现 5 种单体均能明显影响大鼠原代肝微组织的增殖，并且呈现剂量 - 时间正相关趋势；5 种单体对大鼠原代肝微组织肝毒性作用大小依次为大黄素型单蒽酮＞大黄酸＞大黄素＞大黄素 -8-*O*-β-D- 葡萄糖苷＞大黄素甲醚；大黄素型单蒽酮及大黄酸给药 24 h 即表现出较强的肝毒性，且随给药时间延长，毒性作用持续增加，提示两者原形及其代谢产物均为潜在肝毒性物质；而大黄素 -8-*O*-β-D- 葡萄糖苷及大黄素甲醚在给药 168 h 时才逐渐显现毒性作用，提示它们的毒性可能来自其肝内代谢产物。Park 等[22]通过

体外 HepG2 细胞实验对大黄素诱导的毒性进行研究，结果表明，大黄素以剂量依赖性方式诱导 HepG2 细胞的细胞毒性，并上调结合免疫球蛋白（BiP）、C/EBP 同源蛋白（CHOP）、肌醇需求酶 1（IRE1α）、剪接 XBP1、B 细胞淋巴瘤 2（Bcl-2）相关 X 蛋白（Bax）/Bcl-2 的比值和裂解半胱天冬酶 -3 的表达。颜玉静等 [23] 研究了大黄素 -8-*O*-β-D- 葡萄糖苷、单蒽酮、大黄素甲醚给药 14 d 致大鼠的肝损伤作用，结果表明，虽然大鼠的临床症状、体重和肝脏重量未见明显变化，但相较于对照组，三种单体给药组 IL-10 水平均降低，且大黄素甲醚可在一定程度诱导总胆红素（TBIL）升高，提示大黄素甲醚可能具有一定的肝毒性。

另有研究表明，与单用大黄素组相比，LPS 加无毒剂量的大黄素使血浆中 ALT 和 AST 活性显著增加，大黄素联合 LPS 组血浆促炎细胞因子肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、IL-1β 和 IL-6 与大黄素单药组或 LPS 组相比显著增加 [24]。全云云等 [25] 采用斑马鱼模型评价大黄素、大黄酸、大黄素 -1-*O*- 葡萄糖苷、大黄素甲醚 -8-*O*- 葡萄糖苷、芦荟大黄素和芦荟大黄素 -8-*O*- 葡萄糖苷的肝毒性，发现仅芦荟大黄素和芦荟大黄素 -8-*O*- 葡萄糖苷对斑马鱼肝脏有毒性作用，可显著降低其体内转氨酶的含量，升高 TBIL 含量，且斑马鱼肝组织均出现大范围片状坏死，细胞形态发生显著改变。后期进一步研究发现芦荟大黄素是通过 NF-κB 炎症信号通路和 p53 凋亡信号通路，使肝脏部位产生炎症，导致肝细胞凋亡，从而发生损伤 [26]。

2.3 没食子酸类

王婷等 [27] 研究没食子酸重复给药 28 d 致 SD 大鼠肝损伤的作用，结果表明 2000 mg·kg^{-1} 的没食子酸会引起 SD 大鼠的肝损伤，主要表现在肝脏重量增加，肝细胞肥大，血清肝脏指标上升。宋婧等 [28] 发现在一定浓度范围内，没食子酸、大黄素及大黄酸对正常 L02 细胞均具有细胞毒性，这几种成分可能与何首乌的肝毒性相关，且相同浓度下没食子酸的肝毒性大于大黄素和大黄酸。马喆等 [29] 通过高内涵技术推测没食子酸可能是通过线粒体膜电位变化影响细胞凋亡从而导致肝损伤。何首乌各类成肝损伤实验及机制总结见表 1。

表 1 何首乌肝损伤成分实验方式及其机制

Tab 1 Experimental methods and mechanism of liver injury by components of polygonum multiflorum

成分类型	实验方式	损伤机制
二苯乙烯苷类	体外复合细胞实验和体内实验 [15]	提高 THP-1 巨噬细胞的 IL-1β 水平
	体内实验 [16]	通过抑制 PPAR-γ 而诱导免疫特异性肝损伤
	2D、3D 细胞模型 [17]	显著升高细胞凋亡率
	体外实验 [18]	诱导 L02 细胞毒性和凋亡
	体外实验 [19]	促进大黄素的吸收从而诱导肝损伤的产生
	体内实验 [20]	抑制了大黄素氧化代谢的 CYP2C19 和 CYP3A4 途径
蒽醌类	体内实验 [21]	明显影响大鼠原代肝微组织的增殖，且随给药时间延长，毒性作用持续增加
	体外实验 [22]	诱导细胞毒性，并上调 BiP、CHOP、IRE1α、剪接 XBP1、Bax/Bcl-2 的比值和裂解半胱天冬酶 -3 的表达
	体内实验 [23]	降低 IL-10 水平，大黄素甲醚可在一定程度诱导 TBIL 升高
	体外实验 [24]	TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平显著增加，LPS 加无毒剂量的大黄素使血浆 ALT 和 AST 活性显著增加
	体内实验 [25-26]	显著降低其体内转氨酶的含量，升高 TBIL 含量，芦荟大黄素能显著增加 NF-κB 信号通路和 P53 凋亡信号通路中所有靶点基因的 mRNA 表达水平
没食子酸类	体内实验 [27]	没食子酸高剂量组雄性大鼠肝组织内 miR-122 表达下降
	体外实验 [28]	相同浓度下没食子酸对 ALT、MDA、GSH、SOD 及 LDH 变化的影响均大于大黄素和大黄酸
	高内涵技术 [29]	没食子酸可能是通过线粒体膜电位的变化介导细胞凋亡从而导致肝损伤

3 何首乌致肝损伤及其毒理机制

中药致肝损伤的机制主要与代谢酶改变、氧化应激、炎症反应、线粒体损伤、肝细胞异常凋亡等相关 [30]，目前何首乌所致的肝损伤主要有代谢酶改变、肝细胞凋亡、胆汁酸稳态破坏、炎性损伤等（见图 1）。

3.1 代谢酶的改变

研究发现，何首乌所致的肝损伤与某些代谢酶的改变密切相关，如细胞色素 P450（CYP）和 UDP 葡糖醛酸基转移酶（UGT）酶系。Zhang 等 [31] 研究大鼠摄入不同提取部位的何首乌的肝损伤机制，其中药物代谢酶 CYP2A、CYP3A4、CYP2C19、CYP2E1、UGT1A1、UGT1A8 被抑制，从而导致 ALT、AST 升高，引起大鼠肝损伤。Li 等 [32] 研究发现，单纯口服何首乌水提取物时，大鼠血清中的 ALT 和 AST 水平未改变，但大鼠肝脏

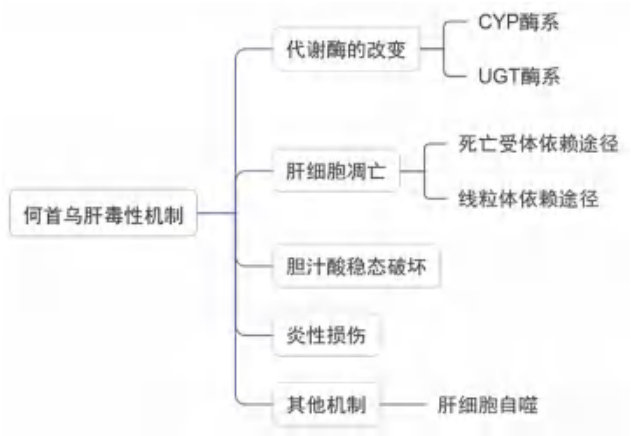


图 1　何首乌肝毒性机制

Fig 1　Mechanism of hepatotoxicity of polygonum multiflorum

中 CYP1A2 或 CYP2E1 的活性受到明显抑制。然而，在注射 CYP1A2 或 CYP2E1 特异性抑制剂联合口服何首乌水提取物后，尤其是间隔重复给药的情况下，ALT 和 AST 水平显著升高，CYP1A2 或 CYP2E1 活性显著降低，肝脏发生中度肝损伤。除人类 *CYP1A2* 基因多态性外，*HLA-B*35*：*01* 等位基因在何首乌诱导肝损伤患者中的频率（45.4%）远高于健康人群（2.7%），证明何首乌诱导肝损伤可能是一种免疫介导的特发性肝损伤 [33]。王呈谕等 [34] 研究了何首乌水提物、芦荟大黄素、大黄素、2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷对人正常肝细胞 L02 中细胞色素氧化酶 CYP2D6 mRNA 表达的影响以及抑制 CYP2D6 活性或表达对何首乌肝细胞毒性的影响，发现在一定浓度下，除大黄素外，何首乌水提物和其他成分都会对 CYP2D6 mRNA 的表达有显著抑制作用，而抑制 CYP2D6 活性或表达会影响有毒成分的代谢，导致其在体内蓄积，造成肝损伤。

汪祺等 [35] 证明何首乌提取物在体内和体外均可抑制 UGT1A1 酶活性，但体内外的抑制方式不同，推测可能与同时存在其他二相代谢反应有关。研究了 3 个体外体系均证明何首乌对 UGT1A1 酶有显著抑制作用，故推断何首乌引发的肝毒性与其对胆红素代谢酶 UGT1A1 的抑制相关，由于何首乌抑制酶活性，导致胆红素代谢降低，继而蓄积引发毒性。并且后续实验通过分子对接和体外大鼠肝微粒体抑制实验验证了大黄素 -8-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、羟基大黄素、大黄素对 UGT1A1 酶介导的胆红素代谢产生较强的抑制作用 [36]。

3.2　肝细胞凋亡

肝细胞作为肝脏中数量最多的细胞类型，其凋亡是肝损伤最突出的表现 [37]。凋亡具有共同的细胞死亡机制，包括死亡受体依赖途径和线粒体依赖途径 [38]。有研究发现，50 μmol • L^{-1} 大黄素在 L02 细胞体系通过抑制线粒体呼吸链复合物的功能，影响氧化磷酸化途径，导致 caspase-3 增加，线粒体膜电位（MMP）降低等，最终导致线粒体凋亡从而引起肝细胞损伤 [39]。在体内实验也有相同的结论，Yang 等 [40] 发现大鼠给予大黄素（1500 mg • kg^{-1}）7 d 后，caspase-9、caspase-3 和 Cyt C 蛋白表达增加，导致线粒体凋亡途径激活，引起肝细胞凋亡。Zheng 等 [41] 使用 L02 细胞体系，对大黄素致细胞凋亡进行研究，大黄素以剂量依赖性方式显著降低磷酸化胞内磷脂酰肌醇激酶（p-PI3K），磷酸化蛋白激酶 B 单克隆抗体（p-AKT）和磷酸化雷帕霉素靶蛋白（p-mTOR）的表达，抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导自噬，导致 L02 细胞凋亡。

3.3　胆汁酸稳态破坏

胆汁酸淤积性损伤为临床使用何首乌最常见的损伤。小鼠口服 1.275 和 3.825 g • kg^{-1} 加工过的何首乌提取液 7 d 后，肝细胞胆汁酸水平下降，参与胆汁酸合成的关键酶 CYP7A1 蛋白表达下调，并且胆汁酸排泄转运蛋白（Bsep）和基底外侧摄取转运蛋白（Ntcp）的 mRNA 表达水平随着何首乌提取液的浓度升高而升高，改变胆汁酸的稳态平衡 [42]。孙萌等 [43] 通过给予小鼠腹腔注射二苯乙烯苷（400 mg • kg^{-1}），研究肝损伤指标和胆汁酸变化，发现二苯乙烯苷可扰乱胆汁酸稳态并抑制磷脂分泌造成肝损伤，表现为血清中肝损伤相关生化指标及疏水胆汁酸含量的增多、胆汁磷脂分泌被抑制、肝组织出现明显炎性细胞浸润，推测其机制可能与其抑制法尼醇 X 受体（FXR）及下游靶点 Bsep 和多药耐药 2（MDR2）表达并破坏 MDR2 在胆管膜的分布有关。

FXR 为核受体超家族配体激活型转录因子，当 FXR 受抑制时，会导致下游靶基因表达发生变化，使得胆汁酸合成酶 CYP7A1 增加，上调胆汁酸摄取转运体，下调胆汁酸外排转运体，一系列反应最终导致胆汁酸稳态被破坏 [44-45]。汪祺等 [46] 通过分子对接和体外实验验证，发现大黄素 -8-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷及芦荟大黄素 -8-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷可能为肝毒性成分，其毒性作用机制为通过抑制 FXR 产生毒性作用，破坏胆汁酸稳态。王涛等 [47] 研究结果显示，口服 30 g • kg^{-1} 或 60 g • kg^{-1} 何首乌提取物 28 d 后，FXR 的 mRNA 和蛋白表达水平受到抑制，导致胆汁淤积，引起肝损伤。

3.4　炎性损伤

炎性损伤被认为是致肝损伤病理生理机制之一，PPAR-γ作为核受体超家族成员参与多种致炎/抗炎的信号传导途径。PPAR-γ通过抑制 NF-κB、信号传导及转录激活蛋白（STAT）等信号通路，从而延缓肝损伤的发生，JAK-STATs 信号的失调与多种肝损伤疾病的发生有关[48]。张银环等[49]研究结果显示，大黄素可显著升高 L02 细胞系的 p-NF-κB 和 IL-6 水平，并呈浓度依赖性地引起炎症损伤。

3.5 其他机制

近年来，肝细胞过度自噬也为何首乌的肝损伤机制提供了进一步的研究方向。黄超文等[50]通过转录组学对 4216 个共同差异表达基因进行 GO 分析和 KEGG 分析，结果提示内吞作用、溶酶体、自噬作用与何首乌引起的肝损伤有关。并且通过体外 L02 肝细胞进行验证，发现何首乌能够通过上调 LC3（自噬标志物）Ⅱ/Ⅰ的比值，下调 P62 表达来增加肝细胞自噬，从而导致肝损伤。

4 何首乌减毒方法研究

4.1 炮制减毒

从古至今何首乌常用炮制方法多为净制、切制和炮炙。常用的炮炙又分为无辅料炮炙（煮制、蒸制、火炮等）和有辅料炮炙（黑豆制、醋制、米制、泔制、酒制、药汁制等）。因何首乌的炮制方法较多且复杂，而现代工业炮制何首乌常用高压蒸制、黑豆制和发酵制法，故本文选用了几种常见的炮制方法总结何首乌炮制减毒的方法。

4.1.1 黑豆制　黑豆制法是何首乌最常见的炮制方法之一，其方法为将净制或切制后的何首乌与黑豆汁进行搅拌，搅拌均匀后放于容器内进行炖制或蒸制，直到颜色为棕褐色，将药物取出、干燥。韦美金[51]基于肝肠转运蛋白及代谢酶的变化研究了黑豆汁制何首乌的减毒作用，结果表明黑豆汁制何首乌的减毒作用机制可能与抑制肝脏中的 P-糖蛋白（P-gp）、多药耐药相关蛋白 3（Mrp3）及空肠中的 Mrp3 表达的上调，肝脏中的 UGT1A1 及肠道中的 Mrp3 的表达下调有关；而大黄素与大豆苷元合用后会抑制肝脏中的 Mrp3 和 UGT1A1 表达上调，提示上述指标可能与黑豆汁制何首乌减毒的作用机制有关。丁平平等[52]对何首乌的九蒸九晒黑豆制炮制品和黑豆炆制炮制品与生品药材的肝毒性进行比较，发现黑豆制炮制品可以有效减少何首乌中的蒽醌苷类成分，并且与何首乌药材相比，制何首乌组、九蒸九晒何首乌组及炆何首乌组的 AST、ALT、乳酸脱氢酶（LDH）、谷氨酰转移酶（GGT）含量明显降低，其肝毒性大小为：何首乌药材＞制何首乌＞九蒸九晒何首乌＞炆何首乌，并呈现明显的量效关系。大鼠灌胃不同蒸晒次数何首乌的水煎液，血清中的 ALT、AST 含量随着蒸晒次数增加先增后减，但与生品相比都具有下降趋势。原因可能为生何首乌中的二苯乙烯苷主要为反式二苯乙烯苷，在炮制过程中不稳定，受加热次数和温度的影响转换为顺式二苯乙烯苷以及与水解成苷元[53]。程燕燕[54]运用不同黑豆制的方法研究了何首乌的有效成分，制品相较于生品中结合蒽醌含量都有所下降，但不同的黑豆制法在不同的炮制时间二苯乙烯苷的含量不同。Han 等[55]运用 UHPLC/Q-Orbitrap-MS 的代谢组学对不同炮制后的何首乌制品其相关性进行比较，黑豆制何首乌是其最佳加工技术工艺。尽管黑豆制法有制备时间较长、无统一的标准的缺点，但是黑豆参与炮制能够增加何首乌温补肝肾、滋养血液的功效[56]，所以黑豆制法依旧是何首乌目前较为常用的方法。

4.1.2 发酵法　发酵法是运用酶和霉菌的催化分解作用进行的一种炮制方法。有研究报道显示发酵后的何首乌中二苯乙烯苷类含量比黑豆制法的含量低，且卵磷脂等成分有所增加，说明发酵法可减少可能的肝毒性成分并保留较多的有效成分[57]。范琼等[58]利用枯草杆菌发酵何首乌，结果发现何首乌生品和发酵品乙醇提取液的 1，1-二苯基 -2- 苦基肼（DPPH）清除率分别为 86.61% 和 96.24%，发酵品不同提取液的 DPPH 清除率均高于生品，且发酵品对亚硝酸盐的清除率也显著高于生品。发酵法虽然有时间较长、不稳定、操作较难等缺点，但其具有去除非可用成分、毒副作用小、吸收利用率高等优点。

4.1.3 其他炮制方法　除上述的两种炮制方法外，何首乌的炮制还包括酒制、米泔水制、大枣制等。刘嘉乐等[59]研究表明黑豆酒制后的游离蒽醌含量较生品含量增加。刘亚蕾等[60]采用不同辅料对何首乌进行炮制，结果发现，针对何首乌生品及不同辅料的炮制品对 L02 细胞系的生长情况和抑制率来看，高压黑豆拌蒸、高压大枣、高压米泔水炮制品有相对较好的减毒效果，其中米泔水炮制减毒效果最佳。另有研究结果显示，高压蒸制相较于传统蒸制其成分变化较大，随着时间的加长，蒽醌、二苯乙烯的含量会逐渐下降，其中游离蒽醌的含量可能逐渐增多[61]。何首乌的炮制方法具有多样性，其中酒制法制备的何首乌口感香甜，有助于消化吸收。然而，酒精成分可能会加重某

些患者的病症；高压蒸制制备的何首乌能够保留较多的活性成分，提高药效，但高温高压处理可能会对药材的气味和口感产生一定的影响[62]。

4.2　配伍减毒

中药配伍作为中国传统的临床应用手法，具有长期的临床实践经验支持，是中国传统中药理论的精华所在。药物之间通过配伍应用，可以降低药物的毒性，增加其功效和临床应用，改善不良反应，从而适应不同的病情，扩大治疗范围。庞晶瑶[63]通过细胞实验验证了生何首乌配伍茯苓的减毒效果，其中生何首乌配伍茯苓降低了生何首乌对正常人肝窦内皮细胞的毒性，从死细胞数占总数的45%降低到了 3%，证明了生何首乌配伍茯苓的减毒效果较好，虽配伍甘草、三七不如茯苓效果好，但相较于何首乌单品仍是具有显著的减毒作用，并呈剂量依赖性。有研究对大鼠的血浆生化指标、细胞因子、RT-qPCR 及肝组织免疫组化的结果进行综合分析，发现生何首乌配伍茯苓能够起到减毒效果，且比例为 1∶2 时减毒效果最佳[64]。Gao 等[65]研究制何首乌配伍茯苓对大鼠肝毒性的影响，通过 UPLC/QTOF-MS 技术发现制何首乌配伍茯苓后会提高精氨酸和脯氨酸代谢，且提高初级胆汁酸生物合成和鞘脂代谢，因此可能是降低何首乌毒性的解毒机制，为茯苓抗何首乌肝损伤提供了依据。梁晓东[66]从还脑益聪方研究何首乌的复方配伍减毒，还脑益聪方中何首乌经复方配伍后二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚含量较何首乌含量显著降低；在小鼠实验验证中，在何首乌给药后 8 周出现肝生化指标异常、肝脏染色显示炎细胞浸润、肝细胞大面积坏死等急性肝损伤反应，而复方给药 24 周才出现肝损伤，且程度较轻。何首乌的配伍减毒相较于炮制减毒来说在临床中的应用更加灵活变通，但是在应用过程中要注意应用不当可能会加重药物毒性或和其他药物配伍加重患者的病情等情况产生。何首乌致肝损伤减毒方法、结论及优缺点如表 2 所示。

表 2　何首乌致肝损伤减毒方法、结论及优缺点

Tab 2　Specific methods and summary of liver injury attenuation by polygonum multiflorum

减毒方法	具体方法	结论	优点	缺点
炮制减毒	黑豆制[51-55]	黑豆制何首乌的减毒作用机制可能与抑制肝脏中的 P-gp、Mrp3 及空肠中的 Mrp3 表达的上调有关 黑豆制炮制品可以有效减少何首乌中的蒽醌苷类成分 制品相较于生品中结合蒽醌含量有所下降	增加功效、用料简单、提升口感	制备时间长，无统一标准
	发酵法[57-58]	发酵后的何首乌中二苯乙烯苷类含量比黑豆制的含量低，且卵磷脂等成分有所增加 发酵品不同提取液的 DPPH 清除率及对亚硝酸盐的清除率均显著高于生品	去除非可用成分、毒副作用小、吸收利用率高	时间较长、不稳定、操作较难
	其他炮制方法[59-61]	黑豆酒制后的游离蒽醌含量较生品含量高 高压黑豆拌蒸、高压大枣、高压米泔水炮制品有相对较好的减毒效果，其中米泔水炮制减毒效果最佳 高压蒸制相较于传统蒸制其成分变化较大，随着时间的加长，蒽醌、二苯乙烯的含量会逐渐下降，其中游离蒽醌的含量可能逐渐增多	提升口感 保留较多的活性成分，提高药效	可能加重某些患者病情 对药材的气味和口感产生一定影响，且设备要求较高
配伍减毒	生何首乌配伍茯苓[63-64]	生何首乌配伍茯苓的减毒效果较好，虽配伍甘草、三七不如茯苓效果好，但相较于何首乌单品仍是具有显著的减毒作用，并呈剂量依赖性	临床应用更加灵活变通	应用不当可能会加重患者的病情
	制何首乌配伍茯苓[65]	制何首乌配伍茯苓后提高精氨酸和脯氨酸代谢且提高了初级胆汁酸生物合成和鞘脂代谢，可能是降低何首乌毒性的解毒机制	同上	同上
	何首乌的复方配伍减毒[66]	复方配伍减毒中，二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚含量较何首乌含量显著降低	同上	同上

5　总结

何首乌是一种传统中药，具有悠久的用药历史，近年来对其不良反应的报道日渐增多，主要表现为肝损伤。为了更好地了解何首乌引起肝损伤的原因，本文阐述了何首乌中二苯乙烯苷类、蒽醌类、没食子酸的潜在肝毒性成分及其作用机制，探讨了何首乌可通过多途径、多靶点、多环节对肝脏系统造成损伤的毒理机制，研究了何首乌的炮制和配伍相关的解毒方法。目前，对何首乌肝毒性机制的研究仍处于不明了的阶段，其潜在毒性成分和作用机制还需要进一步研究。通过研究何首乌致肝损伤的成分、毒性机制和减毒方法，可以全面地了解其何首乌致肝损伤的可能机制，为临床上安全的应用剂量和疗程提供参考，同时也可以为研发更安全的制剂和降低肝毒性提供科学依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：183-184.

[2] 王卓，钟凌云，解杨，等 . 基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物（Q-Marker）的预测分析 [J]. 中草药，2022，53（3）：882-897.

[3] Lin LF，Ni BR，Lin HM，et al. Traditional usages，botany，phytochemistry，pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.：a review [J]. J Ethnopharmacol，2015，159：158-83.

[4] 王婉茹，洪滨，单国顺 . 何首乌肝毒性作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2020，35（2）：378-382.

[5] 中华中医药学会中成药分会，中华中医药学会肝胆病分会，中国药学会临床中药学专业委员会，等 . 何首乌安全用药指南 [J]. 中国中药杂志，2020，45（5）：961-966.

[6] Hao YL，Ma CM，Wu JM，et al. Concurrent severe hepatotoxicity and agranulocytosis induced by *Polygonum multiflorum*：a case report [J]. World J Clin Cases，2022，10（27）：9921-9928.

[7] Zahir Ali BS1，Michael MD，Ryan MMD，et al. Diagnosis and management of drug-induced liver injury after the use of *Polygonum multiflorum* [J]. ACG Case Reports Journal，2022，9（10）：e0088.

[8] Banarova A，Koller T，Payer J. Toxic hepatitis induced by *Polygonum multiflorum* [J]. Vnitr Lek，2012，58（12）：958-962.

[9] 邵艳玲，李倩 . 何首乌致肝损伤 2 例临床护理 [J]. 齐鲁护理杂志，2012，18（22）：111.

[10] Cho HC，Min HJ，Ha CY，et al. Reactivation of pulmonary tuberculosis in a patient with *polygonum multiflorum* Thunb-induced hepatitis [J]. Gut Liver，2009，3（1）：52-56.

[11] 付琪备，刘天晨，雷宇，等 .140 例何首乌及其制剂所致药物性肝损伤的流行病学和临床特征 [J]. 中西医结合肝病杂志，2020，30（1）：6-9.

[12] 常越，刘沁雨，吕成娇，等 . 39 例何首乌致急性药物性肝损伤的临床特点 [J]. 肝脏，2018，23（8）：670-672.

[13] Liu Y，Wang Q，Yang JB，et al. *Polygonum multiflorum* Thunb.：a review on chemical analysis，processing mechanism，quality evaluation，and hepatotoxicity [J]. Front Pharmacol，2018，9：364.

[14] 黄洪，熊万娜，汤小军，等 . 基于网络毒理学和分子对接筛选何首乌致肝毒性成分和 CYP450 抑制剂 [J]. 基因组学与应用生物学，2021，40（Z2）：2863-2873.

[15] 潘韵铮 . 基于 NLRP3 炎症小体的顺式和反式二苯乙烯苷特异质肝损伤评价及机制研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2022.

[16] Meng YK，Li CY，Li RY，et al. Cis-stilbene glucoside in *Polygonum multiflorum* induces immunological idiosyncratic hepatotoxicity in LPS-treated rats by suppressing PPAR-γ [J]. Acta Pharmacol Sin，2017，38（10）：1340-1352.

[17] 颜玉静，淡墨，汪祺，等 . 基于 2D 和 3D 肝细胞模型的何首乌体外肝毒性评价 [J]. 中国药物警戒，2019，16（7）：385-392.

[18] 林艳，肖榕，尹林子，等 . 基于粗糙集理论构建“谱毒”关系研究何首乌特异质肝毒性物质基础 [J]. 中国中药杂志，2019，44（3）：509-517.

[19] Yu Q，Jiang LL，Luo N，et al. Enhanced absorption and inhibited metabolism of emodin by 2，3，5，4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*-β-D-glucopyranoside：possible mechanisms for polygoni multiflori radix-induced liver injury [J]. Chin J Nat Med，2017，15（6）：451-457.

[20] Wang X，Dong LW，Zhao GD，et al. 2，3，5，4'-Tetrahydroxy stilbene-2-*O*-β-D-glucoside，a mechanism-based inactivator of CYP2C19 and CYP3A4，potentiates hepatic protein adduction and hepatotoxicity induced by emodin in vivo [J]. Chem Biol Interact，2022，368：110234.

[21] 汪祺，张茜蕙，文海若，等 . 基于肝微组织考察何首乌主要单体潜在肝毒性 [J]. 中国中药杂志，2020，45（12）：2954-2959.

[22] Park SB，Cho GH，Park YE，et al. Emodin，an emerging mycotoxin，induces endoplasmic reticulum stress-related hepatotoxicity through IRE1α-XBP1 axis in HepG2 cells [J]. Toxins（Basel），2023，15（7）：455.

[23] 颜玉静，文海若，淡墨，等 . 三种何首乌单体成分对大鼠肝损伤作用的研究 [J]. 中国现代中药，2019，21（8）：1054-1061.

[24] Tu C，Gao D，Li XF，et al. Corrigendum：inflammatory stress potentiates emodin-induced liver injury in rats [J]. Front Pharmacol，2021，11：597772.

[25] 全云云，周忆梦，刘美辰，等 . 斑马鱼模型筛选何首乌肝毒性的物质基础 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（6）：52-57.

[26] 全云云 . 基于斑马鱼模型的何首乌肝毒性物质基础及其作用机制研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2019.

[27] 王婷，刘小茜，吴文晓，等 . 没食子酸重复给药 28 天致 SD 大鼠肝损伤的研究 [A]// 中国毒理学会药物毒理与安全性评价学术大会（2019 年）暨粤港澳大湾区生物医药产业第一届高峰论坛论文集 [C]. 2019：198-199.

[28] 宋婧，马致洁，王伽伯，等 . 何首乌及其主要成分对正常人 L02 肝细胞损伤作用的研究 [J]. 北京中医药，2016，35（7）：694-697.

[29] 马喆，赵珺睿，董冉冉，等 . 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药，2016，47（22）：4021-4029.

[30] 刘传梦，方静，王元霞，等 . 中草药相关肝损伤机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2020，38（6）：177-181.

[31] Zhang M，Lin LF，Lin HM，et al. Interpretation the hepatotoxicity based on pharmacokinetics investigated through oral administrated different extraction parts of polygonum multiflorum on rats [J]. Front Pharmacol，2018，9：505.

[32] Li DK，Chen J，Ge ZZ，et al. Hepatotoxicity in rats induced by aqueous extract of polygoni multiflori radix，root of *polygonum multiflorum* related to the activity inhibition of CYP1A2 or CYP2E1 [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2017，2017：9456785.

[33] Li CP，Rao T，Chen XP，et al. HLA-B*35：01 Allele is a potential biomarker for predicting *polygonum multiflo-*

rum-induced liver injury in humans [J]. Hepatology，2019，70（1）：346-357.
[34] 王呈谕，李登科，全正扬，等 . 基于细胞色素氧化酶 CYP2D6 的何首乌肝细胞毒性及相关成分研究 [J]. 中国药物警戒，2021，18（3）：220-227，239.
[35] 汪祺，戴忠，张玉杰，等 . 基于二相代谢酶介导的胆红素代谢考察何首乌体内外肝毒性 [J]. 中国药学杂志，2016，51（22）：1929-1933.
[36] 汪祺，李勇，王亚丹，等 . 基于分子对接和体外大鼠肝微粒体抑制实验综合考察何首乌中潜在肝毒性成分研究 [J]. 药物评价研究，2019，42（4）：635-640.
[37] Malhi H，Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury [J]. Gastroenterology，2008，134（6）：1641-1654.
[38] Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis [J]. Cell Death Dis，2014，5（1）：e996.
[39] Lin LF，Liu YL，Fu S，et al. Inhibition of mitochondrial complex function-the hepatotoxicity mechanism of emodin based on quantitative proteomic analyses [J]. Cells，2019，8（3）：263.
[40] Yang XW，Zhang YH，Liu Y，et al. Emodin induces liver injury by inhibiting the key enzymes of FADH/NADPH transport in rat liver [J]. Toxicol Res（Camb），2018，7（5）：888-896.
[41] Zheng XY，Yang SM，Zhang R，et al. Emodin-induced autophagy against cell apoptosis through the PI3K/AKT/mTOR pathway in human hepatocytes [J]. Drug Des Devel Ther，2019，13：3171-3180.
[42] Wei J，Chen JR，Fu LL，et al. *Polygonum multiflorum* Thunb suppress bile acid synthesis by activating Fxr-Fgf15 signaling in the intestine [J]. J Ethnopharmacol，2019，235：472-480.
[43] 孙萌，俞沁玮，向婷，等 . 二苯乙烯苷扰乱胆汁酸平衡并抑制磷脂分泌诱导肝损伤 [J]. 中国中药杂志，2021，46（1）：139-145.
[44] Gao XG，Fu T，Wang CY，et al. Computational discovery and experimental verification of farnesoid X receptor agonist auraptene to protect against cholestatic liver injury [J]. Biochem Pharmacol，2017，146：127-138.
[45] 刘维伊，孙建国，曹伟灵，等 . 法尼醇 X 受体拮抗剂及药理活性研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2020，25（7）：764-774.
[46] 汪祺，文海若，马双成 . 以法尼醇 X 受体为作用靶点的何首乌中肝毒性成分的筛选 [J]. 中国药物警戒，2022，19（6）：630-634.
[47] 王涛，王佳颖，周植星，等 . 何首乌水提物大鼠连续灌胃给药 28d 肝毒性研究——胆汁淤积相关机制探讨 [J]. 中国中药杂志，2015，40（11）：2163-2167.
[48] 王婉茹，洪滨，单国顺 . 何首乌肝毒性作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2020，35（2）：378-382.
[49] 张银环，杨晓伟，代一航，等 . 大黄素对肝细胞脂质堆积和炎症的影响 [J]. 中国中药杂志，2019，44（13）：2820-2826.
[50] 黄超文，刘艳娟，王璐，等 . 基于转录组学探讨何首乌不同炮制品的肝细胞毒性作用机制 [J]. 湖南中医药大学学报，2023，43（6）：1028-1034.
[51] 韦美金 . 基于肝肠转运蛋白及代谢酶变化的黑豆汁制何首乌减毒作用机制研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2018.
[52] 丁平平，易斌，杨华杰，等 . 炆制对何首乌中蒽醌糖苷类成分的影响及其减毒效应 [J]. 中药新药与临床药理，2022，33（10）：1400-1406.
[53] 周杨静，唐俊峰，高峰，等 . 基于“九蒸九晒”炮制法的何首乌主要化学成分含量变化及对大鼠肝脏的影响实验研究 [J]. 中南药学，2020，18（4）：543-548.
[54] 程燕燕 . 炮制工艺对何首乌成分的影响 [J]. 临床合理用药，2023，16（8）：151-153.
[55] Han LF，Wang P，Wang YL，et al. Rapid discovery of the potential toxic compounds in *polygonum multiflorum* by UHPLC/Q-Orbitrap-MS-based metabolomics and correlation analysis [J]. Front Pharmacol，2019，10：329.
[56] 汪颖舒，尹一鸣，朱广灏，等 . 何首乌炮制方法的历史沿革 [J]. 中医文献杂志，2022，40（4）：46-50，55.
[57] 秦波 . 发酵何首乌与制首乌等质量对比研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2011.
[58] 范琼，赵敏，金明坤 . 何首乌经枯草杆菌发酵后体外生理活性的变化 [J]. 南方农业学报，2019，50（1）：131-136.
[59] 刘嘉乐，马彧，程焱，等 .HPLC 法测定何首乌（黑豆酒炙）饮片中游离蒽醌的含量 [J]. 中国药品标准，2020，21（5）：472-476.
[60] 刘亚蕾，郜丹，李晓菲，等 . 不同辅料对何首乌炮制减毒效果对比研究 [J]. 中草药，2020，51（2）：330-337.
[61] 刘兴朵 . 高压炮制对何首乌中大黄素、大黄素甲醚及二苯乙烯苷含量影响的分析 [J]. 当代医药论丛，2014，12（8）：141.
[62] 李卫先，张琦，王国仁，等 . 高压蒸制不同时间的何首乌质量标准探讨 [J]. 中国医药指南，2012，10（9）：396-397.
[63] 庞晶瑶，李雨萌，柏兆方，等 . 基于高内涵分析的何首乌对肝窦内皮细胞损伤的配伍减毒研究 [J]. 中国现代中药，2015，17（4）：331-334.
[64] 庞晶瑶 . 何首乌辨病用药和配伍减毒的初步研究 [D]. 北京：首都医科大学，2012.
[65] Gao D，Pang JY，Zhang CE，et al. Poria attenuates idiosyncratic liver injury induced by polygoni multiflori radix praeparata [J]. Front Pharmacol，2016，7：386.
[66] 梁晓东 . 何首乌肝毒性物质及复方配伍减毒机制的研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2019.

（收稿日期：2023-11-02；修回日期：2024-01-06）

特拉唑嗪药理学研究进展

李玫[1]，陶彦华[1, 2]，仇念壮[1]，张雨琼[1]，杨武斌[1]，张雪辉[1*]，徐晓燕[1*]（1. 山东第一医科大学药理学研究所，山东 泰安 271016；2. 菏泽市曹县职业教育中等专业学校，山东 菏泽 274400）

摘要：特拉唑嗪是一种新型抗高血压药物，作为哌唑嗪的类似物，具有选择性阻滞突触后 α_1-肾上腺受体的作用，可松弛血管平滑肌，控制血压；与哌唑嗪相比，特拉唑嗪具有降压作用较为缓和，作用时间长且线性量效关系良好的优点。欧美等地区的广泛临床研究表明，特拉唑嗪是一种长效的抗高血压新药，优于哌唑嗪。同时，特拉唑嗪可松弛前列腺和膀胱颈部的肌肉，使小便更顺畅，用于治疗良性前列腺疾病；在神经退行性疾病中（例如帕金森病、肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、多系统萎缩症等），特拉唑嗪能结合并激活磷酸甘油酸激酶 1（PGK1），通过增强 PGK1 活性和促进糖酵解来保护神经元；特拉唑嗪与部分胃肠道疾病、创伤后应激障碍症、多汗症以及脑卒中的治疗也有一定的关系。本文介绍了特拉唑嗪的基本概况、药代动力学特征、临床应用及药理作用，为今后特拉唑嗪的研究提供参考。

关键词：特拉唑嗪；药理学；研究进展；药代动力学
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-1016-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.029

Advances in the pharmacological study of terazosin

LI Mei[1], TAO Yan-hua[1, 2], QIU Nian-zhuang[1], ZHANG Yu-qiong[1], YANG Wu-bin[1], ZHANG Xue-hui[1*], XU Xiao-yan[1*] (1. *Institute of Pharmacology*, *Shandong First Medical University*, *Tai'an Shandong* 271016; 2. *The Vocational and Educational Secondary School in Cao County*, *He'ze Shandong* 274400)

Abstract: Terazosin (TZ) is a novel antihypertensive drug. As an analogue of prazosin, terazosin can selectively block the postsynaptic α_1-adrenal receptor, relax the vascular smooth muscle, and control the blood pressure. Compared with prazosin, terazosin has a more moderate antihypertensive effect with a long action time and a good linear dose-effect relationship. Many studies in Europe and the United States have shown that it is a long-acting new antihypertensive drug, superior to prazosin. At the same time, terazosin can relax the muscles of the prostate and bladder neck, and facilitate urinationsuiable for benign prostate diseases. In neurodegenerative diseases (Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, multisystem atrophy, etc.), terazosin binds and activates PGK1, protects the neurons by enhancing PGK1 activity and promoting glycolysis. Recent studies have linked terazosin to the treatment of some gastrointestinal disorders, post-traumatic stress disorder, hyperhidrosis, and stroke. This paper reviewed the basic situation, pharmacokinetics, clinical application and pharmacological action of terazosin to provide reference for its future research.

Key words: terazosin; pharmacology; research progress; pharmacokinetics

特拉唑嗪（terazosin，TZ）是哌唑嗪的同类物，由美国 Abbot 公司研制，于 1985 年开始应用于临床，是一种突触后 α_1-肾上腺素能受体阻滞剂，因其临床表现良好，1987 年美国 FDA 批

基金项目：泰安市科技发展计划（No. 2018NS0173）。

作者简介：李玫，女，硕士研究生，主要从事神经药理学研究，email：1453068615@qq.com *通信作者：张雪辉，女，讲师，主要从事肿瘤药理学、临床药学研究，email：zhangxuehui@sdfmu.edu.cn；徐晓燕，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事神经药理学、临床药学研究，email：xyxu @sdfmu.edu.cn

准其用于治疗高血压，1992 年美国泌尿学会推荐其为治疗良性前列腺肥大的首选药物，并在日本、英国、丹麦、菲律宾等多国上市使用。目前在我国有片剂和胶囊剂两种，主要用于高血压和前列腺疾病的治疗，随着研究的不断深入，特拉唑嗪被发现可能在神经退行性疾病、胃肠道疾病等的治疗中也有重要作用[1]。除此之外，在创伤性相关噩梦的治疗、选择性 5- 羟色胺再摄取抑制剂（SSRIs）相关多汗症的治疗以及脑卒中的治疗中也有重要意义，不断深入的研究为特拉唑嗪的用药发展提供了多重思路和方向，也为开发新药物提供了新思路和新靶点。

1 特拉唑嗪基本概况

特拉唑嗪，化学名为 1-（4- 氨基 -6，7- 二甲氧基 -2- 喹唑啉基）-4-（四氢呋喃 -2- 甲酰基）哌嗪，分子式为 $C_{19}H_{25}N_5O_4$。特拉唑嗪是一种具有喹唑啉核心的杂环化合物，为白色或类白色结晶性粉末，味微苦，几乎无臭，在水中略溶，在乙醇中微溶。研究显示，特拉唑嗪以糠酸为原料，用氯化亚砜氯化生成糠酰氯，再对哌嗪进行单酰化，单酰化产物还原后与 4- 氨基 -2- 氯 -6，7- 二甲氧基喹唑啉在三乙胺存在下缩合，即得特拉唑嗪，在乙醇中用盐酸酸化可得含两个结晶水的盐酸特拉唑嗪[2-3]。

2 特拉唑嗪的药代动力学特征

健康志愿者口服特拉唑嗪后几乎完全吸收，且生物利用度不受食物影响。给药后 1 ～ 2 h 血浆浓度达到峰值，并在 0.1 ～ 7.5 mg 剂量范围内随剂量增大线性增加。在健康志愿者中，其终末半衰期为 8.9 ～ 12.4 h，全身清除率为 76.3 ～ 86.6 mL•min^{-1}；高血压患者的对应值分别为 11.8 ～ 13.3 h，53.1 ～ 57.4 mL • min^{-1}。大部分药物通过肾外途径排出，特拉唑嗪在肾脏的平均清除量为 10 mL • min^{-1}[4]。特拉唑嗪主要在肝脏代谢为羟基化和葡萄糖苷化的产物。口服剂量≤ 5 mg 时，人体内特拉唑嗪的血浆药物浓度与口服剂量成正比，达峰时间为 1 ～ 2 h[5]。另据文献报道，当健康受试者口服 2 mg 特拉唑嗪后，峰浓度值约为 40 ng • mL^{-1}[6-7]。口服 2.2 μmol 特拉唑嗪后最大血浆非结合浓度为 1.22 nmol•L^{-1}。口服临床剂量的特拉唑嗪，其在 1 ～ 6 h 后的人类前列腺中的 α_1- 肾上腺素受体占有率为 70% ～ 90%，24 h 后为 40% ～ 50%[8]。

3 特拉唑嗪的主要药理作用及临床应用

3.1 前列腺疾病

慢性前列腺炎（chronic prostatitis，CP）是前列腺炎疾病中最高发且最难治疗的类型，占所有前列腺炎的 90% 以上，主要临床表现为下尿路症状、盆腔区域疼痛或不适等。CP 的发病原因、发病机制尚不明确，且疗效不确定、症状易反复，严重影响患者的生活质量及身心健康[9-10]。研究表明，CP 患者多数存在膀胱颈和尿道内压增高的现象，若尿液被感染，反流进入前列腺管，可能加重前列腺炎的症状，因此 CP 也与功能性梗阻有关[11]。α 受体位点存在于体内的诸多组织中，而泌尿系统中的 α 受体位点具有高密度的特点，α 受体阻滞剂可通过改善尿动力参数来达到治疗 CP 目的[12]。Cheah 等[13]试验发现，患者接受的特拉唑嗪剂量从 1 mg•d^{-1} 增加到 5 mg•d^{-1}（43 例，平均年龄 36 岁），治疗 14 周后，慢性前列腺炎指数（NIH-CPSI）评分的降低幅度是接受安慰剂者（43 例，平均年龄 35 岁）的 1.5 倍。接受特拉唑嗪治疗的患者 NIH-CPSI 的平均值降低了 57% [基线时为（25.1±7.1）分，第 14 周时为（10.8±9.0）分，$P < 0.001$]，而安慰剂组降低了 37% [基线时为（27.2±7.7）分，第 14 周时为（17.0±12.1）分，$P < 0.001$]，证明了在治疗 CP 方面特拉唑嗪优于安慰剂。

3.2 心脑血管疾病

3.2.1 高血压 特拉唑嗪为选择性 α_1 受体阻滞剂，可通过降低外周血管阻力，达到降低收缩压和舒张压的效果，效果显著[14]。并且对于同时患有良性前列腺增生的患者，考虑将其作为二级药物来使用[15]。有研究表明，若对自发性高血压大鼠进行特拉唑嗪灌胃给药，给药剂量为 0.1 ～ 30 mg • kg^{-1}，可使大鼠的收缩压显著下降，最大可降低 9.3 ～ 10.7 kPa，且呈剂量依赖性，同时心率并不加快，表明特拉唑嗪具有较强的降压作用且安全[16]，且连续口服特拉唑嗪 5 d，无耐受性发生。有研究选择 36 例Ⅰ或Ⅱ期原发性高血压患者，采用动态血压监测特拉唑嗪的降压疗效。每日 2 ～ 10 mg，一次顿服，治疗 5 周，24 h 平均压及血压负荷值均较用药前明显下降，总有效率为 91%，表明特拉唑嗪在 24 h 内能有效控制血压[17]。特拉唑嗪可以剂量依赖的方式降低高血压患者的血压，从而达到治疗高血压的效果[18]。

3.2.2 左心室肥大（left ventricular hypertrophy，LVH）及血脂 特拉唑嗪对治疗有一定意义，用药后 LVH 指数明显下降，患者血压持续、有效地被控制，而无心率加快等不良影响，心脏负担得到减轻[19]。特拉唑嗪对血脂也有改善作用，有研究表明特拉唑嗪能降低血清总胆固醇（total cholesterol，TC）水平，升高高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol，HDL-C）水平，减少心血管

疾病发生的可能，主要作用机制如下：① 提高低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）受体活性，促进 LDL 的转运与代谢；② 抑制细胞胆固醇合成功能 [20]。动物实验表明，对高脂饮食的家兔采用多沙唑嗪与特拉唑嗪连续治疗 6 周后，家兔体内血糖、TC 水平均明显降低，提示特拉唑嗪可预防心血管疾病的发生 [21]。

3.2.3 脑卒中（cerebral stroke） 脑卒中又称中风，是脑部血管堵塞或破裂导致脑组织缺血缺氧，进而造成脑组织损伤的一种疾病，具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率高的特点 [22]。Chen 等 [23] 测试了特拉唑嗪对大鼠单侧大脑中动脉闭塞（MCAO）模型的影响，结果发现，以较低剂量腹腔注射特拉唑嗪对大鼠脑梗死体积有显著的保护作用。这一结果表明特拉唑嗪在较低剂量时对中风期间的神经细胞有保护作用，能够减轻脑卒中动物模型的器官损伤。

3.3 神经退行性疾病

3.3.1 帕金森病（Parkinson’s disease，PD） PD 是常见的神经退行性疾病，据统计，全球约 600 万人受其影响，且随着年龄的增长发病率进一步增加 [24-25]。PD 患者会出现衰弱的运动症状以及非运动症状，包括痴呆、精神异常、便秘、运动迟缓等 [26-28]。PD 的发病机制尚不明确，许多研究支持活性氧（reactive oxygen species，ROS）诱导的氧化应激，线粒体功能障碍引起的三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）生成障碍与 PD 的发生发展密切相关 [29]。虽然绝大多数 PD 是基于纹状体中多巴胺水平的恢复进行药物治疗，但这种治疗对缓解 PD 的非多巴胺能并发症没有显著效果 [30]，目前各种对 PD 具有潜在疗效的药物正在被开发利用，例如 PGK1 激活剂特拉唑嗪。PGK1 是糖酵解中一个重要的酶，研究显示，PGK1 可以增强糖酵解作用，调控 ATP 和 ROS 的产生，从而保护神经元，因此 PGK1 激活剂可能通过此途径治疗神经退行性疾病 [31]。特拉唑嗪已被证明可以减轻暴露于神经毒素的啮齿动物的神经退化 [32]。在暴露于 1- 甲基 -4- 苯基 1，2，3，6- 四氢吡啶（MPTP）、6- 羟多巴胺（6-OHDA）等神经毒素的小鼠和暴露于鱼藤酮的果蝇中，发现特拉唑嗪可提高 ATP 水平，并改善运动缺陷和异常 [33]。然而，特拉唑嗪仅在较低剂量（0.5 ～ 2.5 μmol•L^{-1}）时激活 PGK1，改善 PD 运动症状 [34]。Simmering 等 [35] 研究发现随着年龄的增加，脑内糖代谢功能受损且线粒体含量减少，导致了 ATP 水平下降，糖酵解与线粒体功能减弱，进而发展为诱发 PD 的潜在因素，实验采用增加能量代谢与 ATP 的疗法来预防 PD 的进一步发展，将特拉唑嗪和与其有相似结构的多沙唑嗪和阿夫唑嗪等 α_1- 肾上腺素能受体阻滞剂进行对照实验，发现特拉唑嗪同样可以通过影响 PGK1 的活性来有效预防 PD 的发展。吴林等 [36] 选取门诊及病房 50 例男性 PD 患者，将其分为观察组与对照组；观察组给予特拉唑嗪 2 mg，对照组给予安慰剂治疗，连续 3 个月后，比较两组帕金森综合评分量表（UPDRS-Ⅲ）评分，结果发现观察组 PD 患者 UPDRS-Ⅲ评分明显低于对照组（$P < 0.05$），证明在治疗 PD 方面特拉唑嗪明显优于安慰剂。另据研究报道，在啮齿类动物身上，腹侧被盖区多巴胺耗尽的小鼠间隔时间变异性增加，模拟了 PD 患者的认知障碍 [37-39]。剥夺腹侧被盖区多巴胺的啮齿动物的间隔时间变异性增加，而特拉唑嗪能够一定程度上挽救间隔时间的变异性。此外，对患者数据库的分析显示，服用特拉唑嗪的 PD 患者与服用坦索罗辛（一种不影响糖酵解的 α_1- 肾上腺素能受体阻滞剂）的 PD 患者相比，服用特拉唑嗪的患者患痴呆症的风险较小 [40]。这些数据共同提供了证据表明特拉唑嗪对 PD 的认知和运动症状有保护作用。

3.3.2 肌萎缩侧索硬化（amyotrophic lateral sclerosis，ALS） ALS 是常见的运动神经元疾病，俗称“渐冻症”，发病率在（2.1 ～ 3.8）/10 万人 [41]。50% 的患者在 3 年内因首次发作而死亡 [42]。目前临床上还没有有效的治疗方案。研究发现来自散发性和家族性 ALS 患者的 i- 运动神经元的 ATP 生成减少 [43]，线粒体 DNA 发生了突变，线粒体的能量代谢缺陷导致了 PGK1 蛋白的减少。为解决 PGK1 表达减少的问题，可通过调节糖酵解来进行改善，这可能是治疗 ALS 患者 i- 运动神经元的 ATP 生成减少的一个具有前景的方向 [44-45]。有研究表明，在 SOD-1G93A 小鼠模型中，PGK1 在星形胶质细胞中下调 [46]；在果蝇中过表达 PGK1 可改善 TDP-43 诱导的 ALS 模型运动缺陷 [47]。Chaytow 等 [48] 研究发现，特拉唑嗪可通过上调糖酵解和拯救应激颗粒的形成等途径来保护运动神经元，其在斑马鱼和小鼠中使用了靶向 ATG 的磷酸二酰胺吗啉基低聚物（MO）来敲低内源性 *C9orf7233* 模型以及突变体 TDP-43 人类序列的过表达 *G348C* 系列核糖核酸这两种 ALS 模型来进行对照实验，发现 PGK1 对于治疗 ALS 有一定的积极效果。这种治疗方案不仅改善了斑马鱼 ALS 模型的运动轴突表型与运动功能，还通过抵抗 NaArO2 诱导细胞死亡，增加小鼠胚胎干细胞衍生

的运动神经元的糖酵解，降低线粒体呼吸和挽救应激颗粒的形成等途径提高了小鼠模型的生存期与存活率，表明了特拉唑嗪对治疗 ALS 有着重大的潜在意义，因此，用特拉唑嗪靶向 PGK1 是一种潜在的治疗 ALS 的方法。

3.3.3 阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）

AD 是老年人群中最常见的痴呆类型，随着全球老年人口的快速增长，其患病率呈上升趋势[49]。AD 的特点是进行性记忆丧失和其他认知能力丧失[50-51]。Yu 等[52]发现在 APP/PS1 双转小鼠中，特拉唑嗪显著减少了 Aβ 沉积，减弱了包括 Tau 蛋白过度磷酸化、胶质激活、神经元丢失、突触功能障碍等在内的下游病理，并改善了行为缺陷。Chen 等[53]对 APP/PS1 双转小鼠的自主行为和社交能力进行了评估，发现在水迷宫实验中，特拉唑嗪治疗大大改善了 APP/PS1 双转小鼠的记忆缺陷；此外，特拉唑嗪对小鼠筑巢行为也表现出改善作用；能量代谢方面，经特拉唑嗪治疗后，脑内 ATP 水平和柠檬酸合酶（citrate synthase，CS）活性均显著升高，皮层和海马区磷酸化 Tau 蛋白的增加显著降低。这些结果表明特拉唑嗪可能通过激活 APP/PS1 双转小鼠的能量代谢和自噬来降低 Tau 蛋白水平并挽救记忆缺陷，改善 AD 症状。

3.3.4 多系统萎缩（multiple system atrophy，MSA）

MSA 是一种成人发病的神经退行性疾病，以不同程度的 PD、小脑性共济失调行为为主[54]。有研究表明，特拉唑嗪给药可以改善 MSA 大鼠模型的工作性能；经特拉唑嗪处理的实验组，大鼠脑内 ATP 水平和 CS 活性显著增加，Western blot 和免疫染色实验发现，实验组大鼠的 α-synuclein 蛋白水平也有所降低[53]。这些结果表明，特拉唑嗪减少了 α-synuclein 在大鼠脑内的积累，对 MSA 有保护作用。有实验发现，在斑马鱼模型中，注射 PGK1 mRNA 或使用特拉唑嗪对其进行治疗，均能改善 SMA 的运动神经元（motor neurons，MN）病理情况，这些结果表明特拉唑嗪作为 PGK1 的激活剂，可通过提高 PGK1 蛋白的含量来治疗 MSA[55]。此前也曾有报道，持续 4 周在饮用水中给予转基因小鼠（一种表现出针对内源性组织 α_{1B}-AR 活性的 MSA 小鼠模型）特拉唑嗪治疗可以改善部分小鼠的运动功能障碍[56]。为了确定这种 α_1-AR 阻滞剂的长期治疗（在症状出现之前）是否具有保护作用，Papay 等[57]在出现症状之前给正常小鼠分别使用特拉唑嗪或正常自来水饲养，同时转基因小鼠也分别使用特拉唑嗪或正常自来水饲养。未使用特拉唑嗪的转基因小鼠比未使用特拉唑嗪的正常小鼠受损更严重。当转基因小鼠被给予特拉唑嗪时，运动水平恢复至与正常小鼠相比没有显著差异。这种运动功能障碍的治疗效果在停止治疗后（44 周龄）仍然持续。这些结果表明长期服用特拉唑嗪可以改善神经退行性小鼠模型的症状和神经元表型，特拉唑嗪能改善转基因小鼠的运动功能缺损、体重减轻和早期死亡情况[57]。

3.4 其他疾病

3.4.1 胃肠道疾病 胃肠道疾病是常见的消化系统疾病，常见症状有恶心呕吐、腹痛腹泻、反流、胃肠出血、发热、吞咽异常、体重下降、易疲倦等[58-59]，尤其是在热带国家，已经是最常见的疾病之一[60]。在胃肠道疾病中，溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）是炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）的一种，是一种免疫介导的慢性肠道疾病，至今病因尚未明确[61-62]。临床上常用的治疗药物包括 5- 氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫抑制剂、生物制剂等，但其疗效有限，且都具有一定的不良反应[63]。有研究表明，对于 UC 小鼠，特拉唑嗪可下调丙二醛（malonaldehyde，MDA）水平，上调超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）水平，具有抗氧化保护作用；同时，特拉唑嗪治疗组可以降低结肠组织和胃组织中的乳酸水平，进一步说明特拉唑嗪可通过激活糖酵解来治疗胃肠道疾病[64]。

3.4.2 创伤后应激障碍（post-traumatic stress disorder，PTSD） PTSD 是一种对创伤等严重应激因素的重度精神反应，由异乎寻常的威胁性事件或灾难性心理创伤引起[65-66]。其中 α_1-AR 阻滞剂被证明有助于促进减轻与创伤后相关的噩梦应激障碍。其中 α_1- 肾上腺素能受体阻滞剂哌唑嗪和特拉唑嗪在治疗创伤噩梦和睡眠障碍 PTSD 方面，有优于其他 α_1-AR 阻滞剂的疗效，特拉唑嗪抗噩梦效应的作用机制尚不清楚，但理论上认为是利用 α_1- 肾上腺素能受体与中枢神经系统突触相结合起阻断作用[67-69]。但也有治疗失败的例子，如对于使用哌唑嗪治疗失败的 4 名患者使用特拉唑嗪进行相关治疗，发现特拉唑嗪在治疗初期有着较为明显的作用，但随着研究的推进，患者出现了严重的药物耐受性，并逐渐失去疗效。所以当哌唑嗪对患者症状无明显效果时，仅可暂时选择使用特拉唑嗪作为哌唑嗪的替代药品进行进一步治疗[70]。目前使用特拉唑嗪治疗 PTSD 的方法并未得到广泛应用，但在现有临床试验结论中，特拉唑嗪有超过 50% 的治疗成功率，因此对于使用特拉唑嗪来治疗 PTSD 的噩梦症状具有一定的医学研究价值[71]。

3.4.3　SSRIs 相关性多汗症　多汗症是指局部或全身皮肤出汗量异常增多的现象。多汗症的原因分为疾病性和功能性失调。临床表现分为全身性多汗症、局部性多汗症 [72]。SSRIs 作为第 3 代抗抑郁药，目前已成为一线用药。临床代表药物有氟西汀（fluoxetine）、帕罗西汀（paroxetine）、舍曲林（sertraline）、西酞普兰（citalo-pram）、氟伏沙明（fluvoxamine）等。SSRIs 的不良反应虽然明显少于三环类抗抑郁药，但是其药物不良反应仍是影响患者生活质量及疗效的重要因素之一。其中，多汗症是 SSRIs 常见的不良反应，发生率在 2% ～ 9%[73]。特拉唑嗪被发现在 SSRIs 相关多汗症中可以起到一定的作用，将根据 DSM-Ⅳ标准诊断为重度抑郁症的服用舍曲林并出汗过多的患者纳入研究，并随机将患者分为接受特拉唑嗪或安慰剂治疗两组。采用多汗症疾病严重程度量表对出汗的严重程度进行分类。在研究开始前和服用特拉唑嗪或安慰剂后 14 d，对患者进行出汗的严重程度进行评估。结果显示，在研究开始时，特拉唑嗪组和安慰剂组中分别有 33 例（48.5%）和 31 例（47%）患者的出汗程度在最高级别。在接受特拉唑嗪治疗后 14 d，特拉唑嗪组和安慰剂组中分别有 46 例（68%）和 2 例（6%）患者的出汗严重程度降至最低级别，表明特拉唑嗪能有效降低使用舍曲林患者的出汗严重程度 [74]。目前在《中国抑郁障碍防治指南》（第二版）中也建议加用 α_1- 肾上腺素能受体阻滞剂（如特拉唑嗪）来治疗 SSRIs 的不良反应。

4　特拉唑嗪的不良反应

特拉唑嗪作为单药或与其他抗高血压药物联合使用时，一般耐受性良好。特拉唑嗪的不良反应一般包括神经系统、心血管系统不良反应，常表现为头痛、眩晕、恶心、心悸、直立性低血压、晕厥、抑郁、精神异常、鼻炎等症状，其中报告的最常见不良事件是头痛和头晕，通常是轻度到中度。在报道中约有 1% 的患者出现晕厥现象，可通过在睡前服用 1 mg 特拉唑嗪，并逐渐增加剂量来避免晕厥现象的出现；也有报道称患者服用后出现过敏反应、关节肿痛等情况。有临床医师表示，运动损伤可能也与特拉唑嗪的应用有关，服用后有出现运动表现下降的状况，因此，有文献警告运动员慎用 [75]。与其他抗高血压药物相比，特拉唑嗪治疗的患者阳痿的发生率要低得多，与安慰剂治疗的患者发生阳痿的程度大致相同 [76]。

5　总结

特拉唑嗪是一种已获批准的药物，具有良好的药代动力学特征，作为 α_1- 肾上腺素能受体阻滞剂，其主要的临床应用还是在心脑血管疾病（尤其是高血压）及前列腺疾病的治疗，但随着研究的不断深入，证明特拉唑嗪可能通过激活 PGK1 或其他机制在神经退行性疾病、胃肠道疾病、PTSD、SSRIs 多汗症、脑卒中等方面也有治疗意义，这为特拉唑嗪的临床应用提供了更广阔的思路，特拉唑嗪或经其改良的药物可能在未来具有更广泛的临床应用价值。

参考文献

[1] Naeem U，Arshad AR，Jawed A，et al. Glycolysis：the next big breakthrough in Parkinson’s disease [J]. Neurotox Res，2022，40（6）：1707-1717.

[2] Kyncl JJ. Pharmacology of terazosin [J]. Am J Med，1986，80（5B）：12-19.

[3] Althuis TH，Hess HJ. Synthesis and identification of the major metabolites of prazosin formed in dog and rat [J]. J Med Chem，1977，20（1）：146-149.

[4] Sonders RC. Pharmacokinetics of terazosin [J]. Am J Med，1986，80（5B）：20-24.

[5] Titmarsh S，Monk JP. Terazosin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties，and therapeutic efficacy in essential hypertension [J]. Drugs，1987，33（5）：461-477.

[6] McNeil JJ，Drummer OH，Raymond K，et al. The influence of food on the oral bioavailability of terazosin [J]. Br J Clin Pharmacol，1991，32（6）：775-776.

[7] Patterson SE. Terazosin kinetics after oral and intravenous doses [J]. Clin Pharmacol Ther，1985，38（4）：423-427.

[8] Yamada S，Kato Y，Okura T，et al. Prediction of alpha1-adrenoceptor occupancy in the human prostate from plasma concentrations of silodosin，tamsulosin and terazosin to treat urinary obstruction in benign prostatic hyperplasia [J]. Biol Pharm Bull，2007，30（7）：1237-1241.

[9] 米华，陈凯，莫曾南 . 中国慢性前列腺炎的流行病学特征 [J]. 中华男科学杂志，2012，18（7）：579-582.

[10] 中华医学会男科学分会，慢性前列腺炎 / 慢性盆腔疼痛综合征诊疗指南编写组 . 慢性前列腺炎 / 慢性盆腔疼痛综合征诊疗指南 [J]. 中华男科学杂志，2022，28（6）：544-559.

[11] Schaeffer AJ. Clinical practice. Chronic prostatitis and the chronic pelvic pain syndrome [J]. N Engl J Med，2006，355（16）：1690-1698.

[12] Lee SW，Liong ML，Yuen KH，et al.Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome：role of alpha blocker therapy [J]. Urol Int，2007，78（2）：97-105.

[13] Cheah PY，Liong ML，Yuen KH，et al. Terazosin therapy for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome：a randomized，placebo controlled trial [J]. J Urol，2003，169：592-596.

[14] Li H，Xu TY，Li Y，et al. Role of α1-blockers in the

current management of hypertension [J]. J Clin Hypertens（Greenwich），2022，24（9）：1180-1186.
[15] Whelton PK，Carey RM，Aronow WS，et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention，Detection，Evaluation，and Management of High Blood Pressure in Adults：Executive Summary：A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines [J]. Hypertension，2018，71（6）：1269-1324.
[16] 郝志刚，刘力，尹立新 . 特拉唑嗪的药效学综述 [J]. 山东医药工业，2000，19（4）：31-32.
[17] 丁振江，刘秀，侯瑞田，等 . 特拉唑嗪治疗原发性高血压的疗效观察 [J]. 高血压杂志，2000，8（4）：342-342.
[18] Hernández Hernández R，Angeli-Greaves M，Carvajal AR，et al. Terazosin：ex vivo and in vitro platelet aggregation effects in patients with arterial hypertension [J]. Am J Hypertens，1996，9（5）：437-444.
[19] Achari R，Laddu A. Terazosin：a new alpha adrenoceptor blocking drug [J]. J Clin Pharmacol，1992，32（6）：520-523.
[20] Deger G. Effect of terazosin on serum lipids [J]. Am J Med，1986，80（5B）：82-85.
[21] 曹雪滨，王荣英，杨梅，等 . 多沙唑嗪及其光学异构体对高脂饮食诱导兔心肌组织损伤和细胞周期改变的干预效果 [J]. 放军医学杂志，2010，35（6）：706-709.
[22] Liu L，Wang D，Wong KS，et al. Stroke and stroke care in China：huge burden，significant workload，and a national priority [J]. Stroke，2011，42（12）：3651-3654.
[23] Chen XP，Zhao CY，Li XL，et al. Terazosin activates Pgk1 and Hsp90 to promote stress resistance [J]. Nat Chem Biol，2015，11（1）：19-25.
[24] GBD 2016 Neurology Collaborators. Global，regional，and national burden of neurological disorders，1990—2016：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet Neurol，2019，18（5）：459-480.
[25] Tysnes OB，Storstein A. Epidemiology of Parkinson’s disease [J]. J Neural Transm（Vienna），2017，124（8）：901-905.
[26] Fahn S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson’s disease [J]. Mov Disord，2008，23（Suppl 3）：S497-S508.
[27] Chaudhuri KR，Odin P. The challenge of non-motor symptoms in Parkinson’s disease [J]. Prog Brain Res，2010，184：325-341.
[28] Wood LD，Neumiller JJ，Setter SM，et al. Clinical review of treatment options for select nonmotor symptoms of Parkinson’s disease [J]. Am J Geriatr Pharmacother，2010，8（4）：294-315.
[29] Sironi L，Restelli LM，Tolnay M，et al. Dysregulated interorganellar crosstalk of mitochondria in the pathogenesis of Parkinson’s disease [J]. Cells，2020，9（1）：233.
[30] Poewe W，Seppi K，Tanner CM，et al. Parkinson disease [J]. Nat Rev Dis Primers，2017，3：17013.
[31] Nie H，Ju HX，Fan JY，et al. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth. Nat Commun，2020，11（1）：36.
[32] Stoker TB，Barker RA. Recent developments in the treatment of Parkinson’s disease [J]. F1000Res，2020，9：F1000 Faculty Rev-862.
[33] Cai R，Zhang Y，Simmering JE，et al. Enhancing glycolysis attenuates Parkinson’s disease progression in models and clinical databases [J]. J Clin Invest，2019，129（10）：4539-4549.
[34] Wang Y，Qian SH，Zhao F，et al. Terazosin analogs targeting PGK1 as neuroprotective agents：design，synthesis，and evaluation [J]. Front Chem，2022，61（10）：906974.
[35] Simmering JE，Welsh MJ，Liu L，et al. Association of glycolysis-enhancing α-1 blockers with risk of developing Parkinson disease [J]. JAMA Neurol，2021，78（4）：407-413.
[36] 吴林，臧静，刘娟，等 . 特拉唑嗪对帕金森病患者运动功能改善情况的临床观察 [J]. 当代医学，2020，26（36）：110-112.
[37] Singh A，Cole RC，Espinoza AI，et al. Timing variability and midfrontal ～ 4 Hz rhythms correlate with cognition in Parkinson’s disease [J]. NPJ Parkinsons Dis，2021，7（1）：14.
[38] Parker KL，Chen KH，Kingyon JR，et al. Medial frontal 4-Hz activity in humans and rodents is attenuated in PD patients and in rodents with cortical dopamine depletion [J]. J Neurophysiol，2015，114（2）：1310-1320.
[39] Buhusi CV，Meck WH. What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing [J]. Nat Rev Neurosci，2005，6（10）：755-765.
[40] Weber MA，Sivakumar K，Tabakovic EE，et al. Glycolysis-enhancing α1-adrenergic antagonists modify cognitive symptoms related to Parkinson’s disease [J]. NPJ Parkinsons Dis，2023，9（1）：32.
[41] van Es MA，Hardiman O，Chio A，et al. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. Lancet，2017，390（10107）：2084-2098.
[42] Longinetti E，Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis：an update of recent literature [J]. Curr Opin Neurol，2019，32（5）：771-776.
[43] Edaravone（MCI-186）ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis：a randomised，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Lancet Neurol，2017，16（7）：505-512.
[44] Wijesekera LC，Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. Orphanet J Rare Dis，2009，4：3.
[45] Ferraiuolo L，Higginbottom A，Heath PR，et al. Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis [J]. Brain，2011，134（Pt 9）：2627-2641.
[46] Manzo E，Lorenzini I，Barrameda D，et al. Glycolysis upregulation is neuroprotective as a compensatory mechanism in ALS [J]. Elife，2019，8：e45114.
[47] Singh T，Jiao Y，Ferrando LM，et al. Neuronal mitochon-

drial dysfunction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis is developmentally regulated [J]. Sci Rep，2021，11（1）：18916.
[48] Chaytow H，Carroll E，Gordon D，et al. Targeting phosphoglycerate kinase 1 with terazosin improves motor neuron phenotypes in multiple models of amyotrophic lateral sclerosis [J]. EBioMedicine，2022，83：104202.
[49] Alzheimer’s Association. 2016 Alzheimer’s disease facts and figures [J]. Alzheimers Dement，2016，12（4）：459-509.
[50] McKhann G，Drachman D，Folstein M，et al. Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease：report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer’s disease [J]. Neurology，1984，34（7）：939-944.
[51] Carrillo MC，Dean RA，Nicolas F，et al. Revisiting the framework of the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association diagnostic criteria [J]. Alzheimers Dement，2013，9（5）：594-601.
[52] Yu ZY，Yi X，Wang YR，et al. Inhibiting α1-adrenergic receptor signaling pathway ameliorates AD-type pathologies and behavioral deficits in APPswe/PS1 mouse model [J]. J Neurochem，2022，161（3）：293-307.
[53] Chen H，Li YJ，Gao JW，et al. Activation of Pgk1 results in reduced protein aggregation in diverse neurodegenerative conditions [J]. Mol Neurobiol，2023，60（9）：5090-5101.
[54] Gilman S，Wenning GK，Low PA，et al. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy [J]. Neurology，2008，71（9）：670-676.
[55] Boyd PJ，Tu WY，Shorrock HK，et al. Bioenergetic status modulates motor neuron vulnerability and pathogenesis in a zebrafish model of spinal muscular atrophy [J]. PLoS Genet，2017，13（4）：e1006744.
[56] Zuscik MJ，Sands S，Ross SA，et al. Overexpression of the alpha1B-adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration：multiple system atrophy [J]. Nat Med，2000，6（12）：1388-1394.
[57] Papay R，Zuscik MJ，Ross SA，et al. Mice expressing the alpha（1B）-adrenergic receptor induces a synucleinopathy with excessive tyrosine nitration but decreased phosphorylation [J]. J Neurochem，2002，83（3）：623-634.
[58] Thrash B，Patel M，Shah KR，et al. Cutaneous manifestations of gastrointestinal disease：part II [J]. J Am Acad Dermatol，2013，68（2）：211.
[59] Zeng L，Wang YF，Tang CW. Gastrointestinal：abdominal actinomycosis：a disease mimicking Crohn’s disease [J]. J Gastroenterol Hepatol，2021，36（2）：300.
[60] M’Koma AE. Inflammatory bowel disease：an expanding global health problem [J]. Clin Med Insights Gastroenterol，2013，6：33-47.
[61] Boeing T，de Souza P，Bonomini TJ，et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of plumieride in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. Biomed Pharmacother，2018，99：697-703.
[62] Cao QH，Gao XH，Lin YT，et al. Thymopentin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by triggering the production of IL-22 in both innate and adaptive lymphocytes [J]. Theranostics，2019，9（25）：7490-7505.
[63] Chiarelli LR，Morera SM，Bianchi P，et al. Molecular insights on pathogenic effects of mutations causing phosphoglycerate kinase deficiency [J]. PLoS One，2012，7（2）：e32065.
[64] Liu JJ，Zhao WY，Li C，et al. Terazosin Stimulates Pgk1 to remedy gastrointestinal disorders [J]. Int J Mol Sci，2021，23（1）：416.
[65] Biedermann F，Fleischhacker WW. Psychotic disorders in DSM-5 and ICD-11 [J]. CNS Spectr，2016，21（4）：349-354.
[66] Brunet A，Akerib V，Birmes P. Don’t throw out the baby with the bathwater（PTSD is not overdiagnosed）[J]. Can J Psychiatry，2007，52（8）：501-503.
[67] Yücel DE，van Emmerik AAP，Souama C，et al. Comparative efficacy of imagery rehearsal therapy and prazosin in the treatment of trauma-related nightmares in adults：a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Sleep Med Rev，2020，50：101248.
[68] Zhang Y，Ren R，Sanford LD，et al. The effects of prazosin on sleep disturbances in post-traumatic stress disorder：a systematic review and meta-analysis [J]. Sleep Med，2020，67：225-231.
[69] Smith C，Koola MM. Evidence for using Doxazosin in the treatment of Posttraumatic Stress disorder [J]. Psychiatr Ann，2016，46（9）：553-555.
[70] Salviati M，Pallagrosi M，Valeriani G，et al. On the role of noradrenergic system in PTSD and related sleep disturbances. The use of terazosin in PTSD related nightmares：a case report [J]. Clin Ter，2013，164（2）：133-137.
[71] Detweiler MB，Pagadala B，Candelario J，et al.Treatment of post-traumatic stress disorder nightmares at a Veterans Affairs medical center [J]. J Clin Med，2016，5（12）：117.
[72] Zuber SM，Kantorovich V，Pacak K. Hypertension in pheochromocytoma：characteristics and treatment [J]. Endocrinol Metab Clin North Am，2011，40（2）：295-311.
[73] 孙钰，郭歆，李焕德. 5-羟色胺再摄取抑制剂（SSRIs）副作用的深入比较 [J]. 中南药学，2007，5（2）：151-156.
[74] Ghaleiha A，Shahidi KM，Afzali S，et al. Effect of terazosin on sweating in patients with major depressive disorder receiving sertraline：a randomized controlled trial [J]. Int J Psychiatry Clin Pract，2013，17（1）：44-47.
[75] Schweiger V，Niederseer D，Schmied C，et al. Athletes and hypertension [J]. Curr Cardiol Rep，2021，23（12）：176.
[76] Sperzel WD，Glassman HN，Jordan DC，et al. Overall safety of terazosin as an antihypertensive agent [J]. Am J Med，1986，80（5B）：77-81.

（收稿日期：2023-09-15；修回日期：2023-12-15）

基于各国监管机构相关技术要求的吸入气雾剂质量控制研究进展

汪敏[1, 2]，房兆营[2, 3]，王雪[2, 3]，刘阿利[1, 2, 3*]（1. 山东中医药大学，济南　250100；2. 鲁南贝特制药有限公司，山东　临沂　276006；3. 药物新制剂研发山东省工程研究中心，山东　临沂　276006）

摘要：吸入气雾剂是一种复杂的药物 - 装置组合产品，广泛用于治疗各种肺部疾病。目前国内外上市的吸入气雾剂品种较少，各国监管机构的质量控制技术要求仍有差别，无法快速开展体外安全性、有效性及质量可控性评价。本文通过文献调研，对比各国监管机构的相关技术要求，对吸入气雾剂的质量研究进行综述，并简要分析存在的问题和挑战，以期为吸入气雾剂的研发提供参考。

关键词：吸入气雾剂；质量控制；技术要求；空气动力学粒径分布

中图分类号：R944.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1023-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.030

Advances in quality control of inhalable aerosols based on technical requirements of regulation agencies worldwide

WANG Min[1, 2], FANG Zhao-ying[2, 3], WANG Xue[2, 3], LIU A-li[1, 2, 3*] (1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, *Jinan*　250100; 2. *Lunan Better Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Linyi Shandong*　276006; 3. *Shandong Engineering Research Center for New Drug Pharmaceuticals Research Development*, *Linyi Shandong*　276006)

Abstract: Inhalation aerosol is a complex drug-device combination product which is utilized extensively for various respiratory conditions. The availability of inhalable aerosols is limited in both domestic and international markets. There are some discrepancies in the quality control technical requirements of regulation agencies in different countries that hindered the efficient conduct of safety, efficacy and quality control in vitro. The article compared the technical requirements established by regulation agencies through literature research, reviewed the quality control research, and briefly analyzed the existing problems and challenges to provide reference for the research and development of inhalable aerosols.

Key words: inhalable aerosol; quality control; technical requirement; aerodynamic particle size distribution

吸入气雾剂系指原料药物或原料药物和附加剂与适宜抛射剂共同封装于具有定量阀门系统和一定压力的耐压容器中，形成溶液、混悬液或乳液，使用时借助抛射剂的压力，将内容物呈雾状物喷出而用于肺部吸入的制剂。与普通口服制剂相比，吸入气雾剂避免了肝脏首过效应，具有生物利用度高、患者依从性好、全身不良反应少等优点[1]，目前广泛用于治疗各种肺部疾病，包括哮喘、慢性阻塞性肺疾病、呼吸道感染以及囊性纤维化等[2]。

质量控制是确保药物有效性和安全性的前提，特别是对于药械组合这类高风险产品，还需要充分研究药物与装置间相互作用带来的影响。由于目前吸入气雾剂上市产品较少，国内外尚无统一的标准用于吸入气雾剂的非临床评价，各国监管机构的质量控制技术要求也存在差异，导致无法快速有效地开展体外安全性、有效性及质量可控性评价[3]。通过文献调研，本文对比分析各国监管机构的相关技术要求，对吸入气雾剂的质

作者简介：汪敏，女，硕士研究生，主要从事化学药物的研发分析工作，email：3090264586@qq.com　*通信作者：刘阿利，女，高级工程师，主要从事化学药物制剂的研发与注册工作，email：liuali0208@163.com

量研究进行综述，并简要分析目前存在的问题和挑战，旨在为吸入气雾剂的研发提供参考。

1　吸入气雾剂质量控制研究的相关技术要求

目前各国监管机构在吸入气雾剂质量控制研究项目和制剂特性要求等方面仍存在差异，见表1。从表中可以看出各国监管机构均要求研究递送剂量均一性、空气动力学粒径分布（APSD）、微生物限度，但在性状、有关物质、喷雾模式、水分、浸出物、含量 / 含量均一性、泄漏率和每瓶总揿次等方面存在差异。例如，美国食品药品监督管理局（FDA）及 USP2023 要求测定喷雾模式，而其他各国监管机构等对此项目并无要求；FDA、欧洲药品管理局（EMA）及 USP2023 中均要求检测浸出物，其他各国药典中并无明确要求。

表 1　各国对吸入气雾剂质量控制研究的相关技术要求

Tab 1　Technical requirements for quality control of inhalable aerosols in various countries

项目	性状	有关物质	递送剂量均一性	APSD	喷雾模式	微生物限度	水分	浸出物	含量	含量均一性	泄漏率	每瓶总揿次
FDA[4]	√	√	√	√	√	√	√	√	√			
EMA[5]	√		√	√		√	√	√	√		√	√
USP2023[6]		√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
EP11.21[7]			√	√		√					√	√
ChP2020[8]	√	√	√	√		√			√		√	√
BP2023[9]			√	√		√					√	√
JP18[10]	√	√	√	√		√	√		√			

注（Note）：√表示要求（√ represents a requirement）。

2　吸入气雾剂质量控制研究

吸入气雾剂的质量研究可以分为制剂内容物特性研究与给药装置相关性能研究两部分。吸入气雾剂与药液相关的质量属性主要有性状、鉴别、含量、水分、有关物质以及微生物限度等。与给药装置相关的性能属性主要有递送剂量和递送剂量均一性、APSD、泄漏率以及喷雾模式等。作为药械组合产品，吸入气雾剂的包材相容性研究也是研发过程中的重要研究项目，主要包括可浸出物和元素杂质研究。

2.1　常规质量属性

吸入气雾剂常规的质量属性包括性状、鉴别、含量、有关物质以及微生物限度等。对于性状的描述应针对不同类型的气雾剂（即混悬型和溶液型）分别进行实验并观察其现象，例如沙丁胺醇吸入气雾剂，ChP2020 中溶液型描述为“含有乙醇的无色至微黄色的澄清液体”；混悬型描述为“白色或类白色混悬液”。对于鉴别实验则是需要对样品进行预处理（在铝盖上钻一小孔，插入注射针头但不与液面接触，待抛射剂气化挥尽后，除去铝盖），然后照紫外 - 可见分光光度法、薄层色谱法或液相色谱法等方法进行测定。

2.2　水分

吸入气雾剂水分含量是质量标准的重要项目指标之一。各监管机构对于水分含量这一检验指标是否纳入质量控制研究中存在一定差异。水分含量的测定方法包括滴定法、重量损失法、甲苯法和气相色谱法等，不同的方法在精密度、特异性、检测范围和操作难度等方面存在差异。目前吸入气雾剂的水分测定通常采用卡尔 - 费休法或者库仑滴定法（主要用于含微量水分的供试品）。对于水分含量的限度，不同处方设计的气雾剂可能有不同的规定，例如吸入气雾剂根据药物是溶解还是分散于溶剂中分为溶液型和混悬型两种，制药企业应根据不同类型的吸入气雾剂设定不同的水分含量限度。特别对于混悬型气雾剂，需要采取更严格的标准，因为混悬型气雾剂水分含量的变化可能导致药物颗粒表面湿润程度的改变，使药物颗粒的分散性和悬浮稳定性变差，进而影响到药物的释放速率和吸入性能[11]。

魏农农等[12]对吸入气雾剂中水分的摄入机制以及水分产生的影响进行了概述，水分侵入气雾剂的过程遵从 Fick 定律，他们认为较高的水分含量可能会引起抛射剂的蒸汽压和药物溶解度降低以及阀门系统密封性和产品稳定性变差等问题，进而影响产品的质量。水分含量过高还可能会增加患者的呼吸道湿度，从而引起咳嗽或其他不适症状。因此，在药物处方筛选以及生产阶段应充分评估水分对产品质量的影响，选用合适的阀门系统，可外加铝箔袋等次级包装，最大程度地避免水分带来的影响。

2.3　递送剂量及递送剂量均一性

递送剂量是指从驱动器接口释放出来的量，多次测定的递送剂量与平均值的差异程度即为递送剂量均一性。递送剂量与递送剂量均一性保证了患者使用过程中吸入剂量的准确性，从而避免了吸入剂量过高或过低造成的用药安全性和有效性问题[13]。递送剂量的取样装置主要有剂量单位取样装置（DUSA）管和改良玻璃漏斗（USP36 首次收录）。魏宁漪等[14]采用上述两种取样装置测定硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂的递送剂量均一性，结果显示

DUSA 管的测定结果较为集中，数据波动较小，更适用。王志军等 [15] 通过采用 DUSA 管法和倒置溶剂法分别测定硫酸沙丁胺醇气雾剂和异丙托溴铵气雾剂的递送剂量（驱动器接口喷出的药量）与每揿主药含量（定量阀中喷出的药量），结果发现递送剂量测定的影响因素较少。为了体现实际进入体内的药量，2020 年我国对气雾剂产品说明书的规定也逐步与国外要求接轨，即上市产品的说明书中，在注明每揿主药含量的同时还应标出递送剂量。

目前国内一般采用 DUSA 管法测定递送剂量均一性，但各国药典关于 DUSA 管法测定的方法以及流速的设定还有区别，见表 2。从表 2 可以看出各国药典对于罐内递送均一性的测定方法基本一致，但在罐间递送均一性的测定方面存在差异，为了更科学地表征产品质量，建议在测定样品时模拟患者使用气雾剂的整个过程，对每罐气雾剂标示揿次的前、中、后三种剂量均进行取样检测，并在取样过程中记录好每揿的重量，降低取样和清洗过程中的误差。

表 2　各国药典测定方法的区别

Tab 2　Differences between test methods in pharmacopoeias

项目	测定装置	测定方法		测定流速 /（L • min^{-1}）	其他
		罐内	罐间		
USP2023	DUSA 管	取 10 罐，分别测标示揿次的首揿和末揿，共 20 个递送剂量	与罐内递送剂量均一性同时测定	28.3（±5%） 30.0（±5%）	有吸入辅助装置的应加上辅助装置后再测
EP11.21	DUSA 管	取 1 罐，分别测标示揿次前（3 个剂量）、中（*n*/2 ＋ 1 揿起 4 个剂量，*n* 为标示总揿次）、后（3 个剂量），共 10 个递送剂量	未说明	28.3（±5%）	对于含有多种活性物质的制剂，需对每种活性物质进行测定
ChP2020	DUSA 管	取 1 罐，分别测标示揿次前（3 个剂量）、中（*n*/2 揿起 4 个剂量，*n* 为标示总揿次）、后（3 个剂量），共 10 个递送剂量	取 10 罐，3 罐测说明书规定的首揿，4 罐测中间（*n*/2）揿次，3 罐测末揿	28.3（±5%）	同 EP11.21
BP2023	DUSA 管	同 EP11.21	同 EP11.21	同 EP11.21	同 EP11.21
JP18	DUSA 管	同 EP11.21	取 10 罐，每一罐对说明书推荐的最小剂量进行采样测定	28.3（±5%）	同 EP11.21

此外，为了更好地模拟患者在使用气雾剂过程中可能出现的情况，FDA 颁布的《定量吸入气雾剂（MDI）和干粉吸入剂（DPI）产品质量控制行业指南》中对一些特定表征项目（如启喷和再启喷、给药装置清洁说明、接近装置耗尽次数的尾喷考察等内容）的目的及方案设计进行了充分说明，见表 3。例如通过模拟患者的使用频率和气雾剂清洁方法，以递送剂量为指标，考察患者在正确使用的情况下，该气雾剂产品是否安全有效。EMA 颁布的《吸入和鼻腔产品药品质量指南》也包含了相关内容的描述。但是与美国 FDA 相比，EMA 并未对相关考察项目的方案设计进行说明。

2.4　APSD

药物吸入效果与药物颗粒可达区域密切相关，药物只有在合适的颗粒大小才能到达支气管的期望部位发挥作用 [16]。大颗粒（直径 5 ～ 10 μm）主要沉积在上呼吸道，小颗粒（直径 1 ～ 5 μm）主要沉积在下呼吸道和肺内，更小的颗粒（直径＜ 1 μm 或直径＜ 0.5 μm）会随呼出的气流排到体外 [17]。

在体外的质量研究中，主要是采用级联撞击器来模拟药物从呼吸道到达肺部各分支的过程，并用 APSD 来表征药物在体内的有效沉积情况。其评价参数主要包括质量中位数空气动力学直径（MMAD）、微细粒子剂量（FPD）以及微细粒子质量分数（FPF）等。随着理论技术的不断创新，近年来又设计出一种新的评价方法——高效的数据分析（EDA），来确定吸入产品形成的气溶胶中的药物粒子大小是否符合预期 [18]。EDA 的原理是从级联撞击器检测的数据中获得大颗粒质量和小颗粒质量的比值以及撞击器粒子质量。以这两个参数大小反映空气动力学平均直径的显著性变化。Mohan 等 [19] 对吸入气雾剂的数据进行分析，结果显示 EDA 在经口吸入制剂质量控制方面优于 FPD，且被建议作为欧洲和美国监管机构对经口吸入制剂 APSD 的一种评价方法。

级联撞击器测定的实验结果重复性很差，其原因在于测定过程中会受到诸多因素的影响，见图 1。

图 1　APSD 测定的影响因素

Fig 1　Influencing factor for APSD determination

① 配方特性：静电作用产生的气溶胶电荷会

表 3　特定表征研究建议 [4]

Tab 3　Specific characterization research recommendations[4]

研究项目	研究目的	研究设计
启喷和再次启喷	验证产品标签中对患者在初次使用装置以及静置后，再次使用需撤压的次数的指令	设计静置时间点（如 0、6、12 h 后），测定产品递送剂量；若样品静置方向（正立、倒立、水平）影响结果也需考虑
混悬型 MDI 存储和摇晃的影响	确认混悬型 MDI 产品标签中摇晃部分的说明有良好的递送性能	设计摇晃后存储时间点，测定产品的递送剂量。若摇晃持续时间和存储方位影响结果也需考虑
清洁说明	确认产品标签上对装置部件（如驱动器）清洁的说明（方法和频率），确保产品在使用期间能维持一定的递送量	模拟患者使用频率和清洁方法，测定产品的递送剂量
接近装置耗尽次数的尾喷考察	确认产品的递送次数，研究当产品在超出规定次数后的递送效果	对已达到标签上的使用次数的产品测定递送剂量，直到撤压后无药物递送

导致药物颗粒在前端的沉积增加，同时影响测定的准确性和重现性 [20]。药物浓度、药物粒径会影响残留颗粒 MMAD；增加助溶剂的浓度或降低助溶剂的蒸汽压会使中间液滴蒸发时间变长，从而导致 FPD 变小 [21-23]。

② 吸入装置：驱动器上喷孔的孔长变长或孔径变大会导致驱动器的残留量降低、L 型连接管沉积量增加、FPD 降低，此现象的产生可能与喷雾喷出的几何形状有关 [24-25]；陈欢等 [26] 以硫酸沙丁胺醇气雾剂为样品，采用新一代撞击器（NGI）对 4 种储雾罐进行体外沉积性质测试，结果显示加装储雾罐后会显著降低药物在咽喉部的沉积量，不同种类储雾罐产生的气溶胶的 FPD 和可吸入药物总量存在差异，产生不同的临床疗效。

③ 环境温湿度：陈洁 [27] 采用 NGI 测试硫酸沙丁胺醇吸入气雾的 APSD，发现较低的环境温湿度会导致进入撞击器的粒径向低级阶段偏移，影响微粒的粒径大小与分布。杨亚如等 [28] 在不同环境湿度条件下，采用 NGI 分别测试溶液型异丙托溴铵吸入气雾剂和混悬型布地奈德气雾剂的 APSD，发现高湿条件下两种类型气雾剂的 FPF 均明显降低。

现有的撞击器种类很多，已有相关文献对各种测定仪器的原理、优缺点及应用情况进行详细的说明 [29-32]。各国药典对于撞击器的收录情况、测定流速以及 FPD 的截止粒径大小还存在差异，但对于已收录仪器的测定流速及各层级截止粒径大小的规定基本一致，见表 4。此外，为确保级联撞击器能够有效地捕获到药物颗粒，国外各药典中还对撞击器的“再次夹带”及“壁损失”试验进行了阐述。例如，采用减少取样剂量和板涂层（甘油、硅油或类似的高黏度液体覆盖在颗粒收集表面）的方式来减少颗粒的再次夹带问题。

表 4　撞击器药典收录情况及 FPD 截止粒径大小

Tab 4　Pharmacopoeia inclusion of impactor and FPD cut-off particle size

药典	装置收录情况及流速 /（L • min $^{-1}$）	FPD 截止粒径
EP11.21	TSLI 60（±5%）、MSLI 30（±5%）、ACI 28.3（±5%）、NGI 30（±5%）	＜ 5 μm
USP2023	ACI 28.3（±5%）、NGI 30（±5%）	未具体说明
ChP2020	TSLI 60（±5%）、ACI 28.3（±5%）、NGI 30（±5%）	未具体说明
JP18	TSLI 30（±5%）、ACI 28.3（±5%）、NGI 30（±5%）	≤ 5 μm
BP2023	同 EP11.21	

注（Note）：双级液体撞击器（twin-stage liquid impactor，TSLI）；多级液体撞击器（multi-stage liquid impactor，MSLI）；安德森多级撞击器（andersen cascade impactor，ACI）；新一代撞击器（nextgeneration impactor，NGI）。

2.5　喷雾模式及喷雾形态

喷雾模式和喷雾形态是衡量气雾剂定量阀和驱动器性能的重要指标。相关人员研究了混悬型气雾剂不同配方和不同驱动器孔径大小差异对喷雾模式的影响，结果显示较小的药物粒径、较高的无水乙醇（助溶剂）以及油酸（表面活性剂）含量都会对喷雾羽化面积和羽流几何角度产生影响 [33-34]。目前高速激光成像是表征喷雾形态的首选技术，但该方法不能模拟吸入气流条件，对喷雾形态边缘的识别具有一定的主观性 [35]。为解决上述限制，Moraga-Espinoza 等 [36] 设计了一种羽流感应端口评估器，该评估器使用药物质量沉积模式来表征喷雾形态，提高了测定的准确性。

目前，对于此项目是否可作为质量控制指标纳入产品开发和稳定性研究中仍有争议，2018 年 4 月，FDA 指南草案《定量吸入气雾剂和干粉吸入剂产品——质量控制》中将喷雾模式列为吸入气雾剂释放测试的典型属性，且在 USP2023 吸入制剂项下提出喷雾模式试验需要采用适当的验证方法和验收标准来确定，且评估的技术参数也是针对不同药品的特性而制定的，包括喷嘴到靶板的喷射距离、同一喷射模式下的喷射次数、靶板

与喷嘴的相对位置和方向以及喷雾的可视化程度等[6]。EMA、澳大利亚治疗产品管理局以及加拿大卫生部等监管部门未将喷雾模式及喷雾形态作为产品开发或质量控制的一部分[37]。ChP2020 虽然没有明确规定，但在国家药品监督管理局药品审评中心（CDE）发布的《经口吸入制剂仿制药生物等效性研究指导原则》中对喷雾模式和喷雾形态的测定提出了建议，即国内企业在进行吸入气雾剂的驱动器（给药装置）孔长、孔径的筛选时，可以增加喷雾模式和喷雾形态这一项目的测定，与其他检测项目结合，更好地反映不同产品间或产品变更前后的雾滴分布情况，降低后续研究工作出现问题的风险[38]。

2.6　泄漏率

泄漏率是体现气雾剂密封性的重要指标，且对每揿主药含量、含量均匀性、喷出药物的粒径密切相关[38]。在一定条件下，药品在有效期内的装量与泄漏率直接相关，有必要对药品的泄漏率进行评估，并制定相应的控制标准[39]。ChP2020 吸入气雾剂项下虽然没有明确将泄漏率定入质量标准，但药典中收载的 4 个吸入气雾剂品种标准项下均包括泄漏率。目前国内外测定方法基本一致，均采用称重法，但在结果的计算方式上有差别，见表 5。USP2023 与 EP11.21 对泄漏率的表示方法不同，主要是由于两者在制定药品管理法规和标准时考虑到的因素不同。美国 FDA 认为长期使用和储存才能真实反映出吸入气雾剂产品的泄漏情况，一个吸入气雾剂产品在生产时没有泄漏，但在长期储存后可能会发生泄漏，因此采用年泄漏率表示。EP11.21 以月泄漏率表示，主要是考虑到吸入气雾剂产品在日常使用中可能会发生泄漏，因此需要更频繁地进行检测和监管。ChP2020 同样以年泄漏率表示，但在 USP2023 的基础上排除了瓶子本身的重量变化对泄漏率计算的干扰，能够更准确地评估气雾剂产品的泄漏情况。

表 5　各国药典泄漏率测定方法的差别

Tab 5　Differences in leakage rate measurement in pharmacopoeia of different countries

项目	检测罐数	测定方法	计算公式
USP2023	12	去除标签，记录时间（最近的 0.5 h）称重记为 W_1；(25.0±2.0) ℃的温度下直立≤ 3 d 再次称重记为 W_2 并记录时间；确定容器被测试的时间 T（h）	365×（24/T）×（W_1 − W_2）(以年泄漏率表示）
EP11.21	适当数量	去除标签，记录时间（最近的 0.5 h）称重记为 W_1；(25.0±2.0) ℃的温度下直立≤ 3 d 再次称重记为 W_2 并记录时间；确定容器被测试的时间 T（h）	[730D/T]×（W_1 − W_2）(D 为保质期，以月为单位，以月泄漏率表示）
ChP2020	12	去除外包装，用乙醇将表面清净，室温直立放置 24 h 称重（W_1），再室温放置 72 h 称重（W_2），置 2 ～ 8 ℃冷却后，迅速在阀上面钻一小孔放置至室温，待抛射剂完全气化挥尽后，将瓶与阀分离，用乙醇洗净，在室温下干燥后称重（W_3）	365×24×（W_1 − W_2）/[72×（W_1 − W_3）]×100%（以年泄漏率表示）
BP2023	同 EP11.21		

2.7　包材相容性研究

吸入气雾剂包装系统包括初级包装和次级包装。目前吸入气雾剂的给药装置与国外产品存在较大差距，阀门等仍以进口产品或进口技术为主，很多吸入气雾剂产品在申报时对给药装置的研究尚不充足。装置材料中的各种添加剂与药液长期接触会浸入药物体系中，给患者的用药安全带来隐患。相关研究人员对吸入气雾剂中可提取物与浸出物的提取及分析方法进行了归纳总结，并指出提取介质的性质尤其是 pH 值和极性的大小对结果有显著影响[40-43]。梅丽等[44]采用电感耦合等离子体串联质谱仪检测了气雾剂中的 24 种元素杂质，结果显示该方法干扰少，适用于元素杂质的检测分析。

包材相容性研究是吸入气雾剂开发过程中关注的重点和难点，但目前各国药典对于吸入气雾剂包材相容性试验的指导和技术要求仍存在一定差异。USP2023 在通则＜ 1664.1 ＞中分别阐述了吸入气雾剂评估阈值的计算方式、试验方法以及结果分析等内容，但没有为特定的剂型制定具体的分析方法和验收标准。EP11.21 和 ChP2020 均只对不同包装材料例如玻璃、金属类以及塑料类等进行分类，并没有直接对吸入气雾剂的可浸出物研究做出明确的规定。

3　吸入气雾剂质量控制的问题和挑战

3.1　体外溶出度试验的挑战

目前各种体外测试只是用于评估吸入制剂的质量，不能预测体内药物的真实沉积情况。通过测定难溶性药物颗粒的溶出度，可以将体外药物沉积数据更好地与药效动力学和药代动力学结果相关联[45]。已有相关文章论述了吸入制剂溶出度研究的方法，阐述了如何为药代动力学建模提供相关参数，为其仿制药的开发提供了新的方向[46-47]。然而，体内药物溶解吸收不仅受到药物本身性质的影响，还受到气道内衬液的组成、气道上皮的通透性以及颗粒清除率等物理因素影响[48]。目前仍

缺乏通用的经口吸入产品溶出度评价方法和监管建议，亟须进一步探索。

3.2 体外粒径分布测定的局限性

级联撞击器不能模拟人体呼吸系统，且 USP 喉管无法模拟真实人体喉部的生理结构，撞击器测定时环境的温湿度也比呼吸道小，导致药物微粒在人体呼吸道内的吸湿性更大，更容易在喉部沉积，从而影响药效并产生一系列不良反应。此外，不同年龄和不同肺部病理的患者在呼吸频率和速度上也有一定的差异 [49]，用真空泵控制一定的流速不能体现出各类患者在用药上的差别。随着年龄变化而发生的解剖学和生理学上的变化会间接影响到药物颗粒沉积的气道段的几何形状，从而影响治疗效果。因此，体外检测手段不能全面表征患者本身的特异性，目前采用级联撞击器测得的 APSD 数据只能用于吸入气雾剂产品质量的控制，不能完全代表药物在肺部真实的沉积情况，也不能对气溶胶颗粒在肺部沉积后的分散、溶解以及吸收等一系列过程进行准确评估。

4 结语

吸入气雾剂是一种可以通过口腔直接送达肺部的给药形式，因其直接作用于呼吸系统而被广泛用于治疗支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病等呼吸系统疾病。随着制剂技术和设备的不断改进，吸入气雾剂质量的研究也得到了越来越多的关注。

在新技术领域，随着纳米技术、材料科学、微电子技术和计算机仿真技术等的发展，新型吸入气雾剂制剂和设备不断涌现。例如，可通过磷脂微球技术（共悬浮递送技术）制备复方吸入气雾剂解决药物递送效率对剂量依赖的问题，通过发明智能化并可远程监控的新型给药装置提高患者依从性。这些技术创新将为吸入气雾剂的质量研究提供更为丰富的研究对象和手段。

在质量评价标准方面，吸入气雾剂质量评价标准的制定也是当前的研究热点，涉及质量评价指标的选取、测试方法的规范、数据分析的标准化等方面。例如，制剂的药物释放度、粒径分布、空气动力学性能、表面形态等指标均应得到充分的考虑。由于吸入气雾剂是药械组合产品，不同吸入气雾剂在处方设计和操作方法上存在很大差别，没有统一的评价方法和标准能满足吸入气雾剂在研发和成品质量控制中的所有要求。基于这一原因，在吸入气雾剂质量研究过程中，制药企业应加强与 CDE 的交流，共同建立科学系统的体外评价体系。总之，吸入气雾剂质量研究是一个复杂且综合性强的领域，需要跨学科的合作，以期在研究对象、技术手段、标准规范等多个方面取得进一步的突破，推进吸入气雾剂的研发和应用。

参考文献

[1] Jaafar MC，Andrieu V，Elaissari A，et al. Assessment methods of inhaled aerosols：technical aspects and applications [J]. Expert Opin Drug Deliv，2009，6（9）：941-959.

[2] 万妮，陈斌，李合，等 . 肺部吸入给药系统的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2021，30（15）：1386-1395.

[3] 翁琳琳，唐黎明，陈桂良 . 吸入给药制剂的质量控制及其安全性研究进展 [J]. 药物分析杂志，2013，33（5）：724-729.

[4] FDA guidance for industry. Metered dose inhaler（MDI）and dry powder inhaler（DPI）products quality considerations guidance for industry [S]. 2018.

[5] EMEA. Guideline on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products [S]. 2006.

[6] The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia，The National Formulary [S]. 2023.

[7] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare（EDQM）. European Pharmacopoeia Eleventh Edition [S]. 2023.

[8] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：12.

[9] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia [S]. 2023.

[10] The Ministry of Health，Labour and Welfare. The Japanese Pharmacopoeia 18th Edition [S]. 2021.

[11] Murata S，Izumi T，Ito H. Effect of the moisture content in aerosol on the spray performance of Stmerin® D hydrofluoroalkane preparations（2）[J]. Chem Pharm Bull，2012，60（5）：593-597.

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

[13] 晏菊姣，李苗，耿颖，等 . 单剂量吸入混悬液剂量均一性抽样方案及评价分析 [J]. 药物分析杂志，2022，42（8）：1465-1471.

[14] 魏宁漪，周颖，陈翠翠，等 . 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂递送剂量测定方法比较 [J]. 中国新药杂志，2018，27（4）：405-408.

[15] 王志军，李慧义，栾瀚森，等 . 定量吸入气雾剂释药剂量与递送剂量的比较 [J]. 中国医药工业杂志，2017，48（2）：243-245.

[16] Tyfa Z，Jóźwik P，Obidowski D，et al. Inhaled drug airflow patterns and particles deposition in the paediatric respiratory tract [J]. Acta Bioeng Biomech，2020，22（2）：101-110.

[17] Darquenne C. Deposition mechanisms [J]. Aerosol Med Pulm Drug Deliv，2020，33（4）：181-185.

[18] Tougas TP，Goodey AP，Hardwell G，et al. A comparison of the performance of efficient data analysis versus fine particle dose as metrics for the quality control of aerodynamic particle size distributions of orally inhaled pharmaceuticals [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2017，18（2）：451-461.

[19] Mohan M，Lee S，Guo C，et al. Evaluation of abbreviated impactor measurements（AIM）and efficient data analysis

（EDA）for dry powder inhalers（DPIs）against the full-resolution next generation impactor（NGI）[J]. AAPS Pharm Sci Tec，2017，18（5）：1585-1594.
[20] Stein SW，Rasmussen J，Walls S，et al. The influence of electrostatic controls on MDI size distribution measurements [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2019，20（5）：170-178.
[21] Chen Y，Young PM，Fletcher DF，et al. The effect of actuator nozzle designs on the electrostatic charge generated in pressurised metered dose inhaler aerosols [J]. Pharm Res，2015，32（4）：1237-1248.
[22] Sheth P，Grimes MR，Stein SW，et al. Impact of droplet evaporation rate on resulting in vitro performance parameters of pressurized metered dose inhalers [J]. Int J Pharm，2017，528（1-2）：360-371.
[23] Bachhav SS，Sheth P，Sandell D，et al. Systematic evaluation of the effect of formulation variables on in vitro performance of mometasone furoate suspension-metered dose inhalers [J]. AAPS J，2021，24（1）：9-15.
[24] 陈保垒，朱俊，卢嘉彤，等 . 驱动器的规格与吸入辅助装置对气雾剂体外沉积性质的影响 [J]. 药学研究，2017，36（5）：272-275.
[25] Kumar R，Mehta P，Shankar KR，et al. Nanotechnology-assisted metered-dose inhalers（MDIs）for high-performance pulmonary drug delivery applications [J]. Pharm Res，2022，39（11）：2831-2855.
[26] 陈欢，付涛涛，王源崧，等 . 不同储雾罐对硫酸沙丁胺醇定量吸入气雾剂体外沉积性质的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19（8）：222-224.
[27] 陈洁 . 探究体外因素对 NGI 测试 pMDI 粒径影响及硫酸沙丁胺醇气雾剂的空气动力学粒径的研究 [D]. 武汉：华中科技大学，2020.
[28] 杨亚如，尚悦，金方 . 影响吸入气雾剂递送剂量及吸入有效性的环境因素研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（20）：1696-1702.
[29] 陈立营，张成飞，李岩峰，等 . 撞击器法评估吸入制剂空气动力学粒径分布的研究进展 [J]. 药物评价研究，2019，42（12）：2332-2336.
[30] David CJ，Patel RB，Mitchell JP，et al. Discriminating ability of abbreviated impactor measurement approach（AIM）to detect changes in mass median aerodynamic diameter（MMAD）of an albuterol/salbutamol pMDI aerosol [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2017，18（8）：3296-3306.
[31] Kumar R，Mehta P，Shankar KR，et al. Nanotechnology-assisted metered-dose inhalers（MDIs）for high-performance pulmonary drug delivery applications [J]. Pharm Res，2022，39（11）：2831-2855.
[32] 高蕾，魏宁漪，周颖，等 . 3 种撞击器测定异丙托溴铵气雾剂体外沉积性质的比较 [J]. 中国新药杂志，2017，26（19）：2319-2323.
[33] Chen Y，Young PM，Murphy S，et al. High-speed laser image analysis of plume angles for pressurised metered dose inhalers：the effect of nozzle geometry [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2017，18（3）：782-789.
[34] 尹晓庆，陈岚，邵奇 . 驱动器对定量吸入气雾剂羽流特征及体外沉积的影响 [J]. 中国药学杂志，2022，57（19）：1651-1659.
[35] Moraga-Espinoza D，Eshaghian E，Smyth HDC. Mass median plume angle：a novel approach to characterize plume geometry in solution based pMDIs [J]. Int J Pharm，2018，543（1-2）：376-385.
[36] Moraga-Espinoza DF，Eshaghian E，Shaver A，et al. Effect of inhalation flow rate on mass-based plume geometry of commercially available suspension pMDIs [J]. The AAPS journal，2018，20（5）：84-96.
[37] Baxter S，Myatt B，Stein S，et al. Spray pattern and plume geometry testing and methodology：an IPAC-RS working group overview [J]. AAPS Pharm Sci Tech，2022，23（5）：145-150.
[38] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 吸入制剂质量控制研究技术指导原则 [S]. 2007.
[39] 胡慧，陈晶晶，王琴，等 . 磷脂包覆技术制备布地奈德吸入气雾剂及体外性质评价 [J]. 中南药学，2023，21（6）：1459-1464.
[40] 肖海文，黄洁瑕，雷春华，等 . 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂与药用气雾剂铝瓶相容性研究 [J]. 中国药业，2021，30（9）：35-38.
[41] 叶晓霞，马娟，金方，等 . 吸入气雾剂多环芳烃浸出物的 GC-MS/MS 测定 [J]. 中国医药工业杂志，2018，49（7）：994-998.
[42] 张叶，宋冬梅，江文明，等 . UPLC 法测定布地奈德吸入气雾剂中 PBT 低聚物的迁移量 [J]. 药物分析杂志，2022，42（5）：809-813.
[43] 马娟，杨永健，张启明，等 . 定量吸入气雾剂中提取物与浸出物的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2014，45（6）：589-595.
[44] 梅丽，叶晓霞，曾祥程，等 . 吸入气雾剂中元素杂质的电感耦合等离子体串联质谱法测定 [J]. 中国医药工业杂志，2015，46（5）：502-507.
[45] Chow MYT，Tai W，Chang RYK，et al. In vitro-in vivo correlation of cascade impactor data for orally inhaled pharmaceutical aerosols [J]. Adv Drug Deliv Rev，2021，177（1）：113952-113961.
[46] Hassoun M，Malmlöf M，Scheibelhofer O，et al. Use of PBPK modeling to evaluate the performance of dissolve it，a biorelevant dissolution assay for orally inhaled drug products [J]. Mol Pharm，2019，16（3）：1245-1254.
[47] Price R，Shur J，Ganley W，et al. Development of an aerosol dose collection apparatus for in vitro dissolution measurements of orally inhaled drug products [J]. AAPS J，2020，22（2）：47-56.
[48] Franek F，Fransson R，Thörn H，et al. Ranking in vitro dissolution of inhaled micronized drug powders including a candidate drug with two different particle sizes [J]. Mol Pharm，2018，15（11）：5319-5326.
[49] 周璇，喻勇，侯曙光 . 经口吸入药物生物等效性研究的科学基础与法规挑战 [J]. 中国医药工业杂志，2021，52（9）：1131-1141.

（收稿日期：2023-09-04；修回日期：2023-12-08）

CDK4/6 抑制剂在 HR$^+$晚期乳腺癌治疗中的耐药机制及进展后治疗策略

王蕾[1]，杨思原[2]，张季[2]，聂建云[2*]（1. 昆明医科大学临床肿瘤学院，昆明 650000；2. 云南省肿瘤医院，昆明医科大学第三附属医院，昆明 650000）

摘要：细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6（CDK4/6）抑制剂联合内分泌治疗已成为激素受体阳性（HR$^+$）、人类表皮生长因子受体 -2 阴性（HER2$^-$）乳腺癌患者的晚期一线及二线标准治疗方案。尽管 CDK4/6 抑制剂可实现有效的疾病控制，但对于晚期乳腺癌患者最终仍会因耐药出现疾病进展。目前 CDK4/6 抑制剂相关耐药机制尚不完全清楚，同时治疗失败后的最佳治疗策略仍是一个亟待解决的问题。本文就 CDK4/6 抑制剂的潜在耐药机制和后续治疗策略的最新研究进展做一综述。

关键词：细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6 抑制剂；乳腺癌；耐药机制；内分泌治疗
中图分类号：R737.9 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-1030-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.031

Mechanism of resistance to CDK4/6 inhibitors in HR$^+$ advanced breast cancer and subsequent treatment strategies

WANG Lei[1], YANG Si-yuan[2], ZHANG Ji[2], NIE Jian-yun[2*] (1. *School of Clinical Oncology*, *Kunming Medical University*, *Kunming* 650000; 2. *Yunnan Cancer Hospital*, *The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University*, *Kunming* 650000)

Abstract: Cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitors plus endocrine therapy have been used as standard first-or second-line treatment for patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer. Although CDK4/6 inhibitors provide excellent control in patients with hormone receptor-positive advanced breast cancer, due to drug resistance cancer progression will eventually occur as treatment proceeds. At present, the resistance mechanism of CDK4/6 inhibitors is not fully understood, and the optimal treatment strategy after failure of CDK4/6 inhibitors remains an urgent problem. This review summarized the potential resistance mechanism and subsequent treatment strategies of CDK4/6 inhibitors.

Key words: cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor; breast cancer; resistance mechanism; endocrine therapy

乳腺癌居女性恶性肿瘤发病率首位，现阶段基于分子分型的综合治疗手段也在逐渐趋于精准化。作为发病率占比最高的激素受体阳性（hormone receptor positive，HR$^+$）、人类表皮生长因子受体 -2 阴性（human epidermal growth factor receptor 2 negative，HER2$^-$）乳腺癌，内分泌治疗（endocrine therapy，ET）已成为此类患者的术后辅助标准治疗方案[1]。但是仍有约 20% 的患者在 5 年的术后辅助治疗期间出现疾病进展，转归晚期患者。随着 CDK4/6（cyclin-dependent kinase 4/6）抑制剂相关临床研究的深入，已有 4 种 CDK4/6 抑制剂帕博西利（palbociclib）、瑞博西利（ribociclib）、阿贝西利（abemaciclib）及达尔西利（dalpiciclib）获批用于临床。对于 HR$^+$晚

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81960479，No.81760480）；云南省科技计划项目（No.2019FA040，No.202201AY070001-153）。
作者简介：王蕾，女，硕士研究生，主要从事乳腺癌诊断治疗研究，email：1841543739@qq.com *通信作者：聂建云，男，博士研究生导师，主要从事乳腺癌诊治整形重建及发病机制研究，email：njyvip@sina.com

期乳腺癌（advanced breast cancer，ABC）患者，CDK4/6 抑制剂已成为标准的晚期一线或二线治疗方案。尽管 CDK4/6 抑制剂疗效良好，但是最终仍然会面临耐药问题，绝大多数晚期乳腺癌患者在接受 CDK4/6 抑制剂治疗后会出现耐药情况，但目前其耐药机制尚不完全明确；而进展后的治疗策略也成为临床中最为关注的问题。本文就 CDK4/6 抑制剂相关耐药机制和进展后治疗策略的研究进展进行综述，以期为临床用药提供参考。

1 CDK4/6 抑制剂的耐药机制

CDK4/6 抑制剂的耐药机制大致可分为两类：细胞周期特异性机制和非细胞周期特异性机制。

1.1 细胞周期特异性机制

1.1.1 细胞周期 G_1 期至 S 期转变中耐药发生相关因子 在细胞周期中，CDK4/6 抑制剂通过与 D 型细胞周期蛋白（cyclin D）结合形成复合体，促使视网膜母细胞瘤（retinoblastoma，Rb）蛋白磷酸化并释放与之结合的转录因子 E2F，E2F 通过调控转录促使细胞由 G_1 期转变为 S 期。因此，Rb 作为 CDK4/6 抑制剂发挥抑制肿瘤细胞生长的关键作用靶点，其缺失可能导致 CDK4/6 耐药的发生。例如，在 *Rb* 基因缺失时，CDK4/6-cyclin D 下游失去作用靶点，细胞可能借助旁路例如 E2F 激活细胞周期推进从而导致了细胞对 CDK4/6 抑制剂耐药 [2]。由 *CCNE1* 基因编码细胞周期蛋白 E（cyclin E）与 CDK2 形成复合体后，此时细胞周期的推动不再依赖于 CDK4/6-cyclin D。当 E2F 及 CDK2 过表达可能导致 cyclin E-CDK2 复合体过度激活并磷酸化 Rb，形成正反馈回路，从而促使 G_1 期转变为 S 期 [3]；在临床前研究及Ⅲ期临床研究中也验证了 *CCNE1* 表达水平与 CDK4/6 疗效的改善有关 [4]。

cyclin-CDK 复合体的形成是驱动细胞周期推进的先决条件，有研究指出，当复合体中 *CDK6* 基因扩增可能导致耐药的发生。有研究在对 CDK4/6 抑制剂耐药的 MCF-7 细胞中观察到了 *CDK6* 表达水平的增加 [5]；而将 *CDK6* 基因进行特异性敲除药物的敏感性即恢复 [6]，其原因可能与 *CDK6* 过表达影响 Rb 磷酸化过程有关。因此，在细胞周期相关性耐药发生的过程中，cyclin-CDK 复合体与 Rb 相关途径均扮演着重要的角色。

此外，有文献指出，cyclin-CDK 复合体、Rb 相关的抑癌基因也参与调控 CDK4/6 抑制剂耐药的发生。*p16* 基因（由 *CDKN2D* 基因编码）作为肿瘤抑制因子，是 INK4 家族的一员。当 *p16* 过表达时，将通过抑制 *CDK4* 活性和降低 cyclin D1 表达而使得 CDK4/6 抑制剂应答减弱，从而导致耐药的发生 [7]。*p21* 作为 Cip/Kip 家族的成员，发挥着抑制周期蛋白依赖性激酶（CDK）和稳定 cyclin-CDK 复合体的双重作用，*P21* 表达降低则可能导致 cyclin-CDK-Rb 通路信号“传递障碍”。组蛋白脱乙酰基酶（histone deacetylase，HDAC）有抑制 *p21* 的作用，而 HDAC 抑制剂可上调 *p21* 的表达，并导致 cyclin-CDK-Rb 通路信号持续激活，与 CDK4/6 抑制剂联用可改善耐药细胞的疗效 [8]。表观遗传修饰在肿瘤中发挥重要作用，组蛋白的乙酰化修饰可能参与了 CDK4/6 抑制剂的耐药过程。例如，HDAC 蛋白 LXCXE 序列可通过招募 Rb 蛋白从而促进组蛋白去乙酰化的发生和下游基因沉默，而乳腺癌中 *HDAC5* 基因缺失或下调通过增加组蛋白 H3 赖氨酸 27 乙酰化（H3K27ac），促使细胞周期相关致癌基因转录增加从而对 CDK4/6 抑制剂耐药 [9]。小鼠双微同源物 2（murine double minute2，MDM2）是负调节 p53 活性的蛋白质。MDM2 可通过形成 MDM2-p53 复合物抑制 *p53* 发挥功能。p53 可以激活天然 CDK4 抑制剂 *p21*，导致细胞周期停滞 [10]。当 MDM2 过度表达时抑制了 *p53* 的周期阻断能力和限制效应，导致 *p53* 对 CDK4/6 抑制剂等细胞周期药物敏感 [11]。

1.1.2 细胞周期 G_2 期至 M 期转变中耐药发生相关因子 WEE1 是丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶中的一员，参与细胞周期的调控，在 G_2/M 期检查点发挥关键作用。WEE1 和 CDK1 协同抑制 DNA 损伤的细胞进入有丝分裂期，而抑制 WEE1 可能导致损伤细胞发生连续复制迫使有丝分裂的持续发生并造成基因组不稳定，最终导致有丝分裂灾难。目前已有报道证实 WEE1 在乳腺癌中高表达，WEE1 过表达可诱导对 CDK4/6 抑制剂的耐药，而耐药细胞株对 WEE1 抑制剂 Adavosertib（AZD1775）表现出敏感性 [12]。另外 MDM2 蛋白与 Rb 蛋白直接作用，MDM2 在 DNA 损伤条件下在 G_2/M 期泛素化并降解 Rb 蛋白促使细胞周期旁路激活，也可能是 CDK4/6 抑制剂耐药的原因 [13]。

1.2 细胞周期非特异性机制

1.2.1 成纤维细胞生长因子受体（fibroblast growth factor receptors，FGFR）信号通路的上调 FGFR 信号通路参与了 HR^+ 乳腺癌的内分泌治疗及 CDK4/6 抑制剂交叉耐药。有研究对耐药前和耐药后的样本进行比较，发现 FGFR/FGF 可通过重编程和激活 MAPK 途径诱导内分泌治疗过程及 CDK4/6 抑制剂耐药性的产生 [14]。FGFR1 的过表达会减弱其对 G_1/S 转换调节因子（Rb 蛋白、E2F1 和 cyclin D3）和促进 G_2/M 转换的因子（cyclin B1、CDC2/CDK1 和 CDC25）的抑制作用，推动细胞周期进展从而介导耐药 [15]。临床前研究也证实，抑

制异常 FGFR 活性能够逆转对 CDK4/6 抑制剂的耐药性[16]。

1.2.2 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的异常激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与肿瘤细胞的生长和转移，在大约 35% 的 $HR^+/HER2^-$ 转移性乳腺癌（metastatic breast cancer，MBC）中发现了 *PI3K* 基因的激活突变，推测 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能是 HR^+ 乳腺癌治疗耐药的关键环节。研究表明 CDK4/6 抑制剂耐药细胞株中，PI3K/AKT/mTOR 通路高度活化，cyclin A、cyclin E 和 cyclin D1 蛋白表达增加，CDK2 磷酸化水平增加，使得肿瘤增殖不再受 CDK4/6 抑制剂控制，从而导致耐药的发生[17]。此外，AKT/mTOR 信号传导途径的负调节剂 *PTEN* 的缺失通过激活 AKT 导致肿瘤细胞对 CDK4/6 抑制剂产生抗性[18]。还有研究发现 *PTEN* 的缺失诱导细胞核 CDK 抑制剂 $p27^{Kip1}$ 的下调，这也会使其对 CDK4/6 抑制剂产生抵抗[19]。

1.2.3 上皮 - 间充质转化（epithelial mesenchymal transition，EMT）和信号传导蛋白 3（Smad3）抑制 CDK4/6 抑制剂通过激活 TGF-β 信号通路，TGF-β 磷酸化并激活 Smad2 和 Smad3，然后与 Smad4 形成复合体，通过激活 EMT 转录因子诱导 EMT 发生使肿瘤细胞逃逸而间接耐药。同时，TGF-β 还通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导 EMT[20-21]。此外，Smad3 作为 TGF-β 信号通路的关键抑制环节，可通过抑制 cyclin E-CDK2 而使细胞周期停滞[22]。

1.2.4 自噬激活 自噬在癌症中有双重作用，在肿瘤发生初期，自噬作为一种生存途径和质量控制机制，可防止肿瘤发生并抑制其进展。然而在肿瘤发展的后期阶段或应激条件下，自噬机制可促进肿瘤进展。在肿瘤细胞抵抗不利环境条件下，细胞周期阻滞介导自噬发生，自噬通过代谢分解降解 ROS，并介导逆转 G_1 期阻滞[23]。CDK4/6 抑制剂通过抑制 cyclin D 激活自噬，逆转 CDK4/6 抑制剂介导的细胞周期停滞[24]，从而参与 CDK4/6 抑制剂的耐药。

1.2.5 免疫逃逸 CDK4/6 抑制剂通过增加 T 细胞活化和促进 T 细胞杀伤肿瘤细胞来增强抗肿瘤免疫。但有研究显示，*NCOR1*、*MUC4* 和 *MUC16* 基因等 T 细胞活化及 T 细胞杀伤相关免疫调控关键基因在帕博西利耐药细胞中突变频率显著增高；进一步的基因组学和转录组学分析表明，由免疫相关基因突变诱导的免疫途径失控将导致 CDK4/6 抑制剂耐药的发生[25]。进一步研究显示 CDK4/6 抑制剂可增加程序性细胞死亡配体 1（PD-L1）的表达，从而诱导炎症微环境并改善肿瘤的免疫原性[26]，说明免疫疗法的加入能降低 CDK4/6 抑制剂的耐药性。

2 CDK4/6 抑制剂的耐药后治疗策略

目前，关于针对使用 CDK4/6 抑制剂治疗进展后患者的治疗方法缺少具有针对性的大型随机临床试验的数据，现有的治疗更多是来源于对有限数量的患者的回顾分析及随机临床试验的亚组分析。因此，对于 CDK4/6 抑制剂治疗进展的后续治疗策略仍缺乏共识，但越来越多的针对性临床试验正在开展，其结果将进一步指导 CDK4/6 抑制剂耐药后的治疗。目前临床考虑治疗方案可分为三类：化疗，转换为其他内分泌治疗＋CDK4/6 抑制剂，联合靶向治疗。

2.1 化疗

有研究表明，在 $HR^+/HER2^-$ 的乳腺癌细胞中，CDK4/6 抑制剂与化疗药物之间没有交叉耐药性[3]。一项多中心分析显示，既往接受帕博西利治疗但反应差的患者中，在换用化疗后其中位无进展生存期（mPFS）仍优于以往治疗反应较佳的患者[27]。换言之，患者既往帕博西利治疗的不敏感提示其从其他 ET 中受益的概率极低。针对在 CDK4/6 抑制剂治疗后疾病进展迅速或伴有症状的内脏疾病或内脏危象的患者，需要快速缓解症状和实现疾病控制，应强烈考虑化疗。

2.2 其他内分泌治疗＋CDK4/6 抑制剂

相较于芳香酶抑制剂（aromatase inhibitor，AI），氟维司群（fulvestrant）作为选择性雌激素受体降解剂（selective estrogen receptor downregulation regulator，SERD），对携带 *ESR1* 突变的肿瘤细胞有较好疗效。在帕博西利与来曲唑或氟维司群联合治疗耐药的患者中也观察到了 *ESR1* 突变的出现，这表明针对 *ESR1* 突变的治疗可能有助于克服 CDK4/6 抑制剂的耐药性[28]。SERENA-1 试验评估了接受过氟维司群或 CDK4/6 抑制剂等治疗后使用 Camizestrant 表现出的良好疗效和剂量依赖的安全性。此外，SERENA-2 的结果也提示了对于使用过 CDK4/6 抑制剂的患者具有肯定疗效，并且转化分析表明 Camizestrant 能显著降低肿瘤循环 DNA 中的 ESR1 突变水平[29]。对于临床实践来说，在进展后继续使用同一或另一种 CDK4/6 抑制剂是否仍然有效是一个非常重要的问题。越来越多的研究正在尝试探索使用 CDK4/6 抑制剂进展后交替使用不同 CDK4/6 抑制剂的可行性。帕博西利治疗进展后继续使用阿贝西利的多中心回顾性分析显示，mPFS 为 5.8 个月[30]。第二阶段 MAINTAIN 研究的结果显示，使用帕博西利进展后，$HR^+/HER2^-$ MBC 患者更换内分泌治疗方案并接受瑞博西利治疗，与单独内分泌治疗相比有

显著的无进展生存期（PFS）获益（5.29 *vs* 2.76 个月）[31]。PACE 试验中 CDK4/6 抑制剂获得性耐药的 $HR^+/HER2^-$ MBC 在单独使用氟维司群和氟维司群＋帕博西利的 PFS 没有差异 [32]。而 BioPER 研究帕博西利治疗失败后继续帕博西利再挑战的临床获益率（CBR）为 34.4%，mPFS 为 2.6 个月，该研究生物标志物分析也提示获益可能是因为选择了没有 *Rb* 缺失、*cyclin E1* 高表达，以及 *ESR1* 突变的患者 [33]。因此，耐药后改用其他内分泌药物联合 CDK4/6 抑制剂也是选择之一。

表 1 已完成的 $HR^+/HER2^-$ MBC CDK 4/6 抑制剂后治疗关键临床试验

Tab 1 Completed pivotal clinical trials of post-CDK 4/6 inhibitors therapy for $HR^+/HER2^-$ MBC

研究类型	研究名称	阶段	研究组和对照组	ORR	CBR	mPFS/ 月	mOS/ 月
CDK4/6 抑制剂进展后继续使用 CDK4/6 抑制剂	MAINTAIN（NCT02632045）	Ⅱ	帕博西利＋内分泌治疗 *vs* 安慰剂＋内分泌治疗	20% *vs* 11%	43% *vs* 25%	5.3 *vs* 2.8	未报告
	PACE（NCT03147287）	Ⅱ	氟维司群单药 *vs* 氟维司群＋帕博西利 / 氟维司群＋帕博西利＋阿维鲁单抗	14% *vs* 18% *vs* 11%	19% *vs* 32% *vs* 35%	4.8 *vs* 4.6 *vs* 8.1	27.5 *vs* 24.6 *vs* 42.5
	BioPER（NCT03184090）	Ⅱ	帕博西利＋内分泌治疗	6%	34%	2.6	23.9
新型 ET	SERENA-2（NCT04214288）	Ⅱ	Camizestrant（75、150、300 mg）*vs* 氟维司群	16% ～ 20% *vs* 12%	49% ～ 51% *vs* 39%	7.2（75 mg）、7.7（150 mg）*vs* 3.7（75 mg）、3.7（150 mg）	未达
PI3K 抑制剂	BYLieve（NCT03056755）	Ⅱ	阿培利司＋氟维司群	17%	45%	7.3	17.3
	SOLAR-1（NCT02437318）	Ⅲ	阿培利司＋氟维司群 *vs* 安慰剂＋氟维司群	35.7% *vs* 16.2%	61.5% *vs* 45.3%	11.0 *vs* 5.7	39.3 *vs* 31.4
mTOR 抑制剂	TRINITI（NCT02732119）	Ⅰ/Ⅱ	依西美坦＋瑞博西利＋依维莫司 *vs* Ⅰ瑞博西利＋依维莫司	8%	41%	5.4	未报告
HDAC 抑制剂	ACE（NCT02482753）	Ⅱ	西达本胺＋依维莫司 *vs* 依维莫司＋安慰剂	18.4% *vs* 9.1%	46.7% *vs* 35.5%	7.4 *vs* 3.8	31.0 *vs* 26.6
BCL-2 抑制剂	VERONICA（NCT03584009）	Ⅱ	维奈克拉＋氟维司群 *vs* 氟维司群	未报告	11.8% *vs* 13.7%	2.69 *vs* 1.94	16.9 *vs* 未达

注：ORR. 客观缓解率；CBR. 临床获益率；mOS. 中位总生存期。

Note：ORR. overall response rate；CBR. clinical benefit rate；mOS. the median overall survival.

2.3 联合靶向治疗

2.3.1 PI3K 抑制剂 PAM 信号通路中对 PI3K 基因的激活突变的抑制一直是乳腺癌关注的焦点。阿培利司（alpelisib）是目前唯一被批准用于治疗肿瘤中携带 *PIK3CA* 突变的 MBC 患者的药物。在 SOLAR-1 试验中，阿培利司＋氟维司群治疗延长了先前接受过内分泌治疗的 *PIK3CA* 突变、$HR^+/HER2^-$ MBC 患者的 PFS[34]。该试验中有少数患者（20 例）接受了 CDK4/6 抑制剂作为先前的治疗，但在这一亚组患者中，联合治疗的 mPFS 为 5.5 个月，而单用氟维司群组为 1.8 个月，表明阿培利司在 CDK4/6 抑制剂耐药情况下的疗效。在使用 CDK4/6 抑制剂加 AI 进展后的 $HR^+/HER2^-$ MBC 中，BYLieve 试验显示了阿培利司＋氟维司群对 *PIK3CA* 突变患者的疗效，121 名患者在中位数为 11.7 个月的随访期中，50.4% 患者在 6 个月内没有疾病进展，mPFS 为 7.3 个月 [35]。此外，氟维司群联合 CDK4/6 抑制剂一线治疗后进展的 *PIK3CA* 突变患者入组 BYLieve 研究的队列 B，并接受阿培利司联合来曲唑作为二线治疗，mPFS 报告为 5.7 个月，6 个月 PFS 率为 46.1%[36]。因此，对于内分泌治疗联合 CDK 4/6 抑制剂一线治疗后出现疾病进展的 *PIK3CA* 突变患者，内分泌治疗联合 PI3K 抑制剂治疗可以成为患者的一种选择。PI3K 抑制剂与 CDK4/6 抑制剂联合应用也显示出协同效应。目前，内分泌治疗、CDK4/6 抑制剂和 PIK3 抑制剂三联组合的几项临床试验正在进行。

2.3.2 mTOR 抑制剂 依维莫司（everolimus）是口服的 mTOR 抑制剂，联合内分泌治疗可提高绝经后女性晚期乳腺癌对 AI 耐药患者的 PFS[37]。目前针对 CDK4/6 抑制剂进展后使用依维莫司与内分泌治疗联合治疗的临床研究正在进行中。一项对 133 名使用帕博西利进展的患者的研究显示，依西美坦＋依维莫司是内分泌治疗的首选，其 mPFS 为 4.9 个月 [38]。另一项回顾性队列研究比较了依维莫司＋依西美坦治疗先前接受过 CDK4/6 抑制剂的患者（17 例）和未接受过 CDK4/6 抑制剂的患者（26 例）的疗效，显示 mPFS（4.2 *vs* 3.6 个月）或 mOS（11.3 *vs* 15.6 个月）没有显著差异 [39]。该研究支持 CDK4/6 抑制剂暴露不会影响依维莫

司加依西美坦的生存结局。所以在 CDK4/6 抑制剂进展后，依维莫司与谨慎选择的内分泌治疗的组合可以是一种有效的治疗选择。TRINITI-1 试验分析了在之前的 CDK4/6 抑制剂之后进展的 $HR^+/HER2^-$ MBC 中瑞博西利＋依西美坦＋依维莫司的组合，24 周的临床获益率达到 41%，超过了预先定义的主要终点阈值（＞ 10%），总体人群的 mPFS 达到 5.7 个月，支持 CDK4/6 抑制剂耐药进展后治疗可考虑联合阻断 CDK4/6 通路和靶向 PI3K/AKT/mTOR 信号通路 [40]。

2.3.3 其他靶向药物 FGFR 是一种新的治疗靶点，多项研究表明 *FGFR* 基因扩增与 CDK4/6 抑制剂＋内分泌治疗的耐药性有关。这种耐药性可以被 FGFR 和 VEGFR 双重抑制剂 lucitanib 逆转 [41]。基于基线 ctDNA 中检测到的分子变化，对 MONALEESA-2 试验的 PFS 进行分析，结果表明，与野生型 *FGFR1* 患者相比，*FGFR1* 扩增患者的 PFS 较短，对于 FGFR 通路改变的乳腺癌应考虑使用内分泌治疗＋ CDK4/6 抑制剂＋ FGFR 抑制剂组合 [41]。在一项Ⅰb 期（NCT03238196）试验中，评估先前 CDK4/6 抑制剂＋内分泌治疗暴露后 *FGFR1-4* 扩增患者使用帕博西利 / 氟维司群和厄达替尼（erdafitinib，泛 FGFR 抑制剂）治疗，结果提示有效且安全性可控 [42]。

另一类有望逆转乳腺癌内分泌耐药的药物是表观遗传调节剂组蛋白去乙酰酶抑制剂。西达本胺（tucidinostat，苯酰胺类 HDAC 亚型选择性抑制剂）获批用于乳腺癌，这主要源于一项Ⅲ期 ACE 研究，在内分泌抵抗的 $HR^+/HER2^-$ MBC 患者中，采用依西美坦加入西达本胺治疗，与安慰剂相比，能显著改善 PFS（7.4 *vs* 3.8 个月）[43]；一项验证西达本胺安全性和有效性的真实世界研究，纳入既往 CDK4/6 抑制剂、mTOR 抑制剂治疗失败的患者，结果阶段性数据证实西达本胺＋氟维司群 /AI 治疗安全有效，mPFS 达到 6.4 个月，其生存获益数据与国外研究中换用另一种 CDK4/6 抑制剂的获益数据相当，充分展现了西达本胺在 CDK4/6 抑制剂治疗失败的中国患者后线治疗中的显著优势。

目前单一药物的免疫治疗在 $HR^+/HER2^-$ ABC 的使用并不常见，但 CDK4/6 抑制剂联合免疫治疗用于 CDK4/6 抑制剂进展的患者正在研究中。临床前数据显示 CDK4/6 抑制剂与免疫检查点抑制剂联合使用时，阿贝西利在体内联合 PD-1 阻断，可提高肿瘤免疫治疗效果 [26]。一项Ⅰb 期（JPCE）临床试验显示，在接受内分泌治疗和化疗发生转移后 CDK4/6 抑制剂初治的 $HR^+/HER2^-$ ABC 患者中，连续服用阿贝西利和帕博利珠单抗的安全性可控 [44]。在 CDK4/6 抑制剂耐药的疾病中，新的免疫治疗组合是必要并且可预见的，相关临床试验正在进行中。

目前正在临床开发的 CDK4/6 抑制剂进展后患者的其他策略包括使用 BCL-2 抑制剂，细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂等。维奈克拉（venetoclax）是一种口服 BCL-2 抑制剂在与他莫昔芬联合应用于 $HR^+/HER2^-$ MBC 伴 *BCL2* 过表达患者的Ⅰb 期临床试验中显示出有希望的结果，但 VERONICA 2 期临床试验显示在内分泌治疗中加入维奈克拉并不能改善 $HR^+/HER2^-$、局部晚期 / 晚期乳腺癌患者的临床获益 [45]。选择性 CDK7 抑制剂 THZ1 和 SY-1365 对帕博西利敏感和耐药细胞株均有效。CDK7 抑制剂的开发已经获得了一定的进展，两款抑制剂 CT7001 和 SY-1365 已经进入临床研究阶段。CDK2 已被确定为克服 CDK4/6 抑制剂耐药的另一个靶点。

3 总结和展望

CDK4/6 抑制剂的开发是 HR^+ 乳腺癌治疗进程的重大突破。然而，在实际诊疗过程中，对 CDK4/6 抑制剂的耐药性是一个不可避免的问题。据目前研究来看，CDK4/6 抑制剂联合内分泌治疗出现耐药的机制尚未完全研究清楚，随着基因测序技术的逐渐深入，后续研究可进一步揭示基因组、转录组等改变和疾病进展之间的相关性，提出更为精准的治疗方案。目前 CDK4/6 抑制剂进展后的治疗仍在探索阶段，包括化疗，使用不同的内分泌治疗主干和添加或不添加第三种靶向药物，继续使用 CDK4/6 抑制剂似乎也是有获益的选择，在各种选择的最佳顺序方面没有既定的指导方针。然而，由于基线治疗背景的差异与现有数据的不均一化，虽然能使更多的患者受益，但仍有部分的患者难以承受治疗叠加的严重不良反应。因此，尝试探索早期获益人群，充分筛选治疗敏感药物，依据患者的具体情况进行个性化评估，或许将为更多患者带来治疗获益。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 . 乳腺癌诊疗指南（2022 年版）[J]. 中国合理用药探索，2022，19（10）：1-26.

[2] Malumbres M，Sotillo R，Santamaría D，et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases CDK4 and CDK6 [J]. Cell，2004，118（4）：493-504.

[3] Guarducci C，Bonechi M，Boccalini G，et al. Mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer and potential biomarkers of response [J]. Breast Care（Basel），2017，12（5）：304-308.

[4] Turner NC，Liu Y，Zhu Z，et al. Cyclin E1 expression and palbociclib efficacy in previously treated hormone receptor-positive metastatic breast cancer [J]. J Clin Oncol，2019，37（14）：1169-1178.
[5] Ogata R，Kishino E，Saitoh W，et al. Resistance to cyclin-dependent kinase（CDK）4/6 inhibitors confers cross-resistance to other CDK inhibitors but not to chemotherapeutic agents in breast cancer cells [J]. Breast Cancer，2021，28（1）：206-215.
[6] Yang C，Li Z，Bhatt T，et al. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence [J]. Oncogene，2017，36（16）：2255-2264.
[7] Jiao Y，Feng Y，Wang XL. Regulation of tumor suppressor gene CDKN2A and encoded p16-INK4a protein by covalent modifications [J]. Biochemistry（Mosc），2018，83（11）：1289-1298.
[8] Lee J，Lim B，Pearson T，et al. Abstract P5-21-15：the synergistic anti-tumor activity of entinostat（MS-275）in combination with palbociclib（PD 0332991）in estrogen receptor-positive and triple-negative breast cancer [J]. Cancer Res，2018，78（4_Supplement）：5-21.
[9] Zhou YK，Jin X，Ma J，et al. HDAC5 loss impairs RB repression of pro-oncogenic genes and confers CDK4/6 inhibitor resistance in cancer [J]. Cancer Res，2021，81（6）：1486-1499.
[10] Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation：overlapping and independent activities of p53 and p21Cip1/WAF1/Sdi1 [J]. J Pathol，1997，183（2）：134-140.
[11] Portman N，Chen J，Lim E. MDM2 as a rational target for intervention in CDK4/6 inhibitor resistant，hormone receptor positive breast cancer [J]. Front Oncol，2021，11：777867.
[12] Francis AM，Alexander A，Liu YN，et al. CDK4/6 inhibitors sensitize Rb-positive sarcoma cells to wee1 kinase inhibition through reversible cell-cycle arrest [J]. Mol Cancer Ther，2017，16（9）：1751-1764.
[13] Hernandez-Monge J，Martínez-Sánchez M，Rousset-Roman A，et al. MDM2 regulates Rb levels during genotoxic stress [J]. EMBO Rep，2021，22（1）：e50615.
[14] Mao PP，Cohen O，Kowalski K，et al. Acquired FGFR and FGF alterations confer resistance to estrogen receptor（ER）targeted therapy in ER $^{+}$ metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res，2020，26（22）：5974-5989.
[15] Cheng Q，Ma ZK，Shi YJ，et al. FGFR1 overexpression induces cancer cell stemness and enhanced Akt/Erk-ER signaling to promote palbociclib resistance in luminal A breast cancer cells [J]. Cells，2021，10（11）：3008.
[16] Sobhani N，Fassl A，Mondani G，et al. Targeting aberrant FGFR signaling to overcome CDK4/6 inhibitor resistance in breast cancer [J]. Cells，2021，10（2）：293.
[17] Jansen VM，Bhola NE，Bauer JA，et al. Kinome-wide RNA interference screen reveals a role for PDK1 in acquired resistance to CDK4/6 inhibition in ER-positive breast cancer [J]. Cancer Res，2017，77（9）：2488-2499.
[18] Costa C，Wang Y，Ly A，et al. PTEN loss mediates clinical cross-resistance to CDK4/6 and PI3Kα inhibitors in breast cancer [J]. Cancer Discov，2020，10（1）：72-85.
[19] Bencivenga D，Caldarelli I，Stampone E，et al. p27Kip1 and human cancers：a reappraisal of a still enigmatic protein [J]. Cancer Lett，2017，403：354-365.
[20] Dongre A，Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2019，20（2）：69-84.
[21] Lin YT，Wu KJ. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition：focusing on hypoxia and TGF-β signaling [J]. J Biomed Sci，2020，27（1）：1-10.
[22] Decker JT，Ma JA，Ma LD，et al. Implications of TGFβ Signaling and CDK inhibition for the treatment of breast cancer [J]. Cancers（Basel），2021，13（21）：5343.
[23] 陈剑，曾艳，高子正，等. 自噬在抗肿瘤药物毒性中的作用与机制研究进展 [J]. 药学进展，2022，46（12）：937-950.
[24] Vijayaraghavan S，Karakas C，Doostan I，et al. CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin E negative cancers [J]. Nat Commun，2017，8（1）：15916.
[25] Pandey K，Lee E，Park N，et al. Deregulated immune pathway associated with palbociclib resistance in preclinical breast cancer models：integrative genomics and transcriptomics [J]. Genes（Basel），2021，12（2）：159.
[26] Schaer DA，Beckmann RP，Dempsey JA，et al. The CDK4/6 inhibitor abemaciclib induces a T cell inflamed tumor microenvironment and enhances the efficacy of PD-L1 checkpoint blockade [J]. Cell Rep，2018，22（11）：2978-2994.
[27] Li Y，Li W，Gong CC，et al. A multicenter analysis of treatment patterns and clinical outcomes of subsequent therapies after progression on palbociclib in HR $^{+}$/HER2 $^{-}$ metastatic breast cancer [J]. Ther Adv Med Oncol，2021，13：17588359211022890.
[28] Bidard FC，Hardy-Bessard AC，Dalenc F，et al. Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy（PADA-1）：a randomised，open-label，multicentre，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2022，23（11）：1367-1377.
[29] Wong NZH，Yap DWT，Ong RJM，et al. Efficacy of oral SERDs in the treatment of ER $^{+}$，HER2 $^{-}$ metastatic breast cancer，a stratified analysis of the ESR1 wild type and mutant subgroups [J]. Ann Oncol，2023，21：S0923-7534（23）04328-4.
[30] Wander SA，Zangardi M，Niemierko A，et al. A multicenter analysis of abemaciclib after progression on palbociclib in patients（pts）with hormone receptor-positive

（HR$^+$）/HER2$^-$ metastatic breast cancer（MBC）[J]. J Clin Oncol，2019，37（15 suppl）：1057-1057.

[31] Kalinsky K，Accordino MK，Chiuzan C，et al. Randomized phase Ⅱ trial of endocrine therapy with or without ribociclib after progression on cyclin-dependent kinase 4/6 inhibition in hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer：MAINTAIN trial [J]. J Clin Oncol，2023，22：2392.

[32] Mayer EL，Wander SA，Regan MM，et al. Palbociclib after CDK and endocrine therapy（PACE）：a randomized phase Ⅱ study of fulvestrant，palbociclib，and avelumab for endocrine pre-treated ER$^+$/HER2$^-$ metastatic breast cancer [J]. J Clin Oncol，2018，36（15_suppl）：TPS1104.

[33] Albanell J，Pérez-García JM，Gil-Gil M，et al. Palbociclib rechallenge for hormone receptor-positive/HER-negative advanced breast cancer：findings from the phase Ⅱ BioPER trial [J]. Clin Cancer Res，2023，29（1）：67-80.

[34] André F，Ciruelos EM，Juric D，et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated，hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer：final overall survival results from SOLAR-1 [J]. Ann Oncol，2021，32（2）：208-217.

[35] Rugo HS，Lerebours F，Ciruelos E，et al. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-mutated，hormone receptor-positive advanced breast cancer after a CDK4/6 inhibitor（BYLieve）：one cohort of a phase 2，multicentre，open-label，non-comparative study [J]. Lancet Oncol，2021，22（4）：489-498.

[36] Alpelisib plus letrozole shows promise after CDK 4/6 inhibitor therapy in PIK3CA-Mutated HR$^+$/HER2$^-$ advanced breast cancer [J]. Oncologist，2021，26（Suppl 2）：S15-S16.

[37] 宋高锋 . 依维莫司治疗晚期乳腺癌激素受体阳性患者中位生存期的影响因素分析 [J]. 中国药物与临床，2022，22（1）：49-51.

[38] Xi J，Oza A，Thomas S，et al. Retrospective analysis of treatment patterns and effectiveness of palbociclib and subsequent regimens in metastatic breast cancer [J]. J Natl Compr Canc Netw，2019，17（2）：141-147.

[39] Cook MM，Al Rabadi L，Kaempf AJ，et al. Everolimus plus exemestane treatment in patients with metastatic hormone receptor-positive breast cancer previously treated with CDK4/6 inhibitor therapy [J]. Oncologist，2021，26（2）：101-106.

[40] Bardia A，Hurvitz SA，DeMichele A，et al. Phase Ⅰ/Ⅱ trial of exemestane，ribociclib，and everolimus in women with HR$^+$/HER2$^-$ advanced breast cancer after progression on CDK4/6 Inhibitors（TRINITI-1）[J]. Clin Cancer Res，2021，27（15）：4177-4185.

[41] Formisano L，Lu Y，Servetto A，et al. Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER$^+$ breast cancer [J]. Nat Commun，2019，10（1）：1373.

[42] Mayer IA，Haley BB，Abramson VG，et al. Abstract PD1-03：A phase Ⅰb trial of fulvestrant$^+$ CDK4/6 inhibitor（CDK4/6i）palbociclib$^+$ pan-FGFR tyrosine kinase inhibitor（TKI）erdafitinib in FGFR-amplified/ ER$^+$/HER2$^-$ negative metastatic breast cancer（MBC）[J]. Cancer Res，2021，81（4 Suppl）：PD1-03.

[43] Jiang ZF，Li W，Hu XC，et al. Tucidinostat plus exemestane for postmenopausal patients with advanced，hormone receptor-positive breast cancer（ACE）：a randomised，double-blind，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2019，20（6）：806-815.

[44] Tolaney SM，Kabos P，Dickler MN，et al. Updated efficacy，safety，& PD-L1 status of patients with HR$^+$，HER2$^-$ metastatic breast cancer administered abemaciclib plus pembrolizumab [J]. J Clin Oncol，2018，36（15 suppl）：1059.

[45] Lindeman GJ，Bowen R，Jerzak KJ，et al. Results from VERONICA：a randomized，phase Ⅱ study of second-/third-line venetoclax（VEN）$^+$ fulvestrant（F）versus F alone in estrogen receptor（ER）-positive，HER2-negative，locally advanced，or metastatic breast cancer（LA/MBC）[J]. J Clin Oncol，2021，39（15 suppl）：1004.

（收稿日期：2023-11-01；修回日期：2023-12-12）

基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路中药防治血管性痴呆的研究进展

高媛[1]，惠乐乐[2]，杨瑞林[1]，李玉芳[1]，徐冰[3*]（1. 陕西中医药大学，陕西　咸阳　712000；2. 西安国际医学中心医院，西安　710000；3. 陕西中医药大学第一附属医院，陕西　咸阳　712000）

摘要：环磷酸腺苷（cAMP）- 蛋白激酶 A（PKA）-cAMP 响应性元件结合蛋白（CREB）是神经系统一条重要的信号途径，在血管性痴呆（VaD）的防治方面发挥重要作用。中医药是我国治疗 VaD 的重要手段，其主要优势在于保护脑血管、改善学习记忆与认知功能的效果显著且无明显不良反应。本文基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路在脑血管病变和记忆认知功能方面的调节机制，从单味中药及中药复方的角度综述了中药防治 VaD 的作用机制，为今后 VaD 相关基础及临床研究提供理论依据。

关键词：血管性痴呆；cAMP-PKA-CREB 信号通路；中药；脑血管病变；记忆认知障碍
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1037-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.032

Research progress in traditional Chinese medicine for vascular dementia based on cAMP-PKA-CREB signaling pathway

GAO Yuan[1], HUI Le-le[2], YANG Rui-lin[1], LI Yu-fang[1], XU Bing[3*] (1. *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712000; 2. *Xi'an International Medical Center Hospital*, *Xi'an* 710000; 3. *The First Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712000)

Abstract: Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-protein kinase A (PKA)-cAMP responsive element binding protein (CREB) is an important signaling pathway in the nervous system, playing a crucial role in the prevention and treatment of vascular dementia (VaD). Traditional Chinese medicine (TCM) is an important approach in China for treating VaD. Its main advantage lies in its obvious protecting the cerebral blood vessels and improving the learning, memory, and cognitive function, without notable side effect. Based on the regulatory mechanism of the cAMP-PKA-CREB signaling pathway in cerebrovascular lesions and memory/cognitive function, this article comprehensively reviewed the mechanism of action of TCM in preventing and treating VaD with single traditional Chinese medicine or compound, to provide a theoretical basis for the future basic and clinical research on VaD.

Key words: vascular dementia; cAMP-PKA-CREB signaling pathway; traditional Chinese medicine; cerebrovascular lesion; memory and cognitive impairment

血管性痴呆（vascular dementia，VaD）主要病理特征是脑血管病变后，引发脑组织间低灌注（缺血、缺氧），导致局灶性神经功能受损，进而出现记忆认知等功能或精神障碍[1]。最新研究显示，全球疾病负担排名的第 5 位为痴呆症，每年造成的全球经济负担在 1 万亿美元左右[2]，据预测到 2030 年，经济负担将增至 2.54 万亿美元[3]。而 VaD 是痴呆症的第二大常见病因，其发生率和疾病负担仅次于阿尔茨海默病[4]。VaD 属于中医学中“痴呆”的范畴。中医认为，痴呆病位在脑，与肾关系密切，涉及心、肝、脾、肺诸脏，五脏和，则脑得所养，五脏失和，则神思散乱，神机失用，而发为痴呆。VaD 的病因病机与髓海不足、脾肾两虚、痰浊蒙窍、瘀血内阻密切相关，治则常以补益脾

基金项目：陕西省教育厅重点实验室项目（No.20JS036）。
作者简介：高媛，女，在读硕士研究生，住院医师，主要从事中西医结合脑血管病研究，email：gy427366397@163.com　**通信作者：**徐冰，女，主任医师，主要从事中西医结合脑血管病研究，email：Xu1623953898@163.com

肾、活血化瘀、化痰通窍为法。

环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）-蛋白激酶 A（protein kinase A，PKA）-cAMP 响应性元件结合蛋白（cAMP responsive element binding protein，CREB）通路在保护脑血管、调控记忆和认知功能中发挥重要作用，为 VaD 的靶向治疗开辟了新思路 [5]。目前，有众多研究聚焦中药及中药复方通过 cAMP-PKA-CREB 信号通路治疗 VaD 的机制，并取得了一定成果，故本文对中药及中药复方基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路防治 VaD 的作用机制进行综述。

1 cAMP-PKA-CREB 信号通路与 VaD 的关系

1.1 cAMP-PKA-CREB 信号通路的概述

cAMP 的产生以 G 蛋白非依赖性方式或 G 蛋白依赖性方式调节，第一信使与 G 蛋白偶联受体（GPCRs）结合后，Gα 亚基与 Gβ 和 Gλ 亚基分离，然后激活腺苷酸环化酶（ACs），导致三磷酸腺苷（ATP）转化为 cAMP[6-7]；cAMP 进一步通过结合 PKA 的调控亚基激活 PKA，促进突触连接的产生 [8]。CREB 是 PKA 的作用底物之一，在中枢神经系统中充当记忆形成和巩固的启动开关 [9]。

1.2 cAMP-PKA-CREB 信号通路在 VaD 中的作用

正常的脑血管及脑血流是维持脑组织功能的基础，血管动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）和淀粉样变性是导致 VaD 的常见病因，cAMP-PKA-CREB 信号通路在预防 AS 和淀粉样变性中起着重要作用。① 内皮细胞 cAMP 的增加是稳定内皮细胞屏障的关键因素之一，激活 cAMP/PKA 通路可以保护内皮细胞屏障 [10-11]；转录激活因子 3（ATF3）作为 CREB 家族蛋白的一员，可以通过调节内皮炎症、泡沫细胞形成和血管重塑直接影响 AS 病变，血管组织外 ATF3 也可以通过调节糖脂代谢和炎症反应参与 AS，因此成为了预防脑血管病变及 VaD 发生的重要潜在靶标 [12]。② 脑淀粉样变性是指淀粉样物质 [主要为淀粉样蛋白 -β（amyloid-beta peptide）Aβ] 在软脑膜和大脑皮质小动脉中层沉积，从而导致脑血管病的发生发展。Aβ 来源于一个大的Ⅰ型跨膜蛋白：β- 淀粉样蛋白前体蛋白（β-amyloid precursor protein，APP），它以血小板的形式在人脑和外周血细胞中表达；活化血小板中 Aβ 的产生始于分泌酶对 APP 的加工，这些酶被 Ca^{2+} 和钙蛋白酶激活；目前已有研究证明，cAMP/PKA 通路的激活可以抑制血小板的钙蛋白酶活性、APP 加工和 Aβ 分泌，以此预防 VaD 等神经退行性疾病的发生发展 [5]。

由脑血管病变和组织长期低灌注导致多发性梗死所引起的记忆认知功能障碍，是 VaD 的最常见类型。而 cAMP-PKA-CREB 作为一条神经系统主导记忆认知功能的信号通路，在改善 VaD 患者临床症状中起着关键的作用。① 海马体是介导记忆和认知功能的关键部位，通常分为三个单向通路，苔藓纤维（mossy fiber，MF）通路是环节之一。MF 通路（突触）通常被认为是情景记忆形成，存储和检索的重要位点 [13]。海马长时程增强（long time potentiation，LTP）目前被认为是研究学习记忆、认知功能的经典细胞模型，VaD 等多种与认知记忆损伤相关的疾病都已被证实与 LTP 障碍密切相关 [14]。研究证明，cAMP-PKA 对于海马 MF 突触中的长期增强（MF-LTP）的诱导和维持起重要作用 [13]。② 长期记忆的巩固是一个高度精确调控的多步骤过程，CREB 在启动记忆巩固中起关键作用。研究表明，CREB 的下调会损害记忆，而过度表达则会增强记忆。③ 磷酸二酯酶 4（phosphodiesterase 4，PDE-4）是 cAMP 信号传导的重要调节者，其负责将 cAMP 降解为 5- 单磷酸核苷（5'-AMP），并与腺苷酸环化酶一起维护 cAMP 的稳态与平衡 [15-16]。研究发现，PDE-4 抑制剂可以通过阻断 cAMP 水解，提高胞内 cAMP 浓度，进而激活 PKA，促进 CREB 的磷酸化，增加海马神经元 LTP 及突触可塑性，从而改善记忆、认知障碍等神经功能下降表现 [17]。

总体来说，当 cAMP-PKA-CREB 通路被激活时，可以预防脑血管 AS 及淀粉样变性，起到“未病先防”的作用；而在 VaD 发生发展时，又可改善记忆认知功能障碍，起到“精准对症”的作用。由此可见，cAMP-PKA-CREB 信号通路对于 VaD 疾病具有重要意义（见图 1）。

2 单味中药和复方基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路对 VaD 防治的作用

2.1 单味中药

中医认为，痴呆病位在脑，与肾关系密切，涉及心、肝、脾、肺诸脏。对于 VaD 治疗原则以补益脾肾、活血化瘀、化痰通窍为主。许多研究发现，单味中药的有效成分通过调节 cAMP-PKA-CREB 信号通路在防治 VaD 过程中发挥重要作用。根据药物功效可分为补肾助阳类和活血通络类两大类。

2.1.1 补肾助阳类 基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路治疗 VaD 的补肾药物主要包括淫羊藿、锁阳、独活。淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶。淫羊藿苷可以增加细胞内的 cAMP、PKA 水平和 CREB 的磷酸化，并可通过抑制 Aβ 的产生和沉积，促进 Aβ 降解，降低 Aβ 引起的神经毒性作用，降低神经炎症反应，有效阻止或延缓 AD 的发生 [18-19]。锁阳为锁阳科植物锁阳 *Cynomorium songaricum* Rupr. 的干燥肉质茎。锁阳乙酸乙酯提取物能够引发 CREB 磷酸化，从而促

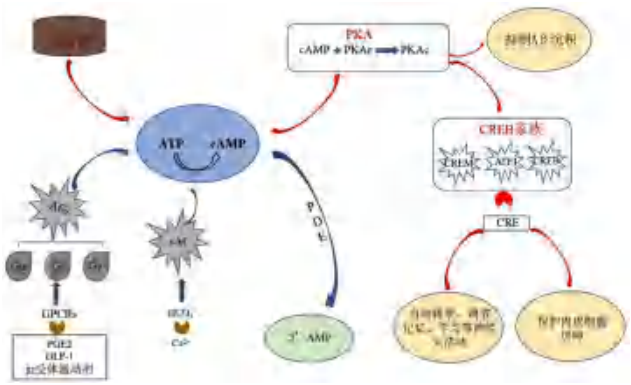


图 1　cAMP-PKA-CREB 信号通路在 VaD 中的作用

Fig 1　Role of cAMP-PKA-CREB signaling pathway in VaD

进神经细胞修复与再生，同时还可以诱导下游部分有利于突触良性改变的神经营养因子的表达，提高学习记忆及认知能力 [20]。独活为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. 的干燥根。香豆素是独活的主要化学成分之一 [21]。独活香豆素能够提高海马神经元活性，且与其增加 p-CREB、BDNF 蛋白的含量有关，可在蛋白水平提高 CREB 的磷酸化率，增大 p-CREB/CREB 比值，从而增加 BDNF 水平，进一步起到神经保护的作用 [22]。

2.1.2　活血通络类　基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路治疗 VaD 的活血通络药物主要包括姜黄、红景天、葛根、银杏叶。姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma Longa* L. 的干燥根茎，姜黄素可以通过激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路，诱导多功能干细胞（induced pluripotent stem cells，iPSCs）先分化为神经干细胞（neural stem cells，NSCs），再分化为有功能的神经元细胞，从而对 VaD 等神经系统退行性疾病发挥作用；PKAc 及 p-CREB 蛋白表达的高低与神经元细胞标志物 MAP2 和 NSCs 标志物 Nestin 表达的高低呈一致性，在 iPSCs 的分化过程中，姜黄素能够显著提高 cAMP 的含量，上调 PKAc 和 p-CREB 蛋白的表达，并使得 Nestin 和 MAP2 的表达也随之升高 [23]。固体脂质姜黄素颗粒是一种比天然姜黄素更有效的抗淀粉样蛋白、抗炎和神经保护剂，比天然姜黄素在体外和体内 AD 模型中具有更大的治疗潜力 [24]。红景天为景天科植物大花红景天 *Rhodiola* crenulata. 的干燥根和根茎，其活性成分红景天苷可以增加细胞内 cAMP 水平，激活 PKA；激活的 cAMP/PKA 抑制 IH 诱导的 RhoA 和 ROCK 升高，从而抑制活性氧（ROS）的产生 [11]，预防血管 AS 及 VaD 的发生。葛根为豆科植物野葛 *Pueraria* lobata. 的干燥根，有研究表明，葛根素可以增加 ATP 含量，并激活 cAMP-PKA 信号通路，降低海马神经元 Aβ 沉积，保护血管内皮功能，延缓 VaD 的发展进程 [25]。银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶，萜类内酯与银杏黄酮是银杏叶提取物的主要有效成分；银杏叶提取物可促进海马组织 CREB 表达，提高颈动脉微血管密度，抑制炎症因子的释放，从而改善大鼠记忆力 [26]。

单味中药基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路对 VaD 的作用机制汇总见表 1。

表 1　单味中药基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路对 VaD 的作用机制

Tab 1　Mechanism of single traditional Chinese medicine on VaD based on cAMP-PKA-CREB signaling pathway

中药	性、味、归经	功效	有效成分	作用细胞 / 模型	作用机制	文献
淫羊藿	性辛、甘，温；归肝、肾经	补肾阳、强筋骨、祛风湿	淫羊藿苷	BCCAO 大鼠模型	抑制 Aβ 的产生和沉积，cAMP↑、PKA↑、CREB↑	[18]
锁阳	性甘，温 归肝、肾、大肠经	补肾阳、益精血、润肠通便	乙酸乙酯	OVX 大鼠模型	促进神经细胞修复与再生，CREB↑	[20]
独活	性辛、苦，微温 归肾、膀胱经	祛风除湿、通痹止痛	香豆素	Aβ25-35 损伤小鼠模型	提高海马神经元活性，CREB↑、p-CREB↑、BDNF↑、p-CREB/CREB↑	[22]
姜黄	性辛、苦，微温；归脾、肝经	破血行气、通经止痛	姜黄素、固体脂质姜黄素颗粒	NSCs、神经元细胞	促进分化有功能的神经元细胞、抗淀粉样蛋白、抗炎，cAMP↑、PKAc↑、pCRE↑、Nestin↑、MAP2↑	[23]
红景天	性甘、苦，平 归肺、心经	益气活血、通脉平喘	红景天苷	ApoE$^{-/-}$ 小鼠模型	抑制 ROS，cAMP↑、PKA↑	[24]
葛根	性甘、辛，凉；归脾、胃、肺经	解肌退热、生津止渴、升阳止泻、通经活络、透疹、解酒毒	葛根素	BCCAO 大鼠模型	降低 Aβ 沉积，cAMP↑、PKA↑	[25]
银杏叶	性甘、苦，平 归心、肺经	活血化瘀 通络止痛、敛肺平喘、化浊降脂	萜类内酯 银杏黄酮	BCCAO 大鼠模型	提高颈动脉微血管密度，抑制炎症因子的释放，CREB↑	[26]

注（Note）：BCCAO. 慢性双侧颈总动脉闭塞（BCCAO-bilateral common carotid artery occlusion）；OVX. 去卵巢（ovariectomized）；ApoE$^{-/-}$. ApoE 基因敲除（ApoE gene knockout）。

2.2　*中药复方*

除了单味中药之外，临床中基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路治疗 VaD 的中药方剂，也以补肾、活血、化瘀为主（见表 2）。中药复方的组成中药较多，具体作用机制较为复杂，根据功效侧重，大致可分为重于补肾类、重于化瘀类两大类。

表 2 中药复方基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路对 VaD 的作用机制

Tab 2 Mechanism of traditional Chinese medicine compound on VaD based on cAMP-PKA-CREB signaling pathway

中药复方	主要组成	作用细胞 / 模型	作用机制	文献
补肾活血方	人参、胡桃肉、制何首乌、益智仁、川芎、郁金、当归、丹参	BCCAO 大鼠模型	抑制神经元凋亡，CREB↑	[27]
戟天健脑方	巴戟天、山茱萸、红景天、茯苓、远志	VaD 患者	保护海马神经元细胞，CREB↑	[28]
醒脑益髓汤	肉苁蓉、何首乌、菟丝子、益智仁、黄精、丹参、川芎、水蛭	BCCAO 大鼠模型	增加长时程记忆、减少神经元凋亡、cAMP↑、BDNF↑、PKA↑、CREB↑	[29]
通窍益智颗粒	麻黄、葛根、人参、黄芪、少量虫类药	BCCAO 大鼠模型	减少神经元凋亡，cAMP↑、PKA↑、pCREB↑	[30]
化瘀祛痰方	黄芪片、党参片、清半夏、茯苓等	BCCAO 大鼠模型	保护神经元，p-CREB↑、CREB↑	[31]
涤痰加味方	南星、半夏、枳实、茯苓、橘红、石菖蒲、人参、甘草	BCCAO 大鼠模型	抑制神经元的凋亡，cAMP↑、PKA↑、CREB↑	[32]
益肺宣肺降浊方	附子、人参、石菖蒲、杏仁、苏子、法半夏、三七、酒大黄	BCCAO 大鼠模型	抑制神经元的凋亡，p-CREB↑、CREB↑	[33]

2.2.1 重于补肾类 以补肾类中药为君药的方剂包括：补肾活血方、戟天健脑方和醒脑益髓汤。补肾活血方以活血通络、益肾填精为主。研究发现，补肾活血方可以显著提高大鼠海马组织中 CREB 的表达水平，从而抑制神经元的凋亡并改善记忆认知能力 [27]。戟天健脑方以益肾健脑、通络开窍、神清智定为主，可以通过调节 CREB/BDNF 信号通路，起到保护海马神经元细胞的作用 [28]。醒脑益髓汤以补益肾精、滋补肾阴为主。研究发现，该方可以明显增高海马组织中 cAMP、BDNF 含量及 PKA、CREB 蛋白表达量，可能通过激活 cAMP/PKA/CREB 信号通路，起到增加长时程记忆、减少神经元凋亡的作用，从而改善 VaD 大鼠的学习记忆 [29]。

2.2.2 重于化瘀类 以活血化瘀类中药为君药的方剂包括：通窍益智颗粒、化瘀祛痰方、涤痰汤加味汤和益肺宣肺降浊方。通窍益智颗粒以通窍益智为主。研究表明，通窍益智颗粒可使海马 CA1 神经元凋亡减少，可使 cAMP 含量、PKA 及 p-CREB 蛋白水平明显上调，显著改善 VaD 大鼠的学习记忆能力 [30]。化瘀祛痰方以益气健脾、化痰祛瘀为主，可以提高海马体内 p-CREB、CREB 等蛋白的表达，起到神经保护、改善脑功能恢复的作用 [31]。涤痰汤以补气活血、化瘀祛痰为主。研究发现，涤痰汤加味方可以激活 cAMP-PKA-CREB 信号传导通路，提高大鼠海马区神经元细胞内 cAMP 的表达量，并增加 PKA 及 CREB 蛋白的表达，以此减轻神经细胞损伤并抑制神经元的凋亡，从而改善学习记忆和认知障碍 [32]。益肺宣肺降浊方以益肺温肾补脾、宣肺降浊化瘀为主。研究表明，该方能明显改善 VaD 大鼠的学习记忆功能，其作用机制之一可能是通过调控激活 cAMP/PKA 信号通路，增加 p-CREB 和 CREB 蛋白表达的作用，减少海马神经元凋亡，从而提高学习记忆能力 [33]。

3 总结与展望

目前，关于探讨中药通过 cAMP-PKA-CREB 信号通路治疗 VaD 的研究相对较少。单味中药或复方通过抑制 Aβ 的产生和沉积、抑制 ROS 的产生、增加 ATP 含量等多种途径均可达到预防和治疗 VaD 效果，而这都与 cAMP-PKA-CREB 信号通路密切相关。运用中药的多途径调节 cAMP 的含量，上调 PKAc 和 p-CREB 蛋白的表达，阻止脑血管病变，促进 LTP 形成、减少神经元凋亡，改善 VaD 大鼠的学习记忆，是基于该通路防治 VaD 的关键。

虽然，基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路不仅为临床中中药防治 VaD 提供了作用机制的理论依据，也为未来研发更多防治 VaD 的新靶点提供了重要思路，如 CREB 家族蛋白（ATF3），PDE-4 抑制剂均成为了该领域研究热点。但是仍然存在一定的不足：

① 中药成分十分复杂，其药效学的分子生物学机制尚不明确。因此，药物具体参与治疗的有效成分仍需更多研究来阐明。② 中药复方存在药物之间的多成分、多靶点、多通路、多途径的复杂作用关系。除 cAMP-PKA-CREB 信号通路之外，包括单味中药都可能还存在其他信号通路、靶点或途径参与整个调节过程，如淫羊藿苷还可以激活 PI3K/AKT/GSK/3β、PI3K/AKT/CREB/TrkB 等多条通路作用于神经系统病变，间接或直接地影响着 VaD 的发生发展，因此，更深入地探索药物间的相互作用，才能为进一步的基础研究与临床应用提供依据。③ 在药物研发领域中，超过 40% 的药物由于水溶性差和生物利用度低，导致其临床应用受限 [34-35]，因此，亟须利用现代药剂学手段对这些药物进行多种剂型改造。如介孔二氧化硅（mesoporous silica nanoparticles，MSN）能够显著增强难溶性药物姜黄素的溶解度与累计溶出率，从而提高姜黄素的生物利用度 [36]。④ 在这些中医药的临床应用中，如何针对不同患者发挥辨证论治的特点，给予患者的个体化治疗方案；以及在与西药联合增效的前提下是否可以减少西医药物带来的不良反应，这些问题仍需要进一步思考与研究。总而言之，基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路探讨中药防治 VaD 的研究相对较少，仍有较大的空间和前景。

参考文献

[1] 陈昭，吴林，蓝雪琳，等 . 血管性痴呆发病机制中西医研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2022，24（1）：40-44.

[2] Livingston G，Huntley J，Sommerlad A，et al. Dementia prevention，intervention，and care：2020 report of the Lancet Commission [J]. Lancet，2020，396（10248）：413-446.

[3] Jia JP，Wei CB，Chen SQ，et al. The cost of Alzheimer’s disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. Alzheimer’s Dementia，2018，14（4）：483-491.

[4] 王琼，周帅，侯芳芳，等 . 痴呆症的流行病学及预防措施 [J]. 中国临床保健杂志，2021，24（6）：747-751.

[5] Sepúlveda C，Hernández B，Burgos CF，et al. The cAMP/PKA pathway inhibits beta-amyloid peptide release from human platelets [J]. Neuroscience，2019，397：159-171.

[6] Ali DC，Naveed M，Gordon A，et al. β-adrenergic receptor，an essential target in cardiovascular diseases [J]. Heart Fail Rev，2020，25（2）：343-354.

[7] Khannpnavar B，Mehta V，Qi C，et al. Structure and function of adenylyl cyclases，key enzymes in cellular signaling [J]. Curr Opin Struct，2020，63：34-41.

[8] Wei W，Dong Q，Jiang W，et al. Dichloroacetic acid-induced dysfunction in rat hippocampus and the protective effect of curcumin [J]. Metab Brain Dis，2021，36（4）：545-556.

[9] Bai H，Zhao L，Liu HX，et al. Adiponectin confers neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury through activating the cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling [J]. Brain Res Bull，2018，143：145-154.

[10] Radeva MY，Waschke J. Mind the gap：mechanisms regulating the endothelial barrier [J]. Acta Physiol（Oxf），2018，222（1）：doi:10.1111/apha.12860.

[11] Li LY，Yang YY，Zhang HN，et al. Salidroside ameliorated intermittent hypoxia-aggravated endothelial barrier disruption and atherosclerosis via the cAMP/PKA/RhoA signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2021，12：723922.

[12] Wu JY，Huang YF，Zhou XY，et al. ATF3 and its emerging role in atherosclerosis：a narrative review [J]. Cardiovasc Diagn Ther，2022，12（6）：926-942.

[13] Shahoha M，Cohen R，Ben-Simon Y，et al. cAMP-dependent synaptic plasticity at the hippocampal mossy fiber terminal [J]. Front Synaptic Neurosci，2022，14：861215.

[14] 宋凯，王亚婷，熊凡捷，等 . 针灸调节学习记忆损伤长时程增强机制的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（3）：84-89.

[15] Zhang HY，Kong QB，Wang J，et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer [J]. Exp Hematol，2020，9（1）：32.

[16] 王惠芳，王有志，支运宝，等 . 磷酸二酯酶 4 抑制剂临床及安全性研究进展 [J]. 药学学报，2023，58（9）：2601-2609.

[17] 付华容，王浩，张汉霆 . 磷酸二酯酶 4 抑制剂罗氟司特改善认知功能研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2019，33（8）：614-620.

[18] 任宁娜，唐学锋，王金艳，等 . 淫羊藿活性成分防治神经系统病变认知功能障碍作用机制的研究进展 [J]. 环球中医药，2023，16（6）：1271-1278.

[19] 路宇仁，陈昳冰，崔元璐，等 . 淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（17）：209-220.

[20] 田方泽，畅洪昇，周静洋，等 . 锁阳乙酸乙酯提取物对去势所致老年痴呆大鼠 p38、p- 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白的影响 [J]. 中国药学杂志，2015，50（10）：868-871.

[21] 周璐丽，曾建国 . 独活化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国现代中药，2019，21（12）：1739-1748.

[22] 李昀泽，裴媛 . 独活及其提取物对痴呆及神经系统变性疾病作用的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2018，36（10）：2368-2371.

[23] 姚辉，舒涛，徐义春，等 . 姜黄素通过激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路促进诱导多功能干细胞神经分化 [J]. 中国中西医结合杂志，2021，41（5）：602-607.

[24] Maiti P，Bowers Z，Bourcier-Schultz A，et al. Preservation of dendritic spine morphology and postsynaptic signaling markers after treatment with solid lipid curcumin particles in the 5xFAD mouse model of Alzheimer’s amyloidosis [J]. Alzheimer’s Res Ther，2021，13（1）：37.

[25] 齐大河，马桦，陈媛媛，等 . 葛根素治疗血管性痴呆的作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志，2023，48（22）：5993-6002.

[26] 徐睿，王雪鹏，周兵 . 银杏叶提取物对血管性痴呆大鼠记忆力及 GAT1、CREB 表达的影响 [J]. 中国实验诊断学，2020，24（2）：295-298.

[27] 靳贺超，于文涛，刘晓，等 . 补肾活血方对血管性痴呆大鼠脑海马细胞凋亡及 ERK2，CREB 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（12）：129-135.

[28] 郭明冬，李秋艳，韦云，等 . 戟天健脑方对血管性痴呆患者认知功能及胆碱能神经递质的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志，2018，24（9）：1253-1255.

[29] 柴金秀，徐冰，张禹，等 . 基于 cAMP/PKA/CREB 信号通路探讨醒脑益髓汤对血管性痴呆大鼠海马神经元的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2023，32（5）：603-608.

[30] 李双阳，王凌雪，蒲玉婷，等 . 通窍益智颗粒通过 cAMP/PKA-CREB 信号通路影响血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的研究 [J]. 中药药理与临床，2020，36（2）：190-195.

[31] 闵冬雨，张哲，朱姝，等 . 化瘀祛痰方对血管性痴呆的保护作用机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（16）：31-36.

[32] 丁瑞丛，纪可，吴东南，等 . 涤痰汤加味方对血管性痴呆大鼠行为学及 PKA/CREB 信号通路的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2021，41（3）：364-369.

[33] 王清碧，唐农，吴林，等 . 益肺宣肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡及 p-CREB 和 CREB 蛋白表达的影响 [J]. 广西中医药，2019，42（5）：59-63.

[34] My Tran KT，Vo TV，Lee BJ，et al. Encapsulation of solid dispersion in solid lipid particles for dissolution enhancement of poorly water-soluble drug [J]. Curr Drug Deliv，2018，15（4）：576-584.

[35] Wenzel T，Stillhart C，Kleinebudde P，et al. Influence of drug load on dissolution behavior of tablets containing a poorly water-soluble drug：estimation of the percolation threshold [J]. Drug Dev Ind Pharm，2017，43（8）：1265-1275.

[36] 胡宪龙，苏厚霖，邱圣楷，等 . 姜黄素介孔缓释载药系统制备工艺优化及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中南药学，2023，21（9）：2328-2334.

（收稿日期：2023-11-01；修回日期：2023-12-25）

药物分析与检验

近红外光谱快速检测苏黄止咳胶囊中间体苏黄颗粒的水分含量

马盼盼[1]，吴晨璐[1]，张婉莹[1]，张茳莹[1]，王海霞[1, 2]，李正[1, 2]，赵静[1, 2, 3*]（1. 天津中医药大学中药制药工程学院，天津 301617；2. 省部共建组分中药国家重点实验室，天津 301617；3. 天津中医药大学第四附属医院老年病科，天津 301617）

摘要：目的 对苏黄颗粒进行水分含量检测。**方法** 取吸湿程度不同的苏黄颗粒，分别使用 Antaris Ⅱ 傅里叶变换近红外光谱仪、Avantes 便携式近红外光谱仪采集两种近红外光谱，同时采用烘干法测定样品含水量作为参考值。光谱采用一阶求导（1stD）、标准正态变量变换（SNV）、多元散射校正（MSC）的预处理方法，运用偏最小二乘回归（PLS）建立基于近红外光谱的苏黄颗粒水分定量分析模型，并采用 Passing-Bablok 回归比较两种近红外设备预测苏黄颗粒含水量的能力。**结果** 采用 1stD 预处理后，所建综合模型的预测能力优异，FT-NIR 模型与 P-NIR 模型的 R^2（c）均大于 0.9897，*RMSEC* 均小于 0.0019，R^2（p）均大于 0.9716，*RMSEP* 均小于 0.0029。FT-NIR 批次验证模型的 R^2 均高于 0.997，P-NIR 批次验证模型的 R^2 均大于 0.935，表明两种仪器所建模型对未知批次样品具有优秀的预测能力。**结论** P-NIR 的模型效果虽不及 FT-NIR，但同样具有较高的准确度和稳定性，可以准确、快速检测苏黄颗粒中水分含量，应用于生产实践与样品大批量检测。

关键词：便携式近红外光谱；近红外光谱技术；苏黄颗粒；苏黄止咳胶囊；水分
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-1042-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.033

Rapid detection of moisture content in intermediate Suhuang granules of Suhuang Zhike capsules by near infrared spectroscopy

MA Pan-pan[1], WU Chen-lu[1], ZHANG Wan-ying[1], ZHANG Jiang-ying[1], WANG Hai-xia[1, 2], LI Zheng[1, 2], ZHAO Jing[1, 2, 3*] (1. *College of Pharmaceutical Enginerring of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *State Key Laboratory of Component Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 3. *Department of Geriatrics*, *the Fourth Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To determine the moisture content of Suhuang granules. **Methods** The Antaris Ⅱ fourier transform near infrared spectrometer and Avantes portable near infrared spectrometer were used to collect near infrared spectra of Suhuang granules with different moisture absorption degrees. Meantime, the oven drying was used to measure the moisture content of samples as the reference value. A quantitative analysis model of moisture content of Suhuang granules based on near-infrared spectrum was established with first derivation (1stD), standard normal variate transformation, multiple scattering correction and partial least squares. Passing-Bablok regression was used to compare the ability of two near infrared devices to predict the moisture content of Suhuang granules. **Results** The prediction ability of the synthesized models was excellent after the pretreatment with 1stD. R^2 (c) of FT-NIR model and P-NIR model was both bigger than 0.9897, *RMSEC* was less than 0.0019, R^2 (p)

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973699，No.82274361）。
作者简介：马盼盼，女，硕士研究生，主要从事中药质量控制与分析方面的研究，email：mapanpan101859@163.com *通信作者：赵静，女，副研究员，主要从事中药质量控制与分析方面的研究，email：cetty3190@163.com

was bigger than 0.9716, and *RMSEP* was less than 0.0029. The R^2 of the FT-NIR batch validation model was consistently higher than 0.997, so was the R^2 of the P-NIR batch validation model at 0.935, indicating that the models for both instruments had excellent predictive capabilities for unknown batch samples. **Conclusion** Although the P-NIR method exhibits poorer accuracy than that of FT-NIR, it still demonstrates good stability and precision in detecting the moisture content of Suhuang granules. Both methods can be used in mass production and sample testing.

Key words: portable near infrared spectroscopy; near-infrared spectroscopy; Suhuang granule; Suhuang Zhike capsule; moisture

苏黄止咳胶囊是由紫苏子、紫苏叶、麻黄、五味子、前胡、地龙、蝉蜕、牛蒡子、枇杷叶九味中药组成的中成药制剂[1]。苏黄止咳胶囊以“风咳”理论为依据研制而成，具有疏风宣肺、止咳利咽的作用，临床上常用于治疗咳嗽变异性哮喘、感冒后咳嗽[2-4]。苏黄颗粒是苏黄止咳胶囊生产中重要的中间体，其物理属性直接影响苏黄止咳胶囊的质量，如吸湿性会影响最终的含水量、流动性，从而影响胶囊装量等。在实际生产过程中，苏黄颗粒具有易吸湿的特性，研究表明苏黄颗粒的吸湿率为 11% ～ 14%，符合 2020 年版《中国药典》中的具有引湿性的标准[5-6]。苏黄颗粒的含水量测定方法一般采取 2020 年版《中国药典》四部中规定的烘干法，该方法测量结果准确度较高，但操作烦琐，耗时较长，实时性差，具有一定的滞后性，容易产生误差，很难满足制药行业生产过程中大批量样品的在线检测。因此，采取一种更加快捷简便的方法对苏黄颗粒含水量进行在线检测是很有必要的。

近红外光谱（near infrared spectroscopy，NIRS）技术具有快速无损、操作简便、成本低廉、检测效率高等优点，该技术利用 O-H、N-H、C-H 等含氢基团的倍频和合频吸收近红外光的特点实现成分的定性定量检测[7]。近年来，NIRS 技术在制药行业的生产过程与质量控制中得到广泛应用。多项研究利用 NIRS 技术在线评估流化床制粒过程中的水分变化以及现场快速筛查颗粒剂，并取得了较好的效果[8-13]。这些研究中采用的台式近红外设备具有高分辨率、高测量精度的特点，但其价格昂贵，体积较大，适用于实验室研究使用，不利于推广应用到工厂和生产线的在线检测。故而，小而精的便携式仪器成为目前各领域 NIRS 在线检测的重要研究和发展趋势。目前，该技术已经应用于食品[14]、农业[15]、医药[16]等相关领域，前景广阔，非常适用于药品的现场检测。修连存等[17]采用便携式近红外药品分析仪测量药品含水量，推动了便携式近红外仪器在药品定性与定量分析中的进展。孙越[18]将便携式近红外光谱仪（portable near-infrared spectroscopy，P-NIR）应用于丹参的产地鉴别、活性成分定量和抗氧化活性预测，实现了对丹参的质量控制和评价。便携式近红外设备成本低廉，非常适用于大批量样本的快速在线检测。然而，便携式近红外光谱用于苏黄颗粒含水量的测定还未见相关文献报道。

本研究将便携式近红外光谱用于苏黄颗粒含水量的在线检测，并同时对比台式傅里叶变换近红外光谱仪（fourier transform near-infrared spectroscopy，FT-NIR）与 P-NIR 两种不同的仪器和采集方法下的结果差异，探究 P-NIR 的适用性与准确性，并结合 NIRS 技术与偏最小二乘回归（PLS）建立苏黄颗粒的水分定量模型，以期为苏黄颗粒水分含量在线检测提供一种新途径，为中药颗粒制剂水分含量检测提供借鉴。

1　仪器与试药

Antaris Ⅱ傅里叶变换近红外光谱仪（赛默飞世尔科技公司），配置积分球漫反射检测器。Avantes 便携式近红外光谱仪（Avaspec-NIR512-1.7-HSO-EVO），配置 Avantes 光源（AVALIGHTT-HAL-S-MINI）、光纤。

苏黄颗粒（样品批号：21062591、21062491、21062592、21062192、21062691）由扬子江药业集团有限公司生产并提供。

2　方法与结果

2.1　样品放置吸湿

将 5 批苏黄颗粒放置于温度为 25 ℃，相对湿度为 50% 的房间，暴露在空气中，持续搅拌以确保受潮均匀。由于苏黄颗粒吸湿性极强，本研究通过设定不同的暴露时间，每批样品每 10 min 取样一次，最终，21062591 批次获得 15 个样品，21062491 批次获得 17 个样品，21062592、

21062192 和 21062691 批次均得到 19 个样品，共获得 89 个不同吸湿程度的样本。5 批样品放置吸湿后采用烘干法测得样品含水量范围在 3% ～ 10%，表明其水分含量变化相对不稳定。颗粒剂的水分含量直接影响颗粒性质和制粒后的工艺步骤，从而对胶囊的稳定性、流动性造成影响导致装量超限等质量问题 [19]，因此，亟须建立一种快速、可靠的苏黄颗粒含水量在线检测方法。

2.2　样品光谱采集

2.2.1　傅里叶近红外光谱采集　采用 Antaris Ⅱ 傅里叶变换近红外光谱仪采集样品粉末的漫反射光谱，光谱采集条件为：光谱扫描范围 10 000 ～ 4000 cm^{-1}，扫描次数 64 次，分辨率 8.0 cm^{-1}，增益 4×，每批样品重复测定 3 次，取平均光谱。每 24 h 自动采集背景光谱。测样前，先将仪器预热 30 min，为了避免装样量对其结果产生影响，每次采集均取 1.0 g 粉末，将样品粉末放入样品杯中进行光谱采集。

2.2.2　便携式近红外光谱采集　使用两根光纤搭建入射光纤与接收光纤，将其固定为四十五度角，光从光源发出后经由入射光纤照射在样品粉末表面，携带信息的漫反射光被接收光纤接收传导至光谱仪，光信号转化为电信号并储存。使用同一个浅口样品池，将苏黄颗粒放入样品池中盛满且轻轻刮平，既保证其松散堆积同时又统一了光程，尽可能地减少光程不同带来的误差。所有采集过程均在黑箱中进行，以减少环境光的干扰。光谱采集条件为：扫描次数 64 次，积分时间 7.5 ms，每 24 h 重新采集白背景与暗背景，每次开机后将仪器预热 30 min，待其稳定后再采集光谱数据。

2.3　样品含水量测定

样品水分采用烘干法 [2020 年版《中国药典》四部通则 0832] 测定。取 2 个 100 ～ 105 ℃干燥至恒重的空扁形称量瓶，精密称定重量后，加入混合均匀的样品 2 ～ 5 g，平铺厚度不超过 5 mm，精密称定，放入 100 ～ 105 ℃的干燥箱内。干燥时，将瓶盖取下放置在称量瓶旁或将瓶盖半开，干燥 5 h 后，将称量瓶盖好取出，置干燥器中放冷至室温，称定重量。再在 100 ～ 105 ℃干燥 1 h，放冷，称重，如此循环至连续两次称重的差异不超过 5 mg 为止。根据减失的重量，计算样品的含水量。

2.4　样本集的划分

本研究采集的光谱数据采取两种划分方式，一种是所有批次的样品采用 Kennard-Stone 算法（K-S 算法）以 7∶3 的比例划分训练集和测试集，进而进行模型的建立与验证。第二种方法是模拟工艺流程中收集模型有限的特性，取 4 个批次的样品进行模型建立，剩余 1 个批次进行模型验证，以证实模型对于未知批次的预测效果。由表 1 可以看出，采用 K-S 算法划分样本集，其训练集的浓度分布大于测试集，划分合理。

表 1　样本集划分情况

Tab 1　Division of sample set

集合类别	样本数量	最大值	最小值	平均值
训练集	60	0.0978	0.0300	0.0614
测试集	27	0.0951	0.0370	0.0605

2.5　光谱预处理与特征波长选择

本研究采用主成分分析（principal component analysis，PCA）对光谱数据中的异常样本进行分析和筛除。样本的 PCA 散点图如图 1 所示，其中图 1A、1B 为原始光谱数据的 PCA 得分图，图 1C、1D 为样本集数据剔除异常值后的分布图。由图 1 可知，在样本的 95% 置信区间外存在 2 个离群值，离群值样本的测量值为全部样本中的最大值和最小值。采用 PCA 剔除异常样本后剩余样本 87 个。

由于 NIRS 中存在大量冗余信息及噪声，建模前需要对光谱进行预处理以去除背景噪声、基线漂移、光散射的影响。本研究选择一阶求导（first derivative，1^{st}D）、标准正态变量变换（standard normal variate transformation，SNV）、多元散射校正（multiplicative scatter correction，MSC）对光谱预处理，结果如图 2 所示。其中，1^{st}D 可以有效消除或减少背景噪声与基线漂移的影响，SNV 和 MSC 具有相似的预处理效果，能够用来消除光谱数据中光散射、样品纹理或形状带来的不良影响。筛选出最佳预处理方法后，采用竞争性自适应重加权采样（competitive adapative reweighted sampling，CARS）提取特征光谱以减少光谱中大量干扰信号的影响，提高模型预测精度。CARS 特征波长提取结果如图 3 所示。其中，图 3A 为 FT-NIR 采用 CARS 筛选后的建模谱段，其特征波长主要位于 1000 ～ 1450 nm 处。图 3B 为 P-NIR 进行 CARS 筛选后的特征波长，主要集中在 900 ～ 1018 nm、1075 ～ 1238 nm、1400 ～ 1450 nm、1600 ～ 1700 nm 处。水分子在该范围内存在明显吸收峰，其 O-H 的伸缩振动引起了近红外光在 960 nm、1450 nm 处的倍频吸收及 1220 nm 处的合频吸收 [20-21]，该吸收特性对于苏黄颗粒水分定量模型的建立具有重要的应用价值。

2.6　模型的建立与评价

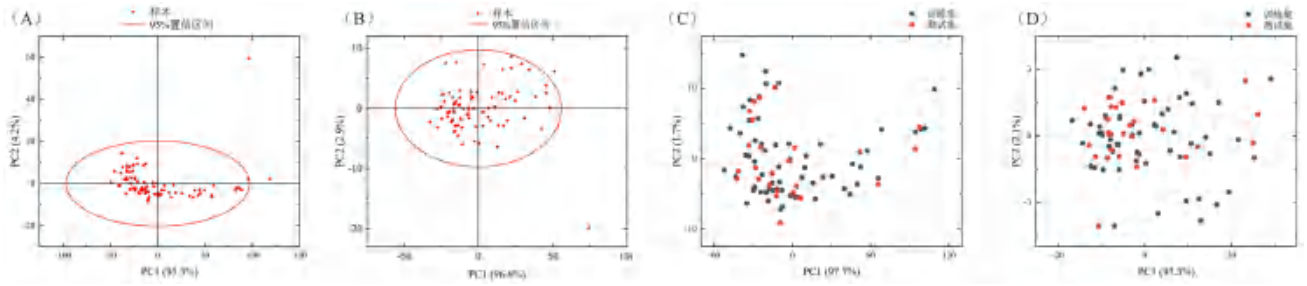


图 1　FT-NIR（A）和 P-NIR（B）的 PCA 得分图以及 FT-NIR（C）和 P-NIR（D）的样本分布图

Fig 1　PCA score charts of FT-NIR（A），P-NIR（B），and sample distribution maps of FT-NIR（C），P-NIR（D）

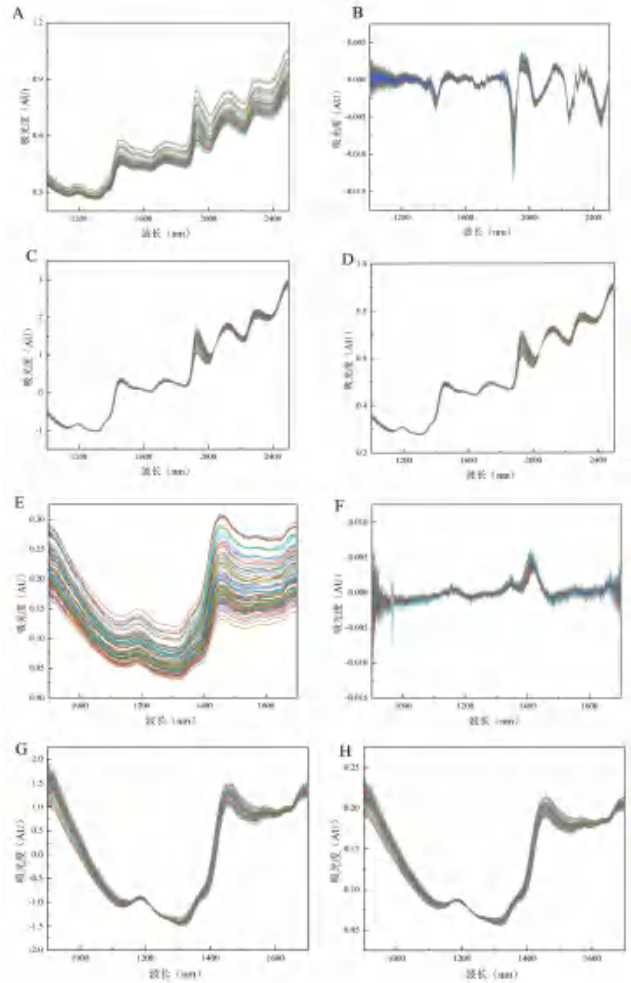


图 2　FT-NIR（E ～ H）和 P-NIR（A ～ D）的光谱预处理结果

Fig 2　Spectral preprocess of FT-NIR（E ～ H）and P-NIR（A ～ D）

A、E. 原始光谱（primary spectrum）；B、F. 1stD 预处理（1stD）；C、G. SNV 预处理（SNV）；D、H. MSC 预处理（MSC）

本研究采用 PLS 结合蒙特卡洛交叉验证（Monte Carlo cross validation，MCCV）建立苏黄颗粒水分定量模型。PLS 可以克服共线性问题，其变量对因变量具有强大的解释能力，可以去除回归无益噪声的影响，选择合适的变量可以提高检测效率。模型性能与准确性使用均方根误差（*RMSE*）和决定系数（R^2）来评价。

2.6.1　综合模型分析　本研究分别采用原始光谱及

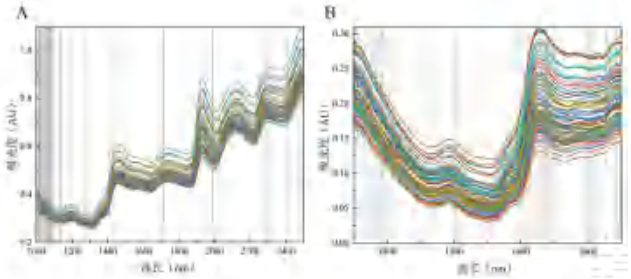


图 3　FT-NIR（A）和 P-NIR（B）的 CARS 特征波长提取结果

Fig 3　Extraction of characteristic wavelength by CARS of FT-NIR（A）and P-NIR（B）

1stD、SNV、MSC 预处理后的光谱信息结合 PLS 建立了基于所有批次样品的综合模型。结果如表 2 所示，每种预处理方式下的 FT-NIR 和 P-NIR 模型在苏黄颗粒的水分含量预测方面均表现出优异的性能。其中，采用 1stD 预处理后的 FT-NIR 和 P-NIR 模型具有明显的鲁棒性优势，相比其他方法预处理的模型表现更优秀。因此，选择 1stD 作为最佳光谱预处理方法。由图 2 可知，光谱采用 1stD 预处理，其数据结构更加统一，光谱特征更加突出，使得光谱主要吸收信息放大，从而有效地提高了模型预测准确度。因此，本研究采用 1stD ＋ CARS ＋ PLS 方法建立基于两种仪器的水分定量模型。

表 2　两种光谱模型预测结果

Tab 2　Predicted results of the two spectral models

模型	预处理方式	LVs	R^2（c）	*RMSEC*	R^2（p）	*RMSEP*
FT-NIR	无	5	0.9917	0.0017	0.9774	0.0026
	1stD	5	0.9977	0.0009	0.9927	0.0015
	SNV	5	0.9952	0.0013	0.9876	0.0019
	MSC	5	0.9930	0.0015	0.9854	0.0021
P-NIR	无	5	0.9703	0.0031	0.9676	0.0031
	1stD	5	0.9897	0.0019	0.9716	0.0029
	SNV	2	0.9781	0.0027	0.9792	0.0025
	MSC	2	0.9784	0.0027	0.9811	0.0023

为检验模型的预测能力，分别将 FT-NIR 模型与 P-NIR 模型预测的水分含量值与烘干法测定的参考值比较以进行外部验证。由图 4 可以看出，FT-NIR 模型的预测精度较高，而 P-NIR 模型的预

测精度不及 FT-NIR 模型，但其预测值与真实值接近，表明 P-NIR 模型同样具有较高的预测性能。因此，P-NIR 模型可以有效地预测苏黄颗粒的含水量，适用于生产线上样品的大批量快速检测。

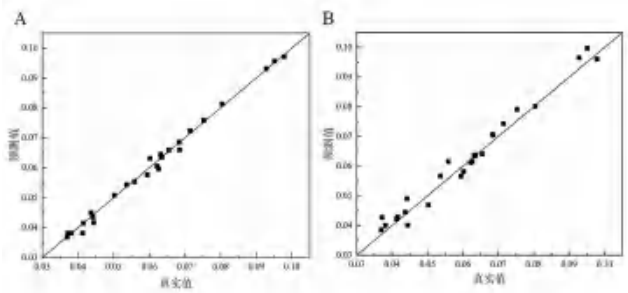


图 4　FT-NIR 模型（A）和 P-NIR 模型（B）预测值与真实值相关图

Fig 4　Correlation between the predicted values and the true values of FT-NIR model（A）and P-NIR model（B）

2.6.2　批次验证模型分析　选取 4 个批次的样品数据采取第二种方法建立苏黄颗粒的水分定量模型，将未用于建模的一个批次用于模型的验证，以检验模型在样品不同批次下的预测效果。不同批次间相互验证的最佳模型结果如表 3、4 所示。由表 3 可以看出，FT-NIR 批次验证模型的准确率较高，表明其模型的稳定性极高，不易受批次间差异的影响。由表 4 可以看出，P-NIR 批次验证模型同样具有较高的准确度与稳定性。如本文“2.4”项下所示，为了模拟工艺流程中收集模型有限的特性，本研究取 4 个批次的样品进行模型建立，剩余 1 个批次进行模型验证，以证实模型对于未知批次的预测效果。模型验证采用的是未用于模型建立的批次，此批次样品对于苏黄颗粒水分定量模型来说属于未知批次样品。结果表明，两种仪器建立的模型对未知批次样品均有较高的预测能力。P-NIR 模型在预测准确度和稳定性上虽不及 FT-NIR 模型，但其本身仍有较高的准确度，可对水分含量进行有效检测。

2.6.3　Passing-Bablok 回归分析　为比较两种仪器预测苏黄颗粒含水量的能力，验证两种仪器之间以及仪器预测值与参考值之间的差异有无统计学意义，采用 Passing-Bablok 回归 [22] 进行方法比较。由于两种分析方法均会受到实验误差的影响，残差往往无法满足正态分布，而 Passing-Bablok 回归是一种非参数检验方法，该方法不要求样本分布和测量误差满足特别的假设，根据斜率与截距值比较两种仪器方法之间的差异有无统计学意义。若斜率的置信区间包括 1，且截距的置信区间包括 0，则 H_0 可接受，两种方法之间的差异无统计学意义，即两种方法具有一致性。

表 3　FT-NIR 批次验证模型预测结果

Tab 3　Predicted results of the FT-NIR batch validation models

验证批次	LVs	R^2（c）	*RMSEC*	R^2（p）	*RMSEP*
21062591	5	0.9974	0.0009	0.9913	0.0018
21062192	5	0.9974	0.0009	0.9916	0.0017
21062491	5	0.9978	0.0009	0.9867	0.0014
21062691	5	0.9983	0.0007	0.9890	0.0019
21062592	5	0.9981	0.0008	0.9885	0.0013

表 4　P-NIR 批次验证模型预测结果

Tab 4　Predicted results of the P-NIR batch validation models

验证批次	LVs	R^2（c）	*RMSEC*	R^2（p）	*RMSEP*
21062591	5	0.9895	0.0017	0.9707	0.0033
21062192	2	0.9782	0.0025	0.9748	0.0029
21062491	5	0.9884	0.0020	0.9415	0.0028
21062691	5	0.9880	0.0019	0.9719	0.0030
21062592	5	0.9887	0.0020	0.9354	0.0032

根据上述两种模型分析结果可知，采用 PLS 建模的 P-NIR 数据与 FT-NIR 数据的 RMSEP 相差很小，这表明 P-NIR 与 FT-NIR 测得的结果具有可比性。为了检验两种仪器之间的差异是否具有统计学意义，对测试集数据进行 Passing-Bablok 回归分析。通过对烘干法、FT-NIR、P-NIR 测量的含水量进行成对比较，并在 95% 置信区间下对斜率和截距联合检验以分析仪器方法之间的差异。Passing-Bablok 回归结果见表 5，可以发现烘干法测得的参考值与 P-NIR、FT-NIR 测量值之间差异无统计学意义。此外，从表 5 中可知两种仪器的预测结果间差异无统计学意义，证实了与 FT-NIR 相比，P-NIR 同样具有测定苏黄颗粒中水分含量的可行性。

表 5　Passing-Bablok 回归结果

Tab 5　Passing-Bablok regression

样品	参数	参考值 *vs* P-NIR	参考值 *vs* FT-NIR	P-NIR *vs* FT-NIR
苏黄颗粒	截距	− 0.007 334 to 0.003 590	− 0.003 418 to 0.001 051	− 0.005 595 to 0.002 821
	斜率	0.9463 to 1.1254	0.9868 to 1.0540	0.9349 to 1.10811
	H_0	接受	接受	接受

3　结论

本研究采用 NIRS 技术结合化学计量学方法建立了苏黄颗粒水分含量的定量分析模型。通过采用多种预处理方式对原始光谱进行处理，筛选出最佳预处理方法，最终选取 1stD 进行光谱预处理。在对光谱预处理后，两种光谱所建模型

的 R^2 均大于 0.97，*RMSE* 均小于 0.0029，表明两种仪器预测结果准确度较高。为检验两种仪器之间的差异有无统计学意义，本研究采用 Passing-Bablok 回归对 FT-NIR、P-NIR 数据进行分析，结果显示两种仪器的预测结果差异无统计学意义，两种仪器具有可比性。以上结果证实了 P-NIR 快速检测苏黄颗粒含水量具有可行性。因此，相较于更加精确的 FT-NIR，P-NIR 在不损失预测精度的情况下，可以有效地应用于生产实践，且节省大量成本。此外，批次验证模型将 4 个批次用于模型建立，1 个批次用于模型验证，证明了本研究所建立的含水量模型在不同批次间的苏黄颗粒中同样具有极高的鲁棒性。在实际生产过程中，FT-NIR 因为体形庞大、价格昂贵难以应用，而 P-NIR 具有体积小、适应性强等优点。本研究结果表明 P-NIR 对水分检测的能力可信，可以为苏黄颗粒中含水量的在线检测提供一种高效、可靠、便捷的定量分析手段。

参考文献

[1] 赵琳 . 苏黄止咳胶囊治疗咳嗽变异性哮喘的临床研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2006.

[2] 李得民，石效平，杨道文，等 . 苏黄止咳胶囊治疗儿童感染后咳嗽的临床疗效评价 [J]. 中华中医药杂志，2015，30（8）：2998-3000.

[3] 张燕萍，晁燕，苗青，等 . 苏黄止咳胶囊治疗感冒后咳嗽的随机对照研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2008，28（8）：698-701.

[4] 吴爱玲 . 苏黄止咳胶囊治疗风咳的疗效与季节相关性研究 [J]. 内蒙古中医药，2020，39（11）：22-23.

[5] 祝明利，张芳语，张瀚，等 . 中药大品种制造关键质量属性表征：粉末与颗粒物理属性的苏黄止咳胶囊中间体过程质量控制方法研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46（7）：1636-1643.

[6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：114.

[7] 邢志娜，张达磊 . 近红外光谱分析技术及其在中药领域的应用进展 [J]. 时珍国医国药，2005，16（5）：416-418.

[8] Alcala M，Blanco M，Bautista M. On-line monitoring of a granulation process by NIR spectroscopy [J]. J Pharmaceutical Sci，2010，99（1）：336-345.

[9] Demers AM，Gosselin R，Simard JS，et al. In-line near infrared spectroscopy monitoring of pharmaceutical powder moisture in a fluidised bed dryer：an efficient methodology for chemometric model development [J]. Can J Chem Eng，2012，90（2）：299-303.

[10] 王晴，徐芳芳，张欣，等 . 在线近红外光谱监测桂枝茯苓胶囊流化床干燥过程水分的方法研究 [J]. 中草药，2019，50（22）：46-55.

[11] 柯樱，朱振明，张烁阳，等 . 硫酸羟氯喹颗粒水分近红外光谱在线定量模型的建立 [J]. 药学实践杂志，2021，39（1）：23-28.

[12] 闫研，殷果，刘凯双，等 . 近红外光谱法快速鉴别三九胃泰颗粒及其水分定量分析 [J]. 中国药房，2016，27（18）：2551-2554.

[13] 王闽予，刘丽萍，朱德全，等 . 甘草配方颗粒多指标成分的近红外快速检测方法 [J]. 今日药学，2020，30（6）：385-393.

[14] 张珮，王银红，江靖，等 . 便携式近红外光谱仪在果蔬品质定性和定量分析中的应用 [J]. 食品科技，2020，45（5）：287-292.

[15] 刘一鸣 . 便携式近红外谷物品质检测设备的设计与研制 [D]. 南京：南京农业大学，2020.

[16] 范林宏，何林，谭超群，等 . 基于便携式近红外光谱技术快速检测川贝母掺伪问题 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（3）：131-138.

[17] 修连存，郑志忠，陈春霞，等 . 国产便携式近红外药品分析仪原理及其应用 [J]. 现代科学仪器，2008，120（4）：120-123.

[18] 孙越 . 基于近红外光谱技术的心可舒片质量分析方法研究 [D]. 济南：山东大学，2021.

[19] Burggraeve A，Silva A，Tom V，et al. Development of a fluid bed granulation process control strategy based on real-time process and product measurements [J]. Talanta，2012，100（Complete）：293-302.

[20] 侯少瑞，冯艳春，胡昌勤 . 近红外光谱法快速分析注射用头孢曲松钠及其水分的含量 [J]. 药物分析杂志，2008，28（6）：936-941.

[21] 黄芳 . 近红外光谱分析技术在药品分析中的应用研究 [D]. 长春：吉林大学，2004.

[22] Passing H，Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry，Part Ⅰ. [J]. J Clin Chem Clin Biochem，1983，21（11）：709-720.

（收稿日期：2023-09-05；修回日期：2023-12-06）

威廉环毛蚓提取物蛋白质含量测定方法研究

蒋巧萍，宇泉霖，宋嘉佳，李寒冰，李敏枫，檀世祖，王天舒，蔡程科*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 建立威廉环毛蚓提取物蛋白质含量测定的最佳方法。**方法** 以氨基酸分析仪测定的威廉环毛蚓提取物中的氨基酸含量为指标，对蛋白质含量检测方法 Lowry 法 2、改良 Lowry 法、BCA 法、Bradford 法进行对比评价。**结果** Lowry 法 2、改良 Lowry 法、BCA 法、Bradford 法测定威廉环毛蚓提取物蛋白质含量（上清液）结果分别为 27.03%、45.85%、31.58%、11.11%，威廉环毛蚓提取物蛋白质含量（混悬液）的结果分别为 38.44%、52.39%、44.06%、11.56%。采用氨基酸分析仪法测定得到威廉环毛蚓提取物中游离氨基酸含量为 4.18%，将威廉环毛蚓提取物蛋白质酸水解之后测定总氨基酸含量为 48.53%。**结论** 在威廉环毛蚓提取物样品溶液的处理方式上，与样品上清液相比，样品混悬液的测定结果更接近样品中蛋白质的真实含量。以牛血清白蛋白（BSA）为对照品，相较于 Lowry 法 2、改良 Lowry 法和 Bradford 法，BCA 法更适宜用于威廉环毛蚓提取物中的蛋白质含量测定。

关键词： 威廉环毛蚓；蛋白质；Lowry 法 2；改良 Lowry 法；BCA 法；Bradford 法；氨基酸自动分析仪

中图分类号： R284.1 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2024)04-1048-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.034

Determination of protein content in the extract from *Pheretima guillelmi*

JIANG Qiao-ping, YU Quan-lin, SONG Jia-jia, LI Han-bing, LI Min-feng, TAN Shi-zu, WANG Tian-shu, CAI Cheng-ke* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To establish an optimal method determine the protein content in the extract from *Pheretima guillelmi*. **Methods** Amino acid content of the extracts from *Pheretima guillelmi* determined by amino acid analyzer was used as an index for the comparative evaluation of protein content assay methods namely Lowry's method 2, modified Lowry's method, BCA method and Bradford method. **Results** The protein content (supernatant) by Lowry's method 2, modified Lowry's method, BCA method, and Bradford's method was 27.03%, 45.85%, 31.58%, and 11.11%, and that of suspension was 38.44%, 52.39%, 44.06%, and 11.56%, respectively. We used the amino acid analyzer to obtain a free amino acid content of 4.18%, and the total amino acid content was 48.53% after acid hydrolysis of the protein. **Conclusion** Considering the way the sample solution is handled, the sample suspension is closer to the real content of protein in the sample as compared to the sample supernatant. Bovine albumin (BSA) was used as a control, the BCA method is more suitable for the determination of protein content in the extract of *Pheretima guillelmi* as compared to Lowry's method 2, modified Lowry's method and Bradford method.

Key words: *Pheretima guillelmi*; protein; Lowry's method 2; modified Lowry's method; BCA method; Bradford method; amino acid auto analyzer

地龙又名蚯蚓，具有镇惊通络、止咳平喘的功效。地龙来源于钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima as-*

基金项目： 国家科技重大专项研发项目（No.2011ZX09201-201-15）；北京市科技计划专项研发项目（No.Z16010101390）。

作者简介： 蒋巧萍，女，硕士研究生，主要从事中药新药研发及中药新剂型与新制剂研究，email：2542743143@qq.com ***通信作者：** 蔡程科，男，博士，教授，主要从事中药新剂型与新制剂研究，email：cck98@126.com

pergillum（E.Perrier）、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi*（Michaelsen）或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体。前一种习称为“广地龙”，后三种习称为“沪地龙”[1]。地龙具有蛋白质[2]、核苷类[3]、脂质[4]、多糖[5]、微量元素等成分。其中，关于地龙蛋白的研究较多，地龙蛋白具有广泛的药理作用，如抗凝[6]、促纤溶[7]、促进创伤修复[8]、改善勃起功能障碍[9-10]等。

近年来由于地龙价格上涨，药材品质参差不齐，中药质量优劣事关临床疗效，目前许多研究发现蛋白质成分在地龙治疗疾病过程中发挥着重要作用，因此地龙蛋白质的定量十分重要，寻求一种简便、快速、准确且适合地龙蛋白质含量的测定方法，对地龙品种质量及药效研究具有重要作用。2020 年版《中国药典》中的蛋白质含量测定方法共有 6 种，包括直接测定蛋白质含量的方法（Lowry 法、双缩脲法、BCA 法、Bradford 法及紫外 - 可见分光光度法）和间接测定的方法（通过测量样品中氮的含量来间接测定蛋白质的含量的凯氏定氮法）[11]。蛋白质的分子量可从几百到几十万不等，氨基酸的组成亦存在较大差异，采用上述比色法测得的威廉环毛蚓提取物中蛋白质含量存在差异。本实验使用的威廉环毛蚓提取物样品为威廉环毛蚓鲜品经过一系列处理，硫酸铵富集蛋白质后的冻干粉末。由于本样品在前期制备富集蛋白质过程中引入了硫酸铵，铵离子在一定程度上会影响凯氏定氮法的结果，故本研究未选用此法。氨基酸为蛋白质的基本单位，运用氨基酸分析仪测定氨基酸的含量，可得到威廉环毛蚓中蛋白质的大致含量。本研究将不同比色法测得的蛋白质含量与氨基酸分析仪测定得到的蛋白质氨基酸含量进行比较，以确定最适合威廉环毛蚓蛋白质含量测定的方法。

1　仪器和试药

1.1　仪器

紫外分光光度计（上海舜宇恒平科技仪器有限公司）；KQ-400DB 型数控超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司）；H1750 型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；BT125D 型电子分析天平（北京赛多利斯有限公司）；HT-1010 氨基酸自动分析仪（青岛海泰亿诺科技有限公司）；电热鼓风恒温机（北京北方利辉试验仪器设备有限公司）。

1.2　试药

BCA 试剂盒（批号：092622230406，碧云天生物技术）；改良 Lowry 法蛋白定量试剂盒（批号：M06IR214352）、Bradford 法蛋白定量试剂盒（批号：J29IR221445）（上海源叶生物科技有限公司）；牛血清白蛋白（BSA，批号：C14037785，生物技术级，上海麦克林生化科技有限公司）；福林酚（批号：N2304030002，1 mol • L^{-1}，南京都莱生物技术有限公司）；无水硫酸铜 [批号：A2224073，纯度：98%，阿拉丁试剂（上海）有限公司]；脱氧胆酸钠（批号：0412-RE-0049，广州佳途科技股份有限公司）；三氯乙酸（批号：LL60W32，纯度：99%，北京百灵威科技有限公司）；氨基酸混合标准物质 [批号：GBW（E）00062/23001，北京北方伟业计量技术研究院]；磺基水杨酸（批号：20220113，国药集团化学试剂有限公司）；纯净水（娃哈哈集团）。

威廉环毛蚓提取物（批号：20191011，哈尔滨九信医药科技有限公司，规格：500 g/ 袋，纤溶效价＞ 25 000 U • mg^{-1}）。

2　方法和结果

2.1　Lowry 法 2

因威廉环毛蚓提取物中含有硫酸铵，对 Lowry 法测定存在干扰，因此采用 Lowry 法 2 进行研究，并进行方法学考察[12]。

2.1.1　相关溶液的配制　取 1% 氢氧化钠溶液 200 mL 与 5% 碳酸钠溶液 200 mL 混合，加水稀释定容至 500 mL，得试剂 A。取 2.98% 二水合酒石酸二钠溶液 100 mL 与 1.25% 硫酸铜溶液 100 mL 混合，加水稀释定容至 250 mL，得试剂 B，临用时新制。取试液 A 与试液 B 按 50∶1 的比例混合，得试剂 C，临用时新制。取去氧胆酸钠适量，加水制成 1.5 mg • mL^{-1} 的去氧胆酸钠溶液。称取 7.2 g 三氯醋酸，加水溶解定容至 10 mL，得三氯醋酸溶液。

2.1.2　BSA 对照品溶液配制　精密称定 BSA 100 mg，加水溶解，转移至 100 mL 量瓶中，定容至刻度，摇匀，即得 1 mg • mL^{-1} 的 BSA 对照品溶液。

2.1.3　威廉环毛蚓提取物供试品溶液的制备

① 混悬液：取威廉环毛蚓提取物约 40 mg，精密称定，置于 50 mL 离心管中，精密加入纯净水 40 mL，涡旋 1 min，称量；25 ℃超声提取 15 min，获得 1 mg • mL^{-1} 的威廉环毛蚓提取物混悬液。

② 上清液：取上述混悬液后，离心 20 min（8000 r • min^{-1}），取上清液即获得 1 mg • mL^{-1} 的威廉环毛蚓提取物上清液。

2.1.4　线性试验　精密量取 BSA 对照品溶液 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mL，置于 10 mL 离心管中，标记为 0 ～ 5 号，加水补足至 1 mL，加入脱氧胆酸钠溶液 0.1 mL，涡旋混匀，室温放置 10 min，加入三氯乙酸溶液 0.1 mL，涡旋混匀，在 3000 g 条件下离心 30 min，移除上清液。蛋白质沉淀用试剂 C 1 mL 复溶后，再加入试剂 C 5 mL，涡旋混匀，室温放置 10 min，加入福林

酚试剂 0.5 mL，立即混匀，室温放置 30 min。以 0 号管作为空白，在 750 nm 处测定吸光度。以对照品溶液质量浓度（mg • mL^{-1}）为横坐标（*C*），吸光度值为纵坐标（*A*），进行线性回归，得到回归方程。另精密量取供试品溶液 0.5 mL，加水补足至 1 mL，同法测定，从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度，并乘以稀释倍数，即得。回归方程及蛋白质含量测定结果见表 1。

2.1.5　方法学考察

① 精密度考察：按照“2.1.3”项下①方法制备供试品，按照“2.1.4”项下方法进行测定，连续测定 6 次，记录吸光度值，经计算吸光度 *RSD* 值为 0.10%，表明仪器的精密度良好。

② 重复性考察：按照“2.1.3”项下①方法制备供试品，按照“2.1.4”项下方法进行测定，平行操作 6 次，记录吸光度值，计算得蛋白质含量的 *RSD* 值为 2.9%，表明样品重复性良好。

③ 稳定性考察：按照“2.1.3”项下①方法制备供试品，按照“2.1.4”项下方法进行测定，90 min 内每隔 15 min 进行一次测定。记录吸光度值，计算得蛋白质含量的 *RSD* 值为 2.4%，表明在 90 min 内样品显色稳定性良好。

④ 加样回收试验考察：取威廉环毛蚓提取物约 20 mg，精密称定，精密加入 BSA 约 8 mg，按照“2.1.3”项下①方法制备供试品溶液，按照“2.1.4”项下方法进行测定，平行操作 6 次，计算加样回收率及 *RSD* 值。结果平均回收率为 101.8%，*RSD* 值为 1.4%，表明此方法可行。

2.2　改良 Lowry 法 [13]

2.2.1　相关溶液　按改良 Lowry 法蛋白定量试剂盒说明书制备。同“2.1.2”项下方法制备对照品溶液，同“2.1.3”项下①法和②法制备混悬液和上清液供试品溶液。

2.2.2　线性试验　精密吸取对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于具塞试管中，标记为 0 ～ 5 号，分别加水补足至 1.0 mL，再加入碱性铜溶液（现配现用）5 mL，混合均匀后室温放置 10 min，快速加入福林酚试剂 0.5 mL，室温放置 30 min，在 750 nm 波长处测定其吸光度，同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液质量浓度（mg • mL^{-1}）为横坐标（*C*），吸光度值为纵坐标（*A*），进行线性回归，得到回归方程。另精密量取供试品溶液 0.5 mL，加水补足至 1 mL，同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度，并乘以稀释倍数，即得。回归方程及蛋白质含量测定结果见表 1。

2.3　BCA 法 [14]

2.3.1　相关溶液　按 BCA 试剂盒说明书制备。同“2.1.2”项下方法制备对照品溶液，同“2.1.3”项下①法和②法制备混悬液和上清液供试品溶液。

2.3.2　线性试验　精密吸取对照品溶液 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mL 于具塞试管中，标记为 0 ～ 5 号，分别加水补足至 0.25 mL。精密加入铜 -BCA 试剂 5.0 mL，立即混匀，置于 37 ℃下反应，反应时间为 30 min，于 562 nm 波长处测定吸光度值，同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液质量浓度（mg • mL^{-1}）为横坐标（*C*），吸光度值为纵坐标（*A*），进行线性回归，得到回归方程。精密量取供试品溶液 0.25 mL，同法测定，从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度，并乘以稀释倍数，即得。回归方程及蛋白质含量测定结果见表 1。

2.4　Bradford 法 [15]

2.4.1　相关溶液　按 Bradford 法蛋白定量试剂盒说明书制备。同“2.1.2”项下方法制备对照品溶液，同“2.1.3”项下①法和②法制备混悬液和上清液供试品溶液。

2.4.2　线性试验　精密吸取对照品溶液 0.0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 mL，分别置具塞试管中，标记为 0 ～ 5 号，各加水至 0.1 mL，再分别加入酸性染色液 5.0 mL，立即混匀，立即在 595 nm 的波长处测定吸光度，同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液质量浓度（mg • mL^{-1}）为横坐标（*C*），吸光度值为纵坐标（*A*），进行线性回归，得到回归方程。精密量取供试品溶液 0.1 mL，同法测定，计算供试品溶液中的蛋白质浓度，并乘以稀释倍数，即得。回归方程及蛋白质含量测定结果见表 1。

表 1　4 种比色法的回归方程、线性范围、R^2 和蛋白质含量

Tab 1　Regression equation，linearity，R^2，and protein content of the 4 colorimetric methods

方法	回归方程	线性范围 /（mg • mL^{-1}）	R^2	蛋白质含量（上清液）/%	蛋白质含量（混悬液）/%
Lowry 法 2	$A = 2.0328C + 0.0436$	0.04998 ～ 0.2499	0.9990	27.03	38.44
改良 Lowry 法	$A = 0.5968C + 0.2344$	0.1999 ～ 0.9996	0.9976	45.85	52.39
BCA 法	$A = 0.6735C + 0.0227$	0.2000 ～ 1.000	0.9973	31.58	44.06
Bradford 法	$A = 0.7083C + 0.0301$	0.1000 ～ 0.8000	0.9956	11.11	11.56

2.5　氨基酸分析仪法

2.5.1　色谱条件　色谱柱：磺酸型阳离子树脂交换柱；流动相 A 为 0.04 mol • L^{-1} 柠檬酸钠缓冲液（pH 3.45），B 为 0.07 mol • L^{-1} 柠檬酸钠缓冲液（pH 10.85），C 为 0.50 mol • L^{-1} 氢氧化钠再生液；进样体积：20 μL；柱温：50 ～ 70 ℃；流速：

250 μL • min $^{-1}$；反应器温度：115 ℃；洗脱时间：90 min；检测波长：570 nm 和 440 nm。

2.5.2　氨基酸混合对照品溶液制备　精密量取氨基酸混合溶液标准物质 0.1 mL，用样品稀释液定容至 1 mL。

2.5.3　氨基酸样品溶液制备

① 总氨基酸溶液的制备：参照 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准食品中氨基酸的测定》[16]，取威廉环毛蚓提取物约 30 mg，精密称定，在水解管中加入 15 mL 6 mol • L $^{-1}$ 盐酸溶液。向其中充入氮气，拧紧螺丝盖。将其放入 110 ℃的电热鼓风恒温箱内，水解 22 h，取出，冷却至室温，将水解液过滤至 50 mL 量瓶中，用少量水冲洗水解管，并入同一量瓶中，定容。吸取 1 mL 滤液置 25 mL 试管中，用试管蒸发仪在 50 ℃下减压干燥，干燥后用 2 mL 水溶解，再次减压干燥，蒸干。再加入 2 mL 柠檬酸钠缓冲溶液溶解，振荡摇匀，0.22 μm 滤膜滤过，平行制备 3 份。

② 游离氨基酸溶液的制备：参照 NY/T 1975—2010《水溶肥料游离氨基酸含量的测定》[17]，取威廉环毛蚓提取物约 1.5 g，精密称定，置于 250 mL 量瓶中。充分溶解后，加水至刻度，混匀，离心，吸取上清液 2 mL 于 10 mL 离心管中，准确加入 2 mL 磺基水杨酸溶液，混匀，放置 1 h。准确加入 1 mL EDTA-Na 溶液和 1 mL 盐酸溶液，混匀，离心 15 min。吸取上清液 1 mL，蒸干。准确加入 2 mL 的柠檬酸钠缓冲液溶解，振荡混匀，0.22 μm 滤膜滤过，平行制备 3 份。

2.5.4　实验结果

① 系统适用性考察：将“2.5.2”和“2.5.3”项下制备得到的氨基酸混合对照品溶液、威廉环毛蚓总氨基酸溶液和游离氨基酸溶液采用磺酸型阳离子树脂交换柱分离，茚三酮醋酸溶液柱后衍生，使用检测器在 570 nm、440 nm 检测分离出的氨基酸的吸光度，并进行定量。结果表明，氨基酸混合标准溶液在 570 nm 和 440 nm 处检出的 16 种氨基酸均能达到良好的分离度。威廉环毛蚓总氨基酸和游离氨基酸样品溶液在目标峰处均无杂质峰干扰，说明该方法具有良好的专属性，见图 1。

② 含量测定结果：采用外标一点法进行计算。通过氨基酸自动分析仪测得威廉环毛蚓提取物总氨基酸含量为 48.53%，威廉环毛蚓提取物游离氨基酸含量为4.18%，不同氨基酸的具体含量见表2。

3　讨论与结论

本研究通过计算威廉环毛蚓提取物中总氨基酸和游离氨基酸的差值，得出威廉环毛蚓提取物

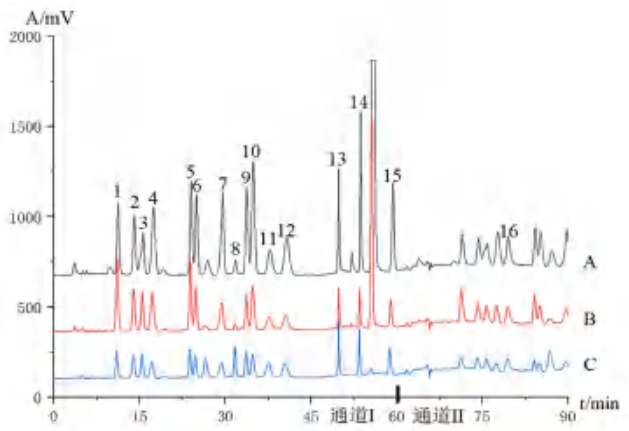


图 1　游离氨基酸（A）、总氨基酸（B）和氨基酸混合溶液标准物质（C）的色谱图

Fig 1　Chromatogram of free amino acids (A), total amino acids (B) and amino acid mixed solution standards (C)

注（Note）：通道Ⅰ（Channel Ⅰ）：570 nm；通道Ⅱ（Channel Ⅱ）：440 nm；1. 天冬氨酸（Asp）；2. 苏氨酸（Thr）；3. 丝氨酸（Ser）；4. 谷氨酸（Glu）；5. 甘氨酸（Gly）；6. 丙氨酸（Ala）；7. 缬氨酸（Val）；8. 蛋氨酸（Met）；9. 异亮氨酸（Ile）；10. 亮氨酸（Leu）；11. 酪氨酸（Tyr）；12. 苯丙氨酸（Phe）；13. 组氨酸（His）；14. 赖氨酸（Lys）；15. 精氨酸（Arg）；16. 脯氨酸（Pro）。

表 2　16 种总氨基酸和游离氨基酸含量

Tab 2　Content of 16 total and free amino acids

氨基酸	总氨基酸含量 /%	游离氨基酸含量 /%	氨基酸	总氨基酸含量 /%	游离氨基酸含量 /%
Asp	5.87	0.24	Ile	2.95	0.31
Thr	3.32	0.20	Leu	4.03	0.46
Ser	2.67	0.16	Tyr	2.65	0.21
Glu	5.40	0.41	Phe	2.76	0.31
Gly	3.00	0.17	His	1.96	0.21
Ala	2.86	0.22	Lys	1.96	0.35
Val	3.19	0.32	Arg	2.97	0.40
Met	0.41	0.045	Pro	2.53	0.16

蛋白质中 16 种氨基酸的含量为 44.35%。由于在酸水解的条件下，天冬酰胺和谷氨酰胺的酰胺键被破坏，转化为天冬氨酸和谷氨酸，因此威廉环毛蚓提取物蛋白质中包括天冬酰胺和谷氨酰胺在内的 18 种氨基酸的含量大致为 44.35%。由于氨基酸以脱水缩合的形式形成蛋白质，实际蛋白质的含量会略少于测定得到的总氨基酸的含量，因此以氨基酸含量推算威廉环毛蚓提取物中蛋白质的含量约为 44%。

Lowry 法 2、改良 Lowry 法、BCA 法和 Bradford 法测定威廉环毛蚓提取物上清液的蛋白质含量结果分别为 27.03%、45.85%、31.58%、11.11%，混悬液的蛋白质含量结果分别为 38.44%、52.39%、44.06%、11.56%。从 4 种检测方法的结果可看出，混悬液中蛋白质含量均高于上清液，推测威廉环毛蚓提取物中含有部分脂溶性蛋白，在水中的溶

解度较低，导致上清液的测定结果低于混悬液。因此采用混悬液的形式进行蛋白质含量测定，更加符合威廉环毛蚓提取物中蛋白质的实际含量。

张云茹等[18]发现采用 Lowry 法测定蛋白质含量，当样品中的硫酸铵大于 0.13% 时就开始引起样品蛋白质含量测定值的降低，且随着样品硫酸铵浓度的增加，蛋白质含量测定值的偏差逐渐增加。威廉环毛蚓提取物在前期制备的过程中引入了硫酸铵，会导致 Lowry 法测定的结果低于实际值。因此，采用《中国药典》中的 Lowry 法 2，使用脱氧胆酸盐和三氯乙酸将威廉环毛蚓提取物中的蛋白质沉淀后再进行测定，其结果小于 44%。三氯乙酸沉淀的多为大分子蛋白质，且沉淀的蛋白量与三氯乙酸的浓度存在一定关系，少量蛋白质会存在于上清液中，造成部分损失[19]，从而导致蛋白质测量值低于实际值。

改良 Lowry 法测定结果高于 44%，推测可能是由于威廉环毛蚓提取物的蛋白质组成与标准品 BSA 之间存在差异。本研究后续采用紫外分光光度计直接测定相同浓度的 BSA 溶液和威廉环毛蚓提取物混悬液在 280 nm 下的吸光度，BSA 溶液的吸光度为 0.604，威廉环毛蚓提取物混悬液的吸光度为 1.367。相同浓度下威廉环毛蚓混悬液的吸光度高于 BSA 溶液，可能是威廉环毛蚓混悬液在 280 nm 处存在其他物质影响，或是威廉环毛蚓蛋白质中含有共轭双键的酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸的占比高于 BSA[20]。

Bradford 法的显色原理为考马斯亮蓝染料中内带负电荷的基团与蛋白质内带正电荷的赖氨酸、精氨酸、组氨酸残基结合，在波长 595 nm 处有最大吸收光，其吸光值与蛋白质含量成正比，从而可以测定蛋白质的含量[21]，该方法适合测定分子量大于 3000 的蛋白质，分子量较低的多肽及寡肽类成分显色较弱[22]。4 种方法测得的结果显示，Bradford 法测得的蛋白质含量明显少于 Lowry 法 2、改良 Lowry 法和 BCA 法，推测是威廉环毛蚓提取物中含有较多的寡肽类成分，与考马斯亮蓝染料显色较弱导致。

与 Lowry 法相比，BCA 法所用试剂及生成的呈色物质更加稳定，与 Lowry 法和 Bradford 法相比，BCA 法受杂质影响较小，测定不同蛋白质时测值变化差别小[23]。本研究结果显示，以混悬液样品的形式，采用 BCA 法测定威廉环毛蚓提取物中蛋白质的含量，其结果与氨基酸分析仪测定结果相近，因此可用 BCA 法快速、简便、较为准确地测定威廉环毛蚓中蛋白质的含量，并为其他类似样品的蛋白质含量检测提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：127.

[2] 王艳丽，宁宇，丁莹 . 地龙的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息，2022，39（12）：86-89.

[3] 周恒，曹依敏，苗水，等 . HPLC 法测定沪地龙中 7 个核苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2018，38（1）：97-103.

[4] 巩晓宇，陆燕萍，严俊珍，等 . 地龙和水蛭脂质成分的比较分析 [J]. 中国药师，2022，25（8）：1486-1489.

[5] 丁冠华，李峰，康廷国 . 水蛭地龙药材商品中总多糖含量测定 [J]. 中华中医药学刊，2010，28（5）：986-987.

[6] 李淑楠，金慧，倪开岭，等 . 酶解水蛭地龙混合药渣的工艺研究及其产物的抗凝活性评价 [J]. 天津中医药，2022，39（3）：392-396.

[7] 杨麒琳，马韫楠，杨万青，等 . 通俗环毛蚓、参环毛蚓、赤子爱胜蚓的分子鉴定及纤溶、抗凝活性对比 [J]. 中南药学，2023，21（2）：427-432.

[8] 田林华，姚琳，冯丽娜，等 . 广地龙纯化蛋白促进创伤修复作用机制研究 [J]. 世界中医药，2023，18（9）：1236-1239.

[9] 张爱平，赵艳，刘黎明，等 . 地龙蛋白调节 Nrf2/ARE 信号通路改善糖尿病大鼠阴茎勃起功能障碍作用及机制 [J]. 时珍国医国药，2023，34（3）：577-580.

[10] 张爱平，武兵兵，刘黎明，等 . 地龙蛋白改善糖尿病勃起功能障碍大鼠的作用机制 [J]. 中国男科学杂志，2022，36（4）：29-35.

[11] 中国药典 2020 年版 . 三部 [S]. 2020：489-491.

[12] 王晔，耿其秀，秦亚男，等 . 测定含甘油牛血清白蛋白样品 Lowry 法的优化及验证 [J]. 中国生物制品学杂志，2019，32（4）：449-453.

[13] 刘颖，刘春雨，曹广超，等 . 美洲大蠊粉发酵前后水溶性活性物质含量对比研究 [J]. 化工时刊，2017，31（3）：1-3，6.

[14] 彭洪兵，袁仕君，尹聪，等 . 地龙蛋白两种提取方法的活性比较 [J]. 时珍国医国药，2021，32（8）：1860-1862.

[15] 任雨贺，刘淑莹，万茜淋 . 人参蛋白质不同提取方法及含量的比较 [J]. 安徽农业科学，2018，46（11）：1-3，9.

[16] GB 5009.124—2016. 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定 [S]. 2016.

[17] NY/T 1975—2010. 水溶肥料游离氨基酸含量的测定 [S]. 2010.

[18] 张云茹，周跃刚，范守城，等 . 硫酸铵存在下的改良福林 - 酚试剂法 [J]. 重庆工学院学报（自然科学版），2008（7）：159-162，166.

[19] 徐娟，吕嘉枥 . 乳蛋白水解液中多肽含量测定方法的研究 [J]. 食品科技，2010，35（12）：275-278.

[20] Zhu DM，Qian F，Wu YM，et al. Determination of protein concentration for protein-protein conjugates using ultraviolet absorption [J]. J Immunol Methods，2013，387（1-2）：317-321.

[21] 韩富亮，袁春龙，郭安鹊，等 . 二喹啉甲酸法（BCA）分析蛋白多肽的原理、影响因素和优点 [J]. 食品与发酵工业，2014，40（11）：202-207.

[22] 杨桂兰，郭学平 . Lowry 法和 Bradford 法测定玻璃酸钠中蛋白质含量的比较 [J]. 中国生化药物杂志，2003，24（3）：131-133.

[23] 郭琳琳，朱艳，张小为 . 蛋白质定量方法的研究现状 [J]. 中国医学工程，2011，19（4）：156-157.

（收稿日期：2023-11-15；修回日期：2023-12-25）

基于 UPLC 指纹图谱及含量测定结合化学模式识别法比较不同产地枇杷花的差异

胡孔兴[1, 2]，何鹏[2]，张萍[2]，陈向涛[1*]（1. 安徽医科大学药学院，合肥　230032；2. 芜湖市食品药品检验中心，安徽 芜湖　241000）

摘要：目的　建立枇杷花的 UPLC 指纹图谱，测定枇杷花中 4 种化合物的含量，并采用化学模式识别法分析比较不同产地枇杷花的差异。**方法**　使用 UPLC 建立不同产地枇杷花的指纹图谱，测定金丝桃苷、绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷的含量，对 20 批次的枇杷花的指纹图谱开展相似度评价、聚类分析、偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）及主成分分析，对不同产地枇杷花进行分类并筛选出差异标志成分。**结果**　建立了枇杷花的 UPLC 指纹图谱，标记出 10 个共有峰，指认出 4 个成分，20 批枇杷花相似度为 0.970 ～ 0.999。通过聚类分析和主成分分析可将不同产地的枇杷花分为两类，OPLS-DA 分析结果显示金丝桃苷、绿原酸、异槲皮苷可作为评价不同产地枇杷花的差异标志成分。含量测定结果显示不同产地枇杷花的 4 种成分含量存在一定差异。**结论**　建立的枇杷花 UPLC 指纹图谱及成分定量方法高效稳定，化学模式识别分析方法结果可靠，可为枇杷花的质量研究提供参考。

关键词：枇杷花；指纹图谱；聚类分析；化学模式识别
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1053-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.035

Loquat flowers from different regions by HPLC fingerprint and content determination combined with chemical pattern recognition

HU Kong-xing[1, 2], HE Peng[2], ZHANG Ping[2], CHEN Xiang-tao[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui Medical University*, *Hefei* 230032; 2. *Wuhu Testing Center for Food and Drug Control*, *Wuhu Anhui* 241000)

Abstract: Objective　To establish the UPLC fingerprint of loquat flowers, determine the content of four components in loquat flowers, and use chemical pattern recognition to compare the differences in loquat flowers from various origins. **Methods**　The fingerprints of loquat flowers from different origins were established by UPLC, the content of hyperoside, chlorogenic acid, isoquercetin, and quercetin-3-rhamnoside was determined. The similarity evaluation, cluster analysis, partial least squares discriminant analysis and principal component analysis of the fingerprints of 20 batches of loquat flowers were conducted, loquat flowers from different origins classified and difference markers determined. **Results**　The UPLC fingerprint of loquat flowers was established, 10 common fingerprint peaks were calibrated and 4 components were identified, the similarities of 20 batches of loquat flowers ranged 0.970 ～ 0.999. The samples were divided into two categories by cluster analysis and principal component analysis. The OPLS-DA analysis showed that hyperoside, chlorogenic acid and isoquercetin served as difference markers to evaluate loquat flowers from different origins. There were differences in the chemical components of loquat flowers from different habitats. **Conclusion**　The established UPLC fingerprint and component quantification method for loquat flowers is effective and stable, which together with chemical pattern recognition, can provide reference for the quality research of loquat flowers.

Key words: loquat flower; fingerprint; cluster analysis; chemical pattern recognition

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82274124）；安徽省药品监督管理局科技创新项目（No.AHYJ-KJ-202012）。
作者简介：胡孔兴，男，硕士研究生，主要从事中药质量控制研究，email：1403853589@qq.com　*通信作者：陈向涛，男，副教授，主要从事中药药理研究，email：chenxt@ustc.edu.cn

中药枇杷花为蔷薇科枇杷 *Eriobotrya japonica*（Thunb.）Lindl. 的干燥带花蕾的花序[1]，主产于四川、江苏、浙江等省份[2]。枇杷花的药用历史由来已久，始载于明代《本草纲目》[3]，具有疏风止咳的功效[4]，现代研究表明，枇杷花含有多种活性化学成分，如金丝桃苷、槲皮苷、山楂酸、异槲皮苷、熊果酸等[5]。我国是全球最大的枇杷生产国，且枇杷的花期长，花量多[6]，具备巨大的应用及研究潜力，虽然该品种未被《中国药典》收录，但在四川[7]、安徽[8]等多省的地方标准中均有收载。在这些标准中大多以单指标成分熊果酸作为枇杷花的质控成分，但前期研究发现熊果酸在枇杷花中的含量显著低于枇杷其他部位的含量，且熊果酸专属性较低，山楂、木瓜、马鞭草等均选择熊果酸作为质控成分[9]。另外，中药成分往往比较复杂，仅针对一个或少数几个成分进行研究难以反映枇杷花药材质量全貌。目前，对于枇杷花相关研究较少，研究主要集中在药理药效、理化鉴别及含量测定等方面，对其指纹图谱的研究鲜见报道。故本研究建立了枇杷花的 UPLC 指纹图谱，并进行 4 种成分的定量分析，结合化学模式识别分析方法多方面评价不同产地枇杷花的质量，筛选出不同产地枇杷花质量差异标志成分，以期为枇杷花综合质量控制研究提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LC-30A 超高效液相色谱仪（配备 DAD，日本岛津）；XP205 十万分之一电子天平（瑞士梅特勒）；ME36S 百万分之一电子分析天平（德国赛多利斯）；P120H 超声仪（德国 Elma）。

1.2　试药

对照品异槲皮苷（纯度：97.2%，批号：111809-201804）、金丝桃苷（纯度：94.9%，批号：111521-201809）、槲皮苷（纯度：93.5%，批号：111538-202007）、绿原酸（纯度：96.1%，批号：110753-202018）（中国食品药品检定研究院）；蒸馏水（屈臣氏食品饮料公司）；色谱纯乙腈及分析纯甲醇（国药化学试剂公司）等。

不同产地枇杷花样品 20 批（编号 P1 ～ P20），由《安徽省中药材标准》样品采集组采集，以及采购自安徽亳州药材市场、广西玉林药材市场、成都荷花池中药材市场等国内主流药材市场，以上样品经芜湖市食品药品检验中心主管中药师何鹏鉴定为蔷薇科植物枇杷的花，样品产地信息及编号见表 1。

表 1　枇杷花产地来源信息

Tab 1　Source information of loquat flowers

编号	产地	编号	产地	编号	产地
P1	安徽	P8	四川	P15	广西玉林
P2	安徽	P9	福建漳州	P16	广西
P3	安徽合肥	P10	福建漳州	P17	重庆
P4	安徽黄山	P11	福建漳州	P18	重庆
P5	安徽黄山	P12	广东梅州	P19	江苏苏州
P6	四川	P13	广东河源	P20	贵州
P7	四川	P14	广东广州		

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱选用 SunFire C18（3.0 mm×150 mm，5 μm）柱，流动相：乙腈（A），0.1% 磷酸（B），按表 2 条件梯度洗脱；进样量：5 μL；检测波长：360 nm；流速：0.30 mL·min^{-1}；柱温：35 ℃。

表 2　梯度洗脱条件

Tab 2　Gradient elution procedures

时间 /min	流动相 A/%
0 ～ 20	8
20 ～ 21	8 → 10
21 ～ 33	10
33 ～ 34	10 → 12
34 ～ 49	12
49 ～ 50	12 → 15
50 ～ 63	15
63 ～ 64	15 → 19
64 ～ 83	19

2.2　对照品溶液的制备

分别精密称取对照品槲皮苷、金丝桃苷、异槲皮苷、绿原酸 5.440、5.870、5.513、5.110 mg，置不同的 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释制成质量浓度分别为 508.64、557.06、535.82、491.08 μg·mL^{-1} 的对照品储备液；以上 4 种储备液各精密移取 1 mL，置同一 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释制成质量浓度分别为 101.73、111.41、107.16、98.22 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，备用。

2.3　供试品溶液的制备

取枇杷花粉末（过 24 目筛）约 1 g，精密称定，置 100 mL 的具塞锥形瓶中，加入甲醇 25 mL 后，称重并记录，超声（37 kHz，600 W）处理 30 min，放凉，称重，用甲醇补充到初始重量，摇匀后用微孔滤膜过滤，备用。

2.4　方法学考察

2.4.1　精密度试验　精密称取 P1 号枇杷花粉末（过 24 目筛）约 1 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次，

选择 7 号共有特征峰（金丝桃苷）作为参照，分别计算各共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积，结果相对保留时间 *RSD* 均＜ 0.37%、相对峰面积的 *RSD* 均＜ 1.7%，表明仪器精密度较好。

2.4.2　重复性试验　精密称取 P1 号枇杷花粉末（过 24 目筛）约 1 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，平行制备 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样测定，选择 7 号共有特征峰（金丝桃苷）作为参照，分别计算各共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积，结果相对保留时间 *RSD* 均＜ 0.55%、相对峰面积的 *RSD* 均＜ 1.5%，表明该方法的重复性较好。

2.4.3　稳定性试验　精密称取 P1 号枇杷花粉末（过 24 目筛）约 1 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别于制备后 0、2、4、8、16 及 24 h 进样测定，选择 7 号共有特征峰（金丝桃苷）作为参照，分别计算各共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积，结果相对保留时间的 *RSD* 均＜ 0.67%、相对峰面积的 *RSD* 均＜ 2.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5　UPLC 指纹图谱的建立及分析

2.5.1　UPLC 指纹图谱的建立与共有峰的指认　取各批次枇杷花粉末（P1 ～ P20），按“2.3”项下方法制备枇杷花供试品溶液，按“2.1”项下方法进样测定，记录 20 批枇杷花的图谱。采用国家药典委颁布的 2012 版指纹图谱相似度评价软件对不同产地枇杷花样品图谱进行处理，选择 P1 号枇杷花的图谱为参照图谱，选平均数法，点击生成对照指纹图谱 R。共标记共有的特征峰 10 个，其中 4 个峰用对照品指认，依次为 2 号共有峰（绿原酸）、7 号共有峰（金丝桃苷）、8 号共有峰（异槲皮苷）、9 号共有峰（槲皮苷）。20 批枇杷花药材 UPLC 指纹图谱叠加图见图 1，混合对照品图谱、枇杷花样品图谱与共有峰指认见图 2。

2.5.2　相似度评价　使用国家药典委颁布的 2012 版指纹图谱相似度评价软件，以对照指纹图谱 R 为参照，评价 20 批不同产地枇杷花的相似度，结果见表 3。20 批枇杷花的相似度为 0.970 ～ 0.999，表明不同产地的枇杷花样品指纹图谱的一致性较高。以 7 号共有峰（金丝桃苷）作为参照峰，分别计算出 20 批枇杷花的共有特征峰的相对保留时间 *RSD* 均＜ 1.9%、相对峰面积 *RSD* 值为 32.06% ～ 61.08%。结果说明不同产地的枇杷花的化学成分组成相似，但样品间共有化学成分的含量存在一定差异。

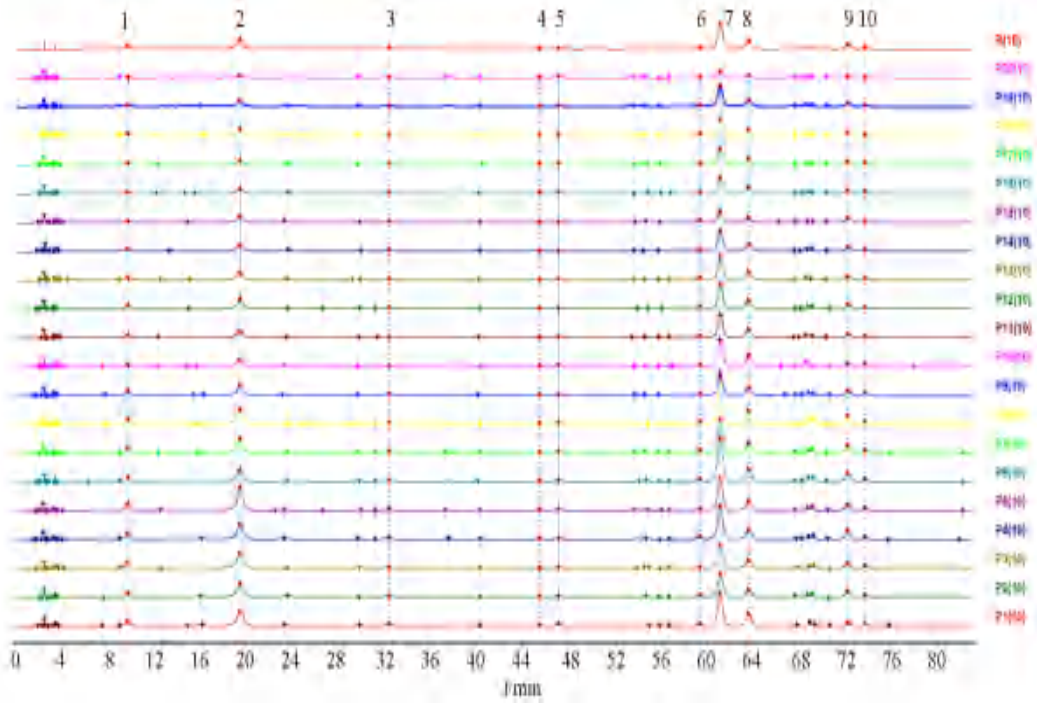


图 1　不同产地枇杷花的 UPLC 指纹图谱

Fig 1　UPLC fingerprint chromatograms of loquat flowers from different regions

2.6　化学模式识别分析

2.6.1　聚类分析　将 20 批枇杷花的 10 个共有特征峰的峰面积数据输入 SPSS 27.0 统计分析软件，以平方欧氏距离为样品间距离，采用组间连接法开展不同产地枇杷花的聚类分析，见图 3。根据图 3 可知，20 批枇杷花样品可以分成两大类，其

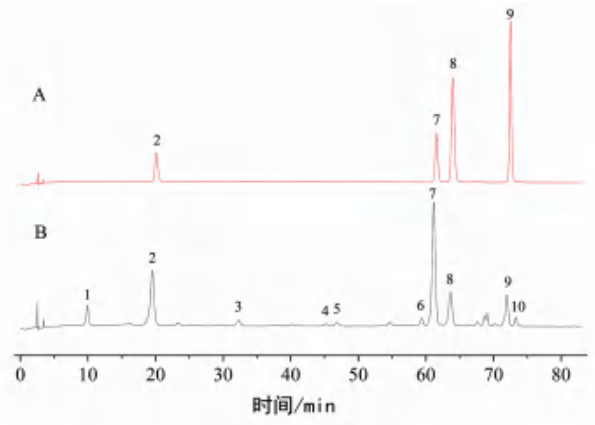


图 2　对照品（A）和枇杷花（B）的 UPLC 图

Fig 2　UPLC chromatograms of reference substances（A）and the loquat flowers（B）

2. 绿原酸（chlorogenic acid）；7. 金丝桃苷（hyperoside）；8. 异槲皮苷（isoquercetin）；9. 槲皮苷（quercetin-3-rhamnoside）

中产地为安徽和四川的 P1 ～ P8 号样品归为Ⅰ类，广东、广西、重庆、福建等产地的 P9 ～ P20 号样品归为Ⅱ类。

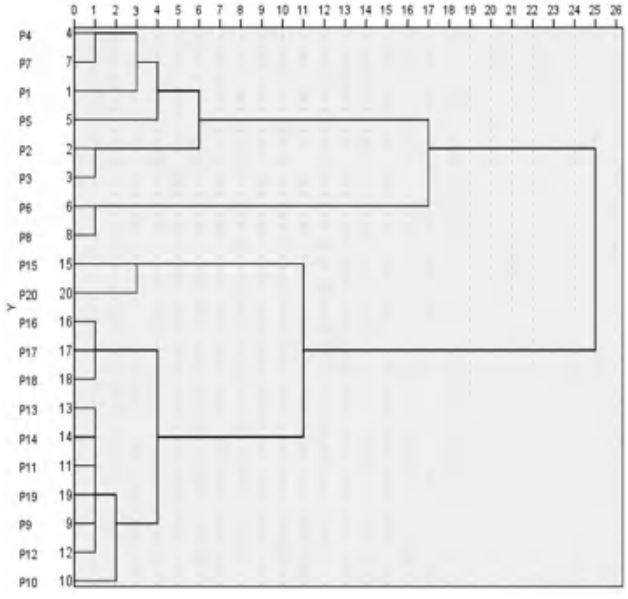


图 3　不同产地枇杷花的聚类分析结果

Fig 3　Cluster analysis of loquat flowers from different regions

表 3　不同产地枇杷花相似度评价结果

Tab 3　Similarity of loquat flowers from different regions

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
P1	0.990	P8	0.998	P15	0.978
P2	0.989	P9	0.998	P16	0.991
P3	0.970	P10	0.979	P17	0.982
P4	0.997	P11	0.991	P18	0.999
P5	0.970	P12	0.999	P19	0.993
P6	0.992	P13	0.996	P20	0.977
P7	0.998	P14	0.995		

2.6.2　主成分分析　20 批枇杷花的共有 UPLC 色谱峰的峰面积数据用 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析。建立 PCA 模型，累计贡献率 $R^2X = 0.823$，表明模型可较好地解释原始变量，得分见图 4。安徽和四川产枇杷花与其他产地的枇杷花样品大部分有明显分开的趋势，大体上可以分为两类，与聚类分析结果基本一致。但部分福建产枇杷花样品与安徽产枇杷花样品分开界限不够明显，因此需要进一步研究。

2.6.3　偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）　为了进一步分析不同产地枇杷花样品的差异，采用 SIMCA 14.1 软件在聚类分析和主成分分析的基础上，对 20 批枇杷花样品的数据进行 OPLS-DA 判别分析，建立 OPLS-DA 模型，得出的模型解释率参数 R^2X 为 0.941、R^2Y 为 0.928，模型预测能力参数 Q^2 为 0.812，说明本模型解释与预测能力较好，OPLS-DA 模型结果中四川、安徽产枇杷花与广东、广西、福建等其他省产的枇杷花样品有着更好的聚类和分离效果，这与主成分分析、聚类分析的结果一致，进一步验证了分析结果的可靠性，得分图见图 5。通过变量重要性投影得到 VIP 值，筛出导致不同产地枇杷花差异性的主要活性成分，VIP 值结果见图 6，以 VIP 大于 1 作为筛选标准，提取出了贡献最大的 3 个活性成分，依次为 7 号峰（金丝桃苷，VIP ＝ 1.981）、2 号峰（绿原酸，VIP ＝ 1.742）、8 号峰（异槲皮苷，VIP ＝ 1.006），说明这 3 个成分对不同产地枇杷花样品的分类具有显著影响，可作为评价安徽、四川枇杷花与其他产地枇杷花的差异标志成分。

2.7　含量测定

2.7.1　线性关系考察　取“2.2”项下 4 种对照品储备液，用甲醇逐级稀释成 6 种不同浓度的对照品溶液，按照“2.1”项下条件测定，用对照品质量浓度（X，μg • mL^{-1}）与峰面积（Y）建立标准曲线，计算回归方程，结果见表 4。

2.7.2　精密度试验　精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，按照“2.1”项下条件重复测定 6 次，记录 UPLC 色谱图，记录 4 种成分的色谱峰峰面积，异槲皮苷、绿原酸、槲皮苷、金丝桃苷峰面积的 *RSD* 依次为 0.97%、0.52%、0.70%、1.1%，结果显示该方法精密度良好。

2.7.3　稳定性试验　精密吸取枇杷花样品（编号：P1）的供试品溶液，依次在 0、4、8、16、32 及 48 h 进样，记录 4 种成分的峰面积数据，异槲皮苷、绿原酸、槲皮苷、金丝桃苷的峰面积的 *RSD* 值依次为 0.81%、0.73%、0.97%、1.1%，结果显示供试品溶液在 48 h 内稳定。

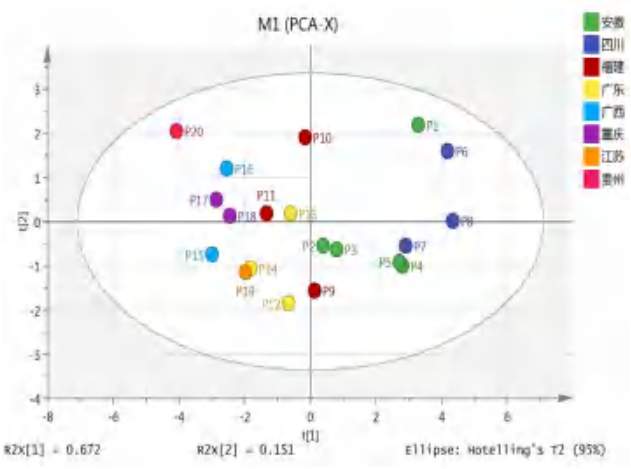


图 4　不同产地枇杷花 PCA 得分图

Fig 4　PCA score plot of loquat flowers from different regions

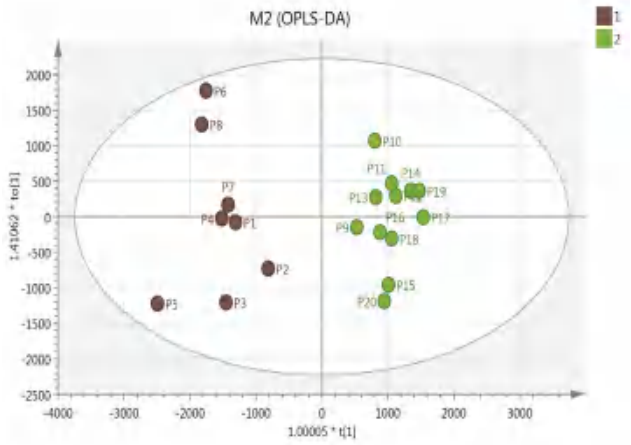


图 5　不同产地枇杷花 OPLS-DA 得分图

Fig 5　OPLS-DA score plot of loquat flowers from different regions

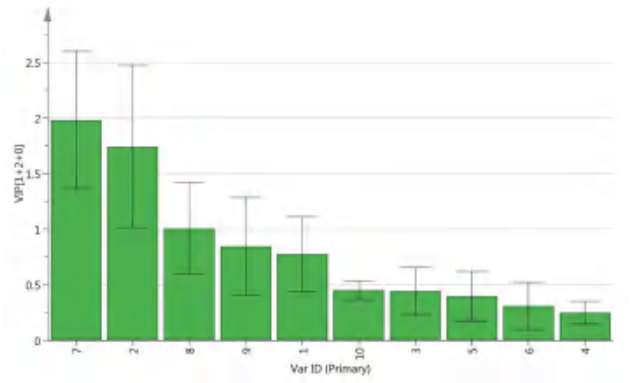


图 6　不同产地枇杷花差异标记成分 VIP 图

Fig 6　VIP diagram of loquat flowers from different regions

表 4　4 种有效成分的线性关系及线性范围

Tab 4　Linearity and range of 4 effective constituents

化合物	回归方程	线性范围 / (μg • mL^{-1})	r
金丝桃苷	$Y = 1.212\times10^{4}X - 4.853\times10^{3}$	27.9 ～ 557.1	0.9998
异槲皮苷	$Y = 2.960\times10^{4}X - 1.510\times10^{4}$	10.7 ～ 214.3	0.9999
槲皮苷	$Y = 3.318\times10^{4}X - 3.843\times10^{4}$	5.1 ～ 101.7	0.9999
绿原酸	$Y = 6.816\times10^{3}X + 1.488\times10^{5}$	24.6 ～ 491.1	0.9991

2.7.4　重复性试验　分别取同一份枇杷花样品（编号：P1）的粉末（过 24 目筛）制备供试品溶液，平行 6 份，按“2.1”项下条件测定，记录 4 种化合物的 UPLC 色谱峰峰面积数据，计算异槲皮苷、绿原酸、槲皮苷、金丝桃苷含量的 *RSD* 值分别为 0.55%、0.94%、0.72%、1.3%，表明供试品制备方法重复性良好。

2.7.5　回收试验　精密称取 6 份已知含量的枇杷花样品（编号：P1）粉末（过 24 目筛）0.5 g，置于 100 mL 的锥形瓶中，按照对照品与样品含量约 1∶1 的比例添加相应量的对照品，按“2.1”项下条件测定这 4 种化合物的峰面积，计算得到异槲皮苷、绿原酸、槲皮苷、金丝桃苷的平均回收率依次为 95.61%、102.22%、96.94%、104.45%，其 *RSD* 值依次为 2.4%、1.3%、3.0%、1.5%，均小于 3%，符合定量分析要求。

2.7.6　样品含量的测定　取 20 批枇杷花粉末（过 24 目筛）约 1 g，精密称定，按照“2.3”项下方法制备所需 20 批枇杷花样品的供试品溶液各两份，按“2.1”项下色谱条件进行测定分析，记录异槲皮苷、绿原酸、金丝桃苷及槲皮苷的 UPLC 色谱峰峰面积，然后采用外标法计算各成分的含量，所得结果见表 5。

表 5　不同产地枇杷花的含量测定 (n = 2，mg • g^{-1})

Tab 5　Content of loquat flowers from different regions (n = 2，mg • g^{-1})

编号	异槲皮苷	金丝桃苷	绿原酸	槲皮苷	总含量
P1	1.15	6.96	6.81	0.21	15.13
P2	0.73	5.75	6.28	0.46	13.22
P3	0.85	5.39	7.44	0.47	14.15
P4	0.95	7.94	7.01	0.69	16.59
P5	0.96	7.29	9.87	0.50	18.62
P6	1.27	10.20	5.45	0.77	17.69
P7	0.99	7.89	6.64	0.65	16.17
P8	1.34	10.61	7.01	0.75	19.71
P9	0.70	5.08	4.13	0.37	10.28
P10	1.05	5.78	2.61	0.23	9.67
P11	0.75	4.94	2.57	0.30	8.56
P12	0.79	5.46	3.89	0.33	10.47
P13	0.76	5.13	3.09	0.30	9.28
P14	0.74	5.03	2.94	0.32	9.03
P15	0.34	2.29	2.62	0.33	5.58
P16	0.58	3.62	2.02	0.28	6.5
P17	0.54	3.43	1.47	0.22	5.66
P18	0.54	3.70	2.71	0.21	7.16
P19	0.65	4.67	2.53	0.31	8.16
P20	0.25	1.32	1.04	0.18	2.79

3 讨论

本课题组在前期研究基础上选取了枇杷花中研究较多且药效作用比较明确的槲皮苷、金丝桃苷[10]、齐墩果酸、科罗索酸[11]等 8 个指标成分进行考察，同时对提取所用溶剂（50% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、乙醇）、提取时间（10、20、30、40 min）、检测波长（330、350、355、360、380 nm）及流动相（甲醇和 0.1% 磷酸、乙腈和 0.1% 磷酸）进行了考察，以分离度、共有峰面积、峰形及提取效率为考察指标[12]，最终确定本次研究的 4 个指标成分（金丝桃苷、槲皮苷、绿原酸、异槲皮苷）、提取条件（加甲醇超声提取 30 min）及色谱条件（即测定波长为 360 nm，流动相为乙腈和 0.1% 磷酸溶液）。在此基础上构建了枇杷花的 UPLC 指纹图谱，对包括主产区四川、安徽、广东以及重庆等在内 8 个产地的 20 批枇杷花样品进行了分析，图谱分离度良好，共标记了 10 个共有色谱峰，并指认了其中 4 个成分。通过相似度分析，20 批不同产地的枇杷花与对照指纹图谱相似度为 0.970 ～ 0.999，不同产地枇杷花的相似度均较高，表明各产地枇杷花成分组成差异较小。

20 批不同产地枇杷花中 4 种化合物的含量有一定差异，四川、安徽产枇杷花绿原酸和金丝桃苷含量以及 4 种成分总含量均明显高于其他产地枇杷花，四川产枇杷花与安徽产枇杷花 4 种成分的平均总含量接近，可能是由于两地处于同一纬度，气候环境较为接近所致。异槲皮苷在各产地枇杷花中的含量差异较大，四川、安徽产区异槲皮苷平均含量略高于其他产区，槲皮苷含量四川产区最高，其次是安徽、福建、广东，其他各省差异不大。以上 4 种成分含量在贵州产区均为最低。

通过聚类分析、主成分分析等可将 20 批枇杷花分为四川、安徽枇杷花与其他产地枇杷花两类。通过 OPLS-DA 筛选出 3 个差异标志物，为 7 号峰（金丝桃苷）、2 号峰（绿原酸）、8 号峰（异槲皮苷）。本研究发现，金丝桃苷、绿原酸、异槲皮苷成分可用于区分安徽、四川枇杷花与其他产地枇杷花，是枇杷花重要质控成分。现行各地方标准中枇杷花项下仅以单一成分作为质控指标，不能显著区分枇杷花各产地各部位的差异，且难以全面整体地对枇杷花的质量进行综合评价。因此，需要增补质控指标，建议可考虑增加本次研究的差异标志成分作为检测指标，从而有利于对不同产地枇杷花的品质进行更加科学全面的评价。

综上，本研究建立不同产地枇杷花的 UPLC 指纹图谱和多成分含量测定方法并结合化学模式识别法，对不同产地枇杷花的化学成分组成进行系统评价，从多个方面研究不同产地枇杷花药材质量的差异，该方法便捷、高效、重复性好，能快速、准确地对不同产地枇杷花质量的差异进行分析，可为枇杷花的综合质量控制研究提供参考。

参考文献

[1] 安徽省药品监督管理局 .《安徽省中药材标准》（2022 年版）[S]. 北京：中国医药科技出版社，2022：88-89.
[2] 国家中医药管理局 . 中华本草（第四册）[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：145.
[3] 李时珍 . 本草纲目 [M]. 北京：人民卫生出版社，1975.
[4] 南京中医药大学 . 中药大辞典（第二版）[M]. 上海：上海科学技术出版社，2006：170.
[5] 王翰华，阮洪生，陈云 . 枇杷花化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中成药，2019，41（12）：2977-2981.
[6] 揭晓泸，冯佩诗，徐红雨，等 . 枇杷非药用部位的资源利用现状与展望 [J]. 中国药学杂志，2023，58（2）：127-133.
[7] 四川省食品药品监督管理局 .《四川省中药材标准》2010 年版）[S]. 成都：四川科学技术出版社，2011：377-378.
[8] 安徽省药品监督管理局 .《安徽省中药饮片炮制规范》（2019 年版）[S]. 合肥：安徽科学技术出版社，2019：170.
[9]《中国药典》2020 年版 . 一部 [S]. 2020：53.
[10] 毕云华，黄佳婷，章鸿彬，等 . 枇杷花抗炎活性物质的制备及成分分析 [J/OL]. 食品与发酵工业，1-10[2023-07-10]. doi：10.13995/j.cnki.11-1802/ts.035869.
[11] 李继杨，谢晓梅，李倩文，等 . 枇杷不同器官及不同物候 4 种三萜酸含量的动态变化 [J]. 中国中药杂志，2015，40（5）：875-880.
[12] 王夏茵，岳宝森，张炜华，等 . 不同产地天麻 HPLC 指纹图谱、含量测定及化学模式识别研究 [J]. 中南药学，2023，21（5）：1358-1362.

（收稿日期：2023-11-30；修回日期：2023-12-15）

基于 HPLC 指纹图谱和多组分含量测定结合化学模式识别研究的龙眼核质量评价

王艺洁[1, 2, 3]，蒋佳丽[1, 2, 3]，陈彦洁[1, 3]，罗鑫[1, 3]，蒋学青[1, 3]，王志萍[1, 2, 3*]，谢谭芳[1, 3*]（1. 广西中医药大学药学院，南宁　530200；2. 农作物废弃物功能成分研究协同创新中心，南宁　530200；3. 广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室，南宁　530200）

摘要：目的　建立龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 核 HPLC 指纹图谱及含量测定方法。**方法**　建立 13 批龙眼核指纹图谱，结合指纹图谱相似度评价及化学模式识别研究对龙眼核质量进行分析，并测定其中没食子酸、柯里拉京、鞣花酸的含量。**结果**　13 批龙眼核样品相似度在 0.919 ～ 0.999，标定共有峰 11 个，并指认出 3 种成分；聚类分析（HCA）将 13 批龙眼核聚为 3 类，主成分分析（PCA）提取到 3 个主成分，正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）筛选出 5 个差异性成分；定量分析得到 13 批龙眼核中没食子酸、柯里拉京金、鞣花酸的含量范围依次为 0.65 ～ 1.8 mg • g^{-1}、3.02 ～ 5.46 mg • g^{-1}、3.18 ～ 4.49 mg • g^{-1}。**结论**　建立的 HPLC 指纹图谱及含量测定方法重复性、稳定性良好，能够为龙眼核质量评价提供参考。

关键词：龙眼核；指纹图谱；化学模式识别研究；含量测定

中图分类号：R284，O657.7　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1059-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.036

Quality evaluation of seeds of *Dimocarpus longan* Lour. based on HPLC fingerprint and multi-component content determination combined with chemical pattern recognition

WANG Yi-jie[1, 2, 3], JIANG Jia-li[1, 2, 3], CHEN Yan-jie[1, 3], LUO Xin[1, 3], JIANG Xue-qing[1, 3], WANG Zhi-ping[1, 2, 3*], XIE Tan-fang[1, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530200; 2. *Collaborative Innovation Center of Research on Functional Ingredients from Agricultural Residues* (*Guangxi University of Chinese medicine*), *Nanning* 530200; 3. *Key Laboratory of Generic Technology Research and Development of Traditional Chinese Medicine Preparations in Colleges and Universities in Guangxi*, *Nanning* 530200)

Abstract: Objective　To establish the HPLC fingerprint of seeds of *Dimocarpus longan* Lour. and to determine differential components. **Methods**　The quality of seeds of *Dimocarpus longan* was analyzed by establishing the fingerprints of 13 batches of samples combined with similarity evaluation of the fingerprints and chemical pattern recognition. The content of gallic acid, corilagin, and ellagic acid was determined. **Results**　The similarity of 13 batches of seeds of *Dimocarpus longan* ranged from 0.919 to 0.999, with a total of 11 peaks confirmed and 3 components identified. HCA clustered 13 batches of seeds of *Dimocarpus longan* into 3 categories, PCA extracted 3 principal components, and OPLS-DA screened 5 differential components. Quantitative analysis showed that the content ranges of gallic acid, corilagin, and ellagic acid were 0.65 ～ 1.8 mg • g^{-1}, 3.02 ～ 5.46 mg • g^{-1}, and 3.18 ～ 4.49 mg • g^{-1}, respectively. **Conclusion**　The HPLC fingerprint and content determination method are stable and repeatable, which can provide reference for the quality evaluation of seeds of *Dimocarpus longan*.

基金项目：农作物废弃物功能成分研究协同创新中心资助课题（No.CICAR 2023-P2）。

作者简介：王艺洁，女，硕士研究生，主要从事中药、民族药新制剂与新剂型的研发，email：1404057294@qq.com　*通信作者：王志萍，女，教授，硕士研究生导师，主要从事中药、民族药新剂型、新制剂的研制与开发研究，email：318007460@qq.com；谢谭芳，女，副教授，主管药师，主要从事中药、民族药新制剂、新剂型研究，email：116914510@qq.com

Key words: seeds of *Dimocarpus longan* Lour.; fingerprint; chemical pattern recognition; content determination

龙眼核为无患子科植物龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 的干燥成熟种子，为制作龙眼肉的附产物，是具有药用价值的农作物废弃物。龙眼核在《滇南本草图说》中首次被记载，能“治瘿疾”；《本草再新》中记录其能“治瘰疬，消肿排脓拔毒”。现代研究表明龙眼核提取物具有降血糖、抗氧化及抗肿瘤活性[1-3]；龙眼核多酚能保护急性肺损伤小鼠肺组织，并有一定的胆固醇清除能力[4-6]；龙眼核醇提物具有较好的抑菌能力，龙眼核醋酸乙酯部位具有一定的抑制脂质过氧化及清除羟基自由基作用[7-8]。目前，《中国药典》及地方药材标准均未对龙眼核进行收录，也无其质量评价相关研究报道，因此建立一种龙眼核质量评价方法尤为重要。

龙眼核富含膳食纤维、蛋白质、粗多糖、脂肪等营养物质，以及总多酚、总黄酮等成分[9]，是一个多组分复杂体系。评价其质量应采用能提供丰富鉴别信息的评价方法。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的分析手段[10]，它建立在中药化学成分研究基础上，能较为全面地反映中药中所包含复杂成分的信息。中药指纹图谱所含信息庞大，将其与化学模式识别方法结合能更好地处理数据，两者结合已成为目前较为常用的中药质量评价方法[11]。常见的化学模式识别方法包括主成分分析（PCA）、聚类分析（HCA）、正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）等[12]。本课题组收集了 13 批不同产地龙眼核，建立了龙眼核 HPLC 指纹图谱，同时结合化学模式识别研究全面评价其质量，并对没食子酸、柯里拉京、鞣花酸进行含量测定，为后续研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

SQP 型万分之一电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司），XSR205DU/A 型十万分之一电子天平（梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司），UPH-Ⅳ-20TN 优普系列超纯水（四川优普超纯科技有限公司），LC-2030C 型高效液相色谱仪（日本岛津公司），KQ3200B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

对照品没食子酸（批号：MUST-22112411，纯度：99.96%）、柯里拉京（批号：MUST-23060211，纯度：99.99%）、鞣花酸（批号：MUST-23033114，纯度：99.89%）（曼斯特成都生物科技有限公司）。色谱纯乙腈、甲醇 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，色谱纯磷酸（上海阿拉丁生化科技有限公司），分析纯乙醇、甲醇（成都市科隆化学品有限公司）。样品信息如表 1 所示，经广西中医药大学田慧教授鉴定为无患子科植物龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 的成熟种子。

表 1 样品信息

Tab 1 Sample information

编号	采集时间	来源
S1	2023-05-27	广西博白
S2	2023-06-02	广西玉林
S3	2023-09-02	广西玉林
S4	2023-09-03	广西博白
S5	2023-06-04	广西武鸣
S6	2023-09-01	广西武宣
S7	2023-09-04	广西南宁
S8	2023-08-06	广西贵港
S9	2023-05-28	福建莆田
S10	2023-05-30	福建漳州
S11	2023-08-15	福建莆田
S12	2023-06-03	广东高州
S13	2023-07-26	广东高州

2 方法与结果

2.1 指纹图谱色谱条件

色谱柱：ShimNeX CS C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.2% 磷酸（B）；梯度洗脱（0 ～ 10 min，5%A；10 ～ 11 min，5% ～ 10%A；11 ～ 20 min，10% ～ 12%A；20 ～ 25 min，12%A；25 ～ 50 min，12% ～ 17%A；50 ～ 70 min，17% ～ 40%A；70 ～ 80 min，40% ～ 5%A）；流速 1 mL • min^{-1}；柱温 30 ℃；检测波长 274 nm；进样体积 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取龙眼核粉末约 0.5 g，过二号筛，精密称定，置圆底烧瓶中，精密加入 60% 甲醇 25 mL，水浴回流 0.5 h，冷却至室温，补足失重，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称定没食子酸、柯里拉京、鞣花酸对照品适量置 25 mL 量瓶中，加入甲醇定容至刻度，制成质量浓度分别为 0.42、0.41、0.41 mg • mL^{-1} 的混合对照品母液，备用。

2.3 龙眼核指纹图谱建立

2.3.1 精密度试验 取龙眼核样品（S9）粉末 0.5

g（过二号筛），按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，以 3 号峰（柯里拉京）为参照物峰（S），计算得到各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.10%，相对峰面积 *RSD* ＜ 1.4%，表明仪器精密度良好。

2.3.2　稳定性试验　取龙眼核样品（S9）粉末 0.5 g（过二号筛），按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，以 3 号峰（柯里拉京）为参照物峰（S），计算得到各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.80%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.8%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3　重复性试验　取龙眼核样品（S9）粉末 0.5 g（过二号筛），按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样分析，以 3 号峰（柯里拉京）为参照物峰（S），计算得到各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.60%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.3%，表明该方法重复性良好。

2.3.4　龙眼核指纹图谱的建立及相似度评价　分别取 13 批龙眼核样品粉末，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。将 13 批龙眼核色谱图 cdf 格式文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012》软件中，设置 S1 为参照图谱，采用平均数法则，时间窗设置为 0.5 min，进行 Mark 峰匹配。共标定 11 个共有峰，得到龙眼核样品叠加指纹图谱并生成对照指纹图谱（R），结果见图 1。

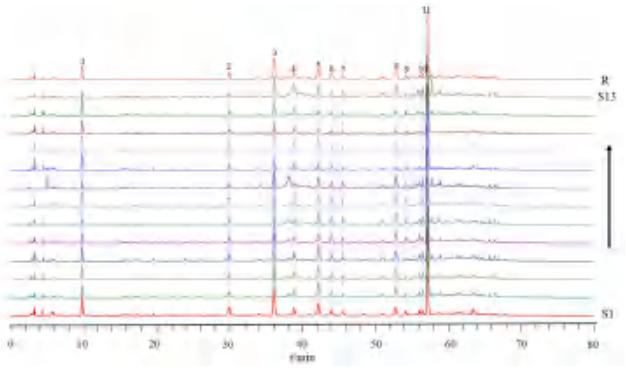


图 1　龙眼核 HPLC 叠加指纹图谱（S1 ～ S13）及对照图谱（R）

Fig 1　HPLC superimposed fingerprint（S1 ～ S13）and reference fingerprint（R）of seeds of *Dimocarpus Longan*

13 批龙眼核样品指纹图谱与对照图谱相比，相似度在 0.919 ～ 0.999，结果见表 2。说明 13 批龙眼核样品具有很高的相似性，品质较为一致。

2.3.5　共有峰指认　通过与混合对照品溶液色谱图对比，11 个共有峰指认出 3 个成分，分别为 1 号峰（没食子酸），3 号峰（柯里拉京），11 号峰（鞣花酸），混合对照品溶液色谱图见图 2。

表 2　13 批龙眼核样品相似度评价结果

Tab 2　Similarity of 13 batches of seeds of *Dimocarpus longan* Lour.

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.997	S8	0.968
S2	0.992	S9	0.949
S3	0.999	S10	0.996
S4	0.995	S11	0.950
S5	0.995	S12	0.979
S6	0.948	S13	0.919
S7	0.997		

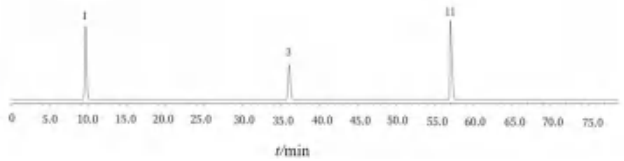


图 2　混合对照品溶液图谱

Fig 2　HPLC chromatogram of mixed reference substances

1. 没食子酸（gallic acid）；3. 柯里拉京（corilagin）；11. 鞣花酸（ellagic acid）

2.4　化学模式识别分析

2.4.1　HCA　将 13 批龙眼核样品共有峰峰面积导入 IBM SPSS Statistics 25.0 软件中，进行系统聚类，结果见图 3。13 批龙眼核样品聚为 3 大类，S1 ～ S5、S7、S10 为第一类，S6、S8、S13 为第二类，S9、S11、S12 为第三类。结果表明不同产区龙眼核化学组成相似，但含量存在一定差异。

2.4.2　PCA　将 13 批龙眼核样品共有峰峰面积导入 IBM SPSS Statistics 25.0 中，进行 PCA，以特征值大于 1 提取主成分，结果见表 3。11 个共有成分共提取到 3 个主成分，特征值分别为 5.983、3.124、1.221，方差贡献率分别为 54.4%、28.4%、11.1%，累计方差贡献率为 93.9%，结果表明这 3 个主成分可以体现龙眼核样品 93.9% 的信息。

表 3　特征值及方差贡献率

Tab 3　Eigen value and cumulative variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	5.983	54.4	54.4
2	3.124	28.4	82.8
3	1.221	11.1	93.9
4	0.306	2.8	
5	0.177	1.6	
6	0.104	0.9	
7	0.059	0.5	
8	0.014	0.1	
9	0.009	0.1	
10	0.003	0.0	
11	0.001	0.0	

由主成分因子载荷矩阵可知，3、5、6、7、8、9、10 号峰在主成分 1 上有较高的正载荷；2、3、4、5、11（鞣花酸）号峰在主成分 2 上有较高的正载荷，9 号峰在主成分 3 上有较高的正载荷（见表 4）。

PCA 目的在于信息浓缩，如果要对数据进行综合评价，则需将数据标准化后，使用“线性组合系数矩阵”建立主成分和研究项之间的关系等式。将标准化后的 13 批龙眼核样品共有峰面积导入 SPSSAU 数据处理网站，得到主成分因子 1、2、3 综合得分值（A_1、A_2、A_3）与 11 个共有峰相对峰面积（$X_1 \sim X_{11}$）关系式如下：$A_1 = -0.335X_1 - 0.026X_2 + 0.226X_3 - 0.309X_4 + 0.222X_5 + 0.334X_6 + 0.385X_7 + 0.391X_8 + 0.252X_9 + 0.372X_{10} - 0.277X_{11}$；$A_2 = 0.260X_1 + 0.531X_2 + 0.451X_3 + 0.327X_4 + 0.374X_5 + 0.241X_6 + 0.002X_7 + 0.077X_8 + 0.036X_9 - 0.005X_{10} + 0.367X_{11}$；$A_3 = 0.072X_1 + 0.253X_2 - 0.154X_3 - 0.135X_4 - 0.462X_5 + 0.283X_6 + 0.168X_7 - 0.136X_8 + 0.665X_9 - 0.296X_{10} + 0.136X_{11}$。将 A_1、A_2、A_3 与相应方差贡献率加权后，得到综合得分计算公式：$A = (0.543\,91A_1 + 0.283\,98A_2 + 0.111\,03A_3)/0.938\,93$。结果见表 5，排名前三的批次为 S13、S5、S7。

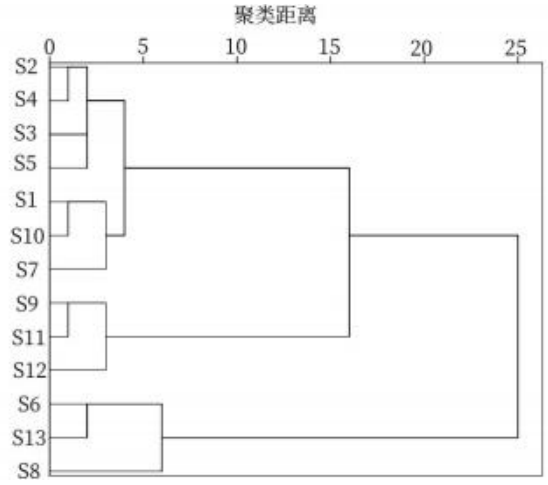


图 3　13 批龙眼核样品聚类分析树状图

Fig 3　Dendrogram of HCA for 13 batches of seeds of *Dimocarpus Longan*

2.4.3　OPLS-DA　为了进一步寻找导致龙眼核样品质量产生差异的标志性成分，分别将 13 批龙眼核样品的 11 个共有峰峰面积导入到 SIMCA 14.1 软件中进行分析。建立的 OPLS-DA 模型累计解释能力参数 R^2X 和 R^2Y 分别为 0.827 和 0.848，预测能力参数（Q^2）为 0.759，说明该模型可用于龙眼核质量差异物质的预测。OPLS-DA 得分见图 4。

以置换检验（$n = 200$）对该 OPLS-DA 模型进行验证，$R^2 = (0.0, 0.11)$，$Q^2 = (0.0, -0.519)$，结果表明所建 OPLS-DA 模型拟合良好，可用于分析龙眼核的质量差异成分。OPLS-DA 置换检验结果见图 5。

表 4　主成分因子载荷矩阵

Tab 4　Load matrix of principal component factors

峰号	载荷系数		
	主成分 1	主成分 2	主成分 3
X_1	− 0.820	0.460	0.080
X_2	− 0.065	0.938	0.280
X_3	0.552	0.797	− 0.170
X_4	− 0.756	0.578	− 0.149
X_5	0.542	0.661	− 0.511
X_6	0.818	0.427	0.313
X_7	0.941	0.003	0.186
X_8	0.955	0.137	− 0.151
X_9	0.617	0.064	0.735
X_{10}	0.910	− 0.008	− 0.327
X_{11}	− 0.678	0.648	0.150

表 5　不同产地龙眼核样品主成分因子得分

Tab 5　Principal component factors scores of seeds of *Dimocarpus Longan* from different regions

编号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合得分
S1	− 0.98	1.97	0.57	0.10
S2	0.63	0.77	− 1.45	0.43
S3	− 0.65	0.52	− 1.46	− 0.39
S4	0.39	1.21	− 1.46	0.42
S5	1.88	0.11	2.12	1.37
S6	2.85	− 1.22	− 0.41	1.24
S7	0.97	1.91	1.71	1.34
S8	2.85	− 2.16	0.10	1.01
S9	− 3.82	− 1.07	0.43	− 2.49
S10	− 0.83	3.24	− 0.18	0.48
S11	− 3.52	− 2.34	0.21	− 2.72
S12	− 3.16	− 1.40	0.12	− 2.24
S13	3.39	− 1.54	− 0.30	1.46

采用 SIMCA 14.1 软件，以 VIP 值＞ 1 为标准筛选影响龙眼核样品的标志成分，结果显示 VIP 值大于 1 的共有峰依次为 2 号、3 号（柯里拉京）、11 号（鞣花酸）、4 号、1 号（没食子酸），表明这 5 个共有成分可能为导致不同批次龙眼核质量差异的主要物质。

2.5　含量测定

2.5.1　线性关系考察　取“2.2.2”项下的混合对照品母液 6 份，分别稀释 2、5、10、25、50、100 倍，按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积，以质量浓度（$\mu g \cdot mL^{-1}$）为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，计算回归方程。没食子酸、柯里拉京、鞣花酸的回归方程、相关系数及线性范围见表 6。

2.5.2　精密度试验　取“2.2.2”项下混合对照品母液，按“2.1”项下色谱条件，重复进样 6 次。计算

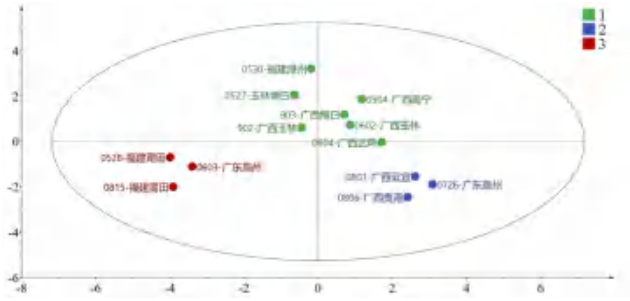


图 4　13 批龙眼核样品 OPLS-DA 得分图

Fig 4　OPLS-DA score plot of 13 batches of *Dimocarpus Longan*

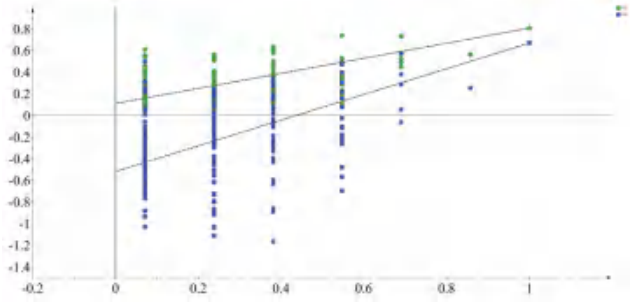


图 5　13 批龙眼核样品 OPLS-DA 置换检验结果

Fig 5　Permutation test of OPLS-DA of 13 batches of *Dimocarpus Longan*

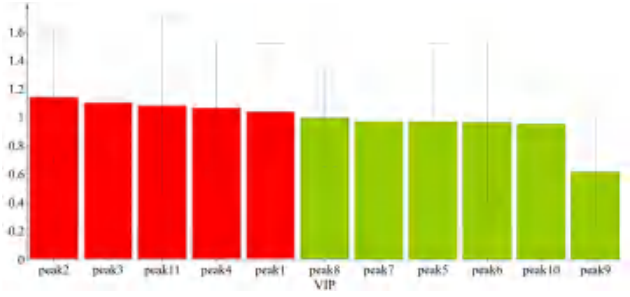


图 6　13 批龙眼核样品共有峰 VIP 得分图

Fig 6　VIP plot of common peak in 13 batches of *Dimocarpus Longan*

表 6　差异性成分线性回归方程

Tab 6　Linear regression of different components

成分	回归方程	相关系数	线性范围 / （μg • mL^{-1}）
没食子酸	$Y = 3.131\times10^{4}X - 1.205\times10^{5}$	0.9998	4.23 ～ 423.07
柯里拉京	$Y = 1.892\times10^{4}X - 8.576\times10^{4}$	0.9997	4.06 ～ 405.96
鞣花酸	$Y = 3.869\times10^{4}X - 2.544\times10^{5}$	0.9997	4.07 ～ 406.75

没食子酸、柯里拉京、鞣花酸峰面积的 *RSD* 值，分别为 1.2%、1.1%、1.1%，表明该方法精密度良好。

2.5.3　重复性试验　取同一批次的龙眼核粉末 6 份，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，计算得没食子酸、柯里拉京、鞣花酸的含量均值分别为 1.41、1.99、7.11 mg•g^{-1}，3 种成分含量 *RSD* 值分别为 0.30%、1.0%、2.2%，表明该方法重复性良好。

2.5.4　稳定性试验　取龙眼核样品粉末（过二号筛）0.5 g，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，记录峰面积，计算没食子酸、柯里拉京、鞣花酸含量的 *RSD* 值均＜ 0.5%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5　加样回收试验　取 6 份已知含量的龙眼核样品粉末各约 0.25 g，精密称定，分别以 1∶1 的比例精密加入对照品，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行分析，计算回收率及其 *RSD* 值。结果表明没食子酸、柯里拉京、鞣花酸的平均加样回收率在 94.35% ～ 102.85%，*RSD* 均小于 3%，表明该方法准确度良好。

2.5.6　样品含量测定　取 13 批龙眼核样品粉末（过二号筛）各约 0.5 g，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析。计算没食子酸、柯里拉京、鞣花酸的含量，结果见表 7。

表 7　13 批龙眼核样品含量测定 (mg • g^{-1})

Tab 7　Content of 13 batches of seeds of *Dimocarpus Longan* (mg•g^{-1})

编号	没食子酸	柯里拉京	鞣花酸
S1	0.65	5.51	6.29
S2	1.15	6.03	4.92
S3	1.31	5.39	5.65
S4	1.36	6.16	5.22
S5	1.02	5.14	4.89
S6	0.65	5.46	3.18
S7	1.38	6.33	5.93
S8	0.71	4.01	3.12
S9	1.57	2.19	6.31
S10	1.54	6.60	6.21
S11	1.30	2.00	5.33
S12	1.80	3.02	4.49
S13	0.71	4.70	3.23

2.5.7　根据各成分含量进行聚类分析　将 13 批龙眼核样品 3 种成分的含量导入 IBM SPSS statistics 25.0 软件中，进行系统聚类，13 批龙眼核样品聚为 3 大类，S1 ～ S5、S7、S10 为第一类，S6、S8、S13 为第二类，S9、S11、S12 为第三类，与“2.4.1”项下通过共有峰聚类的结果一致，表明这 3 种成分能够为龙眼核质量评价提供参考。

3　讨论

3.1　液相条件优化

试验初期进行了色谱条件优化，分别考察不同厂家色谱柱（Waters X Bridge C18 柱、Aglient ZORBAX SB-C18 柱、ShimNeX CS C18 柱），不同流动相体系（甲醇 -0.1% 磷酸、乙腈 -0.1% 磷酸、乙腈 -0.2% 磷酸），不同流速（0.8、1.0、1.2 mL • min^{-1}），不同柱温（25、30、35 ℃），不同

检测波长（215、254、260、274 nm）对测定的影响，以色谱峰分离度、峰形、峰面积、保留时间等为筛选条件，确定最佳色谱条件为：ShimNeX CS C18（5 μm，4.6 mm×250 mm）色谱柱；流动相为乙腈（A）-0.2% 磷酸（B）；梯度洗脱；流速为 1 mL·min^{-1}；柱温为 30 ℃；检测波长为 274 nm；进样量为 10 μL。

3.2 供试品制备优化

参考文献中的方法[13]，分别对不同提取方式（超声、回流），不同提取溶剂（纯水、乙醇、40% 甲醇、60% 甲醇、80% 甲醇），不同料液比（1∶20、1∶50、1∶100），不同提取时间（30、45、60 min）进行考察，得出 60% 甲醇、料液比 1∶50、水浴回流提取 30 min 条件下制得的供试品中目标成分含量最高。

3.3 HPLC 指纹图谱及化学识别模式研究

本研究以 13 批龙眼核为研究对象，建立龙眼核样品指纹图谱。共标定 11 个共有峰且指认出了 1 号峰（没食子酸）、3 号峰（柯里拉京）、11 号峰（鞣花酸）。目前仍有 8 个共有峰未指认，有待进一步分离鉴定。通过化学模式识别全面分析了不同批次龙眼核的质量。其中 HCA 将 13 批龙眼核聚为 3 类，说明产地的不同会在一定程度上影响龙眼核样品的质量；PCA 提取出 3 个主成分，可以体现龙眼核样品的 93.9% 的信息，广东高州（S13）、广西南宁（S5）、广西武鸣（S7）的样品综合得分较高。通过 OPLS-DA，筛选出 5 个可能导致龙眼核质量产生差异的成分，其中包括没食子酸、柯里拉京和鞣花酸。

3.4 多组分定量分析

国内对龙眼核的成分研究主要集中于多酚、总黄酮、原花青素等[14-16]。本研究建立了同时测定龙眼核中没食子酸、柯里拉京、鞣花酸含量的方法，建立的方法重复性、稳定性好，可为龙眼核质量评价提供参考。

参考文献

[1] 黄儒强，邹宇晓，刘学铭 . 龙眼核提取液的降血糖作用 [J]. 天然产物研究与开发，2006，18（6）：991-992.

[2] 黄儒强，刘学铭 . 龙眼核提取物提高小鼠抗氧化功能的研究 [J]. 华南师范大学学报（自然科学版），2008，53（1）：108-111.

[3] 张楠，周志昆，张凌云，等 . 荔枝核与龙眼核水提取物的体外抗肿瘤活性的比较与评估 [J]. 湖南中医杂志，2012，28（3）：133-135.

[4] 范风颖，骆姗，赵莉 . 龙眼核多酚对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织的保护作用及机制 [J]. 西南国防医药，2021，31（6）：497-500.

[5] 李佳娜，郭苏兰，肖水秀 . 龙眼核多酚对用脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织的保护作用及相关机制 [J]. 当代医药论丛，2019，17（11）：102-104.

[6] 李妍，曾亚丽，曹珂珂，等 . 龙眼核多酚提取工艺优化及降胆固醇作用 [J]. 怀化学院学报，2017，36（11）：19-23.

[7] 戴诗云，毛哲浩，胡益祥，等 . 植物提取物主要抑菌活性成分分析及应用 [J]. 绿色科技，2019，10（10）：261-263.

[8] 李雪华，吴妮妮，李福森，等 . 龙眼核醋酸乙酯部位的抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药，2008，19（8）：1969-1971.

[9] 曾铿然，何达为，张世昂，等 . 龙眼典型加工副产物的营养成分研究 [J]. 中国热带农业，2021，18（3）：44-49.

[10] 杨玉畅，许煜晨，刘曼婷，等 . 景参浓缩丸高效液相色谱指纹图谱的建立及 3 种成分的含量测定 [J]. 中南药学，2023，21（9）：2448-2453.

[11] 刘江，陈兴福，邹元锋 . 基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展 [J]. 中国中药杂志，2012，37（8）：1081-1088.

[12] 王韵旨，郭丽，吴作敏，等 . 基于指纹图谱及化学模式识别的归芪通脉合剂质量评价 [J]. 中国药房，2022，33（20）：2503-2507.

[13] 焦洁，郑旭，胡萌萌 . 不同产地红芪指纹图谱的构建及 6 种活性成分的测定 [J]. 中南药学，2023，21（3）：796-799.

[14] 黄海潮，方泽宇，周捷，等 . HPLC 法测定龙眼果核中的原花青素的含量 [J]. 黑龙江医药，2018，31（4）：711-713.

[15] 梁志，左映平 . 龙眼核中总黄酮含量测定及其抗氧化性研究 [J]. 云南化工，2010，37（5）：14-16.

[16] 孙菡峥 . 龙眼核多酚的分离纯化及抗氧化性能的研究 [D]. 无锡：江南大学，2019.

（收稿日期：2023-10-25；修回日期：2023-11-15）

高效液相色谱法测定 α- 硫辛酸绿茶片中 α- 硫辛酸的含量

徐硕，王月，邝咏梅，徐文峰，金鹏飞*（北京医院药学部，国家老年医学中心，中国医学科学院老年医学研究院，北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室（北京医院），北京　100730）

摘要：目的　建立 α- 硫辛酸绿茶片中 α- 硫辛酸的含量测定方法。**方法**　利用高效液相色谱（HPLC）技术，采用 Alltima C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈 -0.1% 磷酸溶液（55∶45），流速为 1.0 mL • min^{-1}，检测波长为 215 nm，柱温为 30 ℃。**结果**　α- 硫辛酸在 102.6 ～ 307.7 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系，相关系数（*r*）为 1.000；精密度、重复性和稳定性考察 *RSD* 均小于 2.0%；3 个浓度的加样回收率为 98.44% ～ 100.2%，*RSD* 值均小于 1.0%。**结论**　该方法准确、简单、快速，能够用于 α- 硫辛酸绿茶片中 α- 硫辛酸的含量测定。

关键词：α- 硫辛酸；α- 硫辛酸绿茶片；高效液相色谱；含量测定
中图分类号：R917，R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1065-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.037

Determination of α-lipoic acid in α-lipoic acid with green tea tablets by high-performance liquid chromatography

XU Shuo, WANG Yue, KUANG Yong-mei, XU Wen-feng, JIN Peng-fei* (*Department of Pharmacy*, *Beijing Hospital*, *National Center of Gerontology*, *Institute of Geriatric Medicine*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Beijing Key Laboratory of Assessment of Risk and Individual Application of Clinical Drugs* (*Beijing Hospital*), *Beijing*　100730)

Abstract: Objective　To establish a method for the determination of α-lipoic acid in α-lipoic acid with green tea tablets. **Methods**　HPLC was carried out, and the experiment was conducted with an Alltima C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (55∶45) at the flow rate of 1.0 mL • min^{-1}. The detection wavelength was 215 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results**　α-lipoic acid showed a good linearity with the peak area at 102.6 ～ 307.7 μg • mL^{-1}, and the correlation coefficient (*r*) was 1.000. The *RSD* of precision, repeatability and stability were less than 2.0%. The average recovery of 3 concentrations was 98.44% ～ 100.2%, and the relative standard deviation was less than 1.0%. **Conclusion**　The method is fast, simple and accurate, and can be used to determine α-lipoic acid in α-lipoic acid with green tea tablets.

Key words: α-lipoic acid; α-lipoic acid with green tea tablet; HPLC; determination

α- 硫辛酸化学名为 1，2- 二硫戊环 -3- 戊酸，是氧化应激强效抑制药，具有双重氧化 - 还原特性，不仅能够清除多种活性氧簇，还能还原人体内的抗氧化系统 [1]，可以直接清除活性氧，不仅可清除单次氯酸、过氧化氢、羟基和过氧化物自由基等活性氧，而且能够清除单线态氧 [2-3]。α- 硫辛酸作为一种强效抗氧化剂，其临床应用广泛，研究表明 α- 硫辛酸不仅可有效降低糖尿病肾病患者的蛋白尿水平，还能调节患者体内的氧化应激和炎症反应，保护患者肾功能。动物实验结果显示，α- 硫辛酸可以在一定程度上改善因氧化应激介导的糖尿病肾病大鼠的足细胞损伤 [4-5]。人体内 α- 硫辛酸主要存在于肝脏及肾脏，可以与许多蛋白产生反应 [6]。糖尿病作为当前最常见且发病率较高的慢性病之一，严重威胁人类健康。世界卫生组织（WHO）数据显示：世界各地的糖尿病

作者简介：徐硕，女，副主任药师，主要从事药物分析及医院药学研究，email：jessica06250917@126.com　*通信作者：金鹏飞，男，主任药师，主要从事药物分析及医院药学研究，email：j790101@163.com

患者中有 90% 的人患有 2 型糖尿病 [7-8]。α- 硫辛酸对 2 型糖尿病有治疗作用，可以促进葡萄糖吸收 [6]，将其应用于糖尿病胃轻瘫、糖尿病周围神经病变等并发症也具有较好的临床效果 [9-11]。目前 α- 硫辛酸的定量分析研究报道较少，主要集中在注射液的含量测定 [12-13]。随着 α- 硫辛酸的抗氧化作用和药用价值受到国际生物医学界的高度关注，近年来，含有该成分的保健品也不断增多。我国还没有针对该类保健品中 α- 硫辛酸含量测定的国家标准方法。虽然保健食品中 α- 硫辛酸含量测定的研究已有少量报道 [14-15]，但存在一些不足之处，如有文献采用乙腈 -0.1% 三氟乙酸水溶液作为流动相 [14]，流动相选择不合适导致基线漂移和波动非常严重，干扰测定。并且在分析方法验证时均未进行专属性及重复性考察 [14-15]。α- 硫辛酸绿茶片为一种适合糖尿病患者服用的保健品，可以调节糖代谢，防止并发症的产生，其含量测定方法尚未见报道。本研究应用 HPLC 技术，建立了 α- 硫辛酸绿茶片的含量测定方法，该方法简便、快速、准确，可为其质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪 [Agilent 1260 型，配有四元梯度泵（G1311C），自动进样器（G1329B），柱温箱（G1316A），DAD 检测器（G4212B）及 LC OpenLAB 色谱工作站，美国 Agilent Technologies 有限公司]；电子分析天平（XP-205 型，精度：十万分之一，瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司）；微电脑人工气候箱（SPX-250 IC 型，上海博迅实业有限公司）；恒温箱 [DKN412C 型，雅马拓科技贸易（上海）有限公司]；数控超声波清洗器（KQ-300DB 型，昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

乙腈、磷酸（色谱纯，Thermo Fisher Scientific 公司）；甲醇、盐酸和 30% 过氧化氢（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；氢氧化钠（分析纯，北京化工厂）；实验用水为二级实验用水。α- 硫辛酸对照品（批号：J08GB150303，纯度：98.5%，上海源叶生物科技有限公司）；α- 硫辛酸绿茶片（规格：含 α- 硫辛酸 50 mg/ 片，批号：2469923，2379462，2371917，美国 Nature Made Nutritional Products）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Alltima C_{18} 分析柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈 -0.1% 磷酸溶液（55∶45）；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测波长：215 nm；柱温：30 ℃；进样体积：10 μL。

2.2 对照品溶液的配制

对照品储备液：精密称取 α- 硫辛酸对照品适量，将其置于 100 mL 量瓶中，加入甲醇适量超声使溶解，定量稀释成质量浓度约为 4 mg • mL^{-1} 的储备液。

线性系列溶液：精密量取上述储备液 2.5、4、5、6、7.5 mL，将其置于 100 mL 量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，摇匀，即得线性系列溶液（质量浓度分别为 102.6、164.1、205.1、246.1、307.7 μg • mL^{-1}）。将质量浓度为 205.1 μg • mL^{-1} 的对照品溶液（与供试品溶液质量浓度基本一致）作为标准工作液，用作方法的系统适用性考察。以上过程避光操作。

2.3 供试品溶液的配制

取 α- 硫辛酸绿茶片 10 片，精密称定，将其置于乳钵中研细，精密称取该样品粉末适量（约相当于 α- 硫辛酸 20 mg），置于 100 mL 量瓶中，加入甲醇约 60 mL，超声提取（功率：350 W，频率：40 kHz）20 min，用甲醇稀释至刻度，摇匀，经微孔滤膜（孔径 0.22 μm）滤过，取续滤液，即得。以上过程需避光操作。

2.4 专属性试验

2.4.1 基质干扰试验　按照 α- 硫辛酸绿茶片说明书的配方，制备不含 α- 硫辛酸的阴性样品，同“2.3”项下方法制成阴性样品溶液。取空白对照溶液（溶剂甲醇）、对照品溶液、供试品溶液以及阴性样品溶液，分别进样 10 μL，色谱图见图 1，样品中其他成分和辅料不干扰 α- 硫辛酸的测定，溶剂对待测成分的检测无干扰。

2.4.2 强制降解试验　参照国际通行的 ICH 方法学验证原则 [16-17]，对该方法的专属性进行考察。分别在酸化、碱化、光照、高温和氧化条件下进行供试品强制降解试验。精密称定 5 份 α- 硫辛酸绿茶片（批号：2469923）样品粉末，每份约为 0.14 g（约相当于 α- 硫辛酸 20 mg），置于 100 mL 量瓶中，按照以下方法处理，① 酸化条件：向样品中加入 1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 2 mL，室温避光放置 4 h，再加入 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液，中和至中性，依照“2.3”项下方法操作，制备供试品溶液。② 碱化条件：量取 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 2 mL，加入至样品中，室温避光放置 4 h，再加入 1 mol • L^{-1} 盐酸溶液中和至中性，依照“2.3”项下方法操作，得到供试品溶液。③ 光照

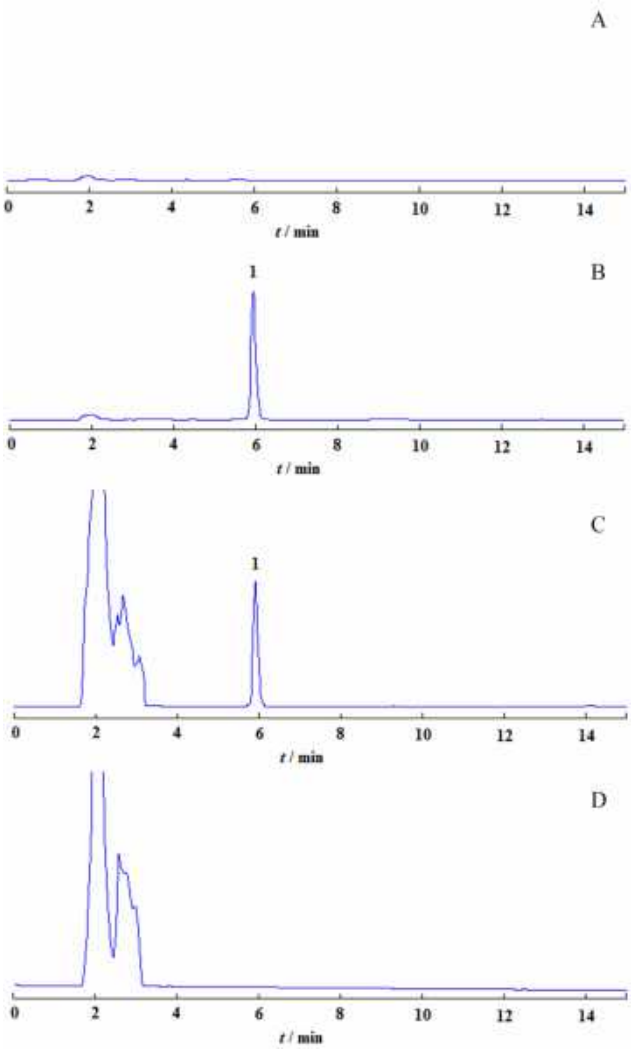


图 1　α- 硫辛酸绿茶片的 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of α-lipoic acid with green tea tablet

A. 空白对照溶液（blank control solution）；B. 对照品溶液（reference solution）；C. 供试品溶液（sample solution）；D. 阴性样品溶液（negative sample solution）

1. α- 硫辛酸（α-lipoic acid）

条件：设置微电脑人工气候箱光照强度为 10 000 lx，将样品放入其中照射 4 h，依照“2.3”项下方法操作，得到供试品溶液。④ 高温条件：将样品置于恒温箱中，80 ℃加热 4 h，取出，待其温度降至室温，依照“2.3”项下方法操作，得到供试品溶液。⑤ 氧化条件：向样品中加入 0.1% 过氧化氢溶液 2 mL，室温避光放置 4 h，依照“2.3”项下方法操作，得到供试品溶液。精密量取上述溶液各 10 μL，按“2.1”项下色谱条件检测，色谱图见图 2。强制降解试验结果表明：α- 硫辛酸对高温较为稳定，在该条件下未发生降解，峰面积基本不变；与未经强制降解试验的样品相比，在氧化条件下略有降解，峰面积略降低，其产生的降解产物未见明显色谱峰。α- 硫辛酸在酸化条件下降解最为明显，其次是碱化条件和光照条件，与未经强制降解试验的样品相比，α- 硫辛酸峰面积降低，可见降解产物色谱峰，产生的降解产物峰不干扰 α- 硫辛酸的定量检测。

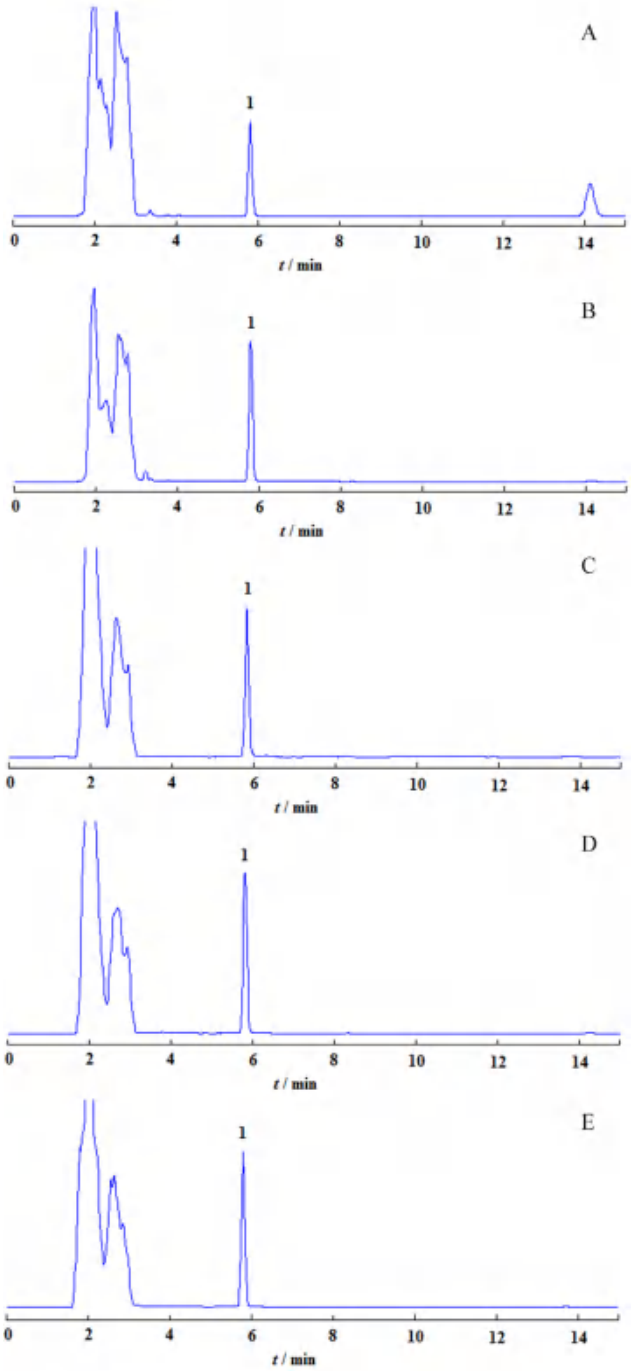


图 2　α- 硫辛酸绿茶片强制降解试验 HPLC 色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of forced degradation test of α-lipoic acid with green tea tablets

1. α- 硫辛酸（α-lipoic acid）；A. 酸降解（acid degradation）；B. 碱降解（alkaline degradation）；C. 光降解（light degradation）；D. 高温降解（high-temperature degradation）；E. 氧化降解（oxidative degradation）

2.5　系统适用性试验

取标准工作液连续进样 6 次，对 α- 硫辛酸色

谱峰的平均理论塔板数和对称因子进行考察，结果显示平均理论塔板数为 12 343.8±144.7，对称因子为 1.132±0.019（n = 6），表明系统适用性良好。

2.6　线性关系考察、检测限和定量限

取“2.2”项下线性系列溶液，浓度由低至高各进样 10 μL，以 α- 硫辛酸的质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标（X），其峰面积为纵坐标（Y），作标准曲线，得到回归方程为：Y = 4.3354X − 2.6842，相关系数（r）= 1.000，α- 硫辛酸在 102.6 ～ 307.7 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系。将质量浓度为 102.6 μg • mL^{-1} 的对照品溶液加入甲醇，倍比稀释，进样测定，以信噪比（S/N）3∶1、10∶1 分别计算检测限与定量限，结果 α- 硫辛酸的检测限为 0.23 μg • mL^{-1}，定量限为 0.68 μg • mL^{-1}。

2.7　精密度试验

取 α- 硫辛酸绿茶片样品（批号为 2469923）制备得供试品溶液，连续进样 6 次，记录 α- 硫辛酸色谱峰峰面积值，计算得到峰面积的 *RSD* 为 0.059%（n = 6），表明仪器精密度良好。

2.8　重复性试验

取 α- 硫辛酸绿茶片样品（批号为 2469923），研细，精密称取 6 份粉末，制得 6 份供试品溶液，分别进样 10 μL，计算得到 α- 硫辛酸的平均含量为 54.02 mg/ 片（n = 6），*RSD* 值为 1.2%，表明该方法的重复性良好。

2.9　稳定性试验

取供试品溶液（批号为 2469923），分别在放置 0、2、4、8、12、24 h（室温条件）进样测定，计算得到 24 h 内 α- 硫辛酸色谱峰峰面积的 *RSD* 为 0.23%（n = 6），表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10　回收试验

取已测知含量的同一批次 α- 硫辛酸绿茶片（批号：2469923），研细，精密称取 9 份，分别精密加入“2.2”项下对照品储备液 2、2.5、3 mL（分别相当于样品中被测成分含量的 80%、100%、120%），低、中、高浓度样品各 3 份，供试液的制备按照“2.3”项下方法处理，进样分析，计算回收率和 *RSD* 值，结果 3 个浓度的回收率均在 98.44% ～ 100.2%，*RSD* 值均小于 1.0%。

2.11　耐用性考察

分别采用 Alltima C_{18} 柱、Waters C_{18} 柱、Shimadzu C_{18} 柱（均为 250 mm×4.6 mm，5 μm）进行分析检测，结果显示 α- 硫辛酸色谱峰对称性均良好，保留时间基本不变；将色谱条件中的流速改变 [（1.0±0.2）mL • min^{-1}]，α- 硫辛酸的保留时间分别为 5.8、5.8、4.9 min；将色谱条件中的柱温 [（30±2）℃] 改变，结果表明不同柱温对 α- 硫辛酸的保留时间无影响，保留时间 *RSD* 为 0.27%。结果表明所建方法具有良好的耐用性，色谱参数的微调不会对测定结果造成影响。

2.12　样品含量测定

应用建立的方法对 3 批 α- 硫辛酸绿茶片进行含量测定，结果见表 2。

表 2　样品中 α- 硫辛酸的含量

Tab 2　Content of α-lipoic acid in samples

批号	α- 硫辛酸含量 /（mg/ 片）	相对标示量 /%
2469923	54.02	108.0
2379462	52.72	105.4
2371917	54.48	109.0

3　讨论

3.1　检测波长的选择

根据 α- 硫辛酸在流动相中的紫外吸收谱图确定检测波长，α- 硫辛酸在 215 nm 波长处的吸收较强，将 215 nm 确定为检测波长。

3.2　色谱条件的优化

方法建立过程中，对乙腈 -0.005 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液（磷酸调至 pH 3.5）、乙腈 -0.1% 磷酸溶液、乙腈 - 水等不同流动相系统进行比较，考察其对 α- 硫辛酸色谱峰的影响，结果显示采用乙腈 -0.1% 磷酸溶液即可获得良好的峰形，理论塔板数大于 12 000，故选择其为流动相。流动相采用磷酸盐缓冲液，对液相系统和色谱柱有一定损害，不利于样品的长期和连续运行，而且流动相配制相对耗时，完成试验之后也需要较长时间冲柱。故本研究采用乙腈 -0.1% 磷酸溶液作为流动相，溶液配制简单省时，对液相系统和色谱柱的损害大幅度降低。设置乙腈 -0.1% 磷酸溶液不同比例、不同流速，考察其对 α- 硫辛酸保留时间的影响，当流动相比例为 55∶45，流速为 1.0 mL • min^{-1} 时 α- 硫辛酸保留时间合适（t_R = 5.8 min），可满足样品数量较多时的检测，经专属性试验，溶剂、样品中其他成分及辅料、产生的强制降解产物均不干扰 α- 硫辛酸的测定。

3.3　提取溶剂的确定

本试验选择在含量测定分析研究中常用的超声提取法作为样品的提取方法。考察了用甲醇、乙腈 - 水（1∶1）提取样品，发现用乙腈 - 水（1∶1）作为提取溶剂时会导致有少量样品粉末黏在量瓶瓶壁上，难以用溶剂冲洗下来，造成样品

提取不完全，影响含量测定结果，并且样品溶液过滤速度比用甲醇作提取溶剂时要慢。α-硫辛酸在甲醇中的溶解性很好，可以确保将待测成分从样品基质中提取出来，故选择其为提取溶剂。

3.4 样品取样量的选择

比较了不同取样量（约相当于α-硫辛酸 5、10、20、50 mg）的影响，结果显示当取样量为约相当于α-硫辛酸 20 mg，加提取溶剂稀释至 100 mL 时待测成分具有合适的响应值。

3.5 方法学验证

强制降解试验在方法学验证中非常重要，为进一步考察方法的专属性，本研究对α-硫辛酸绿茶片样品在酸化、碱化、光照、高温和氧化等条件下进行了强制降解试验，以排除降解产物对α-硫辛酸色谱峰的干扰，结果显示产生的降解产物峰不会对α-硫辛酸的定量分析造成影响。

3.6 操作注意事项

α-硫辛酸对光敏感，其化学结构中含有见光易分解的二硫键，试验过程中应注意避光操作，可使用棕色量瓶和液相进样小瓶，能确保样品溶液的稳定性，经本研究稳定性试验结果显示，在避光条件下，α-硫辛酸供试液在 24 h 内具有良好的稳定性。

参考文献

[1] 侯吉军，刘艳杰，姚秀宇 . α-硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变临床疗效观察 [J]. 中国实用医药，2011，6（29）：164-165.

[2] Trujillo M，Radi R. Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid：new insight into the reaction of peroxynitrite with thiols [J]. Arch Biochem Biophys，2002，397（1）：91-98.

[3] Navari-Izzo F，Quartacci MF，Sgherri C. Lipoic acid：a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species [J]. Plant Physiol Biochem，2002，40（6-8）：463-470.

[4] 刘亚松 . 硫辛酸对早期糖尿病肾病患者体内氧化应激、炎性反应的调节及足细胞的保护作用 [J]. 临床合理用药，2021，14（1A）：18-21.

[5] 王亚娟，于璐，赵少华 . α-硫辛酸对早期糖尿病肾病患者血清 SOD 和 MDA 水平的影响 [J]. 医药论坛杂志，2021，42（7）：114-117.

[6] 鄢楠祺，刘嘉怡 . α-硫辛酸在糖尿病及糖尿病并发症中的应用 [J]. 医学食疗与健康，2022，20（9）：154-156，160.

[7] 殷雪梅，赵志刚，闫宇佳，等 . 中国“三高”慢性病患者药物治疗依从性差异与分布情况 [J]. 中南药学，2023，21（3）：706-713.

[8] 李珍珠，燕军，张高小，等 . 穿心莲内酯衍生物对 2 型糖尿病大鼠的降糖作用及机制研究 [J]. 中南药学，2014，12（1）：10-13.

[9] 胡绿梅 . 硫辛酸治疗糖尿病胃轻瘫的临床研究 [J]. 吉林医学，2020，41（9）：2168-2169.

[10] 尹慧霞 . α-硫辛酸联合甲钴胺治疗 2 型糖尿病周围神经病变的临床疗效研究 [J]. 中国现代药物应用，2021，15（14）：160-163.

[11] 施明霞 . 甲钴胺联合硫辛酸辅助治疗糖尿病周围神经病变的临床疗效及安全性 [J]. 临床合理用药，2021，14（6A）：94-95.

[12] 周自桂，金春，苏晋，等 . HPLC 测定硫辛酸注射液的含量与有关物质 [J]. 中国药学杂志，2009，44（20）：1582-1584.

[13] 甘惠贞，林淑瑜，李玉堂，等 . 高效液相色谱法测定硫辛酸注射液含量 [J]. 医药导报，2012，31（11）：1494-1497.

[14] 谭莹，吴平谷，张晶，等 . HPLC 法测定保健食品中 α-硫辛酸含量 [J]. 中国卫生检验杂志，2008，18（6）：1039-1040，1055.

[15] 刘平，王莉莉，杨永红，等 . 高效液相色谱法测定保健食品中 α-硫辛酸含量 [J]. 理化检验 - 化学分册，2014，50（1）：86-88.

[16] ICH-Q2A. Text on validation of analytical procedures [S]. 1995.

[17] ICH-Q2B. Validation of analytical procedures：methodology [S]. 1996.

（收稿日期：2023-08-10；修回日期：2023-10-03）

不同产地及加热方式文冠果仁中的氨基酸成分分析

段佩利[1, 2]，院军[2]，张帅[2]，郭幸[2]，张振凌[2*]（1. 河南中医药大学第三附属医院，郑州 450046；2. 河南中医药大学药学院，郑州 450046）

摘要：目的 分析不同产地的文冠果仁氨基酸成分及加热方式对氨基酸的影响。**方法** 采用 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），样品以异硫氰酸苯酯进行柱前衍生化，以乙腈 - 甲醇 - 水（3∶1∶1）为流动相 A，0.1 mol • L^{-1} 的醋酸钠溶液（pH 6.5）- 乙腈（93∶7）为流动相 B，柱温 35 ℃，检测波长 254 nm。**结果** 17 种氨基酸在 1.806 ～ 225.200 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系，各产地必需氨基酸、药用氨基酸、苦味氨基酸和儿童必需氨基酸占总氨基酸的含量分别为 14.40% ～ 18.99%、64.06% ～ 73.79%、14.82% ～ 17.09%、23.53% ～ 29.30%，北方地区的文冠果仁氨基酸含量、必需氨基酸含量和药用氨基酸含量均比较高，文冠果仁经过加热处理后各类氨基酸均有所提高。**结论** 不同产地文冠果仁的氨基酸在含量和营养价值上具有差异，北方地区的文冠果仁氨基酸营养和药用价值较高，文冠果仁经过一定的加热后食用营养价值和药用价值得到提高。

关键词：文冠果；氨基酸；柱前衍生化；异硫氰酸苯酯
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-1070-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.038

Amino acid components in Xanthoceras sorbifolium seeds from different origins and heating methods

DUAN Pei-li[1, 2], YUAN Jun[2], ZHANG Shuai[2], GUO Xing[2], ZHANG Zhen-ling[2*] (1. *The Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450046; 2. *School of Pharmacy*, *Henan University of Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450046)

Abstract: Objective To determine the amino acid compositions in Xanthoceras sorbifolium seeds from different origins and the effect of heating on the amino acids. **Methods** Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used after derivation with phenyl isothiocyanate. The mobile phase was acetonitrile-methanol-and water (3∶1∶1) (A) and 0.1 mol • L^{-1} sodium acetate solution (pH 6.5) and acetonitrile (93∶7) (B). The detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 35 ℃. **Results** The range of 1.806 ～ 225.200 μg • mL^{-1} showed a good linearity between the 17 amino acids. The percentages of essential amino acids, medicinal amino acids, bitter amino acids, and children's essential amino acids in each production location were 14.40% ～ 18.99%, 64.06% ～ 73.79%, 14.82% ～ 17.09%, and 23.53% ～ 29.30%, respectively. The content of amino acid, essential amino acid and medicinal amino acid in the Xanthoceras sorbifolium seeds in the northern region was relatively high. All the contents of amino acids were increased after heating. **Conclusion** There are differences in amino acid content and nutritional value of Xanthoceras sorbifolium seeds from different origins, and the nutritional and medicinal value of amino acids in the northern region are higher. The nutritional and therapeutic qualities of Xanthoceras sorbifolium seeds are enhanced after heating.

Key words: Xanthoceras sorbifolium seed; amino acid; pre-column derivatization; phenyl isothiocyanate

基金项目：河南省药品监督管理局科技计划专项（No.2020DB222）。
作者简介：段佩利，女，硕士研究生，主要从事中药炮制学研究，email：dpl161227@126.com *通信作者：张振凌，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药炮制机制及饮片标准化研究，email：zhangzl6758@163.com

文冠果种子为无患子科文冠果 *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. 的成熟种子，资源主要分布于我国河南、陕西、甘肃和内蒙古等北方地区，是我国特有的珍稀木本油料作物[1]。目前对于文冠果种子的研究主要集中于文冠果仁的成分，文冠果仁含油量高达 65%，油脂中不仅富含油酸和亚油酸等不饱和脂肪酸，并且含有稀有的促进大脑发育的神经酸，具有较高的营养价值[2-4]。文冠果仁含有皂苷类、黄酮类和甾醇类成分，具有抗炎和抗氧化等多种药理作用[5-7]。文冠果仁在食品与医药领域都有所应用，现已被开发为多肽口服液[8]、鲜花食用饼[9]和遗尿停胶囊[10]等，说明文冠果仁具有药食同源的潜质，所以从营养维度对文冠果仁的营养价值及食疗作用的物质基础进行研究是很有必要的。

文冠果仁含有较高的蛋白质和丰富的氨基酸成分，氨基酸在维持生命活动中发挥着非常重要的作用，蛋白质的营养高低与氨基酸的种类和含量有着密切的关系[11]，是食品质量及营养价值的重要评价指标[12-13]。现代研究对于文冠果仁的氨基酸成分研究并不充分，临床上对于文冠果仁的应用多采用去油制霜的方式[10]，而传统中药制霜多会采用加热和挤压的方式除油，加热会导致文冠果仁发生美拉德反应，造成氨基酸成分发生变化，故本研究以异硫氰酸苯酯柱前衍生化高效液相色谱法（PITC-HPLC）测定不同产地以及不同加热方式后文冠果仁中氨基酸成分的组成，以期为文冠果仁在食品和临床领域的开发利用和质量评价提供参考。

1　材料

1.1　样品与试药

天冬氨酸（Asp）、谷氨酸（Glu）、丝氨酸（Ser）、甘氨酸（Gly）、组氨酸（His）、精氨酸（Arg）、苏氨酸（Thr）、丙氨酸（Ala）、脯氨酸（Pro）、酪氨酸（Tyr）、缬氨酸（Val）、甲硫氨酸（Met）、胱氨酸（Cys）、异亮氨酸（Ile）、亮氨酸（Leu）、苯丙氨酸（Phe）和赖氨酸（Lys）（中国食品药品检定研究院，批号：624-200104，纯度均≥ 98%）；盐酸（天津市科密欧化学试剂有限公司，分析纯），三乙胺（天津市富宇精细化工有限公司，分析纯），异硫氰酸苯酯（PITC，阿拉丁，批号：P110634），正己烷（山东禹王和天下新材料有限公司，分析纯），乙腈为色谱纯，水为实验室自制超纯水。从市场上购买 12 批不同产地的文冠果种子样品，经河南中医药大学张振凌教授鉴定为无患子科植物文冠果 *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. 的种子，样品信息见表 1。

表 1　12 批文冠果仁样品来源信息

Tab 1　Sample information of 12 batches of Xanthoceras sorbifolium seeds

编号	来源	编号	来源
HN1	河南新乡市新乡县	NX1	宁夏中卫市中宁县
HN2	河南郑州新郑市	NX2	宁夏固原市
SXCH1	陕西咸阳市淳化县	NM1	内蒙古松山县
SXCH2	陕西咸阳市淳化县	NM2	内蒙古宁城县
SX1	山西忻州市代县	LN1	辽宁朝阳凌源市
SX2	山西大同市天镇县	LN2	辽宁阜新市

1.2　仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪（日本岛津公司），BT25S 型 1/10 万电子天平和 BSA224S-CW 型 1/1 万电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司），GZX-9070 型数显鼓风干燥箱（上海博迅实业有限公司），FW-200 型高速万能粉碎机（北京中兴伟业仪器有限公司），KQ-500DV 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），TG16-WS 型高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）。

2　方法与结果

2.1　文冠果仁氨基酸定量分析

2.1.1　样品处理方式　① 生品：取文冠果种子，去掉种壳和种皮得种仁，取种仁在烘箱中 60 ℃下烘干 2 h，粉碎机粉碎，即得；② 微波加热处理：取种仁置于微波炉中加热 2 min，粉碎机粉碎，即得；③ 烘箱加热处理：取种仁置于烘箱中分别在 80、100、120 和 150 ℃下加热 0.5 h，粉碎机粉碎，即得。

2.1.2　供试品溶液制备　取样品粉末 0.6 g，精密称定，置于螺纹试管中，精密加入 6 mol • L^{-1} HCl 溶液 5 mL，玻璃活塞密封，110 ℃烘箱加热反应 6 h，取出冷却至室温，过滤，滤液转移至 10 mL EP 管中，3000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液 1 mL 转移至蒸发皿中，水浴蒸干，冷却至室温，加入 0.1 mol • L^{-1} HCl 溶液复溶，定容至 5 mL，即得供试品溶液。

2.1.3　对照品溶液制备　精密称取 Asp、Glu、Ser、Gly、His、Arg、Thr、Ala、Pro、Tyr、Val、Met、Cys、Ile、Leu、Phe、Lys 对照品适量，分别加 0.1 mol • L^{-1} HCl 溶液配制成储备液，再稀释成质量浓度分别为 0.0910、0.2252、0.1083、0.1592、0.0726、0.1108、0.0924、0.0906、0.1208、0.1713、0.0612、0.1338、0.0600、0.1413、0.0776、0.0891、0.0578 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，作为母液，再分别稀释 0、2、4、8、16 倍作为系列混合对照品溶液。

2.1.4　衍生化方法　精密移取供试品溶液、混合对照品溶液和 0.1 mol • L^{-1} HCl 溶液 500 μL

至 2 mL EP 管中，以 2∶1 的比例分别加入 0.1 mol • L^{-1} 的三乙胺乙腈溶液和 0.1 mol • L^{-1} 的 PITC 乙腈溶液，漩涡混匀，静置 1 h，分别加入 1 mL 的正己烷，漩涡混匀，静置 10 min，分别取下清液 500 μL 于 1 mL 量瓶中，加水定容至 1 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液、混合对照品溶液和空白溶液。

2.1.5　色谱条件　色谱柱为安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相 A 相为乙腈 - 甲醇 - 水（3∶1∶1），流动相 B 相为 0.1 mol • L^{-1} 的醋酸钠溶液（pH 6.5）- 乙腈（93∶7），梯度洗脱（0.01 ～ 12 min，0% ～ 0.5%A；12 ～ 16 min，0.5% ～ 13%A；16 ～ 25 min，13% ～ 28%A；25 ～ 33 min，28% ～ 90%A，33 ～ 35 min，90% ～ 0%A），流速 1 mL • min^{-1}，柱温 35 ℃，检测波长 254 nm，进样量 5 μL。

2.1.6　专属性试验　取“2.1.4”项下空白溶液、混合对照品溶液和供试品溶液，按“2.1.5”项下色谱条件进样测定，共测定了 17 种氨基酸，各成分间色谱分离度较好，空白无干扰，说明本方法具有良好的专属性，见图 1。

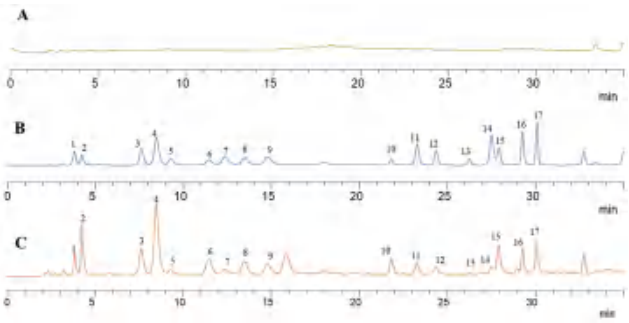


图 1　空白溶液（A）、混合对照品溶液（B）、文冠果供试品溶液（C）的 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of blank solution（A），mix the control solution（B）and test solution of Xanthoceras sorbifolium seed（C）

1. Asp；2. Glu；3. Ser；4. Gly；5. His；6. Arg；7. Thr；8. Ala；9. Pro；10. Tyr；11. Val；12. Met；13. Cys；14. Ile；15. Leu；16. Phe；17. Lys

2.1.7　线性关系考察　分别取系列氨基酸混合对照品储备溶液，按“2.1.4”项下方法进行衍生化处理，进样测定氨基酸含量。以质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，分别以信噪比（*S*/*N*）＝ 3 确定检测限，*S*/*N* ＝ 10 确定定量限，结果见表 2，氨基酸对照品在该浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表 2　17 种氨基酸的线性考察结果

Tab 2　Linearity of 17 amino acids

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	检测限 /（μg • mL^{-1}）	定量限 /（μg • mL^{-1}）
Asp	$y = 2.219\times10^{3}x + 1.227\times10^{3}$	0.9997	2.844 ～ 91.000	0.5968	1.9893
Glu	$y = 2.309\times10^{3}x + 82.756$	0.9998	7.038 ～ 225.200	0.6398	2.1327
Ser	$y = 5.406\times10^{3}x + 6.899\times10^{3}$	0.9996	3.384 ～ 108.300	0.1179	0.3930
Gly	$y = 1.258\times10^{4}x - 8.604\times10^{3}$	0.9996	4.975 ～ 159.200	0.3365	1.1217
His	$y = 4.046\times10^{3}x - 2.769\times10^{3}$	0.9997	2.269 ～ 72.600	0.2658	0.8860
Arg	$y = 3.281\times10^{3}x + 1.045\times10^{3}$	0.9997	3.463 ～ 110.800	0.3821	1.2737
Thr	$y = 4.879\times10^{3}x - 6.224\times10^{2}$	0.9997	2.888 ～ 92.400	0.4557	1.5190
Ala	$y = 4.159\times10^{3}x - 5.584\times10^{3}$	0.9998	2.831 ～ 90.600	0.3114	1.0380
Pro	$y = 7.115\times10^{3}x - 2.732\times10^{2}$	0.9997	3.775 ～ 120.800	0.7167	2.3890
Tyr	$y = 9.491\times10^{2}x - 3.292\times10^{3}$	0.9997	5.353 ～ 171.300	0.4471	1.4903
Val	$y = 7.737\times10^{3}x + 1.913\times10^{2}$	0.9997	1.913 ～ 61.200	0.2691	0.8970
Met	$y = 6.359\times10^{3}x - 3.395\times10^{3}$	0.9997	4.181 ～ 133.800	0.1265	0.4217
Cys	$y = 2.064\times10^{3}x + 1.473\times10^{3}$	09996	2.784 ～ 89.100	0.3034	1.0113
Ile	$y = 1.193\times10^{4}x + 3.104\times10^{3}$	0.9995	1.875 ～ 60.000	0.2671	0.8903
Leu	$y = 7.575\times10^{3}x - 5.145\times10^{2}$	0.9996	4.416 ～ 141.300	0.6339	2.1130
Phe	$y = 8.558\times10^{3}x - 1.836\times10^{3}$	0.9999	2.425 ～ 77.600	0.2751	0.9170
Lys	$y = 1.001\times10^{4}x - 1.323\times10^{3}$	0.9998	1.806 ～ 57.800	0.3302	1.1007

2.1.8　精密度试验　精密移取氨基酸混合对照品溶液，衍生化处理后按“2.1.5”项下色谱条件连续进样 6 次，计算得 17 种氨基酸峰面积 *RSD* 为 0.17% ～ 4.8%，表明仪器精密度良好。

2.1.9　稳定性试验　取文冠果仁供试品溶液（HN1），衍生化处理 0、4、8、12、16、20 h 后按“2.1.5”项下色谱条件进样分析，计算得 17 种氨基酸峰面积 *RSD* 为 0.29% ～ 4.4%，表明供试品衍生物在 20 h 内稳定性良好。

2.1.10　重复性试验　取文冠果仁供试品溶液（HN1）6 份，分别按照“2.1.4”项下条件进行衍生化处理，按照“2.1.5”项下色谱条件进样分析，计算得到 Asp、Glu、Ser、Gly、His、Arg、Thr、Ala、Pro、Tyr、Val、Met、Cys、Ile、Leu、Phe、Lys 的平均含量分别为 10.86、23.07、7.48、8.69、2.74 、10.37、2.52、7.56、13.24、22.63、2.47、2.01、5.78、1.21、7.16、3.55、6.62 mg • g^{-1}，计算 *RSD* 为 0.48% ～ 1.4%，结果表明该方法重复性良好。

2.1.11　加样回收试验　精密称取已知成分含量的文冠果仁供试品（HNI）6 份，加入与样品氨基酸含量相当的对照品，按照“2.1.2”和“2.1.3”项下条件制备供试品溶液，进样测定。计算得到 17 种氨基酸的平均回收率为 91.91% ～ 108.46%，*RSD* 为 0.33% ～ 5.0%，结果见表 3。

2.2　文冠果仁样品氨基酸含量测定

取不同产地和不同加热方式的文冠果仁样品，按“2.1.2”和“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，进样分析，计算样品中 17 种氨基酸的含量，结果见表 4、5。

2.3　不同产地及不同加热方式文冠果仁中氨基酸成分分析

2.3.1　总氨基酸（TAA）及成分分析　TAA 及各成分占比见表 6、7 和图 2、3，12 批样品中氨基酸的总量具有较大的差异，其中内蒙古、山西和辽宁省的氨基酸总含量较高，这可能与不同产地的地理和气候有关。另外同一省份不同产区也有明显的差异，采集于辽宁省的两个不同产地的文冠果仁中 TAA 平均相差了 32.88 mg • g^{-1}，这可能与同一省份不同地区的生长环境有关，不同生长环境会影响植物体内化学成分的积累[14]；文冠果仁经过微波和加热处理后，TAA 有所升高，并且烘箱加热伴随着温度的提高，TAA 逐渐增加，微波和烘箱加热处理会产生美拉德反应，导致氨基酸成分发生变化[15]。文冠果仁氨基酸各成分中 Glu、Tyr、Gly 和 Arg 的含量较高，经过加热处理后 Glu 的含量有所降低，而 Tyr 的含量升高，说明 Glu 和 Tyr 的含量都会受到温度的影响而发生变化。

2.3.2　必需氨基酸（EAA）　由表 6 可知，文冠果仁中含有 7 种人体 EAA（Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys），12 批样品中 EAA 的含量为 24.41 ～ 31.94 mg • g^{-1}，山西、内蒙古和辽宁含量相对较高，其中，Leu 和 Lys 含量最多，异 Leu 含量最低。EAA 占 TAA 比例（EAA/TAA）为 14.40% ～ 18.99%，平均值 16.13%，EAA 占非必需 TAA 比例（EAA/NEAA）为 16.83% ～ 23.45%，平

表 3　17 种氨基酸加样回收试验结果 (n = 6)

Tab 3　Recovery of 17 amino acids (n = 6)

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率 /%	*RSD*/%
Asp	6.56	6.25	13.40	104.61	0.48
Glu	13.74	14.03	27.40	99.68	1.3
Ser	4.90	5.98	11.15	102.44	0.88
Gly	5.07	5.11	10.22	100.35	0.67
His	1.82	1.69	3.80	108.46	1.2
Arg	6.46	6.98	13.49	100.39	1.0
Thr	1.56	1.85	3.54	104.06	1.4
Ala	4.71	5.83	10.61	100.64	0.51
Pro	1.57	2.95	4.51	99.61	3.6
Tyr	13.53	17.29	31.95	103.66	0.95
Val	1.34	1.98	3.16	95.13	3.8
Met	1.28	1.55	2.78	98.23	0.68
Cys	1.18	1.39	2.36	91.91	5.0
Ile	0.42	0.47	0.95	106.49	1.2
Leu	3.24	3.48	6.56	97.55	1.2
Phe	1.69	1.75	3.39	98.49	0.43
Lys	2.73	2.99	5.68	99.28	0.33

表 4　不同产地文冠果仁中氨基酸含量 (mg • g^{-1}，n = 3)

Tab 4　Amino acid content in Xanthoceras sorbifolium seeds from different origin (mg • g^{-1}，n = 3)

编号	Asp	Glu	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	Lys
HN1	10.65	22.34	7.66	8.68	2.59	10.20	2.48	7.79	13.75	23.30	2.68	1.98	5.39	1.36	7.49	3.67	6.68
HN2	9.50	28.07	7.62	8.39	2.84	10.53	2.42	8.94	17.21	23.31	2.46	1.99	4.67	1.37	6.68	3.59	5.89
SXCH1	10.98	24.71	7.99	9.23	2.66	11.16	3.21	9.70	16.64	31.46	3.16	2.30	2.61	1.34	7.57	3.61	5.80
SXCH2	15.53	35.04	9.81	9.99	3.57	13.53	3.58	10.59	20.62	33.05	3.33	2.43	2.33	1.37	8.38	3.69	7.41
SX1	17.35	29.50	13.57	10.61	7.13	18.24	6.52	14.57	22.43	33.50	3.53	2.49	2.00	1.18	5.93	3.02	5.75
SX2	14.69	30.43	10.19	8.82	7.02	16.24	6.61	11.51	13.63	26.06	2.14	2.14	1.94	1.13	5.67	2.94	4.72
NX1	15.87	44.80	8.35	9.00	2.70	11.48	3.37	9.57	15.24	27.95	2.86	2.74	2.07	1.37	7.29	3.53	5.53
NX2	17.34	41.75	10.41	9.55	3.68	13.97	3.63	11.84	20.62	30.79	3.53	2.76	2.15	1.43	7.22	3.84	7.04
NM1	17.08	42.81	12.04	10.28	3.77	15.57	3.85	11.00	19.61	31.40	3.67	2.75	2.08	1.57	7.79	3.92	8.40
NM2	15.55	43.20	9.05	9.66	3.07	13.44	3.76	9.89	15.81	30.21	2.98	2.75	1.98	1.43	7.53	3.69	6.14
LN1	17.73	38.21	13.69	10.51	4.30	15.21	3.89	11.45	21.20	35.03	3.68	2.85	2.62	1.52	7.53	3.77	7.77
LN2	14.89	34.03	10.06	9.65	3.00	13.00	3.59	9.38	15.77	28.87	2.67	2.83	2.21	1.39	7.33	3.50	5.94

表 5　不同加热方式文冠果仁中氨基酸含量 (mg • g^{-1}，n = 3)

Tab 5　Amino acid content in Xanthoceras sorbifolium seeds from different heating methods (mg • g^{-1}，n = 3)

加热方式	Asp	Glu	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	Lys
生品	11.82	30.73	10.49	10.08	3.47	15.28	4.69	10.33	13.26	32.03	3.32	2.80	3.55	1.53	8.90	3.66	5.16
微波	11.64	31.24	10.84	10.72	3.60	15.47	4.76	10.95	13.72	36.00	6.49	3.99	3.77	1.68	9.39	4.19	10.26
烘箱 80 ℃	10.33	29.18	11.58	8.87	2.55	15.71	4.67	11.55	14.09	32.27	3.54	2.66	3.69	1.37	7.13	3.50	6.65
烘箱 100 ℃	11.70	29.59	10.65	10.35	3.64	15.64	4.73	10.78	14.50	33.53	3.46	3.28	3.69	1.57	9.06	3.76	5.47
烘箱 120 ℃	10.57	26.57	11.79	9.05	2.98	16.24	5.01	8.47	16.68	35.97	3.77	2.98	4.21	1.95	10.85	4.65	3.69
烘箱 150 ℃	7.87	23.34	11.79	9.87	3.69	18.96	6.48	7.69	18.59	43.62	4.75	3.32	6.81	2.60	12.46	6.94	2.77

均值 19.26%，这与 FAO/WHO 提出的 EAA/TAA 为 40% 和 EAA/NEAA 为 60% 的理想蛋白质相差较大。提示文冠果仁经过加热后 EAA 的比例有所提高。

2.3.3　药用氨基酸（MAA）　文冠果仁中含有 9 种 MAA（Asp、Glu、Gly、Arg、Tyr、Met、Ile、Leu、Phe），MAA 的含量是中药发挥药效的重要因素之一，12 批文冠果仁中 MAA 的含量为 94.99 ～ 140.00 mg • g^{-1}，其中 MAA/TAA 的比例为 64.06% ～ 73.79%，这说明文冠果仁中含有丰富的 MAA。根据表 6 可知，内蒙古和宁夏地区的 MAA 较高，其中含量最高的成分为 Glu 和 GLu；由表 7 可知，文冠果仁经过加热处理后药用氨基酸的总量有所提高，但是 MAA/TAA 的比例略有降低。

表 6　不同产地文冠果仁氨基酸种类分析

Tab 6　Amino acid species of Xanthoceras sorbifolium fruit from different origins

编号	含量 /（mg • g^{-1}）						EAA/	EAA/	CEAA/	MAA/	BAA/
	TAA	EAA	NEAA	CEAA	MAA	BAA	TAA/%	NEAA/%	TAA/%	TAA/%	TAA/%
HN1	138.70	26.34	112.36	39.14	94.99	23.71	18.99	23.45	28.22	68.49	17.09
HN2	145.48	24.41	121.07	37.77	97.95	23.03	16.78	20.16	25.96	67.33	15.83
SXCH1	154.13	26.99	127.14	40.81	106.82	25.53	17.51	21.23	26.48	69.30	16.56
SXCH2	184.25	30.18	154.07	47.28	129.04	29.03	16.38	19.59	25.66	70.03	15.76
SX1	197.29	28.41	168.88	53.78	126.38	31.36	14.40	16.83	27.26	64.06	15.90
SX2	165.88	25.35	140.53	48.61	111.71	27.33	15.28	18.04	29.30	67.34	16.47
NX1	173.71	26.69	147.02	40.87	128.19	25.74	15.36	18.15	23.53	73.79	14.82
NX2	191.56	29.44	162.12	47.09	134.27	28.91	15.37	18.16	24.58	70.09	15.09
NM1	197.57	31.94	165.63	51.28	140.00	31.35	16.17	19.28	25.95	70.86	15.87
NM2	180.14	28.28	151.86	44.78	132.17	28.13	15.70	18.62	24.86	73.37	15.61
LN1	200.98	31.02	169.96	50.53	138.61	30.80	15.44	18.25	25.14	68.97	15.32
LN2	168.10	27.25	140.85	43.24	120.03	27.22	16.21	19.35	25.72	71.40	16.19
平均值	174.82	28.03	146.79	45.43	121.68	27.68	16.13	19.26	26.06	69.59	15.88

表 7　不同加热方式文冠果仁氨基酸种类分析

Tab 7　Amino acid species in Xanthoceras sorbifolium fruit with different heating methods

加热方式	含量 /（mg • g^{-1}）						EAA/	EAA/	CEAA/	MAA/	BAA/
	TAA	EAA	NEAA	CEAA	MAA	BAA	TAA/%	NEAA/%	TAA/%	TAA/%	TAA/%
生品	171.10	30.07	141.04	48.81	120.45	31.83	17.57	21.32	28.53	70.40	18.60
微波	188.71	40.76	147.94	59.83	132.90	37.02	21.60	27.55	31.71	70.43	19.62
烘箱 80 ℃	169.35	29.52	139.83	47.79	116.32	30.42	17.43	21.11	28.22	68.68	17.96
烘箱 100 ℃	175.42	31.34	144.09	50.62	122.39	33.01	17.86	21.75	28.86	69.77	18.82
烘箱 120 ℃	175.43	32.90	142.53	52.12	120.57	35.79	18.75	23.08	29.71	68.73	20.40
烘箱 150 ℃	191.55	39.33	152.22	61.98	129.15	42.09	20.53	25.83	32.35	67.43	21.97

2.3.4　苦味氨基酸（BAA）　文冠果仁生品具有苦涩的味道，这与 BAA 存在一定的联系，12 批文冠果仁样品中 BAA（Arg、Val、Met、Ile、Leu）的含量为 23.03 ～ 31.35 mg • g^{-1}，其中河南地区的 BAA 较低，其他地区含量差别不大，但是河南地区 BAA 的比例（BAA/TAA）高于其他地区；文冠果仁经过加热处理后，BAA 的含量有较大的提高，但是加热处理后 BAA/TAA 仍高于生品的，这说明经过处理后文冠果仁的苦涩口感可能并不会被减弱。

2.3.5　儿童必需氨基酸（CEAA）　儿童生长所需的氨基酸和成年人有所不同，CEAA 包含了 Arg、His、Lys、色氨酸、Met、Thr、Leu、Val、Ile 和 Phe 这 10 种氨基酸，而文冠果仁中含有除色氨酸外的其他 9 种氨基酸，各个产地的 CEAA 含量差别不是很明显，CEAA 的含量为 37.77 ～ 53.78 mg•g^{-1}，CEAA 占比（CEAA/TAA）为 23.53% ～ 29.30%；文冠果仁经过加热处理后 CEAA 的含量及 CEAA/TAA 相比于生品有所升高。

3　讨论

氨基酸的检测多采用质谱法、柱后衍生化法和柱前衍生化法，相比于前两种，柱前衍生化法具有检测限与灵敏度高、检测简便可靠的优点，本试验采用的衍生化试剂为 PITC，结果表明衍生产物单一稳定，对氨基酸检测无干扰，可为文冠果仁中氨基酸类成分含有量测定提供参考。

本研究收集了河南、山西、陕西、内蒙古、宁夏和辽宁 6 个省份的文冠果仁，对各个产地的氨基酸成分研究发现，北方地区的文冠果仁氨基酸含量、EAA 和 MAA 含量均比较高，中原地区的文冠果仁苦味氨基酸含量较高。由此可见，文冠果仁氨基酸成分受产地和环境因素的影响，且从氨基酸组成上来看，北方地区的氨基酸营养成分和药用价值相对较高，这可为文冠果种子的资源评价研究提供参考。

文冠果仁的含油量较高，一般不会以生品作为食品或者入药，通常会采用加压和加热进行处理，故本研究对文冠果仁进行微波、烘箱加热处

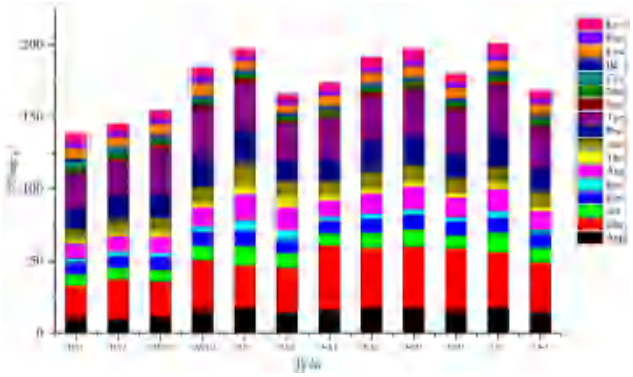


图 2　12 批文冠果仁中氨基酸的含量（n = 3）

Fig 2　Amino acid content of 12 batches of Xanthoceras sorbifolium seeds（n = 3）

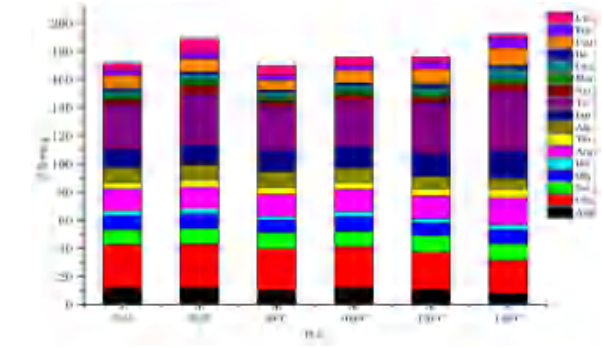


图 3　不同加热方式文冠果仁中氨基酸的含量（n = 3）

Fig 3　Amino acid content of Xanthoceras sorbifolium seeds with different heating methods（n = 3）

理来探究温度对文冠果仁氨基酸成分的影响，结果表明经过加热后，TAA、EAA、MAA、BAA 和 CEAA 含量均有所提高，微波处理后 TAA、BAA 含量略低于烘箱加热处理，EAA、MAA 和 CEAA 含量均高于烘箱加热处理，相比较而言，微波处理效果更好。EAA 是人体不能合成或者自身合成不能满足人体需要的氨基酸，是维持人体生命活动的基准物质；MAA 能够通过参与机体中的器官或组织的生理代谢活动，通过维持人体代谢氮平衡，进而提高人体免疫力，文冠果仁 MAA 中 Glu、Pro、GLu、Arg 和 Asp 的含量较高，Glu 对肝脏具有较好的保护作用，并且对中枢神经系统具有明显的兴奋作用 [16]，Pro 是身体生产胶原蛋白和软骨所需的氨基酸，具有抗衰老和修复受损皮肤的作用 [17]；GLu 对在焦虑症和抑郁症等病症的治疗中发挥着重要作用 [18]；Arg 在维持心血管正常功能以及肥胖、糖尿病（消渴症）的治疗中发挥重要作用 [19]；Asp 能调节脑和神经的代谢功能，具有改善疲劳作用 [20]。文冠果仁经过不同方式的加热后食用营养价值和药用价值都得到提高。

综上，本研究建立了 PITC-HPLC 测定文冠果仁中 17 种氨基酸含量的方法，不同产地的氨基酸含量和组成具有较为明显的差异，文冠果仁经过不同加热方式处理均会导致氨基酸成分发生变化，本试验有助于进一步了解文冠果仁中氨基酸组成及营养价值，可为文冠果种子的品质分析和资源开发利用提供参考。

参考文献

[1] 赵思阳，杨伞伞，管文轲，等 . 不同加热条件对文冠果油脂肪酸和生育酚含量的影响 [J]. 中国油脂，2022，47（10）：39-43.

[2] 杨跃文，曹恭祥，张月芳，等 . 不同种源文冠果种子营养成分研究 [J]. 内蒙古林业科技，2022，48（1）：28-32.

[3] 葛朝红，李梦喆，张洪伟，等 . 文冠果种质资源种仁主要营养成分检测及相关分析 [J]. 特产研究，2023，45（3）：30-37.

[4] 许佳敏，佟祎鑫，王菊花，等 . 文冠果油的营养成分及功能活性研究进展 [J]. 中国油脂，2022，47（10）：77-82.

[5] 姜鑫，房安石，杜维，等 . 不同产地文冠果种仁黄酮类成分的 LC-MS/MS 检测 [J]. 中国油脂，2023，48（5）：133-140.

[6] 杨帆，韩沙沙，南易，等 . 文冠果研究开发进展 [J]. 中国中药杂志，2021，46（17）：4334-4343.

[7] 宋楠楠，路橦，肖姣，等 . 基于 UHPLC-QTOF/MSE 代谢组学方法研究文冠果不同部位化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报，2019，36（10）：900-909.

[8] 宋健平，王雨萌，任婷，等 . 文冠果多肽口服液的研制及抗氧化活性研究 [J]. 中国果菜，2023，43（9）：18-22.

[9] 慈澄，李婷婷，吴彩娥，等 . 文冠果鲜花饼的工艺配方优化 [J]. 食品研究与开发，2022，43（17）：94-99.

[10] 王曼莉 . HPLC 法同时测定遗尿停胶囊中 6 个成分含量 [J]. 中药材，2023，46（4）：955-958.

[11] 顾金瑞，曹美琪，王莹，等 . 基于 HPLC-MS/MS 技术的不同品种药食两用欧李果原汁中氨基酸含量差异分析 [J]. 中南药学，2019，17（3）：435-440.

[12] 高海燕，余欢迎，金传山，等 . 多花黄精须根营养成分及抗氧化活性研究 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1262-1266.

[13] 韩承刚，李明显，姬丽芳，等 . 衍生化高效液相色谱法测定醋酸西曲瑞克中 10 种手性氨基酸的含量 [J]. 中南药学，2023，21（5）：1335-1340.

[14] 张毅，敖妍，刘觉非，等 . 不同分布区文冠果的生长性状差异及其与地理 - 气候因子的相关性分析 [J]. 植物资源与环境学报，2019，28（3）：44-50.

[15] 段耿婷，刘付松，张澜，等 . 不同产地党参的总硒、蛋白质、多糖含量及土壤总硒含量的相关性分析 [J]. 中南药学，2023，21（3）：777-783.

[16] 杨香瑜，张韶辉，郭珩，等 . 丙氨酰谷氨酰胺注射液临床应用分析及合理性探讨 [J]. 中南药学，2017，15（9）：1338-1340.

[17] 和丽丽，左庆娟，马赛，等 . 慢性心力衰竭患者的血清脯氨酸水平及与心功能的相关性 [J]. 中国心血管杂志，2023，28（1）：12-16.

[18] 刘素侠，王义坤 . 探析代谢活化在酪氨酸激酶抑制剂所致肝毒性的作用及防治对策 [J]. 中南药学，2019，17（4）：589-594.

[19] 王琳，马海英 . 肾病用 17 种氨基酸注射液制备工艺的研究 [J]. 中南药学，2014，12（5）：418-423.

[20] 周芳，刘韶，邓梦如，等 . GC-MS/SIM 法测定不同产地杜仲叶中的氨基酸 [J]. 中南药学，2012，10（4）：257-260.

（收稿日期：2023-11-23；修回日期：2023-12-28）

高效液相色谱法测定芦荟大黄素的有关物质

姚倩[1, 2]，邓远雄[1*]，李岩[3]，罗剑[2]，夏志强[2]，杜乐[2]（1. 湖南师范大学医学院，长沙 410013；2. 长沙晶易医药科技股份有限公司，长沙 410013；3. 鄂尔多斯市中心医院药剂科，内蒙古 鄂尔多斯 017000）

摘要：目的 建立 HPLC 法测定芦荟大黄素中有关物质的含量。**方法** 采用 HPLC 法分析，色谱柱为 Welch Xtimate C18（150 mm×4.6 mm，5 μm）柱；以 pH 2.0 磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈为流动相，梯度洗脱；流速为 1.2 mL • min^{-1}，进样量为 20 μL，柱温为 30 ℃，检测波长为 254 nm。**结果** 芦荟大黄素与其有关物质的色谱峰均能良好分离，精密度试验表明，当杂质含量＜ 0.1%，12 份样品的 *RSD* ＜ 13%；当杂质含量≥ 0.1%，12 份样品的 *RSD* ＜ 4.0%，方法精密度良好。同一厂家 6 批芦荟大黄素样品测定结果显示，最大单杂为已知杂质大黄醛，含量 1.42%，杂质总含量小于 5.0%，但不同批样品间杂质存在差异。**结论** 建立的方法灵敏、专属性强，准确度高，可用于芦荟大黄素有关物质的测定。

关键词：芦荟大黄素；高效液相色谱；多组分含量测定；质量控制
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-1076-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.039

Determination of aloe-emodin related substances by HPLC

YAO Qian[1, 2], DENG Yuan-xiong[1*], LI Yan[3], LUO Jian[2], XIA Zhi-qiang[2], DU Le[2] (1. *School of Medicine*, *Hunan Normal University*, *Changsha* 410013; 2. *Changsha King-eagle Medical Science and Technology Co.*, *Ltd.*, *Changsha* 410013; 3. *Department of Pharmacy*, *Ordos Central Hospital*, *Ordos Inner Mongolia* 017000)

Abstract: Objective To determine the related substances in aloe-emodin by HPLC. **Methods** A Welch Xtimate C18 column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisted of pH 2.0 phosphate buffer-methanol-acetonitrile in the gradient elution. The flow rate was maintained at 1.2 mL • min^{-1}, with an injection volume of 20 μL, a column temperature of 30 ℃ , and detection wavelength at 254 nm. **Results** Aloe-emodin and its related substances were well separated. Experiments revealed excellent precision, with a maximum relative standard deviation (*RSD*) below 13% when the impurity content was below 0.1%. When the impurity content ≥ 0.1%, the maximum *RSD* among the 12 parts tested was below 4.0%. The predominant single impurity as rhubarb aldehyde was identified in 6 batches of aloe-emodin samples from the same manufacturer, with a content of 1.42%. The total impurity content in these samples was less than 5.0%, with variations in the impurity profiles among different batches. **Conclusion** This method is sensitive, specific, and accurate, which is suitable for the detection of related substances in aloe-emodin and control its quality.

Key words: aloe-emodin; HPLC; muti-component content determination; quality control

芦荟大黄素是一种蒽醌化合物，来源于天然植物芦荟、大黄、决明子、虎杖等[1]，其具有多种药理作用，已被广泛研究，如芦荟大黄素能够抗肿瘤[2-3]、抗病毒[4]、抗菌[5]、抗炎[6]、抗动脉粥样硬化[7-8]、抗氧化[9]等。芦荟大黄素取材方便快捷，来源广泛，具有安全、经济、高效等优点。

目前，芦荟大黄素的研究报道主要集中在药理研究方面，其质量研究方面文献较少，且芦荟大黄素常作为大黄、决明子、芦荟中的杂质进行研究[10-11]。而针对芦荟大黄素作为主成分，对其有关物质控制的研究暂无文献报道。芦荟大黄素及其类似物结构均含蒽醌警示结构具有潜在致突变性[12]，

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ4437）。
作者简介：姚倩，女，硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：2447781250@qq.com *通信作者：邓远雄，男，教授，主要从事药物分析及药代动力学研究，email：dyxdjy@126.com

在较低水平可能造成 DNA 损伤，导致 DNA 突变，引发癌症，与安全性息息相关。芦荟大黄素常作为保健食品添加剂、医药化工中间体、化妆品原料药及护发原料等使用，临床主要用作泻药。有关物质作为质量标准中一项重要控制内容，与芦荟大黄素安全性相关，对有关物质的充分研究，便于控制其质量，可更好地发挥芦荟大黄素作用。本课题组系统研究了芦荟大黄素有关物质检测方法，为芦荟大黄素质量研究和控制提供参考依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LC-20AT/SPD-M20A 型高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；XA6.4Y.M 型百万分之一电子天平（苏州培科实验室仪器科技有限公司），SQP/SECURA225D-1CN 型十万分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]。

1.2　试药

芦荟大黄素对照品（批号：SRA-102-20221026，含量：96.7%，长沙晶易医药科技股份有限公司）；芦荟大黄素（批号分别为 211205D、220513I、220529L、220628L、220718L、220818L 和 230113L，含量＞95%，南京道斯夫生物科技有限公司），芦荟苷（批号：110787-202109，含量：94.8%）、大黄素（批号：110756-201913，含量：96.0%）（中国食品药品检定研究院），大黄醛（批号：SRA-203-20221123，含量：98.9%，长沙晶易医药科技股份有限公司），大黄酸（批号：DM21080673，含量：99.31%，广州隽沐生物科技股份有限公司）。甲醇、乙腈、四氢呋喃（色谱纯，ACS 公司），磷酸二氢钾、磷酸、三乙胺（分析纯，国药集团化学试剂有限公司），超纯水（自制）。

2　方法与结果

2.1　溶液的配制

2.1.1　供试品溶液　取芦荟大黄素供试品 20 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，加四氢呋喃 6 mL，超声使溶解，用 30% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得供试品溶液。

2.1.2　混合对照品储备液 1　取芦荟苷、大黄素、大黄醛、大黄酸和芦荟大黄素各 10 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.1.3　混合对照品储备液 2　精密移取 5 mL 混合对照品储备液 1 置 100 mL 量瓶中，用 30% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.1.4　对照品溶液　精密移取 2 mL 混合对照品储备溶液 2 置 20 mL 量瓶中，加入 6 mL 四氢呋喃，用 30% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得对照品溶液。

2.1.5　系统适用性溶液　取芦荟大黄素供试品 20 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，加四氢呋喃 6 mL，超声使溶解，精密加入 2 mL 混合对照品储备液 2，用 30% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀后，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得系统适用性溶液。

2.1.6　定位溶液

① 芦荟苷定位溶液：取芦荟苷对照品约 10 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀；再精密量取溶液 50 μL，置 10 mL 量瓶中，加四氢呋喃 3 mL，用 30% 甲醇稀释至刻度，摇匀。

② 大黄素定位溶液：取大黄素对照品约 10 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加四氢呋喃使溶解并稀释至刻度，摇匀；再精密量取溶液 50 μL，置 10 mL 量瓶中，加四氢呋喃 3 mL，用 30% 甲醇稀释至刻度，摇匀。

③ 大黄醛定位溶液：取大黄醛对照品约 10 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加四氢呋喃使溶解并稀释至刻度，摇匀；再精密量取溶液 100 μL，置 10 mL 量瓶中，加四氢呋喃 3 mL，用 30% 甲醇稀释至刻度，摇匀。

④ 大黄酸定位溶液：取大黄酸对照品约 10 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加四氢呋喃使溶解并稀释至刻度，摇匀；再精密量取溶液 100 μL，置 10 mL 量瓶中，加四氢呋喃 3 mL，用 30% 甲醇稀释至刻度，摇匀。

2.2　色谱条件

色谱柱为 Welch Xtimate C18（150 mm×4.6 mm，5 μm）；以 pH 2.0 磷酸盐缓冲液（取磷酸二氢钾约 2.7 g 和三乙胺 10 mL，加水 2000 mL 溶解，用磷酸调节 pH 至 2.0）为流动相 A，甲醇为流动相 B，乙腈为流动相 C，按表 1 进行梯度洗脱；检测波长为 254 nm，进样量为 20 μL，柱温为 30 ℃，流速为 1.2 mL·min^{-1}。

表 1　梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution procedure

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0	44	56	0
28	44	56	0
45	30	0	70
55	30	0	70
56	44	56	0
65	44	56	0

2.3　方法学考察

2.3.1　系统适用性试验　取“2.1.5”项下系统适用性溶液，按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，见图 1，主峰与相邻杂质峰的分离度大于 3.0，各有关物质峰之间的分离度均大于 1.2，芦荟大黄素峰面积和保留时间的 *RSD* 分别为 1.1%、0.23%，理论板数以主峰计大于 10 000。

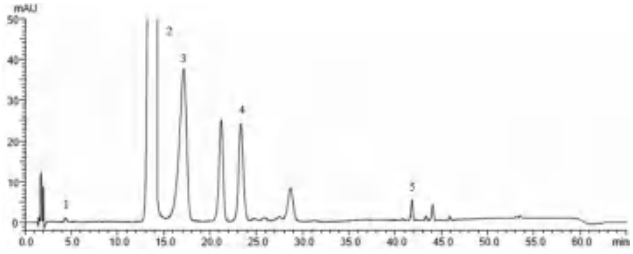


图 1　系统适用性 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of system suitability solution

1. 芦荟苷（aloin）；2. 芦荟大黄素（aloe-emodin）；3. 大黄醛（rhubarb aldehyde）；4. 大黄酸（rhein）；5. 大黄素（emodin）

2.3.2　专属性试验　取“2.1”项下供试品溶液、已知杂质定位溶液和对照品溶液，连续进样测定，色谱图见图 2。供试品溶液中，主峰与前后相邻杂质峰的分离度最小为 3.15，各已知杂质与相邻杂质的分离度最小为 2.63，未知杂质与相邻杂质的分离度最小为 1.12，证明方法专属性良好。主峰芦荟大黄素最小峰纯度指数为 52，说明主峰为单一峰，不包含其他杂质。

2.3.3　定量方式、线性关系、定量限与检测限考察　精密移取“2.1.3”项下混合对照品储备液 2，制备

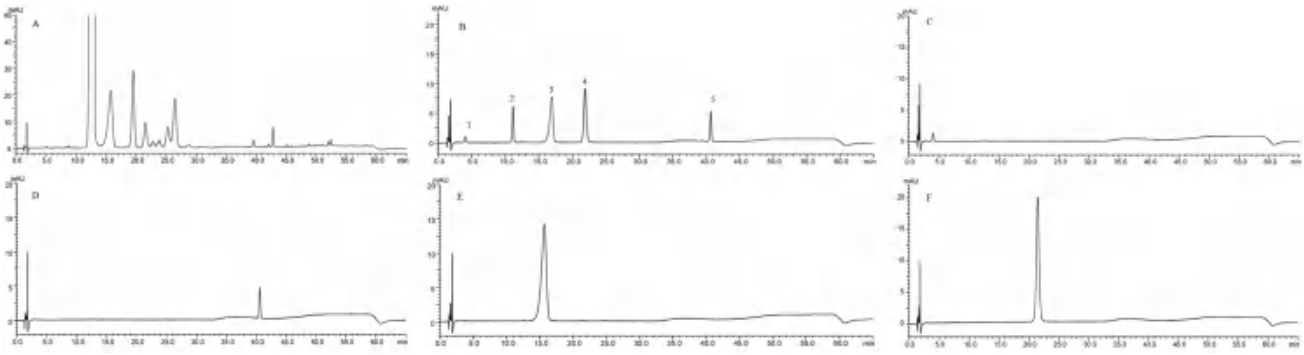


图 2　专属性试验色谱图

Fig 2　Chromatograms of specificity test

A. 供试品（sample）；B. 混合对照品（mix control）；C. 芦荟苷对照品（aloin reference）；D. 大黄素对照品（emodin reference）；E. 大黄醛对照品（rhubarb aldehyde reference）；F. 大黄酸对照品（rhein reference）；1. 芦荟苷（aloin）；2. 芦荟大黄素（aloe-emodin）；3. 大黄醛（rhubarb aldehyde）；4. 大黄酸（rhein）；5. 大黄素（emodin）

系列标准溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，以质量浓度（μg・mL^{-1}）为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归，得线性方程；以信噪比（*S*/*N*）≥ 10 的对照品质量浓度为定量限，以 *S*/*N* ≥ 3 的对照品质量浓度为检测限。结果见表 2，表明各组分在相应线性范围内呈现良好的线性关系。

表 2　芦荟大黄素的回归方程、相关系数、定量限和检测限

Tab 2　Regression equation，correlation coefficient，limit of quantification and limit of detection of aloe-emodin

化合物	线性方程	*r*	定量限 /（μg・mL^{-1}）	检测限 /（μg・mL^{-1}）
芦荟苷	$y = 1.367\times10^{4}x - 3.024\times10^{2}$	0.9993	0.40	0.20
芦荟大黄素	$y = 9.513\times10^{4}x - 7.507\times10^{3}$	0.9962	0.05	0.03
大黄素	$y = 6.456\times10^{4}x - 2.103\times10^{3}$	0.9994	0.20	0.10
大黄醛	$y = 8.253\times10^{4}x + 1.262\times10^{4}$	0.9999	0.10	0.05
大黄酸	$y = 4.506\times10^{4}x - 5.470\times10^{4}$	1.000	0.05	0.03

2.3.4　精密度试验　取“2.1.4”项下对照品溶液，连续进样 6 次，计算得芦荟苷、芦荟大黄素、大黄素、大黄醛、大黄酸峰面积的 *RSD* 分别为 0.52%、0.040%、0.71%、0.42%、0.31%，表明仪器精密度良好。

2.3.5　重复性试验　取“2.1.1”项下供试品溶液 6 份，按“2.2”项下色谱条件进样测定，结果当杂质含量＜ 0.1%，*RSD* 最大为 9.8%（小于 10%）；当杂质含量≥ 0.1%，*RSD* 最大为 1.8%（小于 2.0%），表明方法重复性良好。

2.3.6　稳定性试验　取“2.1.1”项下供试品溶液，分别于制备后室温条件下放置 0、10、20、40、49、66、74 h 进样测定。结果显示杂质个数未增加，杂质含量变化率最大为 0.01%；表明供试品溶液于室温条件放置 74 h 能够保持稳定。

2.3.7　加样回收试验　取 9 份已知含量的芦荟大黄素供试品约 20 mg（样品纯度 96.150%），精密称定，分别置 20 mL 量瓶中，加 6 mL 四氢呋喃溶解样品，再分别精密加入“2.1.3”项下混合对照品储备液 1、2 和 3 mL（即混合对照溶液浓度的 50%、100%、150%），各 3 份，用 30% 甲醇水溶液稀释至刻度，摇匀；配制得低、中、高 3 个浓度的加标供试品溶液 9 份，连续进样测定，计算已知杂质的回收率。测得芦荟苷、大黄素、大黄醛、大黄酸高、中、低浓度的加样回收率在 81.7% ～ 106.8%，*RSD* 均小于 4.0%，表明该方法各已知杂质的加样回收率良好。

2.3.8　耐用性试验　取“2.1.5”项下系统适用性溶液

和“2.1.1”项下供试品溶液，按照“2.2”项下色谱条件分别进样。以杂质含量和系统适用性要求为指标，分别考察柱温（25、30、35 ℃），流速（1.0、1.2、1.4 mL·min^{-1}），流动相 pH（1.8、2.0、2.2），梯度程序（有机相比例－2%、本方法梯度程序、有机相比例＋2%）和同品牌同规格不同批次色谱柱对试验结果的影响。结果表明系统适用性均符合要求，各项指标的测定结果之间没有显著差异，杂质含量的绝对变化率最大为 0.03%，表明方法耐用性良好。

2.4　样品含量测定

分别精密称取同厂家不同批的芦荟大黄素各 20 mg，按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，并按照“2.2”项下色谱条件进行分析，记录色谱图。已知杂质采用建立的线性方程进行测定，未知杂质采用峰面积归一化法进行测定。结果仅统计已知杂质和大于 0.05% 的未知杂质。样品中有关物质检测结果见表 3。

表 3　不同厂家不同批芦荟大黄素有关物质检测结果 (%)

Tab 3　Content of aloe-emodin related substances in different batches from the same manufacturer (%)

批号	杂质 1（芦荟苷）	芦荟大黄素	杂质 2（大黄醛）	杂质 3	杂质 4（大黄酸）	杂质 5	杂质 6	杂质 7	杂质 8	杂质 9（大黄素）	杂质 10
211205D	0.014	95.564	1.420	0.795	0.252	0.104	0.218	0.546	0.810	0.072	0.109
220513I	0.014	96.140	1.186	0.591	0.261	0.174	0.263	0.399	0.763	0.072	0.050
220529L	0.013	96.777	0.857	0.739	0.181	0.090	0.090	0.371	0.534	0.028	0.179
220628L	0.013	96.597	0.878	0.838	0.197	0.045	0.148	0.385	0.574	0.046	0.162
220718L	0.013	96.763	1.103	0.953	0.202	0.052	0.047	0.095	0.631	0.009	0.103
220818L	0.015	96.449	1.256	1.044	0.204	0.057	0.044	0.107	0.671	0.025	0.089
230113L	0.014	96.204	1.130	0.879	0.318	0.066	0.083	0.303	0.750	0.064	0.114

3　讨论

芦荟大黄素作为天然产物提取物，因其来源（如芦荟、大黄、决明子）的不同有关物质存在差异，故芦荟大黄素的有关物质控制难度大。本文使用的芦荟大黄素来源于芦荟，方法建立时参考《中国药典》芦荟检测方法 [采用乙腈 - 水（25∶75）为流动相等度运行]，检测芦荟大黄素有关物质，结果显示存在杂质洗脱不完全现象。同时水作为流动相时，对于含酸碱基团的化合物如大黄酸等，方法重现性差。本文通过对流动相、梯度程序和色谱柱等的方法参数进行优化，建立芦荟大黄素有关物质检测方法。该方法的提出为芦荟大黄素质量控制提供参考依据，可以更好地发挥芦荟大黄素临床应用。

4　结论

本文建立了 HPLC 法测定芦荟大黄素中有关物质的含量，通过对多批芦荟大黄素样品的检测，发现不同批次芦荟大黄素纯度均大于 95%，各批次芦荟大黄素杂质谱基本一致。建立的方法可用于芦荟大黄素中多种成分定量分析，为芦荟大黄素的质量控制提供参考依据。

参考文献

[1] Dong XX，Zeng YW，Liu Y，et al. Aloe-emodin：a review of its pharmacology，toxicity，and pharmacokinetics [J]. Phytother Res，2020，34（2）：270-281.

[2] Meng X，An XL，Zhou L，et al. The isomers，aloe-emodin and emodin，possess differential inhibitory activities against CYP1B1 enzyme [J]. Steroids，2022，185：109055.

[3] Kim HJ，Choi JW，Ree J，et al. Aloe emodin 3-*O*-glucoside inhibits cell growth and migration and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells via suppressing MEK/ERK and Akt signalling pathways [J]. Life Sci，2022，300：120495.

[4] Li SW，Yang TC，Lai CC，et al. Antiviral activity of aloe-emodin against influenza A virus via galectin-3 up-regulation [J]. Eur J Pharmacol，2014，738：125-132.

[5] Deng Z，Bheemanaboina RRY，Luo Y，et al. Aloe emodin-conjugated sulfonyl hydrazones as novel type of antibacterial modulators against *S. aureus 25923* through multifaceted synergistic effects [J]. Bioorg Chem，2022，127：106035.

[6] Park MY，Kwon HJ，Sung MK，et al. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages [J]. Biosci Biotechnol Biochem，2009，73（4）：828-832.

[7] Tang XQ，Zhang Y，Liu X，et al. Aloe-emodin derivative produces anti-atherosclerosis effect by reinforcing AMBRA1-mediated endothelial autophagy [J]. Eur J Pharmacol，2022，916：174641.

[8] Yu J，Zhao XY，Yan XQ，et al. Aloe-emodin ameliorated MI-induced cardiac remodeling in mice via inhibiting TGF-beta/SMAD signaling via up-regulating SMAD7 [J]. Phytomedicine，2023，114：154793.

[9] Tian B，Hua Y. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA [J]. Food Chem，2005，91（3）：413-418.

[10] Xu Y，Wang Q，Yin ZH，et al. On-line incubation and real-time detection by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapidly analyzing metabolites of anthraquinones in rat liver microsomes [J]. J Chromatogr A，2018，1571：94-106.

[11] Jug U，Vovk I，Glavnik V，et al. Off-line multidimensional high performance thin-layer chromatography for fractionation of Japanese knotweed rhizome bark extract and isolation of flavan-3-ols，proanthocyanidins and anthraquinones [J]. J Chromatogr A，2021，1637：461802.

[12] 王亚楠，王雪，汪祺，等 . 基于毒理学软件和细菌回复突变试验的大黄素型蒽醌基因突变风险评价 [J]. 药物评价研究，2022，45（7）：1240-1247.

（收稿日期：2023-10-15；修回日期：2023-11-25）

医院药学

集中带量采购政策对注射用喹诺酮类药物处方行为和细菌耐药性影响分析

过佳月[1, 2, 3, 4]，刘金春[2, 3]，张海霞[1, 2, 3, 4]，陈大宇[1, 2, 3*]（1. 中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京鼓楼医院药学部，南京 210008；2.南京鼓楼医院药学部，南京 210008；3.南京鼓楼医院南京市临床药学中心，南京 210008；4.中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京 210009）

摘要：目的 研究集中带量采购政策对注射用喹诺酮类药物使用情况的影响和细菌耐药情况的变化。**方法** 提取南京鼓楼医院 2017 年 1 月—2019 年 10 月和 2020 年 1 月—2022 年 10 月注射用喹诺酮类药物的使用数据，采用中断时间序列模型分析集采政策对其产生的影响；基于集采政策相关的调查问卷分析本院医务人员对政策的看法及产生相应行为的原因；利用相应时间段细菌耐药率、检出量进行相关性分析。**结果** 第三批集采政策实施后，莫西沙星使用量呈下降趋势；第五批集采政策实施后，莫西沙星和环丙沙星的使用量呈上升趋势，且相较于对照组变化存在显著性差异；左氧氟沙星使用量呈持续下降趋势。问卷调查显示，喹诺酮类药物作为替代药优先选择，与第五批集采后喹诺酮类药物使用量的上升一致。喹诺酮类药物耐药率受政策影响不明显，与喹诺酮类药物用量无高度相关性。**结论** 喹诺酮类药物在第三批集采政策实施后使用量下降，在第五批实施后也未出现异常增长现象。相关病原菌耐药率与药物使用量无高度相关性，政策对耐药率变化的影响还需长期监测。

关键词：集中带量采购政策；喹诺酮类药物；中断时间序列分析；耐药率

中图分类号：R951 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)04-1080-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.040

Impact of centralized drug volume-based procurement policy on the prescribing behaviors and bacterial resistance of quinolone injection

GUO Jia-yue[1, 2, 3, 4], LIU Jin-chun[2, 3], ZHANG Hai-xia[1, 2, 3, 4], CHEN Da-yu[1, 2, 3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210008; 2. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *Nanjing* 210008; 3. *Nanjing Center of Clinical Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *Nanjing* 210008; 4. *School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Objective To determine the effect of centralized drug volume-based procurement policy on the use of quinolone injection and changes in bacterial resistance. **Methods** Data of quinolone injection use in Nanjing Drum Tower Hospital from January 2017 to October 2019 and from January 2020 to October 2022 were collected. The impact of policy was analyzed with interruption time series model. The opinions of medical staff on centralized drug procurement and the reasons of corresponding behaviors were analyzed based on questionnaires. The correlation analysis was conducted with bacterial resistance rate and the detected quantity in corresponding time period.

基金项目：江苏省药学会恒瑞医院药学基金科研项目（No. H202106）；南京临床医学中心建设项目（No. 宁卫科教〔2020〕1 号）。

作者简介：过佳月，女，硕士研究生，主要从事临床药学方面的研究，email：1156182820@qq.com *通信作者：陈大宇，男，主管药师，主要从事抗感染药物治疗、围术期用药、肝衰竭的药物治疗等相关工作及研究，email：cdy_pharmacy@njglyy.com

Results After the implementation of the policy for the third time, the use of moxifloxacin decreased. After the implementation of the policy for the fifth time, the use of moxifloxacin and ciprofloxacin began to increase, and there was a difference between the changes in the control group and the impact of the policy ($P < 0.05$). In contrast, levofloxacin use continued to decline. The questionnaire showed that quinolones were preferred as alternative drugs, which was consistent with the rise in quinolones use after the fifth implementation. The resistance rate of quinolone drugs did not obviously increase due to policy influence, without clear correlation with the usage of quinolone drugs. **Conclusion** The usage of quinolone drugs decreases after the third implementation of the policy of centralized procurement and does not show abnormal growth after the fifth implementation. The resistance rates of relevant pathogens are not highly correlated with the drug usage. Long-term monitor of the impact of policies on the resistance rate is necessary.

Key words: centralized drug volume-based procurement policy; quinolone; interrupted time-series analysis; resistance rate

喹诺酮类药物为广谱抗菌药物，在呼吸科、泌尿科等科室应用广泛[1]。随着临床大量应用，喹诺酮类药物不合理应用带来的细菌耐药问题也日趋加重，尤其是大肠埃希菌、屎肠球菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌等菌群对喹诺酮类药物的耐药性不断增加[1-3]，因此喹诺酮类药物的合理使用是抗菌药物管理的重要议题。

自 2021 年《关于推动药品集中带量采购工作常态化制度化开展的意见》正式印发，我国药品集中带量采购（简称集采）工作进入常态化、制度化、规范化的新阶段。目前，国家第八批集采也已经启动，其中各批次总计 41 个品种的抗菌药物纳入目录。然而随着集采政策的进一步推进，日常医疗中抗菌药物管理及合理使用遇到了一些难题，存在医师为了完成目标量而更换首选药物的情况，而广泛、频繁地使用抗菌药物可能会引起病原菌耐药率的升高。同时，还存在医师声称患者对药品品质不信任而要求更换为原研品种的现象。因此，为了了解医务工作者对集采抗菌药物的看法以及态度，本课题组设计了本研究。南京鼓楼医院自从 2020 年 11 月开始纳入第一个集采抗菌药物注射剂盐酸莫西沙星注射液，喹诺酮类药物也是最早纳入集采目录并在临床广泛使用的药物。由于喹诺酮类药物的口服剂型有 88.56% 的使用量来自门诊，且住院患者开具的喹诺酮类药物的口服剂型主要用于出院带药，而本研究拟分析在住院患者人群中集采对抗菌药物耐药率的影响，因此，对 2017 年 1 月至 2022 年 10 月注射用喹诺酮类药物的月度用药频度（defined drug dose numbers，DDDs）进行分析，研究集采实施前后注射用喹诺酮类药物的行为变化，并通过调查问卷，了解医务工作者对集采药品的态度，分析处方行为变化原因并分析对院内抗菌药物耐药率的影响。

1　材料与方法

1.1　数据来源

通过医院药品管理信息系统抽取江苏省南京市南京鼓楼医院 2017 年 1 月至 2019 年 10 月和 2020 年 1 月至 2022 年 10 月院内盐酸莫西沙星氯化钠注射液（简称莫西沙星）、左氧氟沙星氯化钠注射液（简称左氧氟沙星）、乳酸环丙沙星氯化钠注射液（简称环丙沙星）的用量并计算月度累计用药频度（DDDs）。针对本院各科室临床医师、药师、护士，在问卷星平台设计集采抗菌药物相关问题的电子调查问卷，并在院内以二维码扫码形式进行发放。收集全院的微生物药敏结果，数据来源于上述时间段内本院送检的患者标本，包括痰、尿、血、腹水等，分析我院常见细菌对喹诺酮类药物的耐药率数据。

1.2　结果指标

选择药物的累计 DDD 值作为计算指标，计算方法如下：累计 DDDs ＝总用药量 × 规格 / DDD。累计 DDDs 代表药物的使用量，反映药品在某一时间段用药量情况[4]。DDD 定义为限定日剂量，参考 2019 版抗菌药物 DDD 值[5]。

1.3　研究方法

本研究选用中断时间序列（interrupted time-series，ITS）分析对药物使用量变化进行研究，通过比较喹诺酮类注射剂集采政策实施前后使用量

的即刻水平变化和集采前后回归斜率改变来评估集采政策的影响[4, 6-8]。莫西沙星于 2020 年 11 月（国家第三批，简称国第三批：2020 年 11 月—2021 年 10 月），左氧氟沙星于 2021 年 11 月（国家第五批，简称国第五批：2021 年 11 月—2022 年 10 月）被纳入国家集采目录，因此在分析中将这两个时间设为政策干预时间点。考虑集采政策实施时间恰逢新型冠状病毒大流行，为控制混杂因素的影响，更好地评价政策有效性，本研究除了进行政策落地前后的 ITS 分析，还设置了历史对照组进行分析，最终选取政策干预时间点前后共 34 个月的用药数据为政策干预组和空白对照组（集采前：2019 年 11 月—2020 年 10 月）；同时选取相近的、对应的 34 个月的用药数据，为历史对照组（2016 年 11 月—2019 年 10 月），具体研究时间队列分配方案见图 1，并最终构建中 ITS 模型 15 如下：

$$Y_t = \beta_0 + \beta_1 \times T_t + \beta_2 \times I_t + \beta_3 \times P_t + \beta_4 \times G + \beta_5 \times G \times T_t + \beta_6 \times G \times I_t + \beta_7 \times G \times P_t + \beta_8 \times I_t + \beta_9 \times P_t + \beta_{10} \times G \times I_t + \beta_{11} \times G \times P_t + \varepsilon_t$$

式中 Y_t 是因变量，T_t 是观察期内连续的时间变量，$T_1 = 0、1、2、\cdots\cdots、n-1$，$n$ 为观察点的个数；I_t 为干预变量，将干预前后分别赋值为 0 和 1；P_t 是干预后的时间变量，政策执行前为 0，政策执行后取值范围由 0 到 $n-1$ 递推；G 是哑变量，代表组别（干预组和对照组）[8-9]。

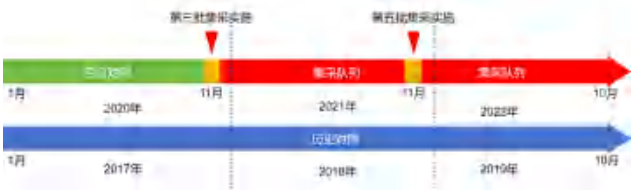


图 1　研究时间队列分配

Fig 1　Time setting of the study cohort

β_0 到 β_3 以及 β_8、β_9 代表对照组的参数估计，β_4 到 β_7 代表干预组的参数估计。更具体地说 β_4 为政策干预前干预组与对照组截距项差异；β_5 为政策干预前对照组与干预组斜率差异；β_6 和 β_{10} 为政策干预时对照组与干预组即刻水平改变量的差异，即政策作用的短期效果；β_7 和 β_{11} 为政策干预后干预组和对照组斜率与干预前斜率的差异，即政策作用的长期效果[8-9]。ITS 模型采用 Cumby-Huizinga 检验[6]来检测数据是否存在自相关性，如存在高阶自相关，则使用 Newey-West[8] 标准误来控制。

基于集采相关政策及实施集采现况的相关文献，建立对集采抗菌药物满意度与政策感知调研的调查问卷。问卷内容包括医务人员的基础信息、对集采政策的个人看法、对集采药品临床应用中的个人经验、集采实施后是否会选择开具替代药物以及集采药品的质量问题等。同时对集采前后耐药菌检出率采用 χ^2 检验，对细菌耐药率与 DDD 选择 Pearson 法进行相关性分析。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。本研究运用 SPSS 24 软件以及 STATA 17.0 软件进行分析。

2　结果

2.1　集中带量采购政策下喹诺酮类药物使用情况

如表 1 所示，在第三批集采后，莫西沙星和环丙沙星使用量分别下降了 24.05%、15.78%，左氧氟沙星使用量较前增长了 0.80%；在第五批集采后莫西沙星和环丙沙星使用量分别较前增长 23.57% 和 86.76%，而左氧氟沙星使用量较前下降了 9.78%。

表 1　注射用喹诺酮类药物集采前后使用量变化情况

Tab 1　Change of cumulative DDDs before and after centralized drug volume-based procurement policy-related quinolone injection

	使用量			同比增长	同比增长
	集采前	第三批	第五批	率Ⅰ/%	率Ⅱ/%
莫西沙星	21 796	16 553	20 455	－24.05	23.57
左氧氟沙星	24 795.2	24 993.2	22 549.4	0.80	－9.78
环丙沙星	708.25	596.5	1114	－15.78	86.76
总量	47 299.45	42 142.7	44 118.4	－10.9	4.7

2.2　注射用喹诺酮类药物使用量的 ITS 分析

结果见表 2，第三批集采政策实施后，莫西沙星使用量呈显著下降趋势（$\beta_1 + \beta_3 + \beta_5 + \beta_7 = -40.157$，95%*CI*：－62.444 ～－17.871，$P = 0.001$），第五批集采政策实施后，莫西沙星使用量较政策前呈上升趋势，表明集采政策显著影响了药物应用（$\beta_{11} = 137.646$，95%*CI*：20.919 ～ 254.373，$P = 0.022$）。左氧氟沙星使用量在第三批集采后呈下降趋势（$\beta_7 = -206.236$，95%*CI*：－347.027 ～－65.445，$P = 0.005$），在第五批集采后持续下降。环丙沙星使用量在第五批集采后呈上升趋势，集采政策显著影响了药物应用（$\beta_{11} = 9.599$，95%*CI*：2.361 ～ 16.837，$P = 0.01$）。

2.3　医疗人员关于集中带量采购政策调查问卷的总体情况

问卷调查结果见表 3，共回收问卷 380 份，其中临床医师、药师共完成问卷 247 份。调研结果显示，开具（建议）处方最多的依次是头孢菌素类（99.6%）、碳青霉烯类（50.2%）和喹诺酮类药物（38.5%）。参与者有 193 人（78.1%）认为集

表 2　集采政策对院内注射用喹诺酮类药物 DDDs 的中断时间序列模型的结果

Tab 2　Effect of centralized drug volume-based procurement policy on DDDs of quinolone injection by interruption time-series analysis

参数	莫西沙星系数（95%*CI*）	左氧氟沙星系数（95%*CI*）	环丙沙星系数（95%*CI*）
β_1	－29.558（－60.27 ～ 1.155）	17.709（－33.963 ～ 69.382）	5.312（3.451 ～ 7.172）***
β_2	326.772（－237.574 ～ 891.117）	－549.095（－1240.347 ～ 142.156）	－6.612（－30.645 ～ 17.42）
β_3	52.078（－15.547 ～ 119.703）	63.68（－32.519 ～ 159.879）	－5.131（－9.253 ～－1.01）*
β_4	63.327（－320.502 ～ 447.156）	－1 218.095（－1 775.304 ～－660.885）***	9.8（－15.269 ～ 34.869）
β_5	－24.673（－89.041 ～ 39.696）	113.732（9.884 ～ 217.58）*	－3.127（－8.428 ～ 2.175）
β_6	－182.823（－828.553 ～ 462.906）	－19.834（－883.932 ～ 844.264）	－13.21（－50.364 ～ 23.945）
β_7	－38.005（－127.936 ～ 51.926）	－206.236（－347.027 ～－65.445）**	2.158（－4.924 ～ 9.24）
β_8	494.303（－41.434 ～ 1 030.04）	6.377（－602.864 ～ 615.617）	43.398（14.721 ～ 72.075）**
β_9	－91.136（－200.372 ～ 18.101）	－151.532（－279.778 ～－23.286）*	－8.213（－14.312 ～－2.113）**
β_{10}	56.944（－645.413 ～ 759.301）	263.823（－669.775 ～ 1 197.42）	1.564（－38.863 ～ 41.99）
β_{11}	137.646（20.919 ～ 254.373）*	89.628（－69.816 ～ 249.072）	9.599（2.361 ～ 16.837）*
$\beta_1+\beta_3+\beta_5+\beta_7$	－40.157（－62.444 ～－17.871）**	－11.115（－40.803 ～ 18.573）	－0.788（－2.629 ～ 1.052）
$\beta_1+\beta_3$	22.52（－43.395 ～ 88.436）	81.389（0.292 ～ 162.487）*	0.18（－3.269 ～ 3.629）
$\beta_5+\beta_7$	－62.678（－132.259 ～ 6.903）	－92.504（－178.865 ～－6.143）*	－0.969（－4.878 ～ 2.941）
$\beta_1+\beta_3+\beta_5+\beta_7+\beta_9+\beta_{11}$	6.353（－39.492 ～ 52.198）	－73.019（－157.749 ～ 11.711）	0.598（－3.038 ～ 4.234）
$\beta_1+\beta_3+\beta_9$	－68.615（－136.601 ～－0.63）*	－70.143（－143.527 ～ 3.241）	－8.032（－11.864 ～－4.2）***
$\beta_5+\beta_7+\beta_{11}$	74.969（－7.03 ～ 156.961）	－2.876（－114.967 ～ 109.215）	8.63（3.348 ～ 13.913）**

注（Note）：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

采政策会影响处方开具 / 建议，其中头孢类抗菌药物和喹诺酮类药物被认为是受政策影响最大的抗菌药物。优先考虑头孢类抗菌药物的医师及药师中，有 37% 的人会考虑选用替代药，其中替代药喹诺酮类占比最高，为 31.3%。而对于首选喹诺酮类抗菌药物的，优选其他喹诺酮类药物作为替代药的占 35.1%，选择头孢类抗菌药物的占 17.5%。调研结果显示，喹诺酮类抗菌药物会作为替代药优先选择，这与第五批集采后喹诺酮类药物总体使用量上升的结果一致，而未纳入集采的环丙沙星作为替代药物的选择也呈现上升趋势。

从问卷调查结果来看，对政策担忧度较低，主要担忧的是认为集采药物疗效可能不确切。有 89.1% 赞同集采政策对患者医疗费用降低的作用，也有认为集采政策变相增加药物使用等，但占比较低。在补充看法里则更关注集采药物质量与供应保证，还有如何更科学地设定目标量以及更合理地设置绩效。

2.4　集中带量采购前后喹诺酮相关病原菌耐药率变化

对于口服喹诺酮类药物，集采前总体临床使用占比在 14.79%，莫西沙星和左氧氟沙星的 DDDs 是呈上升趋势的；第三批集采后总体临床使用占比增加到 19.54%，左氧氟沙星的 DDDs 仍呈上升趋势，而莫西沙星相反；第五批集采后总体临床使用占比维持在 19.77%，莫西沙星和左氧氟沙星 DDDs 呈下降趋势。结果显示仅口服左氧氟沙星的 DDDs 与肺炎克雷伯菌耐药率成中度负相关，而口服莫西沙星的则成轻度正相关。集采政策前后院内常见 5 种病原菌对喹诺酮类药物月均耐药率的变化情况见表 4，细菌耐药率与喹诺酮药物使用量的相关性分析结果见表 5，分析结果显示，常见菌群在政策实施后的耐药率并未有异常波动。大肠埃希菌的耐药率全面上升，但相关性分析显示与喹诺酮类药物的用量无关。肺炎克雷伯菌对喹诺酮类药物的耐药率分别在第三批和第五批集采后有所下降。金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物的耐药率整体平稳，略有下降。分析结果显示，左氧氟沙星 DDDs 与铜绿假单胞菌耐药率成中度负相关，环丙沙星 DDDs 与肺炎克雷伯菌耐药率成轻度负相关，莫西沙星 DDDs 与肺炎克雷伯菌耐药率成中度正相关，而上述细菌耐药率均较为平稳或呈现下降趋势，所有细菌耐药率变化均未与药物用量呈现高度相关性。

3　讨论

3.1　医务人员对集中带量采购政策看法

根据问卷调查结果，集采政策影响处方开具，限制选择药物的自由 [10]，这可能打击医师的积极性。因此，建议医疗机构根据科室情况合理分配集采目标量，同时设置弹性空间给因病情治疗确需使用原研药的患者，保证临床用药多元性

表 3 集中采购抗菌药物满意度与政策感知调研 [*n*(%)]

Tab 3 Satisfaction and policy perception of centralized drug volume-based procurement policy for antibacterial drugs [*n*(%)]

问题及选项		职业		合计 [*n*（%）]
		临床医师（235 份）	药师（12 份）	
开具最多的抗菌药物	头孢类	234（99.6）	12（100）	246（99.6）
	碳青霉烯类	119（50.6）	5（41.7）	124（50.2）
	青霉素类	87（37.0）	3（25）	90（36.4）
	大环内酯类	24（10.2）	1（8.3）	25（10.1）
	喹诺酮类	92（39.1）	3（25）	95（38.5）
	其他	25（10.6）	2（16.7）	27（10.9）
集采政策担忧度	不担忧	156（66.2）	8（66.7）	164（66.4）
	担忧	56（23.8）	4（33.3）	60（24.3）
	不关心	23（9.8）	0（0）	23（9.3）
担忧原因	疗效可能不确切	41（73.2）	4（100）	45（75）
	不良反应可能多	6（10.7）	0（0）	6（10）
	都有	8（14.3）	0（0）	8（13.3）
	其他	1（1.8）	0（0）	1（1.7）
政策是否会影响处方开具 / 建议	是	185（78.7）	8（66.7）	193（78.1）
	否	50（21.3）	4（33.3）	54（21.9）
集采最影响哪些抗菌药物的开具 / 建议	头孢类	173（73.6）	8（100）	181（93.8）
	碳青霉烯类	27（11.5）	0（0）	27（14）
	青霉素类	41（17.4）	0（0）	41（21.2）
	大环内酯类	24（10.2）	0（0）	24（12.4）
	喹诺酮类	150（63.8）	8（100）	158（81.9）
	其他	6（2.6）	8（100）	7（3.5）
是否会因为无法开具首选原研药物而选择	是	68（36.8）	4（50）	72（37.3）
其他替代药物，避免集采药物的开具 / 推荐	否	117（63.2）	4（50）	121（62.7）
如何选择替代药物	同品种非集采药物	60（88.2）	4（100）	64（88.9）
	其他品种备选药物	6（8.8）	0（0）	6（8.3）
	联用其他药物	2（2.9）	0（0）	2（2.8）
常选替代药物种类	头孢类	12（17.6）	1（25）	13（18）
	碳青霉烯类	20（29.4）	2（50）	22（30.6）
	青霉素类	1（1.5）	0（0）	1（1.4）
	大环内酯类	2（3）	0（0）	2（2.8）
	喹诺酮类	23（33.8）	2（50）	25（34.7）
	其他	10（14.7）	0（0）	10（13.9）
对集采整体看法	降低患者医疗费用	208（88.5）	12（100）	220（89.1）
	可能增加药物使用	26（11.1）	2（16.7）	28（11.3）
	影响医疗行为	22（9.4）	0（0）	22（8.9）
	其他优点	4（1.7）	1（8.3）	5（2）
	其他不足	29（12.3）	0（0）	29（11.7）
	没有看法	1（0.4）	0（0）	1（0.4）
	补充看法	36（15.4）	0（0）	36（14.6）

和用药合理性[11-13]；同时对医务人员做好政策培训，将集采政策获益进行宣传，积极引导医患正确看待、正确使用集采药品[12]。大部分医师与药师认可集采政策可以降低医疗费用，但仍有小部分医务人员认为存在其他缺点，这大部分原因还是出于对集采药品的偏见，认为疗效降低，进而导致疗程、剂量的增加以及在治疗无效后更换其他药物。因此，进一步推进集采药物的临床综合评价，并持续跟踪评估集采药物的临床疗效（如定期进行抽样评估）、安全性（完善集采药物的药物警戒体系），是推进集采药物合理应用的重要方法。

表 4　集中采购前后临床常见病原菌对喹诺酮类药物耐药率的变化

Tab 4　Changes in resistance rate of microorganisms to quinolones before and after implementation of centralized drug volume-based procurement

药物	大肠埃希菌			肺炎克雷伯菌			金黄色葡萄球菌		
（月均）	莫西沙星	左氧氟沙星	环丙沙星	莫西沙星	左氧氟沙星	环丙沙星	莫西沙星	左氧氟沙星	环丙沙星
集采前	45.83	56.69	63.63	53.98	48.41	54.7	32.05	33.05	35.49
第三批集采	66.3	58.48	67.66	30.66	38.58	45.42	34.03	37.34	40.02
第五批集采	58.6	58.58	64.21	28.73	36.72	41.13	27.86	32.28	39.67
χ^2 值	13.702**	1.652	12.090**	13.440**	129.703***	152.470***	20.499***	15.309***	7.110*

药物	铜绿假单胞菌			鲍曼不动杆菌		
（月均）	莫西沙星	左氧氟沙星	环丙沙星	莫西沙星	左氧氟沙星	环丙沙星
集采前	64.45	30.26	34.77	40.14	65.71	71.00
第三批集采	59.3	25.34	26.88	51.81	67.25	73.04
第五批集采	47.54	30.7	26.15	44.78	65.08	68.84
χ^2 值	6.539*	26.718***	58.012***	7.236*	4.514	11.772**

注（Note）：*$P < 0.05$；**$P < 0.01$，***$P < 0.001$。

表 5　集采前后喹诺酮类药物耐药率与 DDDs 相关性分析

Tab 5　Pearson correlation analysis between bacterial resistance rate of quinolone and DDDs

抗菌药物	大肠埃希菌	肺炎克雷伯菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	鲍曼不动杆菌
左氧氟沙星	0.092	− 0.229	− 0.037	− 0.520**	− 0.292
莫西沙星	− 0.150	0.429*	− 0.074	0.170	− 0.161
环丙沙星	0.068	− 0.402*	− 0.150	− 0.101	− 0.083

注（Note）：*$P < 0.05$；**$P < 0.01$。

3.2　集中带量采购政策对注射用喹诺酮类药物使用行为变化的影响

第三批集采实施后，三种注射用喹诺酮类药物的使用量都呈下降趋势，总体使用量也较政策前下降，这可能是因为在新型冠状病毒疫情后居民防护意识增强，呼吸道感染性疾病患病率降低因而减少了喹诺酮药物的使用[14]。尽管集采政策的实施确实对药物使用有影响，但在第五批集采后，莫西沙星使用量的上升趋势未显著变化。第五批集采之后左氧氟沙星在最初数月使用量上升，之后又趋于平缓。出现该现象的可能原因：一是医疗机构在对集采政策适应性增强后以及在合理用药管理的约束下使用更加理性[14]；二是因为同类集采药物竞争和替代药物使用量增加带来的。

环丙沙星作为唯一未纳入集采目录的喹诺酮类药物，在第五批集采后使用量较前同比增长了 86.76%，其可能作为替代药物被广泛开具。同时，说明本医疗机构对集采相关替代药品使用的管理亟待完善[15-16]。医疗机构可根据《江苏省抗菌药物集采科学化管理建议》设置主要科室可替代药品用量的可控区间，对其中可替代药品使用量有明显增幅的科室开展处方合理性点评、对异常上涨的同类替代药品进行通报、减少该类药品采购量、加强抗菌药物合理使用管理等措施，同时建议专业人员开展集采药品一致性评价，以降低医患对集采药品质量的疑虑[13，16-17]。

3.3　集中带量采购政策下相关细菌耐药率变化分析

本研究显示主要病原菌的耐药率并未因政策大幅度波动，与全国 CHINET 的监测结果一致[18-19]。耐药率与药物用量的相关性分析结果显示，两者并没有出现高度相关性。左氧氟沙星的 DDDs 与铜绿假单胞菌的耐药率成中度负相关，与张瑞琴等[20]研究结果相反，这可能与铜绿假单胞菌的诊疗习惯的变迁有关。根据铜绿假单胞菌治疗共识[21]以及临床日常诊疗，铜绿假单胞菌的治疗往往选择喹诺酮类中的环丙沙星而非左氧氟沙星，而近年来铜绿假单胞菌作为临床重点关注病原菌，针对其耐药机制以及治疗方案的研究逐步完善，在面对铜绿假单胞菌感染时往往会选择合适的联合治疗方案，耐药菌群得以有效杀灭，因此铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物的耐药率逐年下降。环丙沙星的 DDDs 显示与肺炎克雷伯菌的耐药率存在中度负相关，而莫西沙星的 DDDs 与肺炎克雷伯菌耐药率则存在中度正相关，与刘冬玲等[22]发现肺炎克雷伯菌耐药性与喹诺酮类的 DDDs 的结果相似。环丙沙星的 DDDs 虽然在第五批集采后替代性上升至月均 92.83（86.76%），但使用占比远低于莫西沙星和左氧氟沙星。肺炎克雷伯菌是社区和医院获得性下呼吸道感染的主要致病菌[23]，其临床治疗以 β- 内酰胺类、氨基糖苷类及喹诺酮类抗菌药物为首选，近年来喹诺酮类药物的大量使用导致肺炎克雷伯菌耐药率逐年增加[18-19，22]。而本研究发现莫西沙星和左氧氟沙星在集采后总体 DDDs 较集采前下

降，耐药率也有所下降，提示政策并未导致耐药率的上升。

但是考虑到集采后临床用药模式、品种选择的改变，建议医疗机构积极将自身实际情况与管理建议的内容结合，对抗菌药物进行精细化管理，由感染专业药师与医师共同制订临床使用指南[24]；并对集采抗菌药物及其替代药物的使用量、临床疗效、不良反应进行长期监测，定期汇报，观察政策长期效应。同时联动细菌耐药性监测结果并根据实际情况合理设定目标量，避免不合理用药导致的细菌耐药，同时继续开展多中心集采药物临床综合评价，为集采政策的实施提供证据[10, 24-25]。然而，细菌耐药性变化是一个长期过程，因此需要持续监测集采抗菌药物及其替代药使用量及用药结构的定量变化，来观察政策的长期效应[24]。

参考文献

[1] 袁艳平 . 喹诺酮类抗菌药物的药理作用和临床合理应用 [J]. 临床合理用药，2023，16（2）：158-161.

[2] 聂鲁，刘连奇，周辛波 . 喹诺酮类抗菌药物发展历程与临床应用 [J]. 临床药物治疗杂志，2019，17（7）：12-16.

[3] 吕红玲，刘春林，邓德耀，等 . 临床常见病原菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药性分析 [J]. 检验医学与临床，2021，18（21）：3148-3152，3156.

[4] 谢金平，王斌，陈缪丰，等 . 常州市第二批国家药品集中采购政策实施效果研究——基于双组间断时间序列分析 [J]. 中国卫生政策研究，2022，15（5）：59-66.

[5] WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Guidelines for ATC classification and DDD assignmentt 2019 [M]. Norway：Norwegian Institute of Public Health，2018.

[6] 赵耀伟，王成亮，闫彬，等 . 基于间断时间序列的带量采购政策对中标他汀类药物使用影响分析 [J]. 医药导报，2022，41（8）：1234-1238.

[7] 于石成，王琦琦，毛凡，等 . 中断时间序列设计及其分析方法 [J]. 中华预防医学杂志，2019，53（8）：858-864.

[8] 李洋，于石成，金承刚，等 . 两组中断时间序列设计及其分析方法 [J]. 中华流行病学杂志，2019，40（9）：1159-1163.

[9] Kim NH，Chen JT，Kawachi I. Did expanded dental insurance improve chewing ability in the older Korean population? results of an interrupted time-series analysis [J]. J Epidemiol，2022，32（5）：215-220.

[10] 郭丽，王健，王敬毅，等 . 药品集中采购政策对医院抗菌药物使用的影响研究 [J]. 卫生经济研究，2022，39（6）：24-29.

[11] 沈超煌 . 药品集中采购政策对某院口服降糖药使用情况的影响 [J]. 河南医学研究，2022，31（21）：3859-3863.

[12] 张旭，许欣悦，唐佳骥，等 . 北京市某三级医院落实国家药品集中采购改革数据分析 [J]. 中国医药导报，2020，17（7）：172-175.

[13] 周元江 . 首批国家组织药品集中采购和使用的成效分析——以江西省某三甲医院为例 [J]. 现代医院，2022，22（9）：1417-1419.

[14] 宋雪，黄哲，杨坚，等 . 集中带量采购政策对辽宁省头孢菌素使用情况的影响分析 [J]. 中国卫生事业管理，2023，40（2）：128-131，152.

[15] 马健堃 . 国家药品集中采购政策的溢出效应研究 [D]. 成都：西南财经大学，2022.

[16] 高锦娟，吴秀芳，许云，等 . 药品集中带量采购对某院高血压相关药品价格指数的影响 [J]. 海峡药学，2021，33（7）：214-217.

[17] 何虹，黄际薇，李艳芳，等 . 公立医院落实国家药品集中采购的实践与思考 [J]. 中国医院管理，2020，40（7）：88-89.

[18] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2021 年 CHINET 中国细菌耐药监测 [J]. 中国感染与化疗杂志，2022，22（5）：521-530.

[19] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测 [J]. 中国感染与化疗杂志，2021，21（4）：377-387.

[20] 张瑞琴，陈灿，王凤芝，等 . 医院内科系统铜绿假单胞菌耐药与抗菌药物的使用的相关性研究 [J]. 中国抗生素杂志，2012，37（7）：539-544.

[21] 中华医学会呼吸病学分会感染学组 . 中国铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识（2022 年版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2022，45（8）：739-752.

[22] 刘冬玲，石磊 . 肺炎克雷伯菌耐药率与常用抗菌药物使用强度的关系 [J]. 中国医药导报，2020，17（17）：193-196.

[23] 赵德军，付维婵，胡昭宇，等 . 分离自下呼吸道感染患者的肺炎克雷伯菌耐药性调查 [J]. 中国医药，2013，8（3）：327-329.

[24] 杨照，刘扬，江滨 . 抗菌药物实施集中带量采购之思考 [J]. 中国卫生，2021，432（8）：65-66.

[25] 汪皖青，郑爽，侯欢，等 . 不同地区两家三甲医院医师和患者国家药品集中采购政策认知现状及药学需求调查研究 [J]. 医药导报，2022，41（10）：1557-1563.

（收稿日期：2023-09-05；修回日期：2023-11-06）

盐酸多柔比星化疗的乳腺癌患者心脏毒性的发生和影响因素分析

王梅[1, 2]，李鹏洲[1, 2]，童隆财[2]，邓政[1]，肖双[1]，唐励静[1, 2]，李荣[1, 2*]（1. 南华大学药物药理研究所，湖南 衡阳 421001；2. 南华大学附属第二医院药学部，湖南 衡阳 421001）

摘要：目的 调查并分析女性乳腺癌患者应用盐酸多柔比星化疗后，心脏毒性的发生情况和危险因素。**方法** 选取某市三级甲等医院在 2020—2022 年接受多柔比星化疗的女性乳腺癌患者临床资料共 130 份，根据心脏毒性发生情况，分为心脏毒性组（n = 28）和无心脏毒性组（n = 102），收集患者的一般资料如年龄、肿瘤分期、病理分级、既往疾病史、合并治疗方案、联合用药和放疗等，通过 Logistic 回归分析揭示导致心脏毒性发生的危险因素。**结果** 130 例接受多柔比星化疗的乳腺癌患者中有 28 例发生心脏毒性，发生率为 21.54%。年龄≥ 60 岁、高血压累计剂量≥ 160 mg、联合放疗为导致心脏毒性的独立危险因素。**结论** 年龄、高血压、累计剂量、联合放疗是接受多柔比星化疗乳腺癌患者心脏毒性发生的危险因素，临床用药要密切关注高龄、联合放疗的肿瘤患者，做好心功能指标的监测，同时减少化疗用药剂量或联合使用心脏保护剂右雷佐生来预防或减少心脏毒性的发生。

关键词：盐酸多柔比星；心脏毒性；乳腺癌；危险因素

中图分类号：R737.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1087-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.041

Occurrence of cardiotoxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin hydrochloride chemotherapy and influence factors

WANG Mei[1, 2], LI Peng-zhou[1, 2], TONG Long-cai[2], DENG Zheng[1], XIAO Shuang[1], TANG Li-jing[1, 2], LI Rong[1, 2*] (1. *Institute of Pharmaceutical Pharmacology*, *University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001; 2. *Department of Pharmacy*, *The Second Affiliated Hospital of University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001)

Abstract: Objective To determine the occurrence of cardiotoxicity and risk factors in female breast cancer patients after application of doxorubicin hydrochloride chemotherapy. **Methods** Totally 130 clinical data of female breast cancer patients who received doxorubicin chemotherapy from 2020 to 2022 in a tertiary hospital were selected and divided into a cardiotoxicity group (n = 28) and a non-cardiotoxicity group (n = 102) according to the occurrence of cardiotoxicity. General data of patients such as age, tumor stage, pathological grading, history of previous diseases, combined treatment regimen, combined medication, and radiotherapy, etc., were collected and the risk factors for the occurrence of cardiotoxicity were determined by Logistic regression analysis. **Results** Cardiotoxicity occurred in 28 (21.54%) of the 130 breast cancer patients receiving doxorubicin chemotherapy. Age ≥ 60 years, history of hypertension, cumulative dose ≥ 160 mg and combination radiotherapy were independent risk factors for cardiotoxicity. **Conclusion** Age, hypertension, cumulative dose and combined radiotherapy are the risk factors for cardiotoxicity in breast cancer patients receiving doxorubicin chemotherapy. We should pay close attention to the clinical use of drugs in senior patients receiving combined radiotherapy, and monitor cardiac function indexes. Meanwhile, the dosage of

基金项目：湖南省药学会医院药学研究基金项目（No.2020YXH005）；湖南省临床医疗技术创新引导项目（No.2021SK51709）；湖南省自然科学联合基金项目（No.2022JJ50159）。

作者简介：王梅，女，在读研究生，主要从事抗肿瘤药物心脏毒性机制的研究，email：20212012210954@stu.usc.edu.cn　*通信作者：李荣，女，主任药师，硕士研究生导师，主要从事抗肿瘤药物心脏毒性防治的临床与基础研究，email：1991020015@usc.edu.cn

chemotherapy should be reduced or combined with cardioprotective agent dexrazoxane to prevent or reduce the occurrence of cardiotoxicity.

Key words: doxorubicin hydrochloride; cardiotoxicity; breast cancer; risk factor

近年来，我国乳腺癌的发病率逐年上升，成为五大常见癌症之一，是女性患病率最高的癌症[1]。乳腺癌最新诊疗指南推荐的标准化疗方案仍以蒽环类药物为基础，包括多柔比星、表柔比星、吡柔比星，但在临床使用中发现了严重的心脏毒性[2]，表现为心功能不全、心律失常和心力衰竭[3]。因此，蒽环类药物所致心脏毒性是乳腺癌化疗需要面对和解决的首要问题。多柔比星是第二代蒽环类药物，其引发的心脏毒性以出现时间的迟早分为急性、慢性和迟发性[4]，而随着乳腺癌患者长期化疗和生存时间的延长，这种迟发性的影响可能会越来越大，成为影响患者长期存活的高危因素。蒽环类药物化疗过程中引发的心脏毒性可直接对患者的心功能和心脏结构造成损伤，也可加重患者原有的心血管疾病[5]，如何预防和控制抗肿瘤治疗过程中心脏毒性的发生是肿瘤患者长期生存必须解决的问题。

本研究收集 130 例女性乳腺癌患者的临床资料，回顾性分析临床实际用药过程中，患者使用盐酸多柔比星化疗后心脏毒性的发生情况并探究其影响因素，为多柔比星抗乳腺癌治疗提供临床合理用药参考。

1 资料与方法

本研究收集 2020—2022 年期间于某市三级甲等医院接受盐酸多柔比星治疗的乳腺癌患者电子病历资料共 154 例，按纳入标准和排除标准筛选确定 130 例患者为本研究对象。纳入标准：① 组织病理学确诊为乳腺癌的女性患者；② 采用包含多柔比星化疗药物的方案进行治疗；③ 既往无器质性心脏病；④ 采用至少 1 项心脏监测方法（心电图或超声心动图）；⑤ 年龄≥ 18 岁。排除标准：① 既往存在心血管疾病或化疗前心电图、超声心动图、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白Ⅰ异常；② 既往有其他恶性肿瘤；③ 资料收集不完整。本研究获得湖南省衡阳市南华大学附属第二医院医学伦理委员会的批准（批件号：2023017）。

回顾性收集 130 例患者的年龄、肿瘤分期、病理分级、治疗方案、高血压、糖尿病、多柔比星累计剂量、联合用药、放疗等资料。

本研究将《蒽环类药物心脏毒性防治指南（2020 年版）》作为心脏毒性的评定标准。心电图主要观察：① 非特异性 T 波改变、ST-T 改变；② QRS 低电压；③ 窦性心动过速（心率＞ 100 次 • min^{-1}）；④ 窦性心动过缓（心率＜ 60 次 • min^{-1}）；⑤ 窦性心律不齐；⑥ 房室传导阻滞；⑦ 房性 / 室性早搏。超声心动图主要观察：左室射血分数 [LVEF（%）] 较基线值降低 10% 或绝对值＜ 55%。此外，同时参考乳酸脱氢酶、肌酸激酶、肌酸激酶同工酶和肌钙蛋白Ⅰ结果，以乳酸脱氢酶＞ 220 U•L^{-1}、肌酸激酶＞ 225 U•L^{-1}、肌酸激酶同工酶＞ 25 U•L^{-1}、肌钙蛋白Ⅰ＞ 0.06 ng • mL^{-1} 确定为升高标准[6]。

收集完相关资料和数据后，使用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。对心脏毒性组及无心脏毒性组进行单因素分析，采用卡方检验，计数资料采用例数和百分比表示；识别出有差异变量后通过二元 Logistic 回归分析盐酸多柔比星致心脏毒性的影响因素。

2 结果

2.1 心脏毒性分析

在 130 例接受多柔比星治疗的乳腺癌患者中，有 28 例（21.54%）患者在给药后的 1 ～ 6 个化疗周期内发生了心脏毒性，表现为心电图异常，LVEF（%）较基线值降低 10% 或绝对值＜ 55%，肌钙蛋白Ⅰ和乳酸脱氢酶、肌酸激酶、肌酸激酶同工酶 3 种心肌酶的升高，详见表 1 ～ 3。心电图异常以 T 波或 ST-T 段改变最为多见，占比 46.43%；超声心动图异常情况中有 39.29% 的心脏毒性患者 LVEF（%）较基线值降低 10% ～ 15%；另外，分别有 10.71% 的心脏毒性患者发生了乳酸脱氢酶或肌酸激酶的升高。剩余的 102 例患者未出现心脏毒性，用药后未出现心脏相关不良反应。

2.2 心脏毒性影响因素分析

2.2.1 单因素分析　对患者的一般资料（年龄、肿瘤分期、病理分级、既往高血压、糖尿病病史）及治疗方案（多柔比星累计剂量、联合用药、联合化疗）进行单因素分析，采用卡方检验。多柔比星使用最大累计剂量为 240 mg，最小累计剂量为 32 mg，中位累计剂量为 160 mg，中位疗程 4 周期。患者年龄≥ 60 岁、高血压、多柔比星累计剂量≥ 160 mg、联合放疗在心脏毒性组和非心脏毒性组间存在差异（P ＜ 0.05）。详见表 4、5。

2.2.2 多因素 Logistic 回归分析　根据上述单因素分析的结果将患者的年龄、高血压、多柔比星累计剂量、联合放疗作为自变量，以是否发生心脏毒性作

表 1　心脏毒性患者心电图异常情况

Tab 1　Abnormalities of electrocardiogram in patients with cardiotoxicity

类型	*n*（%）
T 波或 ST-T 段改变	13（46.43）
窦性心律不齐	1（3.57）
窦性心动过速	3（10.71）
窦性心动过缓	3（10.71）
房室传导阻滞	1（3.57）
室性、房性早搏	4（14.29）
不完全性右束支传导阻滞	1（3.57）

表 2　心脏毒性患者超声心动图 LVEF (%) 异常情况

Tab 2　Echocardiographic LVEF (%) abnormalities in patients with cardiotoxicity

类型	*n*（%）
绝对值＜ 55%	4（14.29）
较基线降低 10% ～ 15%	11（39.29）
较基线降低＞ 15%	4（14.29）

表 3　心脏毒性患者心脏肌钙蛋白Ⅰ和心肌酶谱异常情况

Tab 3　Abnormalities of cardiac troponinⅠand cardiac enzyme profile in patients with cardiotoxicity

类型	升高标准	*n*（%）
肌钙蛋白Ⅰ	＞ 0.06 μg・L^{-1}	1（3.57）
乳酸脱氢酶	＞ 220 U・L^{-1}	3（10.71）
肌酸激酶	＞ 225 U・L^{-1}	3（10.71）
肌酸激酶同工酶	＞ 25 U・L^{-1}	1（3.57）

表 4　患者一般资料

Tab 4　General information of patients

因素	心脏毒性组 / [*n*（%）]	无心脏毒性组 / [*n*（%）]	χ^2	*P*
年龄 / 岁			4.063	0.044
≥ 60	8（28.57）	13（12.75）		
＜ 60	20（71.43）	89（87.25）		
肿瘤分期			1.364	0.714
Ⅰ	3（10.71）	16（15.67）		
Ⅱ	14（50）	47（46.08）		
Ⅲ	11（39.29）	36（35.29）		
Ⅳ	0	3（2.94）		
病理分级			0.913	0.633
Ⅰ	5（17.86）	15（14.71）		
Ⅱ	18（64.29）	60（58.82）		
Ⅲ	5（17.86）	27（26.47）		
高血压			5.88	0.015
有	9（32.14）	13（12.75）		
无	19（67.86）	89（87.25）		
糖尿病			0.02	0.887
有	3（10.71）	10（9.8）		
无	25（89.29）	92（90.2）		

为因变量，建立二元 Logistic 回归模型确定盐酸多柔比星化疗致心脏毒性的影响因素。结果表明，年龄（*OR* ＝ 4.133，*P* ＝ 0.020）、高血压（*OR* ＝ 3.017，*P* ＝ 0.048）、累计剂量（*OR* ＝ 5.175，*P* ＝ 0.010）、联合放疗（*OR* ＝ 3.426，*P* ＝ 0.014）可能是导致多柔比星心脏毒性发生的危险因素。详见表 6。

3　讨论

蒽环类药物是临床上实体癌和血液系统癌症治疗的支柱，但也是最常见的致心脏毒性药物。蒽环类药物对心脏的损伤具有明显的剂量 - 效应线性关系，其累计剂量被认为是蒽环类药物心脏毒性的主要危险因素 [7-8]。本研究多因素 Logistic 回归结果显示，累计剂量≥ 160 mg 的乳腺癌患者心脏毒性的发生率是累计剂量＜ 160 mg 患者的 5.175 倍。因此，在应用蒽环类药物进行抗肿瘤治疗时，应对患者的给药剂量进行严格控制，减少因累计剂量增多导致的心脏毒性的发生。

年龄≥ 60 岁是心脏毒性的独立危险因素 [9-10]，且研究发现年龄≥ 55 岁、有既往高血压的蒽环类药物化疗患者要承担更多的心脏毒性风险 [11-12]。高血压、糖尿病、高血脂是接受蒽环类药物患者出现心功能不全的危险因素，其中高血压是最为明显的影响因素 [13-14]。与上述报道一致，本研究二元 Logistic 回归分析结果也表明高

表 5　患者治疗方案

Tab 5　Treatment options for patients

化疗药物	心脏毒性组 / [*n*（%）]	无心脏毒性组 / [*n*（%）]	χ^2	*P*
多柔比星累计剂量 /mg			5.693	0.017
≥ 160	24（85.71）	63（61.75）		
＜ 160	4（14.28）	39（38.23）		
联用环磷酰胺			0.435	0.509
是	25（89.29）	86（84.31）		
否	3（10.71）	16（15.69）		
联用紫杉醇			0.974	0.324
是	1（3.57）	1（0.98）		
否	27（96.43）	101（99.02）		
联用多西他赛			0.277	0.599
是	0（0）	1（0.98）		
否	28（100）	101（99.02）		
联用环磷酰胺＋紫杉醇			0.488	0.485
是	2（7.14）	12（11.76）		
否	26（92.86）	90（88.24）		
联用环磷酰胺＋多西他赛			0.558	0.455
是	0（0）	2（1.96）		
否	28（100）	100（98.04）		
联合放疗			5.752	0.016
是	12（42.86）	21（20.59）		
否	16（57.14）	81（79.41）		

表 6　心脏毒性多元影响因素的 Logistic 回归分析

Tab 6　Logistic regression analysis of multiple influencing factors of cardiotoxicity

变量	*β*	SE	Wals	*P*	*OR*	95%*CI*	
						下限	上限
年龄	1.419	0.609	5.422	0.020	4.133	1.252	13.644
高血压	1.104	0.557	3.927	0.048	3.017	1.012	8.993
累计剂量	1.644	0.636	6.685	0.010	5.175	1.488	17.992
联合放疗	1.231	0.501	6.041	0.014	3.426	1.283	9.147
常量	－ 3.441	0.685	25.221	0.000	0.032	－	－

龄、高血压影响心脏毒性的发生率，年龄≥ 60 岁的患者心脏毒性的发生率是不足 60 岁患者的 4.133 倍，有高血压的患者发生心脏毒性的概率是无高血压患者的 3.017 倍。此外，联合放疗也被发现能够影响心脏毒性的发生率，一项随访 20 年的队列研究发现放疗的乳腺癌患者比非放疗患者心力衰竭风险增加最高至 4.7 倍 [15]，而本研究结果发现联合放疗也显著增加了心脏毒性的发生率，为单纯化疗的 3.426 倍。身体机能下降且存在基础疾病的高龄患者相比年轻患者更易发生心脏毒性，临床用药需重视老年化疗患者心脏功能的监测与保护，可以通过减少化疗剂量和使用心脏保护药右雷佐生来减少心脏毒性的发生。右雷佐生是临床上唯一被批准使用的心脏保护剂，其通过螯合蒽环类 Fe^{3+} 复合物中的 Fe^{3+}，减少活性氧自由基形成，诱导拓扑异构酶Ⅱβ的快速降解，从而降低蒽环类药物的心脏毒性 [16-18]。此外，右雷佐生在不影响抗肿瘤药物疗效的情况下能显著降低心力衰竭的风险 [19]。

综上所述，本研究发现乳腺癌患者使用多柔比星化疗期间心脏毒性发生率较高。高龄（≥ 60 岁）、高血压、药物累计剂量（≥ 160 mg）、联合放疗为心脏毒性的独立风险因素。因此，对高龄、有基础疾病的高危患者要严格监测血糖、血压，及时对心功能指标进行检查，减少药物剂量或联合使用心脏保护药预防心脏毒性的发生。临床除了进行心电图和超声心动图的监测，建议化疗过程中增加脑钠肽、心肌酶谱、肌钙蛋白等多种指标的监测，对早期识别化疗药物心脏毒性的发生具有重要意义。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegal RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] 王英哲，殷咏梅，江泽飞 . 2023 年 CSCO《乳腺癌诊疗指南》更新要点解读 [J]. 中国肿瘤外科杂志，2023，15（3）：209-213，218.

[3] Suero Abreu GA，Ganatra S，Neilan T. Cardiotoxicity monitoring in patients with cancer：focus on safety and clinical relevance [J]. JCO Oncol Pract，2021，17（5）：237-239.

[4] 王青伟，丁荣晶 . 阿霉素诱导心脏毒性的发病机制与防治 [J]. 自然杂志，2022，44（2）：103-108.

[5] Armstrong GT，Oeffinger KC，Chen Y，et al. Modifiable risk factors and major cardiac events among adult survivors of childhood cancer [J]. J Clin Oncol，2013，31（29）：3673-3680.

[6] 丁超，储岳峰，冯俊 . 重组人脑利钠肽治疗老年急性左心衰病人的效果及对心肌损伤标志物水平的影响 [J]. 实用老年医学，2022，36（10）：1042-1045.

[7] Geisberg CA，Sawyer D. Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage [J]. Curr Hypertens Rep，2010，12（6）：404-410.

[8] Ederhy S，Hollebecque A，Haddour N，et al. Management of the cardiovascular complications of treatment in thoracic oncology [J]. Rev Mal Respir，2014，31（2）：173-180.

[9] Romond EH，Jeong JH，Rastogi P，et al. Seven-year follow-up assessment of cardiac function in NSABP B-31，a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel（ACP）with ACP plus trastuzumab as adjuvant therapy for patients with node-positive，human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer [J]. J Clin Oncol，2012，30（31）：3792-3799.

[10] Advani PP，Ballman KV，Dockter TJ，et al. Long-term cardiac safety analysis of NCCTG N9831（Alliance）adjuvant trastuzumab trial [J]. J Clin Oncol，2016，34（6）：581-587.

[11] 高凌燕，万磊 . 恶性肿瘤患者化疗前后心电图变化分析 [J]. 中国肿瘤临床与康复，2017，24（12）：1456-1458.

[12] 赵宇心，印国兵，任建丽，等 . 多种超声心动图技术评估乳腺癌患者放化疗相关心脏毒性的临床研究 [J]. 中国超声医学杂志，2018，34（4）：315-318.

[13] Goldhar HA，Yan AT，Ko DT，et al. The temporal risk of heart failure associated with adjuvant trastuzumab in breast cancer patients：a population study [J]. J Natl Cancer Inst，2016，108（1）：DJV301.

[14] Chow EJ，Baker KS，Lee SJ，et al. Influence of conventional cardiovascular risk factors and life style characteristics on cardiovascular disease after hematopoietic cell transplantation [J]. J Clin Oncol，2014，32（3）：191-198.

[15] Frederika A，van N，Michael S，et al. Cardiovascular disease after hodgkin lymphoma treatment：40-year disease risk [J]. JAMA Intern Med，2015，175（6）：1007-1017.

[16] Loar RW，Noel CV，Tunuguntla H，et al. State of the art review：chemotherapy-induced cardiotoxicity in children [J]. Congenit Heart Dis，2018，13（1）：5-15.

[17] Barry E，Alvarez JA，Scully RE，et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity：course，pathophysiology，prevention and management [J]. Expert Opin Pharmacother，2007，8（8）：1039-1058.

[18] Hutchins KK，Siddeek H，Franco VI，et al. Prevention of cardiotoxicity among survivors of childhood cancer [J]. Br J Clin Pharmacol，2017，83（3）：455-465.

[19] Van Dalen EC，Caron HN，Dickinson HO，et al. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines [J]. Cochrane Database Syst Rev，2011，2011（6）：CD003917.

（收稿日期：2023-10-31；修回日期：2023-12-25）

《抗肿瘤药物临床应用管理办法》实施现状分析

杜娟，田锋奇，张文周*（郑州大学附属肿瘤医院河南省肿瘤医院药学部，郑州　450008）

摘要：目的　了解《抗肿瘤药物临床应用管理办法》下发近 3 年后的实施现状，明确抗肿瘤药物临床应用管理难点，探讨科学管理办法。**方法**　对某省 61 家医疗机构抗肿瘤药物临床应用管理现状，从肿瘤专科临床药师培养及肿瘤临床药学工作开展、抗肿瘤药物目录制订、临时采购审批、分级管理、处方 / 医嘱点评、超说明书用药管理、信息化建设等 7 个维度进行问卷调查，并对调查数据进行分析。**结果**　肿瘤专科临床药师的配备率为 73.8%；肿瘤专科临床药师配备率高的医院对抗肿瘤药物的管理更为规范；不同医院抗肿瘤药物配备品种数差异较大，尤其是新型抗肿瘤药物，肿瘤专科医院配备率最高；35 家（57.4%）医院对抗肿瘤药物施行了分级管理；对肿瘤药物进行分级时主要考虑的是上市时间，其次是不良反应和费用；对医师进行分级授权时主要考虑的因素为职称，其次为专业和工作年限；在施行分级管理的 35 家医院中，13 家（37.1%）医院可以在信息系统上对医师抗肿瘤药物的分级权限进行限制；在处方前置审核环节中，信息化使用率最高（57.4%）；在超说明书用药管理中，信息化使用率最低（9.8%）；三级医院临时采购流程中临床药师参与率相对较高，临时采购条件较为具体严格；肿瘤专科医院对抗肿瘤药物的管理基本符合管理办法的要求；其他医院尚未较好地执行管理办法的规定，尤其在落实分级管理、超说明书用药管理、对不合理用药的干预以及肿瘤专科临床药师参与多学科会诊和开展药学门诊方面。**结论**　肿瘤专科医院对抗肿瘤药物的管理相对规范；二级综合医院、中医院、肿瘤之外的专科医院对抗肿瘤药物的管理亟待加强；应更加重视对肿瘤药师人才培养和对合理用药信息化建设的投入。

关键词：抗肿瘤药物；临床应用；管理办法；实施现状
中图分类号：R95，R979.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1091-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.042

Implementation of *Management Measures for Clinical Application of Anti-tumor Drugs*

DU Juan, TIAN Feng-qi, ZHANG Wen-zhou* (*Department of Pharmacy*, *The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University & Henan Cancer Hospital*, *Zhengzhou* 450008)

Abstract: Objective　To determine the implementation of *Management Measures for Clinical Application of Anti-tumor Drugs* after nearly 3 years of issuance, to clarify the difficulties in the management and to explore management methods. **Methods**　The clinical application and management of anti-tumor drugs in 61 medical institutions in a province were questionnaired from seven aspects, including the training of tumor pharmacists and development of tumor clinical pharmacy, formulation of catalog for anti-tumor drugs, provisional procurement approval, management grading, prescription/doctor's order comments, off-label drug use, and information network construction. The data were analyzed. **Results**　The equipment rate of tumor pharmacists was 73.8%. The hospital with more tumor pharmacists had better management of anti-tumor drugs. The number of anti-tumor drugs in different hospitals varied greatlly, especially new anti-tumor drugs. Totally 35 hospitals (57.4%) implemented graded management of anti-tumor drugs; Marketing timet, adverse reactions and costs were used as indexes to grade drugs. The main factors to be considered in the authorization of doctors included academic title, followed by specialty and working years. Among the 35 hospitals with

基金项目：河南省医学科技攻关计划软科学项目（No.RKX202002011）。
作者简介：杜娟，女，硕士，副主任药师，主要从事抗肿瘤药物规范化使用与管理方面的研究，email：jindalai66@163.com
*通信作者：张文周，男，主任药师，主要从事药事管理方面的研究，email：hnzzzwzx@sina.com

hierarchical management, 13 hospitals (37.1%) restricted doctors' classification authority of anti-tumor drugs in the information system. The application of information technology was the highest (57.4%) in prescription pre-examination. As for off-label drug management, information technology was least used (9.8%). The participation of clinical pharmacists in the temporary procurement process of tertiary hospitals was relatively high, with specific and strict procurement conditions. The management of anti-tumor drugs in cancer hospitals met the basic requirements of management measures. Other hospitals did not well implement the management measures, especially hierarchical management, off-label drug use, intervention of irrational drug use, and the participation of pharmacists in the oncology department in multidisciplinary and outpatient consultation. **Conclusion** The management of anti-tumor drugs in cancer hospitals is relatively standardized. It is urgent to strengthen the management of anti-tumor drugs in secondary general hospitals, traditional Chinese medicine hospitals and other hospitals. More attention should be paid to the training of pharmacists and investment in the information network construction for rational drug use.

Key words: anti-tumor drug; clinical application; administrative measure; implementation statu

肿瘤药物治疗中存在着两大难题——药物种类少和可及性差。目前，针对“药物种类少”，国家采取的主要措施是鼓励新药研发、加速新药审批；针对“可及性差”，国家采取的主要措施是通过国家谈判的方式以量换价，提高药物可及性。在抗肿瘤药物可及性提高的同时，如何规范使用的问题也同样需要重视，因为只有规范使用，才能将抗肿瘤药物可及性的提高转化为患者的生存获益。为了规范抗肿瘤药物的临床应用，国家卫健委于 2020 年 12 月下发了《抗肿瘤药物临床应用管理办法》[1]（以下简称《管理办法》），针对抗肿瘤药物临床应用多个环节的管理进行了规定。目前，该文件已经下发 3 年，为了进一步了解《管理办法》的落实情况，本课题组对某省 61 家医疗机构抗肿瘤药物临床应用管理现状从 7 个维度进行问卷调查，以明确目前抗肿瘤药物临床应用管理中存在的难点并结合本院管理经验探讨解决办法，旨在为全面落实《管理办法》，规范医疗机构抗肿瘤药物管理提供参考。

1 对象与方法

1.1 调查对象

本研究以来自某省的 61 家公立医院为调查对象。纳入标准：有开展肿瘤诊疗业务，有应用抗肿瘤药物。

1.2 调查方法

采用问卷（线上）调查法。主要根据国家卫健委下发的《管理办法》、《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则》[2]、《抗肿瘤药物临床合理应用管理指标》[3] 设计问卷，问卷由单选、多选、填空等题型组成，均为客观性问题。问卷内容包括肿瘤药师培养及肿瘤临床药学工作开展（1 ～ 4 题）、抗肿瘤药物目录制订（5 题）、临时采购审批（6 ～ 12 题）、分级管理（13 ～ 26 题）、处方 / 医嘱点评（27 ～ 38 题）、超说明书用药管理（39 ～ 43 题）、信息化建设（涉及 8 道题）等 7 个维度。问卷经专家评审修改后，由河南省抗癌协会肿瘤药学专委会，通过微信小程序“问卷星”对调查对象进行网络调查。对参与数据核对录入的人员进行培训。回收问卷后，由双人核对录入 Excel 建立数据库，对于存在问题的问卷，联系各医疗机构临床药师进行核实，确保数据的真实性。

2 结果

研究期间共收集 61 份问卷，有效问卷 61 份。

2.1 纳入医院的基本情况

本次参与调查的 61 家医院里，三甲医院 34 家（55.7%），三乙医院 7 家（11.5%），二甲医院 20 家（32.8%）；综合医院 48 家（78.7%），肿瘤专科医院 4 家（6.6%），其他专科医院 6 家（9.8%），中医院 3 家（4.9%）。

2.2 肿瘤专科临床药师培养现状

本次参与调查的 61 家医院里，有 45 家医院（73.8%）配备有肿瘤专科临床药师，共计 56 人。肿瘤专科临床药师的配备率和平均配备人数具体见表 1。肿瘤专科临床药师培训结束 5 年以上 12 家（19.7%），均为三级医院，3 ～ 5 年 14 家（22.9%），3 年以内 19 家（31.1%），二级医院占 88.2%。

2.3 肿瘤临床药学工作开展现状

目前肿瘤临床药学主要开展的工作具体见表 2。其中开展率较高的是医嘱点评、用药教育和药学监护，开展率较低的是多学科会诊、药学门诊、出院随访。医嘱点评项目具体见表 3。其中，在开具抗肿瘤药物处方 / 医嘱时均未要求在信息系统上提交病理诊断报告或靶点基因检测报告。对不

表 1　肿瘤专科临床药师的配备情况

Tab 1　Staffing of tumor pharmacists

配备情况	配备率 /%	配备人数 /（人 / 家）
三级医院	82.90	1.1
二级医院	60.00	0.6
肿瘤专科医院	100.00	2.3
其他专科医院	66.70	0.7
中医院	33.30	0.3

合理使用抗肿瘤药物进行干预并提出改进措施的占 57.4%，对抗肿瘤药物使用趋势进行分析的占 16.4%，主要集中在三级医院。

2.4　抗肿瘤药物配备情况

调查显示，不同医院抗肿瘤药物配备品种数差异较大，尤其是。其中，肿瘤专科医院新型抗肿瘤药物配备率最高，具体见表 4。

表 2　肿瘤临床药学主要开展的工作 (%)

Tab 2　Main aspects of tumor clinical pharmacy (%)

医院类型	医嘱点评开展率	参与方案制订开展率	药学监护开展率	用药教育开展率	多学科会诊开展率	日常会诊开展率	药学门诊开展率	出院随访开展率
三级医院	87.8	36.5	73.1	75.6	26.8	39.0	24.4	12.2
二级医院	60.0	0.0	45.0	50.0	15.0	25.0	5.0	0.0
肿瘤专科医院	100.0	75.0	100.0	100.0	75.0	100.0	25.0	0.0
其他专科医院	83.3	33.3	66.7	66.7	16.7	33.3	0.0	0.0
中医院	100.0	0.0	33.3	66.7	0.0	0.0	0.0	0.0

表 3　抗肿瘤药物处方 / 医嘱点评情况 (%)

Tab 3　Evaluation of anti-tumor drugs prescriptions/doctor’s orders (%)

医院类型	处方权限点评率	使用指征点评率	用法点评率	用量点评率	处方前置审核点评率
三级医院	58.5	92.7	92.7	61.0	63.4
二级医院	35.0	55.0	65.0	35.0	30.0
肿瘤专科医院	100.0	100.0	100.0	25.0	100.0
其他专科医院	50.0	66.7	83.3	33.3	66.7
中医院	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3

表 4　抗肿瘤药物配备平均品种数

Tab 4　Average number of equipped anti-tumor drugs

医院类型	化疗药物	靶向药物	PD-1 单抗	PD-L1 单抗	CTLA-4 单抗
三级医院	33.6	35.7	5.6	0.9	0.02
二级医院	22.5	11.8	2.7	0.1	0.0
肿瘤专科医院	43.2	39.8	9.7	6.0	0.25
其他专科医院	23.7	13.5	3.6	0.0	0.0
中医院	27.4	12.6	0.7	0.0	0.0

表 5　抗肿瘤药物临时采购审批情况 (%)

Tab 5　Approval of temporary purchase of anti-tumor drugs (%)

医院类型	在线申请率	肿瘤药师参与率	专药专用率	单周期用量控制率	使用指征审批率
三级医院	46.3	58.5	75.6	85.4	73.2
二级医院	30.0	30.0	65.0	60.0	50.0
肿瘤专科医院	75.0	100.0	100.0	100.0	100.0
其他专科医院	16.7	0.0	66.7	83.3	66.7
中医院	0.0	33.3	100.0	66.7	33.3

2.5　抗肿瘤药物临时采购审批情况

61 家医院均制订了药品临时采购审批流程，但申请临时采购的途径、方式、环节以及临床药师参与率差异较大。其中，三级医院的临床药师参与率相对较高，对临时采购需满足的条件制订得较为具体、严格，如需提交使用依据，需由临床药师对使用指征进行审核，满足专药专用、只能申请本周期用量等要求，具体见表 5。

2.6　抗肿瘤药物分级管理执行情况

在本次调查中，35 家（57.4%）医院对抗肿瘤药物施行了分级管理，具体开展情况见表 6。其中，对肿瘤药物进行分级时主要考虑的是上市时间，60.0% 医院以上市 5 年为界限，40.0% 医院以上市 3 年为界限；其次是不良反应和费用；5 家（14.3%）医院将药物不合理使用的严重程度纳为分级考虑因素。对医师进行分级授权时主要考虑的因素为职称，其次为专业和工作年限。13 家（37.1%）医院可以在信息系统上对医师抗肿瘤药物的分级权限进行限制。参与本次调查的 61 家医院均未将外购抗肿瘤药物纳入分级管理目录，均未给予分级管理。

表 6　抗肿瘤药物分级管理执行情况 (%)

Tab 6　Implementation of graded management of anti-tumor drugs (%)

医院类型	成立工作组执行率	制订分级目录执行率	培训考核执行率	医师分级授权执行率
三级医院	63.4	80.5	70.7	65.8
二级医院	50.0	55.0	40.0	50.0
肿瘤专科医院	100.0	100.0	100.0	100.0
其他专科医院	50.0	66.7	83.3	66.7
中医院	33.3	33.3	0.0	0.0

2.7　超说明书用药管理情况

调查显示，51 家（83.6%）医院存在抗肿瘤药

物超说明书用药现象，主要集中在三级医院。其中，超适应证用药占 77.1%，超给药途径用药占 36.1%，超剂量用药占 26.2%。在本次调查中，对超说明书用药进行备案管理的医院占 41.0%。对超说明书用药备案时认可的依据除了国内外说明书、国内外权威指南和规范，还包括专家共识（22.9%）、证据级别相对较高的随机对照临床试验（RCT）（26.2%）、任何临床研究数据（1.6%）、其他同类药物已获得该适应证（3.3%）。对超说明书又超指南的抗肿瘤药物医嘱主要干预模式为事后干预（55.7%），其次为直接在信息系统拦截（24.6%）。约 31.1% 的医院对晚期肿瘤患者的后线治疗医嘱不予干预。

2.8 信息化建设情况

对抗肿瘤药物进行管理的过程中，在临时采购申请、分级管理、处方前置审核、超说明书用药管理、六大管理指标统计 5 个环节的信息化使用率分别为 42.6%、50.8%、57.4%、9.8%、24.6%（部分统计）。其中，在处方前置审核环节中，信息化使用率最高（57.4%）；在超说明书用药管理中，信息化使用率最低（9.8%），尚没有一家医院能够对六大管理指标中的“使用抗肿瘤药物患者的病理诊断和检测率、住院患者抗肿瘤药物拓展性临床使用比例”进行信息化统计。

3 讨论

3.1 肿瘤专科临床药师配备与抗肿瘤药物规范管理的关系

《管理办法》[1] 第十三条提出“医疗机构应当加强药学人员配备，培养临床药师”。本次调查结果显示，肿瘤专科临床药师配备率较低的是二级医院、其他非肿瘤专科医院（如骨科医院、妇幼医院等）及中医院。其原因考虑与这些医院“收治肿瘤患者数量有限，对肿瘤专科临床药师重视程度不够，培养肿瘤专科临床药师积极性不高”有关。这些医院肿瘤科多未设置亚专科，收治的肿瘤患者合并疾病相对较多，用药复杂，因此更加需要关注肿瘤药物及辅助用药的规范合理使用问题。另外，本次调查结果显示，肿瘤专科临床药师配备率越高，资深肿瘤专科临床药师越多，医疗机构抗肿瘤药物管理的执行率越高、越规范。比如《管理办法》要求对抗肿瘤药物进行分级管理；对开具肿瘤药物的医师进行培训考核和分级授权；对本机构抗肿瘤药物临床应用情况进行监测，定期分析、评估、上报监测数据并发布相关信息，提出干预和改进措施；对抗肿瘤药物临床应用开展监测工作，分析本机构和各临床科室抗肿瘤药物使用情况，评估抗肿瘤药物使用适宜性；对抗肿瘤药物使用趋势进行分析，对抗肿瘤药物不合理使用情况及时采取有效干预措施。但是，以上的管理要求绝非单纯的行政管理，只有具有肿瘤专科知识的临床药师的参与才能更加科学客观合理地完成上述管理工作 [4-5]。本次调查结果也显示，未配备肿瘤专科临床药师的医院上述管理工作多未开展，因此肿瘤专科临床药师的配备需要加强重视。肿瘤专科临床药师的培养与配备是对抗肿瘤药物的临床应用进行规范管理的基石 [6-8]。

3.2 肿瘤临床药学工作开展情况

3.2.1 医嘱点评 本次调查结果显示，目前在肿瘤临床药学工作中，开展率最高的是医嘱点评，但不同医疗机构的点评内容有所差异。其中使用指征和用量点评难度较大，因为目前在肿瘤治疗中，超说明书使用现象普遍，但超说明书用药并非一定不合理，这就需要药师熟悉相关指南和最新研究进展，有能力对超说明书用药作出科学点评，否则就会影响到部分患者及时合理的治疗。另外，肿瘤药物的用量是在指南推荐剂量的基础上结合患者的既往不良反应种类和级别、肝肾功能、体力状况评分、治疗目的等进行调整的，点评者在对用量进行点评时不仅要熟悉说明书、指南，还要体现个体化。因此，实现对肿瘤药物的使用指征和用量的科学点评，对点评者肿瘤药学的专业素质要求很高。但从本次调查结果来看，三级医院使用指征点评率（92.7%）远高于肿瘤专科临床药师配备率（82.9%），因此，相当一部分医院点评使用指征的药师并非肿瘤专科临床药师，有可能会影响到点评结果的准确性。目前很多医院尚未针对点评结果进行干预，也未将点评标准嵌入处方前置审核系统，因此部分点评的不科学性尚未影响到临床医疗秩序，但也未真正体现出药师点评的价值。因此，我们不仅要重视医嘱点评率的提高，同样要关注点评后的干预率和临床接受率，充分运用处方前置审核系统，尽可能地提高事前干预率，以切实发挥促进临床合理用药的作用。

3.2.2 参与方案制订和多学科会诊 参与方案制订和多学科会诊是肿瘤专科临床药师将专业服务范围前移至用药前的重要途径，《管理办法》也明确要求“应当将药学专业人员纳入多学科诊疗团队（MDT），落实抗肿瘤药物管理要求，保障合理用药，提高肿瘤综合管理水平”。但本次调查结果显示，即使三级医院肿瘤专科临床药师在方案制订中的参与率也仅有 36.5%，在多学科会诊中的参与率更是低至 26.8%。肿瘤专科临床药师参与方案制订和加入多学科诊疗团队，是拓宽肿瘤专科临床药师利用专业知识服务临床的重要途径 [9]，也是对自身专业素质的极大考验，因此肿瘤专科临床

药师一方面要加强自身学习，努力提高专业水平以得到临床认可，另一方面也要充分利用国家政策的支持，积极主动争取加入多学科诊疗团队。

3.2.3 肿瘤药学门诊与出院随访　随着肿瘤治疗的进展，目前越来越多的肿瘤患者通过在家口服肿瘤药物来完成治疗，因此对患者院外的用药指导、不良反应监测及处理会在很大程度上影响到治疗疗效、安全性以及用药依从性。肿瘤药学门诊与出院随访是将药学服务延伸至院外的重要途径，为患者亟需。但本次调查结果显示，在所有的药学服务中，肿瘤药学门诊出院随访的开展率是最低的，分析原因：肿瘤药学门诊开展率低主要与缺乏肿瘤药师人才储备有关，而出院随访率低的关键原因在于缺乏医院赋予药师进行出院随访工作的角色定位，药师在出院随访工作中对患者的用药指导存在一定执业风险，因此工作积极性不高。因此，出院随访工作的开展需要医院甚至卫健委层面的明文支持以及医师药师间的良好沟通。

3.2.4 用药教育和药学监护　用药教育和药学监护是药学查房的重要内容，也是临床药师为患者安全合理用药保驾护航的重要体现。本次调查显示，在肿瘤治疗中，用药教育和药学监护的开展率较高，尤其在三级医院和肿瘤专科医院，但二级医院的开展率仅为 50% 左右，需要加强，这可能与二级医院肿瘤专科临床药师的配备率较低有关。

3.2.5 参与抗肿瘤药物临时采购审批　由于新型抗肿瘤药物价格较高、品种较多，所以多数医院药品配备不能完全满足肿瘤治疗需要，有时需要临时采购。《管理办法》第十七条也提出，因特殊治疗需要，医疗机构确需使用本机构抗肿瘤药物供应目录以外抗肿瘤药物的，可以启动临时采购程序。本次调查显示，除肿瘤专科医院和部分三级医院外，目前多数医院并未进行实质性的专业审核。而肿瘤专科临床药师的参与可以从使用指征上结合患者具体情况进行专业科学的把关，既能避免临床无指征使用，又能满足临床治疗的实际需求，有助于加强抗肿瘤药物临时采购科学审批，对规范抗肿瘤药物的合理使用、减轻患者经济负担意义重大。

3.3 抗肿瘤药物的配备品种数

本次调查显示，不同医院抗肿瘤药物的配备品种数差异较大，可能与不同医院收治的肿瘤类型以及患者数量差异有关。但需要注意的是，常用抗肿瘤药物的配备是完成肿瘤规范化治疗的前提，即使同一类药物获批的适应证也未必相同。在没有循证医学数据支持的前提下在同一类药物中进行具有不同适应证的药物间的替换无法充分保证患者的治疗获益。尤其随着肿瘤研究的不断深入，免疫检查点抑制剂联合化疗药物已成为多个瘤种的一线治疗药物，但是本次调查显示，多家医院免疫检查点抑制剂的配备品种数较少，不能满足不同瘤种的治疗需要。临床通常采用在同类药物中替换或直接舍弃免疫治疗，单用化疗或靶向治疗的方法来应对治疗药物不足的问题，个别情况下会采用临时采购和患者外购的途径。然而，无循证依据的药物间替换和舍弃免疫治疗的做法在一定程度上影响了患者规范治疗的完成率，降低了患者的治疗获益；而患者外购能否满足冷藏条件，以确保药品的质量也需要深思。

3.4 抗肿瘤药物分级管理

抗肿瘤药物分级管理作为抗肿瘤药物管理的核心策略，其根本目的在于让肿瘤诊疗水平更高、用药经验更丰富的医师开具限制使用级药物，以保证抗肿瘤药物“药尽其用、药尽其效、安全使用”，同时避免其过度使用[10]。然而本次调查显示，虽然肿瘤专科医院分级管理的执行率达到了 100%，但是综合性医院，尤其是二级医院的执行率明显较低，而且较多医院仅是完成了形式上对药品和医师的分级，并未进行实质性、真正的分级管理。这将在一定程度上影响到抗肿瘤药物的规范使用。笔者认为，分级管理工作的真正落地，一方面需加强行政检查与干预，以提高医院对抗肿瘤药物分级管理的重视程度；另一方面需加强肿瘤专科临床药师的人才培养。最终，只有将肿瘤药物分级管理嵌入前置审方系统才能更加科学高效地执行分级管理政策，真正促进抗肿瘤药物的合理使用。另外，调查的 61 家医院均未将外购抗肿瘤药物纳入分级管理，可能与该省医保“双通道”尚未全面实施有关。大多数医院原则上不允许外购药品，未进院的抗肿瘤药物主要通过“临时采购”的途径进院，外购药品使用比例相对不高。由于外购药品往往以嘱托医嘱形式呈现，也未纳入医院抗肿瘤药物分级目录，前置审方系统无法进行审核拦截，因此外购药品是目前抗肿瘤药物分级管理的盲区，应引起重视，专门制订文件，将外购药品也纳入抗肿瘤药物分级管理中。

3.5 抗肿瘤药物超说明书用药管理

抗肿瘤药物的飞速发展和肿瘤治疗手段的相对有限使得抗肿瘤药物的超说明书使用现象十分普遍[11]。为了规范超说明书用药，《管理办法》、《中华人民共和国医师法》[12]、《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则》均对超说明书用药做出了相关规定，并明确提出“在尚无更好治疗手段等特殊情况下，医疗机构应当制订相应管理制度、技术规范，对药品说明书中未明确、但具有循证医学证据的药品用法进行严格管理”。然而，本次调查显示仅

41.0% 的医疗机构对肿瘤药物超说明书使用进行了管理。管理的依据主要是国内外说明书、国内外权威指南和规范。少数医疗机构纳入了专家共识、临床研究等。从本次调查结果来看，医疗机构超说明书使用管理尚缺乏科学性、专业性和灵活性，要么没有实质性的管理，要么一刀切，不能很好地体现出个体化差异管理。其原因可能在于不论是说明书还是指南目前对肿瘤药物的推荐主要集中在三线之前，而对后线治疗是缺乏指导的，因此如果按照相关文件上的超说明书要求对后线治疗进行管理，就可能会影响临床的正常治疗。另外，某些肿瘤患者可能存在个体性差异，如伴有某种基础疾病，无法使用常规的推荐药物。因此，在对超说明书用药的管理中，既要坚持原则，又要充分考虑到患者治疗的阶段差异（辅助治疗、新辅助治疗、一线治疗、二线治疗、后线治疗），机体差异（脏器功能、并发症、基础疾病、体力状况评分），甚至经济差异等，以确保管理的目的是促进抗肿瘤药物的规范合理使用，而不是影响患者合理的治疗用药。而达到这一目的的前提是培养合格的肿瘤专科临床药师。

3.6 信息化建设开展情况

《管理办法》中明确提出“医疗机构应当充分利用信息化手段，加强抗肿瘤药物临床应用的全过程管理，促进合理应用”。但是本次调查显示，在抗肿瘤药物管理涉及的 5 个关键环节（临时采购申请、分级管理、处方前置审核、超说明书用药管理、六大管理指标统计）中，信息化使用率并不高，其中，仅 24.6% 的医院落实了对六大管理指标中部分指标的统计。这在一定程度上限制了抗肿瘤药物合理使用的管理效果。比如，抗肿瘤药物要求明确病理诊断后方可使用，多种靶向药物要求明确靶点后方可使用，因此，六大管理指标中提到的“抗肿瘤药物使用前病理诊断率和分子病理检测率”是肿瘤治疗是否规范的重要体现，但本次调查中的所有医疗机构均未要求在信息系统中提交病理报告和基因检测报告，尚没有一家医院的信息系统能够完成对以上指标的统计。因此，信息化是大数据统计的基础，面对每日数万条的医嘱、数千张的处方，没有合理用药信息化管理系统的助力，仅靠临床药师的人工管理，无法实现医嘱审核的全面化，无法有效杜绝无指征使用抗肿瘤药物。另外，临时采购申请如果不能借助于医院办公自动化系统实现信息化，也会延长临时采购申请时间，降低临时采购效率，影响患者的临床治疗。因此，信息化建设是实施抗肿瘤药物管理的重要抓手，应给予高度重视，比如将对六大管理指标的统计作为对医疗机构的考核指标以促进医院信息化水平的提高和相关管理政策的落地，最终实现通过指标统计来促进抗肿瘤药物合理使用的目的。

4 结语

《管理办法》的实施对促进抗肿瘤药物的合理使用意义重大。从本次调查来看，肿瘤专科医院对抗肿瘤药物的管理相对规范，大多数医院对抗肿瘤药物的管理距离国家的要求还有一定差距，尤其是二级医院、中医院、其他专科医院等。分析原因主要在于医院重视程度不高、信息化管理水平有限、肿瘤专科临床药师尤其是高年资的肿瘤专科临床药师人才缺乏等。因此，应加强对肿瘤专科临床药师人才培养和合理用药信息化建设的投入，重视对《管理办法》中相关要求落实情况的检查，以促进抗肿瘤药物管理水平的提高。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 . 抗肿瘤药物临床应用管理办法（试行）[S]. 国卫办医函（2020）487 号 .

[2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 . 新型抗肿瘤药物临床使用指导原则（2019 年版）[S]. 国卫办医函（2019）896 号 .

[3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 . 抗肿瘤药物临床合理应用管理指标 [S]. 国卫办医函（2021）336 号 .

[4] 伍渊麟，鲜秋婉，李晨，等 . DRG 视角下临床药师参与肿瘤中心药事精细化管理的实践与思考 [J]. 中国药房，2022，33（22）：2801-2806.

[5] 丁海樱，辛文秀，童莹慧，等 . 赋能肿瘤药师服务转型，助推肿瘤药学学科发展 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（12）：1585-1587.

[6] Dürr P，Schlichtig K，Kelz C，et al. The randomized AMBORA trial：impact of pharmacological/pharmaceutical care on medication safety and patient-reported outcomes during treatment with new oral anticancer agents [J]. J Clin Oncol，2021，39（18）：1983-1994.

[7] Gatwood J，Gatwood K，Gabre E，et al. Impact of clinical pharmacists in outpatient oncology practices：a review [J]. Am J Health Syst Pharm，2017，74（19）：1549-1557.

[8] Herledan C，Cerfon MA，Baudouin A，et al. Impact of pharmaceutical care interventions on multidisciplinary care of older patients with cancer：a systematic review [J]. J Geriatr Oncol，2023，14（4）：101450.

[9] 李杨，朱庆贵 . 临床药师参与肿瘤多学科会诊的实践与体会 [J]. 实用药物与临床，2021，24（4）：353-356.

[10] 杜娟，张文周 . 对抗肿瘤药物分级管理中三个核心问题的思考 [J]. 肿瘤药学，2022，12（1）：108-110.

[11] 宁婷婷，廖靖萍，于西全，等 . 本院新型抗肿瘤药物的超说明书用药分析 [J]. 中南药学，2020，18（2）：306-310.

[12] 中国人大网 . 中华人民共和国医师法 [EB/OL].（2021-08-20）[2023-04-01]. http：//www. npcgov. cn/npc/c30834/202108/d954d9fa0af7458aa862182dc50a0d63. shtm1.

（收稿日期：2023-10-05；修回日期：2023-11-20）

借助自回归移动平均模型构建儿童口服退烧药消耗量的预测模型

王卓芸[1]，于飚[1]，陶亮亮[2]，蔡和平[1*]（1. 安徽省儿童医院临床药学部，合肥　230000；2. 安徽省儿童医院信息中心，合肥　230000）

摘要：目的　使用自回归移动平均（ARIMA）模型对医院口服退烧药消耗量进行预测，旨在为医院药品供应提供参考。**方法**　收集某儿童医院 2013 年 1 月—2018 年 12 月全院每月口服退烧药的消耗量建立 ARIMA 模型，预测 2019 年 1—12 月口服退烧药的消耗量，以 2019 年 1—12 月实际消耗量数据评价预测模型是否合适。**结果**　2013 年 1 月—2018 年 12 月每月口服退烧药消耗量的时间序列呈现明显的季节性，在每年 1 月、5—7 月及 12 月出现消耗量峰值。该时间序列经季节性分解后拟合 ARIMA（1，1，1）(1，1，1)$_{12}$ 模型，拟合效果较好，经过对比发现除 2019 年 1 月和 2019 年 12 月两个月外，其余月份预测值与实际值的相对误差均在 20% 以内。**结论**　依照 2013 年 1 月—2018 年 12 月全院每月口服退烧药消耗量建立的 ARIMA 模型能够较好地预测口服退烧药消耗量，可为医院科学的药品供应提供一定参考。

关键词：自回归移动平均模型；口服退烧药消耗量；药品供应
中图分类号：R979.1，R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1097-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.043

Prediction model of children's oral antipyretic drug consumption by autoregressive moving average model

WANG Zhuo-yun[1], YU Biao[1], TAO Liang-liang[2], CAI He-ping[1*] (1. *Department of Clinical Medicine*, *Anhui Children's Hospital*, *Hefei* 230000; 2. *Department of Information Center*, *Anhui Children's Hospital*, *Hefei* 230000)

Abstract: Objective　To predict the consumption of oral antipyretic drugs in hospitals by autoregressive integrated moving average (ARIMA) model, and to provide reference for drug supply in hospitals. **Methods**　The monthly consumption of oral antipyretic drugs in the hospital from January 2013 to December 2018 was collected to establish an ARIMA model and predict whether the actual consumption of oral antipyretic drugs from January to December 2019 fit the model. **Results**　The time series of consumption of oral antipyretic drugs from 2013 to 2018 showed obvious seasonal features, with peaks in January, May—July and December each year. The sequence fit the ARIMA (1, 1, 1) (1, 1, 1)$_{12}$ model well after seasonal decomposition. The relative error between the predicted value and the actual value in other months was less than 20% except for January and December 2019. **Conclusion**　The consumption of oral antipyretic drugs and drug supply could be predicted by the ARIMA model.

Key words: autoregressive integrated moving average model; oral antipyretic drug consumption; drug supply

近年来，随着医院信息化的普及和大数据时代的到来，医院的管理更趋于系统化、科学化[1-2]，药事管理作为医院管理的重要环节理应得到重视，而药品供应更是药事管理中不可或缺的一部分。保

作者简介：王卓芸，女，主管药师，主要从事药师管理研究，email：735875712@qq.com　*通信作者：蔡和平，女，主任药师，主要从事药事管理研究，email：greenhprui@163.com

障药品供应是每个医院药学部门最基础也是最为重要的一项工作，而目前许多医院的信息系统往往缺少有效科学的管理，这可能会引发药品库存过多、药品积压失效或是大规模疾病暴发引发医院库存短缺等问题，因此，使用科学合理的方法对库存量进行预测，一定程度上可以规避可能存在的风险，并大幅度提升医院的工作效率、节约成本、减少浪费。医学统计学在医院的科学管理中的重要性不言而喻[3]，采用统计学的手段构建适合的数学模型从而科学地指导实际工作的方法受到广大医院及医院工作者的青睐[4]。时间序列分析方法是一种比较特殊的数学模型，不同于其他的统计模型，其变量存在一定的自相关性，本质是通过观察分析既往数据的变化趋势和特点对变量进行短期预测，该方法在医院管理中的应用也较为成熟[4]。时间序列分析方法可以使用多种统计软件拟合多种模型，本研究希望借助时间序列分析方法的 ARIMA 模型对医院口服退烧药的消耗量进行预测，以期更为科学地对药品库存进行管理，降低差错，提高效率。

1　资料与方法

1.1　资料来源

收集安徽省某儿童医院 HIS 系统中全院 2013 年 1 月—2019 年 12 月每月口服退烧药的消耗量报表，以 2013 年 1 月—2018 年 12 月的消耗量数据建模并预测 2019 年 1—12 月的消耗量，并与 2019 年 1—12 月的实际消耗量对比。

1.2　方法

1.2.1　ARIMA 模型　儿童退烧药的使用量具有季节性特点，以某儿童医院 2013—2018 年每月全院退烧药消耗量的数据在 SPSS23.0 软件中拟合 ARIMA 模型[5-6]。其形式 ARIMA（p，d，q）（P，D，Q）$_s$，其中，p、d、q 分别代表自回归阶数、差分次数及滑动平均阶数；P、D、Q 则代表季节性自回归阶数、季节性差分次数及季节性滑动平均阶数；s 代表季节周期性。

1.2.2　模型拟合及检验　由于儿童退烧药使用量实际上应具有季节性变化特点，首先对该时间序列进行季节性分解，将数据明显的季节性波动去除再进行建模[7]。季节性分解选择加法模型，即序列总变异＝线性趋势与循环变化＋季节性变化＋误差。通过 SPSS 绘制时间序列图并结合序列的自相关系数（ACF）、偏相关系数（PACF）观察时间序列是否平稳，拟合多个 ARIMA 模型。对比各个模型中的均方根误差（RMSE）、平均绝对百分比误差（MAPE）、平均绝对误差（MAE）、正态化 BIC 值等，选定各项误差指标较小的模型进行拟合。对拟合的模型残差进行 Ljung-Box Q 检验，判断模型拟合效果。

1.2.3　统计分析　采用 EXCEL 2007 软件建立数据库及数据分析，采用 SPSS 23.0 软件进行建模和验证，检验水准为 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　消耗量分布特征

2013 年 1 月—2018 年 12 月每月全院口服退烧药消耗量全年呈现季节性，由于医院发展，患者量增加，消耗量总体略有上升趋势，见图 1。

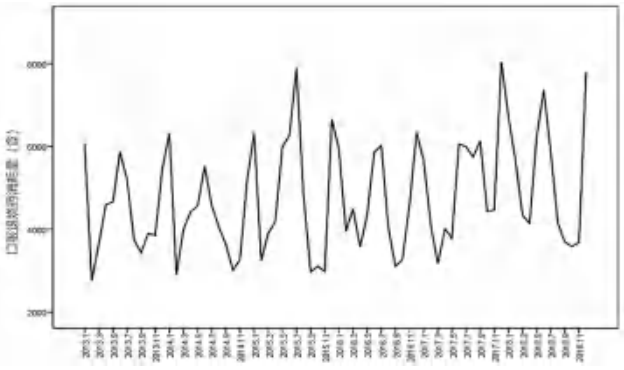


图 1　2013—2018 年口服退烧药消耗量的时间序列图

Fig 1　Time series of consumption of oral antipyretic drugs from 2013 to 2018

2.2　时间序列季节分解

观察口服退烧药消耗量的季节因子，可以看到 2013—2018 年口服退烧药的消耗量在为期一年的循环中呈现双峰的现象，见图 2。根据季节因子的数值，在每年 1 月、5—7 月及 12 月消耗量出现峰值，其他月份消耗量较少。

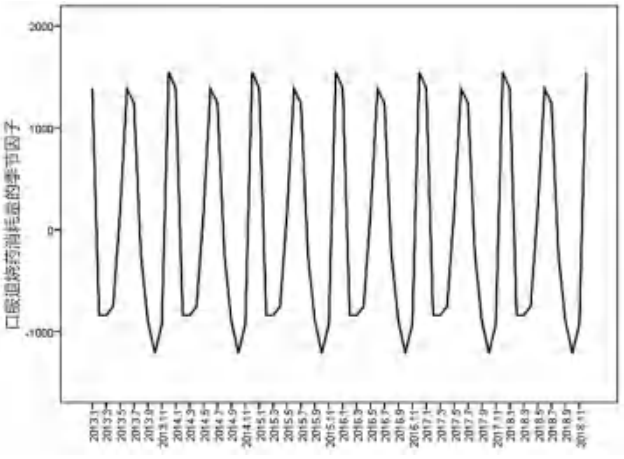


图 2　2013—2018 年口服退烧药消耗量的季节因子时间序列图

Fig 2　Seasonal index time series of consumption of oral antipyretic drugs from 2013 to 2018

2.3　建立及检验 ARIMA 模型

进行 ARIMA 建模的时间序列需为平稳序列，图 3 为季节分解后时间序列 ACF 图，其 ACF 衰减

到 0 的过程非常缓慢，需要进行差分。由于差分后序列平稳，判断 d ＝ 1，D ＝ 1。根据差分后序列 ACF 和 PACF 图（见图 4、5），可以看到无论是 ACF 值，还是 PACF 值均在 1 阶后出现截尾，在图 4 和图 5 中，滞后（lag）lag ＝ 2 时 ACF 及 PACF 值均突破了置信度的界值，说明 lag ＝ 1 时相关性比较大，提供了建模依据，确定 P ＝ 1，q ＝ 1。由于 P、Q 取值一般小于 2[1]，故在 SPSS 中选择 ARIMA 模型建模，比较误差指标选择最优者，最终拟合 ARIMA（1，1，1）(1，1，1）$_{12}$ 模型。该模型季节性明显，参考平稳 R 方 [7] 为 0.445，RMSE 为 911.269，MAPE 为 13.975%，MAE 为 664.680，正态化 BIC 值为 13.975。通过 Ljung-Box Q（18）检验，统计值为 16.123，P ＝ 0.306 ＞ 0.05，拟合效果较好。

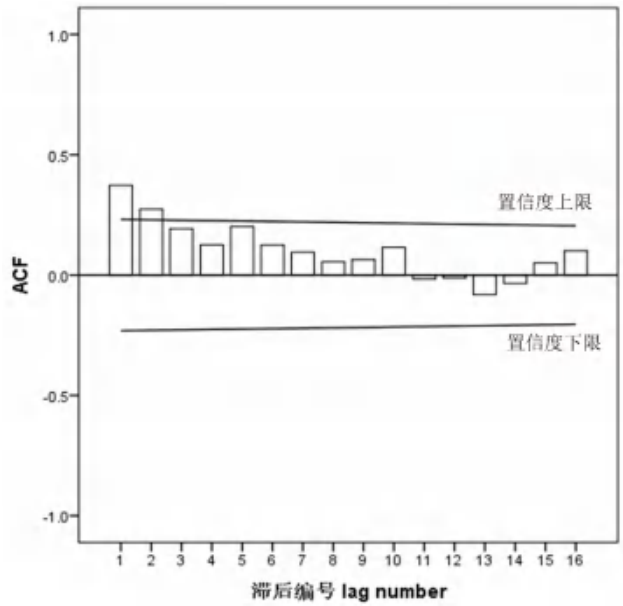


图 3　季节分解后时间序列 ACF 图

Fig 3　ACF chart of time series after seasonal decomposition

2.4　ARIMA 模型预测

使用选定 ARIMA（1，1，1）(1，1，1）$_{12}$ 模型对 2013—2018 年口服退烧药消耗量和实际消耗量进行对比，见图 6。口服退烧药的实际消耗量和模型预测消耗量基本吻合，且都在 95% 的置信区间内。再使用 ARIMA（1，1，1）(1，1，1）$_{12}$ 模型对 2019 年口服退烧药消耗量进行预测，并与实际消耗量对比，除 2019 年 1 月和 12 月 *RSD* 值大于 20%，其余实际消耗量都在预测值 95% 的置信区间内，见表 1。

3　讨论

时间序列分析方法就是分析既往按时间顺序排列成一组序列的某变量的变化特征、趋势并发现规律从而预测该变量在一定时期内的变化 [8]。近年来，时间序列分析方法越来越多地应

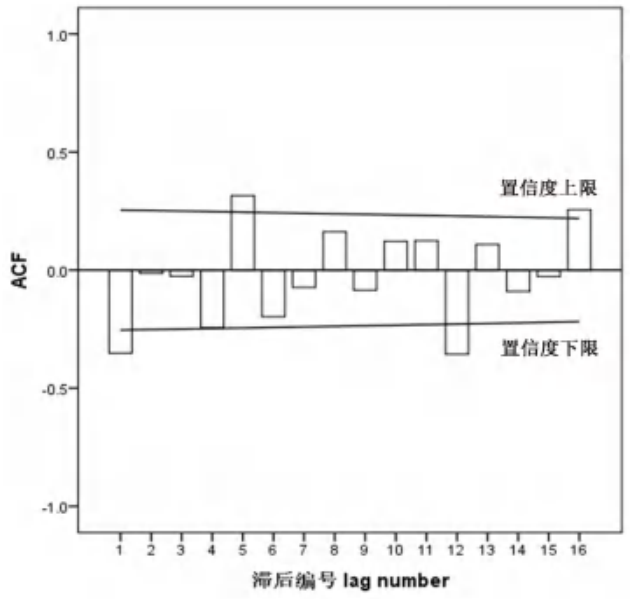


图 4　2013—2018 年口服退烧药消耗量差分后 ACF 图

Fig 4　ACF chart of oral antipyretic drug consumption from 2013 to 2018 after differential

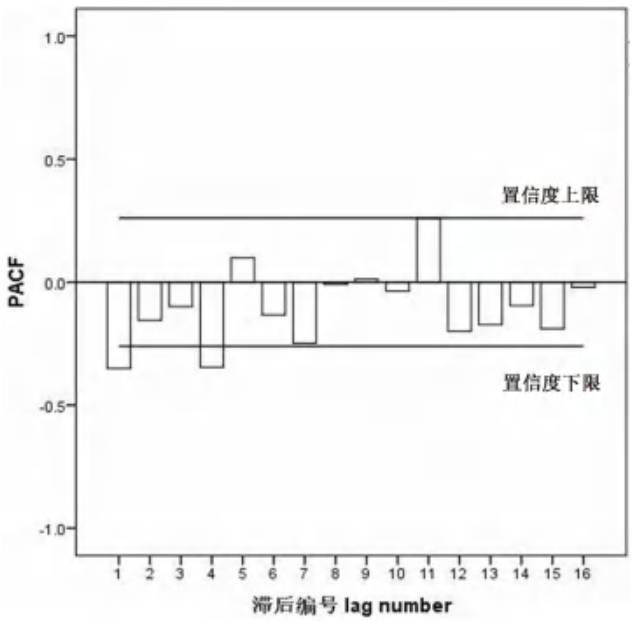


图 5　2013—2018 年口服退烧药消耗量差分后 PACF 图

Fig 5　PACF chart of oral antipyretic drug consumption from 2013 to 2018 after differential

用于医院管理中，如使用 ARIMA 模型预测医院门诊量 [2] 及月平均住院日 [9]；神经外科 ICU 应用 ARIMA 模型预测医院感染发病率 [10]；某医院还利用指数平滑法的 Winters 可加性模型可以拟合普外科住院比例 [11]。有研究发现，使用 ARIMA 模型对医院病例及门诊量的预测效果较为稳健 [4, 12]，故本研究选择 ARIMA 模型对全院口服退烧药进行预测，为医院药品供应提供了参考。

通过对 2013—2018 年口服退烧药消耗量的时间

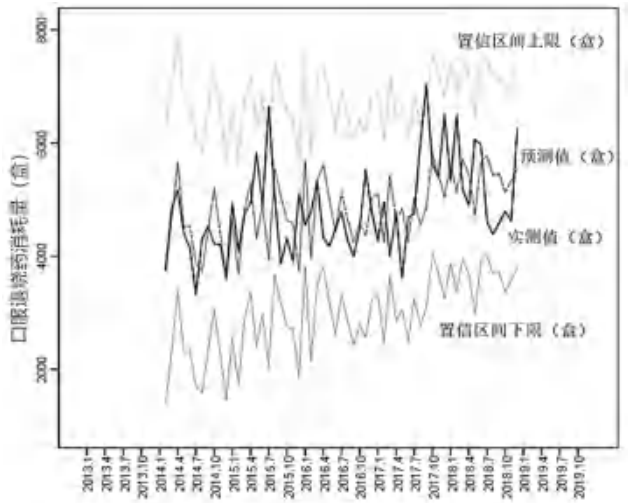


图 6　2013—2018 年口服退烧药消耗量实际值和预测值

Fig 6　Actual and predicted consumption of oral antipyretic drugs from 2013 to 2018

表 1　ARIMA 模型预测 2019 年口服退烧药消耗量与实际消耗量的比较

Tab 1　Actual consumption of oral antipyretic drug in 2019 versus predicted consumption by ARIMA model

时间	实际消耗量 / 盒（除去季节因子后）	预测值 / 盒	置信区间下限 / 盒	置信区间上限 / 盒	*RSD*/%
2019 年 1 月	9726	5653	3904	7402	37.45
2019 年 2 月	7246	5948	4081	7816	19.56
2019 年 3 月	5840	5532	3645	7419	5.61
2019 年 4 月	5985	5555	3664	7446	7.59
2019 年 5 月	5818	5705	3813	7597	1.81
2019 年 6 月	5756	5839	3947	7732	1.18
2019 年 7 月	5001	5477	3584	7370	7.49
2019 年 8 月	4742	5512	3619	7405	15.02
2019 年 9 月	5290	5702	3809	7595	8.04
2019 年 10 月	5984	5643	3750	7536	6.35
2019 年 11 月	4737	5624	3730	7517	18.97
2019 年 12 月	8493	6401	4507	8296	22.35

序列进行观察分析，发现该序列有明显的季节性，需要使用季节性分解去除明显的季节性波动 [13]。本研究的时间序列在整个时间范围内季节性波动幅度基本稳定，选择季节性分解的加法模型去除季节性波动 [7]。其后选择 ARIMA 模型进行建模，对比后最终选择 ARIMA（1，1，1）（1，1，1）$_{12}$ 模型，经检验其残差序列为白噪声序列，预测消耗量与实际消耗量拟合效果较好。使用拟合 ARIMA（1，1，1）（1，1，1）$_{12}$ 模型对 2019 年口服退烧药的每月消耗量进行预测，除 2019 年 1 月和 12 月外，其他每月该模型对口服退烧药的消耗量进行短期预测的效果较好。

本研究采用数学建模的方法，较为科学地对全院口服退烧药的消耗量进行预测，为医院的药事管理提供了新的思路与方案。然而本模型也有局限之处，时间序列分析法可以分析变量的长期趋势、周期变化及季节性变化，但对统计中不规则变化是无法预计的 [8]。本研究选择 2020 年之前的数据避免了新型冠状病毒感染发热患者骤增可能导致的不可预测性；同时，观察到 2019 年 1 月和 12 月数据不准确，可能与 2019 年 1 月和 12 月流感大面积暴发有关 [14]。建立的数学模型仅仅观察到了退烧药的消耗情况，对于生产企业供货情况，药品降价等因素并未考虑，也是本研究的不足之处。

参考文献

[1] 赵梦莹，曹广，符凌嘉，等 . 三级医院医疗设备管理信息化成熟度评价指标体系构建研究 [J]. 中国数字医学，2022，17（2）：17-20，56.

[2] 闫岩，吴小曼，张青青，等 . 基于 SHEL ＋ Reason 模型的住院药房药品调剂差错安全风险综合评价指标体系的建立 [J]. 中南药学，2023，21（7）：1937-1942.

[3] 孙静琴，许莹颖，郭玮 . 公立医院信息化绩效评价指标体系探讨 [J]. 卫生经济研究，2022，39（8）：80-84.

[4] 姜迪，杨洋，孔晓颖，等 . 时间序列分析方法在医院管理中的应用 [J]. 预防医学论坛，2022，28（2）：158-161.

[5] 王晨，郭倩，周罗晶 . ARIMA 模型与指数平滑法预测门诊量效果比较 [J]. 预防医学，2018，30（11）：1152-1155.

[6] 周欢，胡莎莎，单佳妮，等 . 全面二孩政策下儿科诊疗工作量时间变化趋势研究 [J]. 中国医院管理，2021，41（2）：47-51.

[7] 张文彤，董伟 . SPSS 统计分析高级教程 [M]. 北京：高等教育出版社，2018：449-471.

[8] 武松，潘发明 . SPSS 统计分析大全 [M]. 北京：清华大学出版社，2014：358-387.

[9] 游晓平，邹志武 . 时间序列模型在月平均住院日预测中的应用及评价 [J]. 中国数字医学，2019，14（2）：29-31.

[10] 杨亚，蔡冰超，沈瑞红，等 . 神经外科 ICU 医院感染 ARIMA 模型的建立与应用 [J]. 中华医院感染学杂志，2022，32（10）：1500-1503.

[11] 王伟辉，崔燕，韩宝泉 . 某医院普外科住院病例时间序列分析 [J]. 中国卫生统计，2017，34（2）：296-297.

[12] 李桂芹，黄立勇，覃凤芝 . 差分整合移动平均自回归模型在医院流感样病例监测中的应用 [J]. 首都医科大学学报，2019，40（2）：286-291.

[13] 李炜聪，潘福全，胡盼，等 . 基于季节性差分整合移动平均自回归模型的城市公交短期客流预测 [J]. 济南大学学报（自然科学版），2022，36（3）：308-314.

[14] 张玥娇，王保东，刘洋，等 . 2019—2021 年北京市怀柔区严重急性呼吸道感染住院病例流感病毒感染监测分析 [J]. 疾病预防控制通报，2022，37（5）：45-47，73.

（收稿日期：2023-09-14；修回日期：2023-11-02）

药品不良反应

奥沙利铂致眼睑下垂 1 例并文献复习

贾东丽[1]，石亚楠[2]，赵永军[2]，王天珩[1]，曹利波[1]（1. 邯郸市第一医院药学部，河北　邯郸　056002；2. 邯郸市第一医院肿瘤二科，河北　邯郸　056002）

关键词：奥沙利铂；眼睑下垂；神经毒性；不良反应
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1101-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.044

奥沙利铂是继顺铂、卡铂和奈达铂之后的第三代铂类抗癌药，因其有更强的细胞毒作用及较少的不良反应，被广泛应用于胃癌、结直肠癌等的治疗。奥沙利铂胃肠道及肾毒性较顺铂轻，骨髓抑制较卡铂轻，其最主要的剂量限制性毒性是神经毒性[1]，急性神经毒性多表现为与寒冷相关的四肢末端感觉异常、咽喉感觉障碍、下颚痉挛、筋膜炎和肌肉痉挛，慢性神经毒性为轴突神经病，表现为典型的呈手套袜套样分布的神经异常感觉[2-3]，关于奥沙利铂引起的眼睑下垂国外有相关报道[4-9]，国内较为少见，其具体发病机制及发生特点尚不完全明确。本文对我院 1 例应用奥沙利铂出现眼睑下垂的病例进行介绍，对其相关性进行分析，并检索国内外相关数据库，对奥沙利铂致眼睑下垂的文献资料进行复习，以期为临床提供参考。

1　病历资料

患者，女，70 岁，身高 160 cm，体重 59 kg，既往无特殊病史，无药物、食物等过敏史。2023 年 7 月患者无明显诱因出现餐后腹胀，伴厌食，大便次数增多，就诊于外院，查肠镜示结肠肿物。2023 年 8 月 7 日在外院行腹腔镜下右半结肠切除术，术后诊断：结肠腺癌术后（ⅡB 期 T4N0M0）。9 月 11 日患者为行化疗入住我院，9 月 16 日开始化疗，具体为：注射用奥沙利铂 200 mg d1 ＋卡培他滨片 1.5 g bid d1 ～ 14 q21d。患者输注奥沙利铂期间未见特殊不适，输注结束后约 3 h 无明显诱因出现双侧眼睑下垂，双眼抬举费力，无其他特殊不适，立即行颅脑 CT 检查，未见异常，请神经内科和眼科会诊，考虑可能为药物过敏，可适当给予抗过敏治疗，医师未予特殊治疗，约 2 h 后，患者双眼睑下垂好转。9 月 17 日患者双眼睑恢复正常，继续服用卡培他滨化疗，后未再出现上述不适。之后第 2、3 周期化疗方案调整为奈达铂 30 mg d1、50 mg d2 ～ 3 ＋卡培他滨 1.5 g bid d1 ～ 14 q21d，患者未再出现眼睑下垂的情况。

2　文献检索资料及结果

以“奥沙利铂、眼睑下垂”为中文检索词检索万方和中国知网数据库，以“Oxaliplatin”“blepharoptosis”为英文检索词检索 PubMed，纳入由奥沙利铂致眼睑下垂的文献报道，最终纳入文献 6 篇[4-9]，加上本例患者，共 11 例发生奥沙利铂致眼睑下垂的患者。

11 例患者中已知性别的 6 例均为女性，年龄 54 ～ 76 岁；发生时间为第 1 ～ 4 周期用药结束后，缓解时间为 35 min ～ 72 h；行颅脑磁共振（MRI）等相关检查的 4 例检查结果均为阴性；11 例中 3 例未再暴露，2 例未说明暴露情况，6 例继续使用，其中 2 例中间再次被激发，但后续使用均未再出现异常（见表 1）。

3　讨论

根据国家药品不良反应监测的关联性评价原则对该不良反应进行分析：① 患者用药前无眼部相关疾病，使用奥沙利铂后出现双侧眼睑下垂，双眼抬举费力；② 奥沙利铂说明书未提及眼睑下垂不良反应，但已有奥沙利铂引起眼睑下垂的多篇文献报道；③ 停药 2 h 后眼部症状自行缓解；④ 后未再使用奥沙利铂，未再出现眼睑下垂；⑤ 患者结肠癌术后，无眼部及相关疾病病史，颅脑 MRI 等检查未见异常，故可以排除疾病本身所致眼睑下垂；另外，合并用药卡培他滨继续使用，未再出现眼睑下垂的情况。因此，该患者使用奥沙利铂与眼睑下垂因果关系评价为很可能。

基金项目：河北省医学科学研究课题计划（No.20240759）。
作者简介：贾东丽，女，抗肿瘤药物专业临床药师，email：1067188577@qq.com

表 1　10 例出现奥沙利铂致眼睑下垂患者的临床资料

文献	年龄	性别	主要诊断	治疗方案	ADR 发生时间	临床症状	治疗	相关检查	ADR 转归	再暴露
[4]	58 岁	女	结肠癌	奥沙利铂＋亚叶酸钙＋氟尿嘧啶	第 2 周期给药后	眼睑下垂、构音障碍、感觉异常、呼吸困难伴支气管和喉痉挛	抗组胺药、类固醇	颅脑 MRI 阴性	24 h 后眼部症状完全消失，感觉异常消失	未再暴露
[4]	72 岁	女	结肠癌肝转移	奥沙利铂	第 1 周期用药后第 2 日	眼睑下垂		神经功能评估、颅脑 MRI 及脑电图均为阴性	持续 6 h，自发完全消退	第 2 周期延长输注时间至 6 h，出现了更明显的发作，第 3 ～ 6 周期未再出现
[5]	76 岁	女	转移性胃癌	EOX	第 2 周期给药后	眼睑下垂		阴性	持续 35 min，自发完全消退	第 3 周期持续 20 min，第 4 周期持续 10 ～ 15 min，第 5 ～ 10 周期延长输注时间，减少给药剂量，未再出现
[6]	54 岁	女	结肠癌Ⅲ期	XELOX	第 3 周期给药后	呼吸困难和双侧上睑下垂	氯苯那敏、氢化可的松		1 h 内临床完全缓解	延迟 1 周，奥沙利铂和卡培他滨的剂量减少到 75%，未再出现
[7]	54 岁	女	ⅡB 期胰腺腺癌	GEMOX	第 4 周期给药后第 3 日	眼睑抽搐和手部颤抖	硫酸镁、葡萄糖酸钙、苯海拉明、普瑞巴林	阴性	12 h 内改善，72 h 内抽搐完全缓解	未说明
[8]			结直肠癌 4 例	CapeOX/Bev ＋ CapeOX	用药结束几十分钟至几小时	上睑下垂、眼痛			自行改善	1 例伴有 G2 级眼痛，停药；其余 3 例均继续用药，未再出现
[9]			结直肠癌	FOLFOX/XELOX	用药后 6 ～ 24 h	眼睑下垂			持续 24 ～ 72 h	未说明

研究显示，奥沙利铂治疗相关的外周神经毒性发生率为 80% ～ 90%，包括急性和慢性两种 [10-11]。急性外周神经病变是一种发作迅速的末梢神经感觉异常或感觉障碍，如四肢末端麻木或感觉减退、口舌咽部位感觉迟钝或异常、下颌痉挛、吞咽困难、声音改变、视力改变等 [12-13]，多于给药后数小时出现，持续时间短，数日内消失。眼睑下垂可能是急性神经毒性的非典型表现之一，且可能与冷刺激无关 [9]，它可能与运动神经或肌纤维细胞膜的过度兴奋有关，这已被连续的肌电图和神经传导试验进行的电生理研究证实 [14]。关于奥沙利铂急性神经毒性发病机制尚未完全明确，目前大多数研究倾向于离子通道学说，可能是由于奥沙利铂的体内代谢产物草酸盐与钙镁离子螯合作用干扰通道的开放，导致钙离子依赖型的电压门控钠通道开放时间及开放频率增加，总钠离子电流减少所致 [15-17]。研究表明奥沙利铂可在多个通道及分子水平上损伤神经引起急性神经毒性 [18]。

奥沙利铂所致的眼睑下垂，作为非典型急性神经毒性中的一种，目前尚无有效的预防和治疗措施，尽管发生率相对较低，通常为自限性，但眼部是人体至关重要的器官，一旦出现异常将严重影响患者生活，并可能因更换药物影响治疗效果。临床医师应警惕并及早发现急性神经毒性的出现，密切评估神经毒性的分级和持续时间，更重要的是对患者心理及生活的影响。对于出现眼睑下垂等不典型神经兴奋症状的患者，可尝试使用抗组胺药物和类固醇激素等治疗，并且，延长奥沙利铂输注时间，可能会减少奥沙利铂神经毒性的发生。另外，结合文献报道情况，出现眼睑下垂的患者转归似乎均良好，临床医师可在患者充分知情及密切监护的情况下，尝试继续奥沙利铂的使用，以保证抗肿瘤治疗的有效进行。

参考文献

[1] 铂类药物临床应用与不良反应管理专家共识 [J]. 今日药学，2019，29（9）：577-586.

[2] 中国抗癌协会肿瘤支持治疗专业委员会，中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会 . 化疗诱导的周围神经病变诊治中国专家共识（2022 版）[J]. 中华肿瘤杂志，2022，44（9）：928-934.

[3] 徐冰，晋亚楠，王运红，等 . 奥沙利铂致急性喉痉挛的临床分析及药学监护 [J]. 中南药学，2018，16（10）：1464-1466.

[4] La Verde N，Garassino MC，Spinelli G，et al. Reversible palpebral ptosis following oxaliplatin infusion [J]. Dig Liver Dis，2007，39（11）：1041.

[5] Lau SC，Shibata SI. Blepharoptosis following oxaliplatin administration [J]. J Oncol Pharm Pract，2009，15（4）：255-257.

[6] Fanetti G，Ferrari LA，Pietrantonio F，et al. Reversible bilat-

eral blepharoptosis following oxaliplatin infusion：a case report and literature review [J]. Tumori，2013，99（5）：216-219.
[7] Saif MW，Hashmi S. Successful amelioration of oxaliplatin-induced hyperexcitability syndrome with the antiepileptic pregabalin in a patient with pancreatic cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol，2008，61（3）：349-354.
[8] Noguchi Y，Kawashima Y，Kawara H，et al. A retrospective analysis of eye disorders due to oxaliplatin [J]. Gan To Kagaku Ryoho，2015，42（11）：1401-1405.
[9] 王小艳，王志伟，杨萍萍，等 . 奥沙利铂所致急性神经兴奋症状的观察 [J]. 齐鲁医学杂志，2015，30（2）：149-151.
[10] 董媛，唐雨晨，程杰，等 . 奥沙利铂致外周神经毒性机制及防治方法研究进展 [J]. 包头医学院学报，2022，38（2）：89-92，96.
[11] Pachman DR，Qin R，Seisler DK，et al. Clinical course of oxaliplatin-induced neuropathy：results from the randomized phase Ⅲ Trial N08CB（alliance）[J]. J Clin Oncol，2015，33（30）：3416-3422.
[12] 郭昌，赵文韬，胡丰良 . 奥沙利铂神经毒性的机制及防治研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志，2020，29（9）：1022-1026.
[13] Park SB，Goldstein D，Lin CS，et al. Acute abnormalities of sensory nerve function associated with oxaliplatin-induced neurotoxicity [J]. J Clin Oncol，2009，27（8）：1243-1249.
[14] Wilson RH，Lehky T，Thomas RR，et al. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability [J]. J Clin Oncol，2002，20（7）：1767-1774.
[15] 张红，黄婷婷，卢祖能 . 铂类药物诱导性周围神经病：临床研究进展 [J]. 神经损伤与功能重建，2017，12（6）：544-546，549.
[16] Cao F，Yin LX. miR-122 enhances sensitivity of hepatocellular carcinoma to oxaliplatin via inhibiting MDR1 by targeting Wnt/β-catenin pathway [J]. Exp Mol Pathol，2019，106：34-43.
[17] Pourhamidi K，Dahlin LB，Englund E，et al. Evaluation of clinical tools and their diagnostic use in distal symmetric polyneuropathy [J]. Prim Care Diabetes，2014，8（1）：77-84.
[18] Adelsberger H，Quasthoff S，Grosskreutz J，et al. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na^+ channel kinetics on rat sensory neurons [J]. Eur J Pharmacol，2000，406（1）：25-32.

（收稿日期：2023-11-13；修回日期：2023-12-27）

万古霉素致颅内脓肿患者发生 DRESS 1 例

阮旭[1]，韩晶晶[2]，王运红[1]，张在丽[3]，钟晗[3]，张京莉[1*]（1.安徽省太和县人民医院/皖南医学院附属太和医院药剂科，安徽 阜阳 236600；2.安徽省太和县人民医院/皖南医学院附属太和医院新生儿重症监护室，安徽 阜阳 236600；3.上海交通大学医学院附属仁济医院药学部，上海 200127）

关键词：万古霉素；药物反应伴嗜酸性粒细胞增多和全身性症状；不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2024)04-1103-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.045

颅内脓肿是一种严重危及生命的颅内感染性疾病，其治疗方案包括药物治疗和手术治疗[1]。其中药物的起始治疗应针对导致脓肿的病原微生物，万古霉素作为糖肽类抗菌药物可覆盖神经外科术后的常见病原菌，如表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌等[2]。在使用过程中应注意万古霉素导致的药物不良反应，其中药物反应伴嗜酸性粒细胞增多和全身性症状（drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms，DRESS）是一种罕见且严重的不良反应，常发生在用药 2 周后，临床表现为皮疹，并伴有发热、嗜酸性粒细胞增多、多器官衰竭等[3-4]。本文报道 1 例颅内脓肿患者使用万古霉素后出现 DRESS 的临床特征及治疗过程，以期为临床提供参考。

1 病历资料

患者，男，56 岁，因“颅内血肿清除术后 1 月余，反应迟钝伴发热 1 周”于 2023 年 2 月 7 日入院。入院查体：体温 37.5 ℃↑，心率 78 次•min^{-1}，呼吸频率 19 次 • min^{-1}，血压 124/85 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。神志清楚，言语流利，精神欠佳，反应迟钝，全身无皮疹，查体欠合作。患者平素健康，2022 年 12 月 26 日于我院行右侧大脑半球硬膜下血肿钻孔引流术。否认高血压、糖尿病、冠心病、肝炎等传染病史，否认药物过敏

基金项目：中华国际医学交流基金会中青年医学研究专项基金课题（No. Z-2018-35-2003）；吴阶平医学基金会临床科研专项基金课题（No. 320.6750.2020-04-31）；上海市卫生健康委员会科研课题（No. 20194Y0007）。
作者简介：阮旭，男，硕士研究生，主管药师，主要从事抗感染药物临床药学方面的研究，email：737577050@qq.com *通信作者：张京莉，女，主任药师，主要从事医院药学方面的研究，email：408803436@qq.com

史。实验室检查：白细胞（WBC）9.17×10^9·L^{-1}，中性粒细胞百分比（NEU%）76.7%↑，嗜酸性粒细胞（EOS）0.05×10^9·L^{-1}，嗜酸性粒细胞百分比（EOS%）0.6%，血红蛋白（Hb）108 g·L^{-1}↓，血小板（PLT）332×10^9·L^{-1}，C反应蛋白（CRP）55.57 mg·L^{-1}↑，谷丙转氨酶（ALT）51 U·L^{-1}，谷草转氨酶（AST）21 U·L^{-1}。MRI检查显示右侧额顶颞部慢性硬膜下、硬膜外血肿伴脑疝形成，较前（2023年1月13日的头颅CT结果）范围增大；入院诊断为慢性硬膜性血肿。

2月10日在全麻下为患者行“脑脓肿切开引流术”，术中硬膜下见灰白色包膜，从术野中央用尖刀切开包膜，见深黄色脓液流出，给予留置培养。同时予以万古霉素 1 g ivgtt q12h联合美罗培南 2 g ivgtt q8h经验性抗感染。术后第1日（2月11日），患者有发热，最高体温37.8 ℃↑，CRP 109.80 mg·L^{-1}↑，WBC 11.62×10^9·L^{-1}↑，NEU% 89.0%↑。2月13日，患者一般情况差，浅昏迷，查体不配合，仍反复发热，最高体温38.6 ℃↑，CRP 147.24 mg·L^{-1}↑，WBC 13.49×10^9·L^{-1}↑，NEU% 92.0%↑。

2月14日检测万古霉素稳态血药浓度为7.50 μg·mL^{-1}↓，同时脑脊液培养为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA），根据药敏及血药浓度检测结果，将抗感染方案调整为万古霉素 1 g ivgtt q8h，停用美罗培南。复查万古霉素血药浓度为16.20 μg·mL^{-1}，在治疗窗内。患者痰培养与尿培养阴性，体温平稳，一般情况良好。

2月14日至3月4日患者体温波动在36.5～37.2 ℃。3月5日、6日，在万古霉素使用23 d后，患者突然出现反复发热，体温最高39.0 ℃↑，躯干及四肢出现紫红色斑丘疹，部分融合成片，上肢及颈部为甚（见图1A、1B）。实验室检查：CRP 29.07 mg·L^{-1}↑，WBC 3.92×10^9·L^{-1}，NEU% 83.1%↑，EOS 0.02×10^9·L^{-1}。停用万古霉素，给予西咪替丁片 0.2 g po bid，氯雷他定片 10 mg po qd，炉甘石洗剂适量外用 prn，注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg ivgtt bid等抗过敏治疗。

3月15日，患者经抗过敏治疗10 d后，反复皮疹发作，未见减轻，伴有发热不适，治疗效果不佳。实验室检查：CRP 32.14 mg·L^{-1}↑，WBC 12.93×10^9·L^{-1}↑，NEU% 71.8%↑，EOS 0.71×10^9·L^{-1}↑，EOS% 5.30%↑，ALT 1146 U·L^{-1}↑，AST 885 U·L^{-1}↑，血培养为阴性，临床药师会诊后考虑为万古霉素引起的DRESS，建议停用上述抗过敏治疗方案，给予注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 500 mg ivgtt qd冲击疗法 3 d。

3月18日，患者皮疹较前减轻，无发热不适，将注射用甲泼尼龙琥珀酸钠调整为 40 mg ivgtt bid。实验室检查：CRP 11.19 mg·L^{-1}↑，WBC 14.91×10^9·L^{-1}↑，NEU% 60.7%，EOS 0.02×10^9·L^{-1}，EOS% 0.10%，ALT 905 U·L^{-1}↑，AST 119 U·L^{-1}↑。

3月26日，患者近日未再出现发热不适，皮疹较前明显好转（见图1C、1D），实验室检查：CRP 8.71 mg·L^{-1}↑，WBC 12.89×10^9·L^{-1}↑，NEU% 79.1%↑，EOS 0.01×10^9·L^{-1}，EOS% 0.10%，ALT 103 U·L^{-1}↑，AST 16 U·L^{-1}。将方案调整为醋酸泼尼松片 35 mg po bid。4月2日，患者一般情况良好，给予出院，1个月后随访，未诉有皮疹及其他症状发生。

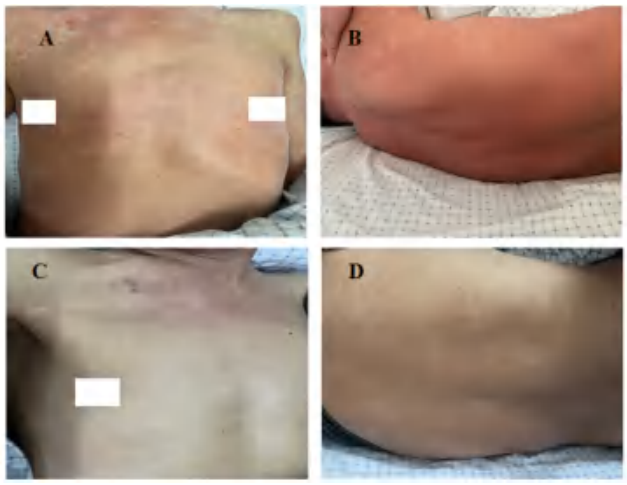


图1　患者治疗前胸部（A）、背部（B）皮肤损害情况及治疗后胸部（C）、背部（D）皮疹恢复情况

2　讨论

2.1　DRESS诊断

DRESS又称为药物超敏感反应综合征（DIHS），是一种罕见但严重的全身药物不良反应，死亡率约为10%[5]。通常表现为皮疹、发热、EOS增多和内脏器官的受累。研究发现导致DRESS最常见的药物有别嘌醇、抗抑郁药、抗惊厥药等[6-7]。

关于DRESS的诊断，有研究报道淋巴转化试验在确定万古霉素导致DRESS方面发挥了巨大作用[8]，但目前尚无绝对可靠的诊断标准，可供参考的为Bocquet等[9]报道的标准，RegiSCAR标准[10]以及J-SCAR标准[11]。以目前欧洲发布的RegiSCAR评分系统为例对该患者进行评分：患者进行查体发现双侧腋窝可见淋巴结明显肿大（1分），EOS绝对值增多0.71×10^9·L^{-1}（1分），皮疹提示DRESS且面积超过体表面积的50%（2分），ALT与AST检验结果提示肝功能异

常（1 分），整个病程≥ 15 d（1 分），HBV、HCV 及血培养为阴性（1 分），该患者最终评分为 6 分，DRESS 诊断成立。

2.2　*万古霉素与* DRESS *相关性评价*

万古霉素属于糖肽类抗菌药物，是临床用于治疗 MRSA 的一线药物 [12]。万古霉素说明书中皮肤相关不良反应主要为皮肤黏膜综合征、中毒性表皮坏死症、脱落性皮炎，对于 DRESS 未曾提及，但国内外均有结论性报道 [13-14]，该患者是使用万古霉素 23 d 后出现的 DRESS，具有时间相关性，在停用万古霉素，使用大剂量甲泼尼龙冲击治疗后，症状有所好转。该患者既往无药物过敏史，万古霉素稳态血药浓度为 16.20 μg • mL^{-1} 符合万古霉素推荐浓度，停用万古霉素后未再继续使用，根据 Naranjo’s 药物不良反应评估量表评分为 7 分，判定万古霉素与 DRESS 的相关性为很可能（见表 1）。

表 1　Naranjo’s 药物不良反应评估量表

相关问题	问题打分			评分
	是	否	未知	
该 ADR 先前是否有结论性报告?	＋1	0	0	1
该 ADR 是否在使用可疑药物后发生?	＋2	－1	0	2
该 ADR 是否在停药或应用抗剂得到缓解?	＋1	0	0	1
该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?	＋2	－1	0	0
是否存在其他原因能单独引起该 ADR ?	－1	＋2	0	2
该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?	－1	＋1	0	0
药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?	＋1	0	0	0
该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解?	＋1	0	0	0
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?	＋1	0	0	0
是否存在任何客观证据证实该反应?	＋1	0	0	1
总分值	7			

注：总分值≥ 9 为肯定；5 ～ 8 很可能；1 ～ 4 可能；≤ 0 可疑。

2.3　DRESS *的临床表现及可能机制*

DRESS 是一种涉及皮肤和多个器官的严重过敏反应。临床通常表现为皮疹，并伴有发热、嗜酸性粒细胞增多、非典型淋巴细胞增多和多器官衰竭，包括肝、肾和肺。其临床表现多样，病程通常迁延。即使停用致病药物，病情仍可继续加重，开始用药与病情发作之间的潜伏期较长，常为 2 ～ 8 周 [4]。

DRESS 的发病机制还未完全阐明，目前认为药物的代谢、免疫反应和疱疹病毒再活化 3 种因素在宿主遗传相互作用的结果。药物遗传学研究发现，DRESS 风险与人类白细胞抗原（HLA）基因的多态性有关。Konvinse 等 [15] 发现在 23 例万古霉素相关 DRESS 患者中有 19 例（82.6%）携带 *HLA-A*32*：*01* 基因，表明 *HLA-A*32*：*01* 基因与万古霉素诱导的 DRESS 密切相关。Wang 等 [16] 研究发现除了 *HLA-A*32*：*01*，*HLA-B*07*：*05*、*HLA-B*40*：*06* 和 *HLA-B*67*：*01* 也是中国汉族人群万古霉素诱导 DRESS 的遗传基因。药物特异性免疫反应在 DRESS 发病机制中发挥作用，研究发现一些致敏药物的斑贴试验呈阳性，体外研究证实有会产生大量肿瘤坏死因子 α（TNF-α）和干扰素 γ（IFN-γ）的药物特异性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞 [17]。在急性期，血液循环中存在活化 T 淋巴细胞增殖，包括含有活化标志物和抗原受体库偏移的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞亚群。疱疹病毒再活化导致 DRESS 早期 B 细胞和血清免疫球蛋白水平下降，免疫抑制状态下病毒再激活 [如人类疱疹病毒（HHV）-6 病毒]，进而发生更严重的全身性免疫反应 [18]。另外，DRESS 还与炎症细胞因子的升高有关，据报道白细胞介素 5（IL-5）在嗜酸性粒细胞增多前几天就已达到高峰，推测 IL-5 可能损伤相关器官，并随后促进了嗜酸性粒细胞增多。

2.4　DRESS *的临床治疗*

DRESS 的治疗首先要立即停用致敏药物，识别致敏药物可能存在一定困难，尤其是在同时使用了多种药物时，这时临床医师或药师的经验至关重要。DRESS 患者通常需要住院治疗，休克患者需要入住重症监护室。对于没有器官损伤或仅有轻度肝损伤（转氨酶轻微升高＜ 3 倍正常值上限）的 DRESS 患者，可予外用糖皮质激素治疗缓解瘙痒和皮肤炎症的症状。对于伴单一或多个器官损伤的重症患者，建议口服或静脉给予糖皮质激素作为一线疗法，甲泼尼龙 250 ～ 500 mg • d^{-1}，持续 2 ～ 4 d，然后改为口服泼尼松龙 1 mg/（kg • d），用 8 ～ 12 周逐渐减量至停药 [19]。该患者在小剂量甲泼尼龙（40 mg bid）治疗一周后无明显效果，甚至加重，ALT 上升至 1146 U • L^{-1}，AST 上升至 885 U • L^{-1}，予甲泼尼龙 500 mg qd 冲击治疗 3 d，患者症状缓解后逐渐降低甲泼尼龙剂量，然后改为口服泼尼松龙 35 mg bid。在全身皮质类固醇治疗无效的情况下，可选

择二线疗法包括环孢素或静脉用免疫球蛋白[20]。

2.5 MRSA 颅内感染的替代治疗

颅脑术后感染常见致病菌为金黄色葡萄球菌、链球菌、需氧革兰氏阴性杆菌，中国神经外科中枢神经系统感染诊治专家共识（2021 版）推荐经验性治疗为万古霉素联合美罗培南[21]。有研究提出在针对 MRSA 感染患者，使用万古霉素过敏时，可选用利奈唑胺作为替代治疗，停药还是选用利奈唑胺继续治疗要根据患者情况进行评估[22]。该患者在脑脊液培养为 MRSA 后，调整为万古霉素针对性治疗，在万古霉素使用 23 d 后，基于 RegiSCAR 评分诊断为 DRESS，遂停用可疑药物万古霉素。在停用万古霉素，使用大剂量甲泼尼龙冲击治疗后，患者皮疹、发热、EOS 数、感染指标及肝功能逐渐好转，未再进行抗感染治疗。

3 小结

万古霉素导致 DRESS 是一种罕见且严重的全身药物不良反应，在临床诊疗中应予以重视，虽说可通过基因检测确定风险人群，但大多数患者没有用药前进行相关基因检测的条件，可利用 RegiSCAR 诊断 DRESS 评分表对在使用万古霉素患者出现皮疹、发热、淋巴细胞增大等进行评估，若确诊，应立即停药，并根据患者的严重程度，选择局部或者全身性糖皮质激素治疗。

参考文献

[1] Bodilsen J，D’Alessandris QG，Humphreys H，et al. ESCMID guidelines on diagnosis and treatment of brain abscess in children and adults [J]. Clin Microbiol Infect，2023，28：S1198-743X（23）00399-3.

[2] 国家卫生健康委合理用药专家委员会 . 国家抗微生物治疗指南 [M]. 3 版 . 北京：人民卫生出版社，2023：14.

[3] 吴光华，吕萌，邢亚兵，等 . 52 例万古霉素致药物超敏反应综合征文献分析 [J]. 中国药物应用与监测，2021，18（6）：392-396.

[4] Husain Z，Reddy BY，Schwartz RA. DRESS syndrome：Part Ⅰ. Clinical perspectives [J]. J Am Acad Dermatol，2013，68（5）：693.

[5] Sandhu S，Neema S，Vashisht D，et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms：a single center descriptive observational study [J]. Dermatol Ther，2021，34（1）：e14670.

[6] Liu QL，Zhao SM，Chen W. Clinical features，treatment outcomes and prognostic factors of allopurinol-induced DRESS in 52 patients [J]. J Clin Pharm Ther，2022，47（9）：1368-1378.

[7] Witcher RH，Ramirez MM. Successful phenobarbital desensitization after DRESS reaction in the management of refractory status epilepticus [J]. J Pharm Pract，2019，32（2）：228-230.

[8] Chung KB，Hwang JH，Kim D. A case of vancomycin-induced drug reaction with eosinophilia，systemic symptoms and multiorgan involvement proven using lymphocyte transformation test [J]. Ann Dermatol，2023，35（2）：140-145.

[9] Bocquet H，Bagot M，Roujeau JC. Drug-induced pseudolymphoma and drug hypersensitivity syndrome（drug rash with eosinophilia and systemic symptoms：DRESS）[J]. Semin Cutan Med Surg，1996，15（4）：250-257.

[10] Kardaun SH，Sidoroff A，Valeyrie-Allanore L，et al. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms：does a DRESS syndrome really exist? [J]. Br J Dermatol，2007，156（3）：609-611.

[11] Shiohara T，Iijima M，Ikezawa Z，et al. The diagnosis of a DRESS syndrome has been sufficiently established on the basis of typical clinical features and viral reactivations [J]. Br J Dermatol，2007，156（5）：1083-1084.

[12] Tabah A，Laupland KB. Update on *Staphylococcus aureus* bacteraemia [J]. Curr Opin Crit Care，2022，28（5）：495-504.

[13] Kulkarni MP，Chinta S，Sosa F，et al. Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）syndrome due to vancomycin [J]. Cureus，2022（6）：e26219.

[14] Clark D，Alomari AK，Burton K，et al. A case of vancomycin-induced drug rash with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）syndrome with failure to respond to cyclosporine treatment [J]. Dermatol Online J，2020，26（6）：13030/qt1bx778dt.

[15] Konvinse KC，Trubiano JA，Pavlos R，et al. *HLA-A*32：01* is strongly associated with vancomycin-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms [J]. J Allergy Clin Immunol，2019，144（1）：183-192.

[16] Wang CW，Lin WC，Chen WT，et al. Associations of *HLA-A* and *HLA-B* with vancomycin-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms in the Han-Chinese population [J]. Front Pharmacol，2022，13：954596.

[17] Ye YM，Hur GY，Kim SH，et al. Drug-specific CD4 ＋ T-cell immune responses are responsible for antituberculosis drug-induced maculopapular exanthema and drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome [J]. Br J Dermatol，2017，176（2）：378-386.

[18] Hirahara K，Kano Y，Mitsuyama Y，et al. Differences in immunological alterations and underlying viral infections in two well-defined severe drug eruptions [J]. Clin Exp Dermatol，2010，35（8）：863-868.

[19] Natkunarajah J，Goolamali S，Craythorne E，et al. Ten cases of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）treated with pulsed intravenous methylprednisolone [J]. Eur J Dermatol，2011，21（3）：385-391.

[20] Nguyen E，Yanes D，Imadojemu S，et al. Evaluation of cyclosporine for the treatment of DRESS syndrome [J]. JAMA Dermatol，2020，156（6）：704-706.

[21] 中国医师协会神经外科医师分会神经重症专家委员会，北京医学会神经外科学分会神经外科危重症学组 . 神经外科中枢神经系统感染诊治中国专家共识（2021 版）[J]. 中华神经外科杂志，2021，37（1）：2-15.

[22] Cox M，Paviour S，Gregory S，et al. When fever is more than infection：two cases of vancomycin-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）[J]. BMJ Case Rep，2021，14（1）：e238006.

（收稿日期：2023-09-13；修回日期：2023-11-16）

注射用六氟化硫微泡致心律失常 1 例

高超，杨金果，牟雷，汤献文*（北京中医药大学深圳医院（龙岗）心内科，广东　深圳　518172）

关键词：注射用六氟化硫微泡；不良反应；心律失常
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2024)04-1107-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.04.046

六氟化硫微泡作为超声科广泛使用的造影剂，最常见的不良反应为过敏反应。本文报道了 1 例使用六氟化硫微泡后发作快速型心律失常的青年女性患者，此类心律失常属于该药物临床上市后观察到的罕见心脏不良反应，尚无此类相似临床病例报道。

1　临床资料

患者女，26 岁，因“输卵管异位妊娠术后 4 个月”就诊于妇产科，于超声科行六氟化硫微泡输卵管造影，在静脉推注六氟化硫微泡（声诺维，59 mg/ 瓶，上海博莱科信谊药业有限责任公司，批准文号：J20130045）后约 10 min 突发心悸，急查心电图示“快心室率心房颤动”（见图 1），5 min 后复查心电图示“室上性心动过速”（见图 2），遂收入心内科病房救治，给予盐酸艾司洛尔注射液 1000 mg（爱络，200 mg/ 支，齐鲁制药有限公司，国药准字 H19991059）微量泵泵入，从 3 mL·h^{-1} 开始，根据血压及心率调整泵速，约半小时后恢复正常窦性心律。既往无其他慢性病病史，无药物过敏史。入院体格检查：体温 36.6 ℃，脉搏 140 次·min^{-1}，呼吸 20 次·min^{-1}，查体未见其他明显阳性体征，入院诊断：① 心律失常心房颤动 室上性心动过速；② 输卵管异位妊娠术后。

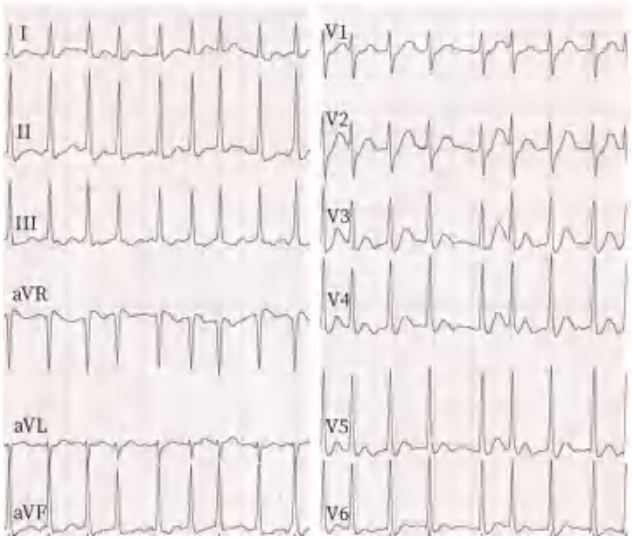


图 1　发作房颤心电图

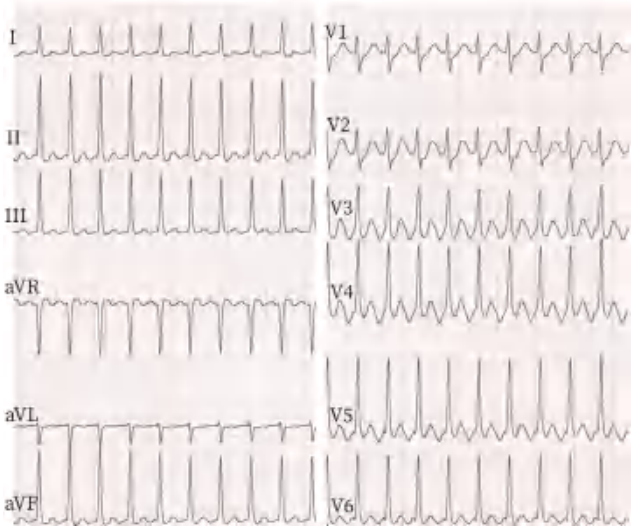


图 2　发作室上性心动过速心电图

2　讨论

该患者既往无心律失常等心脏病病史，静脉推注六氟化硫微泡后突发心悸，有明确的用药史，明确的时间关系，不涉及其他用药，其心动过速发作不能用其原发病解释，依据药品不良反应 / 事件可能性分析 Naranjo 概率评分标准 [1]，该患者的心律失常由六氟化硫微泡引起的概率等级为很可能（见表 1），并且在六氟化硫微泡说明书中明确写有心房颤动、室上心动过速的罕见不良反应，说明该患者突发上述心律失常与六氟化硫微泡有关，此类心律失常属于该药物临床上市后观察到的罕见心脏不良反应。检索 PubMed，中国知网及万方数据库，查阅到六氟化硫微泡导致心律失常的报道极少。

基金项目：深圳市医疗卫生三名工程——广州中医药大学王伟教授心内科团队（No.SZZYSM202205015）。
作者简介：高超，男，主治医师，主要从事心血管相关疾病的诊治，email：gaochao413203@163.com　*通信作者：汤献文，女，主任医师，主要从事心血管相关疾病的诊治，email：1647662756@qq.com

表 1 药品不良反应 / 事件可能性分析 Naranjo 概率评分表

相关问题	Naranjo 评分			得分（六氟化硫微泡）
	是	否	不知	
该不良反应先前是否有结论性报告	＋1	0	0	＋1
该不良反应是否在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2
该不良反应是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1
该不良反应是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
是否存在其他原因能单独引起该不良反应	－1	＋2	0	＋2
该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0
该药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0
该不良反应是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0
是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分值				7

注：总分值≥ 9 分为肯定；总分值 5 ～ 8 分为很可能；总分值 1 ～ 4 分为可能；总分值≤ 0 为可疑。

造影剂是临床常用的化学药剂，主要用于增强影像观察的效果，碘造影剂和钆造影剂多用于 CT 和 MRI 检查，而六氟化硫微泡则是在超声科广泛使用的造影剂，包括六氟化硫微泡在内的造影剂常见的不良反应是过敏反应、皮炎等[2-5]，Shang 等[6]完成的大样本临床观察显示：463 434 例患者中不良反应发生率为 0.034%，其中过敏反应最常见，而以心动过速为主要不良反应的仅 14 例，其中 13 例为过敏性休克与低血压相关心动过速，1 例为心律失常，但具体心律失常类型在文中并未写明。谭鹰月等[7]完成的大样本临床观察显示：91 312 例用静脉注射六氟化硫微泡进行腹部超检查的患者当中最常见是恶心、呕吐及血管迷走神经反应。Tang 等[8]完成的临床观察显示 30 222 例患者中最严重的不良反应为早期过敏性休克，但发生率仅为 0.007%。依据上述三个大样本临床观察的结果，可以发现使用六氟化硫微泡后出现心房颤动和室上心动过速确属罕见现象。本例报道的心律失常属于该药物罕见的较为严重的不良反应，需要心内科专科医师及时介入诊治，提醒临床医务人员在使用六氟化硫微泡过程中，应该制订并提供全面的药物不良反应抢救措施和应急计划，最大限度地减少意外事件的发生。

参考文献

[1] Naranjo CA，Busto U，Sellers EM，et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther，1981，30（2）：239-245.

[2] 胡佳丽，王纯，严俊，等 . 碘克沙醇致严重的大疱性剥脱性皮炎 1 例 [J]. 中南药学，2023，21（10）：2818-2820.

[3] 曹利波，宋丽倩，王天珩，等 . 疑似碘普罗胺注射液致剥脱性皮炎 1 例 [J]. 中南药学，2021，19（07）：1508-1510.

[4] 樊鹏利，秦玉花，赵红卫，等 . 注射用六氟化硫微泡致过敏性休克 1 例 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（21）：2217-2218.

[5] 马换青，马长兴，孙博，等 . 注射用六氟化硫微泡致过敏性休克文献分析 [J]. 中国合理用药探索，2021，18（5）：26-32.

[6] Shang YN，Xie XY，Luo Y，et al. Safety findings after intravenous administration of sulfur hexafluoride microbubbles to 463，434 examinations at 24 centers [J]. Eur Radiol，2023，33（2）：988-995.

[7] 谭鹰月，谭琳，尚永宁，等 . 静脉注射用六氟化硫微泡在腹部超声检查中的安全性分析 [J]. 临床超声医学杂志，2023，25（5）：361-366.

[8] Tang CL，Fang KJ，Guo YL，et al. Safety of sulfur hexafluoride microbubbles in sonography of abdominal and superficial organs：retrospective analysis of 30，222 cases [J]. J Ultrasound Med，2017，36（3）：531-538.

（收稿日期：2024-01-09；修回日期：2024-01-31）