◆ 中国科技核心期刊
◆ 美国CA、波兰IC收录期刊
◆ 中国核心期刊（遴选）数据库收录期刊
◆ 科技期刊世界影响力指数收录期刊

ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2024年5月 第22卷 第5期
Volume 22 Number 5 May 2024

CENTRAL SOUTH PHARMACY

◆应用量子化学计算研究 As_4S_4 与 H^+、OH^- 相互作用的复合物
◆负载雷公藤红素的中空介孔聚多巴胺纳米复合物的制备及体外抗肿瘤活性研究
◆ MS19 通过抑制 IRF5 表达调控巨噬细胞极化减轻 CTD-ILD 肺部炎症的作用研究
◆ cGAMP 通过激活 PI3K-AKT 通路减轻小鼠脑缺血恢复期的损伤

5
2024

ISSN 1672-2981
05>
9 771672 298248

中国科技核心期刊

（中国科技论文统计源期刊）

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL

FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

中南药学

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038　　www.istic.ac.cn

2023年9月

证书编号：2022-GS99-1244

有效期至：2024年12月

中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 22 卷　第 5 期（总第 220 期）　2024 年 5 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

研究论文

（1109）应用量子化学计算研究 As_4S_4 与 H^+、OH^- 相互作用的复合物 …… 王楚茵，陈杨，王泓力，等

（1119）负载雷公藤红素的中空介孔聚多巴胺纳米复合物的制备及体外抗肿瘤活性研究 …… 潘慕倩，蔡义思，袁立霞，等

（1125）肉桂油 - 艾叶油复配亚微乳制备及协同抗菌研究 …… 徐丽芝，孟扬，王欣茹，等

（1131）顶花板凳果的化学成分研究…… 刘辰旺，吴莹，李昕卓，等

（1135）一种 CA-4 类衍生物抗人三阴性乳腺癌活性研究 …… 高祎婷，陈嘉媛，王晓花，等

（1141）硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 通过抑制肺上皮细胞铁死亡缓解小鼠特发性肺纤维化进展的作用研究 …… 吴趋荟，李妲，符艳，等

（1150）基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的复方木鸡合剂化学成分解析研究 …… 霍思奇，王帅，杨欣欣，等

（1157）基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术及肝纤维化细胞模型的肝爽颗粒抗肝纤维化的药效成分筛选研究 …… 宋伏洋，韩东，黄壮壮，等

（1164）直肠用美沙拉嗪温敏凝胶的制备及质量评价 …… 潘娇娇，李娇，丁杨，等

（1170）基于网络药理学和分子对接技术初探红柳治疗酒精性肝损伤的作用机制及实验验证 …… 刘晓航，凌修妍，徐睿君，等

（1178）MS19 通过抑制 IRF5 表达调控巨噬细胞极化减轻 CTD-ILD 肺部炎症的作用研究 …… 陈珊珊，明倩文，肖恩华，等

（1186）基于基因表达芯片和实验验证葛根素降低膀胱尿路上皮癌 T24 细胞 IL6 表达及抑制细胞增殖的作用 …… 马雨阳，许浩，潘登，等

（1194）纳米 LDH 作为藤黄酸吸附和释放载体的试验和分子对接模拟 …… 王姗，刘琦，崔婷婷，等

（1201）熟地黄中促神经干细胞增殖活性的成分研究 …… 杨扬，万凤，侯晓梦，等

（1207）cGAMP 通过激活 PI3K-AKT 通路减轻小鼠脑缺血恢复期的损伤 …… 李新宇，郭羽晨，李铁军

《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　斑　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

（1213）基于“药辅合一”的辛夷油亚微乳的制备及评价 …… 孟扬，徐丽芝，王欣茹，等
（1220）γ- 环糊精 - 金属有机骨架负载黄芪甲苷的制备及其性质研究 …… 陈敏燕，韩璐，王蓉，等
（1227）基于 RTCA 技术研究抗体偶联药物的旁观者效应的检测方法 …… 曹天助，牛庆田，刘兵，等
（1232）UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学探究苦参治疗特应性皮炎的潜在机制 …… 陈鑫宇，郭若曦，王艳，等
（1238）UPLC-ESI-QTOF/MS 快速表征鉴定九华黄精的化学成分 …… 吴小渊，俞年军，邢丽花，等
（1245）5 种不同的植物激素对白花前胡种子萌发的影响 …… 殷齐慧，王胜华，王茂锁，等
（1250）记忆型双特异性 CAR-T 细胞的工艺优化研究 …… 邹婷，马岩松，陈泽建，等
（1256）紫草素纳米结构脂质载体的制备与评价 …… 王昕怡，陈佳佳，谢祎帆，等
（1264）基于含量测定和指纹图谱评价电子束辐照灭菌对藏药小檗膏耳用散剂质量的影响 …… 高平，曲悦，王彩芬，等
（1270）瓶内处理技术结合快速 LC-MS 提高利培酮血药浓度测定效率 …… 夏爽，李小新，郭晓，等

综述

（1276）帕金森病神经突触损伤及中药干预研究进展 …… 刘璇，靳佳慧，燕子姝，等
（1284）花旗松素对神经系统疾病的神经保护作用研究进展 …… 李灵，张晗
（1291）维奈克拉治疗急性髓系白血病的耐药机制及应对策略 …… 滕喆，杨新宇
（1300）二氢杨梅素肝脏疾病保护作用及机制研究进展 …… 康萌，李雪梅，万静之，等
（1305）度普利尤单抗用于 2 型炎症性皮肤疾病的研究进展 …… 赵玉婷，宋沧桑，王国徽，等
（1311）过氧化物酶体增殖活化因子受体 γ 及其激动剂在类风湿关节炎中的作用研究进展 …… 陈娜，臧雷，刘芳

药物分析与检验

（1317）基于指纹图谱及多成分测定评价运脾消食颗粒制备工艺对其整体质量的影响 …… 林欣荣，高紫薇，赵霞，等
（1323）藏药五味清热汤散的 HPLC 指纹图谱及 5 种成分含量测定方法的研究 …… 姚新民，谢和兵，朱业锦，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。

（1329）基于 FTIR 的黄芪药材质量评价研究 …… 郝彩琴，周莹，刘明嘉，等
（1334）不同材质滤膜对滴眼液中抑菌剂含量的影响 …… 张敬，程婷，周乐春，等
（1339）基于 HPLC 和化学计量法分析蜘蛛香不同部位 3 类化合物 10 种成分差异研究 …… 程盛勇，胡光线，付志丽，等
（1345）中药片剂微生物污染鉴定和溯源分析及风险评价 …… 王玢，黄演君，潘子康，等
（1350）微量动态显色法定量检测胎牛血清中细菌内毒素含量 …… 方韵，屠哲玮，黄依雯，等
（1354）GC-MS/MS 法测定阿加曲班中基因毒性杂质 NDMA 和 NDEA …… 季行行，刘芹，邱荣英，等

医院药学

（1358）某肿瘤医院免疫检查点抑制剂超说明书用药分析 …… 严婷，廖德华，符一岚，等
（1365）日本汉方药企业专利布局分析——以株式会社津村为例 …… 王铁融，刘盼，侯媛媛，等
（1372）新疆某三甲医院 H 型高血压患者血压控制的影响因素分析 …… 吴洁茹，阿丽耶·拜尔迪，冯文玲，等
（1379）人工心脏瓣膜患者华法林抗凝质量影响因素分析及预测模型构建 …… 史金平，梁凯云，张琰，等
（1385）HPLC-MS/MS 法同时测定儿童血浆中万古霉素和地高辛的浓度 …… 秦亚彬，姜锡娟，张古英，等

药事管理

（1390）基于政策工具的我国互联网药品政策三维分析 …… 李晓朋，陈巧，武紫静，等
（1395）药物临床试验机构监督检查常见问题及监管建议 …… 杨泽华，李丹，李璟兮，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*290*zh*P*30.0*46*2024-5
本期责任编辑：彭金飞，邬志娟，李科，陆窈窈
英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 5 May 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

(1109) Complexes of As_4S_4 interacting with H^+ and OH^- by computational quantum chemistry
····· *WANG Chu-yin, CHEN Yang, WANG Hong-li, et al*

(1119) Preparation of celastrol-loaded hollow mesoporous polydopamine nanocomposite and its in vitro antitumor activity
····· *PAN Mu-qian, CAI Yi-si, YUAN Li-xia, et al*

(1125) Preparation and synergistic antimicrobial effect of submicroemulsion of Cinnamon oil-Artemisia argyi oil complexes
····· *XU Li-zhi, MENG Yang, WANG Xin-ru, et al*

(1131) Chemical compositions of *Pachysandra terminalis*
····· *LIU Chen-wang, WU Ying, LI Xin-zhuo, et al*

(1135) Anti-human triple negative breast cancer activity of a CA-4 derivative
····· *GAO Yi-ting, CHEN Jia-yuan, WANG Xiao-hua, et al*

(1141) Stearoyl-CoA desaturase 1 mitigates the progression of mouse idiopathic pulmonary fibrosis in mice by inhibiting ferroptosis of pulmonary epithelial cells ····· *WU Qu-hui, LI Da, FU Yan, et al*

(1150) Chemical components analysis of compound Muji mixture based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology
····· *HUO Si-qi, WANG Shuai, YANG Xin-xin, et al*

(1157) Anti-liver fibrosis components of Ganshuang granule based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and liver fibrosis cell model
····· *SONG Fu-yang, HAN Dong, HUANG Zhuang-zhuang, et al*

(1164) Preparation and quality evaluation of mesalazine thermosensitive gel for rectal use ····· *PAN Jiao-jiao, LI Jiao, DING Yang, et al*

(1170) Effect of *Tamarix ramosissima* Ledeb on alcoholic liver injury based on network pharmacology and molecular docking technology
····· *LIU Xiao-hang, LING Xiu-yan, XU Rui-jun, et al*

(1178) Role of MS19 in alleviating lung inflammation in CTD-ILD by regulating macrophage polarization through inhibiting the expression of IRF5
····· *CHEN Shan-shan, MING Qian-wen, XIAO En-hua, et al*

(1186) Puerarin decreases IL6 expression and inhibits cell proliferation in bladder urothelial carcinoma T24 cells
····· *MA Yu-yang, XU Hao, PAN Deng, et al*

(1194) Nano-sized LDH as carriers for adsorption and loading of gambogic acid: experimental and molecular docking simulation
····· *WANG Shan, LIU Qi, CUI Ting-ting, et al*

(1201) Active ingredients in Radix Rehmanniae Praeparata to promote the proliferation of neural stem cells
····· *YANG Yang, WAN Feng, HOU Xiao-meng, 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.

(1207) cGAMP reduces neuronal damage in the mouse cerebral ischemic recovery phase by activating the PI3K-AKT pathway
…… *LI Xin-yu, GUO Yu-chen, LI Tie-jun*

(1213) Preparation and evaluation of *Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsion based on the unification of drugs and excipients
…… *MENG Yang, XU Li-zhi, WANG Xin-ru, et al*

(1220) Preparation and properties of astragaloside loaded by γ-cyclodextrin metal-organic framework
…… *CHEN Min-yan, HAN Lu, WANG Rong, et al*

(1227) Detection of bystander effect in antibody-drug conjugates based on real-time label-free cell analysis technique
…… *CAO Tian-zhu, NIU Qing-tian, LIU Bing, et al*

(1232) Mechanism of Sophora flavescens in the topical treatment of atopic dermatitis by UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology
…… *CHEN Xin-yu, GUO Ruo-xi, WANG Yan, et al*

(1238) Rapid identification of compositions in *Polygonatum cyrtonema* Hua by UPLC-ESI-QTOF/MS
…… *WU Xiao-yuan, YU Nian-jun, XING Li-hua, et al*

(1245) Effect of 5 phytohormones on the germination of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds
…… *YIN Qi-hui, WANG Sheng-hua, WANG Mao-suo, et al*

(1250) Optimization of the proocess of memory dual specificity CAR-T cells
…… *ZOU Ting, MA Yan-song, CHEN Ze-jian, et al*

(1256) Preparation and evaluation of shikonin nanostructured lipid carriers
…… *WANG Xin-yi, CHEN Jia-jia, XIE Yi-fan, et al*

(1264) Effect of electron beam irradiation sterilization on the quality of Tibetan medicine berberis extract ear powder based on content determination and fingerprints …… *GAO Ping, QU Yue, WANG Cai-feng, et al*

(1270) Bottle-in technology combined with rapid LC-MS to improve the determination efficiency of risperidone plasma concentration
…… *XIA Shuang, LI Xiao-xin, GUO Xiao, et al*

(1276) Research progress in synaptic damage in Parkinson's disease and intervention by traditional Chinese medicine
……*LIU Xuan, JIN Jia-hui, YAN Zi-shu, et al*

(1284) Research progress in neuroprotective effect of taxifolin on neurological diseases …… *LI Ling, ZHANG Han*

(1291) Mechanism of drug resistance and strategy for Venetoclax in acute myeloid leukemia …… *TENG Zhe, YANG Xin-yu*

(1300) Research progress in the effect of dihydromyricetin on the prevention and treatment of liver diseases and related mechanism
…… *KANG Meng, LI Xue-mei, WAN Jing-zhi, et al*

(1305) Progress in dupilumab for type 2 inflammatory skin disorders
…… *ZHAO Yu-ting, SONG Cang-sang, WANG Guo-hui, et al*

(1311) Research progress in the role of peroxisome proliferator-activated receptor-γ and its agonists in rheumatoid arthritis
…… *CHEN Na, ZANG Lei, LIU Fang*

(1317) Influence of different process stages on the overall quality of Yunpi Xiaoshi granules based on HPLC fingerprint and multi-component content determination …… *LIN Xin-rong, GAO Zi-wei, ZHAO Xia, et al*

(1323) HPLC fingerprint and content determination of 5 components in Tibetan medicine Wuwei Qingre decoction powder
……*YAO Xin-min, XIE He-bing, ZHU Ye-jin, et al*

(1329) FTIR quantum fingerprints of Radix astragali and quality control
…… *HAO Cai-qin, ZHOU Ying, LIU Ming-jia, et al*

(1334) Effect of different filter membranes on bacteriostat content in eye drops
…… *ZHANG Jing, CHENG Ting, ZHOU Le-chun, et al*

(1339) Differences of 10 components in 3 types of compounds from different parts of *Valeriana jatamansi* Jones based on HPLC and chemometrics
…… *CHENG Sheng-yong, HU Guang-xian, FU Zhi-li, et al*

(1345) Identification and traceability of microbial pollution in traditional Chinese medicine tablets and its risk evaluation
…… *WANG Fen, HUANG Yan-jun, PAN Zi-kang, et al*

(1350) Quantitative detcetion of bacterial endotoxin content in fetal bovine serum by micro-kinetic chromogenic method
…… *FANG Yun, TU Zhe-wei, HUANG Yi-wen, et al*

(1354) Determination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in agatroban by GC-MS/MS
…… *JI Xing-xing, LIU Qin, QIU Rong-ying, et al*

(1358) Off-label usage of immune checkpoint inhibitors in a cancer hospital
…… *YAN Ting, LIAO De-hua, FU Yi-lan, et al*

(1365) Patent distribution of Japanese Kampo medicine enterprises-TSUMURA & CO as an example
…… *WANG Tie-rong, LIU Pan, HOU Yuan-yuan, et al*

(1372) Factors affecting blood pressure control in patients with H-type hypertension in a tertiary hospital in Xinjiang
…… *WU Jie-ru, Aliya • Bardi, FENG Wen-ling, et al*

(1379) Influence factors for the anticoagulant quality of warfarin in patients with prosthetic heart valve and construction of a prediction model
…… *SHI Jin-ping, LIANG Kai-yun, ZHANG Yan, et al*

(1385) HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of vancomycin and digoxin in children's plasma
…… *QIN Ya-bin, JIANG Xi-juan, ZHANG Gu-ying, et al*

(1390) Three dimension analysis of China's internet drug policy based on policy tools …… *LI Xiao-peng, CHEN Qiao, WU Zi-jing, et al*

(1395) Common problems and suggestions in the supervision and inspection of drug clinical trial institutions
…… *YANG Ze-hua, LI Dan, LI Jing-xi, et al*

研究论文

应用量子化学计算研究 As_4S_4 与 H^+、OH^-相互作用的复合物

王楚茵[1]，陈杨[1]，王泓力[1]，赵希彤[1]，张谦[1]，金宏威[2*]，关君[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京 102488；2. 北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室，北京　100191）

摘要：目的　应用量子化学计算方法研究 As_4S_4 与 H^+、OH^-相互作用的复合物，探讨雄黄在酸性、碱性介质中可能存在的砷形态。**方法**　首先采用 GaussianView 软件设计 As_4S_4 异构体与 H^+、OH^-相互作用形成的复合物；接着采用 Gaussian 09 软件，在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31G*、B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平下，对可能形成的 $[As_4S_4\text{-}H]^+$复合物进行几何优化和热力学计算；对可能形成的 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$复合物，则在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 ＋ G*、B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平上进行几何优化和热力学计算。然后分别在 B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-31 ＋ G* 水平下对 $[As_4S_4\text{-}H]^+$和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$复合物进行自然键轨道分析。**结果**　雄黄的两种稳定的 As_4S_4 异构体与 H^+、OH^-均可以形成 1∶1 比例的复合物，所形成的 21 种复合物均具有热力学稳定性。前线轨道能级和键级分析表明，$[As_4S_4\text{-}H]^+$和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$复合物的热力学稳定性较差。**结论**　雄黄在酸性介质和碱性介质中所形成的复合物可以作为短寿命的分子离子存在，这些分子离子可能是雄黄在酸性、碱性介质中的活性中间体。

关键词：As_4S_4；复合物；砷形态；量子化学计算
中图分类号：TS201.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1109-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.001

Complexes of As_4S_4 interacting with H^+ and OH^- by computational quantum chemistry

WANG Chu-yin[1], CHEN Yang[1], WANG Hong-li[1], ZHAO Xi-tong[1], ZHANG Qian[1], JIN Hong-wei[2*], GUAN Jun[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs*, *Peking University Health Science Center*, *Beijing*　100191)

Abstract: Objective　To determine the possible arsenic species of realgar in acidic and alkaline media, by studying the complexes of As_4S_4 interacting with H^+ and OH^- with computational quantum chemistry method. **Methods**　Firstly, the GaussianView software was used to design the possible complexes formed by interaction between As_4S_4 isomers with H^+ and OH^-; subsequently, Gaussian 09 software was used to perform geometric optimization and thermodynamic calculations on the possible formation of $[As_4S_4\text{-}H]^+$ complexes at the HF/STO-3G, B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-311 ＋ G* theory levels; for the possible formation of $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ complexes, geometric optimization and thermodynamic calculations were conducted at the HF/STO-3G, B3LYP/6-31 ＋ G*, and B3LYP/6-311 ＋ G* theory levels. Then, natural bond orbital analysis was performed on $[As_4S_4\text{-}H]^+$ and $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ complexes at the B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-31 ＋ G* levels. **Results**　Two isomers of As_4S_4 could both form

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.82074001）；国家自然科学基金青年科学基金项目（No. 81403069）；北京市“双一流”- 支持高水平中医药重点学科 23 年经费 - 中药分析学（No.CGSQ-2023-746）。
作者简介：王楚茵，女，在读硕士研究生，主要从事中药物质基础研究，email：20200935099@bucm.edu.cn　*通信作者：金宏威，女，高级实验师，主要从事天然药物与仿生药物的分子设计和计算的相关研究，email：jinhw@bjmu.edu.cn；关君，女，教授，主要从事矿物药及金属有机药物的药效物质及作用机制研究，email：timeguan@bucm.edu.cn

complexes with H^+ and OH^- ions at a 1∶1 ratio, and 21 complexes found were thermodynamically stable. The frontier orbital energy level and bond level analysis showed that the stability of $[As_4S_4\text{-}H]^+$ and $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ complexes were relatively poor. **Conclusion** The complexes generated by realgar in acidic and alkaline media may exist as short-lived species, which may be the reactive intermediates in acidic and alkaline media.

Key words: As_4S_4; complex; arsenic species; computational quantum chemistry

雄黄属于硫化物类含砷矿物，2020 年版《中国药典》将雄黄载述为“主含二硫化二砷（As_2S_2）”[1]。然而，国内外相关的研究以及本课题组的长期研究结果表明，雄黄的主要成分为四硫化四砷（As_4S_4）[2-13]，而二硫化二砷（As_2S_2）是雄黄高温分解的产物[14]。

雄黄入药历史悠久，可用于治疗痈肿疔疮、蛇虫咬伤、疥癣等，还可用于治疗慢性支气管炎、哮喘、带状疱疹、流行性腮腺炎、反应性关节炎等疾病[15-17]。近几十年来，雄黄在治疗急性早幼粒细胞白血病（acute promyelocytic leukemia，APL）、慢性粒细胞性白血病（chronic myelocytic leukemia，CML）等恶性血液系统疾病方面效果显著[18-19]。

砷元素可以以不同的形态存在于自然界中，例如：三氧化二砷（As_2O_3），As_4S_4，砷酸盐，甲基胂，砷胆碱等。雄黄中的砷形态主要是 As_4S_4，其次为少量 As_2O_3、砷酸盐等。其中，As_4S_4 存在两种稳定的同分异构体 As_4S_4（Ⅰ）和 As_4S_4（Ⅱ）[3, 5]。雄黄中的砷形态较多、又存在同分异构现象，致使其药效物质基础尚未完全清楚，可能是其主要成分 As_4S_4，也可能是其含有的少量可溶性砷，抑或雄黄进入体内后的砷代谢中间体[20]。由于纯品 As_4S_4 在临床上已被证明对 APL 有效[19]，因此推测雄黄的主要成分 As_4S_4 是可以被机体代谢而发挥药效作用的。但是，As_4S_4 溶解性极差，难以以原形被吸收入血，因此推测雄黄很可能是以某种砷代谢中间体被吸收入血的。此外，由于雄黄可微溶于强酸、强碱溶液[21-22]，且主要经胃肠道吸收[23]，因此推测雄黄有可能先在胃的酸性环境中与 H^+ 作用形成 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物或在肠的碱性环境中与 OH^- 作用形成 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物，而后转化成分子量较小、溶解度较大的砷形态，最后被吸收入血的。

受现有实验条件和技术水平的限制，研究者对雄黄在酸性、碱性介质中的砷形态的研究具有一定难度，目前只检测到三价砷 As（Ⅲ）和五价砷 As（Ⅴ）[24-31]，但很难确定具体的砷形态。为了探究雄黄在酸性、碱性介质中可能存在的砷形态，本研究应用量子化学计算方法，计算并分析 As_4S_4 两种异构体分别与 H^+、OH^- 可能形成的复合物的构型参数、振动频率、热力学能量以及成键性质，以期为雄黄的药效物质基础和作用机制研究提供新方法和新思路，并为雄黄药用的安全性和科学性提供理论依据。

1 计算方法

几何结构优化、总能量、分子轨道和最高占据轨道 - 最低空轨道（HOMO-LUMO）能隙的计算均采用量子化学计算软件包 Gaussian 09[32]。文章中首先用 Hartree-Fock（HF）方法在 STO-3G 基组水平上对 As_4S_4 两种异构体和 H^+、OH^- 所有可能形成的复合物的几何构型进行优化、筛选。然后对 As_4S_4 与 H^+ 所形成的复合物稳定构型，用 B3LYP 方法在 6-31G*、6-311 ＋ G* 基组水平上再次进行几何优化，并对优化后的稳定构型进行振动频率分析；对 As_4S_4 与 OH^- 所形成的带负电荷复合物稳定构型，则在 B3LYP/6-31 ＋ G*、B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平上再次进行几何优化和振动频率分析。此外，振动频率分析给出零点振动能（Zero-point Energies，ZPE）对体系的总能量进行校正。最后，分别在 B3LYP/6-31G*、B3LYP/6-31 ＋ G* 理论水平下对 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物进行自然键轨道（Natural-Bond-Orbital，NBO）分析[33]，采用自然原子轨道键级（Natural Atomic Orbital Bond Index，NAOBI）和 Wiberg 键级（Wiberg-Bond-Index，WBI）[34] 表示复合物中各个化学键的键级。

2 计算结果及分析

2.1 雄黄主要成分 As_4S_4 分子结构与性质

本课题组前期应用计算量子化学方法，对 As_4S_4 两种异构体的几何结构和成键性质进行了研究，所得到的两种 As_4S_4 异构体的分子构型，如图 1 所示[5]。As_4S_4（Ⅰ）是具有 D_{2d} 对称的八元环笼状分子，具有以下几个成键特点：分子中的所有原子均以共价键成键；具有 2 个离域的 σ 成键分子轨道，一个离域 σ 成键分子轨道是由所有的 S 原子和 As 原子的 *s* 原子轨道所形成的，另一个离域 σ 成键分子轨道是由 4 个 S 原子

平面内的 *p* 轨道所形成的；所有的 As 原子和 S 原子都含有孤对电子，意味着 As_4S_4 中的所有的 As 原子和 S 原子都可与 H^+ 结合形成配位键；由于 As 原子含有空的 *4d* 轨道，意味着 As_4S_4 中所有的 As 原子与 OH^- 结合形成配位键。根据 As_4S_4（Ⅰ）的成键性质，可推测 As_4S_4（Ⅰ）既可以作为良好的供电子体系与酸性介质中的 H^+ 配位形成 $[As_4S_4$（Ⅰ）-H$]^+$ 复合物，也可作为良好的受电子体系与碱性介质中的 OH^- 配位形成 $[As_4S_4$（Ⅰ）-OH$]^-$ 复合物。同理，由于 As_4S_4（Ⅱ）的 As 原子和 S 原子与 As_4S_4（Ⅰ）具有相似的成键情况，即 As 和 S 原子都含有孤对电子、As 原子具有空的 *4d* 轨道，因此，推测 As_4S_4（Ⅱ）也可以与 H^+、OH^- 通过配位键分别形成 $[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 和 $[As_4S_4$（Ⅱ）-OH$]^-$ 复合物。

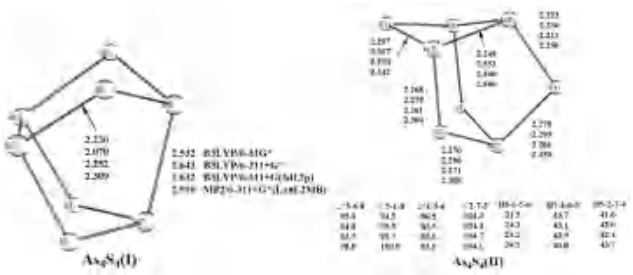

图 1　四硫化四砷（As_4S_4）的两种异构体 [5]

Fig 1　Two isomers of As_4S_4 [5]

2.2　雄黄主要成分 As_4S_4 与 H^+、OH^- 形成的复合物

2.2.1　雄黄 As_4S_4 与 H^+ 所形成的复合物　根据上述 As_4S_4 分子的结构与性质，可以推测 As_4S_4 两种异构体中的 As、S 原子均可以与 H^+ 配位。如图 1 所示，由于 As_4S_4（Ⅰ）是 D_{2d} 对称的，表明 4 个 As 原子在空间上等价的，因此，可以任意选取 1 个 As 原子与 H^+ 形成配位键。同理，由于 As_4S_4（Ⅰ）中的 4 个 S 原子在空间上也是等价的，因此，可以任意选取 1 个 S 原子与 H^+ 形成配位键。As_4S_4（Ⅱ）中 S 原子只有 2 号（S2）和 3 号（S3）是等价的，As 原子只有 5 号（As5）和 8 号（As8）是等价，其余原子均不等价。因此，可以选择 S1、As8、As6、S4、As7、S2 作为与 H^+ 结合的位点。As_4S_4 的两种异构体与 H^+ 可能形成的复合物用 B3LYP 方法在 6-31G*、6-311 ＋ G* 水平上优化后，最终获得 10 种 $[As_4S_4$-H$]^+$ 稳定的复合物，如图 2 所示。总能量和 ZPE 如表 1 所示，相对能量如表 2 所示。在 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，计算所得的 10 种 $[As_4S_4$-H$]^+$ 复合物都是势能面上局域极小点（即没有虚频），其热力学稳定性顺序为：$[As_4S_4$（Ⅰ）-H$]^+$ 复合物Ⅰ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅱ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅲ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅳ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅴ＞$[As_4S_4$（Ⅰ）-H$]^+$ 复合物Ⅵ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅶ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅷ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅸ＞$[As_4S_4$（Ⅱ）-H$]^+$ 复合物Ⅹ。

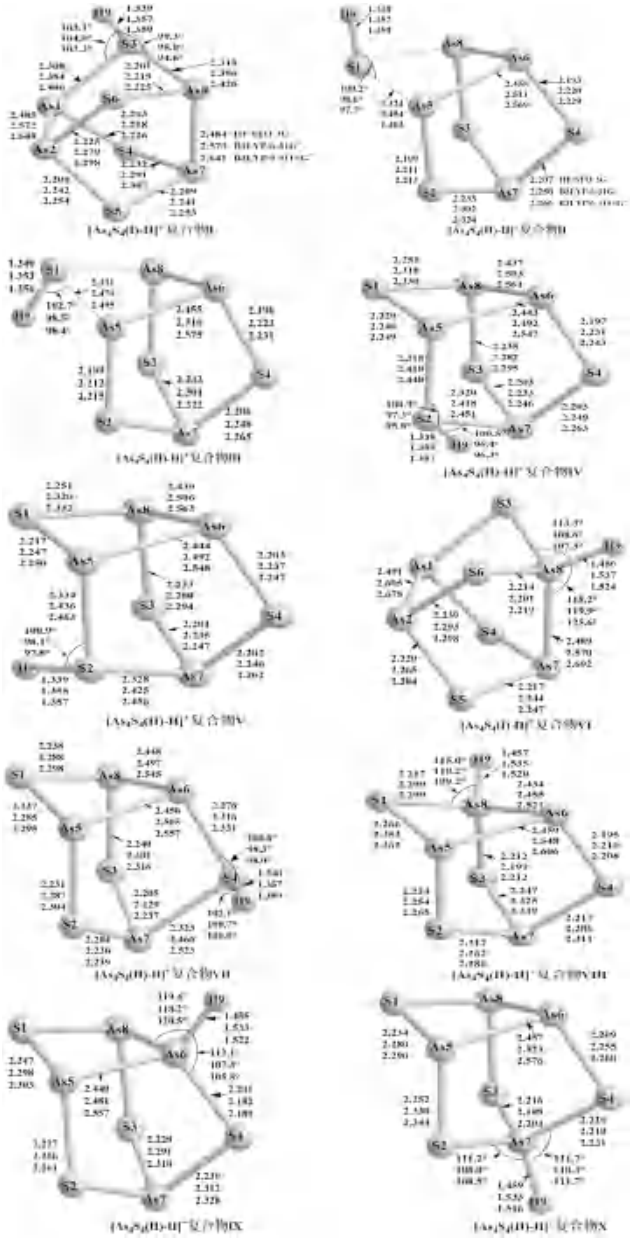

图 2　$[As_4S_4$-H$]^+$ 复合物在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31G*、B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平上优化的几何结构和构型参数

Fig 2　Geometries and configuration parameters of $[As_4S_4$-H$]^+$ complexes optimized at the HF/STO-3G, B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-311 ＋ G* theory levels

如图 2 所示，$[As_4S_4$（Ⅰ）-H$]^+$ 复合物Ⅰ是由 As_4S_4（Ⅰ）中的 S 原子与 H^+ 作用所形成的复合物，具有 C_1 对称性，含有 1 个 S-H 键、2 个 As-As 键和 8 个 As-S 键。其中，S-H 配位键的键长接近于 S 原子与 H 原子共价半径之和（1.40 Å），2 个 As-As 键的键长略大于 2 个 As 原子共

表 1　10 种 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31G*、B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平下的总能量 (a.u.) 和零点能 (kJ・mol^{-1})

Tab 1　Total energies (a.u.) and zero-point energies [kJ・mol^{-1}] of 10 types of $[As_4S_4\text{-}H]^+$ complexes at the HF/STO-3G，B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-311 ＋ G* theory levels

复合物	HF/STO-3G	B3LYP/6-31G*	B3LYP/6-311 ＋ G*
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ（C_1）	－ 10 410.523 09（66.04）	－ 10 528.361 59（51.83）	－ 10 536.901 73（49.79）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ（C_s）	－ 10 410.523 34（65.58）	－ 10 528.357 40（50.43）	－ 10 536.900 31（48.47）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅲ（C_s）	－ 10 410.518 19（65.17）	－ 10 528.354 99（50.39）	－ 10 536.899 41（48.17）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅳ（C_1）	－ 10 410.518 43（65.39）	－ 10 528.355 04（51.10）	－ 10 536.899 08（49.06）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅴ（C_1）	－ 10 410.512 69（64.97）	－ 10 528.351 53（50.47）	－ 10 536.896 62（48.44）
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅵ（C_s）	－ 10 410.527 36（62.47）	－ 10 528.356 71（49.82）	－ 10 536.889 64（47.77）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅶ（C_1）	－ 10 410.499 11（65.02）	－ 10 528.342 53（50.30）	－ 10 536.889 14（48.48）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅷ（C_1）	－ 10 410.523 41（62.14）	－ 10 528.348 65（49.99）	－ 10 536.886 85（48.08）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅸ（C_s）	－ 10 410.511 88（61.41）	－ 10 528.341 81（48.75）	－ 10 536.881 56（46.93）
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅹ（C_s）	－ 10 410.510 88（62.31）	－ 10 528.341 42（50.26）	－ 10 536.876 95（48.25）

表 2　10 种 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31G*、B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平下相对于 $[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]$ 复合物Ⅰ的能量差异 (kJ・mol^{-1})

Tab 2　Energy differences of 10 types of $[As_4S_4\text{-}H]^+$ complexes relative to $[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ complex Ⅰ at the HF/STO-3G，B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-311 ＋ G* theory levels (kJ・mol^{-1})

复合物	HF/STO-3G	B3LYP/6-31G*	B3LYP/6-311 ＋ G*
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ（C_1）	0.00	0.00	0.00
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ（C_s）	－ 0.66	11.00	3.73
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅲ（C_s）	12.86	17.33	6.09
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅳ（C_1）	12.23	17.20	6.96
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅴ（C_1）	27.31	26.41	13.42
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅵ（C_s）	－ 11.21	12.81	31.74
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅶ（C_1）	62.96	50.04	33.06
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅷ（C_1）	－ 0.84	33.97	39.07
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅸ（C_s）	29.43	51.93	52.96
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅹ（C_s）	32.06	52.96	65.06

价半径之和（2.42 Å），8 个 As-S 键的键长均接近 As 和 S 原子共价半径之和（2.24 Å），表明 $[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ中的所有化学键都属于共价键。$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ是 10 种 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物中最稳定的构型，这可能是由于 As_4S_4（Ⅰ）比 As_4S_4（Ⅱ）更稳定，而 S 原子的电负性又比 As 原子的电负性大，因此 H^+ 与 As_4S_4（Ⅰ）的 S 原子结合最牢固。

$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ是由 As_4S_4（Ⅱ）中的 S1 原子与 H^+ 离子作用所形成的复合物，具有 C_s 对称性，其对称面为 H9、S1、As6、S4 和 As7 共同所在的平面。在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ中的 As5-S2 键与 As8-S3 键键长相等，As7-S2 键与 As7-S3 键键长相等，分别为 2.199、2.211、2.213 Å 和 2.233、2.302、2.324 Å，均接近 As 原子与 S 原子共价半径之和（2.24 Å），意味着这 4 个 As-S 键均是共价键。$[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ中的 S1-As5 和 S1-As8 这两个 As-S 键的键长也相等，在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下分别为 2.324、2.454、2.483 Å，虽略大于 As 原子与 S 原子共价半径之和（2.24 Å），但小于 As 原子与 S 原子范德华半径之和（3.85 Å），表明化学键 S1-As5 以及 S1-As8 均是介于共价键和范德华力之间的一种弱相互作用，这种弱相互作用极易受到外界的影响而发生断裂，将导致 H9-S1 从复合物中解离出来，甚至引发复合物中剩余的部分进一步发生解离，因此，该复合物具有深度研究的意义。$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ是 As_4S_4（Ⅱ）与 H^+ 作用所形成的复合物中能量最低的构型，且是第二稳定的 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物。在 B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ的能量比 $[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ分别高 11.00、3.73 kJ・mol^{-1}。而在 HF/STO-3G 水平下，$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ的能量仅仅比 $[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ低 0.66 kJ・mol^{-1}。鉴于 B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平中考虑到了电子相关的作用，计算结果更加可靠，因此可以确定 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ的能量高于 $[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ。$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅲ是 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ的构象异构体，两者不同之处在于 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅲ的 H 原子朝下，而 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ的 H 原子朝上。

$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅳ和 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅴ均是由 As_4S_4（Ⅱ）中的 S2 原子与 H^+ 离子作用形成的复合物，两者结构相似，互为构象异构体，区别在于 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅳ的 H 原子伸向分子外部，而 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅴ的 H 原子伸向分子内部。

$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅵ是由 As_4S_4（Ⅰ）的 As 原子与 H^+ 作用所形成的复合物，具有 C_s 对称性，其对称面是以 H9、As8、As7 这 3 个原子所形成的平面，且垂直平分 As1-As2 键。两个 As-As 键不相等，在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-311＋G* 水平下，分别为 2.489、

2.570、2.692 Å 和 2.491、2.605、2.678 Å。在同样的理论水平下，As 原子与 H^+ 作用形成的 As-H 配位键的键长分别为 1.456、1.537、1.524 Å，As-H 配位键的键长小于 As 原子共价半径（1.21 Å）与 H 原子共价半径（0.37 Å）之和（1.58 Å），意味着 As-H 配位键也是典型的共价键。由此可见，$[As_4S_4$（Ⅰ）$-H]^+$ 复合物Ⅵ中的所有原子均以共价键相连。在 B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-311 + G* 水平下，具有 C_s 对称性的 $[As_4S_4$（Ⅰ）$-H]^+$ 复合物Ⅵ的能量比 C_1 对称性的 $[As_4S_4$（Ⅰ）$-H]^+$ 复合物Ⅰ的能量分别高 12.81、31.74 kJ·mol^{-1}，可能是由于 As 元素的电负性比 S 元素小，As 原子结合 H^+ 离子的能力比 S 原子差所致。

$[As_4S_4$（Ⅱ）$-H]^+$ 复合物Ⅶ是由 As_4S_4（Ⅱ）的 S4 原子与 H^+ 作用所形成的复合物，具有 C_1 对称性。$[As_4S_4$（Ⅱ）$-H]^+$ 复合物Ⅷ、Ⅸ和Ⅹ均是由 As_4S_4（Ⅱ）的 As 原子与 H^+ 作用所形成的复合物。$[As_4S_4$（Ⅱ）$-H]^+$ 复合物Ⅷ、Ⅸ和Ⅹ不如 $[As_4S_4$（Ⅰ）$-H]^+$ 复合物Ⅵ稳定，究其原因，很可能是由于 As_4S_4（Ⅱ）不如 As_4S_4（Ⅰ）稳定所造成的。而 $[As_4S_4$（Ⅱ）$-H]^+$ 复合物Ⅷ、Ⅸ和Ⅹ不如 $[As_4S_4-H]^+$ 复合物Ⅰ至Ⅴ和Ⅶ稳定，主要原因可能是 As 元素的电负性比 S 元素小，而 As 原子的半径比 S 原子大，导致 As 原子结合 H^+ 的能力比 S 原子差。

2.2.2　雄黄 As_4S_4 与 OH^- 离子所形成的复合物

11 种 $[As_4S_4-OH]^-$ 复合物的分子结构及其优化后的几何参数如图 3 所示，总能量和 ZPE 如表 3 所示，相对能量如表 4 所示。在 B3LYP/6-31 + G*、B3LYP/6-311 + G* 水平下，计算所得的 11 种 $[As_4S_4-OH]^-$ 复合物都是势能面上局域极小点，其热力学稳定性顺序为：$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅰ > $[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅱ > $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅲ > $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅳ > $[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅴ > $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅵ > $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅶ > $[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅷ > $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅸ > $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅹ > $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅺ。

表 3　11 种 $[As_4S_4-OH]^-$ 复合物在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 + G* 和 B3LYP/6-311 + G* 理论水平下的总能量 (a.u.) 和零点能 (kJ·mol^{-1})

Tab 3　Total energies (a.u.) and zero-point energies (kJ·mol^{-1}) of 11 types of $[As_4S_4-OH]^-$ complexes at the HF/STO-3G, B3LYP/6-31 + G* and B3LYP/6-311 + G* theory levels

复合物	HF/STO-3G	B3LYP/6-31 + G*	B3LYP/6-311 + G*
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅰ（C_1）	− 10 484.382 95 (76.88)	− 10 604.030 26 (61.47)	− 10 612.526 73 (60.02)
$[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅱ（C_1）	− 10 484.380 09 (76.30)	− 10 604.028 74 (61.61)	− 10 612.523 66 (60.27)
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅲ（C_s）	− 10 484.369 76 (78.07)	− 10 604.015 57 (60.35)	− 10 612.516 19 (59.49)
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅳ（C_s）	− 10 484.351 15 (77.37)	− 10 604.014 74 (60.65)	− 10 612.512 48 (59.83)
$[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅴ（C_s）	− 10 484.393 27 (77.21))	− 10 604.013 11 (60.88)	− 10 612.512 12 (59.69)
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅵ（C_1）	− 10 484.395 18 (77.21)	− 10 604.010 45 (60.61)	− 10 612.509 06 (59.22)
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅶ（C_s）	− 10 484.354 43 (74.98)	− 10 604.010 32 (58.91)	− 10 612.507 24 (58.20)
$[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅷ（C_s）	− 10 484.392 52 (76.36)	− 10 604.008 03 (60.49)	− 10 612.505 79 (58.71)
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅸ（C_1）	− 10 484.379 80 (81.38)	− 10 603.963 05 (62.93)	− 10 612.463 61 (61.03)
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅹ（C_1）	− 10 484.369 56 (81.12)	− 10 603.950 92 (61.20)	− 10 612.455 04 (60.50)
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅺ（C_1）	− 10 484.349 68 (76.61)	− 10 603.946 33 (61.46)	− 10 612.452 92 (59.57)

表 4　11 种 $[As_4S_4-OH]^-$ 复合物在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 + G* 和 B3LYP/6-311 + G* 理论水平下相对于 $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅰ的能量差异 (kJ·mol^{-1})

Tab 4　Energy differences of 11 types of $[As_4S_4-OH]^-$ complexes relative to $[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ complex Ⅰ at the HF/STO-3G, B3LYP/6-31 + G* and B3LYP/6-311 + G* theory levels (kJ·mol^{-1})

复合物	HF/STO-3G	B3LYP/6-31 + G*	B3LYP/6-311 + G*
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅰ（C_1）	0.00	0.00	0.00
$[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅱ（C_1）	7.51	3.99	8.06
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅲ（C_s）	34.63	38.57	27.67
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅳ（C_s）	83.49	40.75	37.41
$[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅴ（C_s）	− 27.10	45.03	38.36
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅵ（C_1）	− 32.11	52.01	46.39
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅶ（C_s）	74.88	52.35	51.17
$[As_4S_4$（Ⅰ）$-OH]^-$ 复合物Ⅷ（C_s）	− 25.13	58.36	54.98
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅸ（C_1）	8.27	176.46	165.72
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅹ（C_1）	35.16	208.31	188.22
$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅺ（C_1）	87.35	220.36	193.79

如图 3 所示，$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复合物Ⅰ是 OH^- 中的 O9 原子与 As_4S_4（Ⅱ）中的 As8 作用所形成的复合物，具有 C_1 对称性。在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 + G* 和 B3LYP/6-311 + G* 水平下，As8-O9 键的键长分别为 1.799、1.839、1.850 Å，约等于 As 原子和 O 原子共价半径之和（1.87 Å），表明 As8-O9 键为典型的共价键。值得注意的是，在 B3LYP/6-31 + G* 和 B3LYP/6-311 + G* 理论水平下，在与 OH^- 作用之后，原 As_4S_4（Ⅱ）中的 As8 原子和 S1 原子之间的距离由原来的 2.3 Å 左右分别增大到 3.316、3.456 Å，但未超过 As 原子与 S 原子范德华半径之和（3.85 Å），意味着 S1 原子与 As8 原子之间仅以弱相互作用相连，这可能将导致 As_4S_4（Ⅱ）在碱性介质中与 OH^- 作用后分解成较小分子量的砷形态。另外，在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 + G* 和 B3LYP/6-311 + G* 水平下，$[As_4S_4$（Ⅱ）$-OH]^-$ 复

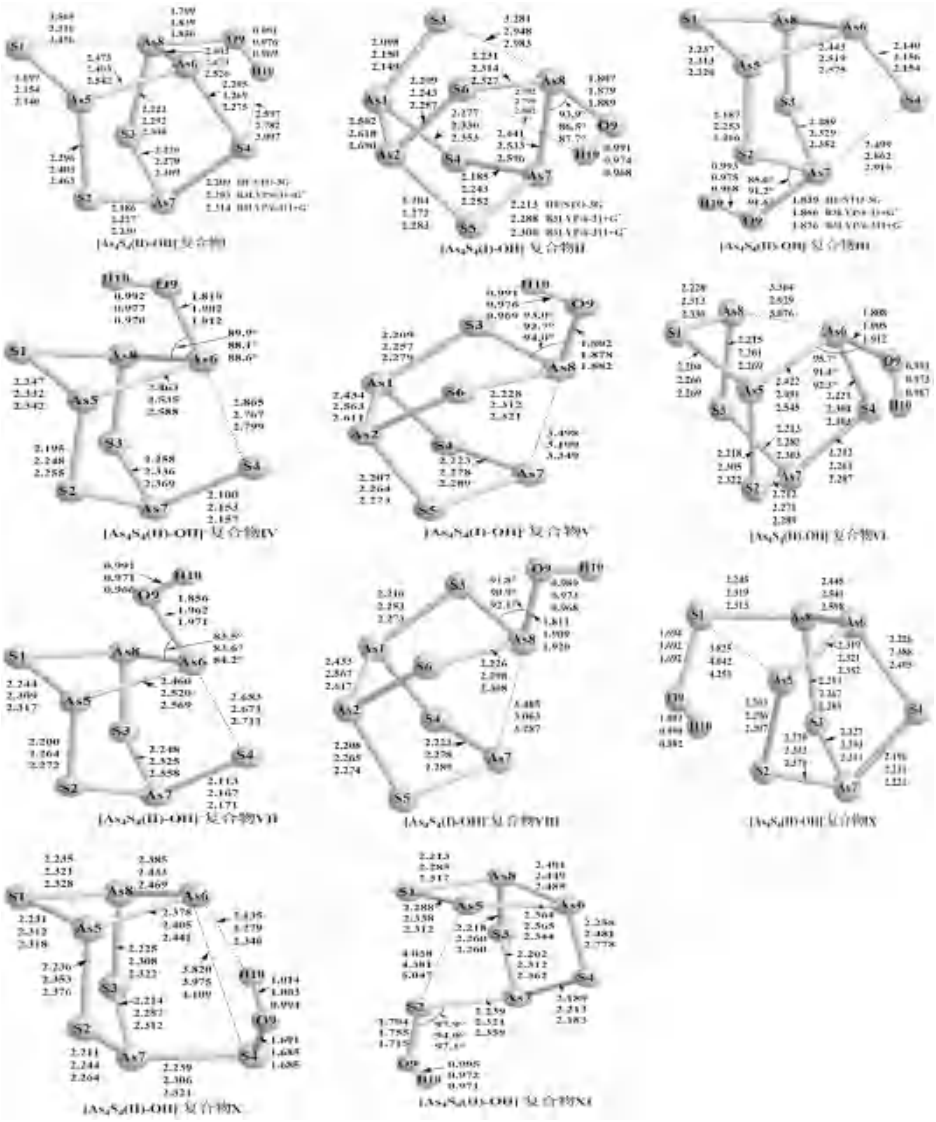

图 3　$[As_4S_4\text{-}OH]^-$复合物在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 ＋ G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平上优化的几何结构和构型参数

Fig 3　Geometries and configuration parameters of $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ complexes optimized at the HF/STO-3G, B3LYP/6-31 ＋ G* and B3LYP/6-311 ＋ G* levels of theory

合物Ⅰ中的 H10 原子与 S4 原子之间的距离分别为 2.597、2.782、3.007 Å，接近水分子的氢键键长（2.76 Å）[35]，表明 H10 原子和 S4 原子之间形成了氢键，这也许是复合物Ⅰ能量较低的主要原因之一。

如图 3 所示，$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$复合物Ⅱ是 OH^-中的 O9 原子与 As_4S_4（Ⅰ）中的 As8 原子作用所形成的复合物，具有 C_1 对称性。在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 ＋ G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$复合物Ⅱ中的 As8-O9 键键长为 1.807、1.879、1.889 Å，基本接近 As 原子和 O 原子共价半径之和（1.87 Å），表明 As8-O9 键为典型的共价键。与原来的 As_4S_4（Ⅰ）（见图 1）相比，复合物中的 S3-As8 键明显变长，在 B3LYP/6-31 ＋ G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 理论水平下分别为 2.948、2.983 Å，该键长处于 As、S 原子共价半径之和（2.24 Å）与范德华半径之和（3.85 Å）之间，意味着 S3 原子与 As8 原子之间以弱相互作用相连。此外，在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 ＋ G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，H10 原子与 S6 原子之间的距离分别为 2.782、2.796、2.882 Å，这个距离略大于水分子的氢键键长（2.76 Å）[35]，说明 H10 原子和 S6 原子之间可能形成了弱氢键。在 HF/STO-3G、B3LYP/6-31 ＋ G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$复合物Ⅱ比 $[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$复合物Ⅰ的能量高，是 11 种 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$复合物中第二稳定的 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$复合物。

如图 3 所示，$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$复合物Ⅲ是由 As_4S_4（Ⅱ）的 As7 原子与 OH^-作用形成的复合物，具有 C_s 对称性，其对称面为 H10、O9、As7、S4、As6 和 S1 原子共同所在的平面。在 B3LYP/6-31 ＋ G* 和 B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，S4-As7 键键长分别为 2.862、2.910 Å，比在 As_4S_4（Ⅱ）中明显伸长。

$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$复合物Ⅳ与复合物Ⅵ、Ⅷ

均是由 As_4S_4（Ⅱ）的 As6 原子与 OH^- 作用形成的复合物，三者互为构象异构体。[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅳ和复合物Ⅶ均以 H10、O9、As6、S4、As7 和 S1 原子所在的平面为对称平面，具有 C_s 对称性。复合物Ⅵ的 OH^- 是在 As_4S_4（Ⅱ）分子的侧边与 As 原子相互作用，具有 C_1 对称性。

如图 3 所示，[As_4S_4（Ⅰ）-OH]$^-$ 复合物Ⅴ、Ⅷ与复合物Ⅱ均是 OH^- 中的 O9 原子与 As_4S_4（Ⅰ）中的 As8 原子作用所形成的复合物，这三种复合物互为构象异构体。如表 4 所示，[As_4S_4（Ⅰ）-OH]$^-$ 复合物Ⅴ、Ⅷ与复合物Ⅱ的热力学能量相差不大，均在 60 kJ • mol^{-1} 以内。

[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅸ至Ⅺ均是由 As_4S_4（Ⅱ）的 S 原子与 OH^- 离子作用形成的离子复合物，具有 C_1 对称性。与 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物Ⅰ至Ⅷ相比，[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅸ至Ⅺ的能量明显较高，表明其热力学稳定性很差。在 B3LYP/6-31 ＋ G*、B3LYP/6-311 ＋ G* 水平下，[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅸ的能量比 [As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅰ分别高 176.46、165.72 kJ • mol^{-1}；[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅹ的能量比 [As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅰ分别高 208.31、188.22 kJ • mol^{-1}；[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅺ的能量比 [As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅰ分别高 220.36、193.79 kJ • mol^{-1}。

以上 OH^- 与 As_4S_4 相互作用所得的 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物Ⅰ至Ⅷ都是 OH^- 与 As_4S_4 中的 As 原子作用而形成的。只有 [As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅸ至Ⅺ是通过 OH^- 与 As_4S_4 中的 S 原子相互作用形成的。但所形成的 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物中Ⅸ至Ⅺ能量较高，较不稳定。结果表明 OH^- 易与 As_4S_4 中的 As 原子作用而不易与 As_4S_4 中的 S 原子作用。这可能是由于 As 元素的电负性比 S 元素小，As 原子更容易失电子与 OH^- 结合所致。

如图 3 所示，As_4S_4 两种异构体与 OH^- 相互作用后，最大的变化是 As-As 键或 As-S 键的键长增大了，导致 As_4S_4 两种异构体的分子对称性降低。例如，[As_4S_4-OH]$^-$ 复合物Ⅰ至Ⅳ、Ⅶ、Ⅸ，当 As_4S_4 两种异构体与 OH^- 相互作用后，作用位点的 As-S 键的键长明显增大。再如，[As_4S_4-OH]$^-$ 复合物Ⅴ、Ⅵ、Ⅷ，当 As_4S_4 两种异构体与 OH^- 相互作用后，作用位点的 As-As 键的键长明显增大。这可能导致 As_4S_4 在碱性介质中与 OH^- 作用后分解成较小分子量的砷形态，从而使得大分子量溶解度小的形态砷转化成分子量小溶解度大的形态砷，进而被人体吸收入血。

2.3 HOMO-LUMO 能隙与稳定性

前线分子轨道理论（frontier molecular orbitals，FMOs）是解释分子化学稳定性的优秀理论之一[36-37]。HOMO 和 LUMO 之间的轨道能级差称为 HOMO-LUMO 能隙，HOMO-LUMO 能隙可以反映分子的稳定性。HOMO-LUMO 能隙越大，分子越稳定[38]。

本课题组前期在 B3LYP/6-31G* 理论水平上研究了 As_4S_4（Ⅰ）和 As_4S_4（Ⅱ）的前线分子轨道能级。其中，As_4S_4（Ⅰ）的 HOMO-LUMO 能隙为 4.37 eV，As_4S_4（Ⅱ）的 HOMO-LUMO 能隙为 4.18 eV，表明 As_4S_4 两种异构体均具有较好的热力学稳定性[5]。本研究在 B3LYP/6-31G* 理论水平上研究了 [As_4S_4-H]$^+$ 复合物的前线轨道能级（如表 5 所示），10 种 [As_4S_4-H]$^+$ 复合物的 HOMO-LUMO 能隙分别为 3.88、3.67、3.70、3.95、3.86、3.93、4.00、4.05、3.85、3.94 eV。本研究在 B3LYP/6-31 ＋ G* 理论水平下研究了 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物的前线轨道能级（如表 5 所示），11 种 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物的 HOMO-LUMO 能隙分别为 3.38、3.72、3.42、3.65、3.06、3.10、3.67、3.04、2.70、2.92、2.76 eV。与 As_4S_4 比较发现，[As_4S_4-H]$^+$ 复合物和 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物的 HOMO-LUMO 能隙值均比两种 As_4S_4 异构体的 HOMO-LUMO 能隙值小，表明 [As_4S_4-H]$^+$ 复合物和 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物的稳定性不如两种 As_4S_4 异构体。可见对 As_4S_4 分子来说，与 H^+、OH^- 作用后可降低其化学稳定性，从而更容易分解成较小分子量的砷形态。

表 5 [As_4S_4-H]$^+$ 和 [As_4S_4-OH]$^-$ 复合物分别在 B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-31 ＋ G* 理论水平下的前线轨道能级

Tab 5 Frontier orbital energy level of [As_4S_4-H]$^+$ and [As_4S_4-OH]$^-$ complexes at the B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-31 ＋ G* levels of theory，respectively

复合物	HOMO/eV	LUMO/eV	HOMO-LUMO 能隙 /eV
[As_4S_4（Ⅰ）-H]$^+$ 复合物Ⅰ	－ 11.06	－ 7.18	3.88
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅱ	－ 10.97	－ 7.30	3.67
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅲ	－ 11.03	－ 7.33	3.70
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅳ	－ 11.03	－ 7.08	3.95
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅴ	－ 11.03	－ 7.17	3.86
[As_4S_4（Ⅰ）-H]$^+$ 复合物Ⅵ	－ 11.17	－ 7.24	3.93
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅶ	－ 11.12	－ 7.12	4.00
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅷ	－ 11.27	－ 7.22	4.05
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅸ	－ 11.18	－ 7.33	3.85
[As_4S_4（Ⅱ）-H]$^+$ 复合物Ⅹ	－ 11.02	－ 7.08	3.94
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅰ	－ 2.00	1.38	3.38
[As_4S_4（Ⅰ）-OH]$^-$ 复合物Ⅱ	－ 2.28	1.44	3.72
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅲ	－ 2.22	1.20	3.42
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅳ	－ 2.49	1.16	3.65
[As_4S_4（Ⅰ）-OH]$^-$ 复合物Ⅴ	－ 1.50	1.56	3.06
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅵ	－ 1.67	1.43	3.10
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅶ	－ 2.33	1.34	3.67
[As_4S_4（Ⅰ）-OH]$^-$ 复合物Ⅷ	－ 1.44	1.60	3.04
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅸ	－ 1.46	1.24	2.70
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅹ	－ 1.85	1.07	2.92
[As_4S_4（Ⅱ）-OH]$^-$ 复合物Ⅺ	－ 1.44	1.32	2.76

2.4　雄黄 As_4S_4 与 H^+、OH^- 的结合能分析

通常情况下，结合能的大小代表了离子与单体相互作用的强度。由表 6 和 7 可知，$[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物的结合能均值为 − 806.58 kJ • mol^{-1}，而 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物的结合能均值为 − 257.62 kJ • mol^{-1}，显然，OH^- 与 As_4S_4 的结合能小于 H^+ 与 As_4S_4 的结合能。这可能是由于 As 原子上的孤对电子和 OH^- 的孤对电子之间存在排斥作用，而 H^+ 没有电子却有空轨道，不论是 As 原子还是 S 原子都比较容易与 H^+ 形成配位键。

表 6　在 B3LYP/6-31G* 理论水平下 H^+ 与 As_4S_4 相互作用的结合能

Tab 6　Binding energies of $[As_4S_4\text{-}H]^+$ complexes at the B3LYP/6-31G* level of theory

复合物	E/a.u.	ZPE/（kJ • mol^{-1}）	H^+ 结合能 /（kJ • mol^{-1}）
H^+	0.00	0.00	
isomer1	− 10 528.052 90	29.22	
isomer2	− 10 528.041 72	28.41	
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ（C_1）	− 10 528.361 59	51.83	− 810.47
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ（C_s）	− 10 528.357 40	50.43	− 828.82
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅲ（C_s）	− 10 528.354 99	50.39	− 822.49
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅳ（C_1）	− 10 528.355 04	51.10	− 822.62
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅴ（C_1）	− 10 528.351 53	50.47	− 813.41
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅵ（C_s）	− 10 528.356 71	49.82	− 797.65
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅶ（C_1）	− 10 528.342 53	50.30	− 789.78
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅷ（C_1）	− 10 528.348 65	49.99	− 805.84
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅸ（C_s）	− 10 528.341 81	48.75	− 787.89
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅹ（C_s）	− 10 528.341 42	50.26	− 786.86

表 7　在 B3LYP/6-31 ＋ G* 理论水平下 OH^- 与 As_4S_4 相互作用的结合能

Tab 7　Binding energies of $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ complexes at the B3LYP/6-31 ＋ G* level of theory

复合物	E/a.u.	ZPE/（kJ • mol^{-1}）	OH^- 结合能 /（kJ • mol^{-1}）
OH^-	− 75.796 68	21.87	
isomer1	− 10 528.109 91	28.57	
isomer2	− 10 528.102 37	27.95	
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅰ（C_1）	− 10 604.030 26	61.47	− 344.49
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅱ（C_1）	− 10 604.028 74	61.61	− 320.70
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅲ（C_s）	− 10 604.015 57	60.35	− 305.92
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅳ（C_s）	− 10 604.014 74	60.65	− 303.74
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅴ（C_s）	− 10 604.013 11	60.88	− 279.67
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅵ（C_1）	− 10 604.010 45	60.61	− 292.48
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅶ（C_s）	− 10 604.010 32	58.91	− 292.14
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅷ（C_s）	− 10 604.008 03	60.49	− 266.33
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅸ（C_1）	− 10 603.963 05	62.93	− 168.03
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅹ（C_1）	− 10 603.950 92	61.20	− 136.18
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅺ（C_1）	− 10 603.946 33	61.46	− 124.13

复合物的稳定性还可以通过形成复合物的化学键的键级来衡量。形成复合物的化学键的键级越大，复合物越稳定。从 WBI 键级和 NAOBI 键级来看（如表 8 所示），在 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物中，形成复合物的化学键的键级较大，预示着 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 复合物比 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物更稳定。基于上述分析，理论上 As_4S_4 会优先与 H^+ 形成复合物，这预示雄黄在胃酸性环境中可能更容易溶出。但是，由于在 H^+、OH^- 与 As_4S_4 所形成的所有复合物中，形成复合物的化学键的键级均小于 1，说明所形成的复合物的稳定性均较差。

表 8　$[As_4S_4\text{-}H]^+$ 和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物分别在 B3LYP/6-31G* 和 B3LYP/6-31 ＋ G* 理论水平下的配位键键级

Tab 8　Bond orders of coordination bond in $[As_4S_4\text{-}H]^+$ and $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ complexes at the B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-31 ＋ G* levels of theory，respectively

配位键	WBI	NAOBI
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅰ（S3-H9）	0.9194	0.6622
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅱ（S1-H9）	0.9340	0.6622
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅲ（S1-H9）	0.9397	0.6711
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅳ（S2-H9）	0.9279	0.6631
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅴ（S2-H9）	0.9334	0.6671
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅵ（As8-H9）	0.8795	0.7104
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅶ（S4-H9）	0.9220	0.6618
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅷ（As8-H9）	0.8669	0.7100
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅸ（As6-H9）	0.8954	0.7138
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}H]^+$ 复合物Ⅹ（As7-H9）	0.8674	0.7167
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅰ（As8-O9）	0.6790	0.5088
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅱ（As8-O9）	0.6075	0.4478
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅲ（As7-O9）	0.6179	0.4539
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅳ（As6-O9）	0.5820	0.4267
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅴ（As8-O9）	0.5906	0.4388
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅵ（As6-O9）	0.5638	0.4187
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅶ（As6-O9）	0.5350	0.3652
$[As_4S_4$（Ⅰ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅷ（As8-O9）	0.5707	0.4061
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅸ（S1-O9）	0.9063	0.5666
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅹ（S4-O9）	0.9040	0.5641
$[As_4S_4$（Ⅱ）$\text{-}OH]^-$ 复合物Ⅺ（S2-O9）	0.7946	0.4937

3　总结与讨论

本研究应用量子化学计算方法研究了 As_4S_4 在酸性、碱性介质中可能形成的复合物的结构和热力学稳定性。计算结果表明，As_4S_4 分子分别与 H^+、OH^- 形成 1∶1 配比的 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物。前线轨道能级和键级分析表明，$[As_4S_4\text{-}H]^+$ 和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物的稳定性较差，推测 As_4S_4 在酸性、碱性介质中可能形成的复合物只作为短寿命的分子离子存在，可能是雄黄在酸性、碱性介质中的活性中间体，为今后雄黄药效及毒性的研究提供了一定的理论基础。

一方面，由于 As_4S_4 中硫离子的半径较大、变形性较强，且砷离子的（18 ＋ 2）电子构型使其具有较强的极化能力，致使 As_4S_4 中硫离子与砷离子之间具有较大的“极化效应”，进而导致 As_4S_4 更接近于共价化合物，也导致 As_4S_4 的水

溶性较差、很难以原形被吸收入血，这也是目前学界对于“雄黄的主要成分 As_4S_4 是否是其药效物质”一直存有争议[20]的主要原因之一。本研究通过量子化学计算预测了 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物的存在，从理论上证明 As_4S_4 可以与 H^+、OH^- 作用而形成极性较大的复合物砷形态，以此降低 As_4S_4 的共价性、增强其离子性，进而增大复合物砷形态的水溶性以及被吸收入血的可能性。这也从某种程度上预示 As_4S_4 可能是雄黄的前体药物，真正的药效物质可能是 As_4S_4 进入体内后代谢转化产生的砷代谢中间体。

另一方面，雄黄的毒性与其形态和价态密切相关。一般来说，AsH_3 的毒性大于 As（Ⅲ）大于 As（Ⅴ）[23]。雄黄的毒性主要来自其中含有的少量的 As_2O_3 以及可溶性的亚砷酸盐 As（Ⅲ）和砷酸盐 As（Ⅴ）[39-43]，而不溶性的 As_4S_4 的毒性则较小[44-45]。雄黄中的可溶性 As_2O_3 或 As（Ⅲ）和难溶性的 As_4S_4 进入体内后，都可进行形态或价态的转化[46]。一般认为，无机砷在体内经过氧化甲基化过程（主要发生在肝脏中）和还原过程（主要在血液中进行），从而产生多种甲基化砷的代谢产物[47]。由于 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物来自毒性较小的 As_4S_4，且 $[As_4S_4\text{-}H]^+$ 和 $[As_4S_4\text{-}OH]^-$ 复合物不稳定，很有可能分解后产生分子量较小且具有不同价态的砷形态。因此，未来有必要探究 As_4S_4 在酸性、碱性介质中所形成的复合物的分解反应，以确定分解反应后所形成的小分子砷形态及其价态，这将有助于阐明雄黄的药效及毒性成分。

一般地，雄黄主要通过口服给药并在胃、肠道中代谢吸收。本研究仅讨论了 As_4S_4 与 H^+、OH^- 作用而形成的复合物，仅对胃、肠道中的 H^+ 或 OH^- 对雄黄的代谢影响进行模拟。但是，胃、肠道中除了 H^+、OH^- 之外，肠道菌群对雄黄的形态或价态的转化与吸收同样具有潜在影响。由于肠道菌群中含有谷胱甘肽（GSH），GSH 可能与三价砷 As（Ⅲ）、一甲基砷酸 MMA（Ⅴ）、二甲基砷酸 DMA（Ⅴ）反应形成砷 - 谷胱甘肽复合物[48-52]，因此 GSH 也可能与 As_4S_4 结合，从而影响雄黄的砷形态或价态的转化与吸收。此外，肠道菌群中还含有与砷代谢相关的基因，也可能会影响雄黄的砷形态或价态的转化与吸收[53]。因此，未来有必要进一步探究肠道菌群对于雄黄转化与吸收的影响。

一直以来，由于雄黄的水溶性低、胃肠道吸收差、生物利用度低等缺点，限制了雄黄在临床上的应用。而且，由于雄黄中砷含量高且毒性大，导致雄黄药用的科学性和安全性备受质疑。因此，研发分子量较小、毒性较低、溶解性较大、生物利用度较高的雄黄代谢中间产物是克服雄黄药用中存在的砷含量高、溶解度小、毒性强等问题的有效途径之一。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：350-351.

[2] 曹帅，夏晶，杨新华，等 . 雄黄炮制前后 X 射线衍射分析研究 [J]. 中成药，2012，34（6）：1136-1139.

[3] 关君，王耘，铁步荣，等 . 雄黄主要成分的考证 [J]. 北京中医药大学学报，2010，33（9）：623-627.

[4] 韩墨，盛振华，钟晓明 . 矿石类中药雄黄和雌黄 XRD 指纹图谱分析 [J]. 浙江中医药大学学报，2010，34（2）：271-273.

[5] Song LL，Han DY，Yao N，et al. Investigation on structure and bonding of As_4S_4 isomers [J]. Chin J Struct Chem，2020，39（9）：1585-1593.

[6] 田金改，吕扬，周俊国，等 . 矿物药雄黄及其伴生矿物的 X- 衍射图谱分析研究 [J]. 药物分析杂志，1998，18（2）：86-89.

[7] 张志杰，周群，尉京志，等 . 我国药用雄黄的晶体结构鉴定 [J]. 光谱学与光谱分析，2011，31（2）：291-296.

[8] Bonazzi P，Menchetti S，Pratesi G. The crystal structure of pararealgar，As_4S_4 [J]. Am Mineral，1995，80（3-4）：400-403.

[9] Buerger MJ. The unit cell and space group of realgar [J]. Am Mineral，1935，20（1）：36-43.

[10] Kutoglu A. Darstellung und kristallstruktur einer neuen isomeren form von As_4S_4 [J]. Z Anorg Allg Chem，1976，419：176-184.

[11] Lu CS，Donohue J. An electron diffraction investigation of sulfur nitride，arsenic disulfide（realgar），arsenic trisulfide（orpiment）and sulfur [J]. J Am Chem Soc，1944，66（5）：818-827.

[12] Porter EJ，Sheldrick GM. Crystal structure of a new crystalline modification of tetra-arsenic tetrasulphide（2，4，6，8-tetrathia-1，3，5，7-tetra-arsatricyclo [3，3，0，$0^{3,7}$]-octane）[J]. J Chem Soc Dalton，1972，13（13）：1347-1349.

[13] Roland GW. Concerning the α-AsS realgar inversion [J]. Can Mineral，1972，11（2）：520-525.

[14] 宋玲玲，韩冬月，姚妮，等 . 应用量子化学研究雄黄分解产物 As_2S_2 的结构与能量 [J]. 中南药学，2020，18（3）：453-457.

[15] 阿拉探巴干 . 雄黄的炮制与研究进展 [J]. 中国民族医药杂志，2012，18（9）：68-70.

[16] 白明，贾亚泉，杨克伟，等 . 雄黄临床外用举隅及药理作用 [J]. 中国当代医药，2011，18（16）：8-9.

[17] 伏旭，李培武，尹稳 . 雄黄抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报，2016，33（11）：914-920.

[18] 汪俊杰，胡琦 . 雄黄在恶性血液病中的临床应用及机制探讨 [J]. 中医药导报，2017，23（15）：82-85.

[19] Lu DP，Qiu JY，Jiang B，et al. Tetra-arsenic tetra-sulfide

for the treatment of acute promyelocytic leukemia：a pilot report [J]. Blood，2002，99（9）：3136-3143.
[20] 宋玲玲，韩冬月，林瑞超，等 . 矿物药雄黄的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2019，44（3）：433-440.
[21] 马世昌 . 化学物质辞典 [M]. 西安：陕西科学技术出版社，1999：264-264.
[22] 赵忠杰 . 矿物药分析 [M]. 北京：人民卫生出版社，1991：51-53.
[23] 刘晶，孙铭忆，吴慧敏，等 . 砷元素形态价态的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2023，48（9）：2396-2405.
[24] 姜泓，张颖花，丁敬华，等 . HPLC-HG-AFS 法测定雄黄中 As（Ⅲ）的含量 [J]. 化学研究，2008，19（4）：67-69.
[25] 李珺，袁倬斌，韩树波，等 . 安宫牛黄丸中汞、砷的存在形式及其吸收与排泄 [J]. 首都医科大学学报，2006，27（5）：647-651.
[26] 李丽敏，夏晶，王欣美，等 . HPLC-ICP-MS 法研究 5 种含雄黄中成药的可溶性砷及其形态 [J]. 中成药，2012，34（11）：2118-2123.
[27] 刘敏敏，司徒咏文，陈俏 . 雄黄及制剂中砷含量测定与形态分析 [J]. 药物分析杂志，2019，39（12）：2199-2205.
[28] 汤毅珊，王宁生 . 雄黄及含雄黄复方中砷含量、形态和晶形分析 [J]. 现代食品与药品杂志，2007，17（2）：30-34.
[29] 张建平 . 几种中成药中砷的含量和形态分析及其体外生物可利用度研究 [D]. 厦门：厦门大学，2008.
[30] 郑怡，徐苑苑，王惠惠，等 . 国产中成药中雄黄应用及其溶出量的研究 [J]. 环境与健康杂志，2009，26（12）：1064-1066.
[31] 朱千赜 . 青黄散为主治疗骨髓增生异常综合征患者体内砷的吸收代谢分析 [D]. 北京：中国中医科学院，2019.
[32] Frisch MJ，Trucks GW，Schlegel HB，et al. Gaussian 09（Revis. D. 1）[CP]. Gaussian，Inc.，Wallingford，CT，2009.
[33] Carpenter JE，Weinhold F. Analysis of the geometry of the hydroxymethyl radical by the “different hybrids for different spins” natural bond orbital procedure [J]. J Mol Struct：Theochem，1988，169（4）：41-62.
[34] Reed AE，Curtiss LA，Weinhold F. Intermolecular interactions from a natural bond orbital，donor-acceptor viewpoint [J]. Chem Rev，1988，88（6）：899-926.
[35] 李梅，韩莉 . 普通化学 [M]. 上海：上海交通大学出版社，2015：126-127.
[36] 陈尔廷，唐立中 . 八一年诺贝尔化学奖获得者福井谦一及其理论 [J]. 化学通报，1982（5）：36-42.
[37] Gunasekaran S，Balaji RA，Kumeresan S，et al. Experimental and theoretical investigations of spectroscopic properties of *N*-acetyl-5-methoxytryptamine [J]. Can J Anal Sci Spectrosc，2008，53（4）：149-162.
[38] Pearson RG. Absolute electronegativity and hardness：applications to organic chemistry [J]. J Org Chem，1989，54（6）：1423-1430.
[39] 张伟，余伯阳，寇俊萍，等 . 雄黄活性物质的毒效相关性初步研究 [J]. 中国天然药物，2004，2（2）：123-125.
[40] 范麒如，寇俊萍，张伟，等 . 天然雄黄与精制雄黄对小鼠肝脏损伤的初步研究 [J]. 中国天然药物，2007，5（1）：63-67.
[41] 张娟，刘启德，汤毅珊 . 雄黄中砷的毒副作用研究进展 [J]. 中国药房，2007，18（15）：1178-1179.
[42] 顾晶晶，黄珍祯，谷颖敏，等 . 雄黄可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性关系的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（8）：230-233.
[43] 王曦，夏晶，曹帅，等 . 小儿化毒胶囊中雄黄药效和毒性成分的测定 [J]. 中成药，2017，39（5）：971-975.
[44] 秦效英，江滨，李国选，等 . 长期口服四硫化四砷对急性早幼粒细胞白血病患者肝脏慢性毒性的观察 [J]. 中华血液学杂志，2006，27（4）：259-263.
[45] 田婧卓，张宇实，易艳，等 . 论雄黄的安全性以及对其监管的建议 [J]. 中国食品药品监管，2021（1）：58-66.
[46] 高双荣，梁爱华，易艳，等 . 雄黄中砷的不同形态及其毒性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（24）：243-247.
[47] 陈杨，王楚茵，姚妮，等 . 雄黄的形态砷与价态砷在体内的转化和蓄积 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1359-1366.
[48] Kato K，Yamanaka K，Hasegawa A，et al. Active arsenic species produced by GSH-dependent reduction of dimethylarsinic acid cause micronuclei formation in peripheral reticulocytes of mice [J]. Mutat Res-Gen Tox En，2003，539（1-2）：55-63.
[49] Yamanaka K，Mizoi M，Tachikawa M，et al. Oxidative DNA damage following exposure to dimethylarsinous iodide：the formation of cis-thymine glycol [J]. Toxicol Lett，2003，143（2）：145-153.
[50] Hayakawa T，Kobayashi Y，Cui X，et al. A new metabolic pathway of arsenite：arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19 [J]. Arch Toxicol，2005，79（4）：183-191.
[51] 赵凤 . 砷 - 谷胱甘肽复合物的降解及含砷化合物对谷胱甘肽清除自由基的影响 [D]. 天津：天津大学，2012.
[52] 罗世林 . 雄黄在肠道菌群内的砷形态分析及砷代谢初步研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.
[53] Chi L，Xue JC，Tu PC，et al. Gut microbiome disruption altered the biotransformation and liver toxicity of arsenic in mice [J]. Arch Toxicol，2019，93（1）：25-35.

（收稿日期：2023-11-24；修回日期：2023-12-24）

负载雷公藤红素的中空介孔聚多巴胺纳米复合物的制备及体外抗肿瘤活性研究

潘慕倩，蔡义思，袁立霞，余林中*（南方医科大学中医药学院，广州　510515）

摘要：目的　制备负载雷公藤红素的中空介孔聚多巴胺纳米复合物（H-PDA/Cel@HA），并考察其体外抗肿瘤活性研究。**方法**　采用湿化学刻蚀法制备 H-PDA/Cel@HA，通过粒径、Zeta 电位、透射电镜、紫外吸收光谱等方法对其进行表征，并从细胞毒性、细胞活性氧水平测定、活 / 死细胞染色实验、细胞凋亡等方面评价 H-PDA/Cel@HA 对乳腺癌 4T1 细胞的抗肿瘤活性。**结果**　所制备的 H-PDA/Cel@HA 呈现出中空立方体的形貌，平均粒径为（183.4±12.3）nm，Zeta 电位为（－ 30.4±1.1）mV；载药量为（13.25±1.16）%，包封率为（66.27±5.78）%；H-PDA/Cel@HA 显著抑制乳腺癌 4T1 细胞的生长，相较于游离的 Cel，其对正常细胞（L929）具有更好的生物相容性。此外，H-PDA/Cel@HA 还通过增加 4T1 细胞内的活性氧水平，诱导细胞凋亡。**结论**　所制备的 H-PDA/Cel@HA 具有良好的生物相容性和肿瘤靶向递送能力，可有效抑制肿瘤细胞的生长。

关键词：雷公藤红素；中空聚多巴胺；活性氧；细胞凋亡

中图分类号：R283，R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1119-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.002

Preparation of celastrol-loaded hollow mesoporous polydopamine nanocomposite and its in vitro antitumor activity

PAN Mu-qian, CAI Yi-si, YUAN Li-xia, YU Lin-zhong* (*School of Traditional Chinese Medicine*, *Southern Medical University*, *Guangzhou* 510515)

Abstract: Objective　To prepare hollow mesoporous polydopamine nanocomposites loaded with celastrol (H-PDA/Cel@HA) and investigate in vitro antitumor activity. **Methods**　The were synthesized via a wet chemical etching method. The nanocomposites were characterized using techniques such as particle size analysis, Zeta potential measurement, transmission electron microscopy, and ultraviolet absorption spectroscopy. The antitumor activity of H-PDA/Cel@HA against breast cancer 4T1 cells was assessed through cytotoxicity assays, evaluation of cellular reactive oxygen species (ROS) levels, live/dead cell staining experiments, and apoptosis analysis. **Results**　The H-PDA/Cel@HA exhibited a hollow cubic morphology, with an average particle size of (183.4±12.3) nm. The Zeta potential values of H-PDA/Cel@HA was (－ 30.4±1.1) mV. The drug loading rate was (13.25±1.16)%, with an encapsulation rate of (66.27±5.78)%. H-PDA/Cel@HA demonstrated significant inhibition of breast cancer 4T1 cell growth and exhibits better biocompatibility with normal cells (L929) compared to free Cel. Moreover, H-PDA/Cel@HA increased the ROS levels in 4T1 cells and induced apoptosis. **Conclusion**　H-PDA/Cel@HA exhibit promising biocompatibility, exhibit promising biocompatibility, tumor-targeted delivery ability, and can effectively inhibit the growth of tumor cells, and can effectively inhibit the growth of tumor cells.

Key words: celastrol; hollow polydopamine; reactive oxygen species; cell apoptosis

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82274400）；广东省自然科学基金项目（No.2022A1515011681）。

作者简介：潘慕倩，女，硕士研究生，主要从事纳米药物递送系统研究，email：panmuqian@163.com　*通信作者：余林中，男，教授，主要从事中药抗炎免疫药理研究，email：yulzh@smu.edu.cn

癌症治疗仍然是一项重大的全球卫生挑战，其发病率每年呈持续增长趋势，对全球公共卫生构成严重威胁。其中，乳腺癌是全球女性最常见的癌症类型，也是导致女性癌症死亡的主要原因[1-2]。卫矛科植物雷公藤所含的活性成分雷公藤红素（celastrol，Cel）具有显著的抗肿瘤作用，可以提高活性氧（ROS）水平并引发线粒体功能障碍、诱导细胞凋亡以及抑制肿瘤转移[3-4]。

然而，在生物制药分类系统中，Cel 属于Ⅱ类药物，存在水溶性差、生物利用度低且器官毒性大等问题，严重限制了其临床应用[5-6]。目前，对 Cel 制剂的研究主要集中在纳米制剂、脂质体、缓释制剂以及化学修饰方法等方面。其中，针对 Cel 的抗肿瘤纳米递送系统具备靶向性、缓释性以及协同效应等优点，有望有效提高其抗肿瘤效果[7-8]。Liu 等[9]通过反溶剂法将 Cel 自组装成纳米粒子，有效地杀伤 MCF-7 细胞。但由于缺乏肿瘤靶向递送能力，仅能低剂量局部注射以实现肿瘤部位的聚集，从而减少全身毒性。Wang 等[10]设计了一种靶向化疗光疗纳米平台（HCR NP），以解决 Cel 的水溶性问题，并增强主动靶向性。然而，载药率相对较低，仅为 6.3%。新型纳米载体可改善 Cel 生物利用度、治疗窗窄、半衰期短等局限性，有望成为将 Cel 有效地用于癌症治疗的递送载体，实现有效的抗肿瘤治疗策略。

聚多巴胺（PDA）是一种具有多种功能的高分子材料，在药物传递领域具有显著的优势。由于其具有优异的生物相容性、生物降解性、金属离子螯合特性，已经成为理想的药物载体材料[11-12]。传统的实心或介孔结构的 PDA 纳米颗粒在药物负载方面存在局限性，其内部空间结构不足，载药量有限。此外，在复杂的肿瘤微环境中，纳米颗粒表面负载的药物容易发生突释或分离，减少了实际达到肿瘤部位的药物量，对其他器官产生毒副作用[13-14]。而中空介孔结构的聚多巴胺纳米颗粒因具有较大的内部空腔，可以显著提高药物的负载能力。通过表面修饰，还可以实现靶向递送和减少药物突释分离，从而提高药物的疗效并减少副作用[15-17]。本研究采用湿化学刻蚀法制备了一种负载 Cel 的中空介孔的聚多巴胺纳米复合物（H-PDA/Cel@HA），并考察其体外抗肿瘤活性，报道如下。

1 仪器与试药

Perkin Elmer Lambda 紫外可见分光光谱仪（美国珀金埃尔默公司）；Zeta sizer Nano ZS 纳米粒度及电位分析仪（英国马尔文仪器公司 Malvern）；Nexsa 透射电子显微镜（美国 FEI 公司）；TiS60 ＋热成像仪（美国 FLUKE 公司）；Axio Observer A1 荧光显微镜、LSM 880 倒置激光共聚焦显微镜（德国卡尔蔡司公司）；FV3000 激光扫描共聚焦显微镜（日本奥林巴斯公司）；InfiniteM1000 Pro 多功能微孔板检测仪（瑞士 Tecan 公司）；BD FACS Caliber 流式细胞仪（美国 San Jose 公司）。

铁氰化钾（$K_3[Fe(CN)_6]$）、透明质酸（HA）、聚醚 F127、乙醇、丙酮（上海麦克林生化科技股份有限公司）；聚乙烯基吡咯烷酮（PVP，M_w ＝ 40 000）、3，3'，5，5'-四甲基联苯胺（TMB）、柠檬酸钠、盐酸多巴胺、雷公藤红素（上海阿拉丁生化科技有限公司）；4'，6-二脒基 -2- 苯基吲哚（DAPI）（上海德百生物科技有限公司）；2，7-二氯二氢荧光素二乙酸（DCFH-DA）（深圳益百顺科技有限公司）；膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒、RMPI 1640 基础培养基（上海碧云天生物技术有限公司）；磷酸盐缓冲液（PBS）、胎牛血清（FBS）、双抗（链霉素 / 青霉素溶液）（武汉普瑞赛尔生命科技有限公司）。

2 方法

2.1 H-PDA 的制备

参考文献报道的方法制备普鲁士蓝（PB）纳米颗粒[18]。精密称取 115 mg 的聚醚 F127 分散在装有 9 mL 去离子水和 6 mL 乙醇的 150 mL 锥形瓶中，加入 250 μL 的 TMB，室温下搅拌 30 min。精密称取 3 mg 合成的 PB（纳米颗粒）和 5 mg 的盐酸多巴胺加入反应溶液中。继续搅拌 3 h 后，通过离心收集黑色沉淀物，并分散在丙酮和乙醇的混合物中（V/V ＝ 1∶2）。超声处理 30 min 后，离心收集黑色沉淀物（CS-PB@PDA），分别使用去离子水和乙醇离心洗涤。

将 CS-PB@PDA（1 mg • mL^{-1}）分散在装有 10 mL 去离子水的 50 mL 锥形瓶中，超声处理 10 min 后，加入柠檬酸钠 1 mL（6 mg • mL^{-1}），并立即置于 80 ℃的油浴锅中，缓慢搅拌 12 h 后，离心收集中空介孔聚多巴胺纳米颗粒 H-PDA，并用去离子水离心洗涤。

2.2 H-PDA/Cel@HA 的制备

精密称取 5 mg 的 Cel 溶于 1 mL 的二甲基亚砜（DMSO）中，立即加入装有 H-PDA（1 mL，10 mg•mL^{-1}）的 10 mL 锥形瓶中，轻轻搅拌 1 h。然后精密称取 2 mg 的 HA 溶于 1 mL 的去离子水中，加入反应混合物中。继续搅拌过夜后，用去

离子水离心洗涤，得到 H-PDA/Cel@HA。

2.3 粒径、Zeta 电位及透射电镜分析

2.3.1 粒径 取 H-PDA/Cel@HA 溶液（1 mg•mL^{-1}）稀释 10 倍后加入 DLS 皿中，在纳米粒度电位仪的 Size 模式下测试其粒径分布（0 ～ 10 000 nm），对数据进行收集和分析。

2.3.2 Zeta 电位 取 H-PDA/Cel@HA 溶液（1 mg • mL^{-1}）稀释 10 倍后加入 Zeta 电位皿中，在纳米粒度电位仪的 Zeta Potential 模式下测试 Zeta 电位。

2.3.3 透射电镜 将制得的 PB、CS-PB@PDA、H-PDA/Cel@HA 溶液（1 mg • mL^{-1}）置于 1.5 mL 的 EP 管中，充分超声后，吸取 10 μL 溶液滴加在超薄铜网上。静置 30 min 后，用滤纸吸取残余液体，晾干，并通过透射电子显微镜（TEM）观察材料的大小和形貌特征。

2.4 载药量（LC）和包封率（EE）

通过紫外可见光吸收法（420 nm）测定 Cel 的载药量。首先测量不同浓度 Cel 溶液的紫外可见吸收光谱，建立 Cel 标准曲线，然后根据上清液的吸光度值测定药物的载药率和包封率。药物的载药率和包封率计算公式为：

LC（%）= Cel 载药量 /（H-PDA/Cel@HA 总量）×100%；

EE（%）= Cel 载药量 / 初始总药量 ×100%。

2.5 细胞内 ROS 水平分析

采用 DCFH-DA 探针对细胞内 ROS 水平进行分析。将 4T1 细胞以 2×10^5 个 / 孔的密度接种于 12 孔板中，培养 24 h。然后将 PBS、NIR、H-PDA/Cel@HA（100 μg • mL^{-1}）、H-PDA/Cel@HA ＋ NIR（100 μg • mL^{-1}）和不同浓度的 Cel（0.5、1 和 2 μg • mL^{-1}），与 4T1 细胞共同孵育。孵育 24 h 后，用 PBS 轻轻洗 1 次，加入 DCFH-DA（0.01 mmol • L^{-1}）37 ℃避光孵育 20 min 后，用激光共聚焦显微镜（Ex：488 nm）观察。

2.6 细胞毒性

采用 MTT 法对 Cel、H-PDA/Cel@HA 的细胞毒性进行评估。将细胞以 5×10^3 个 / 孔的密度接种于 96 孔板中培养 24 h 后，加入含有不同浓度样品的培养基，每个浓度设置 6 个复孔，继续孵育 24 h。轻轻吸弃旧培养基，加入 100 μL 含有 MTT（0.5 mg • mL^{-1}）的基础培养基。继续孵育 4 h 后，轻轻吸弃旧培养基，每孔加入 100 μL 的 DMSO。在摇床上振荡 10 min 后，使用 Infinite M1000 Pro 酶标仪（Tecan，瑞士）测量 490 nm 处的吸光度（A）。细胞存活率根据以下公式计算：

细胞存活率（%）＝[（A_s － A_b）/（A_c － A_b）]×100%

A_s：含有细胞、MTT 和待测样品溶液的吸光度；A_b：含有细胞、MTT，没有待测样品溶液的吸光度；A_c：不含有细胞，含 DMSO 和待测样品溶液的吸光度。

2.7 活 / 死细胞染色

采用 Calcein-AM 和 PI 试剂盒进行活 / 死细胞染色实验。将 4T1 细胞以 2×10^5 个 / 孔的密度接种于 12 孔板中培养 24 h 后，分别进行以下处理：PBS 和 H-PDA/Cel@HA（100 μg • mL^{-1}），继续孵育 24 h。在 37 ℃的避光条件下，用 Calcein-AM 和 PI 染色细胞 30 min 后，使用激光共聚焦显微镜拍摄荧光图像（绿色荧光表示活细胞，红色荧光表示死亡细胞）。活细胞的荧光染料为 Calcein-AM，使用 488 nm 波长激发；死细胞的荧光染料为 PI，使用 561 nm 波长激发。

2.8 细胞凋亡

采用流式细胞术对细胞凋亡进行检测。将 4T1 细胞以 2×10^5 个 / 孔的密度接种于 12 孔板中培养 24 h 后，分别进行以下处理：用流式细胞术对细胞凋亡类型进行检测。将 4T1 细胞以 2×10^5 个 / 孔的密度接种于 12 孔板中培养 24 h 后，再随机分为 PBS 组，H-PDA/Cel@HA 组（终质量浓度 100 μg • mL^{-1}），处理 24 h。胰蛋白酶消化后收集细胞，PBS 洗涤 1 次，用 Annexin-binding buffer（200 μL）重悬。用 FITC（2.5 μL）和 PI（2.5 μL）染色，避光孵育 2 min 后，使用流式细胞仪进行分析。

2.9 统计学方法

样本间的差异采用 SPSS 16.0 中的独立样本 Student’s t 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 透射电镜、粒径及 Zeta 电位分析

如图 1 所示，合成的 PB 纳米颗粒，其呈立方结构，平均粒径为（143.4±5.0）nm。在碱性条件下，盐酸多巴胺通过自聚合形成 PDA 薄膜后，观察到形成的 CS-PB@PDA 中 PB 的形态保持不变，仅尺寸增加到（190.3±9.5）nm。湿化学刻蚀法是一种使用化学溶液对材料进行刻蚀的制备工艺，本研究使用柠檬酸钠对 PB 纳米颗粒进行选择性刻蚀。固定柠檬酸钠的反应质量浓度为 60 mg•mL^{-1}，并将反应温度保持在 80 ℃，在反应 12 h 后，合成 H-PDA，其紫外可见吸收光谱如图 2A 所示。

H-PDA/Cel@HA 的透射电镜结果显示，在负载 Cel 并包裹 HA 后，纳米颗粒表面变得略微模糊，粒径约为（183.4±12.3）nm。由于刻蚀反应的温度较高，时间较长，刻蚀剂选择性地移除作

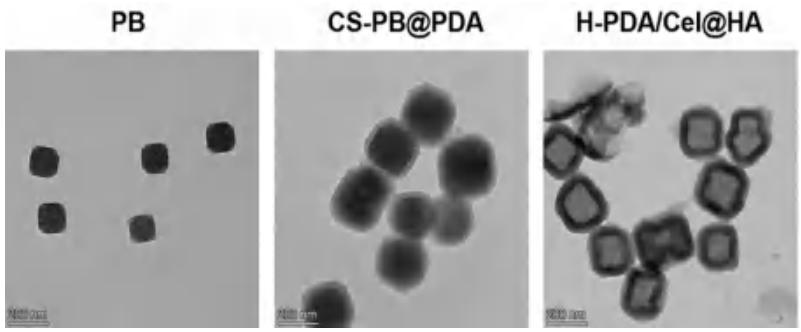

图 1 PB、CS-PB@PDA 和 H-PDA/Cel@HA 的透射电镜图

Fig 1 TEM images of PB，CS-PB@PDA and H-PDA/Cel@HA

为内核的 PB，导致中空结构凹陷，所以相较于核壳结构 CS-PB@PDA，其粒径稍微减小。采用动态光散射分析（DLS）进一步测定 H-PDA/Cel@HA 的平均水合粒径约为 228.42 nm，如图 2B 所示。由于 DLS 测量的是纳米粒子在溶液中的水力直径，水合层增加了粒子的表观直径，使得 DLS 测量的结果比实际电镜结果的粒径要大。进一步测 定 H-PDA、Cel 和 H-PDA/Cel@HA 的 Zeta 电位，结果分别为（－ 21.3±2.9)(－ 19.5±2.1）和（－ 30.4±1.1）mV，如图 2C 所示。

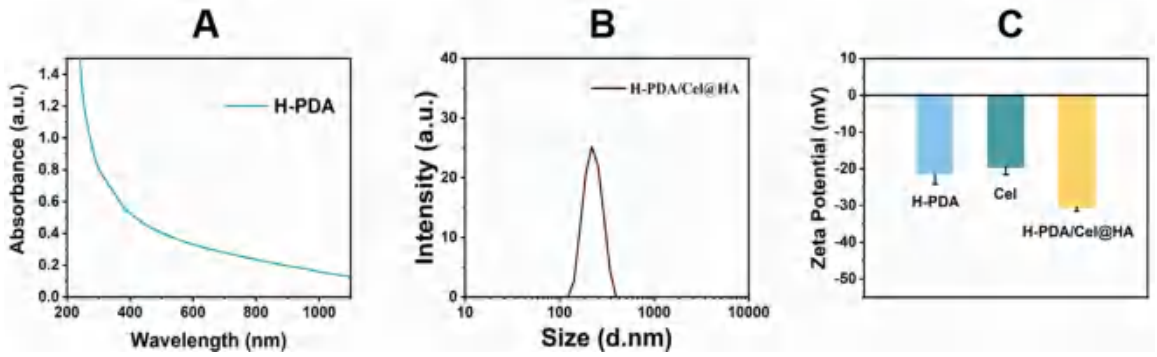

图 2 H-PDA 的紫外可见吸收光谱（A）、H-PDA/Cel@HA 的粒径分布（B）及 H-PDA、Cel 和 H-PDA/Cel@HA 的 Zeta 电位（C）图

Fig 2 UV-Vis absorption spectra of H-PDA（A），size distributions of H-PDA/Cel@HA（B），and Zeta potential of H-PDA，Cel，and H-PDA/Cel@HA（C）

3.2 载药率和包封率测定

根据 420 nm 处 Cel 的吸光度标准曲线，计算得 H-PDA/Cel@HA 的载药量为（13.25± 1.16）%，包封率为（66.27±5.78）%。

3.3 Cel 和 H-PDA/Cel@HA 对细胞内 ROS 水平的影响

绿色荧光表示 ROS 水平，随着 Cel 浓度的增加，荧光强度逐渐增强，如图 3 所示。且 Cel 的最大质量浓度仅为 2 μg • mL $^{-1}$，这证明 Cel 能显著提高细胞内的 ROS 水平。

H-PDA/Cel@HA 在细胞内产生的 ROS 用 DCFH-DA 探针检测。如图 4 所示，与 PBS 相比，H-PDA/Cel@HA 的 ROS 含量显著增加，证实了 H-PDA/Cel@HA 组释放的 Cel 可以提高细胞内 ROS 水平。在近红外光（808 nm，1.0 W • cm $^{-2}$）照射下的 H-PDA/Cel@HA 显示出最亮的荧光信号，表明近红外光照射进一步增强了 ROS 的水平。

3.4 体外细胞毒性

如图 5 所示，游离 Cel 对正常细胞（L929）具有明显的毒性，而 H-PDA/Cel@HA 即使质量浓度高达 100 μg • mL $^{-1}$（Cel 含量为 13.15 μg），细胞活力也仍保持在约 80%，说明 H-PDA/Cel@HA 具有良好的生物相容性。通过 MTT 实验对 H-PDA/Cel@HA 的抗肿瘤效果进行评估，结果如图 6 所示，在 H-PDA/Cel@HA 处理后观察到明显的细胞毒性，IC_{50} 值为 123.03 μg • mL $^{-1}$。例如，在 100 μg • mL $^{-1}$ H-PDA/Cel@HA 的浓度下（含有 13.15 μg • mL $^{-1}$ 的 Cel），4T1 细胞的存活率仅为 51.32%。这主要是因为 H-PDA/Cel@HA 具有靶向性，且在酸性肿瘤微环境下释放的 Cel 可以通过调节线粒体途径，提高细胞内 ROS 的水平，从而诱导细胞凋亡，有效地抑制肿瘤细胞的生长。

3.5 H-PDA/Cel@HA 的活 / 死细胞染色测定

如图 7 所示，PBS 组无明显细胞死亡，而在

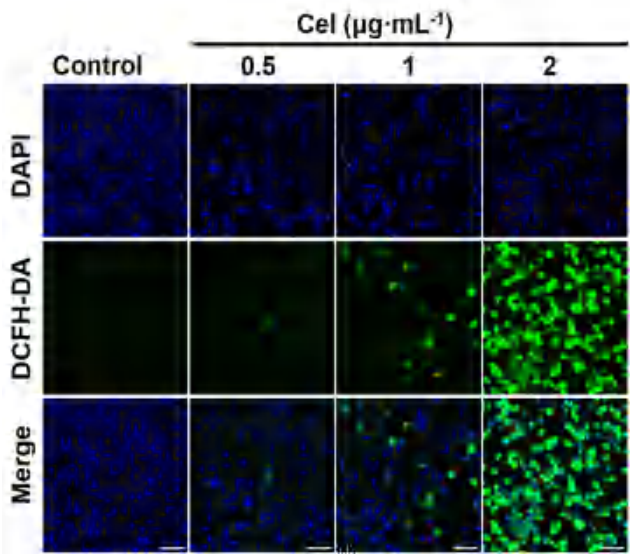

图 3　不同浓度 Cel 的 DCFH-DA 荧光图像（标尺：100 μm）

Fig 3　Fluorescence images of DCFH-DA with different Cel concentrations（scale bar：100 μm）

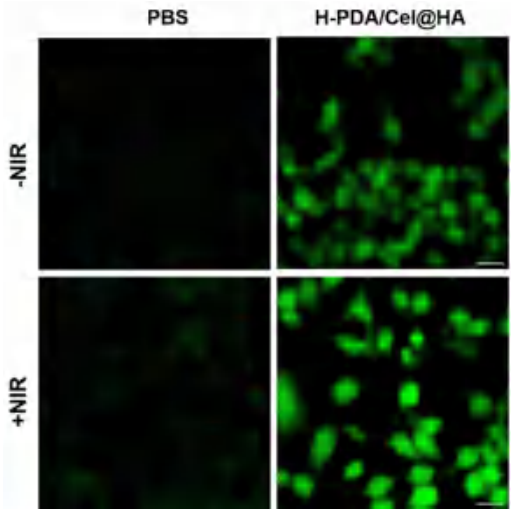

图 4　H-PDA/Cel@HA 的 DCFH-DA 荧光图像（标尺：100 μm）

Fig 4　Fluorescence images of DCFH-DA in 4T1 cells with different treatments（scale bar：100 μm）

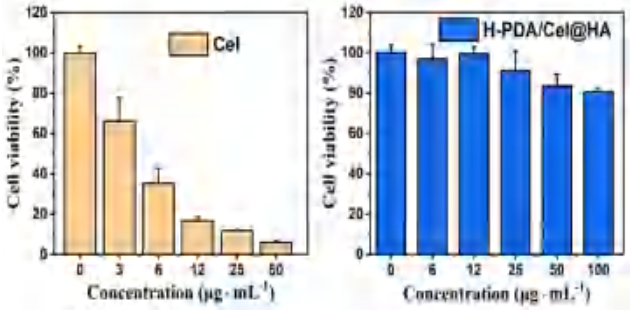

图 5　不同浓度的 Cel 和 H-PDA/Cel@HA 对 L929 细胞存活率的影响

Fig 5　Cell viability of L929 cells treated with different concentrations of Cel and H-PDA/Cel@HA

H-PDA/Cel@HA 处理后，死细胞比例明显增加。这表明 H-PDA/Cel@HA 可有效清除肿瘤细胞，

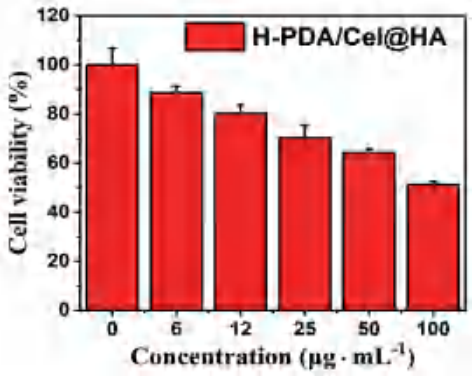

图 6　不同浓度的 H-PDA/Cel@HA 对 4T1 细胞存活率的影响

Fig 6　Effect of different concentrations of H-PDA/Cel@HA on the cell viability of 4T1 cells

具有明显的抗肿瘤活性。

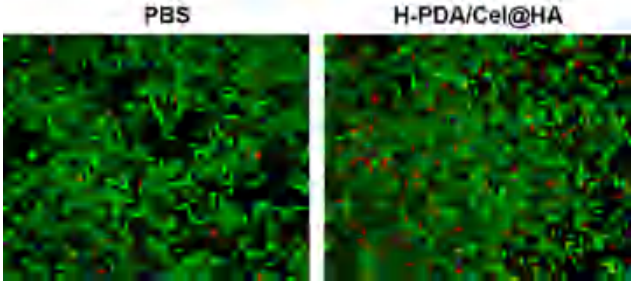

图 7　活 / 死细胞染色实验（标尺：100 μm）

Fig 7　Live and dead cell staining assay using Calcein-AM/PI kit（scale bar：100 μm）

3.6　H-PDA/Cel@HA 对细胞凋亡的影响

使用膜相关蛋白 V-FITC/PI 试剂盒染色，通过流式细胞术分析了细胞死亡途径。如图 8 所示，PBS 组活细胞占比 92.8%，晚期凋亡细胞占比 4.32%；H-PDA/Cel@HA 处理细胞后，活细胞占比仅为 68.6%，晚期凋亡细胞占比 20.0%，说明 H-PDA/Cel@HA 能够有效地诱导细胞凋亡，这也与 MTT 结果一致。

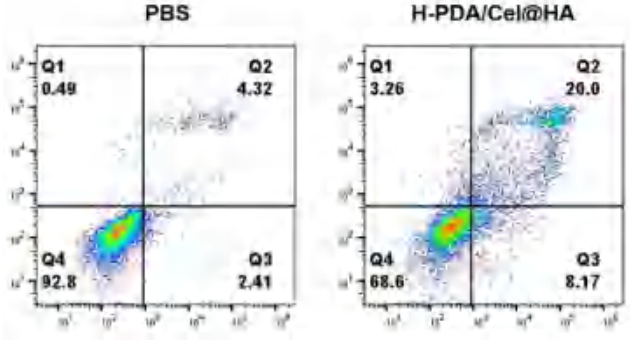

图 8　细胞凋亡实验的流式细胞术分析

Fig 8　Flow cytometry analysis of 4T1 cells after different treatments

4　讨论

本研究设计了一种负载 Cel 的中空介孔的聚多巴胺纳米颗粒 H-PDA/Cel@HA，并通过一系

列表征实验证明该纳米复合物的成功制备。细胞内 ROS 水平实验结果表明，游离的 Cel 能显著提高细胞内 ROS 水平。然而，细胞毒性实验的结果表明，游离的 Cel 对正常细胞具有明显的细胞毒性，不能单独作为药物应用。相较于游离的 Cel，H-PDA/Cel@HA 可提高细胞内 ROS 水平，显著抑制肿瘤细胞生长，诱导肿瘤细胞凋亡，显示出优异的抗肿瘤活性。同时，对正常细胞毒性低，提高了 Cel 的生物相容性。

尽管纳米药物递送系统为药物输送带来了新的前景，尤其在癌症治疗领域显示出了巨大潜力，但其在临床应用中仍面临诸多挑战，如存在制备工艺复杂、生物相容性差、靶向性不足等局限性。因此，后期课题组将从优化纳米材料的制备工艺出发，通过降低纳米复合物的粒径以及采用能够靶向肿瘤部位的表面活性剂、同源细胞膜、特异性抗原等对纳米复合物进行修饰，使纳米复合物具有更好的靶向性和特异性。此外，我们计划通过体外释放、体内抗肿瘤活性、体内抗肿瘤免疫活性等实验进一步考察，以期为其用于临床研究提供理论基础。

参考文献

[1] Erratum：Global cancer statistics 2018：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（4）：313.

[2] Siegel RL，Miller KD，Wagle NS，et al. Cancer statistics，2023 [J]. CA Cancer J Clin，2023，73（1）：17-48.

[3] Wagh PR，Desai P，Prabhu S，et al. Nanotechnology-based celastrol formulations and their therapeutic applications [J]. Front Pharmacol，2021，12：673209.

[4] 呼宇，曹寒冰，龚政艳，等 . 肿瘤微环境中免疫细胞自身调控及中药成分对其调控的研究进展 [J]. 西北药学杂志，2024，39（1）：211-220.

[5] 旦增旺姆，韩广素，李晨露，等 . 中药调节肿瘤免疫微环境发挥抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中西医结合研究，2023，15（6）：410-414.

[6] Guo L，Zhang YP，Al-Jamal KT. Recent progress in nanotechnology-based drug carriers for celastrol delivery [J]. Biomater Sci，2021，9（19）：6355-6380.

[7] Wang C，Dai S，Zhao XT，et al. Celastrol as an emerging anticancer agent：current status，challenges and therapeutic strategies [J]. Biomed Pharmacother，2023，163：114882.

[8] 李小江，邬明歆，孔凡铭，等 . 中药有效成分抗肿瘤活性及作用机制研究进展 [J]. 中草药，2020，51（9）：2587-2592.

[9] Liu YL，Li JB. Self-assembling nanoarchitectonics of size-controllable celastrol nanoparticles for efficient cancer chemotherapy with reduced systemic toxicity [J]. J Colloid Interface Sci，2023，636：216-22.

[10] Wang SQ，Zhou L，Tian HL，et al. Site-specific nanomodulator capable of modulation apoptosis for enhanced colorectal cancer chemo-photothermal therapy [J]. J Nanobiotechnology，2023，21（1）：24.

[11] 张文静，黄倩倩，陈云娜，等 . 聚多巴胺包覆阿霉素 / 中空介孔硅纳米颗粒的制备及表征 [J]. 中南药学，2020，18（3）：364-368.

[12] 袁一超，王春梅，李策，等 . 聚多巴胺 - 砒霜纳米递药系统的构建及其抑瘤效果 [J]. 中草药，2023，54（23）：7759-7764.

[13] 宋冰，王永乐，章晶晶，等 . 基于聚多巴胺药物载体的制备及其性能研究 [J]. 广州化工，2020，48（5）：58-61.

[14] 王昊，王晓伟，李明阳，等 . 聚苯胺 / 聚多巴胺 Janus 球的制备及其应用 [J]. 华北科技学院学报，2018，15（2）：92-98.

[15] Dong L，Wang C，Zhen WY，et al. Biodegradable iron-coordinated hollow polydopamine nanospheres for dihydroartemisinin delivery and selectively enhanced therapy in tumor cells [J]. J Mater Chem B，2019，7（40）：6172-6180.

[16] Wang L，Liu SW，Ren CX，et al. Construction of hollow polydopamine nanoparticle based drug sustainable release system and its application in bone regeneration [J]. Int J Oral Sci，2021，13（1）：27.

[17] 尚兵，余飞，陈琴华 . 多巴胺聚合机制研究及在萃取吸附材料制备中的应用进展 [J]. 中南药学，2017，15（11）：1571-1576.

[18] Tian B，Wang C，Du Y，et al. Near infrared-triggered theranostic nanoplatform with controlled release of HSP90 inhibitor for synergistic mild photothermal and enhanced nanocatalytic therapy with hypoxia relief [J]. Small，2022，18：2200786.

（收稿日期：2024-03-26；修回日期：2024-04-26）

肉桂油 - 艾叶油复配亚微乳制备及协同抗菌研究

徐丽芝[1, 4, 5]，孟扬[2, 4, 5]，王欣茹[2, 4, 5]，杨瑞[6*]，李丹[3*]，刘爽[7]，尹登科[1]，王淑君[3*]（1. 安徽中医药大学，合肥　230012；2. 江西中医药大学，南昌　330000；3. 沈阳药科大学，沈阳　110016；4. 江苏艾迪纳米生物医药有限公司，江苏　南通　226100；5. 南通长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；6. 辽宁中医药大学附属第二医院，沈阳　110034；7. 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心，沈阳　100044）

摘要：目的　探究肉桂油和艾叶油的单一抗菌活性及两者联合使用的抗菌活性，优化肉桂油 - 艾叶油复配亚微乳处方及工艺，并对其进行初步质量评价。**方法**　采用微量稀释法测定肉桂油和艾叶油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠埃希菌的最小抑菌浓度（*MIC*）和最小杀菌浓度（*MBC*）；采用棋盘稀释法测定了两种挥发油复配联用的分级抑菌浓度（*FIC*）；采用滤纸片法测定油不同混合比例下抑菌圈直径，以离心稳定常数、粒径和多分散系数（PDI）为评价指标，最终确定亚微乳的最优处方。**结果**　肉桂油对金黄色葡萄球菌的 *MIC* 为 0.5 μL·mL^{-1}，枯草芽孢杆菌及大肠埃希菌的 *MIC* 均为 1 μL·mL^{-1}，艾叶油对三种供试菌的 *MIC* 均为 16 μL·mL^{-1}。肉桂油和艾叶油对金黄色葡萄球菌起相加作用，对大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌起协同作用。复配亚微乳最优处方为肉桂油 - 艾叶油 - 大豆磷脂 - 泊洛沙姆 188（P188）- 水 2.5∶3∶0.2∶0.8∶93.5，制得的亚微乳为乳白色液体，平均粒径为（130.7±1.2）nm、PDI 为 0.145±0.02。**结论**　肉桂油 - 艾叶油复配亚微乳对金黄色葡萄球、枯草芽孢杆菌和大肠埃希菌均有抑制作用，且效果强于挥发油。

关键词：肉桂油；艾叶油；亚微乳；响应面；协同抗菌
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1125-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.003

Preparation and synergistic antimicrobial effect of submicroemulsion of Cinnamon oil-Artemisia argyi oil complexes

XU Li-zhi[1, 4, 5], MENG Yang[2, 4, 5], WANG Xin-ru[2, 4, 5], YANG Rui[6*], LI Dan[3*], LIU Shuang[7], YIN Deng-ke[1], WANG Shu-jun[3*] (1. *Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330000; 3. *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 4. *Jiangsu Aidi Nano Biomedical Co., Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226100; 5. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226133; 6. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110034; 7. *Center for Food and Drug Inspection of NMPA*, *Shenyang* 100044)

Abstract: Objective　To determine the single and combined antibacterial activity of Cinnamon oil, Artemisia argyi oil and Cinnamon-Artemisia argyi oil, optimize the submicroemulsion formula and process of Cinnamon oil-Artemisia argyi oil, and evaluate its quality. **Methods**　The minimum inhibitory concentration (*MIC*) and minimal bactericidal concentration (*MBC*) of Cinnamon oil and Artemisia argyi oil against *S. aureus*, *B. subtilis*, and *E. coli* were determined by microdilution method. The fractional inhibitory concentration (*FIC*) of the two volatile oils in combination was determined by checkerboard dilution method. The diameter of the circle of inhibition under different mixing ratios of the oils was determined by filter paper slice method, and the centrifugal stability constants, particle sizes and polydispersity index (PDI) were used as the evaluation indexes for the

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973494）。
作者简介：徐丽芝，女，硕士研究生，主要从事中药创新制剂研究，email：lzxubjt@163.com　*通信作者：杨瑞，女，研究员，主要从事药剂学、药代动力学研究，email：yang_rui1983@163.com；李丹，女，高级工程师，主要从事药剂学、创新辅料的研究，email：newtiger001@163.com；王淑君，女，教授，博士研究生导师，主要从事药剂学、创新制剂研究，email：1252116911@qq.com

optimal formula of the submicroemulsion. **Results** The *MIC* of Cinnamon oil was 0.5 μL•mL^{-1} for *S. aureus*, 1 μL • mL^{-1} for *B. subtilis* and *E. coli*, and 16 μL • mL^{-1} for Artemisia argyi oil for the three test organisms. Cinnamon oil and Artemisia argyi oils interacted with *S. aureus* and had synergistic effect on *E. coli* and *B. subtilis*. The optimal formula of compound submicroemulsion was Cinnamon oil-Artemisia argyi oil-soybean phospholipid-Poroxam 188 (P188)-water at 2.5∶3∶0.2∶0.8∶93.5. The resulting submicroemulsion was a milky white liquid with an average particle size of (130.7±1.2) nm and the PDI of 0.145±0.02. **Conclusion** The Cinnamon oil-Artemisia argyi oil complex submicroemulsion can inhibit *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli*, whose effect is stronger than that of volatile oil.

Key words: Cinnamon oil; Artemisia argyi oil; submicroemulsion; response surface; synergistic antibacterial effect

抗菌药物耐药是目前面临的重大挑战之一，患者感染后残疾和死亡风险高，目前尚无治疗方案[1-2]。植物挥发油作为天然抗菌剂，得到广泛关注，具有生物安全性高、毒性小、污染小且不易产生耐药性的特点，但还存在刺激性强和不稳定的缺点[3-4]。由于挥发油的组分非常复杂，不同的挥发油可能具有不同的抑菌机制，通常单一挥发油需要大剂量才能体现抑菌作用，但在高浓度下可通过经皮、口服、吸入等方式导致潜在的毒性和致敏性[5]，复配挥发油可以减小使用浓度，在过程中展现出协同抗菌作用[6]。研究发现牛至和百里香复配精油的最小抑菌浓度（*MIC*）显著低于单一精油的 *MIC*[7]。香茅精油、肉桂精油和罗勒的复合精油对大肠埃希菌和沙门氏菌表现出协同作用，但对金黄色葡萄球菌表现出拮抗作用[8]。目前，棋盘稀释法是测定药物联合使用种类和用量的科学依据，最终通过分级抑菌浓度（*FIC*）指数来判断药物间的协同、相加、无关及拮抗作用[9-10]。

肉桂油和艾叶油具有广谱的抗菌作用和抗氧化作用，但由于挥发油不溶于水，挥发性强且稳定性差，在一定程度上限制了它们的使用[11]。本实验以肉桂油和艾叶油为研究对象，通过棋盘稀释法研究肉桂油和艾叶油的协同抗菌作用，以其复配挥发油为油相及主药，制备 *O*/*W* 型乳剂，探究其最优处方。

1 材料

1.1 仪器

PTX-FA210S 型电子天平（华志电子科技有限公司）；PX85Z 型分析天平（奥豪斯仪器有限公司，d = 0.01 mg）；DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；FJ200-SH 型数显高速分散均质机（上海标本模型厂）；SCIENCETZ-E 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；TDZ4K 型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；MALVERN ZS90 型马尔文粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；BJPX-11-80 型恒温恒湿培养箱（山东博科科学仪器有限公司）；超净台（上海尚道仪器制造有限公司）。

1.2 试药

艾叶油（吉水县天成香料油厂，批号：20210603）；LB 营养琼脂（北京奥博星生物技术有限责任公司，批号：02-137）；MH 肉汤（青岛高科技工业园海博生物技术有限公司，批号：20230331）；肉桂油（批号：20230424）、吐温 -80、司班 -80、吐温 -60、无水乙醇、氯化钠（国药集团化学试剂有限公司）；聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油（EL-40）、P188（中国巴斯夫有限公司）；大豆磷脂（德国利宝益公司，批号：579010-1190091-13）；化学试剂均为分析纯。

1.3 实验菌株

金黄色葡萄球菌 CMCC（B）26112、大肠埃希菌 CMCC（B）44102、枯草芽孢杆菌 CMCC（B）63501（中国食品药品检定研究院）。

2 方法与结果

2.1 挥发油抑菌作用

2.1.1 菌悬液的配制 将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌接种于 LB 琼脂培养基，在 37 ℃条件下培养 24 h。将菌体配制成浓度为 1×10^8 CFU • mL^{-1} 的菌悬液，备用。

2.1.2 滤纸片法 吸取 15 μL 不同挥发油滴在空白药敏纸片上，晾干（表面没有流动的液体）。分别吸取“2.1.1”项下三种菌液 100 μL 加入含 LB 琼脂培养基的平板中，使用涂布器将菌悬液供试菌种涂抹均匀，将含有挥发油的药敏纸片贴在已涂好菌的平板里，于 37 ℃倒置培养 24 h，测量抑菌圈的直径大小。

2.1.3 *MIC* 采用微量肉汤稀释法测定 *MIC*。将挥发油用无水乙醇配制成 512 μL • mL^{-1} 的初始溶液，在 96 孔板第一行中加入 100 μL MH 肉汤，再吸取 100 μL 挥发油加入第 1 孔，混匀后吸取 100 μL 加至

第 2 孔中，如此反复两倍稀释至第 12 孔，弃去 100 μL，再分别吸取 100 μL 菌液加入至 1 ～ 12 孔（1×10^6 CFU • mL^{-1} 的菌混悬液），平行 3 次实验，在 37 ℃条件下培养 24 h 后取出，观察有无细菌生长，以最后一个不长细菌的浓度为 *MIC*，结果见表 1。肉桂挥发油对三种供试菌均有较好的抑制作用，对金黄色葡萄球菌比较敏感，*MIC* 低于其他两种供试菌；艾叶挥发油对三种供试菌的 *MIC* 相同，且浓度较大，可以看出肉桂挥发油的抑菌效果明显强于艾叶挥发油。

2.1.4　最小杀菌浓度（*MBC*）　吸取 4*MIC*、2*MIC* 和 *MIC* 浓度的溶液各 100 μL，涂布于琼脂平板，置于恒温恒湿箱 37 ℃条件下培养 24 h，检查琼脂平板上的菌落，菌落数小于 5 时的浓度，即为 *MBC*，结果见表 1。

表 1　挥发油对三种供试菌的 *MIC* 和 *MBC*（μL • mL^{-1}）

Tab 1　*MIC* and *MBC* of volatile oil on three test organisms（μL • mL^{-1}）

挥发油	项目	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠埃希菌
肉桂挥发油	*MIC*	0.5	1	1
	MBC	1	2	2
艾叶挥发油	*MIC*	16	16	16
	MBC	32	32	32

2.1.5　棋盘稀释法　根据肉桂和艾叶挥发油 *MIC* 确定药物联合测定的稀释度，选择 6 个稀释度，每种抗菌药物的最高浓度为其 *MIC* 的 2 倍。将 96 孔板第一行至第六行各吸取 50 μL 2*MIC*、*MIC*、1/2*MIC*、1/4*MIC*、1/8*MIC*、1/16*MIC* 浓度的艾叶油，第一列至第六列各吸取 50 μL 2*MIC*、*MIC*、1/2*MIC*、1/4*MIC*、1/8*MIC*、1/16*MIC* 浓度的肉桂油，两种挥发油混匀后，吸取 100 μL 已经配制好的菌液，置于 37 ℃恒温恒湿箱培养 24 h，观察有无菌液生长。采用 *FIC* 指数判断结果[12]，*FIC* ≤ 0.5 为协同作用，0.5 ＜ *FIC* ≤ 1 为相加作用，1 ＜ *FIC* ≤ 2 为无关作用，*FIC* ＞ 2 为拮抗作用。结果见表 2，从 *FIC* 指数来看，艾叶油和肉桂油联合使用对金黄色葡萄球菌起相加作用，并无协同作用；对枯草芽孢杆菌和大肠埃希菌，联用起协同作用，大肠埃希菌的 *FIC* 小于枯草芽孢杆菌，说明两种挥发油联合使用对大肠埃希菌抑制效果更明显。

表 2　挥发油联合使用 *FIC* 指数

Tab 2　*FIC* index for combined use of volatile oils

菌种	联合使用时 *MIC*/（μL • mL^{-1}）		*FIC*
	肉桂油	艾叶油	
金黄色葡萄球菌	0.5	8	1
枯草芽孢杆菌	0.25	4	0.5
大肠埃希菌	0.125	4	0.375

2.2　复配亚微乳剂处方选择

2.2.1　乳剂评价指标　① 离心稳定常数（K_e）：精密移取乳液 3 mL 置于 5 mL 离心管中，于 4000 r • min^{-1} 离心 15 min，精密吸取下层液 200 μL 置于量瓶中用蒸馏水稀释定容至 10 mL，混合均匀。以蒸馏水为空白对照，于紫外 - 可见分光光度计 500 nm 下测量其紫外吸光度值。采用同样的方法取未离心的乳剂 200 μL 用蒸馏水定容至 10 mL，测量其吸光度值，计算 K_e。K_e 值越小则制剂越稳定，根据下式计算离心稳定系数 K_e 值。

$$K_e = |A_0 - A|/A_0$$

A_0 代表未离心的制剂的吸光度值，A 表示离心后的制剂的吸光度值。

② 粒径及 PDI：精密吸取不同乳剂 100 μL 用水稀释 100 倍，测量粒径及 PDI。

2.2.2　混合油相比例及用量的选择　根据前期实验，发现肉桂油具有较好的抑菌作用，且肉桂油和艾叶油两者合用起到了协同抑菌作用，因此按照艾叶油比肉桂油 6∶1 至 6∶6 的比例进行三种不同供试菌的滤纸片法实验来筛选混合油相的比例，按“2.1.2”项下方法进行抑菌圈实验，结果见图 1。可以看出，混合油对三种不同供试菌都有较好的抑制作用，且对金黄色葡萄球菌较敏感，随着肉桂油的占比增加，抑菌圈的大小也随之增大，直至艾叶油与肉桂油为 6∶5 时，抑菌圈为最大，之后再增加肉桂油的占比，抑菌圈反而减小，混合油对三种供试菌均有相同的表现，因此选择艾叶油与肉桂油 6∶5 时的比例为混合油相比例。

2.2.3　乳化剂的选择　采用单因素考察法筛选乳化剂，固定相同质量的乳化剂，将艾叶油和肉桂油按 6∶5 的比例与不同乳化剂混合，在室温下搅拌均匀。向纯水中逐滴加入混匀的油相和乳化剂，肉眼观察，以乳滴大小和在水中的扩散速度、均匀程度为评价指标，筛选最优乳化剂，结果见表 3。可以看出 P188 和吐温 -80 在水中的扩散程度和均匀程度比其他乳化剂较好，且乳滴最小，因此选择 P188 作为乳化剂。

表 3　乳化剂种类筛选

Tab 3　Screening of emulsifier types

乳化剂	乳滴大小	扩散速度	均匀程度
P188	＋＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋＋
吐温 -80	＋＋	＋＋＋＋	＋＋
吐温 -60	＋	＋＋	＋＋
EL-40	＋＋＋	—	—
大豆磷脂	＋	＋	—

注（Note）：＋表示程度，—表示无变化（＋ indicates degree，— indicates no change）。

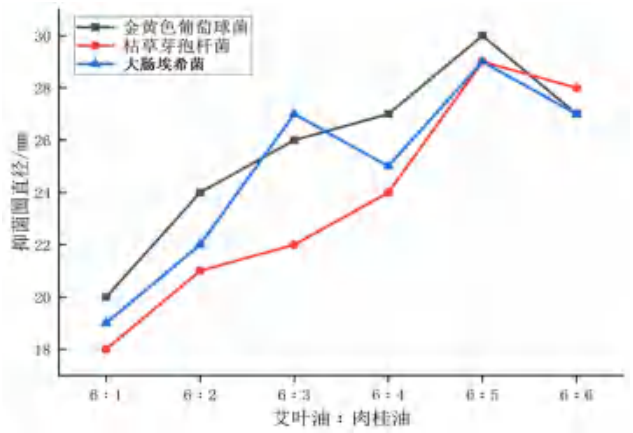

图 1　混合油比例对三种供试菌的抑菌圈大小

Fig 1　Circle of inhibition of three test organisms by mixing oil ratio

2.2.4　复合乳化剂比例的选择　将不同比例的 P188 和大豆磷脂混合（9∶1 ～ 1∶9）作为乳化剂，分别进行乳剂制备，按“2.2.1”项下方法测定 K_e、粒径及 PDI 来评价乳剂稳定性，结果见表 4。从离心情况可以看出，大豆磷脂越多乳剂越不稳定，离心后容易分层，由表 4 可知 P188 与大豆磷脂为 8∶2 时，K_e 值和粒径均较小，且离心后未见分层，因此复合乳化剂比例选择 8∶2。

表 4　复合乳化剂比例筛选

Tab 4　Complex emulsifier ratio screening

比例	离心情况	K_e	粒径 /nm	PDI
9∶1	不分层	0.153	114.3	0.342
8∶2	不分层	0.058	154.8	0.304
7∶3	不分层	0.085	178.0	0.217
6∶4	不分层	0.658	193.3	0.237
5∶5	分层	0.349	161.6	0.183
4∶6	分层	0.528	293.6	0.255
3∶7	分层	0.370	222.3	0.142
2∶8	分层	0.253	233.7	0.138
1∶9	分层	0.594	484.3	0.265

2.2.5　制备方法筛选　乳剂的制备方法主要有干胶法、湿胶法和混合法 [13]，分别考察了三种方法制备乳剂的影响，按“2.2.1”项下方法测定 K_e 值、粒径及 PDI 来评价乳剂稳定性，结果见表 5。三种制备方法的粒径相差并不大，但干胶法的 K_e 值和 PDI 都比其他两种制备方法小，制备也比其他两种方便，更有利于大规模生产。

表 5　不同制备方法筛选

Tab 5　Screening of different preparations

制备方法	K_e	粒径 /nm	PDI
干胶法	0.155	135.10	0.155
湿胶法	0.220	94.89	0.220
混合法	0.252	98.79	0.239

2.2.6　响应面筛选处方及工艺　前期通过对单因素考察得到的结果进行分析，选取了三个对乳剂稳定性影响较大的因素进行响应面设计，因素水平表见表 6。以粒径和 PDI 为响应值，通过 Design-Expert 13 设计三因素三水平的响应面优化，结果见表 7。

表 6　因素水平

Tab 6　Factor and level

因素	水平		
	－1	0	＋1
乳化剂用量 /%	1	2	3
剪切转速 /（r • min^{-1}）	8000	10 000	12 000
超声时间 /min	3	6	9

表 7　实验设计与结果

Tab 7　Experimental design and results

No.	乳化剂 /%	剪切转速 /（r • min^{-1}）	超声时间 /min	粒径 /nm	PDI
1	1	8000	6	147.6	0.124
2	3	8000	6	91.0	0.254
3	1	12 000	6	127.3	0.143
4	3	12 000	6	96.1	0.253
5	1	10 000	3	139.4	0.154
6	3	10 000	3	105.4	0.280
7	1	10 000	9	178.8	0.135
8	3	10 000	9	116.7	0.233
9	2	8000	3	110.5	0.248
10	2	12 000	3	112.3	0.243
11	2	8000	9	126.4	0.177
12	2	12 000	9	118.8	0.206
13	2	10 000	6	114.2	0.242
14	2	10 000	6	102.4	0.224
15	2	10 000	6	112.3	0.252
16	2	10 000	6	106.9	0.244
17	2	10 000	6	107.9	0.246

对表 7 获得的结果粒径和 PDI 进行方差分析，结果见表 8 ～ 9。结果显示，两种模型均为极显著，失拟项不具有显著性，表明该模型拟合情况较为准确。粒径和 PDI 拟合结果方程如下：粒径 ＝ 108.74 － 22.98A － 2.62B ＋ 9.14C ＋ 6.36AB － 7.03AC － 2.35BC ＋ 12.42A^2 － 5.66B^2 ＋ 13.91C^2，R^2 ＝ 0.9711；PDI ＝ 0.2416 ＋ 0.058A ＋ 0.005 25B － 0.021 75C － 0.005AB － 0.007AC ＋ 0.0085BC － 0.033 05A^2 － 0.015 05B^2 － 0.008 05C^2，R^2 ＝ 0.9818。根据方差分析看出，乳化剂用量（A）和超声时间（C）对实验结果起极显著性影响（P ＜ 0.01），各因素对乳剂制备工艺的影响顺序为 A ＞ C ＞ B。三维响应面图通过等高线的形状来表示因素交互的强弱，圆形表示交互较弱，椭圆形则是交互强的表现，图 2 ～ 3 为拟合各因素对粒径、PDI 交互影响的三维响应面图。

选择粒径和 PDI 最小值，通过软件分析，得到乳剂最优制备工艺为：乳化剂用量 1%，剪切转速 12 000 r • min^{-1}，超声时间 4 min，按最优工艺平行制备三份肉桂油和艾叶油复配亚微乳。

表 8　粒径方差分析结果

Tab 8　Analysis of variance results for particle size

来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*
模型	6950.57	9	772.29	26.17	0.0001
A-乳化剂	4226.48	1	4226.48	143.25	＜0.0001
B-均质转速	55.02	1	55.02	1.86	0.2143
C-超声时间	667.95	1	667.95	22.64	0.0021
AB	161.54	1	161.54	5.48	0.0519
AC	197.40	1	197.40	6.69	0.0361
BC	22.09	1	22.09	0.75	0.4156
A^2	649.50	1	649.50	22.01	0.0022
B^2	134.65	1	134.65	4.56	0.0700
C^2	815.27	1	815.27	27.63	0.0012
残差	206.53	7	29.50	—	—
失拟项	119.76	3	39.92	1.84	0.2802
纯误差	86.77	4	21.69	—	—
总离差	7157.10	16	—	—	—

表 9　PDI 方差分析结果

Tab 9　Analysis of variance results for PDI

来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*
模型	0.0378	9	0.0042	41.96	＜0.0001
A-乳化剂	0.0269	1	0.0269	269.04	＜0.0001
B-均质转速	0.0002	1	0.0002	2.20	0.1812
C-超声时间	0.0038	1	0.0038	37.83	0.0005
AB	0.0001	1	0.0001	1.00	0.3507
AC	0.0002	1	0.0002	1.96	0.2043
BC	0.0003	1	0.0003	2.89	0.1330
A^2	0.0046	1	0.0046	45.98	0.0003
B^2	0.0010	1	0.0010	9.53	0.0176
C^2	0.0003	1	0.0003	2.73	0.1426
残差	0.0007	7	0.0001	—	—
失拟项	0.0003	3	0.0001	0.77	0.5665
纯误差	0.0004	4	0.0001	—	—
总离差	0.0385	16	—	—	—

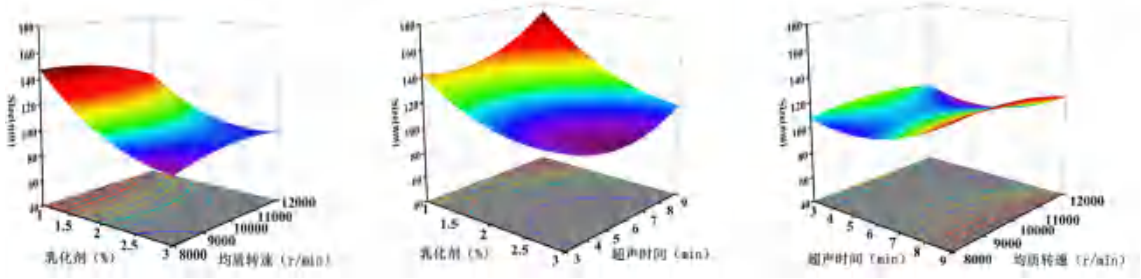

图 2　各因素对粒径交互影响三维响应面图

Fig 2　Three-dimensional response plot of the interaction effect of factors on particle size

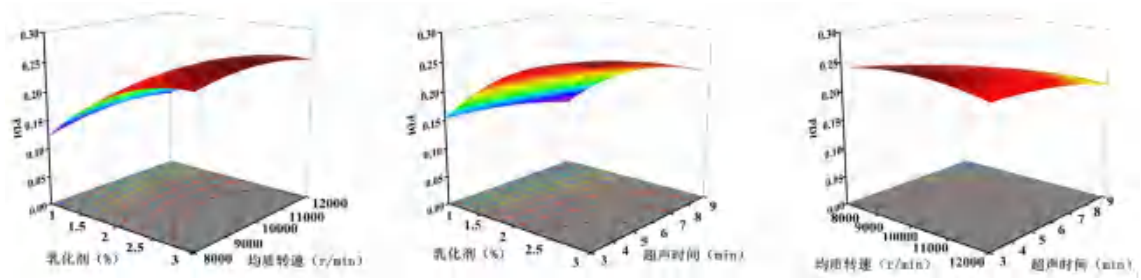

图 3　各因素对 PDI 交互影响三维响应面图

Fig 3　Three-dimensional response plot of the interaction effect of factors on PDI

3　亚微乳初步质量评价

3.1　粒径及 PDI

按照最优处方制备亚微乳，外观呈乳白色，不分层，按“2.2.1”项下方法测定粒径及 PDI。该亚微乳粒径为（130.7±1.2）nm、PDI 为 0.145±0.02。

3.2　乳剂类型鉴别

取两份新制的亚微乳，分别加入亚甲蓝染料和甲基红染料，静置，观察两种染料在乳液中扩散速度以及外观的变化，结果见图 4。结果显示，加亚甲蓝的亚微乳形成均匀蓝色，而加甲基红的亚微乳底部有红色沉淀，说明制备的亚微乳为 *O/W* 型乳剂。

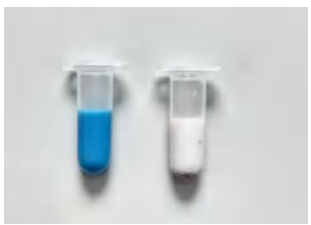

图 4　亚微乳类型鉴别

Fig 4　Submicroemulsion type identification

3.3　亚微乳及挥发油抗菌作用对比

采用牛津杯法对复配亚微乳及同等比例混合的挥发油稀释液（LB 溶液 -1% 吐温 -80 稀释）进行抗菌作用对比，每个牛津杯放入 100 μL 药液，进行三组平行实验，37 ℃培养 24 h，测量抑菌圈的直径大小，见表 10。结果显示，将挥发油制备成亚微乳后抑菌效果增强。

表 10　亚微乳及挥发油对三种供试菌的抑菌圈直径 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 10　Circle of inhibition diameters of submicroemulsion and volatile oil on three test organism ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

试液	抑菌圈直径 /mm		
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠埃希菌
亚微乳	16.33±0.28	14.13±0.42	17.17±0.35
挥发油稀释液	12.26±0.64	11.30±0.30	13.17±0.45

4　讨论

肉桂油中主要成分为桂皮醛，占比不得低于 75%，艾叶油中主要成分包括单萜类、醇类、醚类、倍半萜类及其衍生物等。桂皮醛可影响脂肪酸在细菌细胞膜上的分布，抑制细胞膜上酶的活性，调节细胞膜的流动性，增强其通透性，抑制细胞内三磷酸腺苷（ATP）蛋白酶的活性，影响细胞能量供应，与细胞内蛋白质、激素等因素联合影响细胞正常分裂，从而产生抑菌作用 [14]。艾叶油可能作用于细菌细胞膜，引起细胞内容物泄露，如蛋白质和 K^+ [15]。两种挥发油复配使用起到协同作用，可能与不同成分的多途径作用有关，需进一步研究来阐明。

目前，乳剂是对中药挥发油进行“包封”的常用递释系统，是指互不相溶的两相液体混合，其中一相以液滴状分散于另外一相液体中形成的非均相液体分散体。本实验以肉桂油和艾叶油为油相，采用单因素实验筛选适宜的乳化剂。单用 P188 制备乳剂离心后出现轻微漂油现象，且放置一段时间后出现明显分层现象，因此本研究采用复合乳化剂制备乳剂。根据界面膜理论，磷脂可以形成较高的界面电荷，有利于阻止乳滴的聚集，P188 主要是形成空间稳定位阻，防止乳滴的合并，两种类型乳化剂的混合使用，可提高表面膜的强度 [16]。乳剂的处方和制备工艺都能影响它的稳定性，在处方和工艺优化过程中，乳化剂用量越多，乳剂粒径越小，但 PDI 越大，说明乳剂分布不均匀，但乳化剂太少会使乳剂不稳定，在最优乳化剂用量 1% 时，乳剂稳定且分布变得均匀；随着超声时间的增加，乳滴间相互碰撞的机会增多，促使乳滴的合并，粒径也随之变大，影响乳剂稳定性。

金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌作为革兰氏阳性菌，大肠埃希菌作为革兰氏阴性菌的代表菌株，是研究药物抗菌作用的常用对象 [17]。本实验通过棋盘稀释法得出两种挥发油联合使用对大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌起协同抗菌作用，对金黄色葡萄球菌起累加作用。本研究可为复方挥发油的乳剂制备及协同抑菌作用提供一定理论依据。

参考文献

[1] Khameneh B，Diab R，Ghazvini K，et al. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them [J]. Microb Pathog，2016，95：32-42.

[2] Ma YX，Wang CY，Li YY，et al. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections [J]. Adv Sci（Weinh），2020，7（1）：1901872.

[3] Jing H，Li T，Wei JD，et al. Fabrication and sustained-release property of vinyl silica hollow spheres as a delivery system for aroma compounds [J]. Flavour Fragrance J，2020，36（1）：55-63.

[4] Chen KL，Xu CY，Zhou JL，et al. Multifunctional fabric coatings with slow-releasing fragrance and UV resistant properties from ethyl cellulose/silica hybrid microcapsules [J]. Carbohydr Polym，2020，232：115821.

[5] Reis D，Jones T. Aromatherapy：using essential oils as a supportive therapy [J]. Clin J Oncol Nurs，2017，21（1）：16-19.

[6] Burt S. Essential oils：their antibacterial properties and potential applications in foods--a review [J]. Int J Food Microbiol，2004，94（3）：223-253.

[7] Rossi C，Chaves-López C，Mozina SS，et al. Salmonella enterica adhesion：effect of Cinnamomum zeylanicum essential oil on lettuce [J]. LWT，2019，111：16-22.

[8] Chouhan S，Sharmak K，Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives [J]. Medicines（Basel），2017，4（3）：58.

[9] Farooqui A，Khan A，Borghetto I，et al. Synergistic antimicrobial activity of camellia sinensis and Juglans regia against multidrug-resistant bacteria [J]. PLoS One，2015，10（2）：e0118431.

[10] Silveira AC，Moreira GC，Arts F，et al. Vanillin and cinnamic acid in aqueous solutions or in active modified packaging preserve the quality of fresh-cut Cantaloupe melon [J]. Sci Hortic，2015，192.

[11] 陈玉芹，李仲佰，姚敏，等 . 明胶 - 壳聚糖 - 肉桂精油天然涂膜液的制备及其抑菌效果研究 [J]. 轻工学报，2021，36（4）：9-17.

[12] 丁华，王建清，王玉峰，等 . 几种植物精油与 Nisin 联合抑菌性能分析 [J]. 中国调味品，2016，41（6）：73-79.

[13] 卢秀霞，何琳，李家敏，等 . 辣椒碱亚微乳注射剂的制备及其质量评价 [J]. 中国新药杂志，2013，22（16）：1956-1961.

[14] Doyle AA，Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents [J]. Fitoterapia，2019，139：104405.

[15] Xiang F，Bai JH，Tan XB，et al. Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* Levl. et Van. var. *argyi* cv. Qiai [J]. Ind Crops Prod，2018，125：582-587.

[16] 刘玉红，刘倩伶，黄志芳，等 . 石芎挥发油亚微乳的制备工艺和稳定性研究 [J]. 中成药，2012，34（7）：1254-1258.

[17] 古卓强，梁文辉 . 牛至油不同复配组合的体外联合抗菌作用及机理研究 [J]. 广东药科大学学报，2023，39（3）：54-59.

（收稿日期：2023-10-05；修回日期：2023-12-20）

顶花板凳果的化学成分研究

刘辰旺[1]，吴莹[1]，李昕卓[1]，张玉莹[1]，龚传明[1]，张嘉怡[1]，李玉泽[1, 2]，宋小妹[1, 2]，张东东[1, 2*]（1. 陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳 712046；2. 陕西省太白七药研究与应用重点研究室，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 研究顶花板凳果（*Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc.）的化学成分。**方法** 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱以及半制备液相色谱等方法进行分离纯化，并结合其理化性质及NMR、IR、MS等波谱学技术进行结构解析。**结果** 从顶花板凳果80%乙醇提取物中分离得到10个化合物，分别为（＋）-syringaresinol（**1**）、苯甲酸（**2**）、对羟基苯甲醛（**3**）、对羟基苯乙酮（**4**）、香草酸（**5**）、丁香醛（**6**）、4-羟基-3，5-二甲氧基苯乙酮（**7**）、3，4，5-三甲氧基苯甲酸（**8**）、3-羟基-1-（4-羟基-3，5-二甲氧基苯）-1-丙酮（**9**）、schumannione（**10**）。**结论** 化合物 **1** ～ **4**、**7** ～ **10** 为首次从板凳果属植物中分离得到。

关键词：顶花板凳果；提取分离；化学成分；结构鉴定；木脂素类；酚类
中图分类号：R284.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1131-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.004

Chemical compositions of *Pachysandra terminalis*

LIU Chen-wang[1], WU Ying[1], LI Xin-zhuo[1], ZHANG Yu-ying[1], GONG Chuan-ming[1], ZHANG Jia-yi[1], LI Yu-ze[1, 2], SONG Xiao-mei[1, 2], ZHANG Dong-dong[1, 2*] (1. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Shaanxi Key Laboratory of Research and Application of* "Taibai Qi Yao", *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of *Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc.. **Methods** The separation and purification were conducted by silica gel column chromatography, gel column chromatography and semi-preparative liquid chromatography. The structural was analyzed by combining its physicochemical properties and spectroscopic techniques such as NMR, IR and MS. **Results** Ten compounds were isolated from 80% ethanol extract of *Pachysandra terminalis* and identified as (＋)-syringaresinol (**1**), benzoic acid (**2**), 4-hydroxy benzaldehyde (**3**), 4-hydroxyacetophenone (**4**), vanillic acid (**5**), syringaldehyde (**6**), 4-hydroxy-3, 5-dimethoxyacetophenone (**7**), 3, 4, 5-trimethoxylbenzoic acid (**8**), 3-hydroxy-1- (4-hydroxy-3, 5-dimethoxyphenyl)-1-propanone (**9**), and schumannione (**10**). **Conclusion** Compounds **1** ～ **4**, and **7** ～ **10** have been isolated for the first time from *Pachysandra*.

Key words: *Pachysandra terminalis*; extraction and isolation; chemical composition; structural characterization; lignan; phenol

顶花板凳果药材为黄杨科板凳果属植物顶花板凳果（*Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc.）的干燥全草，又名捆仙七，是"太白七药"中的一个重要品种。其性凉，味苦、微辛，具有舒筋活络、祛除风湿、调经止带等功效[1]。现代药理学研究表明，顶花板凳果具有显著的抗肿瘤活性[2-3]，还具有抗溃疡[4]、抗氧化[5]、抗疟疾[6]等药理作用。其化学成分主要为生物碱[7-8]、三萜[9]和甾体等[10-11]。其中，孕甾烷型生物碱是其发挥抗肿瘤活性的主要成分[12]。目前，国内外学者对顶花板凳果的研究主要集中在其生物碱类成分方面，而对系统性化学成分的研究较为缺乏。因此，本实

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82104368）；陕西中医药大学创新团队项目（No.2023-CXTD-05）。
作者简介：刘辰旺，男，在读硕士研究生，主要从事中草药药效物质基础研究，email：3084054430@qq.com *通信作者：张东东，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事中药药效物质基础研究，email：zhangnatprod@163.com

验对顶花板凳果 80% 乙醇提取物进行系统性研究，分离得到 10 个化合物，分别为（＋）-syringaresinol（**1**）、苯甲酸（**2**）、对羟基苯甲醛（**3**）、对羟基苯乙酮（**4**）、香草酸（**5**）、丁香醛（**6**）、4- 羟基 -3，5- 二甲氧基苯乙酮（**7**）、3，4，5- 三甲氧基苯甲酸（**8**）、3- 羟基 -1-（4- 羟基 -3，5- 二甲氧基苯）-1- 丙酮（**9**）、schumannione（**10**）。其中化合物 **1** ～ **4**、**7** ～ **10** 为首次从板凳果属中分离得到。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LC-6AD 型半制备液相色谱仪（日本岛津公司，SPD-20A 紫外可见光检测器）；Welch Ultimate XB-C_{18} 半制备色谱柱（10 mm×250 mm，5 μm）；AVANCE 型核磁共振波谱仪（德国 Burker 公司）；紫外分析仪（常州恩培仪器制造有限公司）；旋光分析仪（上海仪电物理光学仪器有限公司）；万分之一电子分析天平（美国 Mettler Toledo）；RV10 旋转蒸发仪（德国 IKA 公司）；柱色谱硅胶（200～300 目，青岛海洋化工有限公司）；Sephadex LH-20 凝胶（美国 GE 公司）；薄层硅胶板 GF254（烟台江友硅胶开发有限公司）。

1.2　试药

色谱甲醇、三氟乙酸（天津市科密欧化学试剂有限公司）；分析甲醇、二氯甲烷、三氯甲烷（天津市天力化学试剂有限公司）；娃哈哈纯净水。

顶花板凳果药材于 2020 年 9 月采自陕西省宝鸡市眉县境内（标本号：20200901），经陕西省中医药大学王薇教授鉴定为黄杨科板凳果属顶花板凳果植物的干燥全草。

2　提取分离

顶花板凳果药材干燥全草 50 kg，采用 80% 乙醇回流提取 3 次，每次 2 h。合并提取液，减压浓缩得到总浸膏。将总浸膏与水混悬后，分别用石油醚、二氯甲烷、正丁醇各萃取 3 次。浓缩干燥得到石油醚部位（37 g），二氯甲烷部位（190 g）和正丁醇部位（1500 g）。将二氯甲烷部位经硅胶柱色谱分离，采用二氯甲烷 - 甲醇（80∶1 ～ 0∶1）进行梯度洗脱，得到 13 个组分 F1 ～ F13。F8（12.7 g）先经 Sephadex LH-20 凝胶柱除去部分色素，再经硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝ 30∶1 ～ 0∶1）梯度洗脱，得到四个组分 F8-1 ～ F8-4。F8-2（2.8 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 40∶60）分离得到 F8-2-1 ～ F8-2-3；F8-2-1（1.35 g）先经 Sephadex LH-20 凝胶柱（甲醇）洗脱，再经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 35∶65）分离得到化合物 **5**（t_R ＝ 17 min，25 mg）和化合物 **1**（t_R ＝ 21 min，47 mg）；F8-2-2（779 mg）经硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇＝ 50∶1 ～ 0∶1）梯度洗脱，再经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 34∶66）分离得到化合物 **2**（t_R ＝ 27 min，8.5 mg）。F8-3（3.9 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 35∶65）分离得到 F8-3-1 ～ F8-3-5；F8-3-2（387 mg）先经凝胶柱（甲醇）初步纯化，再经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 31∶69）分离得到化合物 **8**（t_R ＝ 30 min，6.5 mg）；F8-3-3（857 mg）经硅胶柱色谱（二氯甲烷 - 甲醇 40∶1 ～ 0∶1）梯度洗脱，再经凝胶柱（甲醇）纯化得到化合物 **9**（6.5 mg）；F8-3-4（1.65 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 25∶75）分离得到 F8-3-4-1（t_R ＝ 25 min）和化合物 **4**（t_R ＝ 37 min，25.8 mg），F8-3-4-1 再经凝胶柱（甲醇）纯化，重结晶得到化合物 **3**（11.1 mg）。F8-4（3.1 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 30∶70）分离得到 4 个组分 F8-4-1 ～ F8-4-4；F8-4-1（657 mg）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 24∶76）分离得到化合物 **10**（t_R ＝ 22 min，8.7 mg）；F8-4-2（1.01 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 21∶79）分离得到化合物 **7**（t_R ＝ 50 min，10 mg）；F8-4-3（445 mg）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 19∶81）分离得到化合物 **6**（t_R ＝ 45 min，7 mg）。化合物的化学结构如图 1 所示。

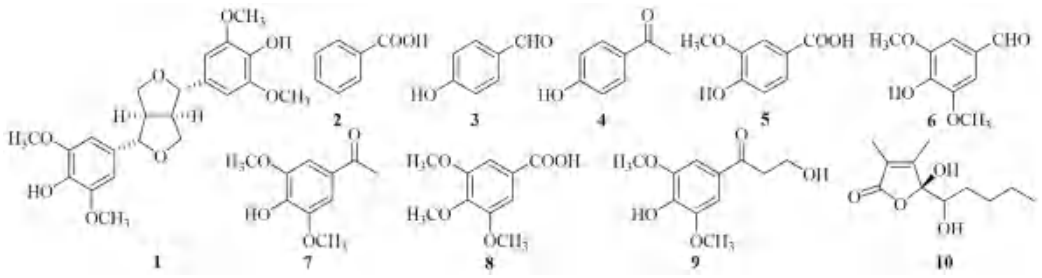

图 1　化合物 **1** ～ **10** 的化学结构

Fig 1　Chemical structures of compounds **1** ～ **10**

3 结构鉴定

化合物**1**：无色针状结晶，$[\alpha]^{20}_{D}$ ＋ 5.8（*c* 0.1，MeOH），ESI-MS *m/z* 419.2（[M ＋ H]$^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：6.59（4H，s，H-2，2'，6，6'），3.90（12H，s，3，3'，5，5'-OCH_3），4.73（2H，d，*J* ＝ 4.1 Hz，H-7，7'），3.10（2H，m，H-8，8'），4.29（2H，dd，*J* ＝ 9.1，6.8 Hz，H-9b，9b'），3.92（2H，overlapped，H-9a，9a'）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：132.1（C-1，1'），102.8（C-2，2'，6，6'），147.2（C-3，3'，5，5'），134.4（C-4，4'），86.1（C-7，7'），54.4（C-8，8'），71.8（C-9，9'），56.4（3，3'，5，5'-OCH_3）。以上数据与文献报道基本一致[13]，因此鉴定该化合物为（＋）-syringaresinol。

化合物**2**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 121.0（[M－H]$^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：8.03（2H，overlapped，H-2，6），7.46（2H，overlapped，H-3，5），7.59（1H，m，H-4）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：130.6（C-1），132.6（C-2，6），128.1（C-3，5），129.3（C-4），168.5（C-7）。以上数据与文献报道基本一致[14]，因此鉴定该化合物为苯甲酸。

化合物**3**：淡黄色片状晶体，ESI-MS *m/z* 121.0（[M－H]$^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：9.75（1H，s，H-7），7.76（2H，d，*J* ＝ 8.6 Hz，H-2，6），6.91（2H，d，*J* ＝ 8.6 Hz，H-3，5）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：164.0（C-1），133.4（C-2，6），130.1（C-3，5），116.7（C-4），191.4（C-7）。以上数据与文献报道基本一致[15]，因此鉴定该化合物为对羟基苯甲醛。

化合物**4**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 159.0（[M＋Na]$^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.87（2H，d，*J* ＝ 8.7 Hz，H-3，5），6.83（2H，d，*J* ＝ 8.7 Hz，H-2，6），2.52（3H，s，H-8）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：164.0（C-1），116.3（C-2，6），132.2（C-3，5），130.2（C-4），199.5（C-7），26.3（C-8）。以上数据与文献报道基本一致[16]，因此鉴定该化合物为对羟基苯乙酮。

化合物**5**：白色针状结晶，ESI-MS *m/z* 167.0（[M － H]$^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.54（1H，s，H-2），3.91（3H，s，3-OCH_3），6.83（1H，d，*J* ＝ 8.7 Hz，H-5），7.56（1H，dd，*J* ＝ 8.7，1.8 Hz，H-6）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：121.7（C-1），114.4（C-2），151.3（C-3），147.3（C-4），112.4（C-5），123.9（C-6），168.6（C-7），55.0（3-OCH_3）。以上数据与文献报道基本一致[17]，因此鉴定该化合物为香草酸。

化合物**6**：淡黄色晶体，ESI-MS *m/z* 183.0（[M ＋ H]$^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.21（2H，s，H-2，6），3.91（6H，s，3，5-OCH_3），9.74（1H，s，H-7）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：129.9（C-1），108.4（C-2，6），149.8（C-3，5），143.3（C-4），192.9（C-7），56.9（3，5-OCH_3）。以上数据与文献报道基本一致[18]，因此鉴定该化合物为丁香醛。

化合物**7**：无色针状晶体，ESI-MS *m/z* 197.1（[M＋H]$^+$）。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：6.00（2H，s，H-2，6），3.97（6H，s，3，5-OCH_3），2.59（3H，s，H-8）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：128.9（C-1），105.7（C-2，6），146.7（C-3，5），139.7（C-4），196.6（C-7），26.3（C-8），56.5（3，5-OCH_3）。以上数据与文献报道基本一致[19]，因此鉴定该化合物为 4-羟基 -3，5-二甲氧基苯乙酮。

化合物**8**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 211.1（[M－H]$^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.34（2H，s，H-2，6），3.88（6H，s，3，5-OCH_3），3.82（3H，s，4-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：125.8（C-1），106.8（C-2，6），152.9（C-3，5），142.0（C-4），168.0（C-7），55.2（3，5-OCH_3），59.7（4-OCH_3）。以上数据与文献报道基本一致[20]，因此鉴定该化合物为 3，4，5-三甲氧基苯甲酸。

化合物**9**：无色油状，ESI-MS *m/z* 225.1（[M － H]$^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：7.31（2H，s，H-2，6），3.17（2H，t，*J* ＝ 6.2 Hz，H-8），3.94（2H，t，*J* ＝ 6.2 Hz，H-9），3.89（6H，s，3，5-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：142.2（C-1），106.0（C-2，6），147.8（C-3，5），127.3（C-4），198.3（C-7），57.6（C-8），40.3（C-9），55.5（3，5-OCH_3）。以上数据与文献报道基本一致[21]，因此鉴定该化合物为 3-羟基 -1-（4-羟基 -3，5-二甲氧基苯）-1-丙酮。

化合物**10**：无色油状，ESI-MS *m/z* 213.1（[M － H]$^-$）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：3.68（1H，dd，*J* ＝ 10.4，1.7 Hz，H-5），1.48（1H，m，H-6a），1.55（1H，m，H-6b），1.33（2H，m，H-7），1.40（2H，m，H-8），0.93（3H，t，*J* ＝ 7.2 Hz，H-9），1.96（3H，s，H-10），1.78（3H，s，H-11）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）

δ：173.6（C-1），124.7（C-2），158.6（C-3），108.0（C-4），71.6（C-5），29.5（C-6），28.2（C-7），22.3（C-8），13.0（C-9），9.7（C-10），6.9（C-11）。以上数据与文献报道基本一致[22]，因此鉴定该化合物为 schumannione。

4 结论

本实验综合运用多种色谱分离技术及波谱学手段对顶花板凳果药材的化学成分进行系统性研究，共分离鉴定了 10 个化合物，其中化合物 **1** ～ **4**、**7** ～ **10** 首次从板凳果属中分离得到。进一步丰富了顶花板凳果药材的化学成分，尤其是非生物碱成分的种类。研究发现酚酸类化合物具有较好的抗菌活性[19]。化合物 **2** 可以有效缓解球虫和产气荚膜梭菌对肉鸡感染造成损伤，并增强其免疫功能[23]。此外，酚类化合物还具有较好的抗氧化活性[5]。因此，后续可继续深入研究顶花板凳果药材的非生物碱部分，进一步挖掘其药用价值，为临床研究提供药效物质基础。

参考文献

[1] 陕西省革命委员会卫生局商业局 . 陕西中草药 [M]. 北京：科学出版社，1971.

[2] Jin MN，Ma SN，Zhai HY，et al. A new megastigmane alkaloid from *Pachysandra terminalis* with antitumor metastasis effect [J]. Chem Nat Compd，2015，51（2）：311-315.

[3] 马胜男 . 转筋草紫罗兰酮型生物碱的抗肿瘤转移活性及作用机制 [D]. 天津：天津医科大学，2013.

[4] 邱明华，聂瑞麟，李忠荣 . Pachysandra 型生物碱的化学结构及活性筛选 [J]. 云南植物研究，1994，16（3）：296-300.

[5] 翟慧媛，李晨阳，唐生安，等 . 转筋草中的酚类成分及其抗氧化活性 [J]. 中国中药杂志，2010，35（14）：1820-1823.

[6] Flittner D，Kaiser M，Mäser P，et al. The alkaloid-enriched fraction of *Pachysandra terminalis*（Buxaceae）shows prominent activity against *Trypanosoma brucei rhodesiense* [J]. Molecules，2021，26（3）：591.

[7] Zhao C，Gan CC，Jin MN，et al. Antitumor metastasis pregnane alkaloids from *Pachysandra terminalis* [J]. J Asian Nat Prod Res，2014，16（5）：440-446.

[8] Sun Y，Ding C，Wang FR，et al. Pregnane alkaloids with BRD4 inhibitory and cytotoxic activities from *Pachysandra terminalis* [J]. Phytochem Lett，2021，45（2）：63-67.

[9] Zhang YY，Li YZ，Xu Y，et al. A new C21 steroidal compound from the whole herb of *Pachysandra terminalis* sieb. et zucc [J]. Biochem Syst Ecol，2020，91（5）：104056.

[10] Ding C，Li YZ，Wu Y，et al. Chemical constituents from the whole plant of *Pachysandra terminalis* [J]. Rec Nat Prod，2023，17（1）：157-164.

[11] 丁超，吴莹，黄欣悦，等 . 捆仙七化学成分研究 [J]. 陕西中医药大学学报，2022，45（4）：32-36.

[12] Funayama S，Noshita T，Shinoda K，et al. Cytotoxic alkaloids of *Pachysandra terminalis* [J]. Biol Pharm Bull，2000，23（2）：262-264.

[13] Kan SQ，Chen GY，Han CR，et al. Chemical constituents from the roots of *Xanthium sibiricum* [J]. Nat Prod Res，2011，25（13）：1243-1249.

[14] 徐巧林，王洪峰，谢海辉 . 薇甘菊根的化学成分研究 [J]. 广东林业科技，2014，30（1）：6-10.

[15] 邓旭坤，余惠凡，刘钊，等 . 绵革藓化学成分研究（Ⅰ）[J]. 中南民族大学学报（自然科学版），2017，36（2）：53-55，59.

[16] 邹吉斌，张鹏，安巧，等 . 越南槐种子化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（1）：165-172.

[17] 邵俊杰，彭勇，何春年，等 . 马尿泡化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报，2013，30（11）：840-845.

[18] 肖寒，郭友朋，李治周，等 . 东北铁线莲地上部位化学成分研究（Ⅱ）[J]. 中草药，2022，53（16）：4934-4939.

[19] 郑娜，李远，徐伟锋，等 . 灵香草乙酸乙酯部分抗菌活性及成分研究 [J]. 时珍国医国药，2016，27（1）：60-61.

[20] 吴培云，蔡百祥，王国凯，等 . 紫藤瘤化学成分研究（Ⅱ）[J]. 中药材，2017，40（2）：338-341.

[21] 梁韩晶，吕江南，冯庆梅，等 . 牛蒡叶化学成分及主要成分动态积累规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（3）：139-146.

[22] Rob MM，Ozaki K，Teruya T，et al. Schumannione，a new butenolide derivative isolated from *Schumannianthus dichotomus* as a potential phytotoxic agent [J]. Tetrahedron Lett，2020，61（30）：152168.

[23] 樊政，刘远斌，张翘楚，等 . 苯甲酸对球虫和产气荚膜梭菌联合感染肉鸡生长性能、免疫功能及肠道健康的影响 [J]. 动物营养学报，2023，35（7）：4387-4401.

（收稿日期：2023-10-15；修回日期：2023-11-09）

一种 CA-4 类衍生物抗人三阴性乳腺癌活性研究

高祎婷，陈嘉媛，王晓花，周昊天（新疆第二医学院 药学院，新疆　克拉玛依　834000）

摘要：目的　以 CA-4 为先导化合物，按照微管蛋白和 PI3K 双靶点活性进行设计、合成一种 CA-4 类衍生物 [1-（3，5- 二氟苯基）-2-（6- 甲氧基 -2-（1-（3，4，5- 三甲氧基苯基）乙烯基）苯并呋喃 -5- 基）乙烯]。并在人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞上进行 PI3K 活性初步研究。**方法**　采用 MTT 法测定 IC_{50} 值，倒置显微镜观察细胞状态，流式细胞术检测细胞周期阻滞情况，AutodockTools 系统进行衍生物和 PI3K 分子对接，ELISA 法检测细胞上清液中 PI3K 分泌表达量，RT-PCR 和 Western blot 分别检测 PI3K mRNA 和蛋白表达水平。**结果**　该衍生物对 MDA-MB-231 细胞的 IC_{50} ＝ 5.78 μmol • L^{-1}，使细胞内出现一系列凋亡形态变化，阻滞细胞生长周期于 G_2 期，与 PI3K 良好结合，结合自由能为 － 36.4008 kJ • mol^{-1}，降低 PI3K 分泌量且下调 PI3K 的基因和蛋白表达水平。**结论**　该衍生物的 PI3K 靶点活性得到了初步验证，也可为此类化合物进一步机制研究提供参考。

关键词：CA-4；三阴性乳腺癌；PI3K
中图分类号：R979，R914　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1135-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.005

Anti-human triple negative breast cancer activity of a CA-4 derivative

GAO Yi-ting, CHEN Jia-yuan, WANG Xiao-hua, ZHOU Hao-tian (*School of Pharmacy*, *Xinjiang Second Medical College*, *Karamay Xinjiang* 834000)

Abstract: Objective　To design and synthesize a CA-4 derivative [1-(3, 5-difluorophenyl)-2-(6-methoxy-2-(1-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)vinyl)benzofuran-5-yl)ethylene] based on the microtubule and PI3K protein as dual targets, using CA-4 as the lead compound, and to preliminarily study the PI3K activity was on human triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods**　MTT was used to measure IC_{50} value, inverted microscope to observe the cell state, flow cytometry to detect cell cycle arrest, AutodockTools system to dock the derivative and PI3K molecule, ELISA to detect PI3K secretion in the cell supernatant, and RT-PCR and Western blot to detect PI3K mRNA and protein expression levels, respectively. **Results**　The IC_{50} was 5.78 μmol • L^{-1}. Many morphological apoptotic changes occurred, and the cell growth cycle was hindered in G_2 phase. Derivatives bound well with PI3K (－ 36.4008 kJ • mol^{-1}), the PI3K secretion decreased, and gene and protein expression levels were down-regulated. **Conclusion**　The PI3K target activity of the derivative has been verified, providing a reference for further mechanism research of this type of derivative.

Key words: combretastatin A-4; triple negative breast cancer; PI3K

乳腺癌是严重威胁女性身心健康的恶性肿瘤之一，2022 年全球女性乳腺癌患者约为 226 万例，其中死亡 69 万例 [1]。乳腺癌主要分为 HER-2 阳性、三阴性和激素受体阳性三类，其中对于三阴性乳腺癌的治疗，2023 年 CSCO《乳腺癌诊疗指南》Ⅲ等级推荐以化疗、生物药物治疗、手术治疗为主，毒副作用大、耐药、复发等问题依然是严峻挑战 [2-3]。以肿瘤细胞信号通路中的潜在治疗靶点为干预目标，利用天然先导化合物的结构优化途径，研究发现新型小分子抗肿瘤药物是当前新药研究的一个热点。

Combretastatin A-4（CA-4，见图 1 左）最初

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金地州科学基金项目（No.2021D01F40）；新疆第二医学院科研基金面上项目（No.MS202301）。
作者简介：高祎婷，女，硕士，讲师，主要从事天然产物的结构修饰和应用开发，email：528610128@qq.com

是从南非天然植物矮柳树中分离而得，作用靶点为微管蛋白秋水仙碱位点，是微管蛋白聚合抑制活性最强的化合物之一[4-5]。但在对 CA-4 构效研究中发现，其结构不稳定，易形成反式异构体，导致活性降低。因此，研究者们以 CA-4 为先导化合物进行了众多的设计和改造探索[6-7]。其中 Kamal 等[8-9]研究表明具有苯并呋喃结构的 CA-4 类化合物，抑制微管蛋白聚合的活性与 CA-4 相当，并且能抑制 PI3K/Akt 通路，从而诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。

磷脂酰肌醇 -3- 激酶（PI3K）具有磷脂酰肌醇激酶活性，作为细胞内重要的信号转导分子，调节着细胞的增殖、分化和凋亡等生理过程。PI3K 分为 3 类，其中与肿瘤相关的为第一类 PI3K，它由一个调节亚基 p85 和一个催化亚基 p110 组成，催化亚基有 4 种类型，即 p110α，β，δ，γ，而 δ，γ 仅存在于白细胞中，其余则广泛分布于各种细胞中[10-13]。PI3K 关联性信号通路在肿瘤进程中至关重要，当它被激活而过度表达时，会造成肿瘤细胞的发生、发展。PI3K 参与的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路作为细胞内重要信号细胞转导通路之一，与乳腺癌的发生，特别是三阴性乳腺癌密切相关，其活化在乳腺癌中高达 70%[14]。目前，全球共有 5 款针对 PI3K 靶点的 PI3K 抑制剂（Idelalisib、Copanlisib、Duvelisib、Alpelisib、Umbralisib）上市应用[15-19]。大量研究显示，PI3K 抑制剂治疗肿瘤的靶点并不唯一，而是能同时影响微管蛋白的正常功能[20-21]。

基于上述，衍生物 1-（3，5- 二氟苯基）-2-（6- 甲氧基 -2-（1-（3，4，5- 三甲氧基苯基）乙烯基）苯并呋喃 -5- 基）乙烯（见图 1 右）是课题组前期合成的活性较好的化合物[22-23]，它以 CA-4 为先导化合物，保留结构中的 A 环及其取代基，B 环用苯并呋喃环取代，不稳定双键用羰基代替，同时引入电负性较高的卤族元素氟原子，增加亲脂性，增强生物利用度，提高与靶点的亲和力，使其兼具有微管蛋白和 PI3K 双靶点结合活性。现就 PI3K 方面的活性，本课题组在人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上进行初步探索研究，以发现该衍生物靶向 PI3K 的应用前景，为其微管蛋白和 PI3K 双靶点活性研究奠定基础。

1　材料

1.1　试药

3，4，5- 三甲氧基苯乙酮、*N*- 溴代琥珀酰亚胺（NBS）、2- 羟基 -4- 甲氧基苯甲醛、*N*- 碘代琥珀酰亚胺（NIS）、3，5- 二氟苯乙烯、双（三苯基磷）二氯化钯（Ⅱ）[$PdCl_2$（PPh_3）$_2$]、三乙胺（Et_3N）、

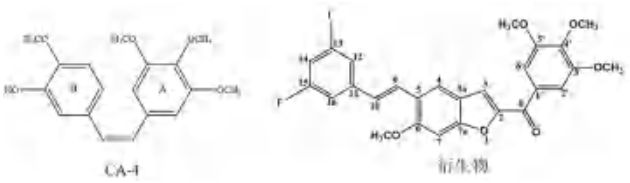

图 1　CA-4（左）和衍生物（右）的化学结构

Fig 1　Chemical structures of the CA-4（left）and targeted compound（right）

N，*N*- 二甲基甲酰胺（DMF）（北京奥秘佳得医药，分析纯）；人雌激素受体阳性乳腺癌细胞 MCF-7 和人雌激素受体、孕激素受体及原癌基因 *Her-2* 均为阴性的三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231（厦门逸漠生物）；DMEM 高糖基础培养基、胰蛋白酶、谷氨酰胺、青霉素 - 链霉素 - 两性霉素 B、PBS 缓冲液、噻唑蓝、二甲基亚砜（DMSO）、PI3K 抑制剂 Alpelisib、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（北京索莱宝）；碘化丙啶 / 核糖核酸酶染色液（PI/RNase，美国 BD）；血清（浙江天杭生物）；硝酸纤维素膜（PVDF，ISEQ07850）（美国 Sigma）；PCR 试剂盒（Takara）；人 β- 微管蛋白（TUBB）ELISA 试剂盒（Bioroyee），人磷酸肌醇 3 激酶（PI3K）ELISA 试剂盒（D&B）；PI3K（ab302958，英国 Abcam）；GAPDH、羊抗兔 IgG-HRP（武汉博士德生物）。

1.2　仪器

UV-A 手提暗箱式紫外分析仪（上海嘉鹏科技）；JJ-1-300W 电动搅拌器（巩义市予华仪器）；HH-S4 数显恒温水浴锅（江苏金怡仪器）；RE-52AA 旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器）；WRS-1C 熔点仪（上海仪电物理光学仪器）；UV-A 细胞培养箱、超净台、7500 Fast 实时荧光定量 PCR 系统（美国 Thermo）；PowerPac HC 蛋白电泳系统（美国 BIO-RAD）；TS2 倒置显微镜（日本 Nikon）；3-18K 离心机（美国 Sigma）；XFH-40CA 高压灭菌锅（绍兴景迈仪器）；Pymol 软件（Delano Scientific LLC）；Auto Dock Tools 1.5.6（http：//mgltools.scripps.edu/）。

2　方法

2.1　衍生物的合成

在课题组前期合成方法的基础上总结、优化步骤[24]。首先，将 3，4，5- 三甲氧基苯基乙酮 3.15 g（15.00 mmol）与 NBS 5.34 g（30.00 mmol）加入无水乙醇中，水浴 45 ℃下反应 5 h，得到 2- 溴 -1-（3，4，5- 三甲氧基苯基）乙酮。其次，将 2- 羟基 -4- 甲氧基苯甲醛 152.00 mg（1.00 mmol）与 NIS 225.00 mg（1.00 mmol）在乙腈中室温反应 10 h，得到 2- 羟基 -5- 碘 -4- 甲氧基苯甲醛。再次，将 2- 溴 -1-（3，4，5- 三甲氧基苯基）乙酮 1.44 g

（5.00 mmol）、2- 羟基 -5- 碘 -4- 甲氧基苯甲醛 1.43 g（5.00 mmol）和 K_2CO_3 1.38 g（10.00 mmol）在丙酮中 70 ℃下加热回流，得到（5- 碘 -6- 甲氧基 - 苯并呋喃 -2- 基）（3，4，5- 三甲氧基苯基）甲酮。最后，将（5- 碘 -6- 甲氧基 - 苯并呋喃 -2- 基）（3，4，5- 三甲氧基苯基）甲酮 0.47 g（1.00 mmol）与 Et_3N 0.30 g（3.00 mmol）、$PdCl_2(PPh_3)_2$ 0.06 g（0.08 mmol）、3，5- 二氟苯乙烯 4.00 mmol 于 DMF 3 mL 中，60 ℃下加热回流 24 h，得到衍生物，经氢谱、碳谱、质谱进行结构表征。

2.2　MTT 实验

MDA-MB-231 细胞以 5×10^3 的密度铺于 96 孔板中，选用 Alpelisib 为阳性对照（Alpelisib 属于已上市的 PI3K 抑制剂。衍生物在 PI3K 靶点活性设计上参考了 Alpelisib 分子结构中的有效基团。因此选用 Alpelisib 为阳性对照药），化合物干预 48 h 后，加入 10 μL MTT 溶液，继续孵育 4 h，吸弃孔内液体，加入 100 μL DMSO，酶标仪中振荡 1 min，570 nm 波长处测定吸光度值，计算增殖抑制率，并计算 IC_{50}。

2.3　细胞形态

将 MDA-MB-231 细胞均匀接种于 6 孔板，用不同浓度衍生物（5、25、50 μmol • L^{-1}）及 Alpelisib（15 μmol • L^{-1}）干预细胞 24 h 后，倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

2.4　细胞周期实验

将细胞均匀接种于 6 孔板，实验干预细胞 48 h 后，收集细胞，加入预冷的 75% 乙醇置于－ 20 ℃冰箱固定过夜。次日，离心去上清液，加入 PI/RNase 染色缓冲液 400 μL，室温下避光反应 30 min，样品经滤网过滤至流式管后检测。

2.5　衍生物分子对接

利用 AutoDockTools.1.5.6 半柔性对接配体和受体，设置算法为遗传算法（Genetic Algorithm），对接次数设置为 50 次，最大迭代次数设置为 2 500 000，种群数目设置为 150，其余数值均采用系统默认数值，通过将衍生物分子配体与受体蛋白 PI3K*α*（PDB ID：4waf，见图 2）对接后得到结合自由能数据。

2.6　衍生物 ELISA 实验

将细胞接种于 96 孔板，实验干预 24 h 后，收集上清液于 1.5 mL 无菌管，严格按照说明书使用双抗体夹心法测定细胞上清液中 PI3K 分泌量。

2.7　Real-Time PCR（RT-PCR）法靶点基因检测

实验干预后，提取细胞总 RNA，纯度测定后逆转录为 cDNA。*PI3K* 和 *β-actin* 引物序列见表 1。按照 Applied Biossytems 7500 Fast R-T PCR System 和 Step One Plus R-T PCR System 操作，在冰上操作，加入引物及扩增试剂。两步法 PCR 扩增标准程序为：预变性 95 ℃，30 s；延伸 95 ℃，5 s，40 个循环，退火 60 ℃，34 s。反应结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算分析。

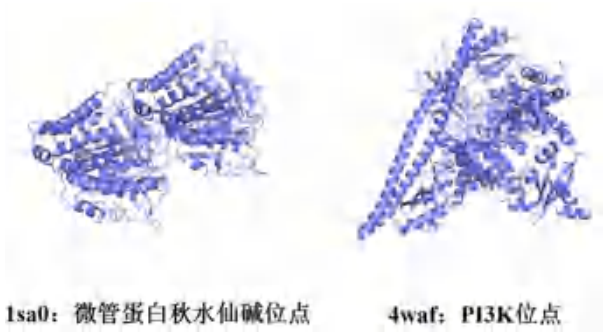

图 2　受体蛋白 PI3K*α*（PDB ID：4waf）

Fig 2　Receptor protein PI3K*α*（PDB ID：4waf）

表 1　引物序列

Tab 1　Primer sequence

引物名称	引物序列
PIK3CB	上游 5'-ATCGCTCTGGCCTCATTGAAGTTG-3'
	下游 5'-ATGGCTCGGTCCAGGTCATCC-3'
β-actin	上游 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'
	下游 5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'

2.8　Western blot 法检测 PI3K 蛋白表达

将对数生长期的细胞接种在 100 mm 培养皿中，实验干预后，加入 200 μL RIPA 裂解液，刮刀辅助刮下细胞，转移至离心管中，于冰上裂解 30 min 后，15 000 r • min^{-1} 离心 10 min，收集上清液，采用 BCA 法测定并调整蛋白质浓度，加入 SDS-PAGE loading buffer，金属浴 10 min 变性，上样电泳、电转，将蛋白转至 PVDF 膜上，5% 的脱脂乳奶粉封闭 2 h，一抗 4 ℃结合过夜。次日加入二抗结合 2 h，洗涤后加入发光液显影。

2.9　数据分析

使用 SPSS 27.0.10 软件处理相关数据，结果用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较使用单因素方差分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　衍生物的结构表征

（*E*）-1-（3，5- 二氟苯基）-2-（6- 甲氧基 -2-（1-（3，4，5- 三甲氧基苯基）乙烯基）苯并呋喃 -5- 基）乙烯，黄色粉末，产率 52.9%，m.p.194 ～ 196 ℃；^{1}H NMR δ: 7.50（s，1H，H-7），8.05（s，1H，H-4），7.85（s，1H，H-3），7.29（s，2H，H-2'，6'），7.57（d，J = 19.8 Hz，1H，C = C-H，H-9），7.25（d，J = 19.8 Hz，1H，C = C-H，H-10），7.35（s，1H，

H-12），7.12（s，1H，H-14），7.35（s，1H，H-16），3.99（s，3H，-OCH_3），3.90（s，6H，-OCH_3），3.80（s，3H，-OCH_3）；^{13}C NMR δ：157.0（C-2），117.9（C-3），121.3（C-3a），123.7（C-4），120.1（C-5），151.3（C-6），95.1（C-7），158.8（C-7a），181.7（C-8），126.3（C-9），127.2（C-10），141.4（C-11），109.4（C-12），161.9（C-13，J_{CF} ＝ 245 Hz），102.1（C-14），161.9（C-15，J_{CF} ＝ 240 Hz），109.4（C-16），132.1（C-1'），106.7（C-2'，6'），152.8（C-3'，5'），141.6（C-4'），56.1（-2OCH_3），60.2（-OCH_3），56.4（-OCH_3）；ESI-MS，*m/z*：calculated for 481.1384，found 481.1459[M ＋ H]$^+$。

3.2　MTT 实验结果

本实验测定了不同化合物对乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 体外增殖抑制活性，结果见表 2。从整体来看，衍生物对两种肿瘤细胞均有一定抑制作用，IC_{50} 值＜ 10 μmol • L^{-1}，而对照药物 Alpelisib 效果欠佳，可能是其主要针对的是 HER2 阴性的晚期乳腺癌。因三阴性乳腺癌对常规内分泌和靶向治疗不敏感、预后差、易复发转移，较难治。因此，以三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为后续实验研究对象。

表 2　衍生物对 MCF-7 和 MDA-MB-231 的 IC_{50}

Tab 2　IC_{50} of compounds on MCF-7 and MDA-MB-231

化合物	IC_{50}/（μmol • L^{-1}）	
	MCF-7	MDA-MB-231
衍生物	3.88±0.34	5.78±0.52
Alpelisib	37.84±1.16	15.44±0.98

3.3　细胞形态变化

由图 3 可见，MDA-MB-231 属上皮细胞，细胞形态大部分为纺锤状，贴壁生长。随着衍生物浓度的递增，细胞数量逐渐减少，并出现细胞体积变小、皱缩、丧失原有细胞形态特征等现象。

3.4　细胞周期实验结果

由图 4 可见，对照药物 Alpelisib 干预后细胞 G_2 期的占比为 24.43%。而衍生物随着浓度的递增，G_2 期的占比从空白时的 14.49% 到干预后的 48.96%、74.47%、90.20%，增幅显著，阻滞明显。

3.5　衍生物与 4waf 的对接结果

前期研究发现，该衍生物与微管蛋白之间形成了 4 个氢键，其中距离≥ 3.0 Å 的较强氢键数量是 2 个，结合自由能为－ 41.4216 kJ • mol^{-1}，结合效果较好。进一步的研究显示，该衍生物与 4waf 蛋白的结合自由能为－ 36.4008 kJ • mol^{-1}，与 Alpelisib（－ 30.5432 kJ • mol^{-1}）相比，结合自由能更低，有作为 PI3K 抑制剂的潜质。对接结果进行可视化（见图 5），衍生物的 A 环上 C-4 位甲氧基的氧原子与 4waf 蛋白中的 VAL-448 形成了一个较强氢键（距离 3.3 Å），呋喃环上 C-6 的甲氧基上的氧原子与 SER-474 形成一个距离为 3.4 Å 的较强氢键。虽然衍生物与 PI3K 蛋白之间形成的氢键数量不多，但都为较强氢键，因此衍生物对 PI3K 结合力较强。同时，衍生物结构中的 3，5- 二氟苯基虽然并未与受体蛋白间形成氢键，但是起到疏水作用，能够增加分子的亲脂性，增强生物利用度。

3.6　衍生物 ELISA 实验结果

化合物干预后，测定细胞上清液中 PI3K 蛋白量，结果见表 3。衍生物干预后，PI3K 蛋白量减少，说明衍生物可以抑制 PI3K 的表达水平，并且在低浓度 5 μmol • L^{-1} 时更有效，与对照药物 Alpelisib 作用相当。

表 3　衍生物对上清液中 PI3K 表达水平的影响

Tab 3　Effect of the targeted compound on the PI3K

化合物	PI3K/（pmol • L^{-1}）
Control	19.1961±0.0256
衍生物 5 μmol • L^{-1}	16.3804±0.0987*
衍生物 25 μmol • L^{-1}	17.3379±0.1021
衍生物 50 μmol • L^{-1}	16.8206±0.0234
Alpelisib	16.2692±0.0018*

注：与 Control 比较，*P ＜ 0.05。

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

3.7　RT-PCR 结果

本实验以 *β-actin* 为内参，对 MDA-MB-231 细胞中 *PI3K* 的 mRNA 表达量进行了测定。结果如表 4 所示，衍生物干预后，*PI3K* 基因显现出浓度依赖性地下调，与空白对照相比，差异有统计学意义，浓度 50 μmol • L^{-1} 时作用与对照药 Alpelisib 相当。说明衍生物可以调控 *PI3K* 基因，抑制 *PI3K* mRNA 表达量。

表 4　衍生物对细胞 *PI3K* mRNA 表达水平的影响

Tab 4　Effect of the targeted compound on the *PI3K* mRNA

组别	*PI3K/β-actin*
Control	1.042±0.045
衍生物 5 μmol • L^{-1}	0.842±0.106*
衍生物 25 μmol • L^{-1}	0.638±0.078*
衍生物 50 μmol • L^{-1}	0.464±0.008*
Alpelisib	0.467±0.073*

注：与 Control 比较，*P ＜ 0.05。

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

3.8　Western blot 法检测 PI3K 蛋白表达

本实验以 GAPDH 为内参，对 MDA-MB-231 细胞中 PI3K 蛋白表达量进行了测定。结果如图 6 所示，衍生物可以下调 PI3K 的蛋白表达水平，并且具有一

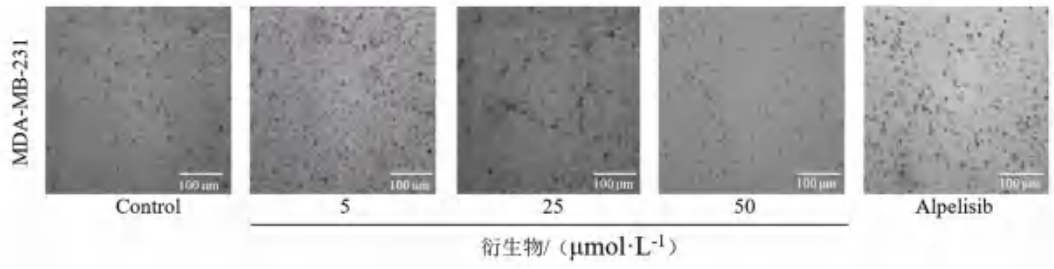

图 3　衍生物对 MDA-MB-231 细胞形态的影响

Fig 3　Effect of the targeted compound on the cell morphology of MDA-MB-231

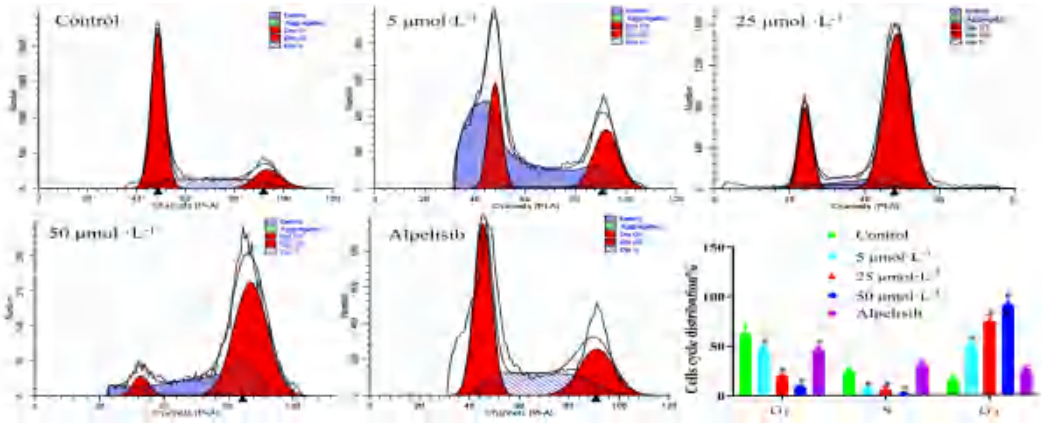

图 4　衍生物对细胞周期阻滞情况的影响

Fig 4　Effect of the targeted compound on the cell cycle block situation

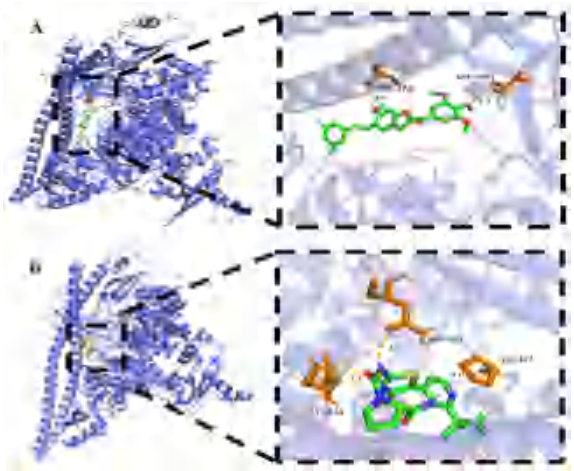

图 5　衍生物（A）及 Alpelisib（B）与 4waf 蛋白对接结果可视化

Fig 5　Docking visualization between the targeted compound（A）and Alpelisib（B）4waf protein

定的浓度依赖性，作用效果与对照药 Alpelisib 相当，与 PCR 和 ELISA 实验结果互相印证。

4　讨论

乳腺癌药物治疗一直存在毒副作用大、耐药、复发、转移等问题。结合集肿瘤信号通路中的核心靶点分子于一身的天然先导化合物的结构设计、修饰、改造，发现结构新型、多靶点、高效低毒的抗肿瘤小分子，成为当下新药研究一条热门路径。

PI3K 可催化磷脂酰肌醇分子磷酸化，在全身

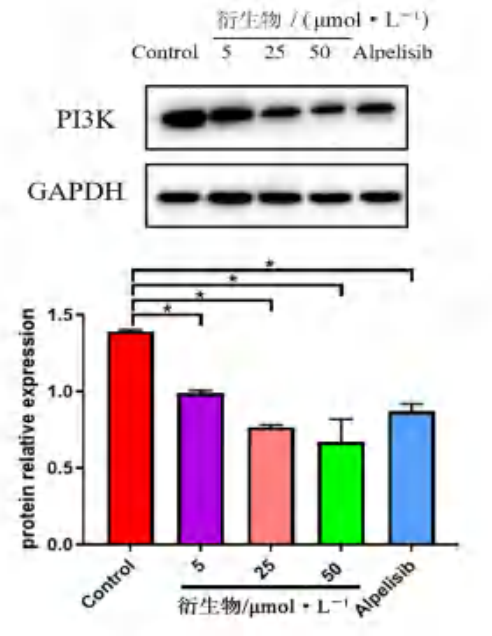

图 6　衍生物对细胞 PI3K 蛋白表达水平的影响（$^{*}P < 0.05$）

Fig 6　Effect of the targeted compound on the PI3K protein level（$^{*}P < 0.05$）

组织细胞中广泛表达，PI3K 分为 Class Ⅰ、Class Ⅱ和 Class Ⅲ，药物研发大多针对 Class Ⅰ PI3K。Class Ⅰ PI3K 的活性亚基 p110*α* 亚型的编码基因 *PIK3CA* 突变在实体瘤中是最常见的突变，它也是本实验分子对接的蛋白。PI3K/AKT/mTOR 是

PI3K 的关键肿瘤通路，PI3K 联合下游信号通路的双靶点抑制剂目前也在开发中，对于现存 PI3K 抑制剂暴露的不良反应大、肝毒性等问题，发现更具有针对性的亚型选择、性质优化、代谢途径改善、联合靶点、新适应证等可提供解决方案。

本研究对衍生物 1-（3，5- 二氟苯基）-2-（6- 甲氧基 -2-（1-（3，4，5- 三甲氧基苯基）乙烯基）苯并呋喃 -5- 基）乙烯进行全合成及 PI3K 靶点活性初步探究。衍生物通过下调 *PI3K* mRNA 的表达，从而减少 PI3K 蛋白表达量，细胞出现凋亡形态学改变，进一步引起细胞生长周期的 G_2 期阻滞，致使细胞增殖受到抑制。在本实验中，该衍生物显示出来的对 PI3K 的活性与阳性对照相比，作用相当。但是，因其自身兼具有的微管蛋白靶点活性，所以其总体药理活性较阳性药物更好。本研究仅在体外水平初步验证了衍生物的 PI3K 靶点活性，进一步的双靶点机制研究和体内活性探究将在后续持续进行。

参考文献

[1] Chhikara BS，Parang K. Global cancer statistics 2022：the trends projection analysis [J]. Chem Bio L，2023，10（1）：451.

[2] 黄香，蒋梦萍，包胜南，等 . 2021 年 CSCO《乳腺癌诊疗指南》更新要点解读 [J]. 中国肿瘤外科杂志，2021，13（3）：209-213.

[3] 邵志博，杨犇龙，吴炅 . 2022 年中国乳腺癌重要临床实验成果及最新进展 [J]. 中国癌症杂志，2023，33（2）：103-109.

[4] Hamze A，Alami M，Provot O. Developments of iso-combretastatin A-4 derivatives as highly cytotoxic agents [J]. Eur J Med Chem，2020，190（10）：112110-112129.

[5] Sahu A. Combretastatin derivatives as microtubule inhibitors of colchicines binding site [J]. Anti-Infective Agents，2022，12（3）：20-40.

[6] 范明月 . Combretastatin A-4（CA4）抑制乳腺癌细胞增殖和迁移侵袭作用的研究 [D]. 长春：吉林大学，2022.

[7] Naret T，Khelifi I，Provot O，et al. 1，1-diheterocyclic ethylenes derived from quinaldine and carbazole as new tubulin-polymerization inhibitors：synthesis，metabolism，and biological evaluation [J]. J Med Chem，2019，62（4）：1902-1916.

[8] Kamal A，Reddy NVS，Nayak VL，et al. Synthesis and biological evaluation of benzo[b]furans as inhibitors of tubulin polymerization and inducers of apoptosis [J]. Chem Med Chem，2014，9（1）：117-128.

[9] Kamal A，Lakshma NV，Nagesh N，et al. Benzo[b]furan derivatives induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human breast cancer cells [J]. Bioorg Chem，2016，66（6）：124-131.

[10] Islam S，Yoshioka K，Aki S，et al. Class Ⅱ phosphatidylinositol 3-kinase α and β isoforms are required for vascular smooth muscle Rho activation，contraction and blood pressure regulation in mice [J]. J Physiol Sci，2020，70：18.

[11] Aung K，Yoshioka K，Aki S，et al. The class Ⅱ phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2α and PI3K-C2β differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells [J]. J Physiol Sci，2019，69（2）：263-280.

[12] Martinez NG，Thieker DF，Carey LM，et al. Biophysical and structural characterization of novel RAS-binding domains（RBDs）of PI3Kα and PI3Kγ [J]. J Mol Biol，2021，433（8）：166838.

[13] Jia YJ，Yang QY，Wang YP，et al. Hyperactive PI3Kδ predisposes naive T cells to activation via aerobic glycolysis programs [J]. Cell Mol Immunol，2021，18（7）：15.

[14] López-Knowles E，O'Toole SA，McNeil CM，et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality [J]. Int J Cancer，2010，126（5）：1121-1131.

[15] Jrgensen JM，Smedby KE，Karin F，et al. Idelalisib in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma：results from a Nordic Lymphoma Group phase Ⅱ trial [J]. Brit J Haematol，2022，196（2）：437-440.

[16] Matasar MJ，Capra M，Ozcan M. Copanlisib plus rituximab versus placebo plus rituximab in patients with relapsed indolent non-Hodgkin lymphoma（CHRONOS-3）：a double-blind，randomised，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2021，22（6）：678-700.

[17] Adamek P，Heles M，Bhattacharyya A，et al. Dual PI3Kd/c inhibitor duvelisib prevents development of neuropathic pain in model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. J Neurosci，2022，10（9）：42-63.

[18] Leenhardt MJW. Alpelisib for the treatment of PIK3CA-mutated，hormone receptor-positive，HER2-negative metastatic breast cancer [J]. Expert Opin Pharmaco，2021，22（1a6）:9.

[19] Diane SA. FDA evaluating possible serious risks from umbralisib [J]. Am J Nurs，2022，122（6）：23.

[20] Liang YC，Hong WU，Xue HJ，et al. Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on acquired resistance to gefitinib of human lung adenocarcinoma H1975 cells [J]. J Huazhong U Sci-med，2013，33（6）：845-851.

[21] Rosenthal M，Clement PM，Campone M，et al. Buparlisib plus carboplatin or lomustine in patients with recurrent glioblastoma：a phase Ⅰb/Ⅱ，open-label，multicentre，randomised study [J]. ESMO Open，2020，5（4）：e000672.

[22] 高祎婷，丁茂鹏，马腾，等 . Combretastatin A-4 衍生物的设计、合成及抗乳腺肿瘤活性初探 [J]. 合成化学，2023，31（10）：749-760.

[23] Gao YT，Ma C，Feng XZ，et al. BF12，a novel benzofuran，exhibits antitumor activity by inhibiting microtubules and the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human cervical cancer cells [J]. Chem Biodivers，2020，17（3）：e1900622.

[24] Fan Y，Luo Y，Ma C. Synthesis and cytotoxic evaluation of combretastatin A-4 analogues of benzo[b]furans [J]. Monatsh Chem，2017，148：1823-1832.

（收稿日期：2023-09-12；修回日期：2023-10-24）

硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 通过抑制肺上皮细胞铁死亡缓解小鼠特发性肺纤维化进展的作用研究

吴趋荟，李妲，符艳，侯钰丛，张琴，金朝晖*（湖南中医药大学第一附属医院，长沙　410208）

摘要：目的　拟利用基因敲除小鼠和细胞系研究硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（SCD1）在特发性肺纤维化（IPF）中的作用及机制。**方法**　利用 SCD1 条件敲除小鼠和 BEAS-2B 细胞，比较 SCD1 敲除或敲低后组织学改变和铁死亡变化，并研究 PPARα 激动剂 Fenofibrate 对 SCD1 表达和对 IPF 的影响。**结果**　敲除 SCD1 会加重 IPF、上调纤维化相关蛋白水平并降低 GPX4 表达；敲低 SCD1 会提高脂质氧化水平、促进肺上皮细胞铁死亡，而 Fenofibrate 可上调 SCD1 表达，降低细胞铁死亡和 IPF 严重程度。**结论**　研究结果证实抑制 SCD1 会促进肺上皮细胞铁死亡、加重 IPF，而 Fenofibrate 可通过上调 SCD1 表达治疗 IPF。本研究将为防控 IPF 提供潜在靶点和候选药物。

关键词：特发性肺纤维化；铁死亡；硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1；Fenofibrate
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1141-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.006

Stearoyl-CoA desaturase 1 mitigates the progression of mouse idiopathic pulmonary fibrosis in mice by inhibiting ferroptosis of pulmonary epithelial cells

WU Qu-hui, LI Da, FU Yan, HOU Yu-cong, ZHANG Qin, JIN Zhao-hui* (*The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208)

Abstract: Objective　To determine the role and mechanism of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) with gene knockout mice and cell lines. **Methods**　SCD1 conditional knockout mice and BEAS-2B cells were used to compare the histological changes and ferroptosis alteration after SCD1 knockout or knockdown. The effect of the PPARα agonist Fenofibrate on SCD1 expression and its impact on IPF were also examined. **Results**　The knockout of SCD1 worsened IPF, upregulated the levels of fibrosis-related proteins, and decreased GPX4 expression. The knockdown of SCD1 increased the lipid oxidation levels, promoted ferroptosis of epithelial cells in the lung, while Fenofibrate upregulated SCD1 expression, reduced the cellular ferroptosis, and ameliorated the severity of IPF. **Conclusion**　SCD1 inhibition promotes the ferroptosis of epithelial cells in the lung, exacerbating IPF, while Fenofibrate can be used to treat IPF by upregulating the SCD1 expression. This study provides potential targets and candidate drugs for the prevention and control of IPF.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis; ferroptosis; stearoyl-CoA desaturase 1; Fenofibrate

特发性肺纤维化（idiopathic pulmonary fibrosis，IPF）是一种慢性进行性的间质性肺疾病，持续进展导致肺功能恶化，甚至死亡[1-4]。全球约有 500 万人患有 IPF，患者的平均中位生存期仅为 3 ～ 5 年[3]。环境刺激、药物不良反应和遗传因素是 IPF 的主要致病因素[5]。临床报告还显示，新型冠状

基金项目：湖南省卫健委重点项目（No. 202203023299）；长沙市自然科学基金项目（No. kq2202455）；湖南省教育厅科学研究项目（No. 22A0252）。

作者简介：吴趋荟，女，博士，主要从事肺疾病的基础研究和中医诊疗，email：qhwu@stu.hnucm.edu.cn　*通信作者：金朝晖，女，博士，硕士研究生导师，主要从事肺疾病的基础研究和中医诊疗，email：tlmtx321@126.com

病毒感染（COVID-19）患者可能在严重急性呼吸综合征冠状病毒 2（SARS-CoV-2）感染后出现肺纤维化反应，这可能成为 IPF 新的病因[6-8]。吡非尼酮（pirfenidone）和尼达尼布（nintedanib）是目前获批治疗 IPF 的药物，但这两种抗肺纤维化的药物均有明显的不良反应，并且仅具有缓解症状的作用[9]。因此，迫切需要确定新的治疗靶点，并开发新的治疗方法，以减缓疾病进展。

铁是人体不可或缺的微量元素，参与调节人体的许多生理活动[10-11]。然而，铁平衡紊乱可能导致多种病理性疾病，比如癌症、血色素沉着症、镰刀细胞病、纤维性肺疾病等[12-15]。越来越多的研究表明，肺部铁代谢紊乱与肺纤维化的发生和进展密切相关。一些临床研究观察到部分 IPF 患者的肺组织学样本中存在细胞外铁和巨噬细胞铁黄素沉积[16-18]。此外，在博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型中进一步发现，肺纤维化和功能下降也与异常铁超载有关[14]。铁超载与一种新型程序性细胞死亡形式——铁死亡（Ferroptosis）密切相关[19]。与其他细胞死亡相比，铁死亡是以特征性的铁依赖性的脂质体活性氧（ROS）积累为特征[19]。*GPX4* 是调控铁死亡的关键基因，*GPX4* 敲除小鼠表现出更严重的博来霉素诱导的 IPF，而在转基因小鼠中这种致病作用则被显著减轻[20]。Yatmark 等[21] 的研究进一步表明，肺部组织过量铁负荷会导致肺纤维化和肺泡上皮细胞损伤，而去铁胺等亚铁离子螯合剂可以减轻过量铁过载，降低铁死亡引起的肺损伤程度。这些研究表明，铁死亡可能在 IPF 的发生发展中发挥重要作用，探索、发现铁死亡参与 IPF 的潜在机制可能成为治疗该疾病的潜在治疗靶点；基于此研究新的治疗药物具有重要的临床意义。

硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1（SCD1）是一种新的铁死亡调控关键因子[22]。SCD1 是脂质代谢的关键酶之一，通过在酰基链的 delta-9 位引入顺式双键将饱和脂肪酸转化为单不饱和脂肪酸[23]。SCD1 主要作用于长链脂肪酰辅酶 A 底物，例如棕榈酰辅酶 A（16：0）和硬脂酰辅酶 A（18：0），从而产生棕榈酰辅酶 A（16：1）和油酰辅酶 A（18：1）。SCD1 催化反应的产物 16：1 和 18：1 不饱和脂肪酸是细胞膜的重要组成部分，有助于细胞膜的流动性和灵活性，对维持细胞膜的正常功能至关重要[23]。此外，它们还作为合成各种生物活性脂质介质（例如类二十烷酸和鞘脂）的前体，参与炎症、信号传导和细胞膜动力学[24]。近年来的研究发现，SCD1 介导的脂质代谢通过改变细胞脂质成分构成，打破饱和和不饱和脂肪酸之间的平衡导致细胞对铁死亡的易感性发生变化[25]。比如抑制 SCD1 可以改善细胞的铁死亡抗体，促进细胞死亡，从而在肝脏功能异常和多种肿瘤的治疗中发挥重要作用[25]。但 SCD1 在 IPF 中的作用及是否与其调控铁死亡相关还未有研究。

本研究基于 SCD1 的条件敲除小鼠和肺上皮细胞系，探讨了 SCD1 在 IPF 发展中的作用，并明确了它的功能与其调控上皮细胞铁死亡密切相关，为丰富 IPF 发生发展的病理机制、防控 IPF 提供潜在的靶向和治疗药物候选。

1 材料

正置显微镜（Axio Scope5，德国 Zeiss）；酶标仪（Multiskan Sky，美国 Thermo Scientific）。含 DAPI 的防褪色试剂（P36934，美国 Invitrogen）；Pierce BCA protein Assay Kit（23225，美国 Thermo Scientific）；PCR Mix（RK21203，中国 Abclonal）；CCK-8 试剂盒（C0037，中国 Beyotime）；Lipofectamine RNAiMAX（13778075，美国 Thermofisher）；Fenofibrate（S1794，日本 Selleck）；High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（K1622，美国 Thermo Scientific）；博来霉素（S1214，日本 Selleck）。

BEAS-2B 细胞（北纳生物公司，BNCC）。细胞在 37 ℃、95% 湿度和 5%CO_2 条件下，使用 Gibco 生物公司的 DMEM 添加 10% 胎牛血清（FBS）进行培养。

6 ～ 8 周的 SPF 级 Flox 小鼠（19 ～ 24 g），购自湖南斯莱克景达生物科技有限公司，动物合格证号：SCXK（湘）2019-0004。6 ～ 8 周 的 SPF 级 SCD1 Flox 小鼠（19 ～ 24 g），购自江苏赛业生物科技有限公司，动物合格证号：SYSL（苏）2020-1002。

2 方法

2.1 H&E 染色和组织学评分

肺组织采用 4% 多聚甲醛固定后用石蜡包埋，然后使用显微切片机切割 4 μm 厚度的切片，去蜡和脱水处理后，进行 H&E 染色。H&E 染色评分采用改良的 Ashcroft 评分，根据 IPF 严重程度赋值 0 ～ 8 分。

2.2 免疫荧光染色

石蜡包埋的样本切成 4 μm 厚的切片，将切片加热至 60 ℃处理 1 h，通过二甲苯洗涤去除石蜡，并使用不同浓度的乙醇进行脱水处理。在 96 ℃处理 20 min 的条件下，使用氢氧化钠柠檬酸缓冲液（10 mmol • L^{-1} 柠檬酸钠和 0.05% Tween 20，pH 6.0）进行抗原修复后，在切片上加入一抗抗体（按 1∶100 稀释）。切片经 PBS 洗涤两次以去除未结合的抗体，并与 Alexa Fluor 488 偶联的二抗在室温下孵育 45 min。然后，用 PBS

洗涤切片，并加入含 DAPI 的防褪色试剂（美国 Invitrogen）进行封片处理，拍照并记录。

2.3 免疫组化染色

拷片和脱蜡的步骤与免疫荧光染色类似。在冷却过程后，将 3%H_2O_2 涂在切片上，处理 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性。将适当浓度的一抗抗体加入切片中，在 4 ℃下孵育过夜。然后，用 PBS 洗涤切片 3 min，以去除未结合的一抗抗体。随后，加入生物素化的二抗抗体，在 37 ℃下孵育 40 min。再次用 PBS 洗涤切片 3 min。为了增强信号，加入三抗（SAB 复合物），在 37 ℃下孵育 40 min。为了可视化目标抗原，使用 3，3'-联苯胺（DAB）对切片进行染色，并用苏木精对比染色。观察 DAB 颜色的变化，并立即用自来水冲洗终止反应。切片用自来水冲洗，直到背景呈蓝色，通常需要大约 15 min。为了准备切片进行封装，采取以下脱水步骤：75% 乙醇脱水 3 min，95% 乙醇脱水 3 min，100% 乙醇两次脱水，每次 3 min，浸入剂Ⅱ脱水 3 min，浸入剂Ⅰ 脱水 3 min。最后，用中性胶封闭切片，观察并拍照。

2.4 Western blot

收集细胞或组织，用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液进行裂解以提取蛋白质。使用 Pierce BCA protein Assay 试剂盒测定总蛋白浓度。向含有 50 μg 总蛋白的裂解混合物中加入 5×SDS loading buffer，并在 95 ℃下加热 10 min。使用 12% 或 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，并转移到 0.2 μm 的硝基纤维素膜上。在室温下用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h 后，按照说明书孵育一抗和二抗。之后采用化学发光试剂盒检测条带信号。

2.5 Real time qPCR

将细胞采用 TRIzol RNA 提取试剂重悬，然后加入氯仿进行 RNA 提取。通过加入异丙醇沉淀 RNA，随后用 75% 乙醇洗涤，并最后在无核酶的水中溶解 RNA。使用 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 将 RNA 逆转录成 cDNA。在无核酶的 8 管带中加入 3 μL cDNA、6.2 μL 无核酶的水、0.4 μL 正向引物、0.4 μL 反向引物和 10 μL 2× 通用 SYBR Green 快速荧光定量 PCR Mix（中国 Abclonal）。将 8 管带放入 PCR 仪器中，根据说明书设定反应时间和温度，并启动反应。反应完成后，提取数据并使用相应软件进行分析。引物序列如下：TGF-β-F，ACGTGGAAATCAACGGGATCA；TGF-β-R，RGTTGGTATCCAGGGCTCTCC；IL-10-F，GTAGAAGTGATGCCCCAGGC；IL-10-R，CACCTTGGTCTTGGAGCTTATT；IL-13-F，CAACGGCAGCATGGTATGGA；IL-13-R，GGGAGGCTGGAGACCGTAGT；SCD1-F，GTGCCGTGGGCGAGG；SCD1-R，AGCCCAAAGCTCAGCTACTC。

2.6 CCK-8 实验

将细胞接种于 96 孔板过夜，根据实验设计分组并进行加药处理，处理完毕后，吸出原培养基。细胞活性采用 CCK-8 试剂盒检测，将混有 CCK-8 试剂的培养基加入 96 孔板中，37 ℃孵育 3 h，信号采用酶标仪检测，将获得的数据进行分析和统计。

2.7 siRNA 转染

将细胞种至 6 孔板或 6 cm 的培养皿中，并培养 24 h。在 1.5 mL 离心管中准备含有转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX、siRNA 以及 optimum medium 培养基的转染体系，孵育 30 min。将混合液加入细胞培养基并充分混合。转染后 48 min，细胞用于下一步处理。

2.8 博来霉素诱导 IPF 模型

取 8 周龄的 SCD1 Flox 和 SCD1 条件敲除小鼠（SCD1 cKO 小鼠），适应环境 2 周后，每周 5 日皮下注射博来霉素（6 U·kg^{-1} 体重），连续注射 4 周。小鼠喂养在无菌环境，实验经湖南中医药大学实验动物中心批准并严格执行。4 周后采用二氧化碳麻醉处死小鼠，取小鼠血液和肺组织用于下一步实验。

2.9 统计分析

所有数据均使用平均值 ± 标准误表示，并用 GraphPad Prism 8 软件分析。两组之间的显著性差异通过非配对的 Student's *t* 检验分析（如果符合正态分布和方差齐性，则使用参数检验，否则使用非参数检验），并使用单因素方差分析统计多个组之间的差异。*P* 值小于 0.05 则认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 构建 SCD1 条件敲除小鼠

参考图 1A 构建 SCD1 的条件敲除小鼠模型：gRNA 序列位于 SCD1 的 3 号外显子两侧，分别添加两个 loxP 位点（SCD1 Flox 小鼠）；在与表达细菌噬菌体 P1 的Ⅰ型拓扑异构酶（Cre）重组酶的工具鼠杂交后获得剪切 3 号外显子的条件敲除鼠（SCD1 cKO 小鼠）。对杂交获得小鼠采用 Southern blot 进行基因型鉴定，结果显示，获得了 3 只 Flox 小鼠和 3 只野生型小鼠（见图 1B）。为了证实肺组织的 *SCD1* 基因表达是否与鉴定结果一致，分别对获得的蛋白和 RNA 进行 Western blot 和 PCR 检测，均证实相较于 Flox 小鼠，cKO 小鼠的 SCD1 表达

几乎完全消失（见图 1C ～ 1D）。为了更直观地体现 SCD1 表达的差异，利用免疫荧光技术分别检测了 Flox 小鼠和 cKO 小鼠肺组织的 SCD1 表达，结果表明 cKO 小鼠的肺组织几乎不表达 SCD1。说明成功获得了 SCD1 cKO 小鼠，后续将对 SCD1 在 IPF 中的功能及机制进行研究。

3.2 条件敲除 SCD1 加重博来霉素诱导的 IPF 的严重程度

对条件敲除 SCD1 cKO 小鼠及其同窝 Flox 小鼠进行 IPF 造模，实验流程见图 2A。对肺组织进行 H&E 染色，发现 Flox 小鼠肺组织表现出典型的 IPF 表现，包括肺泡结构破坏、纤维化斑块或弥漫性纤维化以及炎症反应（见图 2B）。相较于 Flox 小鼠，条件敲除 SCD1 cKO 小鼠的肺部纤维化、炎症反应更为严重，对肺组织的组织学进行评分，发现条件敲除 SCD1 肺组织的病损程度显著增加（见图 2C）。之后，分别检测肺组织的纤维化标记蛋白 α-SMA 和 COL1A1 的表达，进一步证实 cKO 小鼠肺组织的纤维化明显加重（见图 2D ～ 2E）。这些结果共同表明，条件性敲除 SCD1 显著加重 IPF 的严重程度。

3.3 条件敲除 SCD1 加重博来霉素诱导的 IPF 模型鼠的 2 型炎症反应

检测 TGF-β、IL-10 和 IL-13 的 RNA 表达，发现 SCD1 cKO 小鼠 3 种炎症指标显著升高（见图 3A ～ 3C）。由于巨噬细胞在 IPF 进展中起到关键的作用，检测了 SCD1 表达对巨噬细胞数量的影响，结果表明敲除 SCD1 导致小鼠肺组织的巨噬细胞的数量明显增加（见图 3D），表明敲除 SCD1 导致肺组织 2 型炎症反应明显增强，与增强的肺纤维化正相关。

3.4 敲低肺上皮细胞的 SCD1 促进铁死亡

首先在小鼠模型上研究 SCD1 表达是否与铁死亡标记蛋白的表达相关，结果显示 SCD1 cKO 小鼠 GPX4 表达显著降低，提示铁死亡增加（见图 4A）。利用 siRNA 敲低肺上皮细胞 BEAS-2B 的 SCD1，结果证实 Si1 和 Si2 均能成功降低 SCD1 表达（见图 4B）。以 Erastin 诱导 BEAS-2B 细胞发生铁死亡，结果表明敲低 SCD1 联合 Erastin 处理显著抑制细胞活性（见图 4C）。检测细胞的丙二醛（MDA）水平反应脂质过氧化变化，结果显示敲低 SCD1 联合 Erastin 处理显著提高细胞脂质过氧化（见图 4D）。这些结果表明，敲低肺上皮细胞的 SCD1 促进铁死亡。

3.5 PPARα 激动剂 Fenofibrate 促进 SCD1 的表达，并降低肺上皮细胞的铁死亡

根据以上研究结果，猜想通过药物促进 SCD1 表达可能是成功治疗 IPF 的方式，故对能提高 SCD1 表达的药物进行药效验证。研究表明 PPARα 是促进 SCD1 表达的关键转录因子，而 Fenofibrate 是 PPARα 的激动剂。采用不同浓度的 Fenofibrate（10 ～ 40 μmol • L^{-1}）处理 BEAS-2B 细胞，检测细胞活性，结果表明 Fenofibrate 具有很好的安全性（见图 5A）。PCR 和 Western blot 分别检测细胞的 SCD1 RNA 和蛋白表达，发现 Fenofibrate 能以浓度依赖的方式提高其表达水平（见图 5B）。使用 Fenofibrate 可显著降低 Erastin 诱导的细胞死亡（见图 5C）。接着，为了证明 SCD1 的表达是由 PPARα 决定的，采用 siRNA 敲低 BEAS-2B 细胞的 PPARα，之后给予 Fenofibrate 处理，发现 Fenofibrate 并不能明显提高 siRNA 转染后的 SCD1 表达（见图 5D ～ 5E）。这些结果表明，Fenofibrate 通过促进 SCD1 的表达降低肺上皮细胞的铁死亡。

3.6 PPARα 激动剂 Fenofibrate 降低博来霉素诱导的 IPF 模型鼠的严重程度

在博来霉素诱导的 IPF 模型中应用 Fenofibrate，实验设计策略见图 6A。H&E 染色肺组织表明，Fenofibrate 可明显降低肺泡结构破坏、纤维化斑块或弥漫性纤维化以及炎症反应（见图 6B）。对肺组织采用免疫组化染色纤维化标记蛋白 α-SMA 和 COL1A1，发现 Fenofibrate 可显著降低 α-SMA 和 COL1A1 的表达水平（见图 6C ～ 6D）。对铁死亡的标记蛋白 GPX4 和 SLC7A11 进行免疫荧光染色，发现 Fenofibrate 可以显著提高 GPX4 和 SLC7A11 表达，提示 Fenofibrate 可能通过降低肺上皮细胞的铁死亡发挥治疗 IPF 的作用。

4 讨论与展望

IPF 发生发展的分子机制尚未完全理解，现有药物对 IPF 的治疗效果也不尽理想 [1]。作为一种由铁依赖性脂质过氧化驱动的新型程序性细胞死亡，铁死亡参与多种器官损伤、纤维化相关疾病的发展，例如缺血 / 再灌注损伤、药物引起的肾损伤、横纹肌溶解相关的肾损伤和慢性肝病中的肝损伤，以及 IPF 进展 [26-28]。本研究以博来霉素进行 IPF 小鼠造模，博来霉素的体内半衰期范围从几小时到 21 h 不等，它通过诱导上皮细胞损伤，引起上皮细胞程序性死亡，包括凋亡、自噬和铁死亡 [29-31]。以往的研究表明，在 IPF 患者的肺组织中，包括肺泡上皮细胞和间充质细胞在内的细胞均存在明显的凋亡，凋亡导致肺组织正常结构和功能逐渐丧失 [32-33]；并可能通过释放炎性介质和细胞因子如 IL-1β、TNF-α 来引发炎症反应，

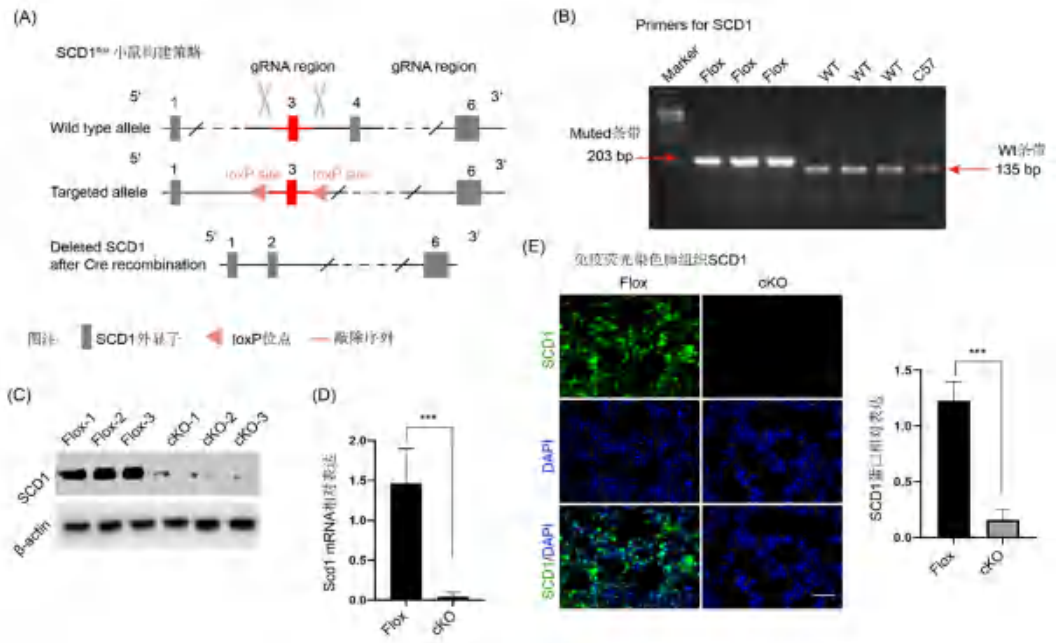

图 1　SCD1 条件敲除小鼠构建（$^{***}P < 0.001$）

Fig 1　Generation of SCD1 conditional knockout mice（$^{***}P < 0.001$）

A. SCD1 Flox 小鼠的构建策略和经 Cre 重组酶后基因序列（construction strategy for SCD1 Flox mice and gene sequence after Cre recombinase）；B. Southern blot 检测各小鼠的基因型，SCD1 突变型引物对的产物大小为 203 bp，野生型产物大小为 135 bp（Southern blot of genotypes in Flox and WT mice；the stripe size is 203 bp and 135 bp for muted and WT primers）；C. cKO 和 Flox 小鼠的 SCD1 蛋白表达（SCD1 protein expression in cKO and Flox mice）；D. cKO 和 Flox 小鼠的 SCD1 mRNA 表达水平（SCD1 mRNA in cKO and Flox mice）；E. 肺组织的 SCD1 表达及蛋白表达的相对定量（SCD1 in the lung tissue and relative quantification of protein expression）

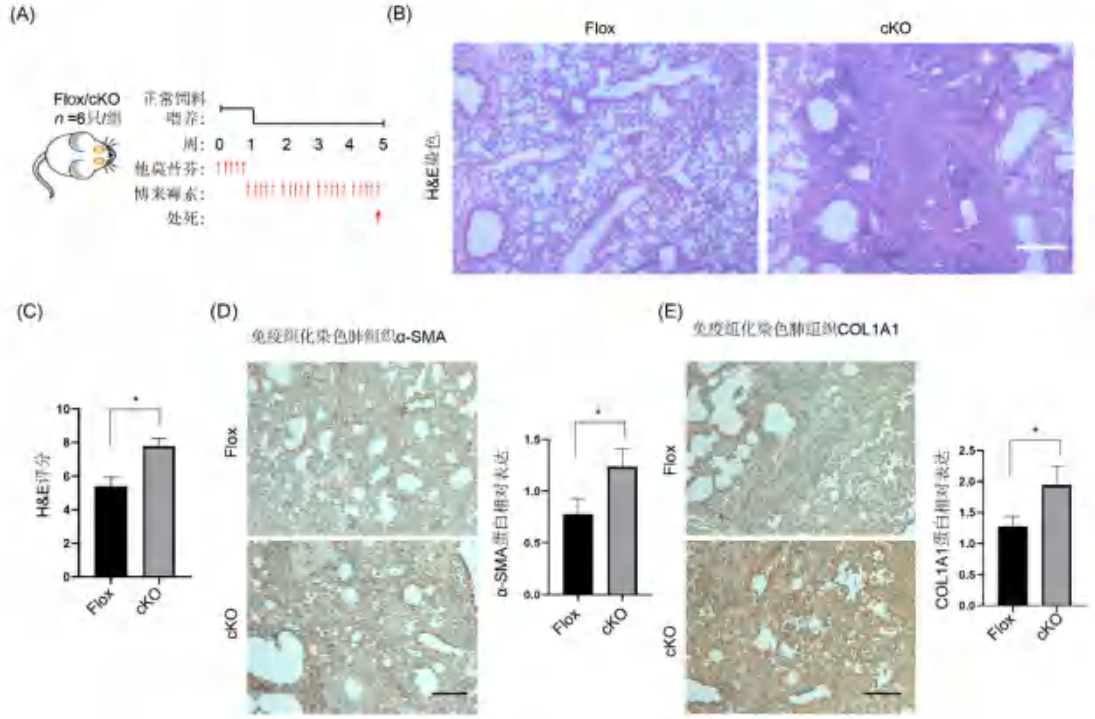

图 2　SCD1 条件敲除对 IPF 进展的影响（$^{*}P < 0.05$）

Fig 2　Effect of SCD1 conditional knockout on IPF progression（$^{*}P < 0.05$）

A. IPF 小鼠模型构建流程图（construction of IPF mouse model）；B. H&E 染色 cKO 和 Flox 小鼠肺组织（H&E staining of the lung tissue in cKO and Flox mice）；C. cKO 和 Flox 小鼠肺组织的组织学评分（histological scoring of the lung tissue in cKO and Flox mice）；D. 肺组织的 α-SMA 表达及半定量（α-SMA expression in lung tissue and semi-quantification）；E. 肺组织的 COL1A1 表达及半定量（COL1A1 expression in the lung tissue and semi-quantification）

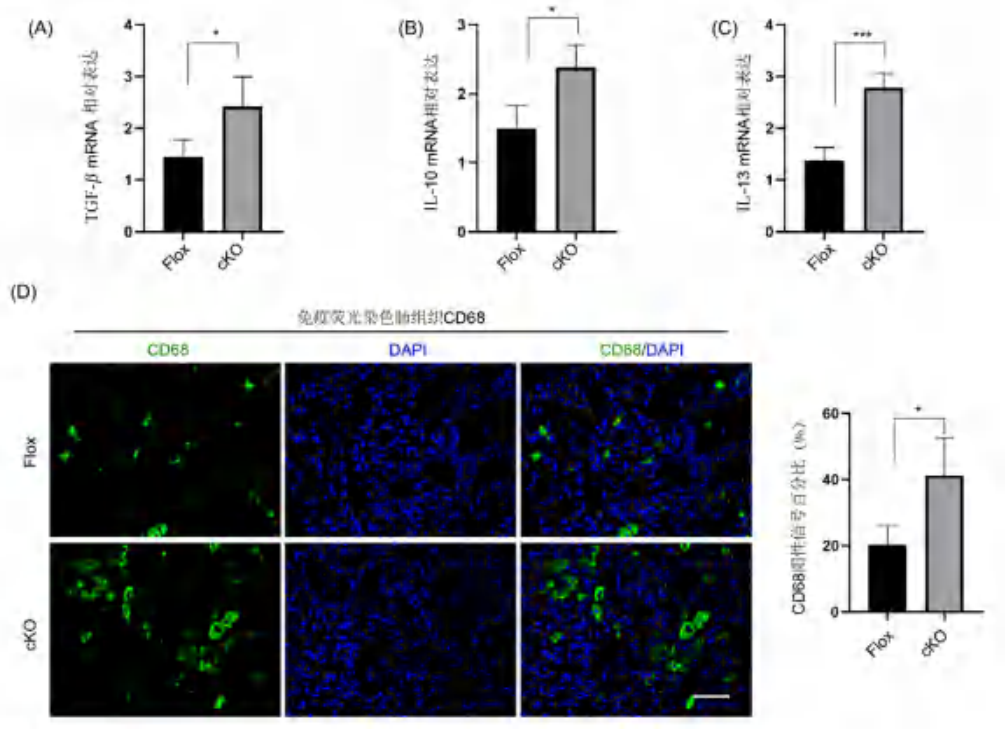

图 3 敲除 SCD1 对 IPF 模型鼠的 2 型炎症反应的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 3 Effect of SCD1 knockout on type 2 inflammation in the IPF mouse model ($^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$)

A. 肺组织的 TGF-β mRNA 表达（TGF-β mRNA expression in the lung tissue）；B. 肺组织的 IL-10 mRNA 表达（IL-10 mRNA expression in the lung tissue）；C. 肺组织的 IL-13 mRNA 表达（IL-13 mRNA expression in the lung tissue）；D. 肺组织的 CD68 表达及半定量分析（CD68 in the lung tissue and the semi-quantitative analysis）

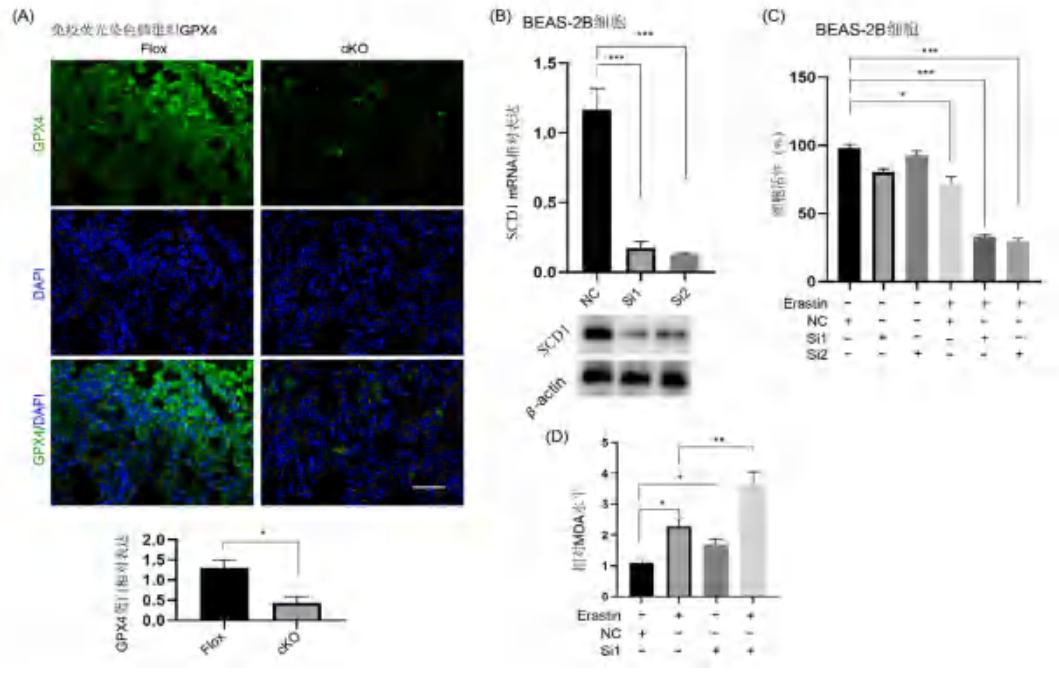

图 4 敲低肺上皮细胞的 SCD1 对铁死亡的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 4 Effect of knockdown of SCD1 in lung epithelial cells on ferroptosis ($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$)

A. 肺组织的 GPX4 表达及阳性信号半定量分析（GPX4 expression in lung tissue and positive signals quantified after semi-quantitative analysis）；B. BEAS-2B 细胞分别采用两条 SCD1 siRNA 敲低，48 h 后检测细胞 RNA 和蛋白表达（BEAS-2B cells transfected with two different SCD1 siRNAs，and mRNA and protein expression assessed after 48 hours）；C. CCK-8 检测细胞活性（cell viability examined by CCK-8 assay）；D. MDA 试剂盒检测细胞的 MDA 水平（MDA levels measured with MDA assay kit）

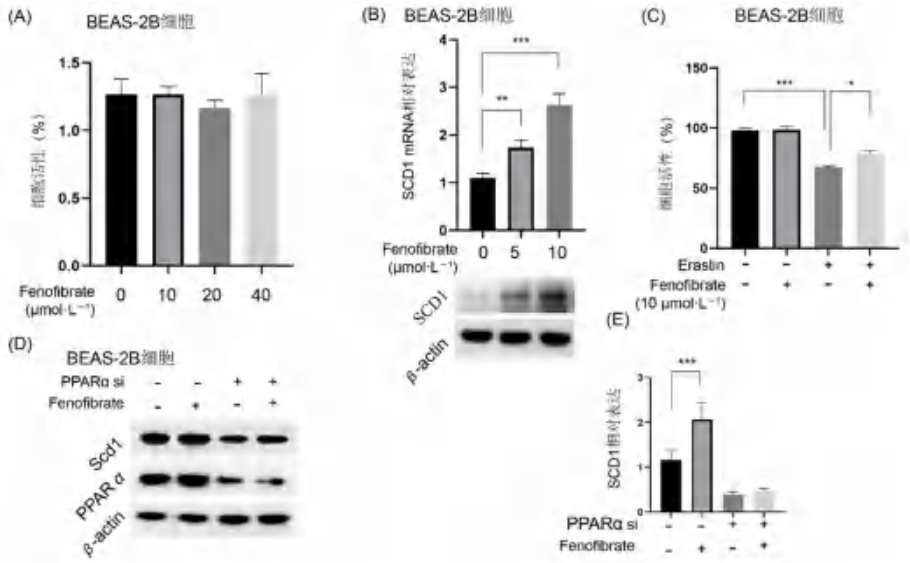

图 5　Fenofibrate 对 SCD1 的表达及肺上皮细胞的铁死亡的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 5　Effect of Fenofibrate on SCD1 expression and ferroptosis in lung epithelial cells（$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）

A. CCK-8 检测细胞活性（cell viability examined by a CCK-8 assay）；B. qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞 RNA 和蛋白表达（mRNA and protein expression assessed by qRT-PCR and Western blot）；C. CCK-8 检测 Fenofibrate 对 Erastin 诱导细胞铁死亡的影响（effect of Fenofibrate on Erastin-induced ferroptosis in cells was evaluated by a CCK-8 assay）；D ～ E. SCD1 和 PPAR*α* 的蛋白表达（protein expression of SCD1 and PPAR*α*）。

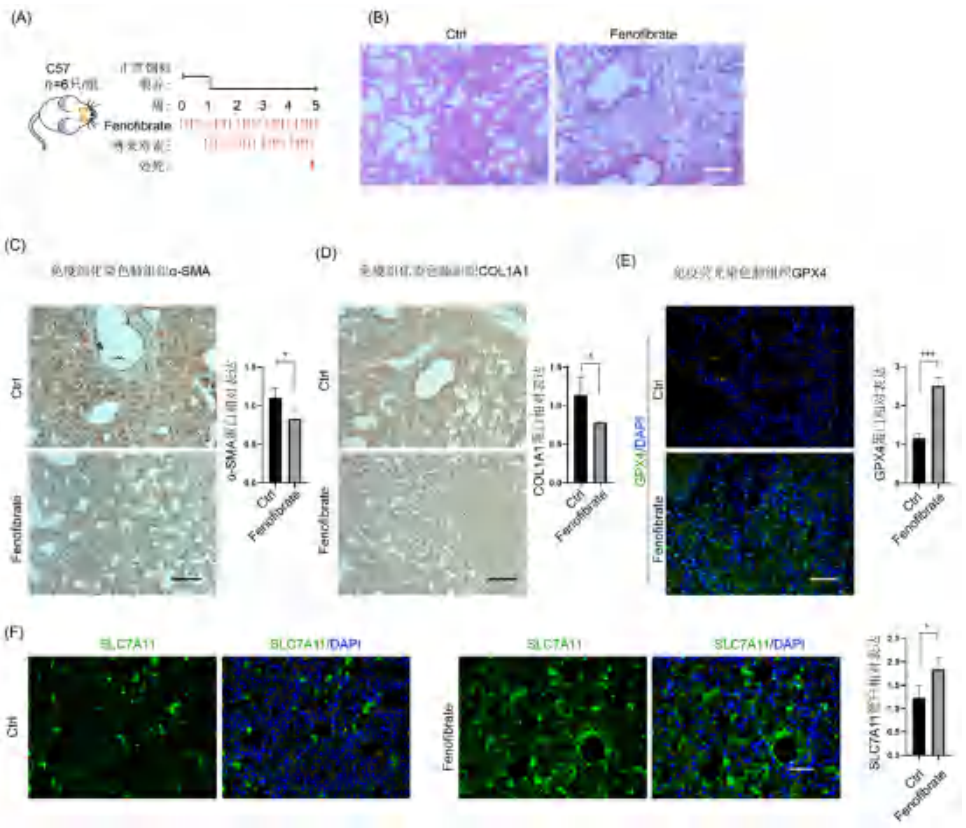

图 6　Fenofibrate 对博来霉素诱导的 IPF 严重程度的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 6　Effect of Fenofibrate on reduces the severity of bleomycin-induced IPF mouse model（$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）

A. IPF 小鼠处理和模型构建流程图（illustrating the treatment and model construction of the IPF mice）；B. H&E 染色对照组和 Fenofibrate 处理组小鼠肺组织（H&E staining of lung tissue in the control group and Fenofibrate-treated group）；C. 肺组织的 *α*-SMA 表达及半定量分析（*α*-SMA expression in lung tissue and semi-quantification）；D. 肺组织的 COL1A1 表达及半定量分析（COL1A1 expression in lung tissue and semi-quantification）；E. 肺组织的 GPX4 表达及半定量分析（GPX4 expression in lung tissue and semi-quantification）；F. 肺组织的 SLC7A11 表达及半定量分析（SLC7A11 expression in lung tissue and semi-quantification）

从而加速肺纤维化的进展[33]。另一方面，自噬在IPF发展中具有多种作用：如自噬可以清除细胞内的异常蛋白聚集和氧化应激产物，减轻细胞的应激和损伤；或者可能通过调节细胞外基质的合成和降解来维持肺组织的平衡，从而影响纤维化的发展；还可能在肺纤维化中加重炎症反应、促进免疫应答[34-35]。本研究利用SCD1条件敲除小鼠证实，SCD1通过抑制肺上皮细胞铁死亡延缓IPF进展，通过PPARα激动剂上调SCD1表达可以起到促进SCD1转录，提高其表达，降低肺组织脂质体ROS水平和铁死亡，发挥治疗IPF的作用。

近年来，铁死亡的分子机制和致病机制研究取得了重大进展，脂质代谢和相关信号通路已被确定为诱导铁死亡的关键环节[36]。脂质过氧化有三个阶段：启动、扩散和终止。在启动阶段，ROS、活性氮（RNS）和活性脂质物质（RLS）从磷脂中提取一个氢原子，形成一个脂质自由基；在扩散阶段，氧与脂质自由基反应，形成过氧基自由基，并与联烯碳中的氢原子形成新的脂质自由基和脂质过氧化物；当两个脂质自由基或过氧基自由基浓度增高并相互作用或与内源性抗氧化剂（如维生素E或谷胱甘肽）发生反应，导致一个氢原子形成稳定的非自由基产物时，扩散结束，终止阶段开始[37]。在亚铁离子过载的情况下，致死性脂质体过氧化物会转化为烷氧自由基，随后与相邻的多不饱和脂肪酸反应，引发另一个脂质自由基链反应。在RSL3诱导的铁死亡中，GPX4无法消除过量的致死性脂质体过氧化物，导致脂质过氧化的扩散阶段无法进展到终止阶段[38]。致死性脂质体过氧化物的积累会降解成羟基脂肪酸或反应性有毒醛类化合物，如MDA和4-羟基-2-非烯醛（4-HNE）[39]。这些活性脂质物质可以激活脂质过氧化，通过修饰关键蛋白质来调控细胞信号事件，或引起毒性并启动细胞死亡级联反应。研究表明，SCD1过表达提高不饱和脂肪酸水平，诱导对铁死亡的抗性，靶向SCD1来显著提高RSL3诱导的铁死亡[40-41]。SCD1是催化饱和脂肪酸转化为单不饱和脂肪酸的关键酶，该酶促反应对于油酸和棕榈油酸等单不饱和脂肪酸的合成至关重要[42]。本文研究证实肺上皮细胞的SCD1表达水平与其脂质过氧化水平和铁死亡密切相关，敲除SCD1或抑制SCD1表达均明显加重铁死亡和促进IPF进展。

PPARα是一种核受体，在脂肪酸分解代谢较高的组织中（例如肝脏、心脏和骨骼肌）高表达，在调节脂质代谢和炎症中发挥着至关重要的作用[43]。研究表明PPARα和IPF进展存在潜在关联，采用药物激活PPARα可抑制IPF实验小鼠模型的纤维化进展[44]。从机制来看，激活PPARα可抑制促炎细胞因子如IL-1β、IL-6的产生并减少炎症细胞的募集，从而减轻肺部炎症[45]。此外，研究同时发现PPARα激活可调节成纤维细胞的分化和激活，成纤维细胞是IPF中参与过量胶原蛋白生成的关键细胞[46]。本研究进一步发现，采用Fenofibrate激活肺上皮细胞的PPARα促进SCD1表达，从而降低铁死亡，为促进PPARα激动剂应用于IPF治疗提供了理论支持。

综上，本研究利用SCD1条件敲除小鼠和肺上皮细胞系证实了SCD1通过抑制铁死亡降低IPF的进展；PPARα激活剂Fenofibrate通过促进SCD1转录、提高其表达水平、抑制铁死亡，从而发挥治疗IPF的作用。

参考文献

[1] Richeldi L，Collard HR，Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet，2017，389（10082）：1941-1952.

[2] Kinoshita T，Goto T. Molecular mechanisms of pulmonary fibrogenesis and its progression to lung cancer：a review [J]. Int J Mol Sci，2019，20（6）：1461.

[3] Podolanczuk AJ，Thomson CC，Remy J，et al. Idiopathic pulmonary fibrosis：state of the art for 2023 [J]. Eur Respir J，2023，61（4）：2200957.

[4] 曹孟淑，蔡后荣 . 2018 年特发性肺纤维化临床诊断指南解读 [J]. 中国实用内科杂志，2019，39（5）：431-436.

[5] Cui FP，Sun Y，Xie JQ，et al. Air pollutants，genetic susceptibility and risk of incident idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir J，2023，61（2）：2200777.

[6] Cilli A，Hanta I，Uzer F，et al. Characteristics and outcomes of COVID-19 patients with IPF：a multi-center retrospective study [J]. Respir Med Res，2022，81：100900.

[7] Al-kuraishy HM，Batiha GE，Faidah H，et al. Pirfenidone and post-Covid-19 pulmonary fibrosis：invoked again for realistic goals [J]. Inflammopharmacology，2022，30（6）：2017-2026.

[8] 王美华，康区欧，王志强，等 . 2022 版成人特发性肺纤维化和进展性肺纤维化临床实践指南解读 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2022，21（6）：381-385.

[9] Lancaster LH，De Andrade JA，Zibrak JD，et al. Pirfenidone safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir Rev，2017，26（146）：170057.

[10] Bayele HK，Balesaria S，Srai SK. Phytoestrogens modulate hepcidin expression by Nrf2：implications for dietary control of iron absorption [J]. Free Radical Bio Med，2015，89：1192-1202.

[11] Jiang L，Wang JM，Wang K，et al. RNF217 regulates iron homeostasis through its E3 ubiquitin ligase activity by modulating ferroportin degradation [J]. Blood，2021，138（8）：689-705.

[12] Bogdan AR，Miyazawa M，Hashimoto K，et al. Regulators

of iron homeostasis：new players in metabolism，cell death，and disease [J]. Trends Biochem Sci，2016，41（3）：274-286.
[13] Pierangelo A. Hereditary hemochromatosis：pathogenesis，diagnosis，and treatment [J]. Gastroenterology，2010，139（2）：393-408.
[14] Ali MK，Kim RY，Brown AC，et al. Critical role for iron accumulation in the pathogenesis of fibrotic lung disease [J]. J Pathol，2020，251（1）：49-62.
[15] Ali MK，Kim RY，Karlm R，et al. Role of iron in the pathogenesis of respiratory disease [J]. Int J Biochem Cell B，2017，88：181-195.
[16] Moss BJ，Ryter SW，Rosas IO. Pathogenic mechanisms underlying idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Annu Rev Pathol，2022，17：515-546.
[17] Bargagli E，Refini RM，D'alessandro M，et al. Metabolic dysregulation in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Int J Mol Sci，2020，21（16）：5663.
[18] Zhao X，Kwan JYY，Yip K，et al. Targeting metabolic dysregulation for fibrosis therapy [J]. Nat Rev Drug Discov，2020，19（1）：57-75.
[19] Bayir H，Anthonymuthu TS，Tyurina YY，et al. Achieving life through death：redox biology of lipid peroxidation in ferroptosis [J]. Cell Chem Biol，2020，27（4）：387-408.
[20] Tsubouchi K，Araya J，Yoshida M，et al. involvement of GPx4-Regulated lipid peroxidation in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis [J]. J Immunol，2019，203（8）：2076-2087.
[21] Yatmark P，Morales NP，Chaisri U，et al. Effects of iron chelators on pulmonary iron overload and oxidative stress in β-thalassemic mice [J]. Pharmacology，2015，96（3-4）：192-199.
[22] Chen H，Qi QQ，Wu N，et al. Aspirin promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing mTOR/SREBP-1/SCD1-mediated lipogenesis in PIK3CA-mutatnt colorectal cancer [J]. Redox Biol，2022，55：102426.
[23] Pope ED，Kimbrouch EO，Vemireddy LP，et al. Aberrant lipid metabolism as a therapeutic target in liver cancer [J]. Expert Opin Ther Targets，2019，23（6）：473-483.
[24] Iizuka K，Takao K，Yabe D. ChREBP-mediated regulation of lipid metabolism：involvement of the gut microbiota，liver，and adipose tissue [J]. Front Endocrinol，2020，11：587189.
[25] Yi JM，Zhu JJ，Wu J，et al. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2020，117（49）：31189-31197.
[26] Friedmann 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.
[27] Gao M，Monian P，Quadri N，et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. Mol Cell，2015，59（2）：298-308.
[28] Capelletti MM，Manceau H，Puy H，et al. Ferroptosis in liver diseases：an overview [J]. Int J Mol Sci，2020，21（14）：4908.
[29] Della LV，Cecchettini A，Del RYS，et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction：from biological mechanisms to counteractions [J]. Pharmacol Res，2015，97：122-130.
[30] Miura Y，Lam M，Bourke JE，et al. Bimodal fibrosis in a novel mouse model of bleomycin-induced usual interstitial pneumonia [J]. Life Sci Alliance，2022，5（1）：e202101059.
[31] Katzen J，Beers MF. Contributions of alveolar epithelial cell quality control to pulmonary fibrosis [J]. J Clin Invest，2020，130（10）：5088-5099.
[32] Phan THG，Paliogiannis P，Nasrallah GK，et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Cell Mol Life Sci，2021，78（5）：2031-2057.
[33] Jones DL，Ligresti G. Survivin IPF：Targeting cellular metabolism to promote apoptosis in ipf fibroblasts [J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2019，60（1）：5-6.
[34] Racanelli AC，Kikkers SA，Choi AMK，et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease [J]. Autophagy，2018，14（2）：221-232.
[35] Yue YL，Zhang MY，Liu JY，et al. The role of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis：from mechanisms to therapies [J]. Ther Adv Respir Dis，2022，16：17534666221140972.
[36] Liang D，Minikes AM，Jiang X. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling [J]. Mol cell，2022，82（12）：2215-2227.
[37] Tang DL，Chen X，Kang R，et al. Ferroptosis：molecular mechanisms and health implications [J]. Cell Res，2021，31（2）：107-125.
[38] Ursini F，Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis：the role of GSH and GPx4 [J]. Free Radic Biol Med，2020，152：175-185.
[39] Chen X，Li JB，Kang R，et al. Ferroptosis：machinery and regulation [J]. Autophagy，2021，17（9）：2054-2081.
[40] Shintoku R，Takigawa Y，Yamada K，et al. Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3 [J]. Cancer Sci，2017，108（11）：2187-2194.
[41] Lin Z，Liu J，Long F，et al. The lipid flippase SLC47A1 blocks metabolic vulnerability to ferroptosis [J]. Nat Commun，2022，13（1）：7965.
[42] Piccinin E，Cariello M，Moshetta A. Lipid metabolism in colon cancer：role of liver x receptor（LXR）and stearoyl-coA desaturase 1（SCD1）[J]. Mol Aspects Med，2021，78：100933.
[43] Pawlak M，Lefebvre P，Staels B. Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism，inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol，2015，62（3）：720-733.
[44] Rui Y，Han XJ，Jiang AB，et al. Eucalyptol prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis and M2 macrophage polarization [J]. Eur J Pharmacol，2022，931：175184.
[45] Izadparast F，Riahi-zajani B，Yarmohammadi F，et al. Protective effect of berberine against LPS-induced injury in the intestine：a review [J]. Cell cycle，2022，21（22）：2365-2378.
[46] Kong D，Zhang ZL，Chen LP，et al. Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy [J]. Redox Bio，2020，36：101600.

（收稿日期：2023-09-26；修回日期：2023-12-31）

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的复方木鸡合剂化学成分解析研究

霍思奇[1]，王帅[1, 2, 3]，杨欣欣[1, 2, 3]，李天娇[1, 2, 3]，包永睿[1, 2, 3*]，赵琳[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 利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术解析复方木鸡合剂成分，为复方木鸡合剂质量控制提供依据。**方法** 复方木鸡合剂采用 Agilent Poroshell SB-C18 色谱柱（100 mm×4.6 mm，2.7 μm），流动相 0.1% 甲酸水 - 乙腈（正）；水 - 乙腈（负），梯度洗脱；流速 0.3 mL·min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 2 μL；采用电喷雾离子源，在正、负离子模式下，通过对照品比对，精确分子质量和二级质谱裂解规律对检测到的化学成分进行鉴定，结合文献报道，确定化学成分结构式。**结果** 鉴定出复方木鸡合剂中金雀花碱、苦参碱、没食子酸、绿原酸等 34 个化学成分，其中包括 11 个生物碱类、11 个有机酸类、5 个黄酮类、1 个萘醌类、1 个酚类、1 个核苷类、4 个其他类化合物，其中以有机酸类和生物碱类为主。**结论** 本实验阐明复方木鸡合剂中的组成成分，为其药效物质基础、质量控制和作用机制研究提供了实验基础。

关键词：UPLC-Q-TOF-MS/MS；复方木鸡合剂；成分解析

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1150-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.007

Chemical components analysis of compound Muji mixture based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology

HUO Si-qi[1], WANG Shuai[1, 2, 3], YANG Xin-xin[1, 2, 3], LI Tian-jiao[1, 2, 3], BAO Yong-rui[1, 2, 3*], ZHAO Lin[1, 2, 3*], MENG Xian-sheng[1, 2, 3] (1. *College of Pharmacy*, *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116600; 2. *Liaoning TCM Multi-Dimensional Analysis Technical Innovation Center*, *Dalian Liaoning* 116600; 3. *Liaoning Engineering Laboratory of Modern Chinese Medicine Research*, *Dalian Liaoning* 116600)

Abstract: Objective To determine the components in compound Muji mixture by UPLC-Q-TOF-MS/MS, and to provide a basis for the quality control of compound Muji mixture. **Methods** Compound Muji mixture was analyzed with Agilent Poroshell SB-C18 chromatography column (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) for gradient elution with the mobile phase of 0.1% formic acid water solution-acetonitrile solution as positive ion modes, water-acetonitrile solution as negative ion modes at a flow rate 0.3 mL·min^{-1}. The column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 2 μL. Electriospray ion (ESI) source was used in the analysis under the positive and negative ion modes. The detected chemical components were identified via comparison with reference materials, precise molecular weight, and fragmentation pathways by secondary mass spectrometry. Based on literature reports, the structural formula of the chemical components was determined. **Results** Totally 34 chemical components were identified in compound Muji mixture, including 11 alkaloids, 11 organic acids, 5 flavonoids, 1 naphthoquinone, 1 phenolic, 1 nucleoside, and 4 other compounds. Organic acids and alkaloids were the main components. **Conclusion** The compositions in compound Muji mixture are clarified, which provides an experimental

基金项目：辽宁省科技厅揭榜挂帅项目（No.2021JH1/10400058）。

作者简介：霍思奇，女，在读硕士研究生，主要从事药物分析与药物制剂研究，email：1432676452@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

basis for its pharmacodynamics, quality control and mechanism of action.
Key words: UPLC-Q-TOF-MS/MS; compound Muji mixture; component analysis

作为著名满药之一的复方木鸡合剂，源于传统满族医药的“木鸡汤”，由云芝提取物、菟丝子、山豆根、核桃楸皮四味中药组成。复方木鸡合剂凭借其清热固表、解毒除湿、扶正祛邪的功效，在临床上治疗湿热蕴结型肝炎、肝硬化、肝腹水、肝癌等各种肝病疗效显著[1-3]。有文献报道，复方木鸡合剂具有抑制甲胎蛋白持续升高的药理作用[1]。

关于复方木鸡合剂研究较少[2-3]，大多数研究报道多集中在药味相同，组方剂量不同的复方木鸡颗粒中。复方木鸡合剂作为复方木鸡颗粒的姊妹剂型，由于组方剂量不同，导致其化学物质存在一定差异。故本课题拟采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术，采用对照品比对、质谱解析等方法，开展复方木鸡合剂化学成分解析研究，明确其化学成分组成，为复方木鸡合剂进一步的药效物质基础、质量控制和作用机制等研究提供前期基础。

1　材料

1.1　仪器

6500 Q-TOF-MS 质谱仪、1290 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）。

1.2　药材与试药

复方木鸡合剂（批号：220601，丹东药业集团有限公司）；槐定碱、香草酸、咖啡酸、苦参碱（批号分别为：110784-202207、110776-201503、110885-201703、110805-202010，质量分数均大于 98%，中国食品药品检定研究院）；金雀花碱（批号：141207，质量分数大于 98%，成都普菲德生物技术有限公司）；绿原酸、丁香酸、原儿茶酸（批号分别为：wkq23022707、wkq21090106、wkq19011703，质量分数均大于 98%，四川维克奇生物科技有限公司）；没食子酸（批号：ZB201307；质量分数大于 98%，广州市齐云生物技术有限公司）；金丝桃苷（批号：519k022；质量分数大于 98%，北京索莱宝科技有限公司）。甲醇、乙腈、甲酸（质谱级，美国 Fisher 公司）；娃哈哈纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

2　方法与结果

2.1　供试品溶液的制备

精密吸取复方木鸡合剂 10 mL，置于具塞锥形瓶中，精密加入 40 mL 甲醇，超声处理 30 min 后，放冷，过滤，取续滤液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.2　对照品溶液的制备

精密称取金雀花碱、苦参碱、槐定碱、没食子酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、金丝桃苷、原儿茶酸对照品适量，置于 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3　色谱分析条件

Agilent Poroshell SB-C18 色谱柱（100 mm×4.6 mm，2.7 μm）；正离子模式流动相：0.1% 甲酸水（A）- 乙腈（B），负离子模式流动相：水（A）- 乙腈（B）；梯度洗脱程序（0 ～ 8 min，3%B；8 ～ 39 min，3% ～ 34%B；39 ～ 51 min，34% ～ 70%B）；流速 0.3 mL • min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 2 μL。

2.4　Q-TOF-MS 分析条件

电喷雾离子源；正、负离子模式；毛细管电压正离子模式 3500 V、负离子模式 4000 V；干燥气体流速 11 L • min^{-1}；干燥气体温度 150 ℃；雾化器压力 25 psi；鞘气流速 10 L • min^{-1}；碎裂电压 20 V；质量扫描范围 50 ～ 1500 *m*/*z*。

2.5　化学轮廓谱的构建与成分解析

运用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 软件，得到正、负离子模式下复方木鸡合剂化学轮廓谱并采用“2.3”项下色谱分析条件，“2.4”项下质谱分析条件，Auto MS/MS 扫描模式进行分析（见图 1），在正、负离子模式下共鉴定出 34 个化合物，并通过 TCMSP 数据库（https：//old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）结合参考文献[4-17]对药材进行归属，二级碎片、结构类型和药材归属等情况见表 1。其中化合物 **2**、**5**、**11**、**13**、**15**、**16**、**18**、**19**、**22**、**25**、**27**、**33** 经过对照品比对鉴定为没食子酸、金雀花碱、麦芽酚、绿原酸、苦参碱、槐定碱、原儿茶酸、香草酸、丁香酸、咖啡酸、对香豆酸、金丝桃苷，碎片裂解情况见图 2。化合物 **1**、**3**、**7**（**24**）、**12**、**14**（**23**）、**34**、**36** 通过 Pubchem 数据库（https：//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）、FoodB 数据库（https：//foodb.ca/）和 MassBank 数据库（https：//massbank.eu/MassBank/）比对，鉴定为奎宁酸、腺嘌呤、新绿原酸、单 -*O*- 没食子酰基 - 葡萄糖、隐绿原酸、异槲皮苷、芒柄花黄素，其余化合物均与参考文献进行比对。

2.6　复方木鸡合剂提取液中色谱峰的裂解特征

通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术检测到复方木鸡合剂中化学成分，通过对照品和文献比对，鉴定了复方木鸡合剂中 34 化合物结构，包括 11 个生物碱类、11 个有机酸类、5 个黄酮类、1 个萜醌类、1 个酚类、1 个核苷类、4 个其他类化合物。

表 1　复方木鸡合剂中的化学成分

Tab 1　Chemical components of compound Muji mixture

No.	t_R/min	分子式	离子模式	实测值（*m/z*）	理论值（*m/z*）	误差 / $\times10^{-6}$	碎片离子（*m/z*）	成分	结构类型	药材归属	文献
1	0.773	$C_7H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	191.0563	191.0561	−0.99	85.0296	奎宁酸	有机酸	菟丝子	Pubchem 数据库[4]
2	0.972	$C_7H_6O_5$	$[M-H]^-$	169.0155	169.0142	−7.14	125.0246、79.0191	没食子酸*	有机酸	核桃楸皮	[5]
3	1.184	$C_5H_5N_5$	$[M+H]^+$	136.0626	136.0618	−6.09	119.0351、109.0508、92.0245	腺嘌呤	核苷类	山豆根	MassBank 数据库[9]
4	1.416	$C_{12}H_{16}N_2O$	$[M+H]^+$	205.1335	205.1335	0.19	191.1177、146.0606、	*N*- 甲基野靛碱	生物碱类	山豆根	[6]
5	1.498	$C_{11}H_{14}N_2O$	$[M+H]^+$	191.1192	191.1179	−6.86	148.0761	金雀花碱*	生物碱类	山豆根	[7]
6	1.713	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	$[M+H]^+$	263.1763	263.1761	−3.40	243.1488	羟基化槐果碱	生物碱类	山豆根	[8]
7	2.047	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0881	353.0878	−0.83	191.0559、179.0347、135.0448	新绿原酸 /5- 咖啡酰奎宁酸	有机酸	菟丝子	Pubchem 数据库
8	2.061	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	$[M+H]^+$	265.1920	265.1911	−3.57	247.1811、219.1851、150.1280	羟基化苦参碱	生物碱类	山豆根	[8]
9	2.127	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	$[M+H]^+$	265.1920	265.1911	−3.57	247.1808、150.1279	14*α*- 羟基苦参碱	生物碱类	山豆根	[8]
10	2.259	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	$[M+H]^+$	265.1920	265.1911	−3.57	247.1810、150.1279	槐醇	生物碱类	山豆根	[8]
11	2.295	$C_6H_6O_3$	$[M-H]^-$	125.0248	125.0244	−3.06	79.0188、51.0237	麦芽酚*	酚类	山豆根	[9]
12	3.225	$C_{13}H_{16}O_{10}$	$[M-H]^-$	331.0676	331.0671	−1.60	211.0252、169.0141、125.0241、59.0140	单 -*O*- 没食子酰基 - 葡萄糖	其他	—	FoodB 数据库
13	3.470	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0881	353.0878	−0.83	191.0558	绿原酸*	有机酸	菟丝子	[10]
14	3.487	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0881	353.0878	−0.83	191.0555、179.0344、173.0453、135.0446	隐绿原酸 /4- 咖啡酰奎宁酸	有机酸	菟丝子	Pubchem 数据库
15	3.633	$C_{15}H_{24}N_2O$	$[M+H]^+$	249.1969	249.1961	−3.05	148.1123、150.1279	苦参碱*	生物碱类	山豆根、菟丝子	TCMSP 数据库[11]
16	3.798	$C_{15}H_{24}N_2O$	$[M+H]^+$	249.1969	249.1961	−3.05	176.1073、112.0755	槐定碱*	生物碱类	山豆根	[12]
17	3.964	$C_{15}H_{24}N_2O$	$[M+H]^+$	249.1969	249.1961	−3.05	176.1074、148.1124	槐定醇	生物碱类	山豆根	[12]
18	4.049	$C_7H_6O_4$	$[M-H]^-$	153.0193	153.0193	0.21	109.0293、53.0400	原儿茶酸*	有机酸	核桃楸皮、菟丝子	[17、14]
19	4.248	$C_8H_8O_4$	$[M-H]^-$	167.0352	167.0350	−1.30	65.0034、91.0191、108.0215、152.0108	香草酸*	有机酸	山豆根、核桃楸皮	[13]
20	5.072	$C_{15}H_{22}N_2O$	$[M+H]^+$	247.1815	247.1805	−4.09	179.1543、136.1121、150.1278、96.0808	槐果碱	生物碱类	山豆根	[8，11]
21	5.155	$C_{15}H_{22}N_2O$	$[M+H]^+$	247.1815	247.1805	−4.09	179.1547、150.1279、136.1122	7，11- 去氢苦参碱	生物碱类	山豆根	[8]
22	5.869	$C_9H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	197.0461	197.0455	−2.81	182.0241、166.9978、153.0554、138.0321、121.0291、106.0059	丁香酸*	有机酸	核桃楸皮	[17]
23	6.033	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0881	353.0878	−0.83	191.0558、179.0344	隐绿原酸 /4- 咖啡酰奎宁酸	有机酸	菟丝子	Pubchem 数据库[4]
24	6.134	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0881	353.0878	−0.83	191.0555、179.0345	新绿原酸 /5- 咖啡酰奎宁酸	有机酸	菟丝子	Pubchem 数据库[4]
25	6.349	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.0350	179.0350	−0.10	135.0448	咖啡酸*	有机酸	核桃楸皮、菟丝子、山豆根	TCMSP 数据库[4，13]
26	10.237	$C_{16}H_{18}O_8$	$[M-H]^-$	337.0929	337.0929	−0.03	119.9471	1，4，8- 三羟基萘 -1-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷	萘醌	核桃楸皮	[13]
27	10.684	$C_9H_8O_3$	$[M-H]^-$	163.0403	163.0401	−1.42	145.0290、119.0500、93.0340	对香豆酸*	有机酸	菟丝子	[14]
28	13.679	$C_{20}H_{20}O_{14}$	$[M-H]^-$	483.0782	483.0780	−0.35	271.0450、169.0133	1，6- 二没食子酰基 - 葡萄糖	其他	—	[15]
29	14.953	$C_{20}H_{20}O_{14}$	$[M-H]^-$	483.0782	483.0780	−0.35	313.0553	2，6- 二没食子酰基 - 葡萄糖	其他	—	[15]
30	15.813	$C_{21}H_{24}O_{13}$	$[M-H]^-$	483.1144	483.1144	0.03	271.0452、169.0131	4- 羟基 -2，6- 二甲氧基苯酚 -1-*O*-*β*-D-[6'-*O*-（3"，4"，5"- 三羟基苯甲酰）] 吡喃葡萄糖苷	其他	核桃楸皮	[8]

续表 1

No.	t_R/min	分子式	离子模式	实测值（*m/z*）	理论值（*m/z*）	误差 / $\times10^{-6}$	碎片离子（*m/z*）	成分	结构类型	药材归属	文献
31	17.170	$C_{27}H_{30}O_{17}$	$[M-H]^-$	625.1411	625.1410	−0.12	463.0834、301.0342	槲皮素 -3-*O*-*β*-D- 半乳糖 -7-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷	黄酮	菟丝子	[8]
32	19.516	$C_{27}H_{30}O_{13}$	$[M+H]^+$	563.1752	563.1759	1.27	417.1170、399.1063、297.0747	苦参醇 O	黄酮	山豆根	[8，10]
33	23.689	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.0881	463.0882	0.22	301.0312	金丝桃苷 *	黄酮	菟丝子	[10，16]
34	23.755	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.0881	463.0882	0.22	301.0319	异槲皮苷	黄酮	菟丝子	FoodB 数据库 [4]
35	32.143	$C_{16}H_{10}O_8$	$[M-H]^-$	329.0306	329.0303	−0.94	299.9858、271.9906	3，3'- 二甲氧基鞣花酸	有机酸	核桃楸皮	[17]
36	38.199	$C_{16}H_{12}O_4$	$[M-H]^-$	267.0664	267.0663	−0.44	252.0429、223.0396、195.0451、132.0214	芒柄花黄素	黄酮	菟丝子	FoodB 数据库 [8]

注（Note）：“*”为经对照品比对（“*” refers to the comparison of the reference substance）。

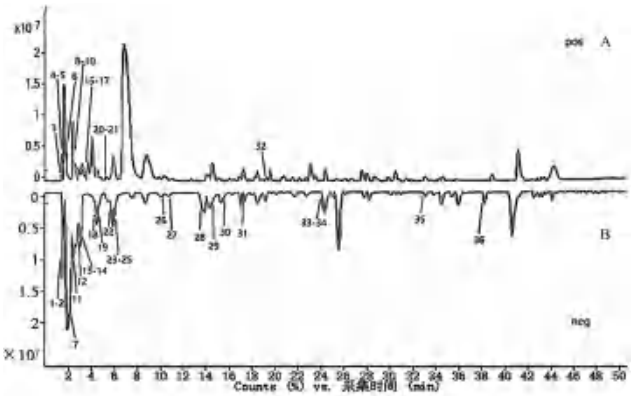

图 1　复方木鸡合剂正（A）、负（B）离子 BPC 图

Fig 1　BPC diagram of positive（A）and negative（B）ions in compound Muji mixture

2.6.1　生物碱类化合物鉴定　生物碱类化合物是复方木鸡合剂抗肝炎、肝癌的活性成分之一，例如金雀花碱具有抗肝癌的作用 [7，18-19]；苦参碱有抑制 *HBV* 基因的作用，可以抑制肿瘤生长 [3]；槐定碱作为苦参碱类生物碱也有抑制 *HBV* 基因的作用，同时还可以通过抗内毒素延缓肝硬化的形成 [20]。

在正离子模式下，共鉴定出 11 个生物碱类化合物，其中经对照品比对结合精准分子量确定的化合物有 3 个，分别是金雀花碱、苦参碱和槐定碱；通过特征二级离子碎片结合文献鉴定出羟基化槐果碱、羟基化苦参碱和槐果碱等 8 个化合物。在这个过程中，我们发现一个规律，大多数生物碱类化合物都经过四中心氢重排得到一个中间体，或者通过 RDA 裂解得到二级碎片离子，形成一个带正电荷的离子，例如苦参碱和槐果碱。以化合物金雀花碱、苦参碱、槐果碱为例，分析如下。

化合物 **5** 在正离子模式下，1.498 min 处可见 *m/z* 191.1192 $[M+H]^+$ 的准离子分子峰，其产生的特征二级离子碎片 *m/z* 148.0761，分子式为 $C_{11}H_{14}N_2O$。化合物 **1** 在正离子模式下丢失 1 个 C_2H_5N 生成 *m/z* 148.0761。通过对照品比对分析，确定化合物 **5** 为金雀花碱，其裂解规律如图 3 所示 [7]。

化合物 **15** 在正离子模式下，3.633 min 处有 *m/z* 249.1969 $[M+H]^+$ 的准离子分子峰，分子式为 $C_{15}H_{24}N_2O$。其产生的二级特征离子碎片为 *m/z* 150.1279、*m/z* 148.1123。化合物 **15** 通过四中心氢重排得到一个中间体，由此中间体发生断裂丢失 1 个 $C_2H_5NH_2$，在此基础上再丢失 1 个 C_2H_4 和一个 CO 形成一个双键得到碎片离子 *m/z* 148.1123。化合物 **15** 的中间体通过 RDA 裂解后丢失 1 个 CH_2NH 产生 *m/z* 150.1279。经对照品比对分析，确定化合物 **15** 为苦参碱，其裂解规律如图 4 所示 [11]。

化合物 **20** 在正离子模式下，5.072 min 处有 *m/z* 247.1815 的准分子离子峰，其产生的特征二级离子碎片为 *m/z* 179.1543、*m/z* 136.1121、*m/z* 150.1278、*m/z* 96.0808，分子式为 $C_{15}H_{22}N_2O$。化合物 **20** 在正离子模式下经过 RDA 裂解，丢失一个 C_4H_4O 得到碎片 *m/z* 179.1543；碎片 *m/z* 179.1543 丢失一个 C_2H_4NH 可得到碎片 *m/z* 136.1121，丢失一个 CH_2NH 可得到碎片 *m/z* 150.1278。二级离子碎片中 *m/z* 179.1543、*m/z* 136.1121、*m/z* 150.1278 都是母离子通过连续四中心氢重排反应后进一步裂解得到的产物，经数据库比对与文献查找，鉴定化合物 **20** 为槐果碱。裂解规律如图 5 所示 [11]。

2.6.2　有机酸类化合物鉴定　有机酸类成分没食子酸可以通过使线粒体膜电位降低来诱导肝癌细胞 HepG2 发生凋亡 [21]；咖啡酸可以有效抑制肝癌细胞侵袭转移以及肝癌血管生成 [22-23]；绿原酸作为咖啡酸与奎宁酸组成的化合物，具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤的生物活性，对抑制肝癌细胞生长及转移也有作用 [24]。

在负离子模式下，共鉴定出 11 个有机酸类化合物，其中经对照品比对结合精准分子量确定的化合物有 7 个，分别是没食子酸、绿原酸、原儿茶酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸和香草酸；通过特征二级离子碎片结合文献鉴定出隐绿原酸、新绿原酸和奎宁酸等 4 个化合物。此类化合

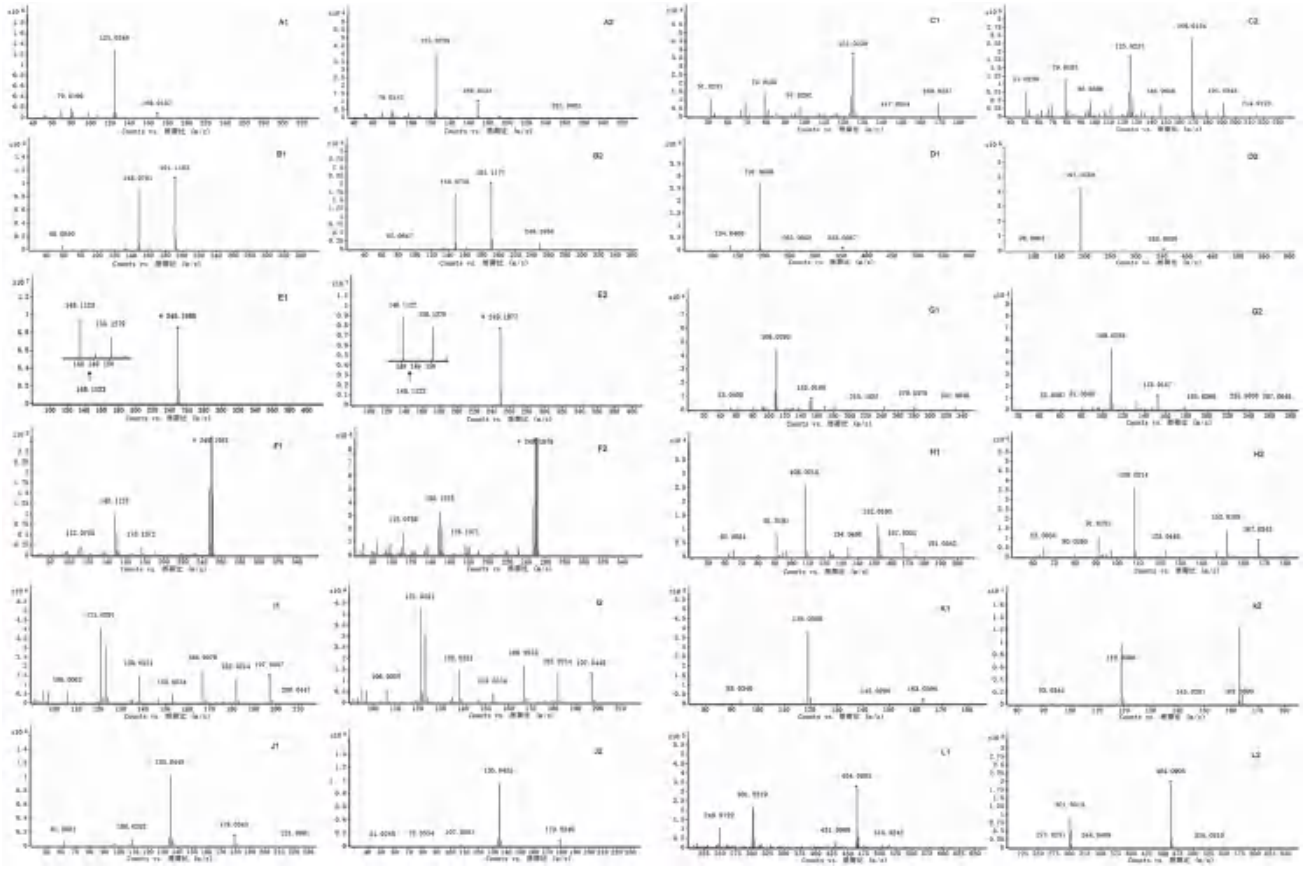

图 2 经对照品比对二级离子碎片图

Fig 2 Fragmentation of the secondary ion was compared with the reference substance

注：A. 没食子酸；B. 金雀花碱；C. 麦芽酚；D. 绿原酸；E. 苦参碱；F. 槐果碱；G. 原儿茶酸；H. 香草酸；I. 丁香酸；J. 咖啡酸；K. 对香豆酸；L. 金丝桃苷；“1”为化合物二级离子碎片图；“2”为对照品二级离子碎片图。

Note：A. gallic acid；B. cytisine；C. maltol；D. chlorogenic acid；E. matrine；F. sophocarpine；G. protocatechuic acid；H. vanillic acid；I. syringic acid；J. caffeic acid；K. 4-hydroxycinnamic acid；L-hyperoside；“1” is the fragmentation diagram of the secondary ion of the compound；“2” is the fragmentation diagram of the secondary ion of the control substance.

图 3 化合物 **5** 金雀花碱裂解规律

Fig 3 Fragmentation pathways of compound **5** cytisine

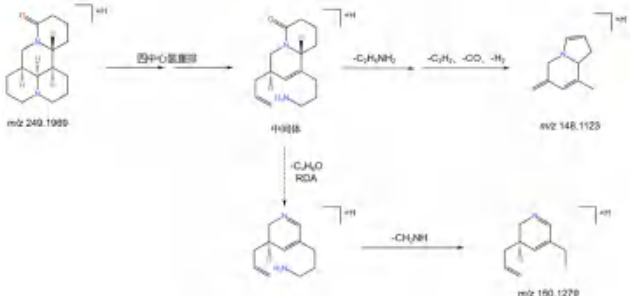

图 4 化合物 **15** 苦参碱裂解规律

Fig 4 Fragmentation pathways of compound **15** matrine

物在负离子模式下有较好的响应，因含有 -COOH 官能团，一般容易断裂产生 $[M-H-H_2O]^-$、$[M-H-CO_2]^-$、$[M-H-CO]^-$等小分子基团。以没食子酸和

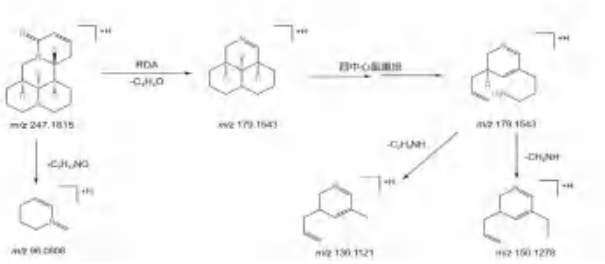

图 5 化合物 **20** 槐果碱裂解规律

Fig 5 Fragmentation pathways of compound **20** sophocarpine

绿原酸为例，分析如下。

化合物 **2** 在负离子模式下，0.972 min 处有 *m/z* 169.0155 的准离子峰，其产生的二级特征离子碎片 *m/z* 125.0246、*m/z* 79.0191，分子式为 $C_7H_6O_5$。判断该二级特征离子碎片为 *m/z* 169.0155 失去一个 CO_2 后生成 *m/z* 125.0246 $[M-H-CO_2]^-$；碎片 *m/z* 79.0191 是由 *m/z* 169.0155 失去一个 $C_2H_3O_4$ 得到。经对照品比对分析，确定化合物 **2** 为没食子酸。裂解规律如图 6 所示[5]。

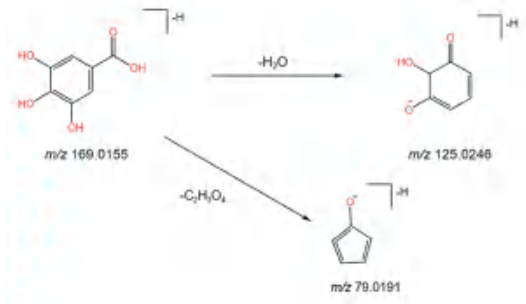

图 6　化合物 **2** 没食子酸裂解规律

Fig 6　Fragmentation pathways of compound **2** gallic acid

化合物 **13** 在负离子模式下，3.470 min 处有 *m/z* 353.0881 的准离子峰，其产生的二级特征离子碎片 *m/z* 191.0558，分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$，判断该二级特征离子碎片为 *m/z* 353.0881 失去一个质量为 162 的奎宁酸后生成 *m/z* 191.0558 $[M\text{-}H\text{-}C_9H_6O_3]^-$ 的特征离子碎片。经过对照品比对，确定 **13** 号峰为绿原酸。裂解规律如图 7 所示 [10]。

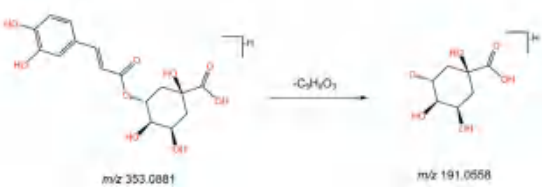

图 7　化合物 **13** 绿原酸裂解规律

Fig 7　Fragmentation pathways of compound **13** chlorogenic acid

2.6.3　黄酮类化合物鉴定　在正、负离子模式下，共鉴定出 5 个黄酮类化合物，其中经对照品比对结合精准分子量确定化合物 1 个，为金丝桃苷；通过特征二级离子碎片结合文献鉴定出苦参醇 O、异槲皮苷、槲皮素 -3-*O*-*β*-D- 半乳糖 -7-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷和芒柄花黄素 4 个化合物，属于黄酮醇苷类和类黄酮类结构。其在质谱条件下的裂解方式主要有 CO、CO_2、C_2H_2O、H_2O 等中性粒子的丢失和 RDA 裂解以及糖基的断裂 [10]。

化合物 **33** 在负离子模式下，23.689 min 有 *m/z* 463.0881 的准离子峰，丢失一个 $C_6H_{10}O_5$，得到离子碎片 *m/z* 301.0312 $[M\text{-}H\text{-}C_6H_{10}O_5]^-$，分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$。经对照品比对分析，确定化合物 **33** 为金丝桃苷，裂解规律如图 8 所示 [10, 16]。

2.6.4　其他　从复方木鸡合剂中鉴定出 1 个萘醌类、1 个酚类、1 个核苷类、4 个其他类化合物。其中经对照品比对结合精准分子量确定的化合物有 1 个，为麦芽酚；通过特征二级离子碎片结合文献鉴定出来有腺嘌呤、4- 羟基 -2，6- 二甲氧基苯酚 -1-*O*-*β*-D-[6'-*O*-（3"，4"，5"- 三羟基苯甲酰）] 吡喃葡萄糖苷和 1，4，8- 三羟基萘 -1-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷等 6 个化合物。

3　讨论

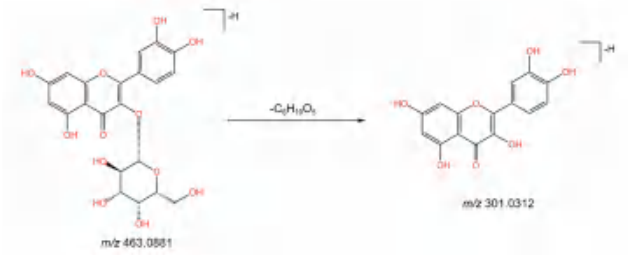

图 8　化合物 **33** 金丝桃苷裂解规律

Fig 8　Fragmentation pathways of compound **33** hyperoside

虽然国内外对复方木鸡颗粒的化学成分有报道 [8]，但复方木鸡合剂和复方木鸡颗粒药味相同，组方配比不同，两者在化学成分组成上有一定的差异性。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对复方木鸡合剂化学成分进行解析，并经过文献比对与对照品比对，明确了 34 个化学成分。通过对照品比对，确定了没食子酸、麦芽酚、原儿茶酸等 12 个化学成分，通过 Pubchem 数据库、FoodB 数据库、TCMSP 数据库和 MassBank 数据库比对，判定了奎宁酸、腺嘌呤、新绿原酸等 7 个化学成分，通过参考文献推测出 *N*- 甲基野靛碱、羟基化槐果碱、羟基化苦参碱等 15 个化学成分。

对比这 34 个化学成分与复方木鸡颗粒已解析的成分发现，两者共有的成分有金雀花碱、羟基化槐果碱、羟基化苦参碱、苦参碱、槐果碱、7，11- 去氢苦参碱、14*α*- 羟基苦参碱、槐醇、槐定碱、苦参醇 O、没食子酸、4- 羟基 -2，6- 二甲氧基苯酚 -1-*O*-*β*-D-[6'-*O*-（3"，4"，5"- 三羟基苯甲酰）] 吡喃葡萄糖苷、绿原酸、槲皮素 -3-*O*-*β*-D- 半乳糖 -7-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷、原儿茶酸、咖啡酸、丁香酸、1，4，8- 三羟基萘 -1-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷、对香豆酸、芒柄花黄素、2，6- 二没食子酰基 - 葡萄糖、1，6- 二没食子酰基 - 葡萄糖共 24 个，剩余的 10 个化合物为复方木鸡合剂中的化学成分。这可为复方木鸡合剂接下来的药效物质基础、质量控制和作用机制等深入研究提供前期基础。

在复方木鸡合剂化学成分研究中，鉴定或推断了复方木鸡合剂中的 34 个主要化学成分，包括 11 个生物碱类、11 个有机酸类、5 个黄酮类、1 个萘醌类、1 个酚类、1 个核苷类、4 个其他类化合物在内的 34 种化合物，经文献查找，在已鉴定的 34 个化学成分中，生物碱类化合物中金雀花碱、苦参碱、槐果碱和槐定碱，有机酸类化合物中没食子酸、咖啡酸、绿原酸、原儿茶酸和香草酸皆在抗炎、抗肿瘤方面有明显作用，可以初步说明生物碱类化合物和有机酸类化合物是复方木鸡合剂治疗肝癌、肝炎、肝硬化的主要活性成分。

34 种化合物中没食子酸、4- 羟基 -2，6- 二甲

氧基苯酚 -1-*O*-*β*-D-[6'-*O*-（3"，4"，5"- 三羟基苯甲酰）] 吡喃葡萄糖苷、咖啡酸、丁香酸、3，3'- 二甲氧基鞣花酸等 8 种成分来自核桃楸皮 [17, 25]；槲皮素 -3-*O*-*β*-D- 半乳糖 -7-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖苷、绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、异槲皮苷、隐绿原酸 /4- 咖啡酰奎宁酸、新绿原酸 /5- 咖啡酰奎宁酸等 14 种成分来自菟丝子 [10]；金雀花碱、羟基化槐果碱、羟基化苦参碱、苦参碱、槐果碱、7，11- 去氢苦参碱、14*α*- 羟基苦参碱、槐醇、*N*- 甲基野靛碱、槐定碱、槐定醇与香草酸等 16 种成分主要来源于复方木鸡合剂中的山豆根 [26]。其中苦参碱为山豆根和菟丝子共有成分，原儿茶酸为核桃楸皮和菟丝子共有成分，香草酸为山豆根和核桃楸皮共有成分，咖啡酸为三者共有成分，可在后续质量控制中加以注意。因为云芝提取物中所含的主要成分是云芝多糖，不适用于本实验分析条件，故没有云芝多糖的相关化学成分，拟将来采用正向色谱法对其进行深入研究。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术解析出复方木鸡合剂中生物碱、有机酸和黄酮等化学成分，为复方木鸡合剂后续的质量评价提供了一定依据，同时也为后续药效物质基础和作用机制研究提供一定参考。复方木鸡合剂中可能还含有响应较低的其他类型化学成分有待于进一步研究。

参考文献

[1] 金黎明，胡文忠，侯梦阳 . 满药复方木鸡颗粒防治肝病的研究进展 [J]. 广州中医药大学学报，2017，34（2）：292-296.

[2] 李若鸿，李艾卓，曲艺 . 复方木鸡合剂治疗慢性乙型肝炎的临床观察 [J]. 中国医药导报，2008，5（21）：76.

[3] 段汝钦，侯云翔，王运东 . 复方木鸡合剂治疗晚期恶性肿瘤 364 例临床分析 [J]. 中国中医药信息杂志，2006，13（7）：54.

[4] 王靖雅，孙向明，宋辉，等 . 基于 HPLC-Q/TOFMS/MS 技术的菟丝子醇提物的大鼠体内成分分析 [J]. 中草药，2018，49（16）：3770-3775.

[5] 赵婷秀，曹迪，茆文莉，等 . HPLC-QTOF-MS 分析六味地黄丸不同部位的化学成分 [J]. 中药新药与临床药理，2018，29（4）：489-496.

[6] 王倩，许霞，张珂，等 . 利用 UPLC-IT-TOF-MS 定性分析芪胶升白胶囊化学成分组 [J]. 中国中药杂志，2022，47（18）：4938-4949.

[7] 刘颖杰，那娜，张晓璐，等 . 金雀花碱的全合成及结构修饰研究进展 [J]. 中国新药杂志，2019，28（7）：810-820.

[8] 门磊，侯梦阳，胡文忠 . 基于 LC-LTQ-Orbitrap/MS 的复方木鸡颗粒成分分析 [J]. 药物分析杂志，2019，39（6）：1048-1057.

[9] 周思雨，陈金鹏，刘志东，等 . 山豆根的化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（5）：1510-1521.

[10] 黄玉，余欢迎，熊俊伟，等 . UHPLC-Q-TOF-MS 技术结合多元统计分析研究菟丝子盐炙前后化学成分变化 [J]. 中国新药杂志，2022，31（15）：1542-1552.

[11] 段媛媛 . 山豆根化学成分分析及苦参碱致肝损伤作用机制研究 [D]. 桂林：广西师范大学，2023.

[12] 王增绘，王冬梅，刘艾琳，等 . 山豆根抑制丁酰胆碱酯酶活性及活性部位 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国现代中药，2015，17（9）：912-916.

[13] 孙国东，霍金海，程团，等 . 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的胡桃楸叶化学成分分析 [J]. 中药材，2017，40（5）：1123-1129.

[14] 刘宏，鞠晓畅，石丰硕，等 . HPLC-DAD 指纹图谱结合 HPLC-Q-TOF-MS/MS 成分表征评价胡桃楸枝的质量 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（9）：137-146.

[15] 徐长丽，石芸，梁裕莎，等 . 菟丝子的研究进展及质量标志物（Q-marker）的预测分析 [J]. 中南药学，2022，20（7）：1610-1616.

[16] 马博稷，肖岩，陈祖德，等 . UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析青钱柳嫩叶渗漉提取液化学成分 [J]. 食品工业科技，2023，44（13）：281-291.

[17] 孙国东，霍金海，王改丽，等 . 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的核桃楸皮成分分析 [J]. 中草药，2017，48（4）：657-667.

[18] Zhang Q，Bao J，Yang JH. Genistein-triggered anticancer activity against liver cancer cell line HepG2 involves ROS generation，mitochondrial apoptosis，G_2/M cell cycle arrest and inhibition of cell migration [J]. Arch Med Sci，2019，15（4）：1001-1009.

[19] Yu L，Jiang B，Chen ZF，et al. Cytisine induces endoplasmic reticulum stress caused by calcium overload in HepG2 cells [J]. Oncology Reports，2018，39（3）：1475-1484.

[20] 张明发，沈雅琴 . 槐定碱的抗肿瘤药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究，2021，44（2）：452-460.

[21] 韦华琴，李燕，解晓敏，等 . 没食子酸经线粒体途径对癌细胞的诱导凋亡作用研究 [J]. 湖北科技学院学报（医学版），2023，37（2）：93-98，103.

[22] Alam M，Ahmed S，Elasbali AM，et al. Therapeutic implications of caffeic acid in cancer and neurological diseases [J]. Front Oncol，2022，12：860508.

[23] 任方奎，刘宗平 . 咖啡酸对硝基苯乙酯对肝癌 HepG-2 细胞株裸鼠增殖瘤的抑制作用 [J]. 中国兽医科学，2019，49（5）：665-670.

[24] 杨晓丽，张君利，王京峰，等 . 绿原酸抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（19）：229-234.

[25] 王诗蒙，王帅，李天骄，等 . 基于谱效关系的核桃楸皮治疗肝癌药效物质基础研究 [J]. 药学研究，2023，42（1）：13-17，27.

[26] 李凡，谷丽华，金武燮，等 . 基于高效薄层色谱 - 电喷雾质谱联用技术建立苦参和山豆根专属性特征图谱 [J]. 药学学报，2023，58（10）：3090-3098.

（收稿日期：2023-10-05；修回日期：2023-11-08）

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术及肝纤维化细胞模型的肝爽颗粒抗肝纤维化的药效成分筛选研究

宋伏洋[1, 2]，韩东[1, 2]，黄壮壮[2, 3, 5]，李波[1, 2]，彭修娟[2, 3]，许刚[2, 3, 5]，杨青[1, 2]，赵扬[1, 2]，王苗[1, 2]，李叶[1, 2]，朱勇乐[1, 2]，刘峰[1, 2, 3, 4*]（1. 陕西中医药大学，陕西　咸阳　712046；2. 陕西国际商贸学院，陕西　咸阳　712046；3. 陕西步长制药有限公司，西安　710075；4. 陕西省中药绿色制造技术协同创新中心，陕西　咸阳　712046；5. 陕西省中医药管理局重点研究室，西安　710075）

摘要：目的　通过多技术联用的方法筛选肝爽颗粒抗肝纤维化的药效成分。**方法**　采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术和 UNIFI 软件，根据质谱相对分子质量、裂解规律、文献报道等方法对肝爽颗粒 70% 醇提取物和大鼠灌胃后血清中化学物质质谱碎片信息进行分析，以明确其药效物质基础。使用转化生长因子 β1（TGF-β1）（10 ng • mL^{-1}）诱导肝星状细胞（HSC-T6）构建肝纤维化细胞模型，采用细胞增殖检测（CCK-8）法检测各组细胞增殖情况。**结果**　在肝爽颗粒提取液中共鉴定出 84 个化学成分，在大鼠给药后的血清中共鉴定出 21 个原形成分，其中党参碱、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、木犀草素、山柰酚、黄芩苷等均可抑制肝星状细胞生长，为肝爽颗粒抗肝纤维化的药效成分。**结论**　本研究阐明了肝爽颗粒抗肝纤维化的药效物质基础，可为肝爽颗粒保肝作用机制及产品质量控制研究提供参考。

关键词：肝爽颗粒；药效物质；化学成分；UPLC-Q-TOF-MS/MS；肝纤维化
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1157-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.008

Anti-liver fibrosis components of Ganshuang granule based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and liver fibrosis cell model

SONG Fu-yang[1, 2], HAN Dong[1, 2], HUANG Zhuang-zhuang[2, 3, 5], LI Bo[1, 2], PENG Xiu-juan[2, 3], XU Gang[2, 3, 5], YANG Qing[1, 2], ZHAO Yang[1, 2], WANG Miao[1, 2], LI Ye[1, 2], ZHU Yong-le[1, 2], LIU Feng[1, 2, 3, 4*]
(1. *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Shaanxi University of International Business and Trade*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 3. *Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd.*, *Xi'an* 710075; 4. *Shaanxi Collaborative Innovation Center of Green Manufacturing Technology of Traditional Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 5. *Key Research Office of Traditional Chinese Medicine Administration Bureau of Shaanxi*, *Xi'an* 710075)

Abstract: Objective　To screen the liver fibrosis pharmacodynamic constituents of Ganshuang granules by multi-technique approach. **Methods**　UPLC-Q-TOF-MS/MS technology and UNIFI software were used to analyze the mass spectrometry fragmentation information of the chemicals in the 70% alcoholic extract of Ganshuang granules and in rat serum after gavage according to mass spectrometry relative molecular mass, cleavage pattern, and literature reports, to clarify the pharmacological substance basis for the drug effect. Liver fibrosis cell model was constructed using transforming growth factor β1 (TGF-β1) (10 ng • mL^{-1})-induced hepatic stellate cells (HSC-T6), and the cell proliferation was detected by cell proliferation assay (CCK-8) method in each group. **Results**　Totally 84 chemical components in the extract of Ganshuang granules, and 21 prototypical components were identified in the serum of rats after the drug administration. Among them, codonopsine, saikosaponin A, saikosaponin

基金项目：陕西高校青年科技创新团队项目（陕教 [2019]90 号）。
作者简介：宋伏洋，女，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础及质量控制研究，email：fysong713@163.com　*通信作者：刘峰，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事中药大品种技术升级及二次开发研究，email：liufeng1720@163.com

D, luteolin, kaempferol, and baicalin all inhibited the growth of HSC, and were the main components of Ganshuang granules for their anti-liver fibrosis pharmacological efficacy. **Conclusion** The pharmacological basis of anti-liver fibrosis of Ganshuang granules is made clear, which provides a basis for the research on the mechanism of hepatoprotection of Ganshuang granules and the quality control of the product.

Key words: Ganshuang granule; efficacy; chemical composition; UPLC-Q-TOF-MS/MS; liver fibrosis

肝爽颗粒是由党参、柴胡（醋制）、白芍、当归、茯苓、白术（炒）、枳壳（炒）、蒲公英、虎杖、夏枯草、丹参、桃仁、鳖甲（烫）等 13 味药材组成的中成药，具有疏肝健脾、清热散瘀、保肝护肝、软坚散结的作用。肝爽颗粒在急、慢性肝炎，肝硬化，肝功能损害的治疗中具有显著疗效，在临床常与恩替卡韦、替诺福韦等西药联合使用，通过改善患者的肝功能、免疫功能和肝纤维化指标达到治疗疾病的目的[1-3]。然而，目前关于肝爽颗粒物质基础及药效的研究较少，仅有少数文献对其主要化学成分进行了含量测定和质量控制研究[4-5]，其药效物质基础尚不明晰。超高效液相色谱四极杆飞行时间串联质谱（UPLC-Q-TOF-MS/MS）因其高分辨、高灵敏度和高通量的特征，已成为鉴定中药复杂体系所含化学成分的重要手段[6]。本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合 UNIFI 天然产物解析平台对肝爽颗粒体内外成分进行定性分析，以期为后期药效成分作用机制研究及其质量控制奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

二元泵和样品管理器、四极杆飞行时间质谱仪（美国 Waters 公司）；十万分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；超纯水仪 [默克化工技术（上海）有限公司]；高速冷冻离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；涡旋振荡器（常州国华电器有限公司）；氮吹仪（北京优晟联合科技有限公司）。

1.2 试药

肝爽颗粒（批号：200814，保定天浩制药有限公司）；乙腈、甲醇均为 UPLC-MS 级（美国）；甲酸钠、亮氨酸 - 脑啡肽（美国 Waters 公司）；质谱水为超纯水；试剂为分析纯；党参碱（批号：111857-201804）、虎杖苷（批号：111575-201603）、柴胡皂苷 A（批号：110766-202022）、山柰酚（批号：111871-201706）、木犀草素（批号：110867-201607）（中国食品药品检定研究院，供含量测定用）。

1.3 动物与细胞

雄性 Sprague-Dawley 大鼠，（200±20）g [四川省实验动物检测中心，实验动物生产许可证编号：SCXK（川）2020-030]。给予标准饲料和饮用水，温度（22±2）℃和相对湿度 50% ～ 60%。实验前 12 h 禁食不禁水。大鼠肝星状细胞株（HSC-T6）及 TGF-β1、CCK-8 等试剂盒（武汉普诺赛生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 肝爽颗粒药效物质基础解析

2.1.1 肝爽颗粒醇提取液的制备 称取肝爽颗粒粉末 1.00 g，加入 70% 甲醇 - 水 50 mL，超声处理 30 min，12 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.1.2 肝爽颗粒血清样本采集 大鼠适应性喂养一周后，随机分为空白组和给药组，空白组灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液，给药组灌胃肝爽颗粒混悬液，给药剂量为 12.8 g·kg^{-1}，灌胃 90 min 后用 3% 戊巴比妥麻醉，从眼眶取血约 0.5 mL，置于 1.5 mL EP 管内，4 ℃、4000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，分装，－ 80 ℃冻存。

2.1.3 肝爽颗粒血清样本制备 取空白血清和含药血清各 200 μL 于 1.5 mL EP 管内，加 800 μL 甲醇涡旋 5 min，离心（4 ℃、1000 r·min^{-1}）10 min，取上清液，经氮气流吹干，残渣以 200 μL 甲醇复溶，涡旋 5 min，在 10 000 r·min^{-1}、4 ℃离心 10 min，取上清液，备用。

2.1.4 色谱条件 Waters Xevo G2-XS Q-TOF 超高效液相色谱仪，色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；柱温：40 ℃；流速：0.3 mL·min^{-1}；进样量：5 μL；流动相：0.1% 甲酸水（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，4% ～ 8%B；5 ～ 10 min，8% ～ 13%B；10 ～ 15 min，13%B；15 ～ 18 min，13% ～ 15%B；

18 ～ 19 min，15% ～ 20%B；19 ～ 24 min，20%B；24 ～ 28 min，20% ～ 40%B；28 ～ 33 min，40%B；33 ～ 35 min，40% ～ 50%B；35 ～ 40 min，5%B）。

2.1.5　质谱条件　电喷雾离子源：正、负离子模式扫描；离子源温度：120 ℃；锥孔电压：40 V；毛细管电压：3.0 kV；锥孔气流量：50 L • h^{-1}；氩气流量：0.15 mL • min^{-1}；脱溶剂：氮气；脱溶剂气温度：300 ℃；扫描范围：*m/z* 100 ～ 1500。

2.1.6　数据采集与处理　采用 MS^E 模式采集数据，使用 UNIFI 数据处理系统对肝爽颗粒的化学成分进行自动识别，结合碎片离子理论精确质量数、相对保留时间及在线质谱数据库、自建数据库、对照品比对以及文献检索鉴定其化学成分。

2.2　体外 HSC-T6 实验验证

2.2.1　细胞培养与分组　为了验证肝爽颗粒的活性成分，选取肝爽颗粒入血成分中君药所含化合物进行验证。HSC-T6 细胞培养条件为 10% 胎牛血清和含 1% 双抗的 DMEM。待细胞贴壁生长至 85% 左右进行实验分组，分为空白对照组、模型组和给药组，给药组分别为不同浓度的党参碱、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、木犀草素、山柰酚、黄芩苷、组合给药及肝爽颗粒组。

2.2.2　CCK-8 法考察药物对 HSC-T6 细胞增殖的影响　取对数生长期 HSC-T6 细胞以 5×10^3 个 / 孔接种于 96 孔板内培养 24 h。模型组和空白组均给予 10 ng • mL^{-1} 转化生长因子 β1（TGF-β1）诱导肝细胞，药物作用 24 h 后，加入 CCK-8 溶液 20 μL，37 ℃、5%CO_2 孵育 2 h，采用酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度（*A*）值，观察药物对 HSC-T6 细胞的生长抑制率。

3　结果

3.1　肝爽颗粒物质基础解析

采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术和 UNIFI 软件在体外鉴定出肝爽颗粒化学成分 84 个（见表 1 和图 1），其中 21 个在体内以原形成分暴露。

化合物 **20** 保留时间为 12.71 min，在 ESI^- 下得到准离子峰 *m/z* 为 525.1630 $[M + COOH]^-$，分子离子通过脱去一分子甲醛形成 *m/z* 449.1490 $[M\text{-}CH_2O\text{-}H]^-$，再脱去一分子水形成 *m/z* 431.1380 $[M\text{-}H_2O\text{-}H]^-$，再脱去一分子糖苷形成 *m/z* 327.1080 $[M\text{-}C_6H_{12}O_5\text{-}H]^-$，*m/z* 165.0540 为蒎烷基本骨架结构的碎片。该化合物通过与对照品比对被确认为芍药苷，其质谱图见图 2A。

化合物 **25** 在负离子模式下，准离子峰 *m/z* 为 389.1240 $[M\text{-}H]^-$，由二级质谱分析，丢失侧链取代基苯二乙烯类化合物，会生成 *m/z* 227.0750 [M-H-glc]$^-$ 的白藜芦醇特征苷元，苯环继续发生重排和裂解，丢失 C_2H_2O（42 Da），最终形成 *m/z* 185.0640 $[M\text{-}H\text{-}glc\text{-}C_2H_2O]^-$ 的特征碎片。将该化合物与对照品进行比对，确定该化合物为虎杖苷，其质谱图见图 2B。

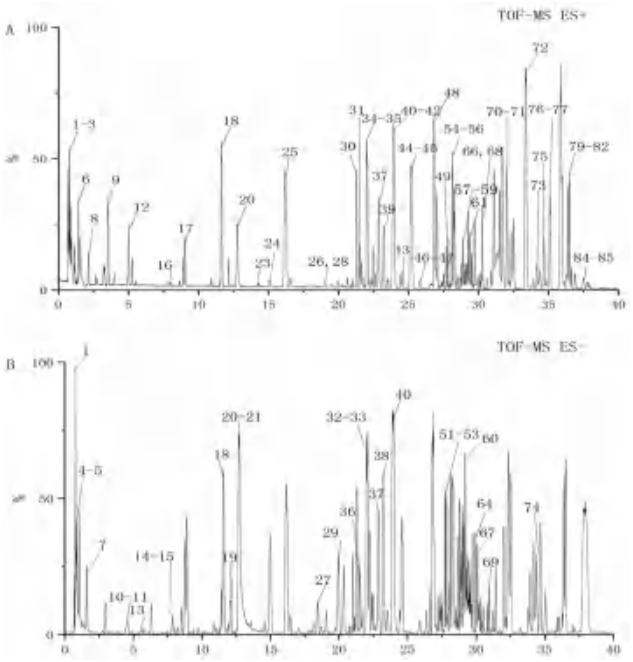

图 1　肝爽颗粒在正（A）、负离子模式（B）下的 BPI 流图

Fig 1　BPI flow diagram of Ganshuang granules in positive（A）and negative ion（B）mode

化合物 **34** 在正离子模式下显示分子离子峰为 *m/z* 581.1870 $[M + H]^+$，推断其分子式为 $C_{27}H_{32}O_{14}$。二级质谱中出现 *m/z* 435.1290 和 *m/z* 273.0760 的碎片离子峰，推断 *m/z* 435.1290 是丢失中性碎片鼠李糖（146 Da）的碎片离子峰，*m/z* 273.0760 为丢失整个糖基所得的碎片离子峰。将该化合物与对照品进行比对，确定该化合物为柚皮苷，其质谱图见图 2C。

化合物 **51** 在负离子模式下，准离子峰 286.0580 $[M\text{-}H]^-$，碎片离子为 267.0340、199.0430，133.0380。与对照品对比后，确定为木犀草素，其质谱图见图 2D。

3.2　体外 HSC-T6 细胞实验结果

采用 CCK-8 法检测肝爽颗粒中的活性成分对 HSC-T6 细胞的影响。结果发现，与空白对照组相比较，不同浓度的党参碱、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、木犀草素、山柰酚、黄芩苷都能抑制 HSC-T6 细胞活性。与模型组相比较，不同浓度的党参碱、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、木犀草素、山柰酚、黄芩苷均能抑制 HSC-T6 细胞增殖（见图 3）。

表 1　肝爽颗粒化学成分信息

Tab 1　Chemical constituents in Ganshuang granules

化合物	t_R/min	理论值	实测值（*m/z*）	加和离子	质量误差 / $\times10^{-6}$	碎片离子	名称	类别	来源
1	0.81	342.1160	387.1135	+HCOO，-H	—	—	*α*- 菠菜甾醇葡糖苷	甾体类	党参
2	0.82	146.0580	191.0613	+HCOO	—	—	草酸二乙酯	其他类	柴胡
3	0.86	121.1100	144.1012	+Na	1.700	—	胆碱	生物碱	党参
4	0.88	192.0270	191.0196	-H	−0.300	—	柠檬酸	有机酸类	虎杖
5	0.89	134.0210	133.0163	-H	0.890	—	L- 苹果酸	有机酸类	虎杖
6	1.43	267.0973	268.102	+H	−2.400	—	腺苷	生物碱	柴胡
7	1.68	406.1484	405.139	-H	−1.100	331.0661，239.0656，205.0345，179.0713，173.0090	三栀子苷甲酯	单萜	丹参
8	1.96	170.0223	171.027	+H	−1.700	153.0170	没食子酸 *	酚类	白芍
9	3.55	267.1475	268.152	+H	−2.200	3.5500	党参碱 *	生物碱	党参
10	4.58	312.0482	311.039	-H	−1.400	311.0394	单咖啡酰酒石酸	苯丙素类	蒲公英
11	4.58	150.0166	149.010	-H	0.7.00	149.0099	D- 酒石酸	有机酸类	党参
12	5.02	296.1414	297.153	+H，+Na	4.500	—	隐丹参酮	二萜类	丹参
13	5.62	138.0326	137.026	-H	1.500	—	水杨酸	酚类	白芍
14	7.76	290.0794	289.071	-H	−1.300	—	儿茶素	多酚类	虎杖
15	7.85	354.0953	353.087	-H	−1.000	191.0558，167.0349	5- 咖啡酰奎宁酸	苯丙素类	丹参，桃仁
16	8.04	354.0956	355.100	+H，+K，+Na	−2.400	163.0375，153.0170	新绿原酸 *	苯丙素类	丹参
17	9.08	457.1580	480.1477	+H，+K，+Na	−0.800	325.1109	苦杏仁苷	酚类	桃仁
18	11.57	480.1630	525.1617	+HCOO，-H	−0.300	479.1552，283.0804	芍药内酯苷 *	单帖类	白芍
19	12.08	198.0530	197.0453	-H	−0.200	169.0142，161.0248	3，5-*O*- 二甲基 - 没食子酸	酚类	白芍
20	12.71	480.1630	525.1630	+HCOO，-H	0.000	525.1630，449.1490，431.1380，327.1080，165.0540	芍药苷 *	单萜类	白芍
21	12.71	496.1580	495.1517	-H	−0.200	449.1450，431.1342，327.1073，165.0559	氧化芍药苷	单萜类	白芍
22	14.29	194.0580	217.0475	+H，+Na	0.200	177.0529，161.0581，160.0506	阿魏酸 *	苯丙素类	当归
23	14.30	176.0470	177.0532	+H	—	—	7- 甲氧基香豆素	其他类	柴胡
24	15.09	474.0800	497.0682	+H，+K，+Na	−1.000	335.0338，295.0443，163.0375	菊苣酸	苯丙素类	蒲公英
25	16.20	390.1310	389.1240	+H，+K，+Na	−2.100	227.0750，185.0640	虎杖苷 *	酚类	虎杖
26	18.74	464.0956	465.103	+H，+Na	−0.300	303.0478，301.0682	槲皮苷	黄酮类	柴胡
27	18.76	434.0854	433.077	-H	−0.700	300.02608，271.0231	番石榴苷	黄酮类	党参
28	19.09	610.1532	611.153	+H，+Na	0.000	303.0472，201.0458	芦丁	黄酮类	柴胡，蒲公英，夏枯草，枳壳
29	20.22	448.1014	447.093	-H	−0.400	307.0271，285.0390，284.0311	木犀草素葡萄糖苷	黄酮类	丹参，虎杖，夏枯草，党参
30	21.15	690.1566	735.153	+HCOO	−1.100	690.1562	锦葵素	黄酮类	夏枯草
31	21.73	434.1212	435.127	+H，+Na	−1.200	287.0528，273.0734，271.0579	南酸枣苷	其他类	枳壳
32	21.76	418.3514	418.090	-H	−0.700	175.0400	丹酚酸 D	苯丙素类	丹参
33	21.76	448.1016	447.093	-H	−0.400	—	紫云英苷 *	黄酮类	白芍
34	22.04	580.1792	581.1870	+H，+K	0.500	435.1290，273.0760	柚皮苷 *	黄酮类	枳壳
35	22.49	578.1645	579.171	+H，+Na	0.600	271.0577，269.0420	山柰苷	黄酮类	柴胡
36	22.49	624.169	623.1604	-H	−1.500	577.1557，269.0441	水仙苷	黄酮类	柴胡
37	22.88	610.1900	609.1822	+HCOO，-H	−0.900	445.1129，325.0704，301.0706	橙皮苷	黄酮类	枳壳
38	23.14	718.1530	361.0905	-H	−2.900	519.0927，339.0496，321.0390	丹酚酸 E	苯丙素类	丹参
39	23.24	360.0850	361.0902	+H，+K，+Na	−2.000	163.0377，145.0272	迷迭香酸	苯丙素类	丹参
40	23.85	462.1526	507.1502	+HCOO，-H	−1.100	273.0757	芍药新苷	单萜苷	白芍

续表 1

化合物	t_R/min	理论值	实测值（*m/z*）	加和离子	质量误差 / $\times10^{-6}$	碎片离子	名称	类别	来源
41	23.94	610.1902	611.1983	+H，+K，+Na	0.800	449.1431，303.0840，177.0529	新橙皮苷	黄酮类	枳壳
42	23.95	302.0791	303.0846	+H，+Na	− 2.200	177.0529，153.0173	橙皮素 *	黄酮类	枳壳
43	24.58	340.0581	341.0633	+H	− 2.200	271.0580，187.0372	丹酚酸 G	苯丙素类	丹参
44	25.21	306.1467	324.1783	$+NH_4$	− 2.400	261.1098，189.0528，161.0582	白术内酯Ⅳ	倍半萜类	白术
45	25.21	166.0631	189.0535	+Na	0.600	−	丹皮酚	酚类	白芍，柴胡
46	25.82	446.0851	447.0842	+H，+Na	− 1.100	271.0577	黄芩苷 *	黄酮类	丹参，柴胡
47	25.97	206.0581	207.0632	+H	− 2.000	177.0531	6，7-二甲氧基香豆素	其他类	柴胡
48	26.83	718.1532	719.162	+H，$+Na^+$，+K	0.900	701.1508，521.1080，323.0529，295.0570	丹酚酸 B	苯丙素类	丹参
49	27.21	484.3195	485.325	+H	− 1.200	467.3136，455.3137，437.3027，405.3119，187.1457，175.1155	茯苓酸 B	三萜类	茯苓
50	27.58	208.0747	207.066	-H	− 0.700	179.0345，161.0245	3，4-二羟基肉桂酸乙酯	苯丙素类	夏枯草
51	27.70	286.0487	285.0580	-H	− 1.700	267.0340，199.0430，133.0380	木犀草素 *	黄酮类	丹参，虎杖，夏枯草，党参
52	27.82	494.1212	493.113	-H	− 1.100	357.0601，295.0597，185.0240，353.0654	丹酚酸 A*	苯丙素类	丹参
53	28.06	552.1274	551.119	-H	− 0.300	321.0388，197.0450，161.0247	紫草酸单甲酯 *	苯丙素类	丹参
54	28.13	408.1425	409.148	+H，+K，+Na	− 1.400	247.0941，229.0837，269.0763	芦荟大黄素 8-葡萄糖苷 *	蒽醌类	虎杖
55	28.30	270.0533	271.0585	+H	− 1.800	−	芹菜素	黄酮类	丹参，虎杖，党参
56	28.61	538.1115	583.1093	+HCOO	− 0.500	493.1137，357.0601，179.0348	紫草酸	苯丙素类	丹参
57	28.44	460.1012	461.1072	+H，+Na	− 0.700	389.1214，285.0734，270.0501，241.0472	汉黄芩苷	黄酮类	柴胡
58	28.70	566.1422	567.1516	+H，+K，+Na	1.100	369.0950，295.0580，187.0373	紫草酸二甲酯	苯丙素类	丹参
59	28.81	316.0582	339.0485	+Na	0.200	181.0481	异鼠李素	黄酮类	柴胡
60	28.91	272.0682	271.0602	-H	− 1.500	−	柚皮素	黄酮类	枳壳
61	29.28	584.1891	585.1973	+H，+K，+Na	0.800	419.1320，391.1006，256.0709	苯甲酰芍药苷	单萜类	白芍
62	29.32	822.4772	867.4703	+HCOO	−	267.0651	6-*O*-乙酰基柴胡皂苷 A	三萜类	柴胡
63	29.33	432.1065	431.0992	+HCOO，-H	0.100	269.0444，161.0249	大黄素 -1-*O*-葡萄糖苷	蒽醌类	虎杖
64	29.43	284.0696	283.0603	-H	− 1.300	240.0416	芫花素	黄酮类	虎杖
65	29.54	256.074	301.070	+HCOO	− 1.300	241.0491	大黄素蒽酮	蒽醌类	虎杖
66	29.43	284.0682	285.074	+H	− 2.100	−	大黄素 -8-甲醚	蒽醌类	虎杖
67	29.60	286.0485	285.039	-H	− 1.400	−	山柰酚 *	黄酮类	白芍，柴胡，夏枯草
68	29.97	926.5246	927.529	+H，+K，+Na	− 2.000	909.5182，891.5076，421.3443，403.3335	柴胡皂苷 C	三萜类	柴胡
69	30.81	812.4922	857.486	+HCOO，-H	− 4.600	663.3730，287.2008	柴胡皂苷 B_4	三萜类	柴胡
70	32.35	780.4662	781.473	+H，+K，+Na	− 0.800	763.4618，745.4514，455.3506，437.3397，419.3286	柴胡皂苷 A*	三萜类	柴胡
71	32.35	396.3393	419.329	+Na	0.300	187.1459	麦角甾醇 *	甾体及其皂苷类	茯苓
72	33.39	402.1312	403.136	+H，+K，+Na	− 2.500	373.0891，355.0785	川陈皮素	黄酮类	枳壳
73	34.29	310.1214	311.126	+H，+Na	− 2.200	−	羟基丹参酮ⅡA	二萜类	丹参
74	34.39	780.4662	825.460	+HCOO，-H	− 3.800	761.4451，503.3013	柴胡皂苷 D*	三萜类	柴胡
75	34.86	192.1156	193.1206	+H，+Na	− 2.100	175.1102	洋川芎内酯 A	其他类	当归
76	35.10	432.1424	433.1486	+H，+K，+Na	− 1.200	403.1007，385.0897	3'，4'，5，5'，6，7-六甲氧基黄酮	黄酮类	柴胡

续表 1

化合物	t_R/min	理论值	实测值（*m*/*z*）	加和离子	质量误差 / ×10^{-6}	碎片离子	名称	类别	来源
77	35.11	230.1313	231.1363	+H	− 2.400	193.1563	白术内酯Ⅰ	倍半萜类	白术
78	35.78	486.3356	531.3321	+HCOO，-H	− 0.600	297.1852	皂树皮提取物*	其他类	虎杖
79	36.11	278.0946	279.0972	+H	− 4.400	−	左旋二氢丹参酮Ⅰ	二萜类	丹参
80	36.39	764.4717	787.4623	+Na	1.500	455.3506，437.3398，419.3287	6-*O*-乙酰基柴胡皂苷 A	三萜类	柴胡
81	36.39	822.4774	823.4834	+H，+K，+Na	− 1.000	455.3506，437.3398，419.3287	23-*O*-乙酰基柴胡皂苷 D	三萜类	柴胡
82	36.92	190.0995	191.1055	+H	− 2.000	173.0940，145.1170	藁本内酯*	其他类	柴胡
83	37.56	268.1463	313.1444	+HCOO	− 0.900	213.1278，198.1046	鼠尾草酚酮	其他类	丹参
84	38.07	280.1447	281.1513	+H	− 2.600	252.1114，239.1029，238.0960	去氢丹参新酮	其他类	丹参

注：*为体内外共有化合物。

Note：*means common compounds both in vivo and ex vivo.

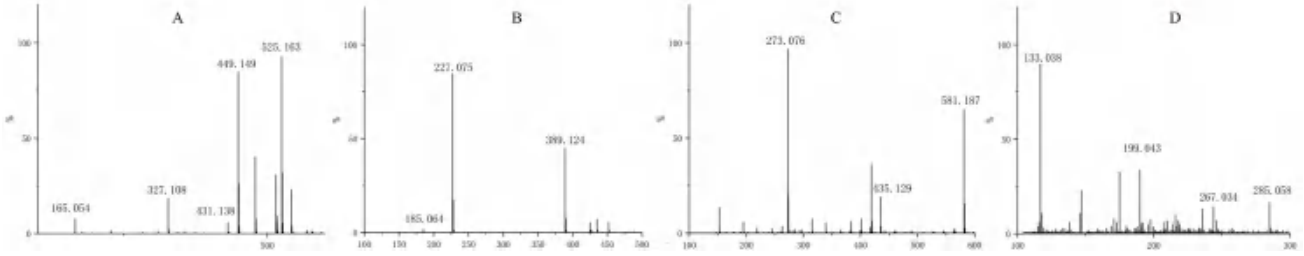

图 2　典型化合物的二级质谱图

Fig 2　Secondary mass spectrometry chart of typical compounds

A. 芍药苷（paeoniflorin）；B. 虎杖苷（polydatin）；C. 柚皮苷（naringin）；D. 木犀草素（luteolin）

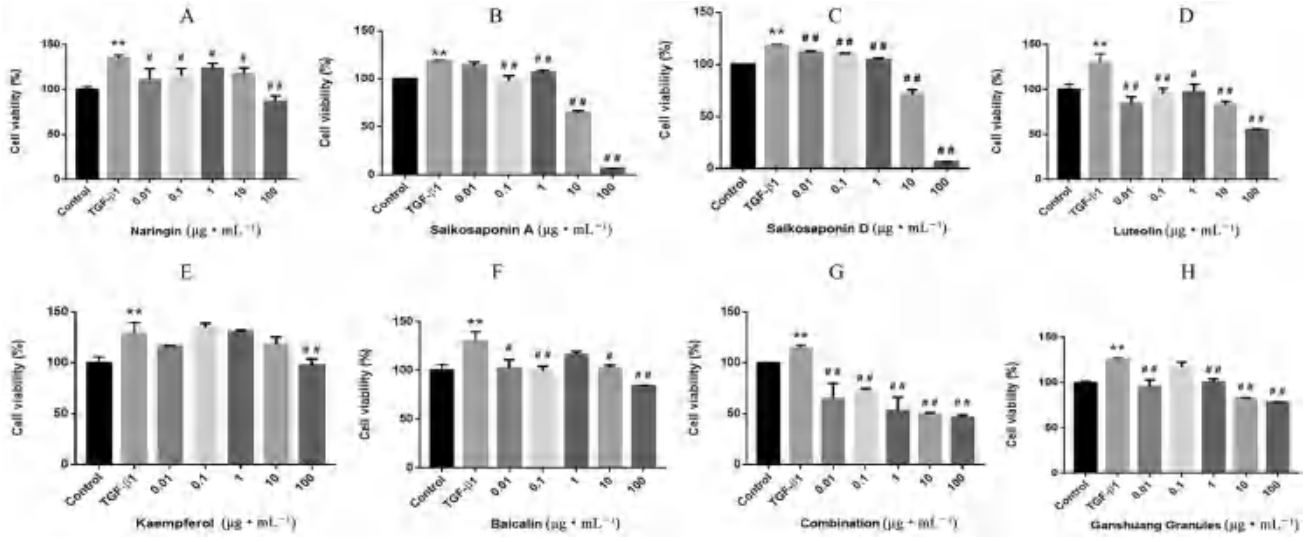

图 3　肝爽颗粒活性成分对肝星状细胞增殖率的影响

Fig 3　Effect of activity ingredients in Ganshuang granule on the proliferation rate of hepatic stellate cells

A. 党参碱（codonopsine）；B. 柴胡皂苷 A（saikosaponin A）；C. 柴胡皂苷 D（saikosaponin D）；D. 木犀草素（luteolin）；E. 山柰酚（kaempferol）；F. 黄芩苷（baicalin）；J. 组合给药（combination administration）；H. 肝爽颗粒（Ganshuang granule）

注：与空白对照组相比，$^{**}P < 0.01$；与 TGF-β1 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the TGF-β1 group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

4　讨论

样品制备方法的选择中，分别选取 30%、50%、70% 的甲醇进行提取，结果发现 70% 的甲醇超声提取时色谱峰数量最多，故选择 70% 甲醇提取；通过比较 60、90、120 min 不同时间点含药血清 HPLC 图谱，发现 90 min 含药血清样品的色谱峰数目较多，故确定 90 min 为最佳采血点；动物给药剂量分别选取 0.8、3.2、12.8 g • kg^{-1}，结果发现剂量为 12.8 g • kg^{-1} 时峰数目较多，故选择 12.8 g • kg^{-1} 为最佳给药剂量。考察了乙腈 -

水、0.05% 甲酸水 - 乙腈、0.1% 甲酸水 - 乙腈三种不同流动相，发现 0.1% 甲酸水 - 乙腈时色谱峰分离效果较好；分别考察了 30、35、40、50 ℃不同柱温对分离度的影响，发现色谱柱温度为 40 ℃时分离效果较好。

鉴定的入血原形成分如异鼠李素、山柰酚、槲皮素、丹酚酸 A、柴胡皂苷 D 据文献报道能够减少细胞外基质的沉积，抑制肝纤维化的形成 [7-9]；阿魏酸可下调肝微粒体酶细胞色素 P450 2E1（CYP2E1）和抑制 Toll 样受体 4（TLR4）介导的炎症，缓解对乙酰氨基酚诱导的肝毒性 [10]；葛根素、黄芩苷可加速乙醇在肝脏的氧化代谢或降低炎症因子表达从而对酒精性肝损伤有预防保护效果 [11-12]；丹酚酸 A 可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 / 沉默信息调节因子 1（AMPK/SIRT1）信号通路，减轻非酒精性脂肪性肝病小鼠诱导的肝细胞损伤 [13]。研究鉴定的主要成分从文献角度证实了其具有良好的肝保护作用，进一步佐证了肝爽颗粒鉴定的药效物质基础的可靠性。

综上所述，本研究首次采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合 UNIFI 数据库分析平台对肝爽颗粒的主要化学成分进行了鉴定分析，共鉴定出 84 个化学成分，其中 21 个在体内以原形成分暴露。基于成分吸收入血才能发挥药效作用的理论，推测 21 个体内暴露成分为其潜在的药效成分 [14]，通过细胞学实验证实了 6 个君药中成分具有抗肝纤维化作用。后续可进一步考察这些化合物发挥肝保护作用的相关机制，为该品种质量控制和临床给药提供参考。

参考文献

[1] 张洋 . 肝爽颗粒联合恩替卡韦治疗早期乙型肝炎肝硬化患者的疗效及对其免疫功能和肝纤维化指标的影响 [J]. 反射疗法与康复医学，2022，3（6）：79-82.

[2] 秦莉 . 肝爽颗粒联合替诺福韦治疗慢性乙肝临床疗效观察 [J]. 内蒙古中医药，2022，41（5）：27-28.

[3] 刘立，李俊义，刘春云，等 . 富马酸替诺福韦酯联合肝爽颗粒对乙型肝炎肝硬化门静脉系统血流动力学的影响 [J]. 昆明医科大学学报，2021，42（11）：134-139.

[4] 杨雯，张永州，杨本霞 . 高效液相色谱 - 一测多评法测定肝爽颗粒中虎杖苷、白藜芦醇、氧化芍药苷、芍药苷和柴胡皂苷 a、b_1、d [J]. 现代药物与临床，2022，37（2）：285-290.

[5] 韩东，杜霞，李林林，等 . 基于 ICP-MS 对肝爽颗粒中 26 种无机元素的分析及质量评价 [J]. 中南药学，2022，20（1）：146-153.

[6] 成小红，蒋丽，董兴婷，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析复方蛇床子洗剂中的化学成分 [J]. 中国药科大学学报，2022，53（4）：452-466.

[7] 李淑娣，王振，刘江凯，等 . 基于细胞信号通路探讨黄芪活性成分抗肝纤维化的研究进展 [J]. 中国药理学通报，2023，39（1）：18-23.

[8] 吴雄健，朱海燕，黄文峰 . 丹酚酸 A 对肝纤维化大鼠 Wnt/β-catenin 信号通路的影响 [J]. 赣南医学院学报，2018，38（11）：1079-1082.

[9] 黄祎，夏莉，雷青松，等 . 柴胡皂苷 D 对大鼠免疫性肝纤维化的保护作用及其机制研究 [J]. 陆军军医大学学报，2022，44（14）：1410-1420.

[10] 袁俊辉 . 阿魏酸下调 CYP 2E1 和抑制 TLR4 介导的炎症减轻对乙酰氨基酚诱导的肝毒性 [D]. 重庆：重庆医科大学，2017.

[11] 孔繁阳，陈真 . 黄酮类化合物防治酒精性肝病的研究进展 [J]. 北方药学，2016，13（5）：118-119.

[12] Shi L，Hao ZX，Zhang SB，et al. Baicalein and baicalin alleviate acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2 antioxidative pathway：the involvement of ERK1/2 and PKC [J]. Biochem Pharmacol，2018，150：9-23.

[13] 钱倩宇，李松涛，窦晓兵 . 激活 AMPK/SIRT 1 通路对丹酚酸 A 对小鼠肝细胞脂质毒性和 NAFLD 的保护作用 [A]// 营养研究与临床实践——第十四届全国营养科学大会暨第十一届亚太临床营养大会、第二届全球华人营养科学家大会论文摘要汇编 [C]. 2019：426.

[14] 曾垣烨，陈嫣婷，何盈盈，等 . 基于 UPLC-QTOF/MS 的中药金花清感颗粒体外及入血成分鉴定和初步药动学特征分析 [J]. 药学学报，2022，57（2）：446-452.

（收稿日期：2024-01-10；修回日期：2024-02-25）

直肠用美沙拉嗪温敏凝胶的制备及质量评价

潘娇娇[1, 2, 3]，李娇[1, 2, 3]，丁杨[1, 6]，刘彤[7]，杨瑞[5*]，桂双英[1, 6*]，王淑君[4*]（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. 沈阳药科大学药学院，沈阳 110016；5. 辽宁中医药大学附属第二医院，沈阳 110034；6. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室，合肥 230012；7. 辽宁省药品检验检测院，沈阳 110034）

摘要：目的 制备一种具有缓释和保留性能，用于直肠给药的美沙拉嗪温敏凝胶（MZ-Gel）。**方法** 以胶凝温度为评价指标，采用星点设计 - 响应面法对泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 188 的用量进行优化。以 Franz 扩散池法进一步考察体外释药行为，得到最佳处方并对其进行质量评价。**结果** MZ-Gel 优化处方为 P407 22.56%，P188 3.34%，胶凝温度为（32.8±0.3）℃；MZ-Gel 的体外释药符合一级动力学特征，具有缓释效果；胶凝时间平均值为 38.3 s，pH 平均值为 4.07，膨胀系数平均值为 4.81%，持水率平均值为 99.78%；红外表征表明，美沙拉嗪的加入并没有破坏温敏凝胶结构。**结论** 此方法制备工艺简单，性质稳定且具有良好的体外释药特征。

关键词：美沙拉嗪；温敏凝胶；星点设计 - 响应面法；Franz 扩散池法；体外释药
中图分类号：R943 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1164-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.009

Preparation and quality evaluation of mesalazine thermosensitive gel for rectal use

PAN Jiao-jiao[1, 2, 3], LI Jiao[1, 2, 3], DING Yang[1, 6], LIU Tong[7], YANG Rui[5*], GUI Shuang-ying[1, 6*], WANG Shu-jun[4*] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Traditional 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. *College of Pharmacy*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 5. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110034; 6. *Anhui Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application*, *Hefei* 230012; 7. *Liaoning Institute for Drug Control*, *Shenyang* 110034)

Abstract: Objective To prepare a mesalazine thermosensitive gel (MZ-Gel) with sustained release for rectal administration. **Methods** The dosage of Porloxam 407 and Porloxam 188 was optimised with star point design-response surface methodology using gelling temperature as the evaluation index. The in vitro drug release behavior was further determined by Franz diffusion cell method to obtain the optimal formula and evaluate its quality. **Results** The optimal formula of MZ-Gel was P407 22.56%, and P188 3.34%, with gelling temperature at (32.8±0.3)℃. The in vitro drug release of MZ-Gel was in accordance with the first-order kinetic characteristics, with sustained release. The average value of the gelation time was 38.3 s, the average value of pH was 4.07, and the coefficient of expansion was 4.81%, with a water-holding capacity of 99.78%. The infrared ray (IR) characterization showed that the addition of mesalazine did not destroy its thermosensitivegel structure. **Conclusion** This preparation method is simple and stable, and has good in vitro drug release characteristics.

Key words: mesalazine; thermosensitive gel; star point design-response surface methodology; Franz diffusion cell method; in vitro drug release

基金项目：安徽高校自然科学研究项目（No. KJ2021A0541）。

作者简介：潘娇娇，女，硕士，主要从事药剂学研究，email：pjj0521@126.com *通信作者：王淑君，女，教授，博士研究生导师，主要从事药剂学与创新制剂研究，email：1252116911@qq.com；杨瑞，女，研究员，主要从事药剂学与药物动力学研究，email：yang_rui1983@163.com；桂双英，女，教授，博士研究生导师，主要从事制剂技术与新制剂研究，email：guishy0520@126.com

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）是一种影响结直肠的慢性炎症性疾病，主要由免疫系统介导。这种疾病可能导致黏膜受损和结直肠癌等严重的并发症，极大地降低了人们的生活品质。据预计，到 2025 年，我国 UC 患者数量将超过 15 万人[1]。该疾病的进展缓慢，多反复发作，因此被 WHO 认定为现代难治疾病之一[2]。

美沙拉嗪（mesalazine，MZ）被认为是治疗 UC 的关键活性物质，已被确认为引发和缓解轻中度 UC 症状的首选药物。至今，该药在国内外市场上已推出多种剂型，包括缓释片、缓释颗粒、肠溶片、栓剂和灌肠液等，主要通过口服和直肠两种途径进行给药，其中直肠途径被视为克服这些挑战的直接给药方式[3]。温敏凝胶是半固体制剂的一种剂型，其中的聚合物材料以液态给药后，会因外界温度的波动而相转变为非化学性的交联制剂。目前，温敏型药物已广泛用于临床治疗各种疾病，如癌症、炎症及感染等。其中泊洛沙姆 188（Poloxamer 188，P188）和泊洛沙姆 407（Poloxamer 407，P407）是两种性质稳定，刺激性小的常用温敏凝胶基质材料，被美国食品药品监督管理局（FDA）列为安全药用辅料[4]。温敏凝胶通过直肠给药，其优势在于其分布范围广，在给药位置能迅速胶凝，有效防止药物泄漏，并最终实现精确定位和持续给药的效果[5-6]，符合直肠靶向治疗的性能要求。

1　材料

1.1　仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；PX85Z 型分析天平（欧豪斯仪器有限公司，精度：0.01 mg）；PTX-FA210S 型分析天平（华志电子技术有限公司，精度：0.001 mg）；DF-101S 集热式磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；SHA-C 数显水浴恒温振荡器（常州荣华仪表制造有限公司）；ST3100 pH 计（欧豪斯仪表有限公司）；NDJ-4 旋转式黏度计（上海昌吉实验仪器有限公司）。

1.2　试药

MZ 对照品（批号：100565-201802，纯度：98%，中国食品药品检定研究院）；MZ 原料药（批号：20220415，纯度：99%，湖北怡和生物科技有限公司）；P407、P188（巴斯夫股份有限公司）；甘油、羟丙基甲基纤维素（HPMC）、羧甲基纤维素钠、壳聚糖、卡波姆 934、海藻酸钠、1- 辛烷磺酸钠（上海麦克林生化科技有限公司）；磷酸二氢钾、磷酸（国药集团化学试剂有限公司）；甲醇、乙腈（色谱级，国药集团化学试剂有限公司）；溴化钾（光谱级，上海戈翔仪器有限公司）；液相用试剂均为色谱纯，其他化学试剂为分析纯。

2　方法与结果

2.1　美沙拉嗪温敏凝胶（MZ-Gel）制备工艺

采用冷溶法制备 MZ-Gel[7]。称取适量的甘油、P407、P188、HPMC、MZ 原料药置于西林瓶中，加入一定量的纯化水使其溶解。在冰浴条件下，于磁力搅拌器中搅拌 30 min，直至完全溶解，得到灰白色混悬溶液，将西林瓶置于 4 ℃冰箱中，充分溶胀，即得 MZ-Gel。

2.2　胶凝温度（T_g）的测定

采用试管反转法测定 T_g[8]。取 1 mL MZ-Gel 溶液加入薄壁试管中，插入温度计（精度为 0.1 ℃），置于恒温水浴中并缓慢升温，升温速率约为 0.5 ℃ • min^{-1}，每隔 0.5 ℃将试管反转 180°，以观察溶液的流动情况，溶液不流动时的最低温度即为 T_g。

2.3　黏度的测定

使用旋转黏度计在室温条件下测定样品成胶前的动力黏度，参照《中国药典》2020 年版四部通则黏度测定法项下第三法[9]。

2.4　单因素考察

以 T_g、成胶前黏度为评价指标，考察生物黏附剂种类（HPMC、海藻酸钠、壳聚糖、卡波姆 934 及羧甲基纤维素钠），结果见表 1。生物黏附剂的加入明显改善了温敏凝胶体系的黏附性能，除海藻酸钠和 HPMC 外，其他黏附剂的加入导致 T_g 明显升高，体系的黏附力逐渐增加，且含 HPMC 的配方黏度高于含海藻酸钠的配方，最终选择 HPMC 作为黏膜黏附剂。

表 1　生物黏附剂的筛选

Tab 1　Mucosal adhesive screening test

生物黏附剂	T_g/℃	黏度 /（mPa • s）
—	32.1	169.00
HPMC	31.7	256.30
海藻酸钠	31.4	185.50
壳聚糖	34.8	246.17
羧甲基纤维素钠	39.4	316.83
卡波姆 934	37.6	324.33

以 T_g 为评价指标，对 P407 用量：14%、16%、18%、20%、22%、24%；P188 用量：1%、2%、3%、4%、5%、6%；HPMC 用量：0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%；甘油用量：0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1%，进行单因素考察，结果见图 1。T_g 随着 P407 的用量增加而降低，随着 P188 的用量增加而增加，HPMC 的用量对 T_g 影响较小，甘油的用量对 T_g 无明显影响。

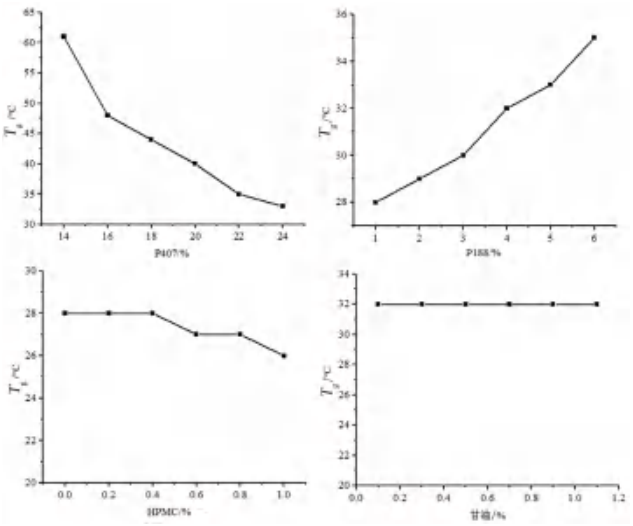

图 1　MZ-Gel 单因素实验结果

Fig 1　Results of MZ-Gel single factor test

2.5　星点设计 - 响应面法优化温敏凝胶处方

根据单因素实验结果，选取 P407 用量（22% ～ 24%）和 P188 用量（2% ～ 4%）两个因素进行考察，每个因素均设为 5 个水平，分别用代码 $-\alpha$、-1、0、1、α 来表示（$\alpha = 1.414$）。以 T_g 作为响应变量，采用星点 - 响应面法 [10] 进行实验设计，见表 2，实验设计和结果如表 3 所示。

表 2　星点 - 响应面法实验因素水平

Tab 2　Star point-response surface methodology experimental factor levels

水平	因素	
	X_1：P407（%）	X_2：P188（%）
$-\alpha$	21.59	1.59
-1	22.00	2.00
0	23.00	3.00
1	24.00	4.00
α	24.41	4.41

表 3　星点 - 响应面法实验设计与结果

Tab 3　Experimental design and results of the star point-response surface methodology

实验号	代码值		实际值		T_g/℃
	X_1	X_2	X_1	X_2	
1	0	$-\alpha$	23.00	1.59	28.0
2	0	0	23.00	3.00	32.0
3	0	0	23.00	3.00	32.0
4	α	0	24.41	3.00	30.0
5	1	-1	24.00	2.00	27.0
6	1	1	24.00	2.00	31.9
7	-1	1	22.00	4.00	34.3
8	0	0	23.00	3.00	32.0
9	-1	-1	22.00	2.00	31.0
10	0	0	23.00	3.00	30.8
11	$-\alpha$	0	21.59	3.00	34.0
12	0	α	23.00	4.41	33.8
13	0	0	23.00	3.00	32.0

2.5.1　模型拟合　应用 Design-Expert 13 软件拟合实验数据，得到 T_g 的回归方程为：$Y = 31.76 - 1.51X_1 + 2.05X_2 + 0.4000X_1X_2 + 0.0200X_1^2 - 0.5300X_2^2$（$R^2 = 0.9725$）；模型 $P < 0.0001$，差异有统计学意义；失拟项 $P = 0.7309$，差异不显著，表明该模型拟合和可信度良好（见表 4）。利用软件绘制三维效应面图和二维等高线图，如图 2 所示。

表 4　方差分析

Tab 4　Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	54.45	5	10.89	49.47	＜ 0.0001	极显著
X_1	18.17	1	18.17	82.54	＜ 0.0001	
X_2	33.63	1	33.63	152.76	＜ 0.0001	
X_1X_2	0.6400	1	0.6400	2.91	0.1320	
X_1^2	0.0028	1	0.0028	0.0126	0.9136	
X_2^2	1.95	1	1.95	8.88	0.0205	
残差	1.54	7	0.2201			
失拟项	0.3890	3	0.1297	0.4503	0.7309	不显著
净误差	1.15	4	0.2880			
总误差	55.99	12				

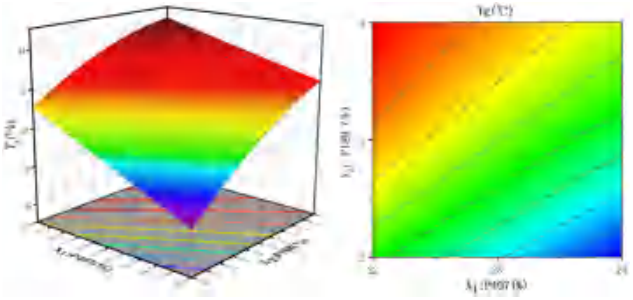

图 2　X_1，X_2 对 T_g 影响的效应面图与等高线图

Fig 2　Contour plot and response surface of effect of variables X_1，X_2 on T_g

2.5.2　优化处方验证　正常人体体温在 37 ℃左右，为确保 MZ-Gel 在室温下为液态，给药后在体温下能够迅速凝胶化，设定 T_g 为 33 ℃为目标温度代入模拟方程中。选择 3 个优化处方进行验证和评价，固定 MZ 处方量 6.7%，甘油用量 0.5%，HPMC 用量 0.6%；P407 和 P188 各优化处方量如表 5 所示，平行制备 3 份。结果见表 5，各处方 T_g 实测值与预测值之间的偏差均＜ 5%，拟合方程预测性较好。

表 5　预测值与实测值比较（$n = 3$）

Tab 5　Comparison between predicted and measured values（$n = 3$）

处方号	P407/%	P188/%	预测值 /℃	实测值 /℃	偏差 /%
1	22.56	3.34	33	32.8±0.3	0.6
2	22.05	2.88	33	32.5±0.2	1.5
3	22.24	3.98	33	32.6±0.1	1.2

2.6　MZ 含量测定方法的建立

2.6.1　色谱条件　色谱柱：AQ-C18（4.6 mm×

150 mm，5 μm）；流动相：磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈（89∶8∶3）；检测波长：220 nm；流速：1.2 mL·min^{-1}；进样体积：20 μL；柱温：40 ℃。

2.6.2　溶液制备　① 称取适量 MZ 对照品置 100 mL 量瓶中，流动相溶解，制成 402 μg·mL^{-1} 的对照品储备液。移取适量的对照品储备液，加入流动相稀释 至 20.10、32.16、40.20、48.24、60.30 μg·mL^{-1} 系列对照品溶液。② 准确量取 0.6 mL MZ-Gel 置 100 mL 量瓶中，加入流动相溶解并稀释至刻度，然后吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。③ 取适量空白温敏凝胶，配制方法与供试品溶液相同，即空白凝胶溶液。

2.6.3　方法学考察　分别取“2.6.2”对照品溶液、供试品溶液和空白凝胶溶液，按照“2.6.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 3。以进样浓度（c）为横坐标，药物峰面积（A）为纵坐标进行线性回归，得到标准曲线方程为 $A = 4.08\times10^4c - 6.76\times10^4$，$r = 0.9995$。结果表明，MZ 在 20.10 ～ 60.30 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。仪器精密度峰面积 *RSD* 为 0.43%，表明仪器精密度良好。测定供试品和对照品稳定性峰面积 *RSD* 分别为 0.41% 和 0.20%，表明该方法的稳定性良好。重复性实验的峰面积 *RSD* 为 0.52%，加样回收率均在 98% ～ 101%，*RSD* 均＜ 2%，表明该方法的准确性良好。

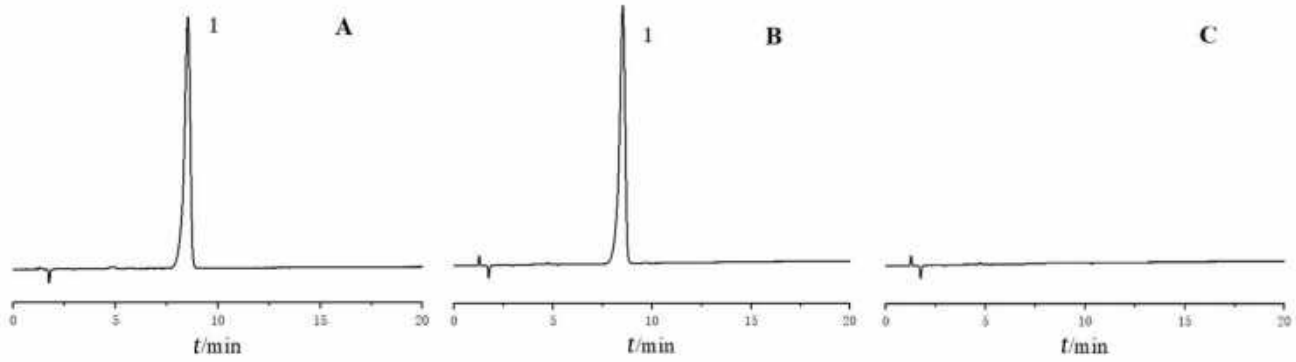

图 3　专属性实验色谱图

Fig 3　Chromatogram of specific test

A. 对照品溶液（reference solution）；B. 供试品溶液（test solution）；C. 空白凝胶溶液（blank Gel solution）；1. 美沙拉嗪（mesalazine）

2.7　体外释放度考察

Franz 扩散池法测定药物的释放率，对 MZ-Gel 的体外释药行为进行研究[11]。使用半透膜将输送槽和接收槽隔离，向接收槽中加入 16 mL 磷酸盐缓冲液释放介质，去除多余气泡。将 Franz 扩散池置于 37 ℃恒温磁力水浴搅拌器中，转速为 100 r·min^{-1}，分别向输送槽中加入 3 组优化处方和 MZ 混悬液各 0.6 g，使其均匀分散在半透膜表面。在此条件下，分别在 0.5、1、2、4、6、8、10、12 和 24 h 取样 1 mL，同时补加等体积的接收液。样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，按照“2.6”项下方法进行定量分析，并计算不同时间的累计释放率（Q）。

$$Q = (C_n\times V\times D + \sum_{i=1}^{n-1} C_{n-1}\times V_{n-1})/W\times F$$

其中，C_n 是在第 n 个取样点测得的药物质量浓度（μg·mL^{-1}）；V 是接收溶液的体积；D 为稀释因子；W 是样品的重量；F 为样品中主要药物的百分比；C_{n-1} 是第 $n-1$ 个取样点的药物质量浓度（μg·mL^{-1}）；V_{n-1} 是第 $n-1$ 个取样点的样品体积。以时间（t）为横坐标，累计释放率均值（Q）为纵坐标绘制累计释放曲线，优化制剂和混悬液的体外释放曲线见图 4。MZ 混悬液在 5 h 内为主要释药阶段，随后趋于稳定；MZ-Gel 在 24 h 尚未完全释放，此时处方 1 的释药曲线与混悬液的释放曲线较为接近，具有明显的缓释特征，因此被确定为优选处方。根据零级、一级、Higuchi 以及 Ritger-Peppas 动力学方程对结果进行拟合，结果见表 6。

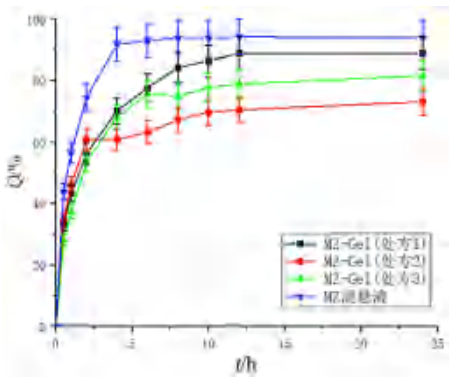

图 4　MZ 混悬液及优化处方温敏凝胶体外释药曲线

Fig 4　In vitro release curve of MZ suspension and optimized prescription mesalazine thermosensitive gel

表 6 释药动力学模型拟合方程及相关系数

Tab 6 Fitting equation and correlation coefficient of drug release kinetics model

制剂	零级		一级		Higuchi		Ritger-Peppas	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
处方 1	$Q=2.87t+42.94$	0.4621	$\ln(1-Q/83.31)=-0.66t$	0.9610	$Q=17.88t^{1/2}+23.12$	0.7865	$Q=48.61t^{0.05}$	0.9467
处方 2	$Q=3.91t+35.43$	0.4450	$\ln(1-Q/69.94)=-1.16t$	0.9893	$Q=12.84t^{1/2}+28.07$	0.6064	$Q=49.30t^{0.15}$	0.9334
处方 3	$Q=2.63t+39.83$	0.4333	$\ln(1-Q/77.59)=-0.65t$	0.9855	$Q=16.60t^{1/2}+21.21$	0.7626	$Q=44.13t^{0.23}$	0.9337
混悬液	$Q=2.61t+55.45$	0.2981	$\ln(1-Q/92.43)=-1.01t$	0.9850	$Q=17.47t^{1/2}+34.76$	0.6335	$Q=62.50t^{0.17}$	0.9281

2.8 质量评价及表征

2.8.1 胶凝时间测定 采用“2.2”项下的方法测定 MZ-Gel 的胶凝时间。取 1 mL MZ-Gel 溶液加入薄壁试管中，预热至室温 20 ℃，再置于 33 ℃恒温水浴中，每隔 10 s 将试管倾斜观察流动性。若不流动，将试管反转，30 s 内液体不发生流动时，则定义该溶液已胶凝固化，记录此时秒表显示时间即为胶凝时间，平行测定 3 次，结果胶凝时间平均值为 38.3 s，*RSD* 为 0.94%。

2.8.2 pH 值测定 取 MZ-Gel 0.5 mL 加水 10 mL，混匀，依法测定 pH 值[12]，平行测定 3 次。结果 pH 的平均值为 4.07，*RSD* 为 0.28%。

2.8.3 膨胀系数测定 量取 MZ-Gel 1 mL 于刻度试管中，在 25 ℃下其体积为 V_0，将试管置于 32 ℃水浴中，使制剂完全胶凝，此时凝胶剂的体积为 V_1，膨胀系数 S 根据公式计算：$S(\%)=(V_1-V_0)/V_0\times100\%$[13]，平行测定 3 次。结果膨胀系数平均值为 4.81%，*RSD* 为 0.95%。

2.8.4 持水能力考察 采用离心失水法进行持水能力考察[14]，量取 MZ-Gel 1 mL 于预先称重的离心管中（W_0），记录初始总重量（W_1），将离心管置于 32 ℃下使其完全胶凝，以 12 000 r·min^{-1} 离心 10 min，将凝胶中渗出的水用滤纸小心吸弃，并称取离心管的总重量（W）。凝胶的持水性能根据公式计算：持水率（%）=（$W-W_0$）/（W_1-W_0）×100%，平行测定 3 次。结果持水率的平均值为 99.78%，*RSD* 为 0.030%。

2.8.5 溶胶动力学测定 采用倾斜板法测定[15]。将载玻片在室温（25 ℃）下保持 45° 的倾斜角度 5 min，吸取 40 μL 溶胶样品（空白凝胶溶液、MZ-Gel 溶液）分别滴到两块玻璃板上，并记下每滴溶胶滑落一定距离所需的时间，并绘制时间 - 滑动位移曲线，即为溶胶动力学曲线。结果见图 5，载药凝胶比空白凝胶需要更多的时间来完成相同距离的滑动。

2.8.6 傅里叶红外图谱（FTIR） 将 MZ 干燥粉、空白凝胶、MZ-Gel 冻干粉以及物理混合物与适量干燥 KBr 混合后压片，运用傅里叶红外光谱仪测定透过率，得 FTIR 图谱，结果见图 6。MZ 在 1761 cm^{-1} 对应 C=O 拉伸，1528 cm^{-1} 对应 -NH 弯曲，1399 cm^{-1} 对应 -OH 弯曲。空白凝胶在 3558 cm^{-1} 对应 -OH 伸缩，3408 cm^{-1} 对应酰胺官能团的 -NH 伸缩。此外，它在 2882 cm^{-1} 处显示出更宽的峰值，对应于 -CH 伸缩。物理混合物和含药温敏凝胶冻干粉末中出现的特征峰基本一致。MZ-Gel 的冷冻干燥制剂显示出与空白凝胶和 MZ 相对应的所有主峰，而在峰中没有显著的偏移，这表明空白凝胶和 MZ 之间不存在强相互作用。

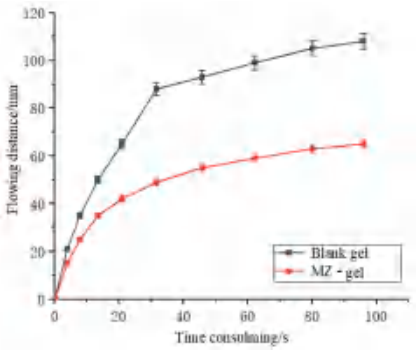

图 5 MZ-Gel 凝胶和空白凝胶的滑动距离

Fig 5 Flowing distance between MZ-gel and blank gel

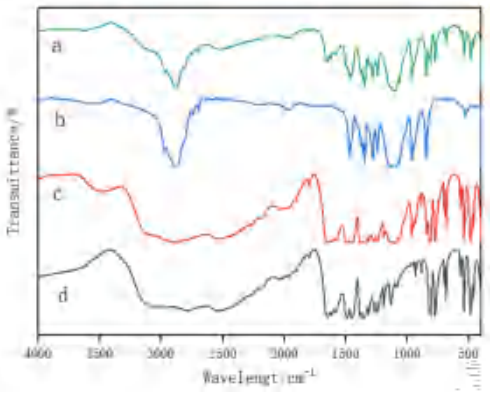

图 6 傅里叶红外光谱图

Fig 6 Fourier infrared spectroscopy

a. MZ-Gel；b. 空白凝胶（blank gel）；c. 物理混合物（physical mixture）；d. MZ

3 讨论

3.1 处方优化设计思路

目前，灌肠液、泡沫液体制剂是治疗直肠 UC

最常用的方法。使用传统液体灌肠容易造成药物渗漏，泡沫制剂虽不易渗漏，但给药装置复杂，容易造成药物消除速度快，患者依从性差等问题[16]。为了解决这些问题，拟设计的 MZ-Gel 关键性能（33 ℃胶凝化温度、体内黏附性、直肠定位、给药效率和药物依从性）有望优于传统的液体灌肠剂型。

温敏材料有很多种，但在温度敏感性、再凝胶化和稳定性方面较好且应用最广泛的温敏材料是 P407，它与 P188 配合使用形成的温敏凝胶在凝胶温度下更稳定，不易受环境干扰，适合在有一定体液的直肠环境中使用。此外，温敏凝胶在直肠中的滞留是影响其给药效果的关键特性，因此通过动力学黏度评估了 MZ-Gel 的滞留能力，含有 HPMC 的黏度相对较高，因此确定以此作为生物黏附剂。

温敏凝胶体外释放度的考察通常有两种，即透析袋法和 Franz 扩散池法。本研究前期采用透析袋法考察 MZ-Gel 的体外释放行为，但由于制剂在透析袋中无法均匀分散，导致测得的药物含量差异较大，因此未被采用。最终，本研究采用 FDA 推荐的 Franz 扩散池考察半固体制剂的体外药物释放行为[17]，最大限度地减少误差。MZ-Gel 体外释药行为结果表明，*Q-t* 模型拟合符合一级动力学方程的特征，具有一定的缓释药物效应，与传统混悬液组相比，温敏凝胶组的药物保留时间更长，体内释放更完全。

3.2　制剂性能评价

P407 和 P188 是由聚氧乙烯（PEO）、聚氧丙烯（PPO）组成的 PEO-PPO-PEO 非离子型三嵌段共聚物，溶胶动力学表明随着 MZ 的加入，PEO 嵌段上的水分子更加紧密地缠绕在一起，从而使 PEO 嵌段上的水分子更难以剥离，进而导致溶胶动力学速率减慢；FTIR 分析表明 MZ 加入温敏凝胶基质中，并没有破坏其结构及化学性质，说明该制剂可行。本研究的局限性在于该制剂为混悬型温敏凝胶，在进行制剂质量评价的过程当中发现该制剂长期稳定较差，高温及光照条件下均会造成不同程度的药物沉淀、pH 值及含量改变。因此，该药物储存时需要避光冷藏保存以保证药物含量。

3.3　总结

综上，本研究制备的温敏型原位凝胶通过优化药物可用性、延长和控制释放以及允许直接靶向来提高 MZ 的治疗效果；能达到在一定温度条件下温敏胶凝化、长时间滞留与持续释药的设计目标，是一种极具开发潜力的治疗 UC 的直肠局部制剂。后续实验将进一步完善 MZ-Gel 治疗 UC 方面的作用机制和药效学评估，为 MZ 直肠制剂的开发和临床应用提供参考。

参考文献

[1] 贾丹丹，戚文娟，程莉，等 . 溃疡性结肠炎相关性结直肠癌的危险因素及癌变机制 [J]. 现代肿瘤医学，2014，22（3）：720-722.

[2] Ramadass SK，Perumal S，Jabaris SL，et al. Preparation and evaluation of mesalamine collagen in situ rectal gel：a novel therapeutic approach for treating ulcerative colitis [J]. Eur J Pharm Sci，2013，48（1-2）：104-110.

[3] 程永明 . 美沙拉嗪与柳氮磺吡啶治疗溃疡性结肠炎疗效比较 [J]. 基层医学论坛，2017，21（5）：563-564.

[4] Verma DD，Verma S，Blume G，et al. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin：a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study [J]. Eur J Pharm Biopharm，2003，55（3）：271-277.

[5] 唐随意，杨晶，符旭东 . 布地奈德灌肠用温敏性凝胶的体外释放度及局部滞留性评价 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（13）：1332-1336.

[6] 赵宇郁，杨东亮，徐楠，等 . 布地奈德脂质体温敏凝胶对溃疡性结肠炎模型小鼠的药效研究 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（14）：1426-1430.

[7] Arkin A，Elham A，Anwar A，et al. Optimization and evaluation of the quercus infectoria galls thermosensitive in situ gel for rectal delivery [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2022，2022：8451055.

[8] 殷雅卓，陈林，谢兴亮，等 . 美沙拉嗪直肠原位温敏凝胶的制备及体外评价 [J]. 中国新药杂志，2019，28（12）：1484-1489.

[9] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2022：361.

[10] 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.

[11] 罗婷婷，庾莉菊，宁保明，等 . 外用半固体制剂质量研究与体外评价技术进展 [J]. 药物分析杂志，2022，42（5）：748-760.

[12] 中国药典 2020 年版 . 三部 [S]. 2020：716.

[13] 黄晶，谷福根，吴春芝 . 帕瑞昔布钠鼻用温敏凝胶的制备及其体外性质研究 [J]. 中南药学，2023，21（8）：2046-2052.

[14] 李新方，王骐榕，陈敏，等 . 薄荷脑鼻用原位凝胶流变与凝胶特性研究 [J]. 海军医学杂志，2018，39（3）：214-218.

[15] Jiang QK，Zhang P，Li J. Elucidation of colloid performances of thermosensitive in situ-forming ophthalmic gel formed by Poloxamer 407 for loading drugs [J]. J Pharm Sci，2020，109（5）：1703-1713.

[16] Lin GL，Yang JJ，Liu JY，et al. In situ polyphenol-adhesive hydrogel enhanced the noncarcinogenic repairing of KGF on the gut epithelial barrier on TNBS-induced colitis rats [J]. Int J Biol Macromol，2023，231：123323.

[17] 薛棱芬，殷雅卓，谢兴亮，等 . 苦参碱直肠原位温敏凝胶的制备及性能评价 [J]. 中草药，2018，49（6）：1311-1316.

（收稿日期：2023-10-02；修回日期：2023-12-08）

基于网络药理学和分子对接技术初探红柳治疗酒精性肝损伤的作用机制及实验验证

刘晓航，凌修妍，徐睿君，郭昕玥，陈婷玉，付金环，范可欣，高祎婷*（新疆第二医学院药学院，新疆 克拉玛依 834000）

摘要：目的 基于网络药理学和分子对接技术，研究天然植物红柳治疗小鼠酒精性肝损伤（ALI）的作用机制。**方法** 使用 TCMSP 平台，以口服利用度≥ 30% 和类药性≥ 0.18 分别作为预设条件，对红柳活性化学成分进行筛选；使用 GeneCards、DrugBank 等数据库，筛选 ALI 相关靶点；通过 VennDiagram 软件获得交集靶点（红柳和 ALI）；根据疾病 - 活性成分 - 交集靶点网络数据，最终遴选出主要活性成分和致病的关键靶点进行分子对接。动物实验采用慢性酒精喂养加急性灌胃法建立 C57BL/6J 小鼠 ALI 模型。通过丙二醛（MDA）、谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）、肝脏指数、HE 染色、NF-κB p65 蛋白表达水平等指标验证红柳对 ALI 的作用机制。**结果** 通过网络药理学从红柳中筛选获得活性成分 12 个，与 ALI 交集靶点共 151 个。推测红柳的主要活性成分为槲皮素、山柰酚、异鼠李素等，通过 RELA/NF-κB p65、JUN、MAPK1、AKT1 等关键靶点调节脂质 - 动脉粥样硬化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 以及流体剪切应力 - 动脉粥样硬化等信号通路来发挥抗 ALI 作用。分子对接显示红柳主要活性成分与通路关键靶点蛋白结合能量均≤ − 28.8696 kJ • mol $^{-1}$。动物实验结果显示，与模型组相比，红柳组肝脏指数、MDA、ALT、AST 和 NF-κB p65 水平均有所下降，HE 染色显示肝组织变性情况减轻。**结论** 本研究初步揭示了红柳可通过多化学成分、多靶点、多通路对 ALI 起一定的保护作用，为天然药用植物的开发和利用提供了理论参考。

关键词：红柳；酒精性肝损伤；网络药理学；分子对接技术；作用机制
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1170-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.010

Effect of *Tamarix ramosissima* Ledeb on alcoholic liver injury based on network pharmacology and molecular docking technology

LIU Xiao-hang, LING Xiu-yan, XU Rui-jun, GUO Xin-yue, CHEN Ting-yu, FU Jin-huan, FAN Ke-xin, GAO Yi-ting* (*School of Pharmacy*, *Xinjiang Second Medical College*, *Karamay Xinjiang* 834000)

Abstract: Objective To determine the mechanism of the natural plant *Tamarix ramosissima* Ledeb on alcoholic liver injury (ALI) in mice by network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The active ingredients were screened, with the oral availability (≥ 30%) and druglikeness (≥ 0.18) pre-ordained. ALI related targets were screened by databases like GeneCards and DrugBank. Via VennDiagram, an intersection target (*Tamarix ramosissima* Ledeb and ALI) was obtained. Based on the disease-active ingredients-intersection target network, the main active ingredients and key pathogenic targets were ultimately selected for molecular docking. Animal experiments were conducted with chronic alcohol feeding and acute gastric lavage to establish the C57BL/6J mouse ALI model. By detecting malondialdehyde (MDA), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), liver index, HE staining, NF-κB p65, the *Tamarix ramosissima* Ledeb action mechanism on ALI was

基金项目：新疆维吾尔自治区级大学生创新创业训练计划项目（No.S202213560018）。
作者简介：刘晓航，女，硕士，讲师，主要从事天然产物成分分析和制剂研究，email：1365935498@qq.com *通信作者：高祎婷，女，硕士，讲师，主要从事天然产物的结构修饰和应用开发，email：528610128@qq.com

validated. **Results** Through network pharmacology screening, 12 active ingredients were obtained, with 151 targets intersecting with ALI. It was speculated that the main active components, included quercetin, kaempferol, and isorhamnetin. Via the key targets (RELA/NF-κB p65, JUN, MAPK1, and AKT1) signal pathways were regulated, like lipid and atherosclerosis, diabetes complications AGE-RAGE, fluid shear stress and atherosclerosis were controled to play the anti-ALI role. The molecular docking showed that the binding energy of the main active components and pathway key target proteins were ≤ －28.8696 kJ • mol^{-1}. The experimental research on mice showed the liver index, MDA, ALT, AST and NF-κB p65 levels all decreased in the *Tamarix ramosissima* Ledeb groups, and the liver tissue degeneration reduced. **Conclusion** *Tamarix ramosissima* Ledeb has a certain protective effect on ALI through multiple ingredients, targets, and pathways.

Key words: *Tamarix ramosissima* Ledeb; alcoholic liver injury; network pharmacology; molecular docking technology; mechanism

酒精性肝损伤（alcoholic liver injury，ALI）是由于长期酗酒导致的慢性肝病，该病会向着酒精性脂肪肝、肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌方向演变[1]，临床上用于 ALI 的西药存在副作用大、价格昂贵、易反弹等缺点，而中药疗法疗效缓和持久、毒副作用较小，为 ALI 的预防与治疗提供了新的思路[2]。

红柳（*Tamarix ramosissima* Ledeb），主要分布在我国西北的荒漠地区，为柽柳科柽柳属灌木，又名西河柳、柽柳、垂丝柳等[3]。红柳的主要药用部位为其绿色细嫩叶子，其主要化学成分为黄酮、有机酸、三萜类化合物，具有透疹、解表、疏风、解毒作用[4]。Wang 等[5]研究发现，红柳提取物（200 mg • kg^{-1}）可能通过抑制 NLRP3-Caspase-1-IL-1β 信号通路和氧化应激来预防慢性乙醇诱导的肝损伤；久保惠子[6]研究表明，柽柳的乙醇提取物具有保肝作用。张钰等[7]发现柽柳醇提取物可能是通过 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 信号通路对小鼠 ALI 起保护作用；赵妍等[8]发现柽柳颗粒剂对小鼠的乙醇性肝损伤具有保护作用；Abouzid 等[9]研究表明，尼罗河柽柳花的醇提物能显著改善四氯化碳对肝脏的不利影响；Assiri 等[10]研究表明红柳醇提物对四氯化碳、乙酰氨基酚或 D- 半乳糖引起的肝损伤具有护肝作用，并表现出剂量相关性；Sehrawat 等[11]研究结果表明红花多枝柽柳能够抑制对硫代乙酰胺诱导的大鼠肝内氧化应激反应和肝毒性。

鉴于红柳的护肝作用，本研究通过运用网络药理学和分子对接技术，研究天然植物红柳对治疗小鼠 ALI 可能存在的作用机制，并通过动物实验验证，为红柳在现代医药中的应用提供新思路。

1　材料

1.1　试药

药材采自新疆克拉玛依市，经新疆第二医学院生药学教研室专任教师鉴定为红柳。谷草转氨酶（AST）试剂盒（批号：20230228）、谷丙转氨酶（ALT）试剂盒（批号：20230331）（南京建成生物工程研究所）；蛋白测定试剂盒（批号：20230329）、还原型谷胱甘肽（批号：1024V058）（北京索莱宝科技有限公司）；丙二醛（MDA）试剂盒（批号：D21HR204578）（上海源叶生物科技有限公司）；伊红染色液（醇溶）和 Mayer 苏木素染液（批号：20230210）（飞净生物科技有限公司）；Anti-NF-κB p65（phospho S536）（批　号：AB76302，Abcam）、GAPDH（批号：BA2913）、羊抗兔 IgG-HRP（批号：BA1054）（武汉博士德生物工程有限公司）。

1.2　动物和饲料

雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只，8 周龄，体重 26 ～ 28 g [伦理审批号：IACUC-20220728-25，许可证号：SCXK（豫）2020-0005，河南斯克贝斯生物科技股份有限公司]。Lieber-DeCarli 酒精液体饲料和对照饲料（批号：280856.00，上海金畔生物科技有限公司）。

1.3　仪器

H1750R 型台式高速冷冻离心机（安徽中科中佳科学仪器）；FYL-YS-50LK 型恒温孵育箱（上海博讯实业）；YD-1508R 型石蜡切片机、YD-A 型摊片机、YD-B 型烤片机（金华市益迪医疗设备）；PowerPac HC 电泳仪（美国 BIO-RAD 公司）；TCMSP 平台（old.tcmsp-e.com/tcmsp.p）；OMIM 数据库（https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/）；Pymol 软件（Delano Scientific LLC）；Auto Dock Tools 1.5.6（http：//mgltools.scripps.edu/）。

2 方法与结果

2.1 网络药理学和分子对接

2.1.1 红柳活性成分筛选及靶点搜集 通过TCMSP分析平台和中药药理学数据库，以口服利用度（OB）≥ 30% 和类药性（DL）≥ 0.18 为预设条件，得出红柳的有效化学成分 12 个，见表 1。

表 1 红柳的 12 个活性成分

Tab 1 12 activing redients in *Tamarix ramosissima* Ledeb

MolID	成分	OB（≥ 30%）	DL（≥ 0.18）
MOL012088	24- 亚甲基环烷醇	39.27	0.78
MOL012095	麦角甾 -4，24（28）- 二烯 -3- 酮	45.35	0.73
MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78
MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
MOL004564	山柰素	73.41	0.27
MOL006358	豆甾 -4- 烯 -3，6- 二酮	39.12	0.79
MOL000953	胆固醇	37.87	0.68
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
MOL000358	*β*- 谷甾醇	36.91	0.75
MOL002883	油酸乙酯	32.40	0.19

2.1.2 ALI 相关靶点的筛选 以“alcoholic liver injury”为关键词，输入 DrugBank、GeneCards、addSymbol、OMIM 以及在线人类遗传数据库，获取 ALI 的靶点。

2.1.3 疾病 - 活性成分 - 靶点网络构建 从药物靶点文件中把标签信息分离出来备用，从 GeneCard 等数据中将疾病对应的标签信息分离出来备用；使用 R 语言 VennDiagram 软件对数据进行处理并作出 Venn 图，同时将数据导入 Network 软件构建“疾病 - 活性成分 - 靶点”网络，得到红柳与 ALI 相交叉的 151 个靶点。再进行拓扑分析（见图 1），推测得出主要有效活性成分为槲皮素、山柰酚、异鼠李素等。

2.1.4 构建核心靶点网络 使用 Perl 计算机程序语言编写的脚本在得到的药物 - 疾病对应的数据基础上生成药物和疾病的连线和有效化成分，使用 Cytoscape 作图，显示出药物 - 化学成分 - 靶标的互作网络，获得连线 188 条。

在 STRING 分析数据库中导入疾病 - 药物互作蛋白，选择人类数据库，通过调整，设置评分值（置信度）> 0.4 后，隐藏游离节点，生成 PPI 蛋白互作网络节点图（见图 2），由 PPI 数据库生成蛋白相互作用连线 870 条。随后对连线结果进行富集并作出可视柱状图，其中靠前的蛋白有 RELA/NF-*κ*B p65、JUN、MAPK1、AKT1 等，红柳可能是通过调节这些关键蛋白治疗 ALI。

2.1.5 GO 富集分析 使用 R 语言对疾病药物靶点的数据进行转化，展示其基因 ID，在 R 语言中安装相应数据包，设置参数，进行 GO 基因功能的富集分析，得到 GO 条目 105 条。使用 Perl 计算机程序语言对 GO 富集结果进行筛选，作出柱状图（见图 3），得到对应基因的功能。

2.1.6 KEGG 通路富集分析 将前面几步所得的数据进行整理，经过 KEGG 通路富集筛选前 10 条通路中与 ALI 有关的信号通路见图 4，主要包括脂质 - 动脉粥样硬化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 以及流体剪切应力 - 动脉粥样硬化等信号通路。

2.1.7 分子对接验证 根据网络拓扑结构分析得出结果，将节点度值为前 3 位，同时靶点数目最多的活性成分槲皮素、山柰酚、异鼠李素作为配体，关键蛋白 RELA/NF-*κ*B p65（ID 1nfi）、JUN（ID 1t2k）、AKT1（ID 5wbl）、MAPK1（ID 1wzy）作为受体，使用 Pymol 软件去除小分子配体，AutoDockTools.1.5.6 半柔性对接上述配体和受体，设置算法为遗传算法（Genetic Algorithm），对接次数设置为 50 次，最大迭代次数设置为 2.5×10^6，种群数目设置为 150，进行计算机模拟对接。配体和受体之间结合得越稳定，其结合能越低。由表 2 可知，山柰酚与关键蛋白 RELA/NF-*κ*B p65 结合能最低，为 − 37.2376 kJ • mol^{-1}，因此选取蛋白 RELA/NF-*κ*B p65 为后续动物实验的检测对象。

表 2 主要活性成分与关键蛋白结合能力

Tab 2 Main active ingredients binded to key proteins

活性成分	关键蛋白	结合能 /（kJ • mol^{-1}）
槲皮素	RELA/NF-*κ*B p65	− 34.5268
	JUN	− 38.5624
	AKT1	− 35.8720
	MAPK1	− 35.4236
山柰酚	RELA/NF-*κ*B p65	− 39.9076
	JUN	− 39.4592
	AKT1	− 38.1140
	MAPK1	− 30.9396
异鼠李素	RELA/NF-*κ*B p65	− 33.6300
	JUN	− 39.0108
	AKT1	− 39.0108
	MAPK1	− 33.6300

2.2 动物实验验证

2.2.1 动物分组及模型建立 通过查阅文献[12]，本实验采用急性酒精灌胃和慢性酒精饲喂相结合的方法，建立小鼠 ALI 模型。小鼠适应环境和饮食后，分为 6 组，分别为：空白对照组（A），给予对照饲

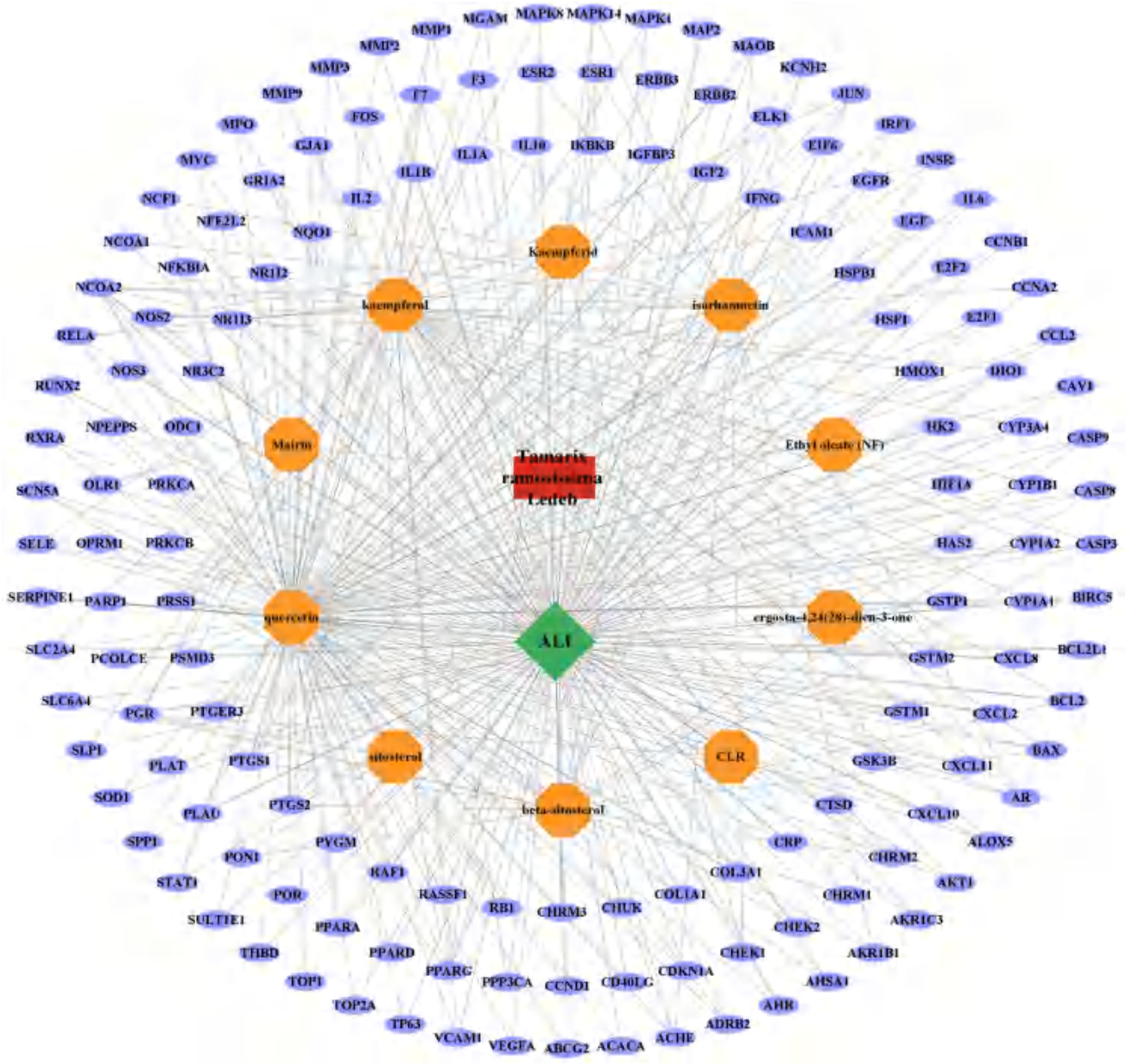

图 1　活性成分交集靶点网络图

Fig 1　Active ingredient-targets intersection network diagram

料；模型组（B），给予酒精液体饲料；红柳低浓度组（C），给予酒精液体饲料＋含槲皮素 50 mg 的红柳 /（kg • d）；红柳中浓度组（D），给予酒精液体饲料＋含槲皮素 100 mg 的红柳 /（kg • d）；红柳高浓度组（E），给予酒精液体饲料＋含槲皮素 150 mg 的红柳 /（kg • d）；阳性药物组（F），给予酒精液体饲料＋还原型谷胱甘肽 200 mg/（kg • d）。灌胃方式给予红柳提取物，腹腔注射还原型谷胱甘肽，连续 10 d，在此期间记录小鼠体重、精神状态。

2.2.2　样本采集及处理　在第 11 日 8 点给予模型组、阳性药物组、红柳组小鼠酒精（31.5%）灌胃 1 次，空白对照组小鼠用相同量蒸馏水灌胃，9 h 后摘除眼球并取血。断颈处死小鼠后，取肝脏。

2.2.3　数据分析　使用 SPSS 27.0.10 软件处理相关数据，结果用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较使用单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.2.4　肝脏指数的计算　肝脏指数（%）＝肝脏重量 / 体重 ×100%。与空白对照组比较，模型组肝脏指数显著升高，说明造模成功。与模型组比较，红柳高、中、低浓度组肝脏指数显著降低（$P < 0.01$），见表 3。

2.2.5　AST 和 ALT 的测定　室温静置血样 1 h，凝固后，低温离心（10 000 r • min^{-1}，15 min），取上清液，然后按照 AST 试剂盒步骤测定；取肝脏组织加入生理盐水，低温机械匀浆，制成浓度

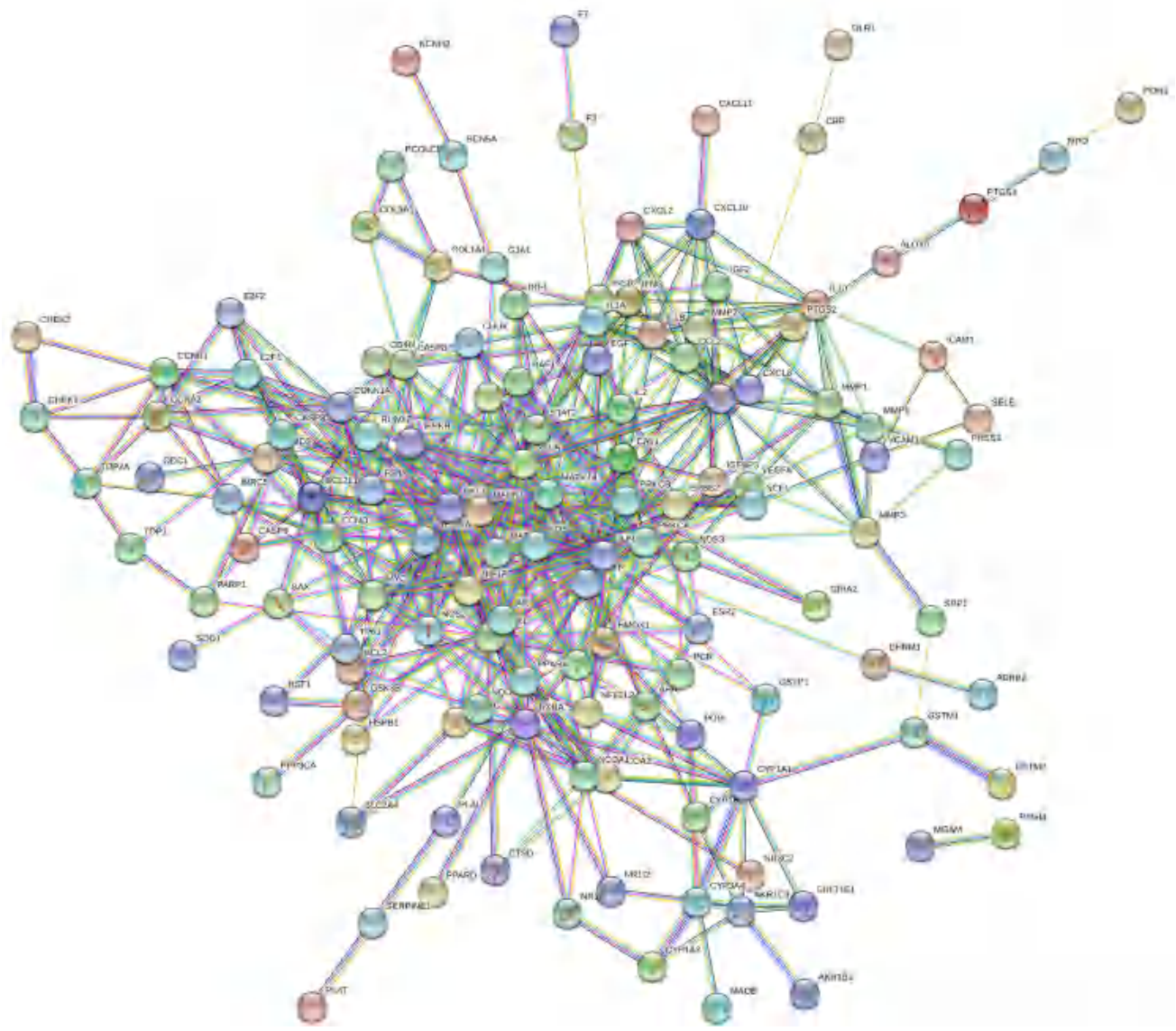

图 2 红柳治疗 ALI 的 PPI

Fig 2 Protein interaction network for ALI

表 3 小鼠肝脏指数

Tab 3 Mouse liver index

组别	肝脏指数 /%
空白对照组	2.65±0.07
模型组	4.41±0.12**
红柳低浓度组	3.18±0.04##
红柳中浓度组	2.80±0.11##
红柳高浓度组	2.77±0.99##
阳性药物组	4.25±0.07

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

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

为 10% 的匀浆液，室温离心（2500 r • min^{-1}，15 min），取上清液，再用生理盐水稀释至浓度为 0.1%，按照 ALT 试剂盒步骤测定。

测定结果显示，与空白对照组比较，模型组 AST 和 ALT 水平显著升高。与模型组比较，红柳高浓度组 AST 和 ALT 水平显著降低，红柳低浓度组 AST 水平降低，见表 4。

2.2.6 MDA 的测定 取肝脏组织，加入 PBS 匀浆，低温离心（10 000 *g*，15 min），取上清液，按照 MDA 试剂盒操作步骤测定。

测定结果显示，与空白对照组比较，模型组 MDA 水平显著升高。与模型组比较，红柳高浓度组和阳性药物组 MDA 水平均显著降低，红柳中、低浓度组 MDA 水平降低（见表 5）。

2.2.7 HE 染色 取肝脏组织，依次进行固定、包埋、切片、染色。结果空白小鼠肝小叶结构正常，无明显脂滴；模型组小鼠肝脏内部分肝细胞内充斥着脂滴空泡，红柳给药组肝脏脂肪变性状况减轻，脂滴空泡减少（见图 5）。

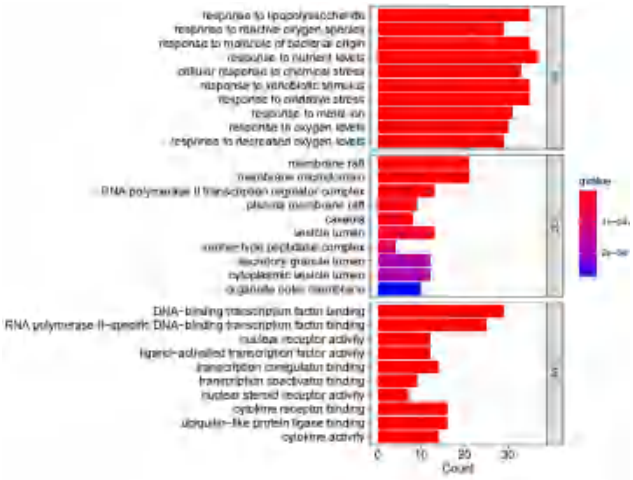

图 3　GO 基因功能富集分析图

Fig 3　GO gene function enrichment analysis（histogram）

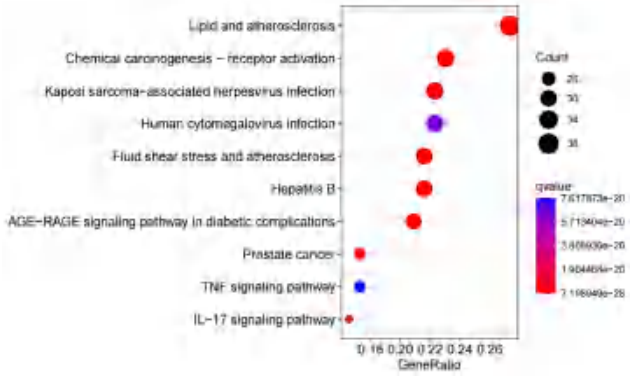

图 4　红柳治疗 ALI 前 10 条 KEGG 富集通路

Fig 4　Top 10 KEGG enrichment pathways in the treatment of ALI

表 4　各组小鼠 AST 和 ALT 水平

Tab 4　AST and ALT levels in each group

组别	AST/（U・L^{-1}）	ALT/（U・gprot^{-1}）
空白对照组	10.64±0.50	19.83±0.66
模型组	27.25±0.41**	25.82±0.55**
红柳低浓度组	25.61±0.11$^{\#}$	24.91±0.13
红柳高浓度组	19.16±0.24$^{\#\#}$	23.93±0.22$^{\#\#}$
阳性药物组	24.04±1.03$^{\#\#}$	24.98±0.17

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，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

表 5　各组小鼠 MDA 水平

Tab 5　MDA levels of mice in each group

组别	MDA/（μmol・L^{-1}）
空白对照组	1.16±0.63
模型组	1.54±0.50**
红柳低浓度组	1.33±0.14$^{\#}$
红柳中浓度组	1.38±0.05$^{\#}$
红柳高浓度组	1.17±0.10$^{\#\#}$
阳性药物组	1.26±0.50$^{\#\#}$

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，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

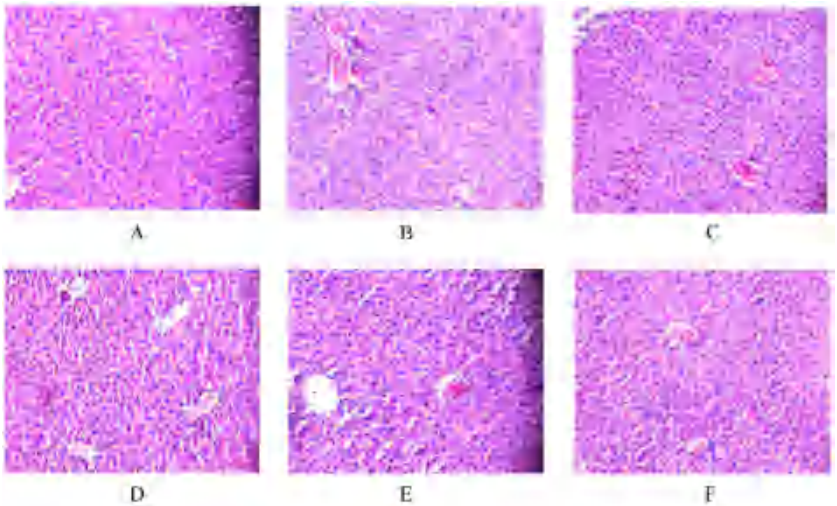

图 5　小鼠组织 HE 染色图（×200）

Fig 5　HE staining for tissue（×200）

A. 空白对照组（blank control group）；B. 模型组（model group）；C. 红柳低浓度组（*Tamarix ramosissima* Ledeb low concentration group）；D. 红柳中浓度组（*Tamarix ramosissima* Ledeb medium concentration group）；E. 红柳高浓度组（*Tamarix ramosissima* Ledeb high concentration group）；F. 阳性药物组（positive drug group）

2.2.8　NF-*κ*B p65 蛋白测定　取肝脏组织于研钵中，加入 RIPA 裂解组织后；低温离心（12 000 r・min^{-1}，25 min），取上清液，进行蛋白含量测定，而后用金属浴变性蛋白（100 ℃，15 min）。依次经电泳、电转，将蛋白转移到 PVDF 膜上，用 5% 脱脂奶封闭 1.5 h，加一抗在 4 ℃条件下反

应 8 h，回收一抗，再加二抗在室温下反应 1.5 h，漂洗后显色。结果显示，与空白对照组比较，模型组 NF-κB p65 蛋白表达水平显著升高。与模型组比较，红柳中、高浓度组和阳性药物组蛋白表达水平降低，见图 6。

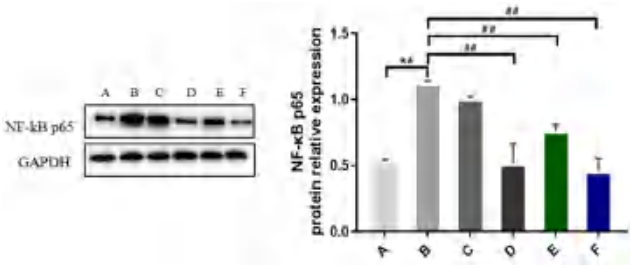

图 6　NF-κB p65 蛋白表达水平

Fig 6　NF-κB p65 protein expression level

A. 空白对照组（blank control group）；B. 模型组（model group）；C. 红柳低浓度组（*Tamarix ramosissima* Ledeb low concentration group）；D. 红柳中浓度组（*Tamarix ramosissima* Ledeb medium concentration group）；E. 红柳高浓度组（*Tamarix ramosissima* Ledeb high concentration group）；F. 阳性药物组（positive drug 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　讨论

影响 ALI 的因素较多，其发病机制复杂，目前仍未找到疗效显著的治疗药物。中药药材构成复杂，对中药的研究受到了重重障碍。利用网络药理学和分子对接技术可以反映出化学成分和生物大分子物质之间的相互作用，能够有效筛选出中药的有效成分，更好地为中药研究提供理论研究基础 [13-14]，从而为红柳多成分、多靶点、多途径治疗 ALI 提供参考。

本研究得出红柳主要保肝活性成分为槲皮素、山柰酚、异鼠李素等黄酮类化合物。槲皮素可对 ALI 起防治作用，能够有效抑制 PI3K/AKT 和 NF-κB 通路的激活，降低 TNF-α 和 IL-6 水平、升高 IL-10 水平，减轻炎症反应，有效遏制 ALI 的进一步恶化 [15]。山柰酚已证实有保肝作用，其在对乙醛的清除上也有一定疗效，能抑制细胞色素 P4502E1 的活性，从而减少活性氧的产生，最终阻断酒精引起的脂质过氧化进程 [16]。异鼠李素可以保护细胞免受炎症，氧化损伤和细胞凋亡 [17]。

PPI 数据库生成 870 条蛋白相互作用连线，其中关键的靶标蛋白有 NF-κB 家族成员 RELA（p65）、核转录激活蛋白 1（AP-1）家族的组成成员 JUN、丝裂原活化蛋白激酶 1（MAPK1）、蛋白激酶 B（AKT1）。其中，JUN 和 MAPK1 主要参与肝细胞生长因子受体信号的传导。AKT1 作为细胞存活的信号和必要因素，参与细胞的生长和增殖，能够抑制肝细胞和肝星状细胞的纤维生成 [18]；RELA/NF-κB p65 参与许多生物学过程，诸如炎症的产生、免疫作用、分化、增殖、肿瘤发生和凋亡。

进一步的 GO 及 KEGG 分析显示红柳主要参与脂质 - 动脉粥样硬化、糖尿病并发症 AGE-RAGE 以及流体剪切应力 - 动脉粥样硬化等信号通路。其中在脂质 - 动脉粥样硬化信号通路中，主要通过调控 PI3K/AKT 发挥抑制肝星状细胞活化与增殖，并促进肝星状细胞凋亡，降低肝组织内氧化应激水平，减少胶原蛋白合成和细胞外基质沉积以及增强肝细胞自噬等多方面作用，实现改善肝脏纤维化的作用；AGE-RAGE 信号通路常见于糖尿病的并发症中，通过中心分子 AKT，抑制 NF-κB 影响肝细胞存活 [19-20]。在肝损伤的过程中，NF-κB p65 被诱导磷酸化，促使大量的炎症因子在肝细胞处被释放，造成肝脏炎性损伤。Cheong 等 [21] 发现，抑制 NF-κB p65 的激活可以显著减轻肝损伤；流体剪切应力 - 动脉粥样硬化信号通路，关联 PI3K/AKT、TGF-β、MAPK 等，研究表明抑制 TGF-β 信号通路可改善代谢相关脂肪性肝炎 [22-24]。

为了验证红柳对 ALI 治疗作用的药效物质基础，课题组选用异鼠李素、山柰酚、槲皮素作为配体，RELA/NF-κB p65、JUN、MAPK1、AKT1 为受体，进行两两分子对接及可视化。发现其中多数结合能＜－ 35.8720 kJ • mol^{-1}。此结果表明红柳核心成分能与 ALI 关键靶点较好结合，可以考虑红柳药效成分是通过调节上述靶点起效。动物实验结果显示，红柳给药组 AST、ALT、MDA 水平降低，HE 染色结果显示肝脏组织的变性状况呈现变轻的趋势，进一步的 NF-κB p65 蛋白表达水平下调，表明红柳对 ALI 的作用机制可能与抑制炎症信号通路 NF-κB 活化有关。

本研究结果存在局限性，由于本研究主要基于网络数据库，通过数字挖掘的方式预测红柳有效成分和作用机制，但通过现有数据库收集得出的活性成分并不一定是药效成分，作用机制也并不明确。虽然动物实验初步证实了其疗效，但是进一步的药理实验和机制研究仍需深入。

参考文献

[1] Karatayli E，Hall RA，Weber SN，et al. Effect of alcohol on the interleukin 6-mediated inflammatory response in a new mouse model of acute-on-chronic liver injury [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2019，1865（2）：298-307.

[2] 孟文文，刘慧茹，张文光，等 . 中药防治酒精性肝病作用机制的研究进展 [J]. 中草药，2022，53（3）：868-881.

[3] 张旋，李蕊希，郑洲，等 . 极端干旱区多枝柽柳叶片功能性状及其与土壤理化因子的关系 [J]. 生态学报，2023，43（9）：3699-3708.

[4] 王映联，王世彪，张文福 . 金塔柽柳的资源与开发应用研究进展 [J]. 临床合理用药杂志，2021，14（14）：177-179.

[5] Wang ZD，Zhang Y，Dai YD，et al. Tamarix chinensis Lour inhibits chronic ethanol-induced liver injury in mice [J]. World J Gastroenterol，2020，26（12）：1286-1297.

[6] 久保惠子 . 西河柳及荸荠的抗肝炎作用研究 [J]. 国外医学 • 中医中药分册，1991，13（2）：116.

[7] 张钰，韩琛，王朝霞，等 . 柽柳对小鼠酒精性肝损伤的保护作用及机制 [J]. 山东大学学报（医学版），2017，55（2）：61-67.

[8] 赵妍，张美双，王壮，等 . 柽柳保肝解酒颗粒剂的功效 [J]. 吉林农业大学学报，2012，34（4）：413-416，422.

[9] Abouzid S，Sleem A. Hepatoprotective and antioxidant activities of Tamarix nilotica flowers [J]. Pharm Biol，2011，49（4）：392-395.

[10] Assiri AMA. Protective effect of Tamarix amplexicaulis seeds against hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride，paracetamol，or D-galactosamine [J]. J Saudi Chem Soc，2006，10（3）：437-446.

[11] Sehrawat A，Sultana S. Tamarix gallica ameliorates thioacetamide-induced hepatic oxidative stressand hyperproliferative response in Wistar rat [J]. J Enzyme Inhib Med Chem，2006，21（2）：215-223.

[12] 朱雪晶，王梦婷，鄢和新，等 . 慢性肝病常用动物模型及建模方案 [J]. 肝脏，2022，27（9）：1030-1035.

[13] Zuo J，Wang X，Liu Y，et al. Integrating network pharmacology and metabolomics study on anti-rheumatic mechanisms and antagonistic effects against methotrexate-induced toxicity of Qing-Luo-Yin [J]. Front Pharmacol，2018，9（10）：1472.

[14] 汪亚楠，闫孝明，张晴宇，等 . 基于网络药理学和分子对接技术探讨葛花 - 枳椇子治疗酒精性肝病的潜在作用机制 [J]. 浙江大学学报（医学版），2020，49（6）：714-724.

[15] Zhu ML，Zhou XF，Zhao JP. Quercetin prevents alcohol-induced liver injury through targeting of PI3K/AKT/nuclear factor-κB and STAT3 signaling pathway [J]. Exp Ther Med，2017，14（6）：6169-6175.

[16] 郭德建，汪程远，赵奎，等 . 山柰酚与 2，6- 二叔丁基 -4- 甲基苯酚体外抗氧化活性的比较研究 [A]//2006 年国际生物医药及生物技术论坛（香港）会议论文集 [C]. 《中草药》杂志编辑部，2006.

[17] 王德宇，杨东亮，常刘 . 异鼠李素对 H_2O_2 诱导的肠上皮细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 陕西中医，2023，44（1）：7-11.

[18] Bava SV，Sreekanth CN，Thulasidasan AK，et al. AKT is up stream and MAPKs are downstream of NF-κB in paclitaxel-induced survival signaling events，which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism [J]. Int J Biochem Cell Biol，2011，43（3）：331-341.

[19] Kao YH，Chen PH，Wu TY，et al. Lipopolysaccharides induce Smad2 phosphorylation through PI3K/AKT and MAPK cascades in HSC-T6 hepatic stellate cells [J]. Life Sci，2017，184（2）：37-46.

[20] Li Y，Ding XM，Fan P，et al. Inactivation of p27kip1 promoted nonspecific inflammation by enhancing macrophage prolifer ation in islet transplantation [J]. Endocrinology，2016，157（11）：4121-4132.

[21] Cheong KO，Shin DS，Bak J，et al. Hepatoprotective effects of zingerone on carbon tetrachloride-and dimethylnitrosamine induced liver injuries in rats [J]. Arch Pharm Res，2016，39（2）：279-291.

[22] Liu CM，Ma JQ，Xie WR，et al. Quercetin protects mouse liv er against nickel-induced DNA methylation and inflammation associated with the Nrf2/HO-1and p38/STAT1/NF-κB pathway [J]. Food Chem Toxicol，2015，82（8）：19-26.

[23] Penas FN，Ceveyá C，Siffo S，et al. Hepatic injury associated with Trypanosoma cruzi infection is attenuated by treatment with 15-deoxy-Δ12，14 prostaglandin J2 [J]. Exp Parasitol，2016，170（11）：100-108.

[24] Zhao YC，Liu XL，Ding CB，et al. Dihydromyricetin reverses thioacetamide-induced liver fibrosis through inhibiting NF-κB mediated inflammation and TGF-β1-regulated of PI3K/AKT signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2021，12（2）：783-886.

（收稿日期：2023-09-26；修回日期：2023-11-13）

MS19 通过抑制 IRF5 表达调控巨噬细胞极化减轻 CTD-ILD 肺部炎症的作用研究

陈珊珊，明倩文，肖恩华，王晓红*（中南大学湘雅二医院，长沙 410011）

摘要：目的 探讨 MS19 通过靶向干扰素调节因子 5（IRF5）对结缔组织疾病相关肺间质病变（CTD-ILD）小鼠模型肺部炎症的治疗作用及其相关机制。**方法** 动物实验：构建 CTD-ILD 小鼠模型，予以 MS19 干预，研究 MS19 对 CTD-ILD 小鼠肺部炎症的影响。细胞实验：对 RAW264.7 细胞进行 OE-IRF5 转染，然后予以 MS19 干预，研究 MS19 对 IRF5 调控的巨噬细胞 M1 型极化及炎症反应的影响。**结果** 动物实验：CTD-ILD 小鼠出现明显的肺部炎症，小鼠支气管肺泡灌洗液（BALF）中 IRF5 的表达增高、巨噬细胞 M1 型极化增加及促炎因子（TNF-α、IL-6 和 IL-1β）的表达升高；而 MS19 干预后，CTD-ILD 小鼠的肺部炎症减轻，BALF 中 IRF5 表达降低、巨噬细胞 M1 型极化减少及促炎因子表达下降。细胞实验：脂多糖诱导巨噬细胞 M1 型极化、促炎因子表达增加；转染 OE-IRF5 后，巨噬细胞 M1 型极化增加、促炎因子表达增加；MS19 干预后，巨噬细胞 M1 型极化减少、促炎因子表达减少。**结论** MS19 通过靶向抑制 IRF5 调控巨噬细胞极化及炎症反应，从而改善 CTD-ILD 的肺部炎症，为防治 CTD-ILD 提供潜在靶点和候选药物。

关键词：MS19；寡聚脱氧核糖核苷酸；干扰素调节因子 5；巨噬细胞极化；结缔组织疾病相关肺间质病变

中图分类号：R563 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1178-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.011

Role of MS19 in alleviating lung inflammation in CTD-ILD by regulating macrophage polarization through inhibiting the expression of IRF5

CHEN Shan-shan, MING Qian-wen, XIAO En-hua, WANG Xiao-hong* (*The Second Xiangya Hosipital of Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of MS19 on pulmonary inflammation in mice with connective tissue disease related interstitial lung disease (CTD-ILD) by targeting IRF5 and related mechanism. **Methods** Animal experiments: CTD-ILD mouse models were constructed and treated with MS19 to determine the effect of MS19 on pulmonary inflammation in CTD-ILD mice. Cell experiments: RAW264.7 cells were transfected with OE-IRF5, and then treated with MS19 to study the effect of MS19 on IRF5-mediated M1 polarization and inflammatory responses of the macrophages. **Results** Animal experiments: CTD-ILD mice showed significant pulmonary inflammation, with elevated expression of IRF5, M1 polarization of macrophages, and expression of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, and IL-1β) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). While the CTD-ILD mice treated with MS19, their pulmonary inflammation was alleviated, and expression of IRF5, M1 polarization of macrophages and expression of pro-inflammatory cytokines were all decreased in BALF. Cell experiments: LPS induced an increase in M1 polarization and expression of pro-inflammatory cytokines in the macrophages. After transfection of OE-IRF5, M1 polarization of macrophages and expression of pro-inflammatory cytokines increased. After the MS19 treatment, M1

基金项目：湖南省自然科学基金（No.2022JJ40714）；中南大学湘雅二医院新进人员科研启动项目。

作者简介：陈珊珊，女，博士研究生，主治医师，主要从事胸部影像及呼吸医学研究，email：chenshanshan@csu.edu.cn *通信作者：王晓红，女，博士，助理研究员，主要从事胸部影像及呼吸医学研究，email：wangxh00@csu.edu.cn

polarization of macrophages and expression of pro-inflammatory cytokines decreased. **Conclusion** MS19 improves pulmonary inflammation in CTD-ILD by targeting and inhibiting IRF5, thereby providing potential targets and candidate drugs for the prevention and treatment of CTD-ILD.
Key words: MS19; oligodeoxynucleotide; interferon regulatory factor 5; macrophage polarization; connective tissue disease related interstitial lung disease

间质性肺疾病（ILD）是结缔组织疾病（CTD）患者的常见表现[1]，也是导致患者死亡的主要原因之一[2]，CTD-ILD 具有较高的发病率和死亡率。虽然生物制剂、抗纤维化药物，甚至干细胞移植等新方法已经被引入到 CTD-ILD 的治疗中，但具体的肺部获益情况还没有定论[3]。因此，迫切需要找到新的方法来预防或治疗这种难治性疾病。

异常的炎症和过度的纤维化反应是 CTD-ILD 的可能发病机制[4]。巨噬细胞不仅协调炎症过程，还介导纤维化的形成。许多研究证实巨噬细胞参与了 CTD-ILD 的发病[5-10]，且巨噬细胞极化可能在 CTD-ILD 中起着重要的作用[11]。IRF5 是巨噬细胞极化的重要调节器，是 M1 型巨噬细胞发挥作用的确切因子[12-15]，其高表达是自身免疫性疾病的重要致病因素[16]，*IRF5* 的基因多态性与 CTD-ILD 密切相关[17]。因此，IRF5 可能通过调控肺泡巨噬细胞极化来参与 CTD-ILD 肺部炎症的免疫应答。

AAAG ODN（MS19）是一种由“AAAG”重复序列组成的单链寡聚脱氧核糖核苷酸（ODN）[18]，序列为 5'-AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG-3'[19]。生物信息学分析结果显示，AAAG ODN 序列与促炎细胞因子顺式调控元件中的 IRF5 结合位点一致。已有多个研究发现 MS19 可降低 IRF5 的表达、下调巨噬细胞 M1 型极化，从而减轻炎症反应[20-23]。因此，MS19 可能作为一种能够干扰 IRF5 功能的细胞质诱饵，被开发为治疗炎症性疾病的候选药物。

因此，推测 MS19 可能通过靶向干扰 IRF5 来抑制巨噬细胞 M1 型极化，减轻 CTD-ILD 的肺部炎症，从而起到治疗作用。本研究通过构建 CTD-ILD 小鼠模型及体外细胞实验来研究 MS19 对 CTD-ILD 的肺部炎症的作用及可能机制。

1　材料

1.1　实验动物及细胞

6 ～ 7 周龄、体重（17±2）g 的 DBA/1 雄性小鼠 [广东省医学实验动物中心，实验动物使用许可证号：SYXK（湘）2017-0002]。小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞（美国 ATCC）。本研究方案已获得中南大学湘雅二医院伦理和方案审查委员会的批准（批件号：2022254）。

1.2　ODNs

ODNs 由中国 Takara 生物工程有限公司合成，序列为 AAAG ODN（MS19）：5'-AAAG-AAA-G-AAAGAAAGAAAGA AAG-3'，Ctrl ODN：5'-CCTCCTCCTCCTCC TCCTCCTCCT-3'。

1.3　试药及仪器

IRF5 表达质粒（OE-IRF5）及其阴性对照（OE-NC）（上海吉玛制药公司）；Lipofectamine 3000 试剂（美国 Life Technologies Corporation）；RIPA 试剂（Beyotime）；PVDF 膜（美国 Invitrogen）；兔抗 IRF5（ab181553）、兔抗 CD86（ab239075）、兔抗 iNOS（ab178945）和兔抗 p-IRF5（ab309088）（美国 Abcam）；TRIzol 试剂（美国 Sigma）；反转录套件、SYBR Green Taq Mix（Takara）；细胞裂解缓冲液（Beyotime）；ELISA 试剂盒（美国 R&D Systems）；博来霉素（BLM，日本 Selleck）；Ⅱ型胶原（CⅡ）、完全弗氏佐剂（美国 Chondrex）；RPMI 1640 培养基（美国 Gibco）；脂多糖（LPS，美国 Sigma-Aldrich）；流式细胞仪（美国 BD 公司）；FlowJo 软件（第 10 版，美国 TreeStar）；qPCR 仪（美国 Applied Biosystems）。

2　方法

2.1　小鼠分组与 CTD-ILD 模型小鼠建立

小鼠在 22 ～ 24 ℃、湿度 50% ～ 60%、12 h/12 h 光照 / 黑暗的无菌环境中喂养。将小鼠随机分为 4 组（每组 10 只）：正常组（Normal 组）、模型组（PBS 组）、模型对照组（Ctrl ODN 组）和模型处理组（MS19 组），后 3 组构建 CTD-ILD 小鼠模型，然后分别予以 PBS、Ctrl ODN 或 MS19 干预。

采用胶原诱导性关节炎（CIA）和 BLM 诱导性间质性肺纤维化相结合的方法建立小鼠 CTD-ILD 模型[24]。模型组小鼠通过在尾部基部皮下注射 100 μL 含有 4 mg·mL^{-1} CⅡ的 3 mg·mL^{-1} 完全弗氏佐剂乳化液诱导 CIA，注射当日记为第 0 日。在第 21 日，小鼠通过在尾部基部注射

100 μg C Ⅱ增强。在第 28 日，将 1.2 mg • mL^{-1} 的 BLM 溶解在生理盐水中，以 2 mg • kg^{-1} 的剂量注入支气管，诱导肺纤维化。对照组向支气管注射不含 BLM 的生理盐水。然后，所有小鼠经口腔给予生理盐水处理 28 d，再根据分组分别对 CTD-ILD 小鼠腹腔注射 0.1 mL PBS 或溶解于 0.1 mL PBS 的 25 μg Ctrl ODN 或 MS19 两次，两次给药间隔时间为 24 h，Normal 组不予处理。小鼠于第 56 日予颈椎脱臼处死，然后取得肺组织进行组织学分析。

小鼠的肺组织被固定在 4%（*w*/*V*）福尔马林中，用石蜡包埋、切片，用苏木精 - 伊红（HE）染色，并在显微镜下观察。肺组织的组织病理学评分为 0 ～ 12 分。每个肺组织切片都根据三个分类标准评估：肺泡间隔增厚的程度、肺泡腔内渗出的严重程度和周围血管炎性细胞浸润的程度。每个分类分为：0 分，正常；1 分，轻度；2 分，中度；3 分，重度；4 分，极重度。小鼠肺组织的病理分数为这些指标评分的总和。

2.2 肺湿 - 干重比

将左肺下叶切割并称重，在测量湿重后，将肺完全干燥 48 h 以测量干重。湿 - 干重比＝湿重 / 干重。

2.3 小鼠支气管肺泡灌洗液（BALF）收集

解剖小鼠颈部、胸部，暴露气管及主支气管，将气管和左主支气管结扎，穿刺针穿刺气管上段，予 1.0 mL PBS ＋ 0.5 mL 乙二胺四乙酸（EDTA）灌洗右肺，重复 3 遍。按组收集的 BALF 于 4 ℃以 1200 r • min^{-1}（离心半径 8 cm）离心 15 min，上清液储存于－ 80 ℃冰箱中备用。

2.4 细胞培养和分组

RAW264.7 细胞在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中，使用含有 10% 灭菌胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。根据具体分组转染相应慢病毒后，RAW264.7 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种在 24 孔板中，然后在含有 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养过夜。第 2 日，添加 1 μg • mL^{-1} LPS 和（或）8 μg • mL^{-1} MS19 或 Ctrl ODN。将 RAW264.7 细胞分为 6 组：Control 组（A 组）、LPS 组（B 组）、LPS ＋ OE-NC 组（C 组）、LPS ＋ OE-IRF5 组（D 组）、LPS ＋ OE-IFR5 ＋ Ctrl ODN 组（E 组）、LPS ＋ OE-IFR5 ＋ MS19 组（F 组），C、D、E、F 组分别为转染相应慢病毒载体的稳转细胞。各组细胞接种在 24 孔板中培养过夜后，第 2 日 B、C、D、E、F 组分别予 1 μg • mL^{-1} 的 LPS 刺激，然后 E、F 组再分别加入 8 μg • mL^{-1} 的 Ctrl ODN 或 MS19 进行处理。

2.5 细胞转染

使用 Lipofectamine 3000 试剂按照方案将携带 OE-NC 和 OE-IRF5 质粒的慢病毒载体转染到 RAW264.7 细胞中。

2.6 蛋白质免疫印迹（Western blot）

RAW264.7 细胞在冷的 RIPA 试剂中裂解，利用 NE-PERTM 核和胞质提取试剂按照说明书提取细胞核和胞质中的蛋白质。经 SDS-PAGE 分离后，将蛋白质转移至 PVDF 膜。在 5% 脱脂奶中阻断后，使用以下抗体：兔抗 IRF5，兔抗 p-IRF5，兔抗 CD86 和兔抗 iNOS。然后，膜用抗兔 IgG 血清孵育。在使用增强的化学发光试剂可视化后，使用 Image J 软件分析蛋白质条带的密度。

2.7 定量反转录 -PCR（qRT-PCR）

总 RNA 通过 TRIzol 试剂按照方案提取；IRF5 经反转录套件逆转录；使用 SYBR Green Taq Mix 确定 IRF5 的转录；GAPDH 作为内参。引物如下：IRF5-F，5'-GTTGCCTTTGACGGACCTA-3'，IRF5-R，5'-GGCCCACTCCAGAACACCT-3'；GAPDH-F，5'-CTGACATGCCGCCTGGAGA-3'，GAPDH-R，5'-ATGTAGGCCATGAGGTCCAC-3'。

2.8 流式细胞术

① 从小鼠 BALF 中分离细胞，将细胞的浓度调整到每管约 1×10^6 个细胞 /100 μL，然后将细胞与抗 CD86 和抗 IRF5 抗体在 4 ℃孵育 30 min。② RAW264.7 细胞用胰蛋白酶 -EDTA 制备成单细胞悬浮液，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，并在 4 ℃避光条件下与 PE 标记的抗 F4/80 和 PE/Cy7 标记的抗 CD86 小鼠单克隆抗体共孵育 30 min。然后，通过流式细胞仪检测。获得的流式细胞仪图像通过 FlowJo 软件 10.0.7 进行分析。

2.9 ELISA 法测定促炎因子（TNF-α、IL-6、IL-1β）水平

使用细胞裂解缓冲液裂解 RAW264.7 细胞，并收集细胞上清液。使用 ELISA 试剂盒定量测定细胞上清液中的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平，在 450 nm 处测量 *OD* 值。

2.10 统计学分析

使用 SPSS 20.0 进行数据分析，以均值 ± 标准差（SD）表示。每个实验均进行三次。采用 Student’s *t* 检验评估两组之间的差异，而采用 One-way 方差分析（ANOVA）和 Tukey’s 的多重比较检验分析几个组之间的差异，$P < 0.05$ 表示

差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　MS19 对 CTD-ILD 模型小鼠肺部炎症的影响

观察 MS19 对 CTD-ILD 模型小鼠肺部炎症的影响，小鼠肺组织病理切片 HE 染色显示：与 Normal 组比，PBS 组的小鼠肺泡间隔明显增厚、肺泡腔内出现大量的渗出物以及周围大量的炎症细胞浸润，说明 CTD-ILD 小鼠模型建立成功；而与 Ctrl ODN 组比，MS19 干预后的小鼠肺泡间隔增厚减轻、肺泡腔内渗出物减少以及周围炎症细胞浸润减少（见图 1A）；说明 MS19 能减轻 CTD-ILD 小鼠的肺部炎症。肺组织病理评分间接证实了这一点，PBS 组小鼠的肺组织病理得分较 Normal 组明显增高，而 MS19 组小鼠的肺组织病理得分较 Ctrl ODN 组明显减低（见图 1B）。采用小鼠肺组织的湿 - 干重比来评估肺组织的含水量，PBS 组较 Normal 组小鼠肺组织湿 - 干重比升高，而 MS19 组较 Ctrl ODN 组小鼠肺组织的湿 - 干重比降低（见图 1C），提示 CTD-ILD 小鼠的肺组织含水量较正常小鼠高，而 MS19 干预能减少 CTD-ILD 小鼠肺组织的含水量，间接说明 MS19 能减轻 CTD-ILD 小鼠的肺部炎症。

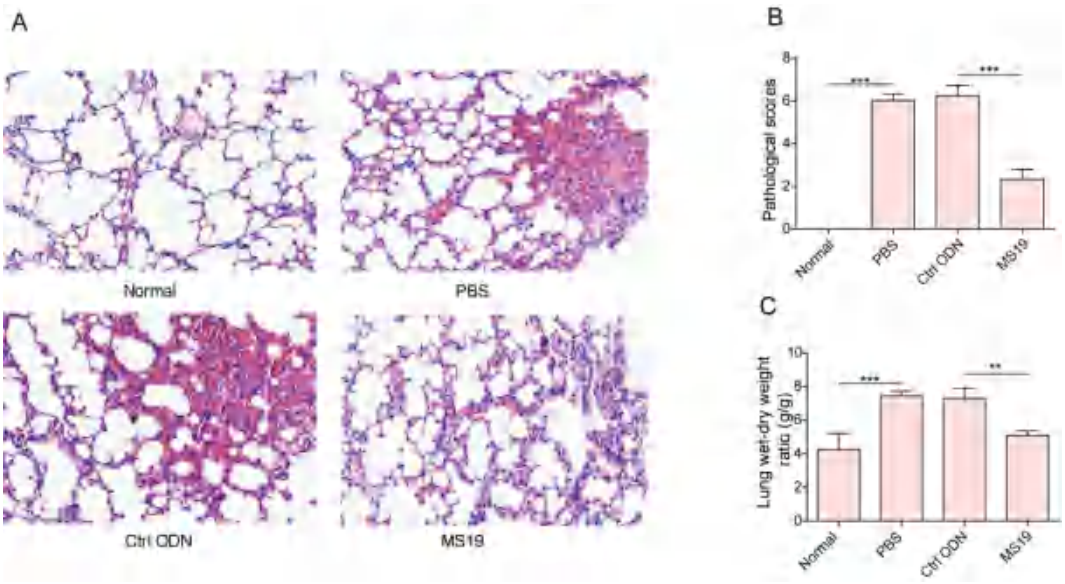

图 1　MS19 对 CTD-ILD 小鼠肺部炎症的影响（×400，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 1　Effect of MS19 on pulmonary inflammation in the CTD-ILD model mice（×400，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

3.2　MS19 对 CTD-ILD 模型小鼠 BALF 中 IRF5 表达的影响

qRT-PCR 结果显示，PBS 组小鼠 BALF 中 IRF5 的 mRNA 表达较 Normal 组升高，而 MS19 组 IRF5 的 mRNA 表达较 Ctrl ODN 组下降（见图 2A）。p-IRF5 是指磷酸化的 IRF5，IRF5 磷酸后转位入细胞核发挥作用。Western blot 显示，PBS 组小鼠 BALF 中 IRF5、p-IRF5 的蛋白水平均较 Normal 组升高，而 MS19 组小鼠 BALF 中 IRF5、p-IRF5 的蛋白水平均较 Ctrl ODN 组降低（见图 2B 及 2C）。这些结果表明，MS19 能够下调 CTD-ILD 模型小鼠 BALF 中 IRF5 的表达。

3.3　MS19 对 CTD-ILD 模型小鼠 BALF 中巨噬细胞 M1 型极化的影响

流式细胞仪测定小鼠 BALF 中 $IRF5^+CD86^+$ 细胞数，与 Normal 组比，PBS 组小鼠 BALF 中 $IRF5^+CD86^+$ 细胞的数量增多，即 M1 型巨噬细胞中 IRF5 的表达增加；而与 Ctrl ODN 组比，MS19 干预后小鼠 BALF 中 $IRF5^+CD86^+$ 细胞的数量减少，即 M1 型巨噬细胞中 IRF5 的表达减少（见图 3A 和 3B），结果表明 MS19 能够抑制 M1 型巨噬细胞中 IRF5 的表达。ELISA 法测定小鼠 BALF 上清液中促炎因子（TNF-α、IL-6 和 IL-1β）的表达，与 Normal 组比，PBS 组 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的表达水平均升高，与 Ctrl ODN 组比，MS19 干预能下调 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的表达（见图 3C ～ 3E），结果表明 MS19 能够抑制 CTD-ILD 模型小鼠 BALF 中促炎因子的表达。综上，MS19 能够抑制 M1 型巨噬细胞中 IRF5 的表达及 BALF 中促炎因子的表达，说明 MS19 能够抑制 CTD-ILD 小鼠 BALF 中巨噬细胞 M1 型极化。

3.4　RAW264.7 细胞的 OE-IRF5 转染效率

LPS 处理 RAW264.7 细胞后，通过 qRT-PCR 测定 IRF5 mRNA 的表达，结果显示 LPS 处理后 RAW264.7 细胞中 IRF5 mRNA 的表达较对照组明

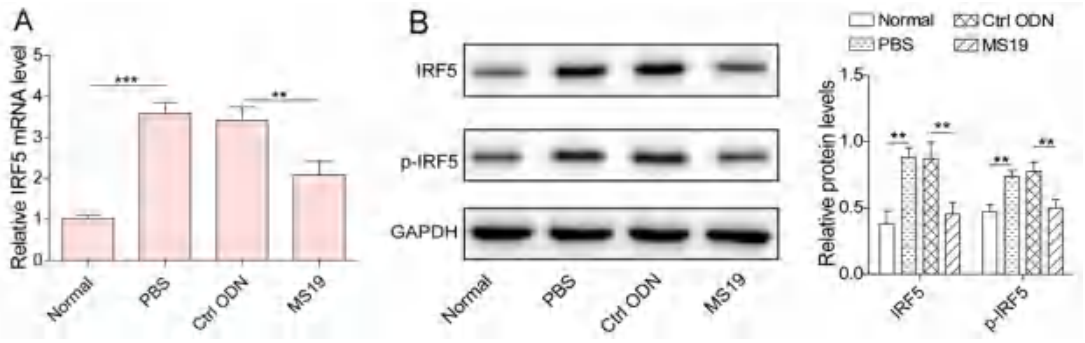

图 2 MS19 对 CTD-ILD 小鼠 BALF 中 IRF5 的表达的影响（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 2 Effect of MS19 on the expression of IRF5 in BALF from CTD-ILD model mice（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

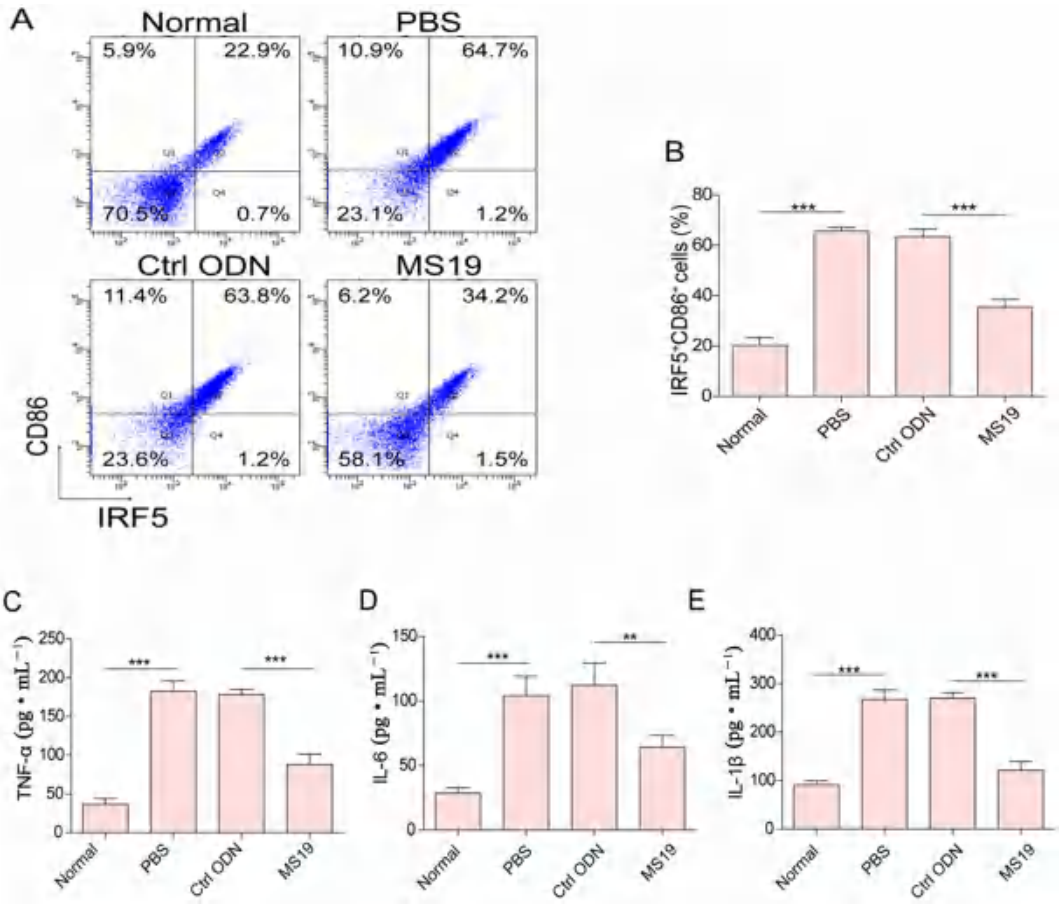

图 3 MS19 对 CTD-ILD 小鼠 M1 型巨噬细胞中 IRF5 的表达及其 BALF 中促炎因子表达的影响（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 3 Effect of MS19 on the IRF5 expression in M1 macrophages and the levels of proinflammatory factors in BALF of CTD-ILD mice（$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

显升高（见图 4A），说明 LPS 能够诱导巨噬细胞中 IRF5 的表达。对 RAW264.7 细胞转染 OE-IRF5 或 OE-NC 后，通过 qRT-PCR 测定 IRF5 mRNA 表达水平来验证 OE-IRF5 的转染效果，对比转染 OE-NC，转染 OE-IRF5 后 IRF5 mRNA 表达水平升高，提示转染效果良好（见图 4B）。

3.5 MS19 对 IRF5 调控 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化及炎症反应的影响

Western blot 及流式细胞术结果显示，与 Control 组比，LPS 组 M1 型巨噬细胞标记物 CD86

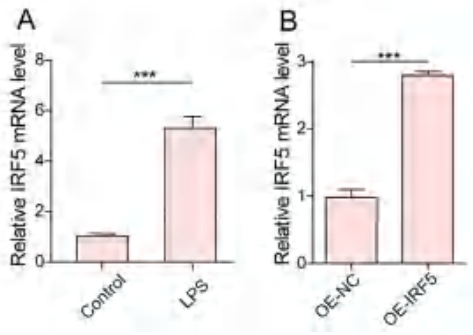

图 4 OE-IRF5 或 OE-NC 转染效率的验证

Fig 4 Verification of transfection efficiency of OE-IRF5 or OE-NC

和 iNOS 蛋白的表达增加，F4/80$^+$CD86$^+$细胞数增多；与 LPS ＋ OE-NC 组比，OE-IRF5 转染后 CD86 和 iNOS 蛋白的表达增加，F4/80$^+$CD86$^+$细胞数增多；而与 LPS ＋ OE-IRF5 ＋ Ctrl ODN 组比，MS19 干预能抑制 CD86 和 iNOS 蛋白的表达，减少 F4/80$^+$CD86$^+$细胞数（见图 5A ～ 5C）。ELISA 法测定各组细胞上清液中促炎因子（TNF-α、IL-6 和 IL-1β）的表达水平，与 Control 组比，LPS 组的促炎因子表达增加；与 LPS ＋ OE-NC 组比，LPS ＋ OE-IRF5 组的促炎因子表达增加；而与 LPS ＋ OE-IRF5 ＋ Ctrl ODN 组比，MS19 干预后促炎因子表达减少（见图 5D ～ 5F）。结果说明 OE-IRF5 能够促进 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化及炎症反应，而 MS19 能抑制 OE-IRF5 的这种作用。因此，MS19 能够抑制 IRF5 调控的巨噬细胞 M1 型极化及炎症反应。

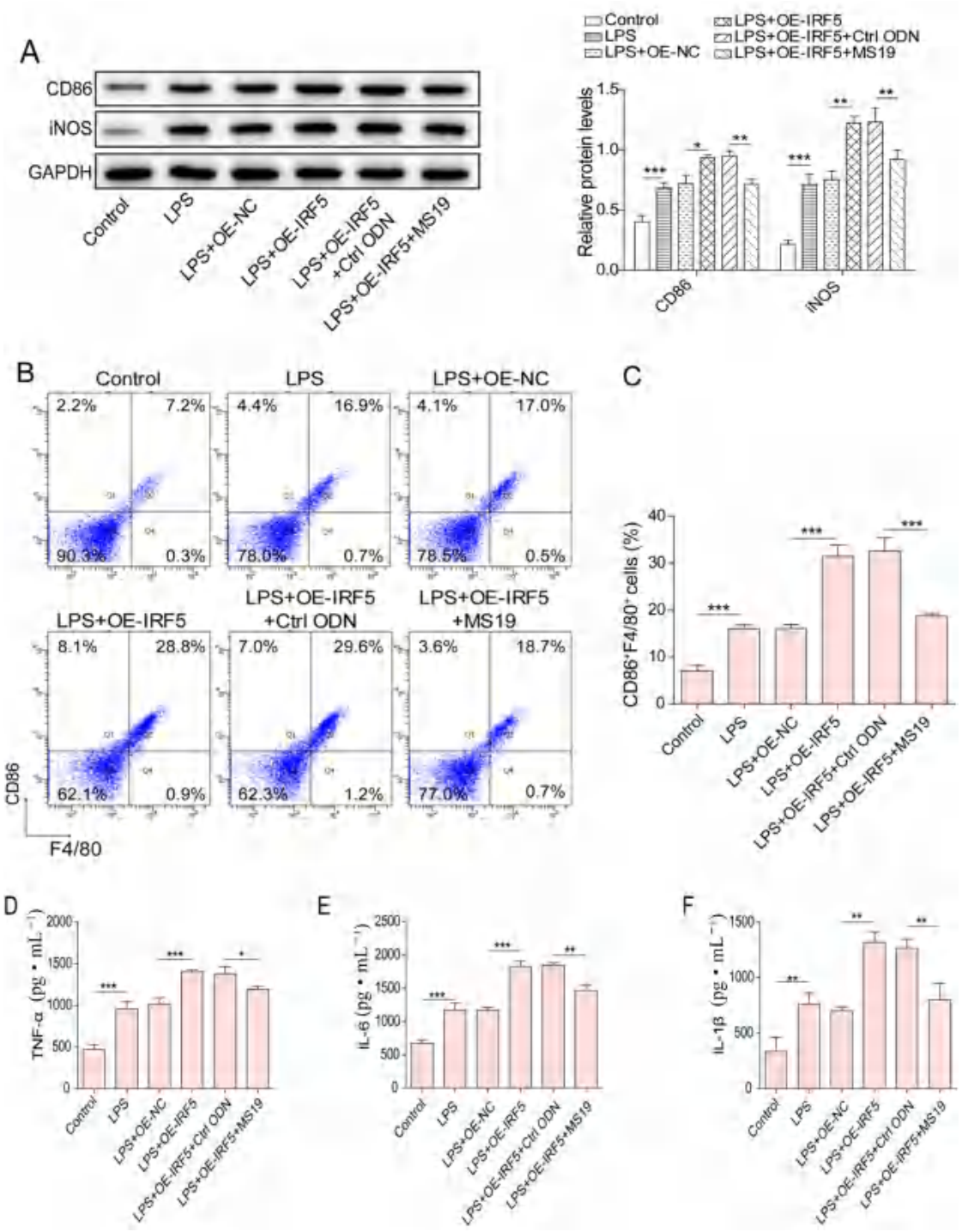

图 5　MS19 对 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化及炎症反应的影响（$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

Fig 5　Effect of MS19 on macrophage M1 polarization and inflammatory responses induced by LPS（$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）

4 讨论

CTD-ILD 的发病率逐年增加，且由于其症状隐匿且非特异性，很多情况下，明确诊断时已经到了疾病的不可逆阶段 [25]，因此，CTD-ILD 的早期诊断和治疗十分重要。

巨噬细胞根据激活状态分为经典激活型（M1）或选择性激活型（M2），M1 型发挥促炎作用，M2 型起修复作用。在气道和肺微环境中，巨噬细胞参与 ILD 的发生发展，本研究通过建立 CTD-ILD 小鼠模型，模拟 CTD-ILD 的体内环境进行研究。作为调节炎症和免疫反应的转录因子家族成员，IRF5 通过调节 I 型干扰素（IFN-I）及促炎因子等途径而发挥作用 [26-27]。IRF5 在细胞稳态时位于细胞质中，外界刺激使其活化后转位进入细胞核，并与其调控的靶基因启动子上的位点序列相结合，启动 IFN-I 及炎症细胞因子的产生而发挥作用。CTD-ILD 属于自身免疫性疾病，大量研究证实 *IRF5* 是自身免疫性疾病的特征基因 [28-30]，而且 IRF5 与 CTD-ILD 密切相关 [17]。既往有研究发现 IRF5 转录水平较低的系统性硬化症患者生存时间较长且 ILD 较轻 [31]，还有研究发现调控巨噬细胞极化的化合物可以通过抗炎作用减轻肺损伤 [32]，也有研究表明 IRF5 在促炎 M1 型巨噬细胞中被诱导表达，并且调控巨噬细胞 M1 型极化 [33]。而在本研究中，CTD-ILD 模型小鼠存在明显的肺部炎症，其 BALF 中 IRF5 表达、M1 型巨噬细胞极化及促炎因子产生均增加；IRF5 过表达能够上调巨噬细胞 M1 型极化及促炎因子的表达。因此，可有理由认为 IRF5 及其调控的巨噬细胞 M1 型极化参与了 CTD-ILD 的发病，进一步研究 IRF5 可否作为 CTD-ILD 的治疗靶点。

MS19 是一种由“AAAG”重复序列组成的单链 ODN，与 IRF5 结合位点一致。既往有研究发现 MS19 能减轻小鼠流感病毒感染引起的肺损伤 [19]，能抑制 SIRS 模型小鼠 [20] 及脓毒症性腹膜炎模型小鼠 [21] 中 IRF5 及其下游促炎因子的表达并延长小鼠的生存期，还能够调控 IRF5 的核转位并抑制巨噬细胞 M1 型极化及促炎因子的表达 [21]。因此，MS19 可以与 IRF5 结合调控巨噬细胞 M1 型极化从而抑制炎症反应，这与本研究结果也是相符的。在本研究中，MS19 干预 CTD-ILD 模型小鼠后，小鼠肺部炎症减轻，其 BALF 中 IRF5 表达下降、M1 型巨噬细胞数量减少、促炎因子产生减少；而 MS19 干预 RAW264.7 细胞后，IRF5 的表达下降、巨噬细胞 M1 型极化及促炎因子产生减少。因此，我们认为 MS19 通过抑制 IRF5 调控巨噬细胞 M1 型极化，从而改善 CTD-ILD 模型小鼠的肺部炎症，这为 MS19 治疗 CTD-ILD 提供了一定的理论依据。

本研究发现 MS19 对 CTD-ILD 小鼠肺部炎症及巨噬细胞 M1 型极化具有抑制作用，但没有进行 MS19 的剂量 - 疗效的进一步研究，接下来应进行相应的研究。此外，对于 IRF5 具体通过何种机制调控巨噬细胞极化从而参与 CTD-ILD 的发病是接下来研究的重点。

综上，本研究表明 MS19 能减轻 CTD-ILD 小鼠的肺部炎症，抑制 IRF5 的表达，减少巨噬细胞 M1 型极化及促炎因子的产生，提示 MS19 可能通过抑制 IRF5 来减轻 CTD-ILD 的肺部炎症，这项研究可能为 CTD-ILD 潜在的治疗靶点提供了新的见解，也为 CTD-ILD 的发病提供了理论基础。

参考文献

[1] Gao Y，Moua T. Treatment of the connective tissue disease-related interstitial lung diseases：a narrative review [J]. Mayo Clin Proc，2020，95（3）：554-573.

[2] Celli BR，Decramer M，Wedzicha JA，et al. An official american thoracic society/european respiratory society statement：research questions in COPD [J]. Eur Respir J，2015，45（4）：879-905.

[3] Zhu W，Li YH，Zhao JJ，et al. The mechanism of triptolide in the treatment of connective tissue disease-related interstitial lung disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. Ann Med，2022，54（1）：541-552.

[4] Spagnolo P，Distler O，Ryerson CJ，et al. Mechanisms of progressive fibrosis in connective tissue disease（CTD）-associated interstitial lung diseases（ILDs）[J]. Ann Rheum Dis，2021，80（2）：143-150.

[5] Chen S，Saeed AFUH，Liu Q，et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics [J]. Signal Transduct Target Ther，2023，8（1）：207.

[6] Moreira AC，Silva T，Mesquita G，et al. H-Ferritin produced by myeloid cells is released to the circulation and plays a major role in liver iron distribution during infection [J]. Int J Mol Sci，2021，23（1）：269.

[7] Enomoto N. Pathological roles of pulmonary cells in acute lung injury：lessons from clinical practice [J]. Int J Mol Sci，2022，23：15027.

[8] Hofbauer D，Mougiakakos D，Broggini L，et al. *β*2-microglobulin triggers NLRP3 inflammasome activation in tumor-associated macrophages to promote multiple myeloma progression [J]. Immunity，2021，54（8）：1772-1787.

[9] Chen J，Zhang RX，Xie M，et al. Transcriptome sequencing identifies plaur as an important player in patients with dermatomyositis-associated interstitial lung disease [J]. Front

Genet，2021，12：784215.
[10] Yang Y，Yin G，Hao JC，et al. Serum interleukin-18 level is associated with disease activity and interstitial lung disease in patients with dermatomyositis [J]. Arch Rheumatol，2017，32（3）：181-188.
[11] Zhang L，Zheng D，Yan YM，et al. Myeloid cell-specific deletion of Capns1 prevents macrophage polarization toward the M1 phenotype and reduces interstitial lung disease in the bleomycin model of systemic sclerosis [J]. Arthritis Res Ther，2022，24（1）：148.
[12] Dalmas E，Toubal A，Alzaid F，et al. Irf5 deficiency in macrophages promotes beneficial adipose tissue expansion and insulin sensitivity during obesity [J]. Nat Med，2015，21（6）：610-618.
[13] Weiss M，Blazek K，Byrne AJ，et al. IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo [J]. Mediators Inflamm，2013，2013：245804.
[14] Krausgruber T，Blazek K，Smallie T，et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses [J]. Nat Immunol，2011，12（3）：231-238.
[15] Takaoka A，Yanai H，Kondo S，et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors [J]. Nature，2005，434（7030）：243-249.
[16] Yashaar C，Wallace DJ，Weisman MH，et al，A promising approach to targeting type 1 IFN in systemic lupus erythematosus [J]. J Clin Invest，2019，129（3）：958-961.
[17] Stock CJW，De Lauretis A，Visca D，et al. Defining genetic risk factors for scleroderma-associated interstitial lung disease：IRF5 and STAT4 gene variants are associated with scleroderma while STAT4 is protective against scleroderma-associated interstitial lung disease [J]. Clin Rheumatol，2020，39（4）：1173-1179.
[18] Bayik D，Gursel I，Klinman DM. Structure，mechanism and therapeutic utility of immunosuppressive oligonucleotides [J]. Pharmacol Res，2016，105：216-225.
[19] Fang ML，Wan M，Guo S，et al. An oligodeoxynucleotide capable of lessening acute lung inflammatory injury in mice infected by influenza virus [J]. Biochem Biophys Res Commun，2011，415（2）：342-347.
[20] Xiao Y，Lu WT，Li X，et al. An oligodeoxynucleotide with AAAG repeats significantly attenuates burn-induced systemic inflammatory responses via inhibiting interferon regulatory factor 5 pathway [J]. Mol Med，2017，23：166-176.
[21] Gao S，Li X，Nie S，et al. An AAAG-rich oligodeoxynucleotide rescues mice from bacterial septic peritonitis by interfering interferon regulatory factor 5 [J]. Int J Mol Sci，2017，18（5）：1034.
[22] Nie S，Dong BQ，Gao S，et al. The protective effect of interfering TLR9-IRF5 signaling pathway on the development of CVB3-induced myocarditis [J]. Clin Immunol，2019，207：24-35.
[23] Zhang CH，Wang H，Wang HR，et al. A microsatellite DNA-derived oligodeoxynucleotide attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting the HMGB1-TLR4-NF-κB signaling pathway [J]. Front Microbiol，2022，13：964112.
[24] Ba X，Wang H，Huang Y，et al. Simiao pill attenuates collagen-induced arthritis and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by suppressing the JAK2/STAT3 and TGF-β/Smad2/3 signalling pathway [J]. J Ethnopharmacol，2023，309：116274.
[25] Fischer A，du Bois R. Interstitial lung disease in connective tissue disorders [J]. Lancet，2012，380（9842）：689-698.
[26] Honda K，Taniguchi T. IRFs：master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors [J]. Nat Rev Immunol，2006，6（9）：644-658.
[27] Almuttaqi H，Udalova IA. Advances and challenges in targeting IRF5，a key regulator of inflammation [J]. FEBS J，2019，286（9）：1624-1637.
[28] Ban T，Sato GR，Nishiyama A，et al. Lyn kinase suppresses the transcriptional activity of IRF5 in the TLR-MyD88 pathway to restrain the development of autoimmunity [J]. Immunity，2016，45（2）：319-332.
[29] Ban T，Kikuchi M，Sato GR，et al. Genetic and chemical inhibition of IRF5 suppresses pre-existing mouse lupus-like disease [J]. Nat Commun，2021，12（1）：4379.
[30] Kaur A，Lee LH，Chow SC，et al. IRF5-mediated immune responses and its implications in immunological disorders [J]. Int Rev Immunol，2018，37（5）：229-248.
[31] Sharif R，Mayes MD，Tan FK，et al. IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis [J]. Ann Rheum Dis，2012，71（7）：1197-202.
[32] Lin FY，Song C，Zeng YJ，et al. Canagliflozin alleviates LPS-induced acute lung injury by modulating alveolar macrophage polarization [J]. Int Immunopharmacol，2020，88：106969.
[33] Ikushima H，Negishi H，Taniguchi T. The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol，2013，78：105-116.

（收稿日期：2024-01-19；修回日期：2024-03-01）

基于基因表达芯片和实验验证葛根素降低膀胱尿路上皮癌 T24 细胞 IL6 表达及抑制细胞增殖的作用

马雨阳[1, 2]，许浩[1]，潘登[1]，王海跃[2]，徐鹏[3]，王靖凯[3]，庞昆[1, 2*]，韩从辉[1, 2*]（1. 蚌埠医学院研究生院，安徽 蚌埠 233030；2. 徐州市中心医院，江苏 徐州 221009；3. 江苏大学研究生院，江苏 镇江 212013）

摘要：目的 探讨葛根素抑制膀胱尿路上皮癌 T24 细胞增殖的作用机制及潜在作用靶点。**方法** CCK8 实验验证葛根素对 T24 细胞的增殖抑制作用。火山图和热图对芯片数据进行质量控制。对基因表达芯片实验得到的差异表达基因列表进行 KEGG、GO 通路富集分析、蛋白质相互作用（PPI）和上游转录因子预测，得到关键作用靶点及通路并进行相关验证。**结果** 葛根素抑制 T24 细胞的增殖活力，这种抑制作用和浓度成正比，半数抑制浓度为 218 μmol • L^{-1}。KEGG 通路富集分析显示差异基因主要富集在细胞生长和增殖相关通路，GO 通路富集分析显示差异基因主要富集在蛋白质折叠、DNA 复制和肿瘤细胞坏死相关通路。PPI 分析得到关键作用靶点 IL6。IL6 在病理分期Ⅲ、Ⅳ期的表达明显高于Ⅱ期，并且 PCR 实验证明葛根素可降低 T24 细胞中 IL6 的表达。GSEA 分析显示 IL6 与上皮细胞增殖相关。上游转录因子预测得到 CENPA，分子对接结果显示葛根素和 CENPA 之间对接良好。**结论** 葛根素能抑制 T24 细胞的增殖活力，其作用机制可能是葛根素和 CENPA 结合，降低 IL6 的表达进而影响蛋白质折叠、DNA 复制、肿瘤细胞坏死和增殖相关通路，最终抑制 T24 细胞增殖。

关键词：膀胱尿路上皮癌；葛根素；IL6；T24 细胞；细胞增殖
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1186-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.012

Puerarin decreases IL6 expression and inhibits cell proliferation in bladder urothelial carcinoma T24 cells

MA Yu-yang[1, 2], XU Hao[1], PAN Deng[1], WANG Hai-luo[2], XU Peng[3], WANG Jing-kai[3], PANG Kun[1, 2*], HAN Cong-hui[1, 2*] (1. *Graduate School*, *Bengbu Medical College*, *Bengbu Anhui* 233030; 2.*Xuzhou Center Hospital*, *Xuzhou Jiangsu* 221009; 3. *Graduate School*, *Jiangsu University*, *Zhenjiang Jiangsu* 212013)

Abstract: Objective To determine the mechanism and potential targets of puerarin, when inhibiting the proliferation of bladder urothelial carcinoma T24 cells. **Methods** The inhibitory effect of puerarin on the proliferation of T24 cells was demonstrated by CCK8 assay. The differentially expressed gene list (DEGL) was obtained by gene expression microarray. Volcano maps and heat maps were used for the quality control of chip data. KEGG, GO pathway enrichment analysis, protein-protein interaction (PPI) and upstream transcription factor prediction were performed to obtain key targets and pathways, and then further validated them. **Results** Puerarin inhibited the proliferation of T24 cells, whose inhibitory effect was proportional to its concentration, and the half inhibitory concentration was 218 μmol • L^{-1}. KEGG pathway enrichment analysis showed that DEGL was mainly enriched in cell growth and proliferation-related pathways, and GO showed that DEGL was

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 82004110）；中国博士后科学基金面上项目（No. 2022M722674）；徐州市医学后备人才项目（No. XWRCHT20220009）；蚌埠医学院 2022 年度研究生科研创新计划 150 项资助立项项目（No. Byycx22129）。
作者简介：马雨阳，男，硕士，主要从事中药与膀胱肿瘤的相关研究，email：yuyang0865@163.com *通信作者：庞昆，男，副主任医师，硕士研究生导师，主要从事中药与泌尿系肿瘤的相关研究，email：pakn1987@163.com；韩从辉，男，主任医师，博士研究生导师，主要从事泌尿系肿瘤与男科疾病方面的研究，email：hanchdoctor@st.btbu.edu.cn

enriched in protein folding, DNA replication and tumor cell necrosis-related pathways. PPI yielded the key target IL6. The expression of IL6 in stage Ⅲ and Ⅳ was obviously higher than that in stage Ⅱ, and PCR experiments showed that puerarin reduced the expression of IL6 in T24 cells. GSEA analysis showed that IL6 was associated with epithelial cell proliferation. CENPA was predicted by upstream transcription factors, and the molecular docking showed good docking between puerarin and CENPA. **Conclusion** Puerarin can inhibit the proliferation of T24 cells, whose mechanism may be via the binding of puerarin and CENPA to reduce the expression of IL6 and affect protein folding, DNA replication, tumor cell necrosis and proliferation-related pathways, and ultimately inhibit T24 cell proliferation.

Key words: bladder urothelial carcinoma; puerarin; IL6; T24 cell; cell proliferation

膀胱癌（bladder cancer）的主要病理类型是尿路上皮癌，是泌尿外科最常见的恶性肿瘤之一。在我国，膀胱癌发病率居男性恶性肿瘤第 8 位[1]。膀胱癌的高发病率、高复发率给社会带来了巨大经济负担，其传统化疗方法在带来治疗效果的同时，也具有较强的副作用。因此寻找一种改善患者预后同时减少副作用的治疗方法是必要的。应用葛根素注射液辅助治疗多发性骨髓瘤可以改善患者的血液流变学，促进心肌血液供应和循环，减少化疗药物对心脏的不良反应，并预防静脉血栓栓塞的发生，从而提高患者的生活质量。葛根素在子宫内膜癌和卵巢癌的临床研究中也显示出了良好的效果，能够提高化疗疗效，减轻化疗的不良反应[2]。

葛根素是从中药葛根中提取的一类异黄酮类物质，具有多种治疗作用，如抗肿瘤、保护心肌细胞、抗炎、抗抑郁、调节免疫细胞、扩张冠脉和抗氧化等[3]。葛根素可显著抑制膀胱癌细胞生长[4]，其作用机制包括调控 mTOR/p70S6K 信号通路、上调 miR-16 等[5-6]。虽葛根素抑制膀胱癌的机制已有部分研究，但仍有待探索。葛根素现用于治疗多种疾病，包括心血管、糖尿病、眼和神经相关疾病等[3, 7]。葛根素对膀胱癌作用的高通量数据尚无相关研究，本研究利用高通量基因表达芯片联合生物信息学分析探究葛根素抑制膀胱癌的机制，并预测潜在作用靶点，以期为后续相关研究提供正确方向。

1　材料

葛根素单体（纯度≥ 98%，北京索莱宝生命科学有限公司），膀胱尿路上皮癌 T24 细胞系（中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心），Agilent RNA 6000 Nano 试剂盒（美国 Agilent 公司），体外逆转录试剂盒、GeneChip 3' IVT Express 试剂盒、基因芯片杂交、洗涤和染色试剂盒（美国 Thermo Fisher 公司），胎牛血清（FBS，南京维森特生物技术有限公司），RPMI 1640、胰酶、TRIzol 试剂（美国 Thermo Fisher 公司），CCK8 试剂盒（日本 Dojindo 公司），二甲基亚砜（上海索莱宝生物科技有限公司），D-HANKs（大连美仑生物技术有限公司），一代逆转录试剂盒（武汉塞维尔生物科技有限公司），IL6 引物及 β-actin 内参（上海生工生物）。

2　方法与结果

2.1　细胞培养

膀胱尿路上皮癌 T24 细胞培养于含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中，在 37 ℃、5% CO_2 浓度的恒温培养箱中常规培养。细胞在培养皿中汇合度达到 80% ～ 90% 时，弃培养液，3 mL D-HANK’s 溶液清洗 2 次，加入 1 mL 的胰蛋白酶溶液消化，细胞成片脱落后加入 3 mL 培养液终止消化。将细胞吹打成单细胞，1000 r • min^{-1}、4 ℃的条件下离心 5 min，弃上清液，T24 细胞置于培养皿中培养。

2.2　CCK8 实验检测细胞活力

T24 细胞以 4000 个 / 孔接种到 96 孔板中，孵育 48 h 加入含不同浓度葛根素的完全培养基（0、12.5、50.0、100.0、200.0、400.0、600.0、800.0 μmol • L^{-1}）。孵育 48 h，每孔加入 10 μL CCK8 溶液，继续 37 ℃下孵育 2 h 于 450 nm 测定吸光度值。每组实验重复 3 次。结果显示葛根素可抑制膀胱癌 T24 细胞增殖活力，这种抑制作用与浓度成正相关（见图 1A）。

2.3　基因表达芯片实验与质量控制

基于 CCK8 实验，选取 100 μmol • L^{-1} 葛根素在培养 48 h 后进行基因芯片实验。标记 RNA 之前，用 Agilent ND-1000 分光光度计检测 RNA 的降解情况并鉴定 RNA 浓度。采用 Agilent Quick

Amp Gene Expression Labeling Kits 标记样品，使用 Agilent SureHyb 进行杂交实验。芯片清洗后使用 Agilent DNA Microarray Scanner 扫描，采用 Agilent Feature Extraction 软件（v11.0.0.1）获取芯片探针信号值，使用 Agilent GeneSpring GX v12.1 软件进行芯片归一化。采用火山图和热图评估芯片数据质量。火山图和热图分别由 Rstudio（2022.02.0）的 ggVolcano 包和 pheatmap 包制作（见图 1B、1C），用于显示差异表达基因（differentially expression genes，DEG）的分布和表达情况。DEG 的筛选标准是满足 $|\log_2 FC| > 1$ 和 $FDR < 0.05$。最终得到差异表达基因列表（differentially expressed gene list，DEGL），包括 428 个和 585 个上、下调基因。差异表达基因分为上调、下调两组，按 *FDR* 值从小到大取前 25 个基因的表达量用于热图的制作，结果显示这 50 个基因的表达分布符合标准。

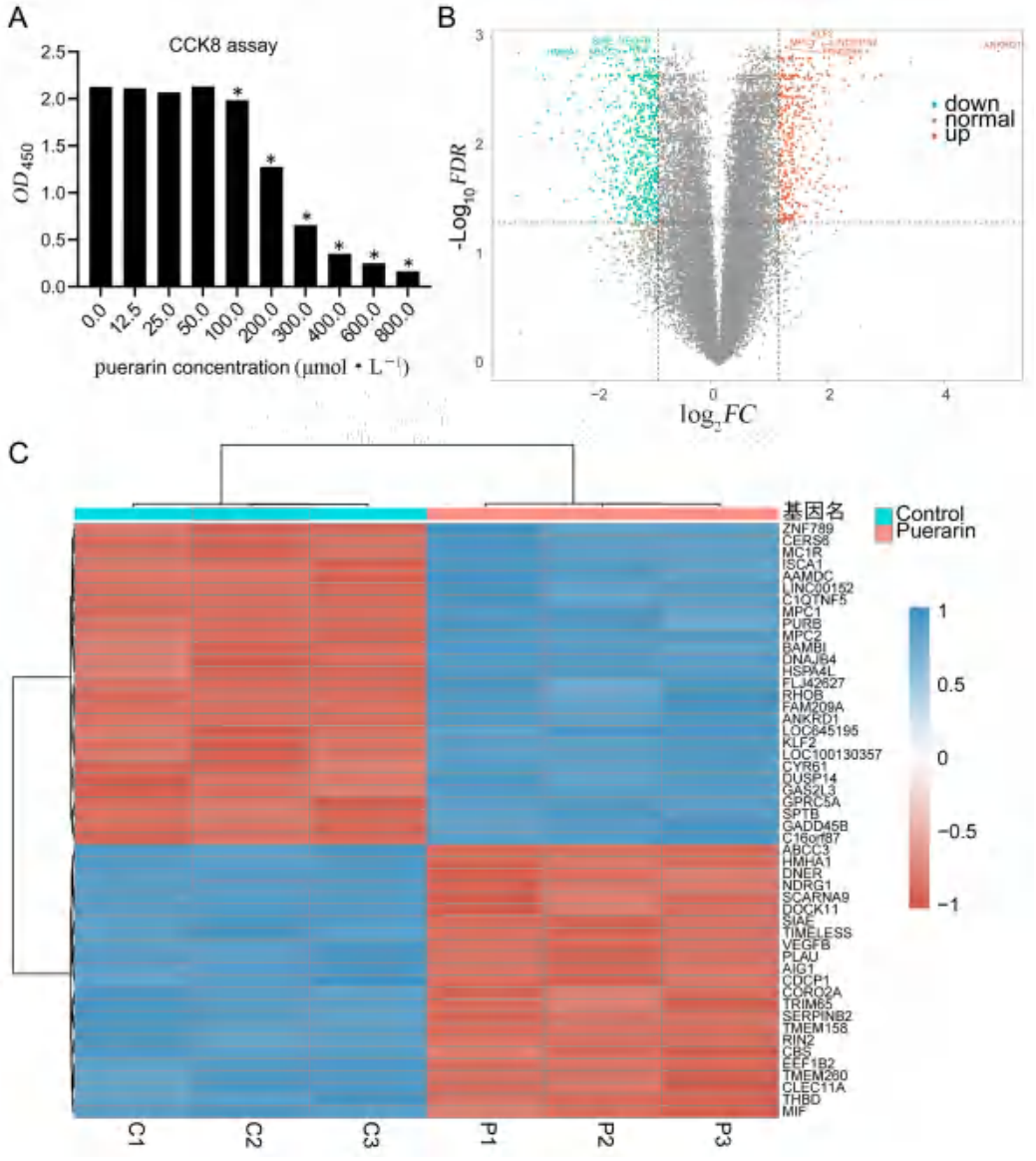

图 1 CCK8 实验和基因芯片数据的质量控制（$^*P < 0.05$）

Fig 1 CCK8 assay and quality control of gene chip data（$^*P < 0.05$）

A. CCK8 实验检测葛根素对 T24 细胞的抑制作用（inhibitory effect of puerarin on T24 cells by CCK8 assay）；B. 火山图（volcano map）；C. 热图（heatmap）

2.4 KEGG 和 GO 通路富集分析

对基因表达芯片实验得到的 DEGL 进行 KEGG、GO 通路富集分析。

KEGG 通路富集分析显示上调基因富集于增殖相关通路（见图 2A），如长寿调节途径、FoxO 信号途径和 Toll 样受体（TLR）信号途径等。下调基因也主要富集在增殖相关通路，如钙信号途径、DNA 复制、蛋白质消化吸收和 NOD 样受体（NLR）信号途径等。Martins 等 [8] 发现 FoxOs 能以多效性方式影响寿命，影响多种细胞调节活动，

如抗应激性、代谢、细胞周期停滞和细胞凋亡等。细胞周期的表达和活性依赖于胞内储存钙的激活，储存钙激活钙依赖磷酸酶（CaN），CaN 反过来控制细胞周期蛋白的活性[9]。G_1/S 期转变产生自发性 Ca^{2+}振荡，这些 Ca^{2+}振荡随着细胞准备下一个分裂周期的 DNA 复制[10]。DNA 复制进程常伴随着大量细胞周期相关基因表达和蛋白质的消化与吸收。NLR 和 TLR 可识别多种病原体，诱导炎症和免疫反应。TLR 和 NLR 的激活可以诱导恶性细胞的死亡，并将免疫细胞募集到肿瘤微环境中[11]。这表明葛根素可能参与调控 T24 细胞内 Ca^{2+}、TLR 和 NLR 等多种信号途径，调控细胞周期和 DNA 复制过程，最终导致细胞的增殖或死亡。

GO 通路富集分析显示上调基因富集在蛋白质折叠和伴侣蛋白结合相关通路（见图 2B）。下调基因富集在细胞核中 DNA 复制进程、肿瘤坏死和膜相关通路，这些通路包括 DNA 复制，肿瘤坏死因子超家族细胞因子产生的正向调节，细胞因子产生的正向调节，肿瘤坏死因子产生的正向调节，DNA 复制前启动复合物，核染色体，膜筏，膜微域，DNA 修复复合物，生长因子受体结合，DNA 等。癌症的发生和进展通常与蛋白质折叠和质量控制失败相关[12-13]。细胞因子是多种细胞类型和细胞活性的有效分泌调节剂，在细胞生长和发育中发挥重要作用，主要类别包括白细胞介素（IL）、肿瘤坏死因子（TNF）超家族、趋化因子（趋化性细胞因子）和生长因子[14]。Wang 等[15]发现 PBRM1 可调控 IL6、IL8 等细胞因子表达，改变细胞周期进程并抑制肿瘤细胞增殖和迁移[15]。微核是细胞膜上的小隔室，与染色体不稳定性、基因组重排和突变有关，其在肿瘤发生中起核心作用，微核包膜的完整性可以延迟或破坏 DNA 复制，抑制 DNA 修复[16]。葛根素可能参与调控 IL6 等细胞因子的表达，控制蛋白质折叠、膜的微核形成和 DNA 复制等过程，从而抑制 T24 细胞的增殖活力。

2.5　蛋白质相互作用网络及靶点预测

将 DEGL 提交到 String 数据库（https：//version-12-0.string-db.org/），得到蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）数据。将其导入 Cytoscape 3.9.1 软件后进行分析并给每个基因赋予 Degree 值，按照 Degree 值从大到小进行绘制同心圆类型 PPI 网络图。PPI 网络图显示 Degree 值大于 20 的基因之间的相互作用，包括 63 个基因和 530 条相互作用连接。取 Degree 值大于 50 的基因为潜在靶点基因，得到 6 个潜在靶点基因：*IL6*、*HSP90AA1*、*PTGS2*、*IL1A*、*CDK1* 和 *BRCA1*。取 Degree 值大于 80 的基因为关键靶点基因，最终得到关键靶点基因 *IL6*（见图 3A）。

2.6　基因表达分析

IL6 在膀胱癌中的病毒分期表达情况和生存分析通过 GEPIA（http：//gepia.cancer-pku.cn/）网站的“Expression DIY”模块（http：//gepia.cancer-pku.cn/detail.php）获得。基因表达分析中，Use major stage 设置为“Yes”，Datasets Selection 设置为“BLCA”，Log Scale 设置为“Yes”。结果显示 *IL6* 在病理分期Ⅲ、Ⅳ期的表达明显高于Ⅱ期（$P < 0.05$，见图 3B）。

2.7　实时荧光定量 PCR

将 T24 细胞培养于 6 孔板中，3 个孔加入 2 mL 含 100 μmol·L^{-1} 的葛根素的完全培养基，为实验组，3 个孔加入完全培养基为对照组，培养箱孵育 24 h 后进行 RNA 提取。首先使用 TRIzol 试剂从 T24 细胞中提取总 RNA，并使用 Nanodrop 2000 分光光度计测量 RNA 浓度。然后按照说明书进行 cDNA 合成，以 *β*-actin 为内参基因，在 ABI QuantStudio 6 Flex（Thermo Fisher Scientific，USA）上进行实时荧光定量 PCR。最后，采用相对定量法对实验数据进行分析（$2^{-\Delta\Delta CT}$）。本文所用引物由中国上海生工生物提供，引物序列见表 1。qRT-PCR 结果显示与未经葛根素处理的对照组相比，葛根素处理后可显著降低 T24 细胞中 *IL6* 的表达量（$P < 0.05$，见图 3C）。

表 1　qRT-PCR 引物

Tab 1　qRT-PCR primers

引物名	序列（5'-3'）
β-actin F	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG
β-actin R	GTAGTTTCGTGAATGCCGCAG
IL-6 F	GGTGTTGCCTGCTGCCTTCC
IL-6 R	GTTCTGAAGTGAGTGGCTGTC

2.8　基因组富集分析

基因集富集分析（GSEA，https：//www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp）是一种用于确定 2 个先验定义的基因集之间的关联以及两种生物状态之间差异是否有统计学意义的计算方法。从 GDC（https：//portal.gdc.cancer.gov/）下载基因表达数据，包括 412 个膀胱癌和 19 个癌旁组织。从 GSEA 官网下载名为“GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_EPITHELIAL_CELL_PROLIFERA-

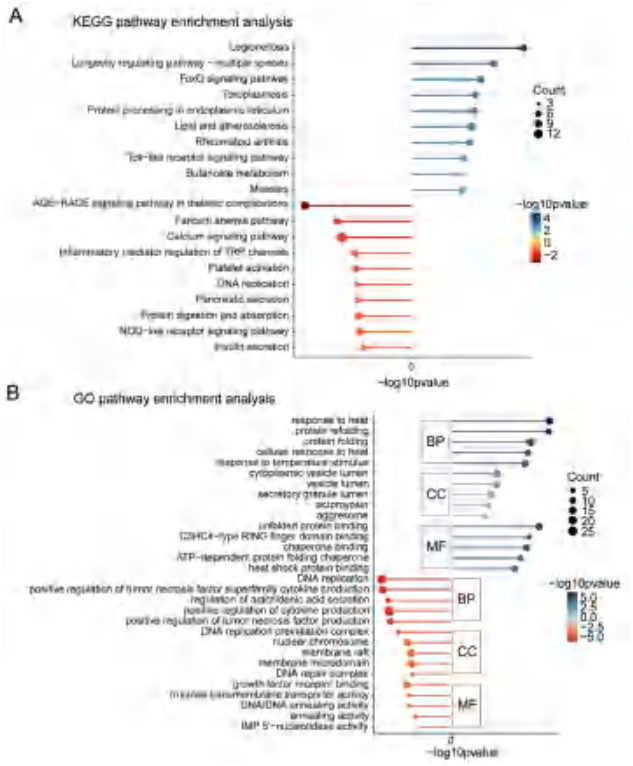

图 2 差异表达基因的 KEGG（A）和 GO（B）通路富集分析

Fig 2 KEGG（A）和 GO（B）pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

TION”的基因集数据。GSEA_4.2.3 用于 GSEA 分析，以确定某个预定义的基因集是否在预期的相关通路中富集。“collapse/remap to gene symbols”设置为“No_Collapse”，“Permutation type”设置为“Phenotype”。本研究根据膀胱癌中 IL6 的表达分为高、低两组，探究其分布状态与上皮细胞增殖通路的相关性，结果显示 IL6 和上皮细胞增殖相关（NES ＝ 1.82，$P = 7.64\times10^{-7}$，见图 4）。

2.9 上游转录因子预测及验证

ChEA3（https：//maayanlab.cloud/chea3/#top）常被用于预测多个基因的上游转录因子。将特定基因集输入 ChEA3，即可得到按平均排名排序的转录因子列表。将 6 个靶点输入上游转录因子预

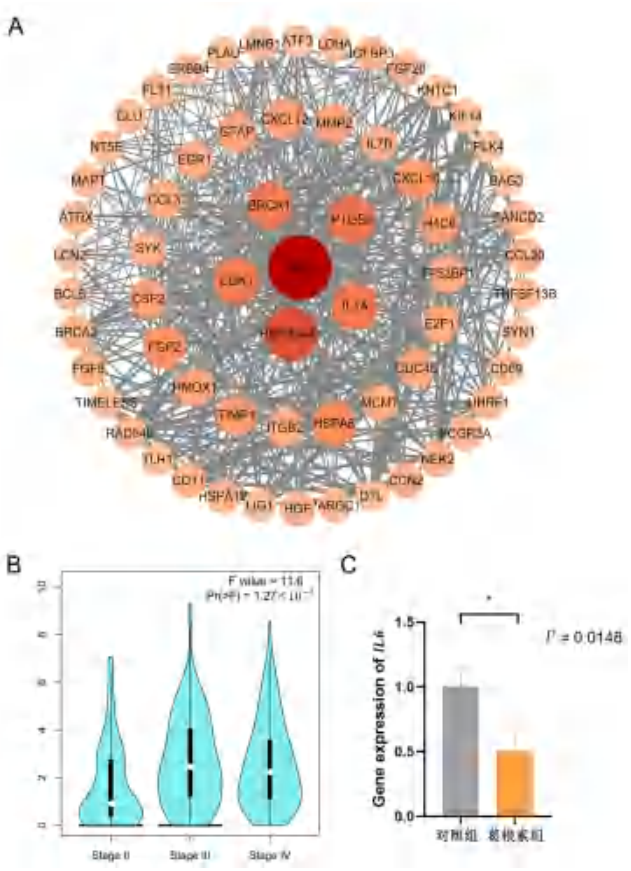

图 3 蛋白质相互作用和靶点预测及验证（$^{*}P < 0.05$）

Fig 3 Protein-protein interactions and target prediction and validation（$^{*}P < 0.05$）

A. PPI 网络图（interaction networks of proteins）；B. IL6 在膀胱癌不同分期的表达情况（expression of IL6 at different stages of bladder cancer）；C. 葛根素处理后 T24 细胞中 IL6 的表达（expression of IL6 in T24 cells after puerarin treatment）

测网站 ChEA3，得到按照平均排名排序的 1632 个转录因子，前 5 个分别是 CENPA、ZNF730、ZNF267、ATF3 和 CSRNP1（见表 2），选择排名第一的 CENPA 进行验证。

PubChem（https：//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）数据库下载葛根素的 3D 结构，将其导入 ChemBio3D Ultra 14.0 进行能量最小化（minimum

表 2 上游转录因子

Tab 2 Upstream transcription factors

排名	转录因子	分数	库	调控基因
1	CENPA	25	ARCHS4 Coexpression，45；GTEx Coexpression，5	*CDK1*，*BRCA1*
2	ZNF730	32	ARCHS4 Coexpression，20；GTEx Coexpression，44	*CDK1*，*BRCA1*
3	ZNF267	37.67	ARCHS4 Coexpression，2；Enrichr Queries，29；GTEx Coexpression，82	*IL1A*，*IL6*，*HSP90AA1*，*PTGS2*
4	ATF3	40	Literature ChIP-seq，35；ARCHS4 Coexpression，9；ENCODE ChIP-seq，31；Enrichr Queries，64；ReMap ChIP-seq，77；GTEx Coexpression，24	*IL6*，*HSP90AA1*，*BRCA1*，*PTGS2*
5	CSRNP1	44	ARCHS4 Coexpression，32；GTEx Coexpression，56	*PTGS2*

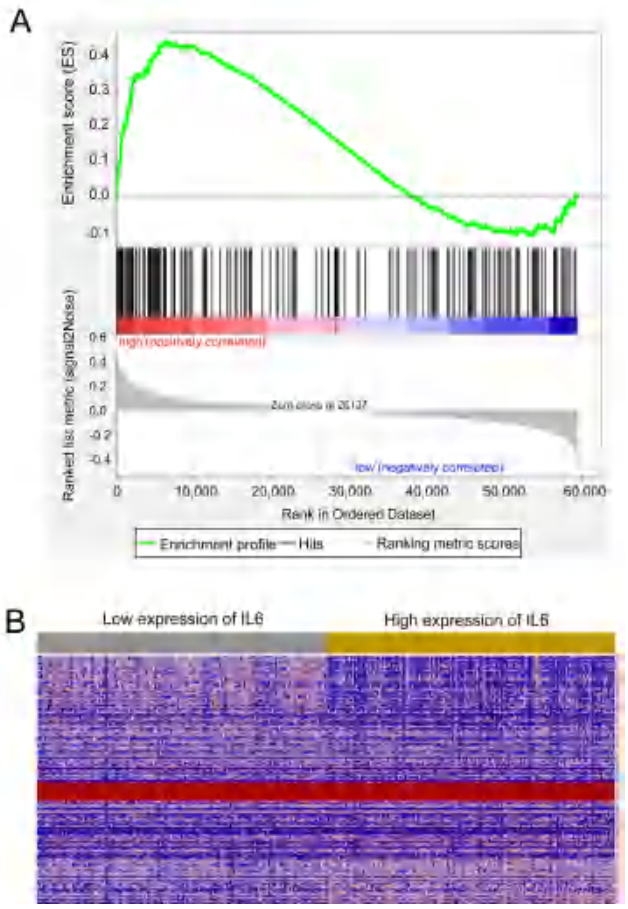

图 4　IL6 与上皮细胞增殖通路相关性的基因集富集分析

Fig 4　Gene enrichment analysis of correlation of IL6 with epithelial cell proliferation pathway

A. 富集图揭示 IL6 与上皮细胞增殖通路相关（enrichment plot showing association of IL6 with epithelial cell proliferation pathway）；B. 热图显示上皮细胞增殖通路相关基因在低 IL6 表达和高 IL6 表达队列中差异表达（differential expression of genes related to epithelial cell proliferation pathways in the low IL6 expression and high IL6 expression cohorts by heatmap）

RMS Gradient 设置为：0.001）。将优化好的小分子导入 AutodockTools-1.5.6 进行加氢、计算电荷、分配电荷。从 PDB 数据库（https：//www.rcsb.org/）下载 CENPA（PDB ID：3NQU），Pymol2.3.0 去除蛋白结晶水、原始配体，将蛋白结构导入 AutoDocktools（v1.5.6）进行加氢、计算电荷、分配电荷、指定原子类型并保存为“pdbqt”格式。利用 PyMOL2.3.0 对对接结果进行相互作用模式分析。结果葛根素与 CENPA 对接结果显示对接良好，结合能为－27.2 kJ·mol^{-1}。葛根素和 CENPA 的 ALA-98、PHE-67 形成氢键，与 PHE-67、LEU-94、ALA-98 具有疏水作用，与 PHE-101 形成 π-π 堆积（见图 5A）。

CENPA 在膀胱癌中的表达使用 Rstudio 2023.6.1.0 绘制，412 个膀胱癌组织样本与 19 个正常样本组织的基因表达数据从 GDC（https：//portal.gdc.cancer.gov/）下载，使用的 R 包有 ggplot2、ggsignif、ggpubr 和 RColorBrewer，采用 *t* 检验。分析显示 CENPA 在膀胱癌组织中高表达（见图 5B）。

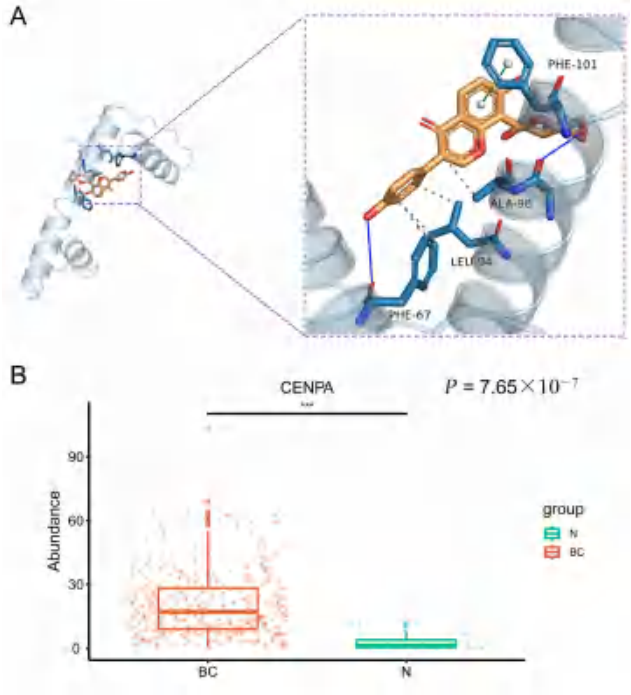

图 5　6 个潜在靶点的上游转录因子 CENPA 的预测及验证

Fig 5　Prediction and validation of the upstream transcription factor CENPA for 6 potential targets

A. 葛根素和 CENPA 对接情况（docked puerarin and CEMPA）；B. CENPA 在膀胱癌和癌旁组织中表达情况（expression of CENPA in bladder cancer and adjacent tissues）（$^{***}P < 0.001$）

2.10　统计分析

使用 IBM SPSS Statistics 27 进行统计分析。*t* 检验用于比较两组之间的差异。Rstudio 2023.6.1.0 和 GSEA_4.2.3 用于质量控制、表达分析及通路富集等。Adobe Illustrator 2020 用于图形美化。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　讨论

本研究通过 CCK8 实验发现葛根素可抑制膀胱癌细胞的增殖，其半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC_{50}）是 218 μmol·L^{-1}，这和 Ye 等[17]的研究一致。本研究基于此结果，通过基因表达芯片得到了包含 1013 个基因的 DEGL，包括 428 个上调基因和 585 个下调基因。我们首先对 DEGL 进行 KEGG 和 GO 通路富集分析。KEGG 通路富集分析显示 DEGL 主要富集在长寿调节途径，FoxO 信号途径和 Toll 样受体途径等肿瘤生长和增殖相关通路[18-20]。

GO 通路富集分析显示 DEGL 一部分富集在

蛋白质折叠和伴侣蛋白结合相关通路，未折叠蛋白质结合，伴侣结合等相关通路。肿瘤细胞中蛋白质折叠对伴侣的依赖性表现为 Hsp70 和 Hsp90 等伴侣的表达水平较高，且已被认定为癌症治疗的靶点之一[21]。本研究发现 HSP90AA1 是潜在治疗靶点之一，这提示葛根素可能通过影响 HSP90AA1 的表达进而影响蛋白质折叠过程，从而影响肿瘤细胞的生长增殖过程。

GO 富集分析显示 DEGL 另一部分富集在 DNA 复制，肿瘤坏死因子超家族细胞因子产生的正向调节，细胞因子产生的正向调节，肿瘤坏死因子产生的正向调节，DNA 复制前启动复合物等相关通路。CENPA 是着丝粒组蛋白 H3 变体，和细胞周期、凋亡、DNA 修复和 RNA 代谢等有关[22]，这与本文的结果相一致。肿瘤细胞的持续分裂导致肿瘤细胞的 DNA 复制增快，这种连续细胞分裂由突变驱动，这些突变可防止细胞凋亡并使肿瘤细胞的细胞周期循环持续进行，最终导致肿瘤细胞无限制增殖。细胞周期调节的转录依赖于周期蛋白依赖性激酶（CDK）活性的激活[23]。CDK1 激活在决定是否进入有丝分裂中起核心作用，CDK1 被激活后，多种 CDK1 的底物广泛磷酸化就会被触发并进入到有丝分裂进程中[24-25]。*BRCA1* 基因编码一种 190 kD 的核磷蛋白，其在蛋白质转录、双链断裂的 DNA 修复和重组等维持基因组稳定性方面发挥作用。BRCA1 通过同源重组促进 DNA 双链断裂（DSB）修复，并保护 DNA 复制叉[26]。*BRCA1* 与 BRCA1 相关 RING 结构域蛋白 1（BARD1）相互作用，介导 DNA 损伤以及 RAD51 的招募和调节，形成的 BRCA1-BARD1-RAD51 复合体在通过同源重复修复 DNA 损伤方面具有重要作用[27]。本研究认为葛根素可能通过调节 CDK1、BRCA1 的表达，影响膀胱癌细胞的 DNA 复制和有丝分裂进程，进而抑制膀胱癌细胞的增殖。

慢性炎症已被确定为膀胱癌、肺癌、胃癌等实体肿瘤的致癌驱动因素之一[28]。IL 在诱导非免疫细胞的信号传导和维持组织稳态中发挥重要作用，在癌症发生后，肿瘤细胞中的 IL 信号传导又可成为肿瘤生长、转移扩散和癌症进展的病理机制[29]。IL-1α 和 IL-1β 在慢性炎症过程中可直接促进一氧化氮和活性氧等致癌介质的产生，也可启动 IL6 等下游促炎细胞因子的释放，介导先天免疫细胞的聚集，引发一系列炎症反应进而促进炎症诱导的致癌作用[30-31]。前列腺素内过氧化物合酶 2（prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene，PTGS2）基因编码环氧合酶 2 蛋白（cyclooxygenase-2，COX-2），是炎症反应的关键调节因子。COX-2 在多种类型的肿瘤中异常表达，能在肿瘤发生和促进肿瘤细胞对化疗和放疗的抗性方面发挥作用[32]。已有相关研究证明 COX-2 抑制剂联合化疗药治疗肿瘤取得良好的疗效[33]。葛根素可在大脑、心脏等多个器官内抑制 IL 诱导的炎症因子的产生[34-35]。因此本研究认为葛根素可能通过调控 IL1、IL6 和 PTGS2 等炎症因子的表达来抑制炎症反应和膀胱癌的发生发展。

综上所述，本研究认为葛根素可抑制膀胱癌细胞的生长和增殖，这种抑制作用可能是由于葛根素通过与 CENPA 等转录因子结合，进而影响 IL6 的表达。中药单体葛根素由于多靶点、低毒性等特点，其联合顺铂等治疗膀胱癌可能为临床疗效的改善提供一种新思路。

4 结论

葛根素能抑制膀胱癌细胞的增殖活力，作用机制可能是葛根素和 CENPA 结合，降低 IL6 的表达进而影响蛋白质折叠、DNA 复制、肿瘤细胞坏死和增殖相关通路，最终抑制 T24 细胞增殖。

参考文献

[1] Xia CF，Dong XS，Li H，et al. Cancer statistics in China and United States，2022：profiles，trends，and determinants [J]. Chin Med J（Engl），2022，135（5）：584-590.

[2] 刘亚迪，王雪，殷晓阳，等 . 基于 CiteSpace 和生物信息学技术评估葛根素在肿瘤辅助治疗中的临床应用与安全风险 [J]. 中国药物警戒，2023，20（12）：1407-1414.

[3] Wang D，Bu T，Li YQ，et al. Pharmacological activity，pharmacokinetics，and clinical research progress of puerarin [J]. Antioxidants（Basel），2022，11（11）：2121.

[4] 王国政，沈金贵，邹永平，等 . 葛根素联合 γ 突触核蛋白 siRNA 对膀胱癌细胞生长的抑制作用 [J]. 临床与病理杂志，2018，38（12）：2558-2565

[5] Jiang KH，Chen HB，Tang K，et al. Puerarin inhibits its bladder cancer cell proliferation through the mTOR/p70S6K signaling pathway [J]. Oncol Lett，2018，15（1）：167-174.

[6] Liu XY，Li SG，Li YY，et al. Puerarin inhibits proliferation and induces apoptosis by upregulation of miR-16 in bladder cancer cell line T24 [J]. Oncol Res，2018，26（8）：1227-1234.

[7] Zhou YX，Zhang H，Peng C. Puerarin：a review of pharmacological effects [J]. Phytother Res，2014，28（7）：961-975.

[8] Martins R，Lithgow GJ，Link W. Long live FOXO：unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity [J].

Aging Cell，2016，15（2）：196-207.
[9] Humeau J，Bravo-San Pedro JM，Vitale I，et al. Calcium signaling and cell cycle：progression or death [J]. Cell Calcium，2018，70：3-15.
[10] Russa AD，Maesawa C，Satoh Y. Spontaneous [Ca^{2+}]i oscillations in G_1/S phase-synchronized cells [J]. J Electron Microsc（Tokyo），2009，58（5）：321-329.
[11] Wicherska-Pawłowska K，Wrobel T，Rybka J. Toll-like receptors（TLRs），NOD-like receptors（NLRs），and RIG-I-like receptors（RLRs）in innate immunity. TLRs，NLRs，and RLRs ligands as immunotherapeutic agents for hematopoietic diseases [J]. Int J Mol Sci，2021，22（24）：13397.
[12] Bastola P，Oien DB，Cooley M，et al. Emerging cancer therapeutic targets in protein homeostasis [J]. AAPS J，2018，20（6）：94.
[13] Chatterjee S，Burns TF. Targeting heat shock proteins in cancer：a promising therapeutic approach [J]. Int J Mol Sci，2017，18（9）：1978.
[14] Propper DJ，Balkwill FR. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol，2022，19（4）：237-253.
[15] Wang HK，Qu YY，Dai B，et al. PBRM1 regulates proliferation and the cell cycle in renal cell carcinoma through a chemokine/chemokine receptor interaction pathway [J]. PLoS One，2017，12（8）：e0180862.
[16] Krupina K，Goginashvili A，Cleveland DW. Causes and consequences of micronuclei [J]. Curr Opin Cell Biol，2021，70：91-99.
[17] Ye GM，Kan SF，Chen JF，et al. Puerarin in inducing apoptosis of bladder cancer cells through inhibiting SIRT1/p53 pathway [J]. Oncol Lett，2019，17（1）：195-200.
[18] Farhan M，Wang HT，Gaur U，et al. FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. Int J Biol Sci，2017，13（7）：815-827.
[19] Ohadian MS，Nowroozi MR. Toll-like receptors：the role in bladder cancer development，progression and immunotherapy [J]. Scand J Immunol，2019，90（6）：e12818.
[20] Liu P，Lu ZW，Liu LL，et al. NOD-like receptor signaling in inflammation-associated cancers：from functions to targeted therapies [J]. Phytomedicine，2019，64：152925.
[21] Zhang H，Gong WB，Wu S，et al. Studying protein folding in health and disease using biophysical approaches [J]. Emerg Top Life Sci，2021，5（1）：29-38.
[22] Renaud-Pageot C，Quivy JP，Lochhead M，et al. CENP-A regulation and cancer [J]. Front Cell Dev Biol，2022，10：907120.
[23] Matthews HK，Bertoli C，De Bruin RAM. Cell cycle control in cancer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2022，23（1）：74-88.
[24] Crncec，Hochegger H. Triggering mitosis [J]. FEBS Lett，2019，593（20）：2868-2888.
[25] Blethrow JD，Glavy JS，Morgan DO，et al. Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals cdk1-cyclin B substrates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2008，105（5）：1442-1447.
[26] Tarsounas M，Sung P. The antitumorigenic roles of BRCA1-BARD1 in DNA repair and replication [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2020，21（5）：284-299.
[27] Zhao WX，Steinfeld JB，Liang FS，et al. BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing [J]. Nature，2017，550（7676）：360-365.
[28] Bruni D，Angell HK，Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy [J]. Nat Rev Cancer，2020，20（11）：662-680.
[29] Briukhovetska D，Dorr J，Endres S，et al. Interleukins in cancer：from biology to therapy [J]. Nat Rev Cancer，2021，21（8）：481-499.
[30] Mantovani A，Dinarello CA，Molgora M，et al. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity [J]. Immunity，2019，50（4）：778-795.
[31] Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol，2018，10（2）：a028415.
[32] Hashemi GN，Najafi M，Salehi E，et al. Cyclooxygenase-2 in cancer：a review [J]. J Cell Physiol，2019，234（5）：5683-5699.
[33] Xu X，Zhu GQ，Zhang K，et al. Cyclooxygenase-2 mediated synergistic effect of ursolic acid in combination with paclitaxel against human gastric carcinoma [J]. Oncotarget，2017，8（54）：92770-7.
[34] Zhang L，Liu LS，Wang MY. Effects of puerarin on chronic inflammation：focus on the heart，brain，and arteries [J]. Aging Med（Milton），2021，4（4）：317-324.
[35] Peng LB，Xie ZK，Pei J，et al. Puerarin alters the function of monocytes/macrophages and exhibits chondroprotection in mice [J]. Mol Med Rep，2019，19（4）：2876-2882.

（收稿日期：2023-10-09；修回日期：2023-12-06）

纳米 LDH 作为藤黄酸吸附和释放载体的试验和分子对接模拟

王姗，刘琦，崔婷婷，张海文，赵柔，彭绪玲，韩晓燕*（天津中医药大学中药学院，天津 300193）

摘要：目的 以藤黄酸（GA）为模型药物，将 GA 吸附在层状双金属氢氧化物（LDH）表面从而获得 GA-LDH 复合物。**方法** 采用高效液相色谱法（HPLC）测定 GA 含量，并进行方法学验证。采用共沉淀、离子交换、剥离 - 重组、胶束载药等方法制备 GA-LDH 复合物。以载药量和包封率为指标，对载药方法、药载比和不同粒径大小的载体进行单因素考察。采用 IR 和 XRD 等对样品结构表征，考察 GA-LDH 的缓冲及缓释性能；采用分子对接方法计算 GA 与 LDH 之间的结合能大小。**结果** 确定以离子交换法、药载比为 3∶5、水热合成 LDH 制备 GA-LDH 复合物的最佳制备工艺。优化后 GA-LDH 的载药量和包封率分别为 21.37%、46.29%。酸碱滴定试验发现 GA-LDH 具有和 LDH 相似的缓冲性能。体外释放试验表明，GA-LDH 具有一定的缓释效果，释药机制为被动扩散过程。分子对接结果从理论上佐证了 GA-LDH 复合物的形成。**结论** 该载药复合物具有良好的载药性能和缓冲性能，有望成为一种新型的中药抗肿瘤成分高效载体。

关键词：层状双金属氢氧化物；藤黄酸；缓释性能；分子对接
中图分类号：R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1194-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.013

Nano-sized LDH as carriers for adsorption and loading of gambogic acid: experimental and molecular docking simulation

WANG Shan, LIU Qi, CUI Ting-ting, ZHANG Hai-wen, ZHAO Rou, PENG Xu-ling, HAN Xiao-yan*
(*College of Chinese Materia Medica*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 300193)

Abstract: Objective To obtain GA-LDH nanohybrid with the gambogic acid (GA) adsorped to the surface of layered double hydroxides (LDH). **Methods** A HPLC method for the determination of GA was established and validated. GA-LDH nanohybrid was prepared by co-precipitation, ion exchange, exfoliation recombination and miceller drug loading. The drug loading rate and encapsulation effiency were used as the indexes, the drug-loading process of GA-LDH nanohybrid was determined by single factors, such as drug-loading method, drug/LDH ratio and particle size of LDH. The samples were structurally characterized by IR and XRD. The buffering and sustained release properties of GA-LDH were investigated. The molecular docking method was used to calculate the magnitude of binding energy between GA and LDHs. **Results** The optimum preparation process of GA-LDH nanohybrid was as follows: ion exchange method, drug loading ratio of 3∶5 and hydrothermal LDH as the carrier. The drug loading rate and encapsulation effiency of GA-LDH were 21.37% and 46.29% under optimized conditions. Acid base titration showed that GA-LDH had similar buffer performance to LDH. In vitro release experiments showed that GA-LDH had a certain sustained-release effect, whose mechanism was a passive diffusion process. The molecular docking method theoretically confirmed the experimental results. **Conclusion** The drug-loaded complex has good drug-loading and buffering properties, which is expected to be a new type of efficient carrier for antitumour components of traditional Chinese medicine.
Key words: layered double hydroxide; gambogic acid; sustained-release; molecular docking

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81202921）。
作者简介：王姗，女，硕士研究生，主要从事中药新型给药系统科学研究，email：15933452746@163.com *通信作者：韩晓燕，女，副教授，主要从事物理化学理论和实验教学及中药新型给药系统科学研究，email：15022611743@163.com

藤黄酸（gambogic acid，GA）来源于藤黄科植物藤黄，主要是从藤黄的树脂分泌物中提取分离所得，在抗菌、抗病毒、抗肿瘤及杀虫等方面具有较强活性，可用于治疗恶性肿瘤疾病[1-2]。GA 在醇类、酮类等有机溶剂和强碱性水溶液中的溶解度较大，在水中较难溶解，在 pH 大于 12 的碱性条件下稳定性差，易因外界因素水解，临床使用受到限制[3-4]。

层状双金属氢氧化物（layered double hydroxides，简称 LDH）又称类水滑石，是具有水滑石层状晶体结构的氢氧化物，由两种或两种以上金属元素组成，LDH 因其独特的层间结构和阴离子交换性，可作为微型储存器，将药物分子插入或吸附在 LDH 上，可形成药物 -LDH 复合物，实现活性药物分子的有效控制释放，具有活性物质供给量大、对靶细胞或器官毒性小等特点，可提高药物的生物利用度和稳定性，在制剂方面具有广泛的应用前景[5-6]。目前，国内外的研究已报道多种制备药物 -LDH 纳米杂化物的方法，如共沉淀法[7]、离子交换法[8]、水热合成法[9]、剥离重组法[10]和结构重建法[11]等。

本文以 GA 为模型药物，采用共沉淀法、离子交换法、剥离重组法、胶束载药法等方法制备 GA-LDH 复合物。通过单因素试验筛选载药方法、药载比和不同粒径大小的 LDH 等最优制备条件，确定最佳载药工艺。采用红外光谱（IR）和 X-射线衍射（XRD）等对样品结构表征，考察 GA-LDH 的缓冲及缓释性能。采用分子对接方法辅助证明试验结果的准确性以及药物负载的可行性。

1 材料

1.1 试药

甲醇、无水乙醇、冰醋酸、二氯甲烷（天津市康科德科技有限公司）；GA（HPLC ≥ 90%，南京春秋生物工程有限公司）；甲酰胺、胆酸钠（上海源叶生物科技有限公司）；丙酮（天津市江天化工技术有限公司）；磷酸二氢钾（天津市大茂化学试剂厂）；磷酸氢二钠（上海麦克林生化科技有限公司）。

1.2 仪器

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；ME104E 电子天平（日本岛津公司）；H1650 台式高速离心机（长沙湘仪离心机仪器有限公司）；GOLD-SIM 循环水式多用真空泵（河南省予华仪器有限公司）；IVOS-30A 真空干燥箱（施都凯仪器设备有限公司）；SHA-C 水浴振荡器（巩义市予华仪器有限责任公司）；高效液相色谱仪（日本岛津公司）；DC-0510 节能型智能恒温槽（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Varian 640 傅里叶变换红外光谱（南昌捷岛科学仪器有限公司）；SCIENTZ-950E 超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；MIniflex600 粉末 X- 射线衍射仪（日本株式会社理学）；BT-90 纳米激光粒度分布仪（丹东百特仪器有限公司）；HORIBA 粒径电位仪（日本 HORIBA 公司）；XO-5200DTS 超声波清洗机（南京先欧仪器制造有限公司）；FE20 实验室 pH 计 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]。

2 方法

2.1 GA 方法学建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱：C18 液相色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm，北京百灵威科技有限公司）；流动相：甲醇 -0.1% 冰醋酸水溶液 = 93∶7；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：360 nm；柱温：25 ℃；进样量：20 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取 10 mg GA 对照品置于 10 mL 量瓶中，加入甲醇后超声溶解，定容至刻度。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，滤液作为对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取 10 mg “3.4.2” 项下的 GA-LDH 复合物，置于 10 mL 量瓶中，滴加两滴浓磷酸破坏 LDH 的结构，使药物释放。加入适量甲醇超声溶解后，定容至刻度，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，滤液作为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取 “2.1.2” 项下对照品储备液 0.05、0.1、0.25、0.5、1.5、2 mL 分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度。各吸取 20 μL 注入液相色谱仪测定，记录 GA 的峰面积（*A*），以峰面积对 GA 质量浓度（*c*，μg·mL^{-1}）进行线性回归，得出 GA 标准曲线方程。

2.1.5 精密度试验 吸取 “2.1.4” 项下 0.2 mg·mL^{-1} 的对照品溶液连续进样 6 次，测定峰面积，计算相对标准偏差（*RSD*）。

2.1.6 重复性试验 精密称取 6 份相同条件下制得的 GA-LDH 复合物 10 mg，按照 “2.1.3” 项下方法处理。在 “2.1.1” 项色谱条件下，每份供试品溶液连续进样两次，记录峰面积，计算 *RSD* 值。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取已知浓度的 GA-LDH 复合物供试品溶液 20 μL，在 “2.1.1” 项色谱条件下，分别于样品处理后 0、1、2、3、4、5 h 进行测定，记录峰面积并计算 *RSD* 值。

2.1.8 加样回收试验 在已知载药量的 GA-LDH 复合物中分别加入已知量约 80%、100%、120% 的 GA 对照品，制备供试品溶液，计算 GA-LDH 复合物中 GA 的加样回收率。

2.2 不同粒径 LDH 载体的制备

共沉淀法：精密称取摩尔比 3∶1 的 $MgCl_2$ 和 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$，将其溶于 60 mL 去 CO_2 去离子水中得到混合盐溶液。精密称取 0.18 mol NaOH 溶于 75 mL 去 CO_2 去离子水中得到碱溶液。在 N_2 环境保护下，将前者缓慢滴入后者中，混合溶液最终 pH 调至 10。磁力搅拌 24 h 后老化 3 h，将沉淀离心、水洗，真空 65 ℃干燥 24 h，即得粉末状 MgAl-LDH。

水热合成法：将共沉淀法制备得到的 LDH 水洗后，分散在去 CO_2 去离子水中，100 ℃下水热 4 h。沉淀再次离心、水洗，真空 65 ℃下干燥 24 h，即得水热合成法制备的 MgAl-LDH。

采用 BT-90 纳米激光粒径分布仪分别测定共沉淀法制备的 LDH 和水热合成法制备的 LDH 的粒径。

2.3 GA-LDH 复合物载药量和包封率的测定

精密称取 10 mg GA-LDH 复合物置于 10 mL 量瓶中，滴加两滴浓磷酸破坏载药复合物，使药物释放出来。加入甲醇后超声溶解 GA，并定容至刻度。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取 20 μL 进样测定，记录峰面积并代入标曲方程，计算载药量（*LE*）和包封率（*EE*）。计算公式如下：

LE（%）=（复合物中 GA 的含量 / 复合物的总质量）×100%；

EE（%）=（复合物中 GA 的含量 / 投药量）×100%。

2.4 GA-LDH 复合物制备方法的筛选

2.4.1 共沉淀法 称取 30 mg GA 溶于 10 mL 乙醇中，用 0.2 mol • L^{-1} NaOH 将溶液 pH 调至 8；取 0.006 mol $MgCl_2$ 和 0.002 mol $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 溶于 60 mL 去 CO_2 去离子水中，在 N_2 保护下将两者混合。滴加 0.2 mol • L^{-1} NaOH 将混合液 pH 调至 9，40 ℃磁力搅拌 7 h，静置 1 h。将沉淀离心、水洗两次、乙醇洗两次，真空干燥，即得共沉淀法制备的 GA-LDH 复合物。

2.4.2 离子交换法 称取 250 mg LDH 分散在 60 mL 去 CO_2 去离子水中，超声粉碎至匀浆液；取一定量的 GA 溶于 30 mL 甲醇中，N_2 保护下将两者混合。滴加 0.01mol • L^{-1} NaOH 使 LDH 与 GA 混合溶液的 pH 值达到 9。40 ℃下磁力搅拌 8 h，静置 1 h。将沉淀离心，水洗两次、乙醇洗两次，真空干燥，即得离子交换法制备的 GA-LDH 复合物。

2.4.3 剥离重组法 取 250 mg LDH 分散在甲酰胺中进行剥离，超声得到剥离的 LDH 胶状分散体，取 30 mg GA 溶于 30 mL 乙醇中。在 N_2 保护下，将剥离的 LDH 溶液逐渐地加到 GA 乙醇溶液中，40 ℃下磁力搅拌 4 h，静置 1 h 后离心，水洗两次、乙醇洗两次，真空干燥，即得剥离重组法制备的 GA-LDH 复合物。

2.4.4 胶束载药法 取 0.17 g 胆酸钠溶于 20 mL 去 CO_2 去离子水中，将 15 mg GA 溶于 20 mL 二氯甲烷中，两者混合，悬蒸除去二氯甲烷。取 5 mL 甲酰胺溶液（20 g • L^{-1}）滴入上述溶液中，搅拌 2 h，静置 1 h，离心，真空干燥，即得胶束载药法制备的 GA-LDH 复合物。

2.5 GA-LDH 复合物制备条件的单因素考察

根据“3.2”项下结果，选用离子交换法进行载药，其余条件相同，考察药载比为 1∶5 和 3∶5 时 GA-LDH 复合物的载药量和包封率。

选用离子交换法进行载药，其余条件相同，分别考察不同粒径的 LDH 载体对 GA-LDH 复合物载药量和包封率的影响。采用水热合成法制备的 LDH 粒径更均匀，集中在 100 ～ 200 nm，而共沉淀法制备的 LDH 粒径分布广，大颗粒含量较多。因此分别选用共沉淀法和水热合成法制备的 LDH 进行载药。

2.6 GA-LDH 复合物的表征

采用 IR、XRD 对 GA-LDH 结构表征，制备 GA-LDH 胶体溶液，测定其 Zeta 电位。采用傅里叶变换红外光谱对 GA-LDH 结构进行表征，KBr 压片，波段 400 ～ 4000 cm^{-1}。采用 MIniflex600 粉末 X- 射线衍射仪表征 GA-LDH 结构。测试条件：Cu-Kα 射线源，电压 40 kV，电流 40 mA，扫描速度 10°/min。取适量 GA-LDH 超声分散在去离子水中，终质量浓度为 1 mg • mL^{-1}，测定 GA-LDH 的粒径及 Zeta 电位。

2.7 GA-LDH 复合物缓冲性能测试

以最佳制备条件下制得的 LDH 和 GA-LDH 复合物分别作为测试样品，滴加 0.1 mol • L^{-1} HCl 溶液至样品的悬浮液，测定溶液 pH 值变化，考察其缓冲性能[12]。具体步骤如下：将 100 mg 样品超声分散在 30 mL 去离子水中，滴加 0.1 mol • L^{-1} HCl 溶液至上述悬浮液中并持续搅拌，连续测定 pH 值至 pH 为 1，以加入 HCl 的体积为横坐标、溶液 pH 值为纵坐标，绘制缓冲曲线，评价其缓冲性能。

2.8 GA-LDH 复合物体外释药性能考察

采用动态透析法测定 GA-LDH 复合物的累计释放量。精密称取一定量 GA-LDH 复合物溶于适量 PBS（pH 7.4）溶液中，转入透析袋（截留分子量 3500 D），置于 50 mL 离心管内。管内加入 30 mL 含有 20% 丙酮的 PBS 释放介质，将离心管放入 37 ℃的恒温水浴中，转速为 100 r • min^{-1}。每隔一段时间从透析袋外的 PBS 中取出 2 mL 样

品，同时加入相同的空白介质。采用 UV-Vis 建立体外释放 GA 标准曲线 $A = 0.022c + 0.0302$（c，μg • mL^{-1}，$R^2 = 0.9998$）。UV-Vis 测量样品吸光度，代入标准曲线，计算得到药物的累计释放率。药物的累计释放率按式（1）计算。

$$E = [V_e \sum_{1}^{n-1} C_i + V_0 C_n]/m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中 E：释放介质中 GA 的总释放量（%）；V_e：每次吸取样品的体积（2 mL）；V_0：透析袋外释放介质的总体积（30 mL）；C_i：第 i 次置换取样时释放介质中 GA 的质量浓度（mg • mL^{-1}）；m_0：复合物 GA 的质量（mg）；n：取样次数。

2.9　GA-LDH 复合物的分子对接

使用 AutoDockTools1.5.7 软件进行对接计算。LDH 的晶体结构通过 Cambridge Crystallographic Data Centre（CCDC）获得，在 PubChem 中下载药物 GA 的三维结构。将配体与受体的 pdb 文件导入 ADT，对受体 LDH 的 pdb 文件进行去除结合水分子、一并删除小分子、添加氢原子等处理，将其保存至 pdbqt 文件；再将配体 GA 的 pdb 文件所含化学键进行调整处理，并将其输出为包含坐标、电荷、原子类型及可旋转键的位置信息的 pdbqt 文件。对接时，将对接盒子设置到最大，其他参数保持默认设置。测定了不同构象的结合能，并以结合能最低的构象为参考。

3　结果

3.1　GA 方法学考察结果

测得 GA 的保留时间约为 5.5 min，以峰面积积分值（A）为纵坐标、对照品浓度（c，μg•mL^{-1}）为横坐标绘制标准曲线，得出 GA 的回归方程 $A = 15002c + 1419.3$（$R^2 = 0.9995$，$n = 6$），线性范围为 4 ～ 240 μg • mL^{-1}。HPLC 色谱图见图 1。进样 6 次峰面积的 *RSD* 为 2.7%，说明仪器精密度符合要求；经计算得 GA-LDH 复合物的重复性 *RSD* 为 2.8%，说明方法重复性好；样品 5 h 进样稳定性 *RSD* 为 1.7%，结果符合要求。GA-LDH 复合物的平均回收率为 99.35%，*RSD* 为 2.8%，符合要求。

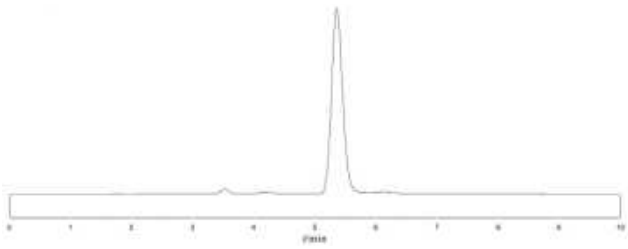

图 1　GA 的 HPLC 图谱

Fig 1　HPLC chromatogram of GA

3.2　不同方法制备的 LDH 粒径大小

从图 2A 可以看出，共沉淀法制备的 LDH 粒径不均匀，分散性较差，且大颗粒 LDH 含量较多。然而图 2B 结果显示，经过 100 ℃水热处理 4 h 后，LDH 颗粒变得非常均匀，粒径分布较窄，普遍集中在 100 ～ 300 nm，分散性良好。

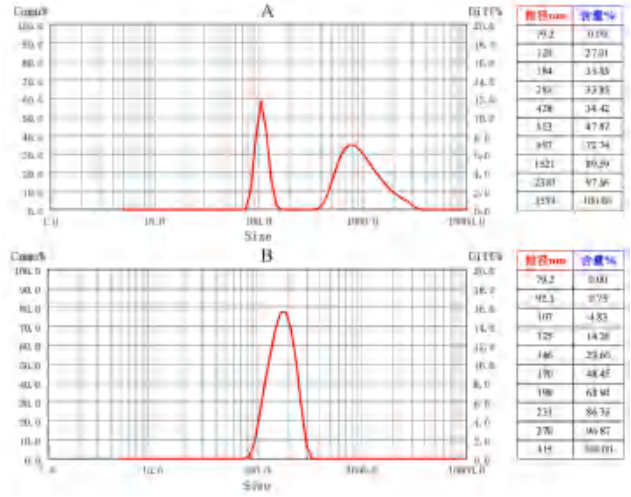

图 2　共沉淀法（A）和水热法（B）制得的 LDH 粒径图

Fig 2　Particle size of LDH prepared by co-precipitation（A）and hydrothermal（B）

3.3　GA-LDH 复合物制备方法的筛选结果

试验结果显示，经不同载药方法制备的 GA-LDH 复合物的载药量和包封率有明显变化。根据表 2 结果，离子交换法和胶束载药法得到的载药量和包封率较高。然而胶束载药法过程中需要旋蒸除去二氯甲烷，且影响因素较多不易控制，离子交换法作为相对成熟且普遍使用的载药方法，因此后续试验中采用离子交换法制备 GA-LDH 并进行优化。

表 2　载药方法单因素考察结果

Tab 2　Single factor of drug loading method

载药方法	载药量 /%	包封率 /%
共沉淀法	1.02	10.90
离子交换法	5.73	26.54
剥离重组法	1.80	19.05
胶束载药法	5.36	25.62

3.4　GA-LDH 复合物制备方法的单因素考察

3.4.1　不同药载比的考察结果　固定离子交换法为制备方法，其余条件相同，考察药载比为 1∶5 和 3∶5 时 GA-LDH 的载药量和包封率。当药载比为 1∶5 时，GA-LDH 复合物的载药量和包封率分别为 5.73% 和 26.54%；当药载比为 3∶5 时，GA-LDH 复合物的载药量和包封率分别为 7.89% 和 12.43%。考虑到后续试验，选择以载药量为主要指标，以药载比 3∶5 为后续制备条件。

3.4.2　不同粒径 LDH 的考察结果　选用离子交换法进行载药，药载比为 3∶5，其余条件相同，分别考察不同粒径 LDH 载体（“2.2” 项下共沉淀法制备的 LDH 粒径和水热法制备 LDH 粒径）对 GA-LDH 载药

量和包封率的影响。结果表明，粒径较小的 LDH 载药量和包封率更高，分别为 21.37% 和 46.29%。

3.5　GA-LDH 表征

3.5.1　GA-LDH 的 IR 分析　由图 3 中 GA、GA-LDH 的 IR 谱图可知，GA-LDH 的谱图中出现了 GA 的特征吸收峰。位于 2927 cm^{-1} 和 2973 cm^{-1} 的吸收峰为 GA 中的甲基和亚甲基的吸收峰，1368 cm^{-1}、1595 cm^{-1} 和 1633 cm^{-1} 处的峰为 GA 苯环骨架的伸缩振动峰，1748 cm^{-1} 处的峰为 GA 羧酸上 C ＝ O 的伸缩振动峰。

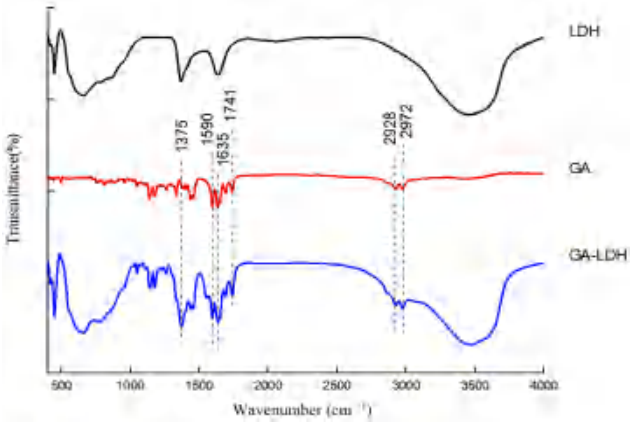

图 3　LDH、GA 和 GA-LDH 的 FT-IR 图谱

Fig 3　FT-IR spectra of LDH，GA and GA-LDH

3.5.2　GA-LDH X- 射线衍射分析　图 4 为 LDH 和 GA-LDH 的 XRD 谱图。可以看出，空白 LDH 具有类水滑石的特征峰，分别在 11.34°、22.84°、34.74°、39.13°、46.36°、60.58° 和 61.89° 处对应（003）、（006）、（012）、（015）、（018）、（110）和（113）峰。在 LDH 吸附 GA 后，GA-LDH 的 d- 间距为 11.34Å，与空白 LDH 的 d- 间距相同，表明 GA 未插入 LDH 的层间结构。此外，空白 LDH 在吸附 GA 后其结晶度沿着 c 轴方向降低，与文献一致 [13]，表明成功制备了 GA-LDH 复合物。

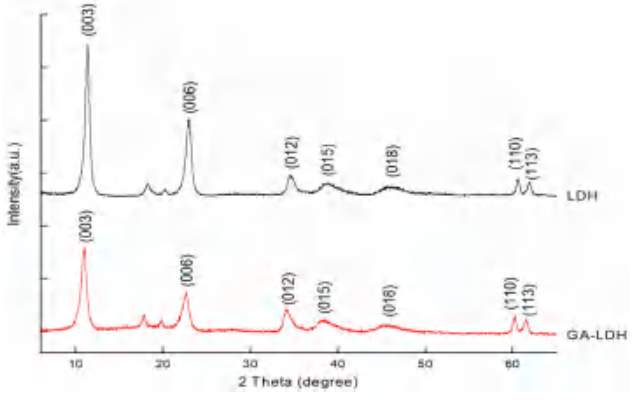

图 4　LDH 和 GA-LDH 的 XRD 图谱

Fig 4　XRD spectra of LDH and GA-LDH

3.5.3　GA-LDH Zate 电位分析　图 5 显示了 LDH 和 GA-LDH 复合物在去离子水中分散时的 Zeta 电位。GA 吸附 LDH 后复合物仍表现出正电荷，但 Zeta 电位为（12.4±2.5）mV，相较原始 LDH 有所降低。

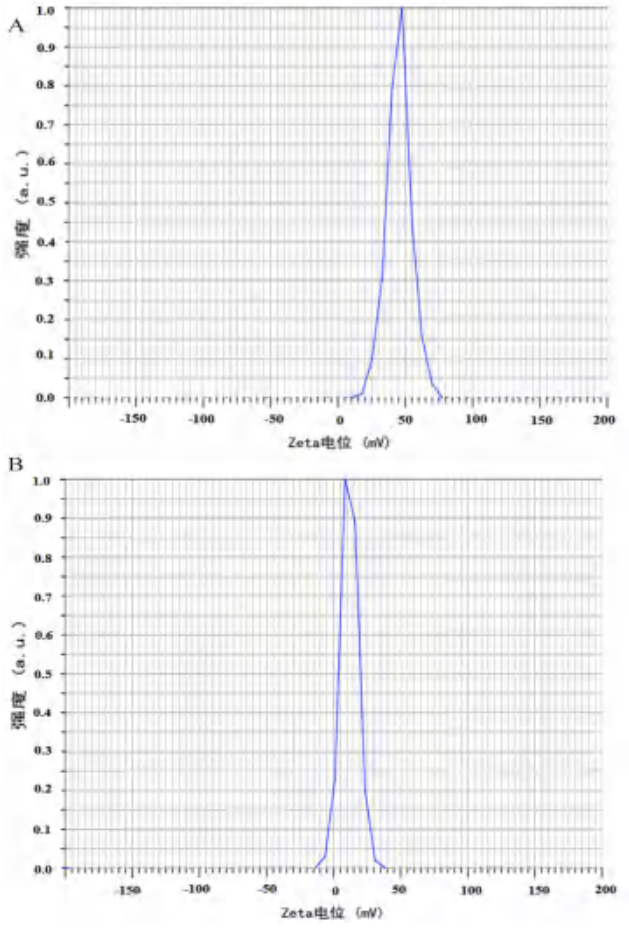

图 5　LDH（A）和 GA-LDH（B）的 Zeta 电位图

Fig 5　Zeta potential of LDH（A）and GA-LDH（B）

3.5.4　GA-LDH 复合物缓冲性能测试　载体 LDH 与 GA-LDH 复合物的缓冲性能如图 6 所示，载体 LDH 在 pH 4 处表现出较好的缓冲效果，可作为抗酸剂使用，推测其缓冲性能归因于层间的羟基。另外，当 GA 吸附 LDH 上形成杂化物后，仍可在 pH 4 处观察到明显的缓冲效果。这表明，新形成的 GA-LDH 复合物不仅能保持 LDH 的层状结构，也可保留 LDH 的缓冲性能。

图 7 为 GA 甲醇溶液、GA-LDH 复合物的体外释放曲线，开始时药物释放较快，随后释放变缓，最终达到释放平衡。GA 溶液的释放在 12 h 内达到平衡，早于 GA-LDH 复合物。GA 溶液的释放量在 3 h 达到总药量的 53.2%，12 h 达到总药量的 91.8%，而 GA-LDH 复合物的释放量 4 h 达到总药量的 24.5%，24 h 达到了总药量的 60.8%。因此，GA-LDH 复合物中药物释放更加缓慢，具

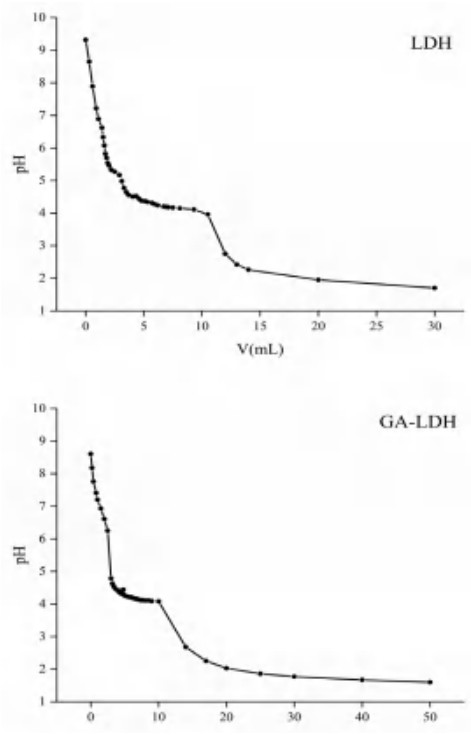

图 6　LDH 和 GA-LDH 复合物的缓冲曲线

Fig 6　Buffer curves of LDH and GA-LDH

有一定的缓释性能。

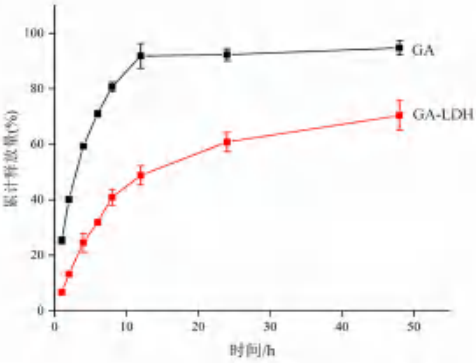

图 7　GA 溶液和 GA-LDH 复合物的释放曲线

Fig 7　Release curves of GA solution and GA-LDH nano hybrid

3.6　GA-LDH 体外释药性能考察

将 GA-LDH 复合物的体外释放数据运用 Origin 软件进行方程拟合。由拟合结果可知，在用一级动力学模型进行拟合时，拟合优度 R^2 最大，相关系数为 0.9963。因此 GA-LDH 复合物的释药机制为被动扩散过程（见表 3）。

表 3　体外释放方程拟合

Tab 3　In vitro release equation fitting

模型	方程	R^2
零级动力学模型	$M_t = 0.0124t + 0.20748$	0.7301
一级动力学模型	$M_t = 0.692\ (1 - e^{-0.10})$	0.9963
Higuchi 模型	$M_t = 0.1098t^{1/2} - 0.02639$	0.9126
Ritger-Peppas 模型	$M_t = 0.14251t^{0.433}$	0.9282

3.7　GA-LDH 的分子对接及其结合能

表 4 显示 GA 与 LDH 的分子对接得到 10 种受体 - 配体构型的结合能由低到高依次排序。选择 GA 与 LDH 结合最稳定的受体配体构型，即结合能最低，为 − 9.38 kcal • mol $^{-1}$（− 39.09 kJ • mol $^{-1}$）。观察氢键作用，使用 VMD 对对接结果进行可视化，图 8 显示了 GA 与 LDH 的氢键结合，氢键的形成对 GA 负载在 LDH 表面的稳定性起着重要作用。

表 4　结合能大小排序

Tab 4　Order of binding energy

受体 - 配体构型	结合能 /（kcal • mol $^{-1}$）
GA 1_1	− 9.38
GA 2_1	− 9.06
GA 2_2	− 7.68
GA 3_1	− 8.66
GA 4_1	− 8.35
GA 5_1	− 8.15
GA 6_1	− 8.11
GA 7_1	− 7.62
GA 8_1	− 7.40
GA 9_1	− 7.17

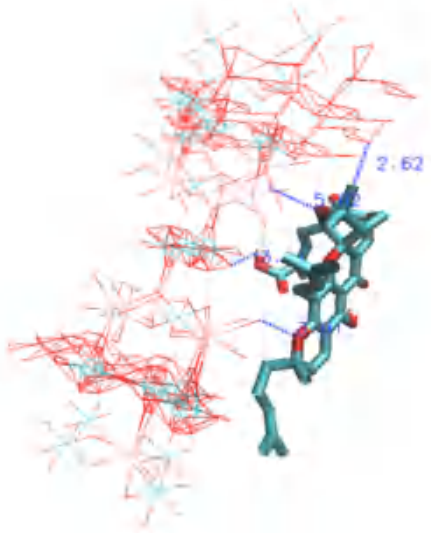

图 8　GA 与 LDH 的结合构型及氢键图

Fig 8　Conformational and hydrogen bonding of the adsorption of GA to LDH

4　讨论

目前，国内外已报道多种药物 -LDH 复合物的制备方法。本文选取共沉淀法、离子交换法、剥离重组法和胶束载药法进行考察。本研究表明，载药方法对 GA-LDH 的载药量和包封率具有显著影响。其中，共沉淀法制备的 GA-LDH 载药量和包封率均较低，可能与共沉淀法合成 LDH 的过程有关。简单来说，共沉淀法是将金属盐溶液、碱溶液和药物溶液三者混合，在合成 LDH 层状结构的同时吸附药物分子，得到载药复合物。GA 在乙醇、碱性水溶液和高温条件下不稳定[14]，容

易降解，推测在 LDH 形成前，部分 GA 已经降解，含量减少，因此共沉淀法制备的 GA-LDH 杂化物的载药量和包封率最低。剥离重组法和胶束载药法的原理相同，都是先将 LDH 层状结构剥离成单片状 LDH，再与药物分子重新组装形成层状结构。然而，LDH 的剥离程度与剥离溶剂、溶剂体积及剥离时间都密切相关，影响因素较多不易控制。离子交换法是目前 LDH 载药最为成熟且普遍使用的方法，试验结果证明，离子交换法制备的 GA-LDH 优于其他三种方法。在单因素试验中，粒径较小的 LDH，其载药量和包封率更高。因为 LDH 粒径小，比表面积大，便于 GA 药物分子吸附在 LDH 表面；而粒径较大的 LDH 容易聚集，比表面积相对较小，从而使载药量和包封率较低。

GA-LDH 复合物充分体现了 LDH 作为药物载体的优势。酸碱滴定试验表明，LDH 由于其层间的羟基而具有一定缓冲效果，可作为抗酸剂进行使用，LDH 在表面吸附 GA 后仍具有相似的缓冲效果。这些优势都是基于 LDH 的层状结构，药物吸附在 LDH 表面后，没有破坏层状结构，因此药物 -LDH 复合物仍能保持原始 LDH 的特性。

GA 为难溶性药物，几乎不溶于水，前期体外释放预试验曾尝试在释放介质中加入吐温 -80 和十二烷基硫酸钠（SDS）等增溶剂，促进 GA 的溶出，但试验效果并不理想。后又尝试在释放介质中加入一定量的有机溶剂（小分子的醇、醛、酮）作为表面活性物质进行助溶，结果表明 GA 的溶出效果较好。GA 在醇类有机溶剂中的稳定性较差，容易降解，我们分别考察了乙醇、二甲基亚砜（DMSO）、丙酮加入释放介质后 GA 的溶出效果，结果表明，加入 20% 丙酮的 PBS 溶液中 GA 的溶出效果最好。体外释放结果表明，相较于 GA 原药溶液，GA-LDH 具有一定的缓释效果，释药机制为被动扩散过程。

5 结论

本研究成功建立了 GA 含量测定分析方法，通过共沉淀法、离子交换法、剥离重组法、胶束载药法等方法制备 GA-LDH 复合物。以载药量和包封率为指标，对载药方法、药载比和不同粒径大小的 LDH 进行单因素考察，确定以离子交换法、药载比为 3∶5、水热合成 LDH 为载体制备 GA-LDH 复合物为最佳制备工艺。酸碱滴定试验表明 GA-LDH 具有一定的缓冲性能；体外释放试验表明 GA-LDH 复合物具有缓释效果，释药机制为被动扩散过程；分子对接结果显示药物负载载体的过程为自发过程，两者结合能较高。

参考文献

[1] 董茜，韩举国，段少峰 . 藤黄酸提取分离及其抗肿瘤活性 [J]. 河南大学学报（医学版），2019，38（1）：1-5.

[2] 侯文洁，萧伟 . 藤黄酸的研究进展 [J]. 中草药，2011，42（3）：617-620.

[3] 杨磊，张赟星，汪小琴 . 布洛芬插层类水滑石 / 淀粉凝胶复合物的制备及缓释行为 [J]. 应用化学，2018，35（7）：781-787

[4] Alcântara ACS，Aranda P，Darder M，et al. Bionanocomposites based onalginateâ zein/layered double hydroxide materials as drug delivery systems [J] J Mater Chem，2010，20：9495-9504.

[5] Zhang H，Pan DK，Duan X. Synthesis，characterization，and magnetically controlled release behavior of novel core shell structural magnetic ibuprofen-intercalated LDH nanohybrids [J]. J Phys Chem C，2009，113（28）：251-263.

[6] Khan A. Intercalation chemistry of layered double hydroxides：recent developments and applications [J]. Cheminform，2002，12（11）：3191-3198.

[7] Xiao R，Wang W，Pan LL，et al. A sustained folic acid release system based on ternary magnesium/zinc/aluminum layered double hydroxides [J]. J Mater Sci，2010，46（8）：2635-2643.

[8] Senapati S，Thakur R，Verma SP，et al. Layered double hydroxides as effective carrier for anticancer drugs and tailoring of release rate through interlayer anions [J]. J Control Release，2016，224：186-198.

[9] Silion M，Hritcu D，Jaba IM，et al. In vitro and in vivo behavior of ketoprofen intercalated into layered double hydroxides [J]. J Mater Sci Mater Med，2010，21（11）：3009-3018.

[10] 王爽，兀晓文，李海平，等 . 剥离 - 共组装法制备葫芦素插层类水滑石纳米杂化物 [J]. 高等学校化学学报，2014，35（9）：1982-1987.

[11] Hyoung-Jun K，Kitae R，Kang JH，et al. Anticancer activity of ferulic acid-inorganic nanohybrids synthesized via two different hybridization routes，reconstruction and exfoliation-reassembly [J]. Sci World J，2013，2013：421967.

[12] 张晓晴，曾美桂，李淑萍 . 不同溶剂对甲氨蝶呤 / 类水滑石复合物性质的影响 [J]. 化学学报，2013，71（2）：246-254.

[13] Jeung DG，Kim HJ，Oh JM. Incorporation of Glycine max Merrill extract into layered double hydroxide through ion-exchange and reconstruction [J]. Nanomaterials，2019，9（9）：1262-1267.

[14] Katherine MT，Scott RS，Emmanuel PG. Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin [J]. J Control Release，2004，95（3）：501-514.

（收稿日期：2023-09-14；修回日期：2023-10-18）

熟地黄中促神经干细胞增殖活性的成分研究

杨扬[1]，万凤[2]，侯晓梦[1]，刘傲雪[1]，胡江雪[1]，李强[1*]，司银楚[2*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京 102488；2. 北京中医药大学中医学院，北京　102488）

摘要：目的　探究熟地黄中促进体外培养的神经干细胞（NSCs）增殖的活性成分。**方法**　采用系统溶剂萃取法及柱色谱法分离熟地黄各部位，CCK-8 法测定熟地黄不同化学分离部位及活性部位所获化合物对 NSCs 增殖活性的影响。**结果**　熟地黄水提醇沉后水部位经大孔树脂、硅胶、聚酰胺分离后所得 FrC5 部分具有显著的促进 NSCs 增殖的活性（$P < 0.05$）。FrC5 部分按照溶解性不同分为 FrC5-1 和 FrC5-2，FrC5-1 部位相较于其他组别作用较强且与对照组相比差异有统计学意义（$P < 0.05$），与对照组相比对 NSCs 的增殖率为 75.85%。进一步分离得到 2 个化合物，根据 MS、NMR 数据及参考文献鉴定得出活性化合物为毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷。毛蕊花糖苷对 NSCs 的增殖率为 65.04%，异毛蕊花糖苷对 NSCs 的增殖率为 35.86%。**结论**　毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷可能是熟地黄中促进 NSCs 增殖的主要活性成分。

关键词：熟地黄；神经干细胞；增殖；物质基础

中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1201-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.014

Active ingredients in Radix Rehmanniae Praeparata to promote the proliferation of neural stem cells

YANG Yang[1], WAN Feng[2], HOU Xiao-meng[1], LIU Ao-xue[1], HU Jiang-xue[1], LI Qiang[1*], SI Yin-chu[2*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *School of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective　To determine the active components in Radix Rehmanniae Praeparata to promote the proliferation of neural stem cells (NSCs) in vitro. **Methods**　The system solvent extraction method and column chromatography were used to separate the various parts of Radix Rehmanniae Praeparata. CCK-8 assay was used to determine the effect of the compounds obtained from different chemical separation sites and active sites of Radix Rehmanniae Praeparata on the proliferation of NSCs. **Results** After water extraction and alcohol precipitation of Radix Rehmanniae Praeparata, the water position was separated by macroporous resin, silica gel, and polyamide to obtain the FrC5 part. The FrC5 part significantly promotied the proliferation of NSCs, the difference was significant as compared with the control group ($P < 0.05$). The FrC5 part was divided into FrC5-1 and FrC5-2 according to solubility, the FrC5-1 site showed stronger effect compared with that of other groups with significant difference ($P < 0.05$). Compared with the control group, the proliferation rate of NSCs was 75.85%. Two compounds were further separated by MS and NMR spectrum data and references, which were acteoside and isoacteoside. The proliferation rate of acteoside on NSCs was 65.04%, while that of isoacteoside on NSCs was 35.86%. **Conclusion**　Acteoside and isoacteoside may be the main active components in Radix Rehmanniae Praeparata to promote the proliferation of NSCs.

Key words: Radix Rehmanniae Praeparata; neural stem cell; proliferation; materialbasis

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No. 81373830）。

作者简介：杨扬，女，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究，email：yang123yang0928@163.com　*通信作者：李强，男，研究员，主要从事中药药效物质基础研究，email：lq-cn@126.com；司银楚，男，教授，主要从事中医药促进脑损伤修复的机制研究，email：bjsiyinchu@sina.com

熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 根及根茎的炮制品，可补血滋阴、补精填髓。临床常用于肝肾阴虚、腰膝酸软、骨蒸潮热等的治疗[1]。本实验拟通过活性追踪法，采用 CCK-8 法寻找熟地黄中促神经干细胞（NSCs）增殖的活性成分[2]。

1 材料

1.1 试药

熟地黄，产地山西襄汾，批号：17102313，经北京中医药大学中药学院杨瑶珺教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的炮制加工品，符合药典要求。二氯甲烷、石油醚、乙醇均为分析纯（天津市致远化学试剂有限公司），氘代甲醇（Cambridge Isotope Laboratorics），DMEM/F12 培养基、胰酶（Gibco，赛默飞世尔科技有限公司），胎牛血清（四季青，浙江天杭生物科技公司），CCK-8（Vazemy，诺唯赞生物科技有限公司）。

1.2 动物

SPF 级孕 15 ～ 18 d 雌性 SD 大鼠，约 460 g [斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SYXK（京）2019-0010]。

1.3 仪器

BJ-2CD 型净化工作台（上海博迅实业有限公司医疗设备厂），AVANCE NEO 型 600 MHz 核磁共振波谱仪（布鲁克公司），LTQ-Orbitrap 型高分辨质谱仪（赛默飞公司），RE-52AA 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂），ZDHW 型调温电热套（北京中兴伟业仪器有限公司）。

2 方法与结果

2.1 原代 NSCs 的培养

孕鼠麻醉后，于无菌条件下取胎鼠大脑，加 0.05% 胰酶消化 5 ～ 10 min，10% 胎牛血清终止消化，所得细胞悬液过 200 目细胞筛，即得原代 NSCs。将单细胞悬液置于显微镜下计数并调整细胞浓度至 1.0×10^6 个 $\cdot$ mL^{-1}，接种至细胞培养瓶中，于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，每日观察，2 ～ 3 日换液[3]。

2.2 熟地黄活性追踪分离流程

熟地黄活性追踪分离流程图见图 1。

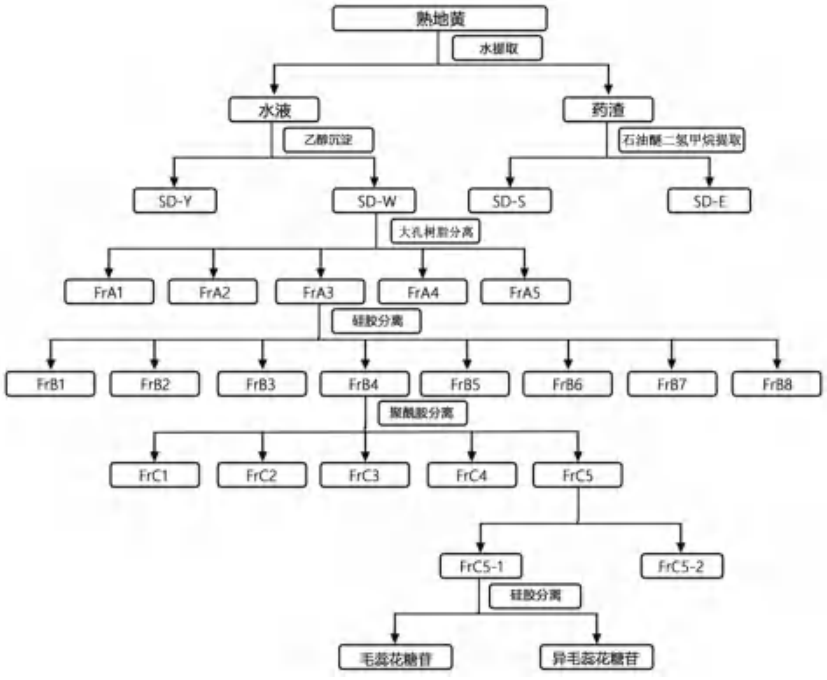

图 1 熟地黄活性追踪分离流程图

Fig 1 Activity tracking separation process of Radix Rehmanniae Praeparata

取熟地黄 10 kg，加入 10 倍量水回流提取 3 次，每次 2 h，合并滤液，滤液回收溶剂至 $\rho=1.18$（24 ℃）。向其中加入乙醇至含醇量为 80%，滤过，获得母液部分（SD-W，得率为 2.50%）及沉淀部分（SD-Y，得率为 5.20%）。水提取后所余药渣晾干后用 8 倍量石油醚回流提取 3 次，每次 2 h，合并，滤过，回收溶剂得石油醚部分（SD-S，得率为 0.33%）。石油醚部分回流所得药渣晾干后继续用 8 倍量二氯甲烷回流提取 3 次，每次 2 h，得二氯甲烷部分（SD-E，得率为 0.30%）。SD-W 部分经大孔树脂柱分别以水、20% 乙醇、40% 乙醇、60% 乙醇、95% 乙醇洗脱浓缩后获得相应提取物 FrA1 ～ FrA5（得率分别为 0.74%、0.29%、0.38%、0.13%、0.21%），FrA3 部位经硅胶柱分别以二氯甲烷 - 甲醇

（1∶0、20∶1、5∶1、1∶1、1∶5、1∶10、1∶20、0∶1）洗脱浓缩后得到相应提取物 FrB1 ～ FrB8（得率分别为 0.02%、0.02%、0.06%、0.07%、0.04%、0.04%、0.03%、0.05%），FrB4 部分经聚酰胺柱分别以水 - 甲醇（1∶0、5∶1、1∶1、1∶5、0∶1）洗脱浓缩后得到相应提取物 FrC1 ～ FrC5（得率分别为 0.01%、0.03%、0.006%、0.0006%、0.003%）。FrC5 部分按照溶解性不同分为水溶部分 FrC5-1 和甲醇溶部分 FrC5-2（得率分别为 0.002%、0.0009%）。FrC5-1 经硅胶柱分离后获得 2 个化合物。

2.3　CCK-8 法检测各药物对 NSCs 增殖的影响

取传代后 NSCs 调整浓度至 1.0×10^6 个 • mL^{-1}，取无菌 96 孔板，外圈加入 200 μL 无菌 PBS。分别设置：空白对照组（每孔加入 200 μL 完全培养基）、对照组（每孔加入 100 μL 完全培养基和 100 μL 单细胞悬液）、给药调零组（每孔加入 100 μL 完全培养基和 100 μL 不同浓度待测药液）、给药组（每孔加入 100 μL 不同浓度待测药液和 100 μL 单细胞悬液）。铺板后，于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中继续培养 2 ～ 3 日后，取出，每孔加入 20 μL CCK-8，继续置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 2.5 h 后，于 450 nm 处测量吸光度（*OD* 值），*OD* 值越高，活细胞数目越多。

△ *OD* 值＝给药组 *OD* 值－给药调零组 *OD* 值　（公式 1）

2.4　统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行处理，采用单因素（ANOVA）方差分析检验。比较方差齐时用 Tukey 检验，方差不齐时用 Tamhane’s T2 检验。

2.5　熟地黄各分离部位的△ *OD* 值与对 NSCs 增殖的影响

SD-W 部分（25、12.5、1.6 μg • mL^{-1}），SD-E 部分（25、12.5、6.4、3.2、1.6 μg • mL^{-1}）组的△ *OD* 值与对照组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。依据公式 2 进行增殖率计算，结果表明 SD-W 部位促 NSCs 增殖作用最强，可达 41.03%（见图 2）。

增殖率（%）＝[（给药组 *OD* 值－给药调零组 *OD* 值）/（对照组 *OD* 值－空白对照组 *OD*）－1]×100%　（公式 2）

2.6　熟地黄 SD-W 部分经大孔树脂柱洗脱后各部分的△ *OD* 值与对 NSCs 增殖的影响

FrA2 部分（25、12.5 μg • mL^{-1}），FrA3 部分（25、3.2 μg • mL^{-1}），FrA4 部分（12.5、6.4 μg • mL^{-1}），FrA5 部分（12.5、6.4 μg • mL^{-1}）组的△ *OD* 值与对照组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。

依据公式 2 对增殖率进行计算，结果见图 3。

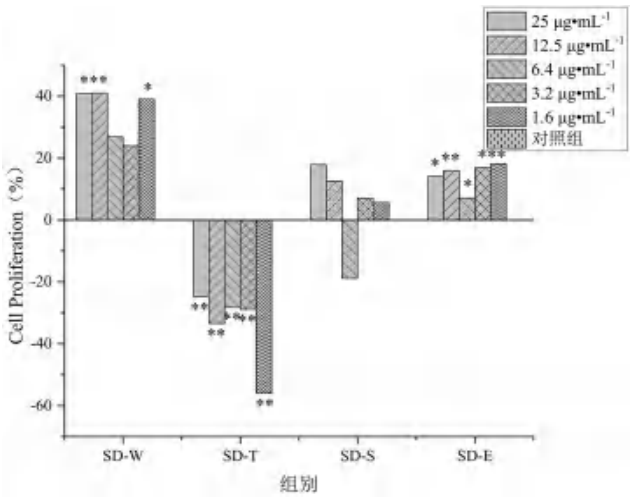

图 2　熟地黄各分离部位对 NSCs 增殖率的影响

Fig 2　Effect of separated parts of Radix Rehmanniae Praeparata on the proliferation rate of NSCs

注：与对照组相比，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

SD-W 部位经大孔树脂分离后，所得 FrA3 部位促 NSCs 增殖作用最强，可达 52.09%。

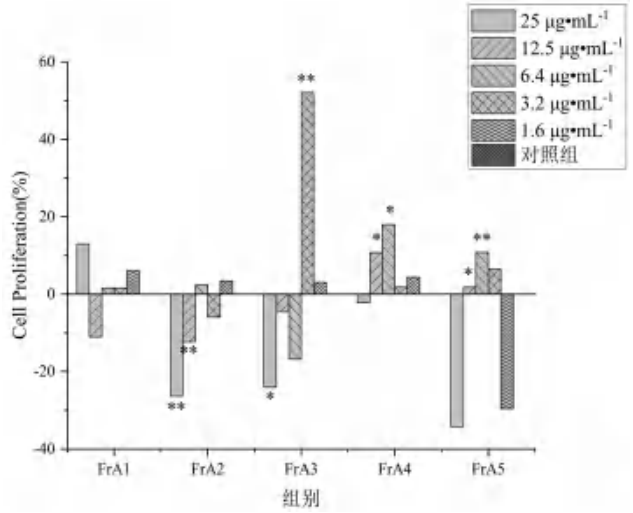

图 3　熟地黄 SD-W 部位各分离部分对 NSCs 增殖率的影响

Fig 3　Effect of separated parts of SD-W from Radix Rehmanniae Praeparata on the proliferation rate of NSCs

注：与对照组相比，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

2.7　熟地黄 FrA3 部位经硅胶柱洗脱后各部分的△ *OD* 值与对 NSCs 增殖的影响

FrB1（25、12.5、6.4、3.2、1.6 μg • mL^{-1}），FrB3（25、12.5、6.4、3.2、1.6 μg • mL^{-1}），FrB4（25、12.5、6.4 μg•mL^{-1}），FrB5（12.5、3.2 μg•mL^{-1}），FrB6（1.6 μg•mL^{-1}），FrB7（6.4、3.2 μg • mL^{-1}）组的△ *OD* 值与对照组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。依据公式 2 对增殖率进行计算，结果见图 4，FrA3 部位经硅胶分离后所得

FrB4 部位促 NSCs 增殖作用最强，可达 38.10%。

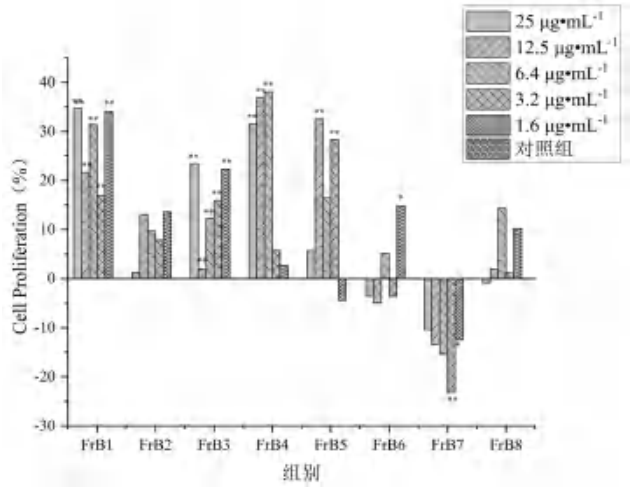

图 4　熟地黄 FrA3 各分离部分对 NSCs 增殖率的影响

Fig 4　Effect of separated parts of FrA3 from Radix Rehmanniae Praeparata on the proliferation rate of NSCs

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

2.8　熟地黄 FrB4 部位经聚酰胺柱洗脱后各部位的△ *OD* 值与对 NSCs 增殖的影响

FrC1（25 μg • mL^{-1}），FrC3（3.2 μg • mL^{-1}），FrC5（25、12.5、6.4、3.2、1.6 μg • mL^{-1}）组的△ *OD* 值与对照组相比差异有统计学意义（$P < 0.05$）。依据公式 2 对增殖率进行计算，结果见图 5。结果表明 FrB4 部位经聚酰胺分离后，所得 FrC5 部位促 NSCs 增殖作用最强，可达 55.93%。

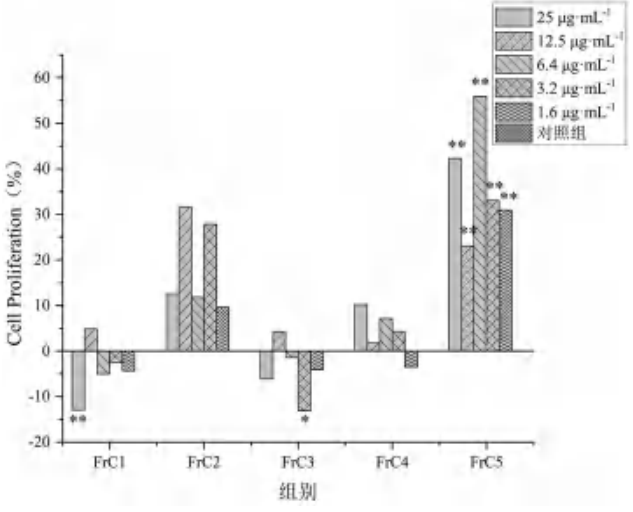

图 5　熟地黄 FrB4 各分离部分对 NSCs 增殖率的影响

Fig 5　Effect of separated parts of FrB4 from Radix Rehmanniae Praeparata on the proliferation rate of NSCs

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

2.9　熟地黄 FrC5（1-2）部分的△*OD* 值与对 NSCs 增殖的影响

FrC5-1（25、12.5、6.4、3.2、1.6 μg • mL^{-1}），FrC5-2（12.5、6.4、3.2、1.6 μg • mL^{-1}）组的△*OD* 值与对照组相比差异有统计学意义（$P < 0.05$）。依据公式 2 对增殖率进行计算，结果见图 6，FrC5 部位按照溶解度不同分离后，FrC5-1 部位促 NSCs 增殖作用最强，可达 75.85%。

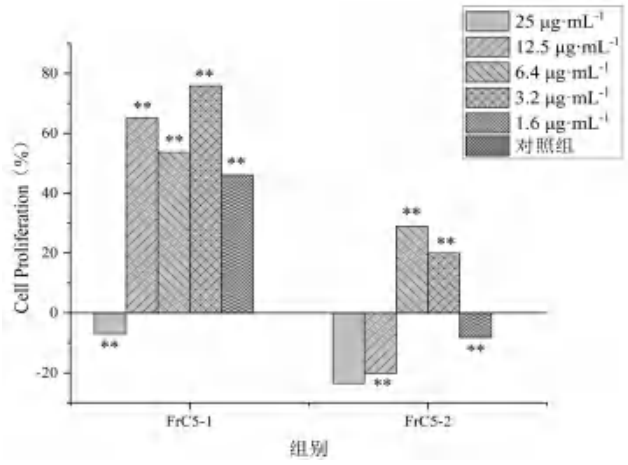

图 6　熟地黄 FrC5 各分离部分对 NSCs 增殖率的影响

Fig 6　Effect of separated parts of FrC5 from Radix Rehmanniae Praeparata on the proliferation rate of NSCs

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

2.10　熟地黄 FrC5-1 部分结构鉴定

2.10.1　质谱解析　质谱条件为 ESI 离子源，采用负离子检测模式；毛细管温度：350 ℃；离子源温度：300 ℃；鞘气流量：40 L • min^{-1}；辅助气体流量：20 L • min^{-1}；电源电压：4 kV；毛细管电压：25 V；扫描范围：100 ～ 1200 *m/z*。

从 FrC5-1 中分离所得化合物均为苯乙醇苷类化合物。苯乙醇苷类化合物主要由苯丙烯酰基、苯乙醇基、葡萄糖基和其他糖基共四部分组成，苯丙烯酰基主要包括咖啡酰基和阿魏酰基等，裂解过程中葡萄糖基位于中心不易掉落，苯乙醇基与葡萄糖基紧密相连同样不易掉落，苯丙烯酰基以及其他糖基在裂解过程中易掉落。

毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷均为苯乙醇苷类化合物，毛蕊花糖苷（*m/z* 623.1985）和异毛蕊花糖苷（*m/z* 623.1966）在质谱中首先发生酯键断裂产生 *m/z* 461.2220 和 *m/z* 461.8015 或 *m/z* 179.0247 和 *m/z* 179.5808，而后前者丢失鼠李糖产生 *m/z* 315.2324 和 *m/z* 315.9755（见表 1），裂解规律见图 7、8。

2.10.2　核磁共振波谱解析　化合物 **1**：白色粉末，mp142 ～ 145 ℃，易溶于甲醇、乙醇。^{1}H-NMR（CD_3OD，600 MHz）δ：7.05（1H，d，J = 2.1 Hz，H-2），6.78（1H，d，J = 8.2 Hz，

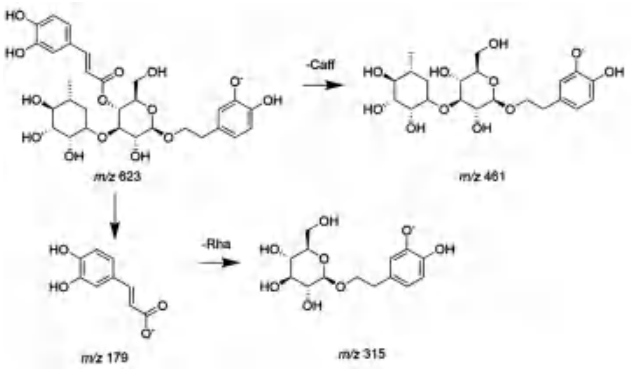

图 7　毛蕊花糖苷可能裂解规律

Fig 7　Fragmentation pattern of acteoside

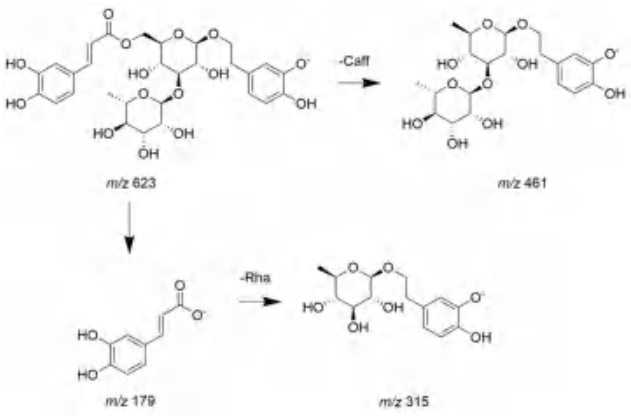

图 8　异毛蕊花糖苷可能裂解规律

Fig 8　Fragmentation pattern of isoacteoside

表 1　熟地黄 FrC5-1 部位所得结构类型化合物 MS 数据

Tab 1　MS data of compounds obtained from FrC5-1 from Radix Rehmanniae Praeparata

化合物	$[M-H]^-$	MS^2	误差 / $\times10^{-6}$
毛蕊花糖苷	623.1985	461.2220，315.2324，179.0247	2.31
异毛蕊花糖苷	623.1966	461.8015，315.9755，179.5808	0.75

H-5），6.95（1H，dd，J = 8.2，2.1 Hz，H-6），7.59（1H，d，J = 15.9 Hz，H-7），6.27（1H，d，J = 15.9 Hz，H-8），6.70（1H，d，J = 2.1 Hz，H-2'），6.68（1H，d，J = 8.2 Hz，H-5'），6.57（1H，dd，J = 8.1，2.1 Hz，H-6'），2.80（2H，m，H-7'），3.92（1H，m，H-8'），3.72（1H，m，H-8'），4.38（1H，d，J = 7.9 Hz，H-1''），4.92（1H，m，H-4''），5.19（1H，m，H-1'''）。^{13}C-NMR（CD_3OD，151 MHz）δ：127.6（C-1），115.1（C-2），146.9（C-3），149.8（C-4），116.5（C-5），123.2（C-6），148.1（C-7），114.6（C-8），168.3（C-9），131.4（C-1'），117.1（C-2'），144.7（C-3'），146.2（C-4'），116.3（C-5'），121.2（C-6'），36.6（C-7'），72.4（C-8'），104.2（C-1''），76.2（C-2''），81.6（C-3''），70.6（C-4''），76.1（C-5''），62.4（C-6''），103.0（C-1'''），72.3（C-2'''），72.1（C-3'''），73.8（C-4'''），70.4（C-5'''），18.5（C-6'''）。根据以上数据，结合参考文献[4]，推测化合物为毛蕊花糖苷。

化合物 **2**：淡黄色粉末，mp134 ～ 135 ℃，易溶于甲醇、乙醇。^{1}H-NMR（CD_3OD，600 MHz）δ：7.04（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2），6.77（1H，d，J = 8.2 Hz，H-5），6.90（1H，dd，J = 8.2，2.1 Hz，H-5），7.57（1H，d，J = 15.9 Hz，H-7），6.30（1H，d，J = 15.8 Hz，H-8），6.68（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2'），6.64（1H，d，J = 8.0 Hz，H-5'），6.54（1H，dd，J = 8.0，2.1 Hz，H-6'），2.79（2H，m，H-7'），3.95（2H，s），3.71（1H，m，H-8'），3.95（1H，m，H-8'），4.34（1H，d，J = 8.0 Hz，H-1''），4.50（1H，dd，J = 11.9，2.1 Hz，H-6''），5.18（1H，d，J = 1.7 Hz，H-1'''），1.25（3H，d，J = 6.2 Hz，H-6'''）。^{13}C-NMR（CD_3OD，151 MHz）δ：127.7（C-1），115.0（C-2），146.8（C-3），149.6（C-4），116.5（C-5），123.2（C-6），147.3（C-7），114.8（C-8），169.1（C-9），131.4（C-1'），116.3（C-2'），144.7（C-3'），146.1（C-4'），117.1（C-5'），121.3（C-6'），36.7（C-7'），72.4（C-8'），104.4（C-1''），75.4（C-2''），83.9（C-3''），70.0（C-4''），75.7（C-5''），64.6（C-6''），102.7（C-1'''），72.4（C-2'''），72.2（C-3'''），74.0（C-4'''），70.4（C-5'''），17.9（C-6'''）。根据以上数据，结合参考文献[4]，推测化合物为异毛蕊花糖苷。

2.11　*熟地黄 FrC5-1 部位中化学成分的△OD 值与对 NSCs 增殖的影响*

毛蕊花糖苷（25、12.5、6.4、3.2、1.6 μg•mL^{-1}），异毛蕊花糖苷（25、12.5、6.4 μg • mL^{-1}）组的△*OD* 值与对照组相比差异有统计学意义（P < 0.05）。依据公式 2 对增殖率进行计算，结果见图 9。与对照组相比，毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷均具有促 NSCs 增殖的作用，毛蕊花糖苷（12.5 μg • mL^{-1}）促 NSCs 增殖作用可达 65.04%，异毛蕊花糖苷（25 μg•mL^{-1}）促 NSCs 增殖作用可达 35.86%。

3　讨论

NSCs 存在于脑中，对神经系统的发育、再生和修复至关重要[5]，是神经系统中最原始未分化的细胞，可以产生中枢神经系统和周围神经系统中特异性的细胞，具有很强的自我更新能力，能够分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的子代细胞[6]。NSCs 减少，会增加患阿尔茨

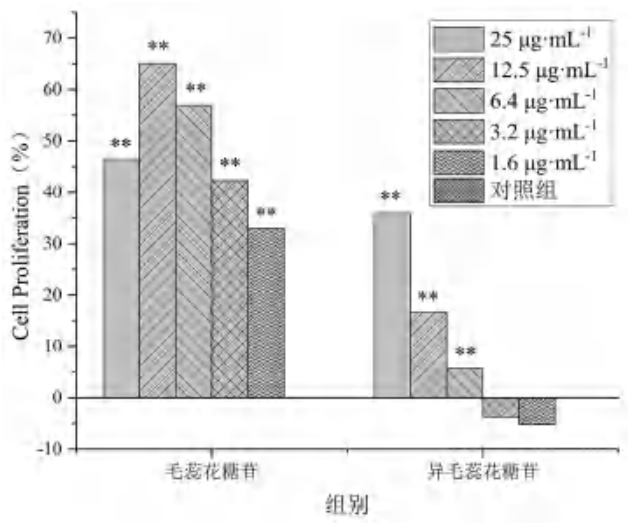

图 9　熟地黄 FrC5-1 分离所得各化合物对 NSCs 增殖率的影响

Fig 9　Effect of various compounds obtained from FrC5-1 from Radix Rehmanniae Praeparata on the proliferation rate of NSCs

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

海默病（Alzheimer’s disease，AD）、帕金森病（Parkinson’s disease，PD）等神经退行性疾病的风险。目前尚未见临床上关于促进 NSCs 增殖的药物的报道。因此，寻找适宜的促进 NSCs 增殖的药物是治疗神经退行性疾病的关键。《中西汇通医经精义》云“肾系贯脊，通于脊髓，肾精足，则入脊化髓上循入脑而为脑髓，是髓者精气之所会也”[7]。可见，肾与脑相关联，可以通过补肾的方式填充脑髓，从而达到促进 NSCs 增殖的作用。

熟地黄甘，微温，归肝、肾经，具有补血滋阴、益精填髓的功效，滋补肝肾之阴作用强，尤以滋肾见长[8]。因此，认为熟地黄在促进 NSCs 增殖方面有较大的研究价值。

本实验采用活性追踪法筛选熟地黄中促 NSCs 增殖的成分，以 CCK-8 法寻找熟地黄中促 NSCs 增殖的活性成分。结果表明，熟地黄醇沉后水部位增殖活性最为显著，分别采用大孔树脂、硅胶、聚酰胺进一步分离并比较活性，获得活性较强的 FrC5-1 部位，分离后得到 2 个化合物，分别是毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷，两者均有促 NSCs 增殖的活性。结果表明毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷可能是熟地黄体外细胞实验中促进 NSCs 增殖的活性成分，课题组后续将进行体内整体实验等以深入探究熟地黄中通过其他途径发挥作用的活性成分。研究表明，毛蕊花糖苷对中枢神经系统疾病具有治疗作用[9]，其促进 NSCs 增殖的作用机制可能与化合物激活 Akt 通路有关[10]。异毛蕊花糖苷可改善肾损伤并具有神经保护作用[11-12]，其对于 NSCs 增殖作用尚未见有关报道。

研究过程中发现熟地黄多个分离部位均具有促进 NSCs 增殖的作用，本研究针对增殖作用最高的部位进行活性研究，其余有增殖活性的部位有待于进一步研究。除此之外，后续可进一步进行整体动物实验并研究其作用机制，为临床用药的理论依据奠定基础。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：130.
[2] 王瀚泽 . 菟丝子促神经干细胞增殖的活性成分研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2021.
[3] 高健，白华静，万凤，等 . 人参皂苷对缺氧缺糖 / 再灌注神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中华中医药杂志，2017，32（5）：2291-2297.
[4] 李孟 . 生地黄化学成分研究 [D]. 郑州：河南中医学院，2015.
[5] 曾琳，陆彦邑，严博文，等 . 神经干细胞再激活及其应用的研究进展 [J]. 中国临床神经科学，2023，31（4）：459-463，475.
[6] Zhao X，Moore DL. Neural stem cells：developmental mechanisms and disease modeling [J]. Cell Tissue Res，2018，371（1）：1-6.
[7] 唐宗海 . 中西汇同医经精义 [M]. 太原：山西科学技术出版社，2013：68.
[8] 明·张介宾 . 景岳全书 [M]. 北京：中国中医药出版社，1994：635-638.
[9] 谢良骐，柴智，弓强，等 . 毛蕊花糖苷对中枢神经系统的作用及其机制研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊 . https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20231019.1718.006.
[10] 林慧敏，段伟兵，邵瑞，等 . 毛蕊花糖苷通过激活 PI3K/AKT 通路促进成年小鼠神经干细胞增殖 [J]. 中国药理学通报，2016，32（6）：836-840.
[11] 徐万爱，杨丹阳，吴静雨，等 . 肉苁蓉的主要化学成分及生物活性研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊 . https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20231108.1638.004.
[12] 张伟，许双旺，吴德玲，等 . 醉鱼草果实水部位化学成分及神经保护活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，2019，31（8）：1397-1401.

（收稿日期：2023-11-29；修回日期：2024-02-25）

cGAMP 通过激活 PI3K-AKT 通路减轻小鼠脑缺血恢复期的损伤

李新宇[1]，郭羽晨[2]，李铁军[1*]（1. 上海大学医学院，上海　200444；2. 上海市浦东新区浦南医院，上海　200125）

摘要：目的　研究 cGAMP 对小鼠脑缺血恢复期的影响及初步作用机制。**方法**　采用线栓法制备小鼠大脑中动脉闭塞（MCAO）模型，通过行为学评分和组织病理染色观察 cGAMP 对 MCAO 小鼠恢复期的影响。激光散斑仪器观察 cGAMP 对 MCAO 小鼠恢复期的脑血流量的影响，使用苏木精 - 伊红染色（HE）和尼氏染色（NISSL）观察 cGAMP 对 MCAO 小鼠大脑皮层神经元的影响，使用实时荧光定量聚合酶链反应（PCR）检测小鼠大脑皮层中肿瘤坏死因子 α（TNF-α）和精氨酸酶 1（Arg-1）的表达，使用蛋白免疫印迹法（Western blot）检测小鼠大脑皮层中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的表达。**结果**　行为学观察结果显示，与模型组相比，缺血期的 MCAO 小鼠经 cGAMP 处理后，行为学评分降低，在提尾测试、平衡木试验和前肢抓地力牵引测试中，其运动功能均显著恢复。HE、NISSL 染色中，cGAMP 可减轻脑缺血恢复期小鼠神经元损伤。PCR 结果表明 cGAMP 处理可以降低脑缺血恢复期小鼠脑组织 TNF-α 的表达，升高 Arg-1 的表达。在 Western blot 结果中，cGAMP 处理能够显著促进 PI3K、AKT 的磷酸化（$P < 0.05$）。**结论**　cGAMP 能明显改善脑缺血恢复期小鼠运动功能，可能是通过激活 PI3K-AKT 通路减轻小鼠脑缺血恢复期的神经元损伤发挥治疗作用。

关键词：cGAMP；脑缺血再灌注；恢复期；PI3K-AKT 通路；神经损伤
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1207-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.015

cGAMP reduces neuronal damage in the mouse cerebral ischemic recovery phase by activating the PI3K-AKT pathway

LI Xin-yu[1], GUO Yu-chen[2], LI Tie-jun[1*] (1. *School of Medicine*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444; 2. *Punan Hospital*, *Pudong New District*, *Shanghai* 200125)

Abstract: Objective　To determine the effect of cGAMP on the cerebral ischemia recovery phase in mice and its preliminary mechanism. **Methods**　The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established in mice with the suture method. The effect of cGAMP on the cerebral ischemia recovery phase of MCAO mice was evaluated with behavioral scoring and histopathological staining. Laser speckle instrument was used to observe the effect of cGAMP on the cerebral blood flow in MCAO model during the ischemic phase. The effect of cGAMP on the cortical neurons in MCAO mice was observed with hematoxylin-eosin (HE) and NISSL staining. The expressions of tumor necrosis factor α (TNF-α) and arginase-1 (Arg-1) in the cerebral cortex of mice were detected with real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR), and the expressions of PI3K, p-PI3K, AKT, and p-AKT were detected with Western blot. **Results**　Behavioral observations showed that as compared with the model group, cGAMP-treated MCAO mice during the ischemic phase displayed reduced behavioral scores and significant recovery in elevated body swing test, balance beam test, and forelimb grip traction test, indicating improved motor function. HE and NISSL staining showed that cGAMP alleviated neuronal damage in mice during the cerebral ischemia recovery phase. PCR demonstrated that cGAMP treatment reduced the expression of TNF-α in the brain tissue of mice

基金项目：上海市浦东新区科技发展基金民生科研专项资金（医疗卫生）项目（No. PKJ2022-Y35）。
作者简介：李新宇，男，硕士研究生，主要从事心脑血管药物作用机制研究，email：lxy02130225@163.com　*通信作者：李铁军，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事心脑血管药物作用机制研究，email：ltj204@163.com

during the cerebral ischemia recovery phase while increased the expression of Arg-1. Western blot showed that cGAMP treatment greatly promoted the phosphorylation of PI3K and AKT ($P < 0.05$). **Conclusion** cGAMP significantly improves the motor function in mice during the cerebral ischemia recovery phase, and its therapeutic effect may be attributed to the activation of the PI3K-AKT pathway to alleviate neuronal damage during the cerebral ischemia recovery phase.

Key words: cGAMP; cerebral ischemia-reperfusion; recovery phase; PI3K-AKT; neuronal damage

缺血性中风（脑缺血）是全球范围内致死和致残的主要原因之一。根据世界卫生组织的数据，发达国家中风病例中 80% 以上是由脑缺血引起的[1]。脑缺血恢复期是指脑组织在缺血和再灌注后的修复过程[2]。脑缺血恢复期神经元损伤的严重程度取决于缺氧和再灌注的时间和程度，以及导致缺血的血管形态和位置等多种因素。神经元损伤可能会影响大脑的功能和认知能力，包括记忆、注意力、学习和行为等方面[3]。尽管目前存在一些药物和治疗方法用于脑缺血恢复期，但其疗效并不理想，而且常常伴随着明显的不良反应。因此，迫切需要进一步探索新的治疗药物，并研究其作用机制。

cGAS/STING 通路是一种在细胞内参与免疫反应的信号传导通路，与体内炎症反应息息相关，最近研究表明该通路在脑缺血中也发挥了重要作用[4]。脑缺血再灌注损伤会导致脑细胞死亡和释放细胞内的 DNA，这些 DNA 片段的释放会被细胞内的 cGAS 识别并激活 STING 通路。随后，STING 激活 IRF3、NF-κB 和 STAT6 等信号通路，从而促进产生炎症介质和免疫反应，并引发细胞凋亡[5]。cGAMP 在 cGAS/STING 通路中充当第二信号分子，通过与 STING 受体结合，进一步放大炎症反应并导致神经元细胞损伤。研究发现，抑制 cGAS 和 STING 的功能可以减轻缺血性中风（脑缺血恢复期）引起的损伤，并促进缺血后的恢复[6]。

然而，有研究表明，cGAMP 可能对脑具有潜在的保护作用。例如，它可以调节免疫系统功能，并有助于清除大脑中β-淀粉样蛋白（Aβ）的积聚，从而减少阿尔茨海默病（AD）的进展[7]。这提示 cGAMP 可能对缺血性中风起到保护作用，为探索新的治疗途径提供了希望。本研究通过 MCAO 小鼠模型研究 cGAMP 对脑缺血恢复期的影响，并阐明其潜在机制，现报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠，体重 20 ～ 25 g，SPF 级 [江苏华创信诺医药科技有限公司，许可证编号：SCXK（苏）2020-0002]。实验前一周，动物被安置在上海大学医学院的动物设施中，在受控条件下（温度：22 ～ 25 ℃，相对湿度：约 70%），随意获得标准饮食和水。动物以 12 h 的光 / 暗周期饲养（8：00 开灯，20：00 关灯）。所有动物实验均经上海大学医学院伦理委员会批准，符合动物研究伦理要求（批件号：ECSHU 2023-008）。

1.2 试药

cGAMP（杭州新高生物技术有限公司）；p-PI3K 抗体（Zenbio）；PI3K 抗体、AKT 抗体、p-AKT 抗体、β-ACTIN 抗体（Proteintech）；小鼠抗 -IgG 抗体（Cell Signaling）和小鼠抗 -Ig 抗体（Abcam）。

2 方法

2.1 模型制备及分组与给药

适应性喂养一周后，将体重相似的小鼠随机分组：假手术组、模型组、依达拉奉组、cGAMP 低剂量组和 cGAMP 高组剂量，每组 8 只。根据文献方法[8]建立小鼠局灶性脑缺血再灌注模型。腹腔注射 2% 戊巴比妥麻醉小鼠，对颈总动脉（CCA）、颈外动脉（ECA）和颈内动脉（ICA）进行钝性分离，结扎 ECA，在结扎部位做一个小切口，并通过切口将栓线插入 ICA。当遇到轻微阻力时栓线至大脑中动脉处，将栓线固定。脑缺血 2 h 后，轻轻地抽出栓线以建立再灌注模型。假手术组解剖 CCA、ICA 和 ECA，但栓线不插入颅内，其余步骤与模型组的步骤一致。假手术组注射生理盐水（3 mL • kg^{-1}），阳性药依达拉奉组注射依达拉奉 6 mg • kg^{-1}，cGAMP 低、高剂量组分别注射 cGAMP 1 mg • kg^{-1} 和 3 mg • kg^{-1}。再灌注后即刻静脉注射给药，后每日同剂量静脉给药 1 次，连续 7 d。模型组给予生理盐水。给药结束后进行相关实验。

2.2 脑血流量监测

将给药完毕后的小鼠麻醉，固定在激光散斑仪（RWD，RFLSI III）的测量平台上，剪开小鼠头皮，完全暴露颅骨。调节激光散斑仪的参数，启动激光散斑仪，拍照并记录血流图。

2.3 行为学评分

Longa 评分系统用于评估小鼠神经系统缺陷：0 分表示没有症状；1 分表示当尾巴抬起时对侧前

肢无法伸展；2 个点表示向同侧盘旋；3 分表示下降到对侧；4 分表示丧失意识或不能自主行走。

2.4　提尾测试

提尾测试旨在评价小鼠中枢神经系统功能的受损程度。把小鼠尾巴抬高到桌面上方 3 cm 的高度，并记录其身体摆动的方向。重复 10 次，并计算左右摆动的比率。向右摆动（%）=（身体向左摆动的次数 / 身体向右摆动的次数）×100%。

2.5　平衡木试验

平衡木试验旨在评估小鼠运动感觉反射（尤其是后肢）、肌肉力量和协调性。参照文献方法 [8]，测试前每只小鼠都经过训练，成功地从一端穿过平衡木到达另一端，到达安全平台。评分标准见表 1。分数越高表示神经损伤越严重。每只小鼠重复 3 次测试。

表 1　平衡木测试的评分标准

Tab 1　Scoring standards for balance beam test

评分 / 分	标准
0	小鼠成功穿越平衡木，没有任何滑动
1	小鼠成功穿过平衡木，但一只前肢在受伤一侧滑动一次（能够抓住平衡木）
2	小鼠成功穿过平衡木，但一只前肢在受伤一侧“不止一次但不超过到横杆距离的 50%”（能够抓住平衡木，但是一只爪子打滑）
3	小鼠成功穿过平衡木，但一只前肢在受伤一侧滑动“距离横杆 50% 以上”（能够抓住平衡木，但是两只爪子在平衡木上滑动或旋转超过 60 s）
4	小鼠试图穿过平衡木但失败（试图停留在平衡木上但在 40 s 内摔倒）
5	小鼠可以在平衡木上保持平衡而不移动（试图停留在平衡木，但在 20 s 内摔倒）
6	小鼠无法停留在平衡木上（试图停留在平衡梁上，但在 20 s 内摔倒）

2.6　前肢抓地力牵引测试

前肢抓地力牵引测试旨在评估每只小鼠挂在水平绳索上的能力。绳索的直径为 0.5 cm，并放置在泡沫垫上方 45 cm 处。每只小鼠都可以用前肢抓住绳子。记录小鼠悬挂时间，最长为 10 s。落地时间即为小鼠抓绳时间。

2.7　HE 染色

将小鼠麻醉后取脑，固定。随后，酒精脱水，清除脑组织。然后，石蜡浸润，将脑组织放置在切片机上，获得厚度约为 5 μm 的连续切片。脱蜡和再水化后，切片进行苏木精和伊红染色。染色后，在显微镜下观察切片，进行组织学分析。

2.8　NISSL 染色

将小鼠麻醉后取脑，固定。将大脑切成厚度为 5 μm 的切片，并将这些切片浸入固定液中。固定后，切片用 NISSL 染色。染色后，将切片清洗、脱水、清除，安装在显微镜载玻片上。显微镜下分析细胞结构和组织特征。

2.9　实时荧光定量聚合酶链反应（PCR）

将小鼠麻醉后取脑。RNA 提取，使用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录完成后，使用 SYBR 实时荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增，将反应混合物加入 PCR 机器中，分析实时荧光信号数据，计算样品中靶 RNA 的相对丰度。最后，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 RNA 的相对表达水平并进行统计分析。引物序列见表 2。

表 2　引物序列

Tab 2　Primer sequence

基因	引物序列
β-ACTIN	Forward：GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	Reverse：CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
TNF-α	Forward：CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	Reverse：GCTACGACGTGGGCTACAG
Arg-1	Forward：CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG
	Reverse：AGGAGCTGTCATTAGGGACATC

2.10　免疫蛋白印迹分析

将小鼠麻醉后取脑。组织蛋白裂解，BCA 测定蛋白质浓度。加样，SDS-PAGE 分离，转移至 PVDF，封闭，孵育 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、*β*-ACTIN 的一级抗体，4 ℃下过夜。随后，将膜与山羊抗小鼠 / 山羊抗兔二级抗体在室温下孵育 2 h，ECL 化学发光成像系统进行检测。靶蛋白相对表达＝磷酸化靶蛋白带强度 / 靶蛋白带强度。

2.11　统计分析

采用 SPSS 21.0 软件对所得数据进行统计学分析。样本数据为计量资料，使用 mean±SD 表示。采用单因素方差分析（One-way ANOVA）进行组间比较，并以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　cGAMP 对缺血期 MCAO 小鼠神经运动功能和缺血区脑血流量的影响

使用多种行为测试评估神经运动功能。Longa 行为评分中，接受依达拉奉或 cGAMP 治疗的小鼠评分明显低于模型组。在提尾测试中，接受依达拉奉或 cGAMP 治疗的小鼠向右摆动的比例与模型组比显著提高。在平衡木上行走时，接受依达拉奉或 cGAMP 治疗的小鼠打滑次数更少，与模型组相比评分更低，显示运动功能的恢复。前肢抓地力牵引测试中，接受依达拉奉或 cGAMP 治疗的小鼠与模型组相比有更长落地时间（见图 1）。这些结果提示 cGAMP 治疗有效地恢复了缺血期的 MCAO 小鼠的神经运动功能。

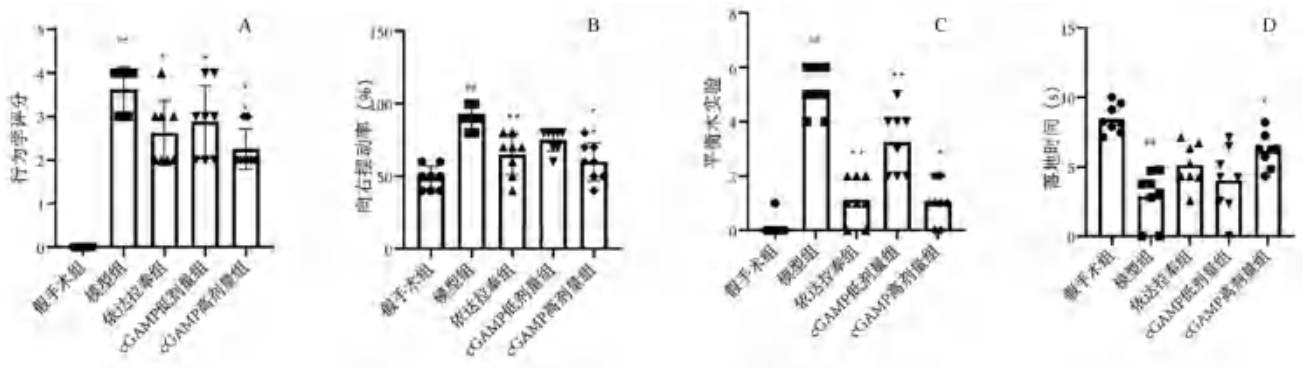

图 1 cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠神经功能评分和运动功能的影响

Fig 1 Effects of cGAMP on the neurofunctional score and motor function in mice during the cerebral ischemic recovery phase

注：与假手术组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

采用激光散斑系统研究了 cGAMP 对缺血期的 MCAO 小鼠模型中大脑血流的影响，结果显示，与模型组相比，cGAMP 治疗组缺血性区域的血流显著恢复（见图 2）。

3.2 cGAMP 对缺血期 MCAO 小鼠的皮层神经元损伤的影响

如图 3 所示，假手术组中脑部神经元的分布相对有序，细胞形态清晰，并且没有明显的损伤。模型组小鼠的神经元则显示出明显的结构紊乱和异常的神经元核形态。与模型组相比，cGAMP 和依达拉奉组缺血期的 MCAO 小鼠的皮层神经元呈现相对完整的细胞结构，细胞排列紧密有序。

进一步使用 NISSL 染色观察皮层神经元尼氏小体。结果显示，模型组的小鼠皮层神经元尼氏小体异常聚集，神经元形态异常，而 cGAMP 和依达拉奉组小鼠的皮层神经元尼氏小体的染色异常较少，神经元形态与假手术组类似，神经元核颗粒的分布更加均匀（见图 4）。

3.3 cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠脑组织炎症水平的影响

通过 PCR 分析，我们观察到给予 cGAMP 治疗的恢复期小鼠脑组织中炎症相关基因的表达水平显著降低。与模型组相比，cGAMP 治疗组小鼠中 *TNF-α* 明显地下调。此外，cGAMP 治疗还导致恢复期小鼠脑组织中 *Arg-1* 基因的表达水平显著升高（见图 5）。

3.4 cGAMP 通过激活 PI3K-AKT 途径对脑缺血恢复期小鼠的保护作用

PI3K-AKT 信号通路在细胞生存调控中起着关键作用，该通路的激活能够促进神经元细胞的存活，进而对脑缺血恢复期产生保护作用。实验结果显示，与模型组相比，cGAMP 处理能够显著激活 PI3K、AKT 的磷酸化（$P < 0.05$），表明 cGAMP 可能通过激活 PI3K-AKT 途径保护脑缺血（见图 6、7）。

4 讨论

脑缺血因其高死亡率和残疾率而成为全球健康问题，脑缺血恢复期的神经元损伤会影响神经元的功能和生存 [9-10]。在缺氧的环境中，神经元无法正常运作，逐渐受损甚至死亡 [11]。最近的研究表明，cGAS/STING 通路可能在脑缺血恢复期的发生和发展中发挥重要的调节作用 [12-13]。研究发现，cGAS/STING 通路参与脑缺血恢复期炎症反应的调节，诱导炎性细胞因子和趋化因子的产生，并进一步加剧炎症反应 [14-15]。同时，cGAS/STING 通路的激活也可能通过调节免疫细胞的激活和迁移来介导炎症反应，加重脑组织损伤 [16]。然而，关于 cGAS/STING 通路在脑缺血恢复期中的具体作用仍存在争议。

本课题组使用 MCAO 小鼠模型来研究 cGAMP 在脑缺血恢复期中的作用。结果表明，cGAMP 具有显著的神经保护作用，显著减少了缺血期的 MCAO 小鼠的梗死面积，恢复了缺血区的脑血流量，改善了小鼠的运动功能，抑制了炎症反应。

在脑缺血恢复期，PI3K-AKT 通路的激活可以促进细胞存活、轴突再生和神经功能的恢复。PI3K-AKT 通路的激活可以增强神经细胞的生存信号，抑制细胞凋亡，抑制炎症反应，促进受损神经元的存活和恢复。此外，PI3K-AKT 通路的激活还可促进神经元轴突的再生和神经突触的重建，有助于恢复受损的神经回路功能。因此，当 PI3K-AKT 通路在脑缺血恢复期中被抑制时，会阻碍神经保护和修复过程。这可能会导致细胞死亡增加、轴突再生受限以及神经功能恢复缓慢 [17]。本研究结果表明，cGAMP 可以抑制 TNF-*α* 的表达。TNF-*α* 是一种炎症介质，过度表达会加剧炎症反应和细胞损伤。通过减少 TNF-*α* 的表达，cGAMP 可以减轻

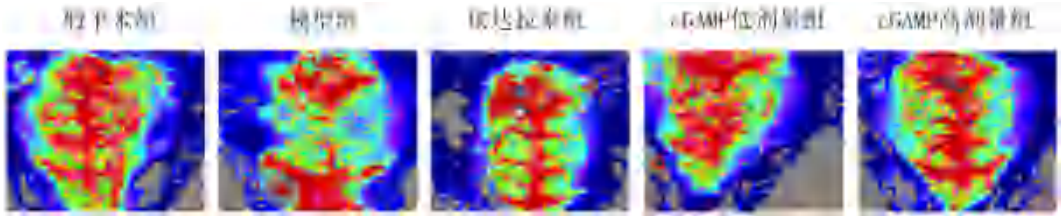

图 2　cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠脑血流量的影响

Fig 2　Effect of cGAMP on cerebral blood flow in mice during the cerebral ischemic recovery phase

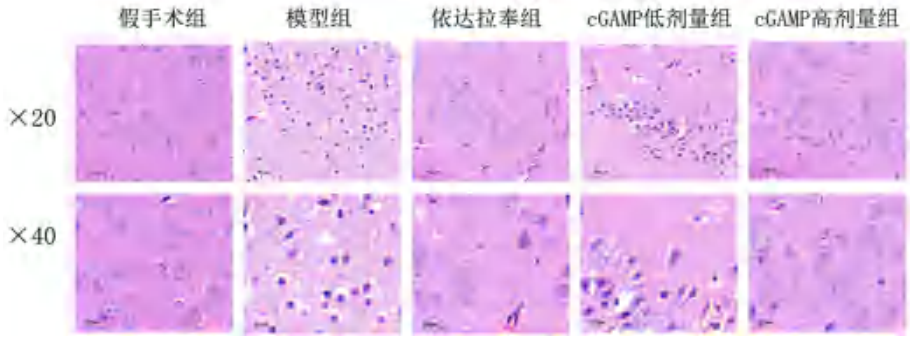

图 3　cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠大脑皮层神经元的影响

Fig 3　Effect of cGAMP on cortical neurons in the cerebral ischemic recovery phase of mouse cerebral cortex

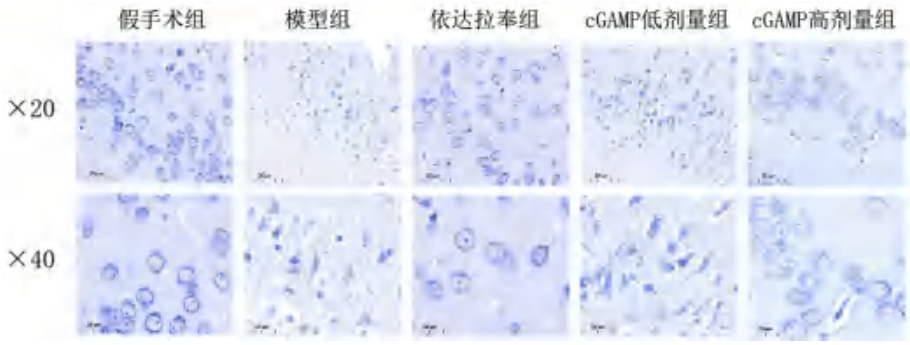

图 4　cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠大脑皮层尼氏小体的影响

Fig 4　Effect of cGAMP on NISSL bodies in the cerebral ischemic recovery phase of mouse cerebral cortex

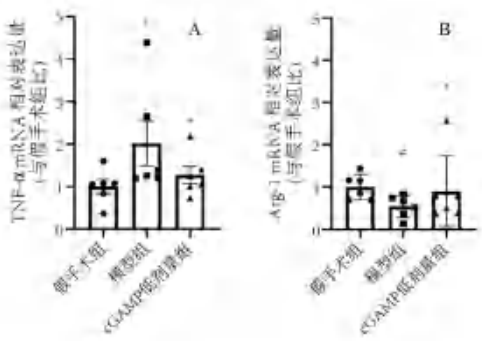

图 5　cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠脑组织炎症因子的影响

Fig 5　Effect of cGAMP on inflammatory factors in the brain tissue of mice during the cerebral ischemic recovery phase

注：与假手术组相比，$^{\#}P < 0.05$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$。

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

炎症反应和细胞损伤。同时，cGAMP 的处理还可以上调 Arg-1 的表达。Arg-1 是一种抗炎酶，可以抑制炎症反应并促进组织修复。通过上调 Arg-1 的

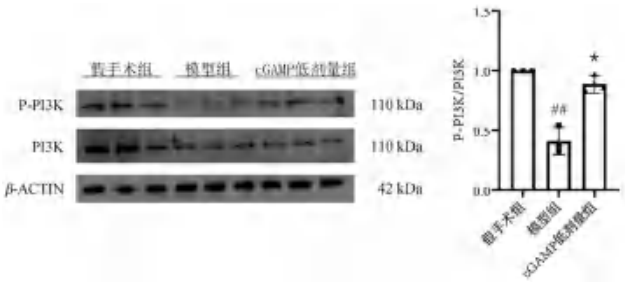

图 6　cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠大脑皮层 PI3K 和 P-PI3K 蛋白表达的影响

Fig 6　Effect of cGAMP on the protein expression of PI3K and P-PI3K in the cerebral cortex of mice during the cerebral ischemic recovery phase

注：与假手术组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{**}P < 0.01$。

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

表达，cGAMP 可以进一步减轻炎症反应和细胞损伤。因此推测 cGAMP 可能通过激活 PI3K-AKT 通路，抑制 TNF-α 的表达，上调 Arg-1 的表达，抑制炎症，从而保护缺血期的 MCAO 小鼠。

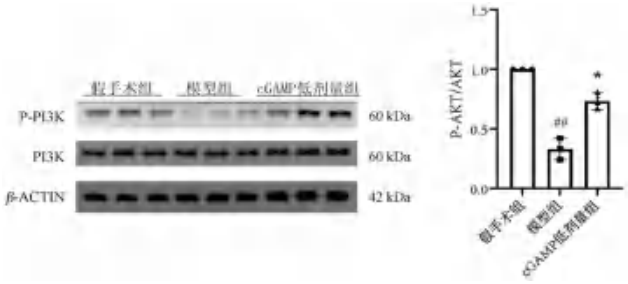

图 7 cGAMP 对脑缺血恢复期小鼠大脑皮层 AKT 和 P-AKT 蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of cGAMP on the protein expression of AKT and P-AKT in the cerebral cortex of mice during the cerebral ischemic recovery phase

注：与假手术组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{**}P < 0.01$。

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

综上，本研究发现 cGAMP 可以促进小鼠的神经运动功能恢复，恢复缺血区脑血流，对脑缺血恢复期还表现出神经保护作用，减轻了脑缺血引起的神经元损伤，提示 cGAMP 可能通过调节免疫反应和神经再生过程，对脑缺血恢复期具有积极的影响。鉴于 cGAMP 在实验模型中的有效性，推测 cGAMP 可能具有治疗脑缺血恢复期的潜在应用潜力。然而，本研究只是对治疗机制进行了初步探索，具体作用机制还需要进一步探究。

参考文献

[1] Zhao YF，Zhang XJ，Chen XY，et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke：from mechanisms to treatment（review）[J]. Int J Mol Med，2022，49（2）：15.

[2] Zhou HY，Yang J，Srinath C，et al. Improved cardiac function in postischemic rats using an optimized cardiac reprogramming cocktail delivered in a single novel adeno-associated virus [J]. Circulation，2023，148（14）：1099-1112.

[3] Li ZX，Wang HY，Xiao GX，et al. Recovery of post-stroke cognitive and motor deficiencies by Shuxuening injection via regulating hippocampal BDNF-mediated Neurotrophin/Trk signaling [J]. Biomed Pharmacother，2021，141：1118-1128.

[4] Hopfner KP，Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2020，21（9）：501-521.

[5] Sun SB，Lv W，Li SN，et al. Smart liposomal nanocarrier enhanced the treatment of ischemic stroke through neutrophil extracellular traps and cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase-stimulator of interferon genes（cGAS-STING）pathway inhibition of ischemic penumbra [J]. ACS Nano，2023，17（18）：17845-17857.

[6] Decout A，Katz JD，Venkatraman S，et al. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Immunol，202，21（9）：548-569.

[7] Xu QM，Xu W，Cheng H，et al. Efficacy and mechanism of cGAMP to suppress Alzheimer's disease by elevating TREM2 [J]. Brain Behav Immun，2019，81：495-508.

[8] Zeng L，Hu SQ，Zeng LC，et al. Animal models of ischemic stroke with different forms of middle cerebral artery occlusion [J]. Brain Sci，2023，13（7）：1007.

[9] 张忠立，李淑琪，左月明 . 栀子花舒心胶囊、酸橙花舒畅胶囊和酸橙栀子双花抗脑衰胶囊对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的保护作用 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1309-1315.

[10] 甄霞，吴秀娟，林富源 . 蛋白酶激活受体 -3 在大鼠体内外脑缺血模型中的作用研究 [J]. 中南药学，2017，15（6）：780-785.

[11] 陈璐，姚宇晴，李德坤，等 . 注射用丹参多酚酸对脑缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用 [J]. 药物评价研究，2023，46（3）：559-564

[12] 董娜娜，陈晓兰，邓铋莉，等 . 基于偏最小二乘法分析猪牙皂不同组分对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（2）：141-146.

[13] Li BY，Wang W，Li YN，et al. cGAS-STING pathway aggravates early cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by activating NCOA4-mediated ferritinophagy [J]. Exp Neurol，2023，359：1142-1169.

[14] Gamdzyk M，Doycheva DM，Araujo C，et al. cGAS/STING pathway activation contributes to delayed neurodegeneration in neonatal hypoxia-ischemia rat model：possible involvement of LINE-1 [J]. Mol Neurobiol，2020，57（6）：2600-2619.

[15] Shi JJ，Yang Y，Yin N，et al. Engineering CXCL12 biomimetic decoy-integrated versatile immunosuppressive nanoparticle for ischemic stroke therapy with management of overactivated brain immune microenvironment [J]. Small Methods，2022，6（1）：e2101158.

[16] Jiang GL，Yang XL，Zhou HJ，et al. cGAS knockdown promotes microglial M2 polarization to alleviate neuroinflammation by inhibiting cGAS-STING signaling pathway in cerebral ischemic stroke [J]. Brain Res Bull，2021，171：183-195.

[17] Li RQ，Zheng YY，Zhang JX，et al. Gomisin N attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of autophagy by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Phytomedicine，2023，110：154644.

（收稿日期：2023-11-09；修回日期：2023-12-29）

基于“药辅合一”的辛夷油亚微乳的制备及评价

孟扬[1, 2, 3]，徐丽芝[2, 3, 4]，王欣茹[1, 2, 3]，冯向阳[1, 2, 3]，刘彤[7]，叶田田[1, 5*]，杨瑞[6*]，王淑君[5*]（1. 江西中医药大学药学院，南昌　330004；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. 安徽中医药大学药学院，合肥　230012；5. 沈阳药科大学，沈阳　110016；6. 辽宁中医药大学附属第二医院，沈阳　110034；7. 辽宁省药品检验检测院，沈阳　110032）

摘要：目的　基于“药辅合一”理念优化辛夷油亚微乳的处方与制备工艺，并对其进行表征和体外释放动力学研究。**方法**　以离心稳定性常数 K_e、粒径、ζ电位的综合评分为指标，采用 Box-Behnken 效应面法优化辛夷油亚微乳处方工艺，透析法研究其体外释放桉油精的情况。**结果**　辛夷油亚微乳的最优处方：辛夷油 5%、大豆磷脂 1.2%、泊洛沙姆 188 1.8%、油酸 1.3%，最佳制备工艺条件：乳化时间 10 min，乳化温度 60 ℃，超声时间 10 min。辛夷油亚微乳的桉油精含量为（2.43±0.04）mg·mL^{-1}，粒径为（156.93±1.53）nm，多分散指数（PDI）为（0.16±0.02），ζ电位为（－24.87±1.67）mV，体外释放符合一级动力学方程特征，释放机制为 Fick 扩散。**结论**　成功制备辛夷油亚微乳并优化了处方工艺，所得制剂的稳定性良好，并且具有缓释作用。

关键词：辛夷油；药辅合一；响应面法；亚微乳；体外释药
中图分类号：R944，R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1213-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.016

Preparation and evaluation of *Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsion based on the unification of drugs and excipients

MENG Yang[1, 2, 3], XU Li-zhi[2, 3, 4], WANG Xin-ru[1, 2, 3], FENG Xiang-yang[1, 2, 3], LIU Tong[7], YE Tian-tian[1, 5*], YANG Rui[6*], WANG Shu-jun[5*] (1. *School of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226133; 3. *Jiangsu Aidinami Biopharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226100; 4. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 5. *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 6. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110034; 7. *Liaoning Institute for Drug Control*, *Shenyang* 110032)

Abstract: Objective　To optimize the prescription and preparation of *Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsion based on unification of drugs and excipients, characterize its preparation and determine the vitro release kinetics. **Methods**　Box-Behnken response surface method was used to optimize the formulation and process variables of *Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsion using the comprehensive score of K_e, particle size, and zeta potential as indexes. The dialysis method was used to determine the in vitro release of eucalyptol. **Results**　The optimal formulation of *Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsion was as follows: 5% *Magnolia Flos* oil, 1.2% soybean lecithin, 1.8% poloxamer 188, and 1.3% oleic acid. The optimal preparation conditions: emulsification for 10 min, at 60 ℃ , ultrasonic time of 10 min. The content of eucalyptol in the *Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsion was (2.43±0.04) mg·mL^{-1}, mean particle size was (156.93±1.53) nm, polymer dispersity index (PDI) was (0.16±0.02) and zeta potential was (－ 24.87±1.67) mV. The in vitro release study

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973494）。
作者简介：孟扬，女，在读硕士研究生，主要从事中药创新制剂研究，email：2450806304@qq.com　*通信作者：叶田田，女，博士，副教授，主要从事药剂学与工业药剂学研究，email：729587208@qq.com；杨瑞，女，研究员，主要从事药剂学及药物动力学研究，email：yang_rui1983@163.com；王淑君，女，教授，博士研究生导师，主要从事药物新剂型与药物动力学研究，email：1252116911@qq.com

exhibited the characteristics of the first-order kinetic equation, and the release mechanism was Fick diffusion. **Conclusion** *Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsion is successfully prepared and the formulation is optimized. The preparation has good stability and sustained release effect.

Key words: *Magnolia Flos* oil; unification of drug and excipient; response surface method; submicron emulsion; in vitro release

辛夷 *Magnolia Flos* 为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp.、玉兰 *Magnolia denudata* Desr. 或武当玉兰 *Magnolia sprengeri* Pamp. 的干燥花蕾 [1]。辛夷油（*Magnolia Flos* oil，MFO）为辛夷的有效成分之一，现代药理研究证明其具有抗炎 [2-3]、抗菌 [4-6]、抗过敏 [7-8]、抗氧化 [8] 和调节中枢神经系统 [9] 等作用，临床主要用于变应性鼻炎的治疗。

MFO 水溶解度低，易挥发，开发成适宜剂型则可有助于提高其稳定性。亚微乳作为一种新型的药物递送系统，可作为不稳定药物的载体，增加难溶性药物的溶解度和稳定性，促进药物持续释放 [10]。

“药辅合一”即“药之为辅”，充分利用处方中部分药物的理化性质和功能特性，辅助制剂成型与稳定，以减少辅料的用量 [11]。MFO 不仅具有广泛的药理活性，还具有良好的皮肤渗透性，可替代亚微乳中油相的应用，这一性质与“药辅合一”的理论相吻合。基于此，本研究拟将 MFO 作为油相和模型药物，制备鼻用辛夷油亚微乳（*Magnolia Flos* oil-loaded submicron emulsions，MFO-SME），优化其处方并表征所得制剂，为研发相关新剂型和扩大辛夷油的应用范围提供参考。

1 材料

1.1 试药

桉油精对照品（批号：M94423，纯度＞ 99%，上海迈瑞尔有限公司）；MFO（批号：21091，江西海麟香料有限公司）；大豆磷脂（批号：579010，南京威尔药业集团股份有限公司）；泊洛沙姆 188（批号：GND17422B，巴斯夫中国有限公司）；油酸（批号：20210319）、氢氧化钠（批号：20220925）、甲醇（批号：20230706）（国药集团化学试剂有限公司）；甲醇为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.2 仪器

PX85ZH 型电子天平（奥豪斯仪器有限公司，精度：0.01 mg）；DF-101 型集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；FJ200-SH 型数显高速分散均质机（上海标本模型厂）；SCIENCETZ-E 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；ST3100 型实验室 pH 计（奥豪斯仪器有限公司）；NS-90Z 型纳米粒度及电位分析仪（珠海欧美克仪器有限公司）；UV-2550 型紫外分光光度计、GC-2030 型气相色谱仪（日本岛津公司）。

1.3 实验动物

普通级日本大耳白兔，体重 2.0 ～ 2.5 kg [辽宁长生生物技术股份有限公司，动物许可证号：SCXK（辽）2020-0001]。

2 方法与结果

2.1 MFO-SME 的制备

通过预实验确定本品的制备工艺：将处方量 MFO、大豆磷脂、油酸混合均匀作为油相，泊洛沙姆 188 溶于超纯水作为水相；油相、水相分别于水浴加热至 60 ℃，往油相中逐滴滴加水相，边滴加边搅拌，于超声细胞粉碎后制得初乳，加超纯水至 10 mL，调节 pH 值至 6.5，即得。

2.2 单因素考察评价指标

2.2.1 离心稳定性 乳剂的物理稳定性用离心稳定性系数（K_e）评价。准确移取离心前或离心后样品 100 μL，置于 10 mL 量瓶，超纯水稀释至刻度，转速 4000 r • min^{-1} 离心 15 min，测量样品在 500 nm 处的吸光度。K_e ＝（A_0 － A）/A_0，A_0 代表离心前的吸光度值，A 表示离心后的吸光度值，K_e 值越低，分散的油滴在离心力作用下上浮或下沉的现象越少，乳剂越稳定。

2.2.2 粒径和电位 取乳剂 100 μL 至 10 mL 量瓶中，加超纯水稀释至刻度，分别取 1 mL 测定其平均粒径、粒径分散系数（PDI）和 ζ 电位。亚微乳一般要求粒径分布越窄越好，即 PDI 越小越好。ζ 电位用来衡量颗粒之间的相互吸引力和排斥力的强度，绝对值越大表明制剂越稳定。

2.3 单因素考察

采用单因素实验分别考察乳化剂比例、乳化剂用量、稳定剂用量、载油量、乳化时间、乳化温度、超声时间对 MFO-SME 的稳定性的影响，结果见表 1。由表 1 可知，当大豆磷脂与泊洛沙

姆 188 比例为 2∶3，乳化剂用量为 3.0%，稳定剂用量为 1.0% 时，乳剂 K_e 值最小，且离心后未分层，制剂最稳定。在确定成分用量的基础上，还研究了不同百分比的载油量。结果表明，MFO 的最佳添加量为 5.0%。大豆磷脂在 60 ℃时发生相转化，乳化温度 60 ～ 80 ℃时均可制得相对稳定的亚微乳，考虑到 MFO 的挥发性，综合选择乳化时间 10 min，乳化温度 60 ℃，超声时间 8 min。

表 1　处方工艺的单因素考察

Tab 1　Single factor examination of prescription and preparation

考察项目	梯度设置	离心后性状	K_e	粒径 /nm	ζ 电位 /mV
大豆磷脂与泊洛沙姆 188 比例	3∶2	分层	0.039	129.62	− 14.93
	1∶1	分层	0.031	125.12	− 17.95
	2∶3	不分层	0.011	116.35	− 20.63
	1∶2	不分层	0.094	134.08	− 17.04
乳化剂用量 /%	1.0	分层	0.087	156.54	− 17.64
	2.0	不分层	0.050	126.72	− 14.10
	3.0	不分层	0.001	123.73	− 17.43
	4.0	分层	0.159	86.71	− 8.76
稳定剂用量 /%	0.2	分层	0.125	99.48	− 6.59
	0.5	不分层	0.114	105.63	− 12.47
	1.0	不分层	0.055	119.11	− 15.05
	2.0	分层	0.065	140.54	− 17.87
载油量 /%	3.0	不分层	0.066	108.37	− 20.37
	4.0	不分层	0.050	115.56	− 18.96
	5.0	不分层	0.015	139.58	− 17.46
	6.0	分层	0.121	152.02	− 14.34
乳化时间 /min	5	不分层	0.119	157.70	− 17.12
	10	不分层	0.139	138.28	− 16.53
	15	不分层	0.197	148.13	− 15.04
	20	不分层	0.112	138.12	− 15.27
乳化温度 /℃	50	分层	0.208	158.91	− 17.26
	60	不分层	0.225	159.60	− 18.25
	70	不分层	0.190	154.07	− 18.62
	80	不分层	0.206	145.73	− 17.23
超声时间 /min	2	分层	0.324	145.36	− 15.08
	5	不分层	0.189	147.18	− 15.14
	8	不分层	0.113	137.69	− 16.25
	11	不分层	0.232	142.40	− 15.71

2.4　处方工艺优化及验证

2.4.1　Box-Behnken 效应面法优化处方工艺　基于前期实验结果，选取影响乳剂稳定性较为显著的 3 个因素为考察对象，即乳化剂用量（X_1），稳定剂用量（X_2）和超声时间（X_3）。以乳剂的 K_e 值（Y_1）、粒径（Y_2）、ζ 电位（Y_3）的总评归一值（*OD*）为评价指标，采用 Box-Behnken 效应面法优化处方工艺，因素与水平见表 2。将上述评价指标采用 Hassan 方法 [12] 进行归一化处理得标准化值（d_i），并采用层次分析法构建判断矩阵并利用 SPSS PRO 软件计算得 Y_1、Y_2、Y_3 的权重系数分别为 0.45、0.27、0.28，最大特征根为 3.0，*CI* 为 0，因此 $CR = 0.0 < 0.1$，通过一次性检验，提示权重系数赋值合理 [13]，再按下式计算 *OD*：$OD = d_1 \times 0.45 + d_2 \times 0.27 + d_3 \times 0.28$，*OD* 越大，处方组成越理想。实验设计和结果见表 3。

表 2　Box-Behnken 效应面设计因素与水平

Tab 2　Factor and level for Box-Behnken design

水平	因素		
	X_1 /%	X_2 /%	X_3 /min
− 1	1.5	0.5	4
0	3	1	8
1	4.5	1.5	12

表 3　Box-Behnken 效应面设计和结果

Tab 3　Design and results for Box-Behnken design

序号	X_1/%	X_2/%	X_3/min	Y_1	Y_2/nm	Y_3/mV	*OD*
1	1.5	0.5	8	0.077	165.17	− 7.80	0.56
2	4.5	0.5	8	0.383	132.03	− 11.03	0.26
3	1.5	1.5	8	0.179	204.14	− 20.92	0.58
4	4.5	1.5	8	0.184	144.04	− 19.52	0.71
5	1.5	1	4	0.133	181.59	− 17.64	0.64
6	4.5	1	4	0.431	161.28	− 17.89	0.26
7	1.5	1	12	0.151	192.13	− 17.80	0.59
8	4.5	1	12	0.143	128.81	− 16.32	0.74
9	3	0.5	4	0.375	177.70	− 9.62	0.12
10	3	1.5	4	0.195	180.43	− 16.91	0.53
11	3	0.5	12	0.293	160.27	− 13.72	0.37
12	3	1.5	12	0.181	153.22	− 20.05	0.70
13	3	1	8	0.155	144.43	− 15.62	0.67
14	3	1	8	0.169	146.36	− 16.14	0.65
15	3	1	8	0.111	146.24	− 15.36	0.72
16	3	1	8	0.114	145.31	− 16.19	0.74
17	3	1	8	0.068	145.30	− 16.61	0.81

2.4.2　模型拟合　运用 Design-Expert 13.0.1 软件对实验结果进行拟合，得到各因素与综合评分之间的二次多元回归方程：$OD = 0.718 - 0.05X_1 + 0.15125X_2 + 0.10625X_3 + 0.1075X_1X_2 + 0.1325X_1X_3 - 0.02X_2X_3 - 0.0315X_1^2 - 0.159X_2^2 - 0.129X_3^2$。方差分析结果，模型 $P = 0.0004 < 0.001$，R^2 为 0.9598，失拟项 $P = 0.5534 > 0.05$，表明该模型拟合度和可信度良好。根据所拟合的方程，应用 Origin 10.0.5 软件绘制响应曲面图和等高线图，见图 1。

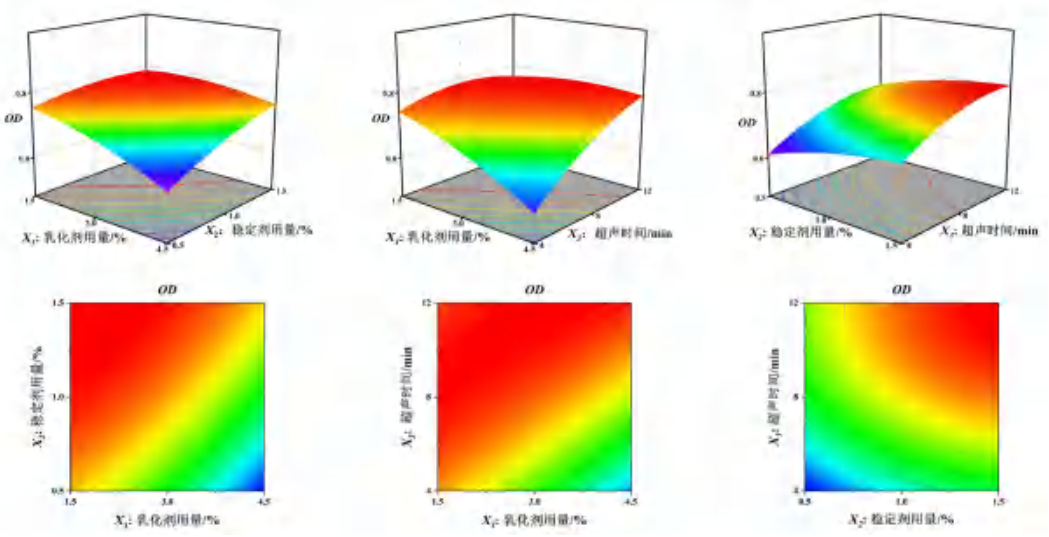

图 1　各因素的响应曲面图和等高线图

Fig 1　Response surface and contour plot of each factor

2.4.3　验证实验　Design-Expert 13.0.1 软件预测的最佳处方工艺条件为：乳化剂用量 3.0%，稳定剂用量 1.3%，超声时间 10 min，预测 *OD* 为 0.82。按“2.1”项下方法平行制备 3 组 MFO-SME，测定 K_e、粒径、ζ 电位，并计算 *OD* 值。结果见表 4，偏差结果显示该模型可靠。

表 4　最优处方验证结果 (n = 3)

Tab 4　Optimal prescription validation (n = 3)

批次	K_e	粒径 /nm	ζ 电位 /mV	平均 *OD*	*RSD* /%
1	0.170	155.42	− 26.13	0.81	− 1.3
2	0.153	157.21	− 23.24		
3	0.183	158.26	− 25.29		

2.5　MFO-SME 的质量评价

2.5.1　MFO-SME 的外观、类型和 pH　按照优化处方工艺制备的 MFO-SME，外观为均一的乳白色，如图 2。根据“相似相溶”原理，取等量 MFO-SME 于两个离心管中，分别加入等量甲基红和亚甲蓝，静置 1 h 后观察两种染料在乳液中的扩散情况。结果显示，加入亚甲蓝的亚微乳形成均匀蓝色，而加甲基红的亚微乳上层乳白色，底部红色沉淀，表明 MFO-SME 为 *O*/*W* 型亚微乳。鼻用制剂还须具有合适的 pH 值，乳液的 pH 值也会影响系统的稳定性，经测定，3 批 MFO-SME 的 pH 值为 6.47±0.21（n = 3）。

图 2　MFO-SME 的外观（A）和类型鉴别（B）

Fig 2　Appearance（A）and type identification（B）of MFO-SME

2.5.2　MFO-SME 的粒径、PDI 和 ζ 电位　将 MFO-SME 用超纯水稀释 50 倍，轻轻摇动混匀，在 25 ℃ 下测量其粒径、PDI 和 ζ 电位。如图 3 所示，MFO-SME 的平均粒径为（156.93±1.53）nm，PDI 为（0.16±0.02），平均 ζ 电位为（− 24.87±1.67）mV，结果表明 MFO-SME 满足亚微乳粒径要求，呈正态分布，粒径均匀且体系稳定。

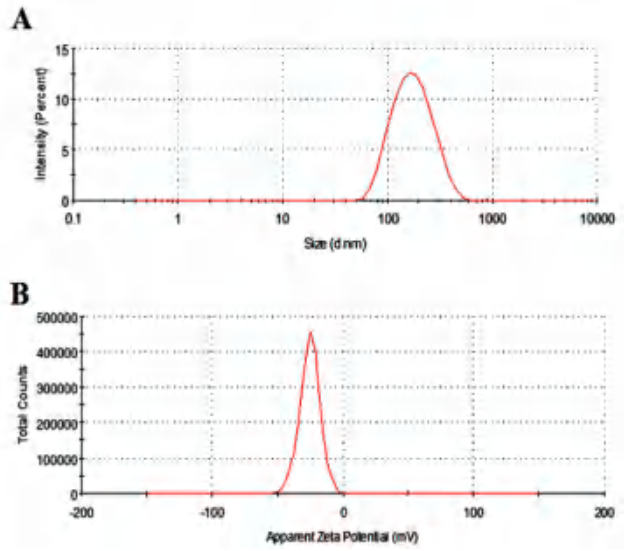

图 3　MFO-SME 的粒径分布（A）和 ζ 电位分布（B）

Fig 3　Particle size（A）and zeta potential distribution（B）of MFO-SME

2.5.3　稳定性考察　亚微乳属于热力学不稳定体系，容易发生分层、絮凝、转相或合并等变化，有必要对其进行稳定性考察。将 MFO-SME 分别置于不同转速（4000、15 000 r • min^{-1}），不同温度（4、25 ℃），不同稀释倍数（50、100 倍）下观察外观，测量粒径和 PDI，考察其稳定性，结果见表 5。综合考察，认为 MFO-SME 物理稳定性良好。

表 5　不同条件下 MFO-SME 稳定性

Tab 5　Stability of MFO-SME under different conditions

测试条件	外观变化	粒径 /nm	PDI
4000 r • min^{-1} 离心 15 min	无变化	156.28	0.13
15 000 r • min^{-1} 离心 15 min	轻微分层振摇后恢复	171.43	0.26
4 ℃保存 15 d	无变化	159.49	0.13
25 ℃保存 15 d	无变化	158.60	0.18
稀释 50 倍	无变化	157.33	0.16
稀释 100 倍	无变化	156.94	0.16

2.6　桉油精含量测定

2.6.1　色谱条件　ATPEG-20M（30 m×0.25 mm，0.25 μm）弹性石英毛细管柱；载气为高纯度氦气，流速 1.0 mL • min^{-1}；分流比 20∶1；温度 250 ℃；接口温度 250 ℃；升温程序：55 ℃保持 3 min，8 ℃ • min^{-1} 升至 80 ℃，6 ℃ • min^{-1} 升至 160 ℃保持 2 min，8 ℃ • min^{-1} 升至 200 ℃，3 ℃ • min^{-1} 升至 250 ℃保持 3 min；进样量 1.0 μL。

2.6.2　溶液的配制　① 取桉油精适量，加甲醇制成 1.524 mg • mL^{-1} 的对照品储备液，取 1.0 mL 用甲醇稀释 10 倍，滤过即得对照品溶液。② 精密量取 MFO-SME 500 μL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，滤过即得供试品溶液。③ 以甲醇作为空白对照溶液。④ 精密量取 500 μL 空白辅料溶液置 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过即得阴性对照溶液。

2.6.3　专属性考察　分别将空白对照溶液、阴性对照溶液、对照品溶液和供试品溶液进样测定，结果见图 4，桉油精在对照品溶液和供试品溶液中出峰位置一致。结果表明辅料对桉油精含量测定无影响，该方法专属性良好。

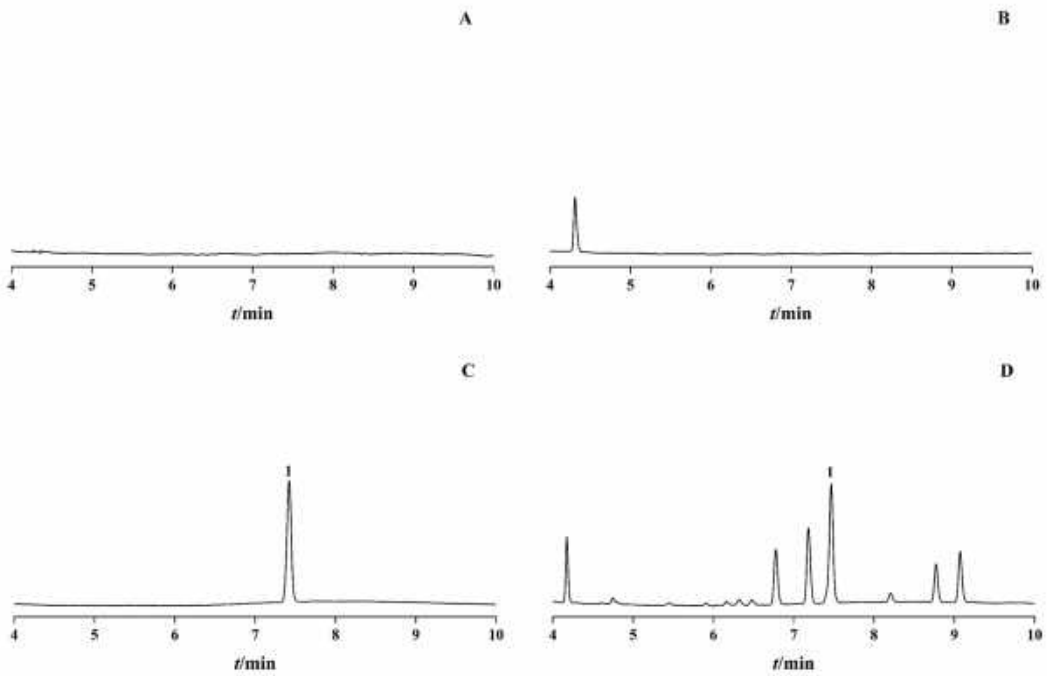

图 4　专属性色谱图

Fig 4　Specificity chromatogram

A. 空白对照溶液（blank control solution）；B. 阴性对照溶液（negative control solution）；C. 对照品溶液（reference substance solution）；D. 供试品溶液（test sample solution）；1. 桉油精（eucalyptol）

2.6.4　线性关系考察　取对照品溶液稀释成系列标准曲线对照品溶液，按“2.6.1”项下色谱条件依次进样，记录峰面积。分别以浓度和峰面积为横坐标（*X*）和纵坐标（*Y*）进行线性回归，得回归方程为 $Y = 382.34X - 3269.5$（$r = 0.9992$），表明桉油精在 76.20 ～ 228.60 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.6.5　精密度实验　取对照品溶液连续测定 6 次，记录色谱图并计算 *RSD* 值。结果保留时间 *RSD* 为 0.010%，峰面积 *RSD* 为 1.3%，表明仪器精密度良好。

2.6.6　重复性实验　取 MFO-SME，按照“2.6.2”项下方法平行配制 6 份供试品溶液，记录峰面积并计算含量。结果样品含量的 *RSD* 为 1.5%，表示方法重复性良好。

2.6.7　稳定性实验　将对照品溶液和供试品溶液放置在室温条件下，分别于 0、2、4、10、18、24 h 进样检测，记录峰面积并计算 *RSD*。结果对照品溶

液和供试品溶液在室温条件下放置 24 h，*RSD* 分别为 1.9% 和 1.7%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.8　加样回收实验　精密量取已知含量的供试品溶液 500 μL（约相当于桉油精 1.215 mg）9 份，分成 3 组，每组 3 份，各组分别加入 0.5、1.0、1.5 mL 对照品溶液，置 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，记录峰面积并计算加样回收率。结果 3 组样品的加样回收率均在 98% ～ 101%，*RSD* 分别为 1.8%、1.0%、1.3%，表明该方法准确度良好。

2.6.9　桉油精含量测定　按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液，滤过后取续滤液进样 3 次，记录桉油精峰面积，并计算桉油精的含量，结果测得桉油精含量为（2.43±0.04）mg • mL^{-1}（n = 3）。

2.7　体外释药评价

以透析袋法 [14] 考察 MFO-SME 体外释药行为，由于 MFO-SME 的定量是基于桉油精含量，因此释放到介质的药物浓度被大量稀释，这可能会增加测量误差。因此，本文测量透析袋内的药物残留并计算累计释放量以提高药物释放测量的准确性 [15]。MFO-SME 上药量为 8 mL（含桉油精 19.44 mg），释放介质为 1% 吐温 -80 的 pH 6.5 磷酸缓冲盐溶液，桉油精在该释放介质中的平衡溶解度为 168.65 μg • mL^{-1}，是释放体系中最大药物浓度（24.30 μg • mL^{-1}）的 3 倍以上，满足漏槽条件。

取适量 MFO 溶于 40% 乙醇，制备同 MFO-SME 等质量浓度的 MFO 溶液，精密量取各 1 mL，分别装入活化好的透析袋中，密封夹封口后，分别置于装有 800 mL 释放介质的烧杯。每个烧杯放入 8 个透析样品，水浴加热 37.0 ℃，转速 200 r • min^{-1}，分别于 1、2、4、6、8、10、12、24 h 各取出一个透析袋，按“2.6.9”项下方法测定袋内桉油精浓度 C_1。另取 MFO-SME 和 MFO 溶液按照同种方法测定原始桉油精浓度 C_0，计算不同时间点的累计释放率（Q_t），Q_t =（C_0 − C_1）/ C_0 × 100%，平行 3 份，绘制释放曲线，见图 5。并将其分别按零级、一级、Higuchi、Ritger-Peppas 方程进行拟合，见表 6。结果显示，MFO 溶液的 Q_t 在 12 h 后趋于平缓，24 h 达到（82.98±2.91）%，而 MFO-SME 在 24 h 的 Q_t 为（70.38±3.08）%，仍未完全释放，显示亚微乳具有缓释效果。从方程拟合结果看出，一级拟合方程的相关系数（R^2）最大，并且 Ritger-Peppas 方程的特征参数 $n \leqslant 0.45$，表明 MFO-SME 体外释药接近一级释放，释放机制为 Fick 扩散。

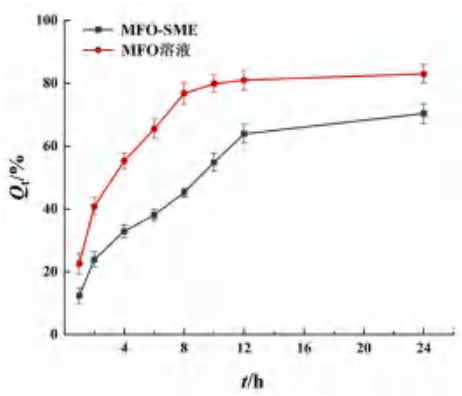

图 5　MFO-SME 和 MFO 溶液累计释放率曲线

Fig 5　Cumulative release rate curves of MFO-SME and MFO solution

表 6　累计释放率 - 时间模型拟合方程

Tab 6　Cumulative release rate-time model fitting equation

制剂	模型	拟合方程	R^2
MFO-SME	零级方程	$Q_t = 23.16 + 2.47t$	0.80
	一级方程	$Q_t = 74.24\ (1 - e^{-0.14t})$	0.96
	Higuchi 方程	$Q_t = 15.71t^{1/2} + 2.19$	0.72
	Ritger-Peppas 方程	$Q_t = 18.31t^{0.44}$	0.81
MFO 溶液	零级方程	$Q_t = 42.63 + 2.16t$	0.48
	一级方程	$Q_t = 79.49\ (1 - e^{-0.31t})$	0.99
	Higuchi 方程	$Q_t = 15.10t^{1/2} + 20.70$	0.94
	Ritger-Peppas 方程	$Q_t = 34.25t^{0.31}$	0.94

2.8　家兔眼黏膜刺激性考察

家兔 6 只，分为两组。一组家兔左眼给生理盐水，右眼给 MFO-SME 50 μL，连续观察 1 h，记录出现的症状，恢复 2 d 后，左眼给 MFO-SME，右眼给生理盐水，再观察记录；另一组家兔给 MFO 溶液，给药方式同上 [16]，观察并记录。结果见表 7，MFO 溶液组给药后角膜持续浑浊，结膜充血，轻微肿胀有少量分泌物；MFO-SME 组角膜略有浑浊，轻微充血，未见肿胀和分泌物，1 h 后上述现象消失。表明两组药物均有一定的刺激性，但 MFO-SME 组刺激性较小，可用于鼻黏膜给药。

表 7　家兔眼黏膜刺激性实验结果

Tab 7　Mucosa stimulation on rabbit eyes

样品	眼刺激反应	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
MFO 溶液	角膜浑浊	+	+	+	+	−
	虹膜坏死	−	−	−	−	−
	结膜充血	+	+	+	−	−
	结膜水肿	+	+	−	−	−
	分泌物	−	+	+	−	−
MFO-SME	角膜浑浊	−	+	+	−	−
	虹膜坏死	−	−	−	−	−
	结膜充血	−	+	−	−	−
	结膜水肿	−	−	−	−	−
	分泌物	−	−	−	−	−

注（Note）：“+”有刺激性，“−”无刺激性（“+” means irritating，“−” means non-irritating）。

3　讨论

本研究直接以 MFO 作为亚微乳的油相以提高药物载药量。根据界面膜理论，大豆磷脂可以形成较高的界面电荷，有利于阻止乳滴的聚集，泊洛沙姆 188 形成空间稳定位阻，防止乳滴合并，两者混合使用，可提高表面膜的强度，增强亚微乳稳定性 [17]。油酸作为稳定剂不仅可以提高亚微乳的电位，增大乳滴之间的排斥力，还可以与乳化剂一起形成复合凝聚膜，进一步提高制剂稳定性。

体外释放行为表明亚微乳体系可一定程度上减缓桉油精成分的释放。这可能是由于 MFO-SME 处方中含有乳化剂，使得 MFO 形成微小的内相液滴并均匀分散在 *O*/*W* 乳液中，药物从内相乳滴中扩散后才能释放到介质中，从而体现为缓慢释放。

“药辅合一”是中药制剂使用辅料的重要原则，也是中药制剂区别于化学药制剂的显著特征，在中药制剂中具有普遍性 [18]，但在新型递药系统中较少得到体现。基于前期预实验结果及精简处方、提高目标药物含量的考虑，以模型药物 MFO 为亚微乳递药系统唯一油相，辅助制剂的成型与稳定，同时可以充当促透剂 [11]，是“药之为辅”的体现；从治疗学角度，MFO 具有作为油相发挥辅料作用从而提高制剂稳定性，自身又具有抗炎和抗过敏作用 [19]，体现了“辅之为药”的特点。本研究研制的鼻用制剂，有效地降低了促透剂和油相用量，减轻了药物刺激性和不良反应，提高了制剂的安全性。

综上所述，本研究成功制备了用于鼻腔给药的 MFO-SME 并优化了其处方工艺，制备方法简单易行，所得制剂的稳定性良好，且未使用有机溶剂和致敏性的吐温 -80，对鼻腔刺激性较小，具有较好的安全性。但是家兔眼刺激观察过程判断的主观性较强，为该研究的不足之处。后续的研究中考虑添加壳聚糖 [20] 等辅料，制备阳离子亚微乳递药系统，以延长在鼻腔内的滞留时间，并开展对鼻纤毛毒性、鼻黏膜刺激性和初步药效学的考察，以期为其进一步药理、毒理研究提供实验依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：189.

[2] 曾蔚欣，刘淑娟，王弘，等 . 标准望春花油的抗炎作用研究 [J]. 中国药学杂志，2013，48（5）：349-354.

[3] 刘琨琨，曾南，汤奇，等 . 辛夷挥发油体外干预大鼠胸腔炎性白细胞 5-LO 活性的研究 [J]. 中药药理与临床，2011，27（1）：52-53.

[4] Sun YY，Cai XJ，Cao JX，et al. Effects of 1，8-cineole on carbohydrate metabolism related cell structure changes of *Salmonella* [J]. Front Microbiol，2018，9：1078.

[5] Dizová S，Bujdáková H. Properties and role of the quorum sensing molecule farnesol in relation to the yeast *Candida albicans* [J]. Pharmazie，2017，72（6）：307-312.

[6] 程嘉莉，马江，肖爱华，等 . 不同干燥方式对红花玉兰花蕾挥发油成分及抗氧化、抗菌活性的影响 [J]. 食品科学，2020，41（19）：132-139.

[7] 管政，马小卓，吕圭源，等 . 辛夷挥发油对变应性鼻炎大鼠 IL-12、IFN-γ 及组胺的影响 [J]. 中药药理与临床，2011，27（2）：70-72.

[8] Juergens LJ，Worth H，Juergens UR. New perspectives for mucolytic，anti-inflammatory and adjunctive therapy with 1，8-cineole in COPD and asthma：review on the new therapeutic approach [J]. Adv Ther，2020，37（5）：1737-1753.

[9] 贺利敏，李光武，王敏，等 . 辛夷挥发油经嗅觉通路改善自闭症模型昆明鼠学习记忆能力及其神经递质含量 [J]. 神经解剖学杂志，2016，32（4）：507-512.

[10] 郑立发，周建平，吕慧侠 . 我国药物新剂型研究进展 [J]. 药学进展，2014，38（4）：252-256.

[11] 李越，陈金素，郭雪，等 . 基于“药辅合一”的中药挥发油现状与分析 [J]. 中国现代中药，2022，24（4）：564-569.

[12] 吴伟，崔光华，陆彬 . 实验设计中多指标的优化：星点设计和总评“归一值”的应用 [J]. 中国药学杂志，2000，35（8）：530-533.

[13] 郭丽，陈皓，贾明璐，等 . 层次分析法及多指标正交试验优化归芪通脉合剂水提工艺 [J]. 中国现代中药，2021，23（6）：1068-1075.

[14] 刘晨，任宗芬，李建理，等 . 复方薄荷脑微乳原位凝胶剂的评价 [J]. 中成药，2015，37（12）：2632-2636.

[15] 林俊敏 . 乳香 - 没药精油醇质体的制备及体外释药研究 [D]. 广州：广东工业大学，2023.

[16] 缪建春，杨泰源，陈周 . 丹参喷鼻剂的黏膜毒性评价 [J]. 贵阳医学院学报，2013，38（4）：375-378.

[17] 刘玉红，刘倩伶，黄志芳，等 . 石芎挥发油亚微乳的制备工艺和稳定性研究 [J]. 中成药，2012，34（7）：1254-1258.

[18] 张定堃，傅超美，林俊芝，等 . 中药制剂的“药辅合一”及其应用价值 [J]. 中草药，2017，48（10）：1921-1929.

[19] 王萍，张海燕，刘英孟，等 . 辛夷挥发油的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国药房，2022，33（3）：378-384.

[20] 郝欣岩，张远冬，侯盈盈，等 . 壳聚糖修饰的纳米乳用于鼻腔疫苗递送的研究 [J]. 四川大学学报（医学版），2021，52（4）：592-597.

（收稿日期：2023-11-27；修回日期：2023-12-26）

γ- 环糊精 - 金属有机骨架负载黄芪甲苷的制备及其性质研究

陈敏燕，韩璐，王蓉，杨刚*（上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科，上海 200011）

摘要：目的 以 γ- 环糊精 - 金属有机骨架（CD-MOF）为载体制备载黄芪甲苷（AST）的 AST@CD-MOF 并研究其对 AST 溶解度、溶出速率、稳定性及 A549 细胞凋亡的影响。**方法** 以溶剂孵育法将 AST 负载于 CD-MOF 中，采用环境扫描电子显微镜、氮气吸附脱附等手段表征 AST@CD-MOF 的形貌和吸附特性，同时对 AST@CD-MOF 的溶解度、溶出速率、稳定性及诱导 A549 细胞凋亡能力进行考察，并与环糊精包合物（AST@γ-CD）和原料药进行对比。**结果** 制备得到的 AST@CD-MOF 形貌呈均一的立方晶体，粒径约为 140 nm，优化后的 AST@CD-MOF 载药量为（32.29±2.57）%，且具有良好的稳定性；AST@CD-MOF 中 AST 的溶出速率和累计溶出百分率均得到显著提升，在 6 h 内的累计释放率达到 80% 以上；AST@CD-MOF 诱导细胞的总凋亡比率可达 68.18%，显著高于游离 AST 和 AST@γ-CD。**结论** CD-MOF 显著提高了 AST 的水溶性和溶出速率，增强了 AST 诱导 A549 细胞凋亡的能力。

关键词： 黄芪甲苷；γ- 环糊精 - 金属有机骨架；体外溶出；细胞凋亡
中图分类号： R94 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2024)05-1220-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.017

Preparation and properties of astragaloside loaded by γ-cyclodextrin metal-organic framework

CHEN Min-yan, HAN Lu, WANG Rong, YANG Gang* (*Department of Pharmacy*, *the Ninth People's Hospital Affiliated to Medical School*, *Shanghai Jiao Tong University*, *Shanghai* 200011)

Abstract: Objective To prepare γ-cyclodextrin metal-organic framework (CD-MOF) containing astragaloside (AST) with CD-MOF as the carrier and to determine its effect on AST solubility, dissolution rate, stability and apoptosis of A549 cells. **Methods** AST was loaded into CD-MOF by solvent incubation method. The morphology and adsorption properties of AST@CD-MOF were characterized by environmental scanning electron microscopy and nitrogen adsorption. Meanwhile, the solubility, dissolution rate, stability and induction of A549 cell apoptosis of AST@CD-MOF were measured before comparion with those of AST@γ-CD and AST powder. **Results** The morphology of AST@CD-MOF was homogeneous cubic crystal with a particle size of about 140 nm. The drug loading of optimized AST@CD-MOF was (32.29±2.57)%, with good stability. The dissolution rate and cumulative dissolution rate of AST in AST@CD-MOF was obviously improved, and the cumulative dissolution percentage reached over 80% within 6 h. The total apoptosis rate induced by AST@CD-MOF was 68.18%, much higher than that induced by free AST and AST@γ-CD. **Conclusion** CD-MOF can greatly increase the water solubility and dissolution rate of AST, and enhance the ability of AST to induce the apoptosis of A549 cells.

Key words: astragaloside; γ-cyclodextrin metal-organic framework; in vitro dissolution; apoptosis

肺癌是目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一，其中以非小细胞肺癌最为多见，其五年生存率不足 20%，严重影响着人类的健康 [1-2]。肺癌的主要治疗方案包括化疗、放疗及靶向治疗等，但这些方案的治疗效果仍不理想 [3-5]。因此，探求新型有效的治疗方案具有重要意义。

基金项目： 国家自然科学基金青年科学基金项目（No.82204768）。
作者简介： 陈敏燕，女，主管药师，主要从事医院制剂研究，email：mychen1983@163.com *通信作者：杨刚，男，主管药师，主要从事新制剂和医院制剂研究，email：yanggangws@163.com

中医认为肺癌的病机是正虚邪实，治疗肺癌应以“扶正祛邪”为核心[6]。中药黄芪具有补气升阳、固表消肿、敛疮生肌和托毒排脓等功效，治疗肺癌正气虚衰、血腐肉败，正可谓切当[7]。黄芪甲苷（astragaloside，AST）是黄芪的药效物质基础，是其免疫活性最强的一类物质，可通过改善体内肺癌的免疫抑制状态而发挥抗肿瘤作用，同时对肺癌细胞也具有显著的抑制效果[8-9]。然而，由于 AST 水溶性和脂溶性较差，难以穿透血管壁进入肿瘤组织，且作为皂苷类化合物在静脉注射时存在溶血的危险，使其在临床应用中受限[10-11]。选择合适的药物递送载体是克服 AST 上述问题的关键。

金属-有机骨架（metal-organic framework，MOF）是 20 世纪 90 年代发展起来的一类极具吸引力的晶体材料，其三维孔道结构可为药物分子提供可附着空间，在药物递送方面具有独特的优势。其中，γ-环糊精-金属有机骨架（γ-cyclodextrin metal-organic framework，CD-MOF）是由钾离子和天然 γ-环糊精以配位键的形式自组装形成的无限延伸的网络状晶体，相比于常规的药物递送载体如脂质体、胶束、脂质纳米粒、聚合物纳米粒、氧化石墨烯等，CD-MOF 不仅具有环糊精自身的空腔，还具有开口的球形空腔，均可作为药物储库，因此具有更高的载药量和药物运载效率，而且还能用于生物大分子的递送[12-14]，具有良好的生物相容性[15]；此外，CD-MOF 的可修饰性及功能化进一步促进了其在药物递送尤其是在抗肿瘤领域的应用[16]。因此，本文利用 CD-MOF 巨大的内部空腔对 AST 进行载药，以期实现 AST 的高效装载。同时对载药 CD-MOF 进行表征，并评价 AST@CD-MOF 的稳定性、平衡溶解度、体外溶出以及对肿瘤细胞的杀伤能力。

1 仪器与试药

1260 型高效液相色谱仪（Agilent 科技有限公司）；RE-52A 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；minispin 离心机（德国 Eppendorf 公司）；PHS-3BpH 计（上海精密科学仪器有限公司）；RC-806 溶出度仪（天津因赛科技发展有限公司）；SHA-C 水浴摇床（江苏科晰仪器有限公司）；JEM-1230 透射电镜（日本 JEOL 公司）；FACS Calibur 流式细胞仪（美国 BD 公司）。

AST 原料药（纯度≥ 99%，批号：210723，成都瑞芬思生物科技有限公司）；AST 对照品（供含量测定用，批号：202219，中国食品药品检定研究院）；聚乙二醇 20000（国药集团）；无水乙醇（含量≥ 99.7%，分析纯，上海泰坦科技股份有限公司）；γ-环糊精（含量≥ 99%，广州泰龙生化有限公司）；氢氧化钾（含量≥ 85%，分析纯，国药集团）；A549 细胞、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲溶液（PBS，pH 7.4）（江苏凯基生物股份有限公司）；乙腈（色谱级，德国 Merck 公司）；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 AST 高效液相色谱法（HPLC）的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水（35∶65）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长为 203 nm；进样量为 20 μL；柱温为 30 ℃[17]。

2.1.2 溶液配制

① 对照品溶液配制：取 AST 对照品约 10 mg，精密称定，转移至 50 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容，摇匀得质量浓度约为 200 μg·mL^{-1} 的 AST 对照品储备液。

② 供试品溶液配制：取 AST@CD-MOF 约 10 mg，精密称定，转移至 50 mL 量瓶内，用甲醇溶解并定容，稀释适当倍数得供试品溶液。

③ 空白 CD-MOF 溶液配制：取 CD-MOF 约 10 mg，精密称定，转移至 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解后定容，稀释适当倍数得空白 CD-MOF 溶液。

2.1.3 专属性考察 分别配制 100 μg·mL^{-1} 的 AST 对照品溶液、供试品溶液及空白 CD-MOF 溶液并按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，考察分析方法的专属性。结果表明溶剂与 CD-MOF 均不干扰 AST 的含量测定，表明该方法具有良好的专属性。

2.1.4 标准曲线的建立 取 AST 对照品储备液，分别用甲醇稀释得到 2、5、10、30、60、90、150 μg·mL^{-1} AST 对照品溶液，进样测定，记录峰面积。以 AST 峰面积（A）对质量浓度（c）进行线性拟合，得回归方程 $A = 2.163\times10^{4}c - 6.001\times10^{3}$（$r = 0.9999$），表明 AST 在 2 ～ 150 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取 2、30、150 μg·mL^{-1} 的黄芪甲苷对照品溶液，分别在日内和日间重复测定各 5 次，平行操作 5 份，计算日内精密度和日间精密度。结果显示，日内 *RSD* 和日间 *RSD* 分别为 0.25% 和 0.29%，符合精密度试验要求。

2.1.6 回收试验 取 2、30、150 μg·mL^{-1} 的黄芪甲苷对照品溶液，加入空白 CD-MOF 混悬液中，各平行操作 5 份，进样测定，计算回收率。结果显示，平均回收率为（99.8±0.13）%，符合回收率要求。

2.1.7 稳定性试验和重复性试验 将 AST 对照品储备液稀释得到质量浓度为 30 μg·mL^{-1} 的对

照品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样，记录峰面积，考察稳定性。同时，平行配制 6 份浓度为 30 μg • mL^{-1} 的 AST 对照品溶液，进样测定，记录峰面积，考察重复性。结果显示，对照品溶液在 0 ～ 12 h 测定的峰面积 *RSD* 值为 0.80%，重复性试验测定的色谱峰面积 *RSD* 值为 1.3%，表明该方法的稳定性和重复性良好。

2.2　AST-MOF 的制备

2.2.1　CD-MOF 的制备与活化

① CD-MOF 的制备：采用溶剂热法制备 CD-MOF[18]。称取一定量的 γ- 环糊精（γ-CD）和 KOH（摩尔比为 1∶6）超声溶解于纯水中。所得溶液经 0.45 μm 滤膜滤过，滤液加入甲醇中，得到浑浊液。将浑浊液置于 50 ℃恒温水浴中静置至澄清，并继续水浴 20 min。随即加入含 8 mg • mL^{-1} 的 PEG 20000 甲醇溶液，摇匀后于冰水浴中静置过夜。离心（4000 r • min^{-1}，5 min），除去上清液，所得白色沉淀用无水乙醇洗涤 3 次，以去除残留的 PEG 20000 和钾离子等杂质，收集沉淀，即得。

② CD-MOF 的活化：将收集的白色沉淀浸泡在 200 mL 二氯甲烷中 72 h，并每 24 h 更换一次二氯甲烷，二氯甲烷置换 CD-MOF 孔道中的无水乙醇，离心收集沉淀后放置在真空干燥箱内，设置温度为 50 ℃，过夜真空干燥，即得二氯甲烷活化的 CD-MOF。

2.2.2　载药工艺优化　以载药量为评价指标，考察溶剂孵育法制备载 AST 的 CD-MOF（AST@CD-MOF）的最佳载药工艺[19]。

① 搅拌时间考察：取 10 mL 质量浓度为 2 mg • mL^{-1} 的 AST 无水乙醇溶液置于 20 mL 具塞棕色玻璃瓶内，加入 100 mg 的 CD-MOF，磁力搅拌器中（50 ℃、400 r•min^{-1}）搅拌，分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 取 0.5 mL 溶液进行离心（12 000 r • min^{-1}，10 min），并收集沉淀于 50 ℃烘箱干燥 12 h。采用 HPLC 法测定各样品中 AST 含量，计算其载药量并绘制 CD-MOF 载药量 - 时间曲线，如图 1 所示，初始阶段随着搅拌时间的增加，载药量迅速增加，2 h 后载药量随时间变化差异不显著。因此，优选搅拌时间为 2 h。

② 药物浓度考察：分别配制质量浓度为 1、2、5、10、20 mg • mL^{-1} 的 AST 乙醇溶液 10 mL，加入 100 mg 的 CD-MOF，水浴加热 50 ℃，转速 400 r•min^{-1} 条件下搅拌 2 h 后离心（12 000 r•min^{-1}，10 min），并收集沉淀于 50 ℃烘箱干燥。采用 HPLC 法测定各样品中 AST 的含量，计算载药量。如图 2 所示，在乙醇溶液孵育载药方法条件下，药物浓度提高能显著提高载药量，是影响 CD-MOF 载药量的重要因素，当载药浓度为 5 mg•mL^{-1} 时，CD-MOF 载药量可达（31.59±2.28）%。当药物浓度进一步增大时，载药量无显著增加。因此，优选药物质量浓度为 5 mg • mL^{-1}。

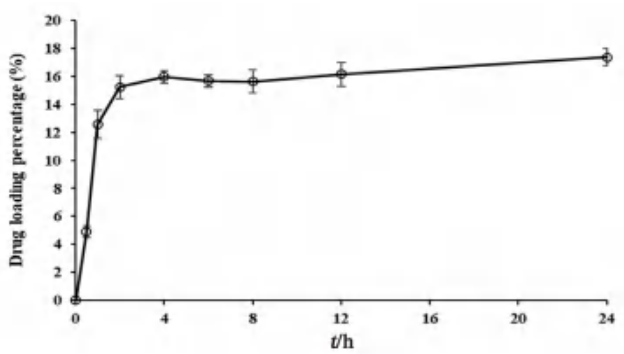

图 1　CD-MOF 载药量 - 搅拌时间曲线（n = 3）

Fig 1　Drug loading-stirring time curve of CD-MOF（n = 3）

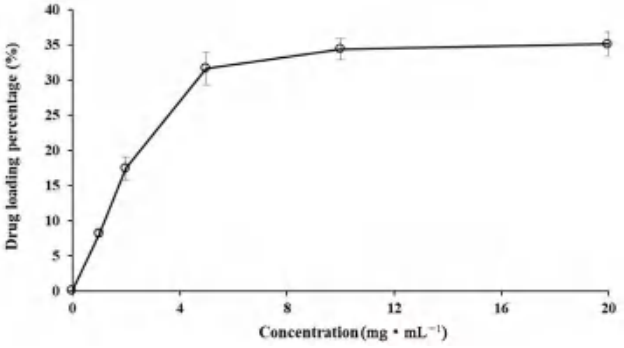

图 2　药物浓度考察（n = 3）

Fig 2　Investigation on the drug concentration（n = 3）

2.2.3　AST@CD-MOF 载药量测定　取约 5 mg 载药样品，精密称定，转移至 10 mL 量瓶中，加入水 - 无水乙醇（体积比为 1∶1）混合溶剂溶解并定容，样品经去离子水适当稀释后，经 HPLC 法测定，记录测得峰面积，并按“2.1.2”项下方法计算药物浓度。计算载药量：载药量（%）= $W_{AST}/W_{AST@CD\text{-}MOF}$ × 100%。

其中，W_{AST} 表示 AST@CD-MOF 中 AST 的质量，W_{AST}@CD-MOF 表示负载 AST 的 CD-MOF 的质量。

2.2.4　优选工艺参数重复性试验验证　根据工艺优化结果，AST@CD-MOF 制备优选工艺参数为：搅拌时间为 2 h、药物质量浓度为 5 mg • mL^{-1}。采用以上优选制备工艺参数进行 3 批试验验证重复性。结果显示不同批次 AST@CD-MOF 的载药量均值为（32.29±2.57）%，*RSD* 小于 3%，表明所选工艺条件重现性良好。

2.3　AST 环糊精包合物的制备

环糊精与 AST 的投料摩尔比为 1∶1，采用

饱和水溶液沉淀法[20]制备 AST 的 γ-CD 包合物。配制近饱和的 γ-CD 水溶液 10 mL，将一定量的 AST 溶于 1.5 mL 无水乙醇中，缓慢滴加到 γ-CD 水溶液中，于 40 ℃水浴加热，搅拌转速为 300 r·min^{-1}，包合 6 h 后室温放冷，置于 4 ℃冰箱待沉淀析出，将固液混合物倒入抽滤装置的漏斗中进行抽滤，抽滤结束后收集沉淀，再依次使用适量无水乙醇和去离子水洗涤沉淀以去除残留未包合的 AST 与环糊精，将沉淀放入真空干燥箱，设置温度为 50 ℃，减压干燥即得 AST 环糊精包合物（AST@γ-CD）。

2.4　AST@CD-MOF 的性质表征

2.4.1　外观形貌分析　采用环境扫描电子显微镜（ESEM）表征各样品的外观形貌。分别将适量的 CD-MOF 和 AST@CD-MOF 粉末样品均匀地涂布于导电胶表面进行制样，将样品放置于离子溅射仪样品台，样品进行喷金处理后在放大 50 000 倍下观察样品的形态。

活化 CD-MOF 的 ESEM 图如图 3 所示，其呈均一的立方晶体，粒径约为 140 nm。负载 AST 后，其形态与 CD-MOF 基本一致，而粒径略有增大，这可能是由于少量 AST 吸附在 CD-MOF 表面所致。

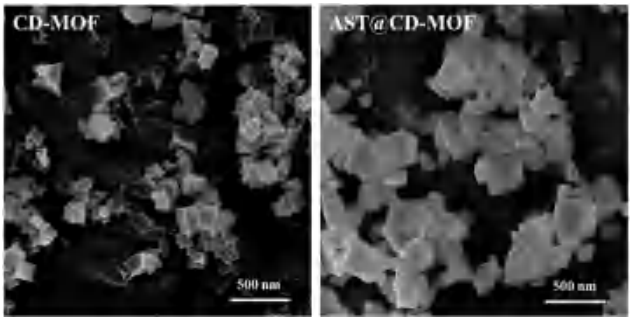

图 3　CD-MOF 和 AST@CD-MOF 的 ESEM 图像

Fig 3　ESEM image of CD-MOF and AST@CD-MOF

2.4.2　氮气吸附 / 脱附　采用氮气吸附 / 脱附仪（Autosorb-iQ，Quantachrome）对样品进行比表面积和孔容量测定[21]。在气体吸附前对 CD-MOF 和 AST@CD-MOF 在 60 ℃条件下进行脱气处理 12 h，在液氮温度（77 K）下测试样品对 N_2 的吸附效果。采用软件 ASiQwin（version3.01）对数据进行处理分析。

以相对压力（P_S/P_0）为横坐标，氮气吸附量（cm^{-3}·g^{-1}）为纵坐标得到 N_2 吸附等温线，如图 4 所示，活化的 CD-MOF 在低压区域有急剧的 N_2 吸附，证明了 CD-MOF 的微孔吸附特征。而负载 AST 后，CD-MOF 的比表面积迅速减小，表明 CD-MOF 的孔隙均被药物分子占据。

2.4.3　X- 射线衍射（XRD）分析　采用 Cu-Kα 射线作为 X- 射线，管电压 40 kV，管电流 20 mA，衍射角（2θ）的测定范围为 0 ～ 50°，步长为 0.02°。分别对 AST、CD-MOF 和 AST@CD-MOF 进行 XRD 分析。结果如图 5 所示，AST 在 2θ 为 7.32°、10.36°、12.70°、18.00° 有尖锐的特征峰，晶体衍射峰强度较大；而在 AST@CD-MOF 中，AST 的晶体衍射峰消失，提示 AST 以无定形的形式存在于 CD-MOF 中。

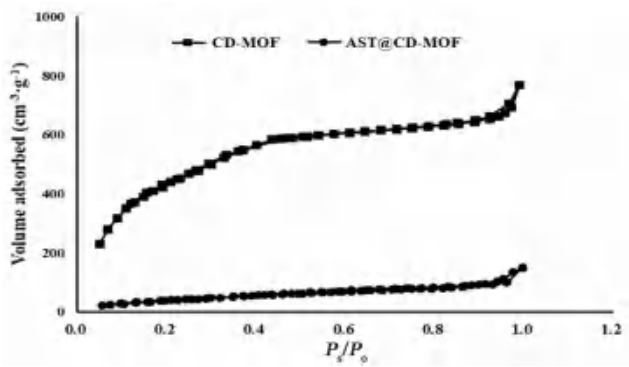

图 4　CD-MOF 和 AST@CD-MOF 的 N_2 吸附等温线

Fig 4　N_2 adsorption isotherms of CD-MOF and AST@CD-MOF

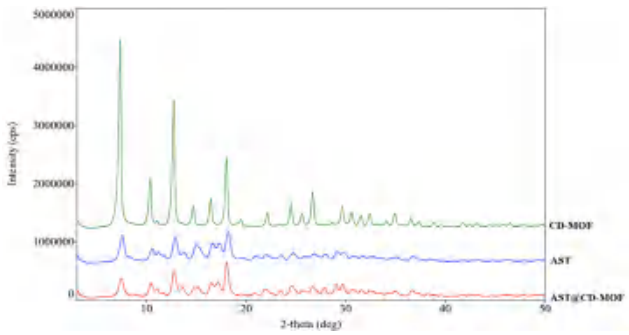

图 5　AST、CD-MOF 和 AST@CD-MOF 的 XRD 谱图

Fig 5　XRD image of AST，CD-MOF and AST@CD-MOF

2.4.4　差示扫描量热（DSC）分析　取适量 AST、CD-MOF 和 AST@CD-MOF，分别装入铝坩中，以空铝坩埚为参比，升温速度为 10 ℃·min^{-1}，扫描范围 20 ～ 250 ℃，氮气流速为 60 mL·min^{-1}，进行 DSC 分析，结果见图 6。AST 在 75.83 ℃有特征吸热峰，说明 AST 原料以晶体的形式存在；在制备成 AST@CD-MOF 后，AST 的特征吸热峰消失，表明 AST 以非晶体的状态存在于 CD-MOF 中，进一步证实了 XRD 的结果。

2.4.5　平衡溶解度测定　分别取过量 AST 原料药、AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF 样品于 20 mL 具塞西林小瓶中，分别加入至 10 mL 的磷酸盐缓冲液（pH 7.4）中。将西林小瓶固定于水浴摇床中，设置水浴温度为 25 ℃，转速 100 r·min^{-1} 条件下振荡 72 h，达到平衡后，将样品离心并用 0.45 μm 水性滤膜滤过，滤液采用同介质稀释，用 HPLC 法测定 AST 浓度，计算平衡溶解度。

结果与 AST 原料药相比，AST@γ-CD 的平衡溶解度有显著提高，为 AST 原料药的 3.06 倍。

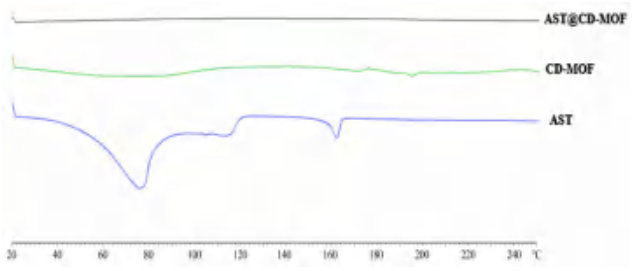

图 6　AST、CD-MOF 和 AST@CD-MOF 的 DSC 谱图

Fig 6　DSC image of AST，CD-MOF and AST@CD-MOF

而 AST@CD-MOF 对 AST 的增溶效果更加显著。AST@CD-MOF 的平衡溶解度比 AST 原料药提高了 31.74 倍，比 AST@γ-CD 提高了 8.10 倍。

2.5　稳定性考察

将 AST 原料药、AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF 样品放置在温度（40±2）℃、相对湿度（75±5）% 条件下进行加速试验，考察时间为 6 个月，分别于 1、2、3、6 个月取样，比较存放前后 AST 的含量。

由表 1 可知，AST 原料药在贮存了 6 个月后，药物含量几乎没有变化；AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF 中的药物含量有所下降，但 6 个月期间含量变化的 *RSD* 值均小于 2%，表明其稳定性良好。

表 1　加速试验中 AST 含量变化 (n = 3)

Tab 1　Content of AST in the acceleration test (n = 3)

样品	AST 含量 /%				*RSD* /%
	第 1 个月	第 2 个月	第 3 个月	第 6 个月	
AST	99.75±0.16	99.38±0.14	99.25±0.20	99.06±0.31	0.29
AST@γ-CD	98.54±0.22	97.95±0.50	96.97±0.62	95.28±0.47	1.5
AST@CD-MOF	99.44±0.17	98.73±0.93	98.04±1.01	96.98±1.27	1.1

2.6　体外溶出研究

按《中国药典》2020 年版规定的浆法测定，精密称取 5 mg 的 AST 原料药、当量 AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF 样品，为满足漏槽条件，实验选择 PEG 400 的生理盐水溶液（20%，*V*/*V*）作为溶出介质，分别将样品置于 100 mL 释放介质中，转速为 100 r • min^{-1}，介质温度为（37.0±0.5）℃，定时取样 1 mL，并及时补充等体积等温度的溶出介质，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，按“2.1.1”项下色谱条件进样，记录峰面积，计算样品浓度，得出对应时间点 AST 的溶出百分率（C_r）。溶出百分率的计算公式如下：

$$C_r(\%) = (\sum_1^{n-1} C_i V_i + C_m V_m)/m_{AST} \times 100\%$$

其中，m_{AST} 为 CD-MOF 负载的 AST 质量；V_m 为释放药物的总体积；C_m 为第 m 次取样时的药物浓度；V_i 为第 i 次取样时的样品体积；C_i 为第 i 次取样时的药物浓度。

对比 AST 原料药，AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF 的溶出度可知（见图 7），AST 原料药的累计溶出百分率较小，溶出速率也较慢，6 h 还未达到溶解平衡，且累计溶出百分率小于 40%；AST@γ-CD 在 6 h 时的累计溶出百分率为 46.6%；而将 AST 负载于 CD-MOF 后，其溶出度最大，在 6 h 后 AST@CD-MOF 的累计溶出百分率达到 80% 以上。上述结果表明，CD-MOF 可显著提高 AST 的溶出速率和累计溶出百分率。

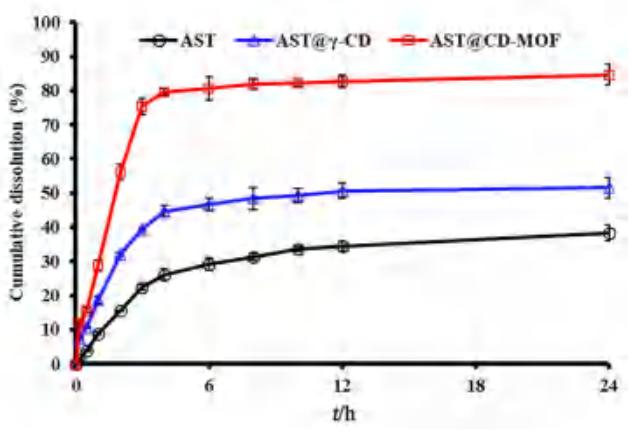

图 7　AST 原料药、AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF 的体外释放曲线（n = 3）

Fig 7　In vitro dissolution curve of AST powder，AST@γ-CD and AST@CD-MOF（n = 3）

2.7　诱导细胞凋亡能力考察

实验采用 Annexin V-FITC/PI 双染法考察各组别对 A549 细胞凋亡的影响 [22]。将 A549 细胞以 1.5×10^6 个 / 孔的密度接种于 6 孔板中，培养过夜，分别加入 1 mL 用空白培养基稀释的 CD-MOF、AST 原料药（5 μg • mL^{-1}）、当量 AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF，空白对照组加入 1 mL 空白培养基，孵育 12 h 后，吸弃培养基，用 PBS（pH 7.4）进行润洗，加入 1 mL 新鲜培养基，继续培养 12 h，经 PBS 润洗后，用不含 EDTA 的胰酶消化后离心收集细胞，用含 1% 胎牛血清的 PBS 重悬洗涤两遍。用 100 μL 结合缓冲液和 5 μL 荧光素 FITC 标记的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白（Annexin V-FITC）重悬细胞并置于 4 ℃避光染色 30 min，再加入 400 μL 结合缓冲液和 5 μL 碘化

丙啶（PI）涡旋后继续在 4 ℃避光染色 5 min，离心收集细胞，将细胞用含有 1%FBS 的 PBS 缓冲液重悬后，样品进行流式细胞仪检测。

结果如图 8 所示，游离 AST 组可诱导 A549 细胞产生 3.41% 的早期凋亡和 24.4% 的晚期凋亡，说明 AST 可以诱导一定数量的 A549 细胞产生凋亡；AST@γ-CD 组具有比游离 AST 更强的诱导细胞凋亡的能力，其诱导细胞的总凋亡比率为 47.16%；而 CD-MOF 组几乎没有细胞杀伤能力，具有良好的安全性；值得注意的是，当 AST 负载至 CD-MOF 时，其诱导细胞的总凋亡比率可达 68.18%，显著高于游离 AST 组和 AST@γ-CD 组。

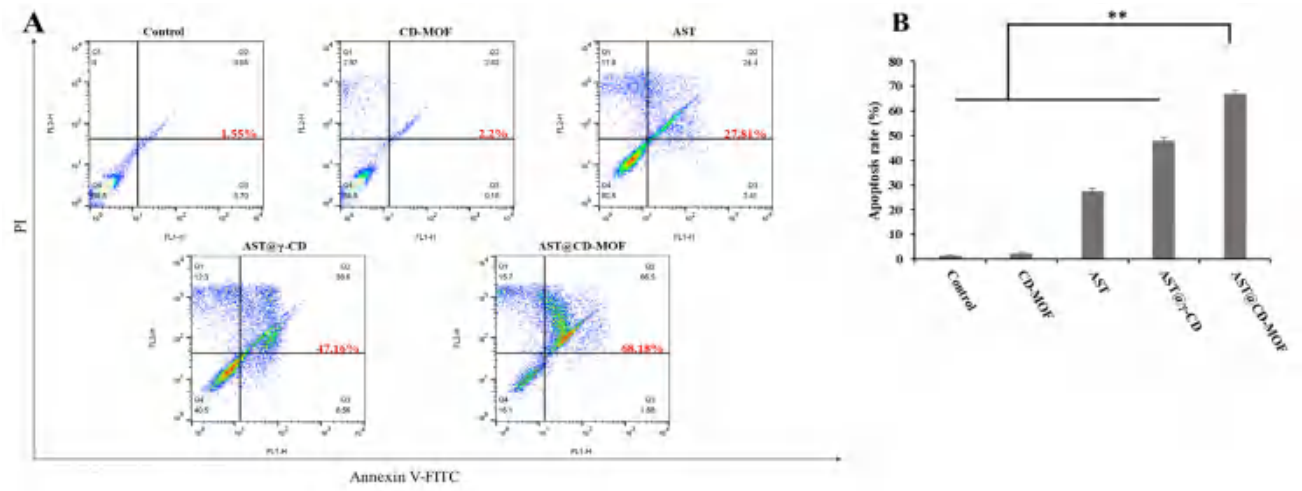

图 8　AST@CD-MOF 对 A549 细胞凋亡的影响（$n = 3$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 8　Effect of AST@CD-MOF on the apoptotic of A549 cells（$n = 3$，$^{**}P < 0.01$）

3　讨论

本文采用溶剂交换法对 CD-MOF 进行活化，并通过溶剂孵育法对 CD-MOF 进行载药条件优化。从结果可知，搅拌时间和药物浓度是载药量的重要影响因素。在初始阶段，载药量随搅拌时间和药物浓度的增加而增大，但随着两个条件的进一步增加，此时 CD-MOF 的药物吸附量趋近于饱和，因此载药量无法进一步显著增大。在优化条件下，CD-MOF 的载药量高达（31.59±2.28）%。ESEM 表征显示，载药过程不影响 CD-MOF 的粒径和外观形态，结合氮气吸附 / 脱附试验中 CD-MOF 的微孔吸附特征，说明载药过程并未破坏 MOF 孔道，引起孔道坍塌。

稳定性研究表明，AST 原料药、AST@γ-CD 以及 AST@CD-MOF 都具有较好稳定性。但与 AST 原料药相比，AST@γ-CD 和 AST@CD-MOF 的药物含量降低更多，原因可能是由于 AST 负载于 γ-CD 和 CD-MOF 后，药物的物理结构转变为无定形状态，这些状态的热力学性质相对不稳定，在一定程度上加速了药物的降解，所以药物含量有所降低 [23-24]。而 AST 原料药由于其结晶度较高，热稳定性较好，因此不易降解。

药物在生理介质中的溶解度决定了药物的生物利用度，是药物在处方前阶段需要考虑的关键参数之一 [25]。由于晶格能的束缚，AST 是一种水难溶性药物。目前已报道多种递药策略来提高其溶解度，如环糊精包合 [26]、减小药物粒径 [27] 以及胶束 [28] 和脂质体 [29] 递药等。然而，这些传统策略往往载药量及装载效率较低。本文利用 CD-MOF 孔道的空间位阻效应，AST 分子的空间取向与重结晶所需的分子间作用力被有效限制，导致无定形的 AST 难以转变为晶态，同时具有较高的载药量和载药效率，并增加 AST 的溶解度 [30]。AST@CD-MOF 平衡溶解度和溶出行为评价证实，与环糊精包合物和原料药相比，AST@CD-MOF 可显著提高 AST 的平衡溶解度、累计溶出度和溶出速率。根据现有 CD-MOF 增溶的双分子机制 [31] 可知，AST 分子可在 CD-MOF 的双环糊精分子对形成药物的环糊精包合物，且 AST 分子在 CD-MOF 大空腔内可均匀分散，降低粒子间的吸附功能，避免了某些细小粉末状药物的附聚与结块，有利于药物粒子与溶解介质充分接触，促进药物的溶解与释放。此外，AST@CD-MOF 能提升药物诱导细胞凋亡作用，可能是形成的药物纳米团簇促进了 A549 细胞的药物摄取所致 [32]。该研究为解决其他难溶性药物的装载、递送以及提升抗肿瘤效果提供了新思路。

参考文献

[1] Schussler O，Bobbio A，Hervé D，et al. Twenty-year survival of patients operated on for non-small-cell lung cancer：the impact of tumor stage and patient-related parameters [J]. Can-

cers，2022，14（4）：874.
[2] Sadeghirad H，Bahrami T，Layeghi SM，et al. Immunotherapeutic targets in non-small cell lung cancer [J]. Immunology，2023，168（2）：256-272.
[3] Maise AB，Ariana H，Carlos MR，et al. The evolution of non-small cell lung cancer metastases in TRACERx [J]. Nature，2023，616：534-542.
[4] Król K，Mazur A，Stachyra-Strawa P，et al. Non-small cell lung cancer treatment with molecularly targeted therapy and concurrent radiotherapy——a review [J]. Int J Mol Sci，2023，24（6）：5858-5881.
[5] Zhao ZT，Wang J，Fang L，et al. Dual-responsive nanoparticles loading bevacizumab and gefitinib for molecular targeted therapy against non-small cell lung cancer [J]. Acta Pharmacol Sin，2023，44：244-254.
[6] 肖志伟，罗嘉敏，林丽珠 . 肺癌的中西医理论整合与临床实践 [J]. 中医肿瘤学杂志，2022，4（1）：1-5.
[7] 李成亮，王同 . 黄芪诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及作用机制的初步研究 [J]. 实用癌症杂志，2022，37（7）：1055-1059.
[8] Liang YT，Chen BQ，Liang D，et al. Pharmacological effects of astragaloside Ⅳ：a review [J]. Molecules，2023，28（16）：6118-6134.
[9] Xu F，Cui WQ，Wei Y，et al. Astragaloside Ⅳ inhibits lung cancer progression and metastasis by modulating macrophage polarization through AMPK signaling [J]. J Exp Clin Canc Res，2018，37（1）：207-223.
[10] Xu F，Li MH，Que ZJ，et al. Combined chemo-immuno-photothermal therapy based on ursolic acid/astragaloside Ⅳ-loaded hyaluronic acid-modified polydopamine nanomedicine inhibiting the growth and metastasis of non-small cell lung cancer [J]. J Mater Chem B，2023，11：3453-3472.
[11] Yue GJ，Wang CX，Liu B，et al. Liposomes co-delivery system of doxorubicin and astragaloside Ⅳ co-modified by folate ligand and octa-arginine polypeptide for anti-breast cancer [J]. Rsc Adv，2020，10：11573-11581.
[12] Roy I，Stoddart JF. Cyclodextrin metal-organic frameworks and their applications [J]. Accounts Chem Res，2021，54（6）：1440-1453.
[13] He YP，Xiong T，He SY，et al. Pulmonary targeting crosslinked cyclodextrin metal-organic frameworks for lung cancer therapy [J]. Adv Funct Mater，2020，31（3）：2004550.
[14] Zhao RN，Zhu BW，Xu Y，et al. Cyclodextrin-based metal-organic framework materials：classifications，synthesis strategies and applications in variegated delivery systems [J]. Carbohyd Polym，2023，319：121198.
[15] Dummert SV，Haneesh S，Zahid HM，et al. Cyclodextrin metal-organic frameworks and derivatives：recent developments and applications [J]. Chem Soc Rev，2022（12）：5175-5213.
[16] Parbeen S，Jing F，Vinaya KG，et al. Crosslinked and biofunctionalized γ-cyclodextrin metal organic framework to enhance cellular binding efficiency [J]. Mater Chem Phys，2022，289：126496.
[17] 李姿锐，王一婷，兰帆，等 . 基于质量源于设计（QbD）理念的黄芪甲苷 PLGA 纳米粒制备工艺研究 [J]. 中草药，2022，53（15）：4678-4686.
[18] Nanri A，Yoshida M，Ishida Y，et al. Preparation and characterization of a hybrid complex of cyclodextrin-based metal-organic frameworks-1 and ascorbic acid derivatives [J]. Materials，2021，14（23）：7309.
[19] Chen GS，Luo JY，Cai MY，et al. Investigation of metal-organic framework-5（mof-5）as an antitumor drug oridonin sustained release carrier [J]. Molecules，2019，24（18）：3369.
[20] Jiang LW，Yang JD，Wang Q，et al. Physicochemical properties of catechin/β-cyclodextrin inclusion complex obtained via co-precipitation [J]. Cyta J Food，2019，17（1）：544-551.
[21] He YZ，Hou XF，Guo JW，et al. Activation of a gamma-cyclodextrin-based metal-organic framework using supercritical carbon dioxide for high-efficient delivery of honokiol [J]. Carbohyd Polym，2020，235：115935.
[22] Li Z，Yang G，Han L，et al. Sorafenib and triptolide loaded cancer cell-platelet hybrid membrane-camouflaged liquid crystalline lipid nanoparticles for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. J Nanobiotechnol，2021，19（1）：360-372.
[23] Chen Q，Ji YH. Thermodynamic mechanism of physical stability of amorphous pharmaceutical formulations [J]. Ind Eng Chem Res，2023，62（3）：1596-1605.
[24] Dijana J. Thermal stability of amorphous solid dispersions [J]. Molecules，2021，26（1）：238-256.
[25] Zhang YY，Wang SH，Dai MM，et al. Solubility and bioavailability enhancement of oridonin：a review [J]. Molecules，2020，25（2）：332-355.
[26] Rabia M，Abdul H，Salah-ud-Din K，et al. Solubility and dissolution enhancement of dexibuprofen with hydroxypropylbetacyclodextrin（hpβcd）and poloxamers（188/407）inclusion complexes：preparation and in vitro characterization [J]. Polymers，2022，14（3）：579.
[27] Jain H，Chella N. Methods to improve the solubility of therapeutical natural products：a review [J]. Environ Chem Lett，2020（5）：1-11.
[28] Jaspreet K，Pankaj S，Inderpreet K. Binary pluronics based mixed micellar systems：effective solution for improved solubilization of biochanin A [J]. Spectrochim Acta A，2023，304：123279.
[29] Bi Y，Lv B，Li LL，et al. A liposomal formulation for improving solubility and oral bioavailability of nifedipine [J]. Molecules，2020，25（2）：338.
[30] Ha JS，Jeon MY，Park J，et al. Effect of steric hindrance on the interfacial connection of MOF-on-MOF architectures [J]. Nanoscale Adv，2023，5：2111-2117.
[31] Sun QY，Sheng J，Yang RD. Encapsulation of curcumin in CD-MOFs：promoting its incorporation into water-based products and consumption [J]. Food Funct，2021，12（21）：10795-10805.
[32] Kim SN，Park CG，Min CH，et al. Shape-dependent intracellular uptake of metal-organic framework nanoparticles [J]. J Ind Eng Chem，2021，104：468-477.

（收稿日期：2023-09-21；修回日期：2023-12-14）

基于 RTCA 技术研究抗体偶联药物的旁观者效应的检测方法

曹天助[1, 3]，牛庆田[2]，刘兵[2]，昌根琼[1, 3]，林军[2]，罗顺[1, 2, 3*]（1. 江西中医药大学药学院，南昌　330004；2. 澳斯康生物（南通）股份有限公司，江苏　南通　226133；3. 长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133）

摘要：目的　利用实时无标记细胞分析（RTCA）系统评估抗体偶联药物（ADC）的旁观者效应。**方法**　采用 RTCA 系统监测抗原阳性细胞（Ag^+）和抗原阴性细胞（Ag^-）的共培养状态，观察 Ag^-的细胞存活情况；采用重复实验验证结果的可靠性和一致性，并采用单因素方差分析比较不同细胞比例培养组在单个时间点的 Ag^-存活率。**结果**　加入抗体偶联药物后，随着共培养时间的延长，Ag^-存活率下降；此外，在单个时间点（96 h）上，与 0%Ag^+细胞的 Ag^-细胞存活率相比，10%Ag^+细胞的 Ag^-细胞存活率为 89.07%（$P = 0.156$），25%Ag^+细胞的 Ag^-存活率为 68.93%（$P = 0.0026$），50%Ag^+、75%Ag^+和 90%Ag^+细胞的 Ag^-存活率分别为 35.28%、13.99% 和 12.02%（$P < 0.0001$）。在 Ag^+细胞比例为 25% ～ 90% 时，旁杀伤效果显著；重复性结果显示不同 Ag^+细胞的旁杀伤率的相对标准偏差（*RSD*）均小于 30%。**结论**　结合 RTCA 技术和共培养方式的方法，可以更准确地模拟旁观者效应的生物学过程，为后续的抗体偶联药物开发提供有价值的参考。

关键词：抗体偶联药物；实时无标记细胞分析；旁观者效应；细胞存活；旁杀伤率

中图分类号：R917，R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1227-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.018

Detection of bystander effect in antibody-drug conjugates based on real-time label-free cell analysis technique

CAO Tian-zhu[1, 3], NIU Qing-tian[2], LIU Bing[2], CHANG Gen-qiong[1, 3], LIN Jun[2], LUO Shun[1, 2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004; 2. *Nantong Thousand Oaks Biopharma*, *Nantong Jiangsu* 226133; 3. *Yangtze Delta Institute for Advanced Pharmaceutical Research*, *Nantong Jiangsu* 226133)

Abstract: Objective　To evaluate the bystander effect of antibody-drug conjugates with a real-time label-free cell analysis (RTCA). **Methods**　RTCA was used to monitor the co-cultivation of Ag^+ (antigen-positive cells) and Ag^- (antigen-negative cells) to observe the survival of Ag^- cells. The experiment was repeated to validate the reliability and consistency of the results. Additionally, one-way ANOVA was used to compare the Ag^- survival rates at a single time point among cultivation groups with different cell ratios. **Results**　After adding antibody-drug conjugates drugs, the survival rate of Ag^- decreased with the prolongation of co-culture time. In addition, at 96 h, compared to the Ag^- cell survival rate with 0%Ag^+ cells, the Ag^- cell survival rate of 10%Ag^+ cells was 89.07% ($P = 0.156$), the Ag^- cell survival rate with 25%Ag^+ cells was 68.93% ($P = 0.0026$), and the Ag^- cell survival rates with 50%Ag^+, 75%Ag^+, and 90%Ag^+ cells were 35.28%, 13.99%, and 12.02%, respectively ($P < 0.0001$). The bystander killing effect was significant within 25% ～ 90% the proportion of Ag^+ cells. The repeatability test showed that the relative standard deviation of the bystander killing rates of different Ag^+ cells was less than 30%. **Conclusion**　This method, which combines RTCA technology and co-cultivation, can more accurately simulate the bystander effect in biological processes, providing valuable reference for subsequent antibody-drug conjugate development.

作者简介：曹天助，男，在读硕士研究生，主要从事新型生物大分子体外功能研究，email：cao2270200355@163.com　*通信作者：罗顺，男，教授，硕士研究生导师，主要从事分子生物学研究，email：shun.luo@tobiopharm.com

Key words: antibody-drug conjugate; real-time label-free cell analysis; bystander effect; cell survival; bystander killing rate

抗体偶联药物（antibody-drug conjugate，ADC）是一种新兴且具有开发前景的治疗剂，它结合了免疫疗法和化学疗法两种方式，具有高效的药物特性和协同效应[1-3]。ADC 由 3 个组分构成：单克隆抗体、连接接头和细胞毒性药物分子[4]。抗体负责将细胞毒性剂传递到肿瘤细胞上，减少了由旁观者效应引起的副作用，并增加了治疗指数[5]，它需要具备靶向特异性和高亲和力，此外，低免疫原性也是非常重要的[6]。连接接头具备在血液循环中维持偶联物处于非活性和无毒状态的基本功能，它在肿瘤细胞内部被内化后释放细胞毒性药物，其化学性质决定了释放的时机和方式，从而决定了是否可能发生旁观者效应[7]。具有可裂解接头的 ADC 在肿瘤微环境或靶细胞中直接通过连接子释放有效载荷，而具有不可裂解接头的 ADC 进入肿瘤细胞并在溶酶体中降解蛋白以逐步释放有效载荷。高度膜渗透性的有效载荷可以穿透细胞膜以杀死相邻的阴性肿瘤细胞，称为旁观者效应，这可以进一步提高在异质性肿瘤中的功效[8]。

评估其体外旁观者效应对于 ADC 疗效具有重要意义，目前有两种不同类型的方法用于评估体外 ADC 的旁观者效应：共培养测定和培养基转移测定[9-11]。培养基转移法通过首先用一定量的 ADC 处理 N87 细胞（抗原阳性细胞，Ag^+细胞），然后在一定时间段后将条件培养基转移到具有 MCFT 细胞（抗原阴性细胞，Ag^-细胞）的孔中来进行。采用四唑盐比色（tetrazolium salt colorimetry，MTT）法研究 Ag^+细胞和 Ag^-细胞毒性[12]。共培养方法开始于将 Ag^+和 Ag^-细胞一起培养，并将共培养系统中 Ag^-细胞的活力与相同 ADC 浓度下 Ag^-单培养系统中的活力进行比较。共培养系统中 Ag^-细胞的活力可以通过流式细胞仪或荧光板读数器来测量[13-14]。其中，第一三共株式会社用于检测 Enhertu（DS8201a）的方法被认为是一种较为经典的方法。该方法是将 HER2 阳性的 KPL4 细胞和 HER2 阴性的 MDAMB468 细胞混合培养，然后加入 ADC 药物，培养 5 d 后，用流式细胞仪分析细胞的存活率和 HER2 的表达情况。然而，MTT 法试剂的细胞毒性，以及流式细胞术需要进行多次细胞洗涤，可能会对细胞产生一定损伤[15]。

无标记检测的优点包括简单、非侵入性、对正常细胞功能干扰较少、动态测量和检测开发时间缩短。实时无标记细胞分析（real-time label-free cell analysis，RTCA）是这些新的无标记技术之一，基于阻抗测量，可以收集不同过程的信息包括细胞增殖，迁移、细胞毒性和受体的信号传导[16]。因此本研究采用细胞共培养法来测定 ADC 药物的旁观者效应，通过 RTCA 技术来计算结果，为肿瘤临床治疗提供客观的监测手段。

1 材料与仪器

人乳腺导管癌 BT474 细胞、人胚胎肾细胞 HEK293 细胞和 ADC 药物（D8）[澳斯康生物（南通）股份有限公司]；DMEM 培养基、RPMI-1640（1X）培养基、胰酶、青霉素 - 链霉素双抗和磷酸盐缓冲溶液（Gibco 公司）；16 孔 E 板、实时细胞分析仪 RTCA（Agilent 公司）；细胞活力分析仪（Beckman 公司）。

2 方法

2.1 培养基配制

BT474 培养基包括 445 mL RPMI-1640 培养基，50 mL 胎牛血清（10% 终浓度），5 mL 青霉素 - 链霉素双抗（1% 终浓度）；HEK293 培养基包括 445 mL DMEM 培养基，50 mL 胎牛血清（10% 终浓度），5 mL 青霉素 - 链霉素双抗（1% 终浓度）。

2.2 细胞共培养

取生长状态良好的 Ag^+细胞（BT474 细胞）和 Ag^-细胞（HEK293 细胞），分别加入 10 mL 磷酸缓冲盐溶液润洗一次，吸掉磷酸盐缓冲溶液，加入 2 mL 0.25% 胰蛋白酶 -EDTA 溶液（T75 细胞培养瓶：1 ～ 3 mL），放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱消化 2 min（期间可镜下观察细胞被消化的程度，细胞间隙变大，变圆或脱落需及时终止消化），分别加入约 3 倍 0.25% 胰蛋白酶 -EDTA 溶液体积的细胞完全培养基终止消化。转移至离心管中，215×g 离心 5 min，弃去上清液后，用 10 mL 靶细胞完全培养基重悬细胞（可根据实际需要适当调整），轻柔吹打获得细胞悬液。取细胞悬液 600 μL，用 Vi-cell 进行细胞计数。根据细胞计数结果，取所需体积的细胞悬液，然后加入细胞完全培养基，配制成实验需要的细胞浓

度 [（0.2×10^6）±10% 个 • mL^{-1}]。细胞存活率高于 90% 才可用于实验。将 Ag^+ 细胞和 Ag^- 细胞按照 90%、75%、50%、25%、10%、0% 的具有不同阳性细胞比例混合至总体积 3 mL 备用。

2.3 xCELLigence RTCA TP 仪器时间表步骤设置

在 16 孔 E 板中加入 50 μL BT474 靶细胞完全培养基，将 16 孔 E 板放到 xCELLigence RTCA TP 上开始步骤 1，检测基线确定所选择的孔接触正常，所有孔的细胞指数（cell index，*CI*）值均未显现黄色；取出 16 孔 E 板，按照如图 1 所示在孔中加入 70 μL 混合均匀的不同 Ag^+ 细胞比例的细胞悬液，使每孔中细胞数目为 14 000 个细胞，空白孔中加入 70 μL 的培养基即可，将 16 孔 E 板置于超净台中室温放置 30 min，将 16 孔 E 板放到培养箱中的 xCELLigence RTCA TP 上，设置培养箱温度 37 ℃，CO_2 浓度 5%；开始步骤 2（检测细胞增殖曲线），55 h 后开始下一步操作。

2.4 加入 ADC 药物 D8

D8 是一种 ADC 药物，采用半胱氨酸的巯基偶联 DXd（拓扑异构酶Ⅰ抑制剂），药物抗体比（DAR）值为 8。D8 的设计采用了优化的可裂解连接子，这使得 D8 在血液系统中能够保持结构的稳定性，同时在肿瘤细胞内能够高效地释放药物。此外，由于 DXd 具有优秀的膜穿透性，D8 还能够杀伤邻近的肿瘤细胞，即所谓的“旁观者效应”。终止步骤 2，取出 16 孔 E 板，置于超净台中，将药物 D8 用 BT474 细胞培养基稀释至 20 μg • mL^{-1}，按照图 1 所示的 ADC 组加入 120 μL，最终药物的终质量浓度为 10 μg • mL^{-1}。无 ADC 组再补加 120 μL 的 BT474 培养基，空白孔中均加入 120 μL 的 BT474 培养基。将 16 孔 E 板置于 xCELLigence RTCA TP 上，设置培养箱温度 37 ℃，CO_2 浓度 5%；开始步骤 3，继续共培养 96 h，观察 D8 对阴性细胞生长的影响，可得到原始图谱，见图 2。

2.5 *CI* 值的计算方式及意义

xCELLigence 系统是一种利用微电极阵列检测细胞阻抗变化的无标记技术，能够实时、动态地反映细胞黏附和扩散的过程。该系统通过微机械加工技术，在 16 孔 E 板的每个孔底设计了一对叉指型金微电极，当细胞贴壁生长在微电极表面时，会影响电极间的电流流动，从而改变电极的阻抗值。每个时间点的 *CI* 值计算为 $CI=(Z_i-Z_0)/15$ Ohm，其中 Z_i 是实验期间各个时间点的阻抗，Z_0 是实验开始时的阻抗，该系统将阻抗值转化为无单位的 *CI*，并以时间为横轴绘制出动态的细胞增殖曲线。相关研究表明，*CI* 与细胞数量成正相关，即细胞越多，*CI* 越高，从而可以定量地评估细胞的生理功能 [17]。

2.6 重复性实验

按照上文所述的实验方法重复 3 次实验以确保结果的可靠性和一致性。根据原始数据，通过减去空白孔的 *CI*，CI_1 和 CI_2 为采用归一化 ADC 处理的孔的 *CI* 和未处理的孔的 *CI*。ADC 药物的旁杀伤率（%）= $[1-(CI_1/CI_2)]\times100\%$。

2.7 统计学分析

根据图 2 中的原始数据，通过减去空白孔的 *CI*，采用归一化法将 ADC 处理的孔的 *CI* 除以未处理的孔的 *CI* 得到 Ag^- 的活率，采用 Graphpad Prism7 对处理后的数据进行作图及统计学分析，在单个时间点（96 h）上采用单因素方差分析（One-Way ANOVA）比较组间显著性差异，实验数据以均值形式表示，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 药物 D8 对 HEK293（Ag^-）细胞存活率的影响

在具有不同细胞比例的 BT474（Ag^+）和 HEK293（Ag^-）共培养系统中，随着时间的推移，Ag^- 细胞的存活率越来越低（见图 3）。

3.2 加入药物共培养 96 h 时不同 Ag^+ 细胞比例组间的 Ag^- 细胞存活率差异比较

在 0% Ag^+ 细胞比例组中，Ag^- 细胞的存活率为基准值。随着 Ag^+ 细胞比例的增加，Ag^- 细胞的存活率逐渐降低。当 Ag^+ 细胞比例为 10% 时，Ag^- 细胞的存活率为 89.07%，与基准值的差异无统计学意义（$P=0.156$）；当 Ag^+ 细胞比例为 25% 时，Ag^- 细胞的存活率显著下降至 68.93%（$P=0.0026$）；当 Ag^+ 细胞比例为 50%、75% 和 90% 时，Ag^- 细胞的存活率分别为 35.28%、13.99% 和 12.02%，与基准值的差异有统计学意义（$P<0.05$）。当 Ag^+ 细胞比例在 25% ～ 90% 内时旁杀伤效果显著，表明不同 Ag^+ 细胞比例之间存在明显差异，并且对 Ag^- 细胞的旁杀伤结果具有显著影响。

3.3 Ag^+ 比例细胞旁杀伤率重复性实验结果

表 1 展示了在单个时间点（96 h）下，不同 Ag^+ 比例细胞旁杀伤率的共培养结果。结果显示，随着 Ag^+ 细胞比例的增加，细胞旁杀伤率逐渐升高。3 次重复实验的结果表明，不同 Ag^+ 比例细胞的旁杀伤率相对标准偏差（*RSD*）均小于 30%。

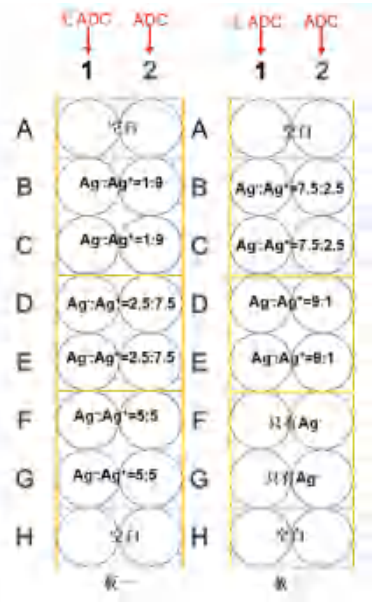

图 1　RTCA 16 孔 E 板共培养铺板方式

Fig 1　RTCA E-plate 16 co-culture plate spreading method

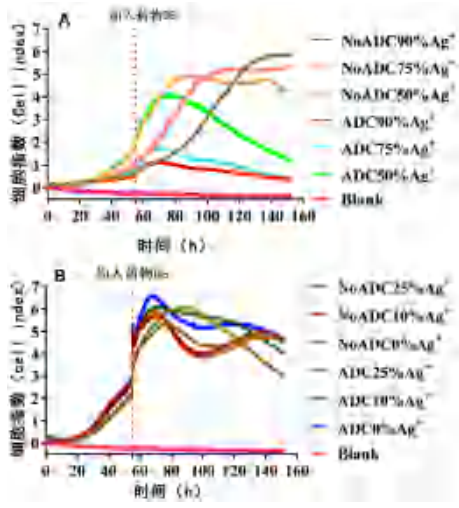

图 2　RTCA 16 孔 E 板原始图谱

Fig 2　Original plots of RTCA E-plate 16

A. 板一（plate 1）；B. 板二（plate 2）

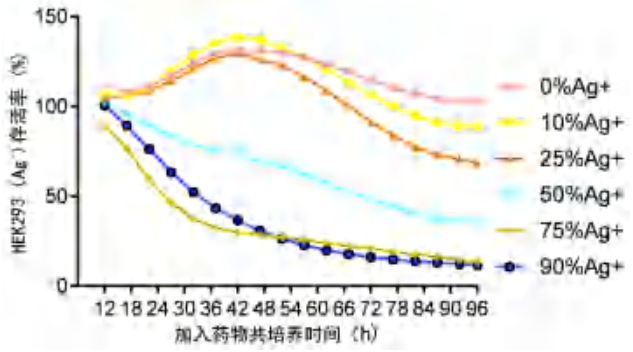

图 3　不同细胞比例的 BT474（Ag^+）和 HEK293（Ag^-）共培养系统中 Ag^-的细胞存活力

Fig 3　Ag^- cell viability in BT474（Ag^+）and HEK293（Ag^-）co-culture systems with different cell ratios

表 1　重复性实验不同 Ag^+比例细胞旁杀伤率（n = 3）

Tab 1　Bystander killing rates for different Ag^+ ratios in repetitive experiments（n = 3）

不同 Ag^+比例细胞	细胞旁杀伤率 /%			*RSD*/%
	第 1 次实验	第 2 次实验	第 3 次实验	
90%Ag^+	88.28	88.07	87.84	0.25
75%Ag^+	86.25	67.19	87.52	14.18
50%Ag^+	65.07	47.80	81.91	26.27
25%Ag^+	31.40	35.91	40.73	12.96
10%Ag^+	10.98	17.31	20.51	29.80

4　讨论

在低药物浓度下，细胞活力有时会超过 100%，这可能是由于细胞在低浓度下的代谢增加，因为这种处理可能引发应激反应而非细胞死亡。ADC 药物的添加浓度是通过早期预实验确定的，这个浓度可以达到对目标抗原 Ag^+细胞（BT474 细胞）的最大杀伤效果，同时对抗原 Ag^-细胞（HEK293 细胞）没有生长抑制作用。通过添加纯 Ag^+细胞观察药物杀伤效果，发现在本研究中使用的 10 μg • mL^{-1} ADC 浓度，82 h 共培养的纯 Ag^+细胞杀伤率达到 80% 以上，纯 Ag^-细胞杀伤率约为 2%，且由杀伤曲线趋势显示，随着共培养时间的延长，纯 Ag^+细胞杀伤率有进一步上升的趋势，因此选择此浓度进行实验[18]。

本研究显示，无论是具有不同细胞比例的 BT474（Ag^+）和 HEK293（Ag^-）共培养系统中随时间推移的 Ag^-细胞活力，还是单个时间点（96 h）的 Ag^-细胞活力以及重复性实验结果，都能很好地展现 ADC 药物的细胞旁杀伤效应。这些结果表明，RTCA 技术可用于评估 ADC 药物的旁观者效应。ADC 旁观者效应随着存在于共培养系统中的 Ag^+细胞的比例的增加而增加，旁观者效应的启动需要时间，最可能是由于 Ag^+细胞处理 ADC 以及释放的药物在相邻 Ag^-细胞中扩散所花费的时间。相关研究表明随着 Ag^-细胞群体的减少，ADC 在共培养系统中的旁观者效应可能会逐渐消失，因此，对于体内的异质性肿瘤细胞，只有在 Ag^+细胞比例较高时，才能实现显著的旁观者效应；除了抗原表达水平外，可能还存在其他因素决定这些细胞系在共培养系统中发挥旁观者效应的能力。这可能包括决定 ADC 及其成分的蛋白质等电点在细胞内生物测量的差异，例如组织蛋白酶 B 和其他蛋白酶的细胞内水平、结合成分（例如微管蛋白）的细胞内水平以及细胞膜上的外排转运蛋白（例如 P-gp）的水平。进一步了解

这些因素在确定 ADC 旁观者效应中的重要性将提高预测旁观者效应的能力[19-20]。Ag^+细胞比例为 75% ～ 90% 时，旁杀伤效率显著且变异小；然而在 10% ～ 50% 时，虽然旁杀伤效率显著，但变异增大，这种增加的变异可能是由于较低的 Ag^+细胞比例导致的细胞分布不均，进而影响了对 Ag^-细胞的杀伤作用。因此，为了确保旁杀伤效率的一致性和减少变异性，保持较高的 Ag^+细胞比例是至关重要的，除了上述原因外还可能是细胞代次和细胞活力使得每个测试孔中活细胞数量存在差异以及共培养时间过长等原因[21]。

本研究采用 RTCA 检测 ADC 药物的旁观者效应，参考了文献中的荧光强度共培养法的实验设计，计算旁杀伤率时，根据 Ag^-细胞初始比例进行了校正。但是，RTCA 技术也有一些局限性，比如两种细胞的增殖速度不同，导致细胞的比例发生变化，影响旁杀伤率的计算；RTCA 技术只适用于贴壁细胞的评估，对于悬浮细胞可能需要使用一些细胞沉降剂。尽管如此，RTCA 技术仍然显示出较好的剂量 - 效应关系。

本研究采用 RTCA 系统实时监测细胞生物学过程来评估 ADC 药物的旁观者效应；这种结合 RTCA 技术和共培养方式的方法，可以更准确地模拟旁观者效应的生物学过程。相较于传统的终点法，本方法能实时监测细胞的生长状态，并在达到理想的结果状态时停止，从而大大节省财力和物力，可为后续 ADC 药物的开发提供有价值的参考。

参考文献

[1] Sheyi R，de la Torre BG，Albericio F. Linkers：an assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate [J]. Pharmaceutics，2022，14（2）：396.

[2] Stanchina M，Soong D，Zheng-Lin B，et al. Advances in acute myeloid leukemia：recently approved therapies and drugs in development [J]. Cancers（Basel），2020，12（11）：3225.

[3] Samantasinghar A，Sunildutt NP，Ahmed F，et al. A comprehensive review of key factors affecting the efficacy of antibody drug conjugate [J]. Biomed Pharmacother，2023，161：114408.

[4] Joubert N，Beck A，Dumontet C，et al. Antibody-drug conjugates：the last decade [J]. Pharmaceuticals（Basel），2020，13（9）：245.

[5] Fu ZW，Li SJ，Han SF，et al. Antibody drug conjugate：the “biological missile” for targeted cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther，2022，7（1）：93.

[6] Pondé N，Aftimos P，Piccart M. Antibody-drug conjugates in breast cancer：a comprehensive review [J]. Curr Treat Options Oncol，2019，20（5）：37.

[7] Staudacher AH，Brown MP. Antibody drug conjugates and bystander killing：is antigen-dependent internalisation required? [J]. Br J Cancer，2017，117（12）：1736-1742.

[8] Li LX，Zhang D，Liu BL，et al. Antibody-drug conjugates in HER2-positive breast cancer [J]. Chin Med J（Engl），2021，135（3）：261-267.

[9] Okeley NM，Miyamoto JB，Zhang X，et al. Intracellular activation of SGN-35，a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate [J]. Clin Cancer Res，2010，16（3）：888-897.

[10] Singh AP，Sharma S，Shah DK. Quantitative characterization of in vitro bystander effect of antibody-drug conjugates [J]. J Pharmacokinet Pharmacodyn，2016，43（6）：567-582.

[11] Szot C，Saha S，Zhang XM，et al. Tumor stroma-targeted antibody-drug conjugate triggers localized anticancer drug release [J]. J Clin Invest，2018，128（7）：2927-2943.

[12] Wu YP，Li WT，Chen XZ，et al. DOG1 as a novel antibody-drug conjugate target for the treatment of multiple gastrointestinal tumors and liver metastasis [J]. Front Immunol，2023，14：1051506.

[13] 秦刚，徐涵文，马赛，等 . 一种 ADC 药物旁杀伤活性的检测方法：中国，114045325B [P]. 2022-04-12.

[14] Wu SJ，Shah DK. Determination of ADC cytotoxicity in immortalized human cell lines [J]. Methods Mol Biol，2020，2078：329-340.

[15] Shitara K，Iwata H，Takahashi S，et al. Trastuzumab deruxtecan（DS-8201a）in patients with advanced HER2-positive gastric cancer：a dose-expansion，phase 1 study [J]. Lancet Oncol，2019，20（6）：827-836.

[16] 侯雪芹，张晓晶，王奇，等 . 体外抗 AD 药物筛选中 MTT、Edu 和 RTCA 法的比较研究 [J]. 时珍国医国药，2015，26（3）：741-743.

[17] 王海涛，徐玉茵，周静，等 . RTCA 法用于医疗器械体外细胞毒性试验的研究 [J]. 毒理学杂志，2016，30（3）：224-226.

[18] 曹天助，牛庆田，刘兵，等 . 基于 RTCA 的 ADC 的旁观者效应检测方法：中国，116732130A [P]. 2023-09-12.

[19] Singh AP，Sharma S，Shah DK. Quantitative characterization of in vitro bystander effect of antibody-drug conjugates [J]. J Pharmacokinet Pharmacodyn，2016，43（6）：567-582.

[20] Perrino E，Steiner M，Krall N，et al. Curative properties of noninternalizing antibody-drug conjugates based on maytansinoids [J]. Cancer Res，2014，74（9）：2569-2578.

[21] Riss TL，Moravec RA，Duellman SJ，et al. Treating cells as reagents to design reproducible assays [J]. SLAS Discov，2021，26（10）：1256-1267.

（收稿日期：2023-12-28；修回日期：2024-02-26）

UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学探究苦参治疗特应性皮炎的潜在机制

陈鑫宇[1]，郭若曦[2]，王艳[1, 4, 5*]，王丽[3]，张晗[2]，王军[2]，王鹏[2]（1. 天津中医药大学，天津 301617；2. 天津尚美化妆品有限公司，天津 300381；3. 贵州国台酒业集团股份有限公司，贵州 遵义 564501；4. 现代中医药海河实验室，天津 301617；5. 天津市中药智能制药与绿色制药重点实验室，天津 301617）

摘要：目的 探究苦参醇提液经皮给药后皮肤滞留成分及入血成分，并预测其治疗特应性皮炎的潜在作用机制。**方法** 采用超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱联用（UPLC-Q-TOF-MS）技术，定性分析小鼠体内皮肤滞留成分及入血成分。通过 Swiss Target Prediction、GeneCards、OMIM 数据库获取成分、疾病靶点，通过 STRING 数据库及 Cytoscape 软件构建蛋白互作（PPI）网络，通过 DAVID 数据库进行基因本体（GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。**结果** 共推测出 18 个皮肤滞留原形成分及 4 个入血原形成分。网络药理学结果显示，关键靶点为信号传导和转录活化因子（STAT）3、蛋白激酶 B（AKT）1 等，KEGG 富集分析主要涉及磷脂酰肌醇 -3- 激酶（PI3K）-AKT 等信号通路。**结论** 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术，探究苦参潜在的药效物质基础，并结合网络药理学预测其治疗特应性皮炎的潜在作用机制，初步为苦参的进一步开发利用提供参考依据。

关键词：苦参；特应性皮炎；UPLC-Q-TOF-MS；网络药理学
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1232-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.019

Mechanism of Sophora flavescens in the topical treatment of atopic dermatitis by UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology

CHEN Xin-yu[1], GUO Ruo-xi[2], WANG Yan[1, 4, 5*], WANG Li[3], ZHANG Han[2], WANG Jun[2], WANG Peng[2]
(1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *Tianjin Shang Mei Cosmetics Co.*, *Ltd.*, *Tianjin* 300381; 3. *Guizhou Guotai Liquor Group Co.*, *Ltd.*, *Zunyi Guizhou* 564501; 4. *Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 5. *Tianjin Key Laboratory of Intelligent and Green Pharmaceuticals for Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To determine the skin retention components and blood components in the alcohol extract of Sophora flavescens after transdermal administration, and its potential mechanism for atopic dermatitis. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS was used to qualitatively analyze the skin retention components and blood components in mice. The targets of chemical components and disease were obtained through Swiss Target Prediction, GeneCards and OMIM databases. PPI network was established through STRING database and Cytoscape software. Gene Ontology (GO) function analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis were conducted by DAVID database. **Results** Totally 18 prototype skin retention components and 4 prototype blood components were identified. The network pharmacology showed that the key targets included signal transducer and activator of transcription (STAT) 3, protein kinase B (AKT) 1, etc. KEGG enrichment analysis mainly involved phosphoinositide 3-kinases (PI3K)-AKT and other signal pathways. **Conclusion** The pharmacodynamic basis of Sophora flavescens is determined by UPLC-QTOF-MS. Its potential

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：陈鑫宇，女，在读硕士研究生，主要从事中药产品开发研究，email：211293719@qq.com *通信作者：王艳，女，教授，主要从事中药产品开发研究，email：paozhijiaoxue@126.com

mechanism for atopic dermatitis is made clear by network pharmacology, providing reference for the development and utilization of Sophora flavescens.

Key words: Sophora flavescens; atopic dermatitis; UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology

特应性皮炎（atopic dermatitis，AD）是一种常见的慢性、炎症性皮肤病，患者多表现为瘙痒、红斑、皮肤增厚等症状[1]，易反复发作，严重影响患者的生活质量。AD的病因病机复杂，涉及遗传、炎症、皮肤屏障功能受损等。赵睿智[2]在中药治疗AD的组方用药规律分析中发现，苦参为高频、核心药物。苦参外用多用于治疗皮肤相关疾病，如苦参软膏、苦参凝胶、苦参酊等[3-5]。现代药理研究表明，苦参具有抗炎、抗病原微生物、抗氧化等多种药理作用[6]。但关于苦参经皮给药后皮肤滞留成分和入血成分的分析比较少见，因此本研究采用UPLC-Q-TOF-MS技术，对小鼠生物样本进行定性分析，以明确其潜在的药效物质基础，并结合网络药理学探究苦参治疗AD的潜在机制。

1　材料

1.1　试药

苦参（批号：220804101，达仁堂中药饮片有限公司），经天津中医药大学马琳教授鉴定为豆科植物苦参（*Sophora flavescens* Ait.）的干燥根。乙醇（分析级，天津市风船化学试剂科技有限公司），甲酸、乙腈（质谱级，赛默飞世尔科技有限公司），甲醇（质谱级，美国Fisher公司），超纯水（屈臣氏集团有限公司），鲸蜡硬脂醇、黄原胶（天津市博迪化工有限公司），甘油脂肪酸酯（北京索莱宝科技有限公司），橄榄油酸乙基己酯（EHO，泰安嘉岳生物化工有限公司），棕榈酸乙基己酯、维生素E［巴斯夫（中国）有限公司］，角鲨烷（Amytis公司），辛酸/癸酸甘油三酯、丁二醇（国药集团化学试剂有限公司），多元醇防腐剂（广州佰宇生物科技有限公司），月桂醇磷酸酯钾（丹东安康精细化工有限公司），甘油（天津市凯通化学试剂有限公司）。

1.2　仪器

Xevo G2-XS Q-TOF高分辨质谱仪、ACQUITY UPLC I-Class超高效液相色谱系统、ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）（美国Waters公司），MD 200-1氮吹仪（杭州奥盛仪器有限公司）。

1.3　动物

5周龄SPF级ICR雄性小鼠10只，体重20～25 g［北京华阜康生物科技有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0008］。

2　方法与结果

2.1　苦参醇提液及外用乳膏的制备

取苦参饮片50 g，加入8倍量的70%乙醇提取2次，每次1.5 h，趁热过滤，合并滤液，减压浓缩至质量浓度为1 g·mL^{-1}。

取鲸蜡硬脂醇2.6 g、甘油脂肪酸酯2.0 g、EHO 3.5 g、棕榈酸乙基己酯3.5 g、角鲨烷3.0 g、辛酸/癸酸甘油三酯1.5 g、维生素E 0.5 g、多元醇防腐剂0.5 g、月桂醇磷酸酯钾2.2 g，75 ℃水浴加热至熔化，为A相；称量甘油6.0 g、丁二醇2.0 g、黄原胶0.25 g，加入水62.45 g，搅拌均匀，为B相；称取苦参提取液10 g，95 ℃水浴加热，为C相。将B相和C相混合，电动搅拌器边搅拌边加入A相，搅拌均匀后，放置至室温即得苦参乳膏。空白基质乳膏则用等量水替代C相。

2.2　生物样本的采集

小鼠适应性饲养一周后，随机分为空白组和苦参组，每组5只。脱去背部毛发，区域为4 cm×2 cm。苦参组涂抹0.1 g苦参乳膏，空白组涂抹等量空白基质乳膏，每日涂抹2次（每日9：30、17：30），连续涂抹7 d，第7日涂抹乳膏2 h后取材。小鼠眼球取血于抗凝管中，4 ℃下12 000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液即为血浆。剥离小鼠背部皮肤，去除皮下组织及脂肪，生理盐水冲洗后保存备用。

2.3　生物样品的制备

2.3.1　血浆样品　分别精密吸取300 μL空白血浆和含药血浆于2 mL离心管内，加入3倍量甲醇，涡旋2 min，静置10 min，4 ℃下12 000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液于37 ℃下氮气吹干。残渣用100 μL 70%甲醇复溶，涡旋2 min，超声10 min，4 ℃下12 000 r·min^{-1}离心15 min，取上清液，经0.22 μm的微孔滤膜滤过，供MS分析。

2.3.2　皮肤样品　分别称取约0.1 g空白皮肤和含药皮肤，加入5倍量乙腈后剪碎，－50 ℃匀浆后涡旋2 min，超声10 min，后续离心、氮吹、复溶及涡旋操作与“2.3.1”项下相同，超声5 min，4 ℃下12 000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液，经0.22 μm的微孔滤膜滤过，供MS分析。

2.4　UPLC-Q-TOF-MS分析方法及质谱图采集

2.4.1　色谱条件　色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C18（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），流动相为0.05%甲酸水溶液（A）-乙腈溶液（B），梯

度洗脱（0 ～ 5 min，5% ～ 20%B；5 ～ 15 min，20% ～ 42%B；15 ～ 27 min，42% ～ 71%B；27 ～ 30 min，71% ～ 85%B）；流速 0.2 mL • min^{-1}；进样量 2 μL；柱温 30 ℃。

2.4.2 质谱条件 离子源为 ESI 源，正、负离子模式检测：脱溶剂气体积流量为 800 L • h^{-1}，脱溶剂气温度为 450 ℃，锥孔气体积流量为 50 L • h^{-1}，源温度为 120 ℃，正离子毛细管电压为 3 kV，负离子毛细管电压为 2 kV，锥孔电压为 40 V。

2.4.3 UPLC-Q-TOF-MS 质谱图采集 通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术，对生物样品进行定性分析，正负离子模式下样品的总离子流图（TIC）见图 1。

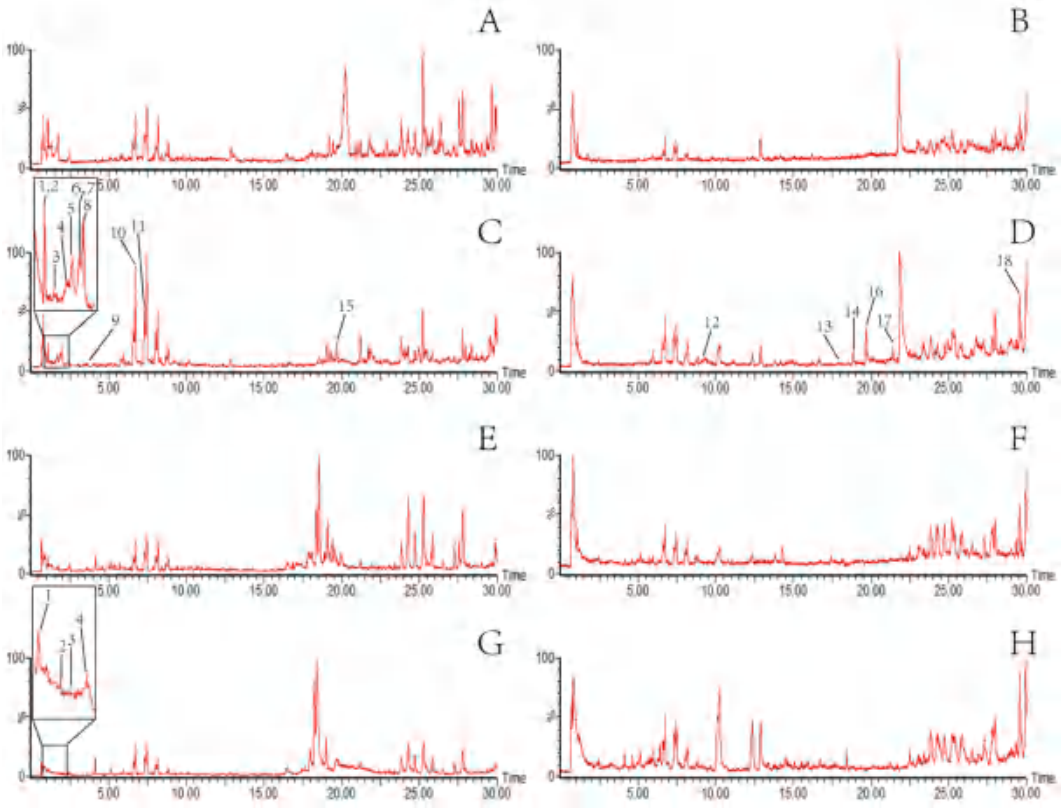

图 1 正、负离子模式下苦参皮肤及血浆样品的 TIC 图

Fig 1 TIC diagram of Sophora flavescens skin and plasma samples in positive and negative ion mode

A. 空白皮肤正离子模式（blank skin in positive ion mode）；B. 空白皮肤负离子模式（blank skin in negative ion mode）；C. 含药皮肤正离子模式（drug-contained skin in positive ion mode）；D. 含药皮肤负离子模式（drug-contained skin in negative ion mode）；E. 空白血浆正离子模式（blank plasma in positive ion mode）；F. 空白血浆负离子模式（blank plasma in negative ion mode）；G. 含药血浆正离子模式（drug-contained plasma in positive ion mode）；H. 含药血浆负离子模式（drug-contained plasma in negative ion mode）

2.5 UPLC-Q-TOF-MS 数据处理

2.5.1 化合物结构分析 检索文献，将已有文献报道的苦参成分信息进行汇总，如化合物名称、分子式、分子离子及碎片离子信息等，自建苦参质谱数据库。通过 Masslynx 4.1 对图谱数据进行解析。不同样品中具有相同的保留时间 t_R 值和 m/z 值的则被认为是同种化合物。

2.5.2 皮肤滞留原形成分及入血原形成分定性分析 依据质谱数据，对比确定了含药皮肤样品中包含 18 种皮肤滞留原形成分，见表 1；含药血浆样品中包含 4 种入血原形成分，见表 2。

2.6 网络药理学分析

2.6.1 靶点获取 通过 PubChem 数据库获取“2.5.2”项下中各成分的 SMILES 号，上传至 Swiss Target Prediction 数据库，物种选择“智人”，进行靶点检索，合并去重，最终获得 382 个成分靶点。通过 GeneCards、OMIM 数据库，以“atopic dermatitis”为关键词进行检索并去重，最终获得 2202 个疾病靶点。通过 Venny 2.1.0 在线工具将获得的成分靶点和疾病靶点进行交集，共得到 141 个交集靶点。

2.6.2 PPI 网络构建 将交集靶点上传至 STRING 数据库，物种选择“智人”，设置最低交互作用阈值为＞ 0.9，去除游离靶点，得到 PPI 网络，导入 Cytoscape 3.7.2 软件作图，见图 2。该网络中共有 106 个节点，294 条边。以度值排序，排名前 5 的靶点为 STAT3、非受体酪氨酸激酶（SRC）、PI3K 催化亚基 α（PIK3CA）、PI3K 催化亚基 δ（PIK3CD）、AKT1，预测这些靶点是苦参治疗 AD 的关键靶点。

表 1　苦参皮肤滞留原形成分

Tab 1　Prototype skin retention components of Sophora flavescens

No.	t_R/min	理论值	实测值	模式	误差值	二级碎片	分子式	鉴定成分
1	1.08	191.1178	191.1184	[M+H]	3.1394	191.1188，189.1049，162.1202，148.0482，120.7657，118.0879	$C_{11}H_{14}N_2O$	金雀花碱
2	1.08	205.1335	205.1342	[M+H]	3.4124	205.0997，191.9738	$C_{12}H_{16}N_2O$	*N*-甲基金雀花碱
3	1.36	245.1648	245.1660	[M+H]	4.8947	245.1735，186.9608，98.9877	$C_{15}H_{20}N_2O$	臭豆碱
4	1.59	249.1961	249.1975	[M+H]	5.6181	249.1974，247.1813，231.9628，176.0090，150.0591，148.0015，136.5014，112.0321	$C_{15}H_{24}N_2O$	苦参碱
5	1.67	247.1810	247.1810	[M+H]	0.0000	247.1975，176.0125，150.0709，136.5103，110.0644	$C_{15}H_{22}N_2O$	槐果碱
6	1.88	263.1754	263.1766	[M+H]	2.2798	263.1324，245.1674	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	氧化槐果碱
7	1.88	263.1760	263.1766	[M+H]	1.8999	245.1643	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	9*α*-羟基槐果碱
8	1.96	265.1916	265.1926	[M+H]	3.7709	265.1926，247.1827，205.1003，148.0038，120.0795，98.9895	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	氧化苦参碱
9	3.34	281.1859	281.1876	[M+H]	6.0458	263.1296，245.1616，221.1201，203.5698，112.0168	$C_{15}H_{24}N_2O_3$	5*α*，9*α*-二羟基苦参碱
10	6.79	171.0288	171.0293	[M+H]	2.9235	125.0718，95.0872	$C_7H_6O_5$	没食子酸
11	7.12	563.1759	563.1774	[M+H]	2.6635	350.9404，303.8455	$C_{27}H_{30}O_{13}$	苦参新醇 O
12	9.03	283.0606	283.0616	[M-H]	3.5328	283.0616，268.1165，255.0505	$C_{16}H_{12}O_5$	高丽槐素
13	17.99	441.1918	441.1926	[M-H]	1.8133	211.0961，161.9288	$C_{25}H_{30}O_7$	苦醇 Q
14	18.85	455.2070	455.2071	[M-H]	0.2197	455.1976，331.0266，279.0928	$C_{26}H_{32}O_7$	苦参啶醇
15	19.67	439.2121	439.2138	[M+H]	3.8706	409.1850，267.5862	$C_{26}H_{30}O_6$	异苦参酮
16	19.78	439.1762	439.1767	[M-H]	1.1385	192.9256	$C_{25}H_{28}O_7$	苦醇 L
17	21.32	451.2126	451.2109	[M-H]	−3.7676	367.2144，134.8915	$C_{27}H_{32}O_6$	2'-甲氧基苦参酮
18	29.56	339.1238	339.1232	[M-H]	−1.7693	339.1230，265.1563	$C_{20}H_{20}O_5$	去甲基黄腐醇

表 2　苦参入血原形成分

Tab 2　Prototype blood components of Sophora flavescens

No.	t_R/min	理论值	实测值	模式	误差值	二级碎片	分子式	鉴定成分
1	1.08	191.1178	191.1184	[M+H]	3.1394	191.0381，189.1307，148.0996，120.5872	$C_{11}H_{14}N_2O$	金雀花碱
2	1.59	249.1961	249.1973	[M+H]	4.8155	249.1968，247.1822，231.0781，176.1225，150.0611，148.07529，112.0136	$C_{15}H_{24}N_2O$	苦参碱
3	1.69	247.1810	247.1810	[M+H]	0.0000	247.0428，176.1236，150.0576，136.0806	$C_{15}H_{22}N_2O$	槐果碱
4	1.97	265.1916	265.1920	[M+H]	1.5083	247.1836，150.0591，148.0046	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	氧化苦参碱

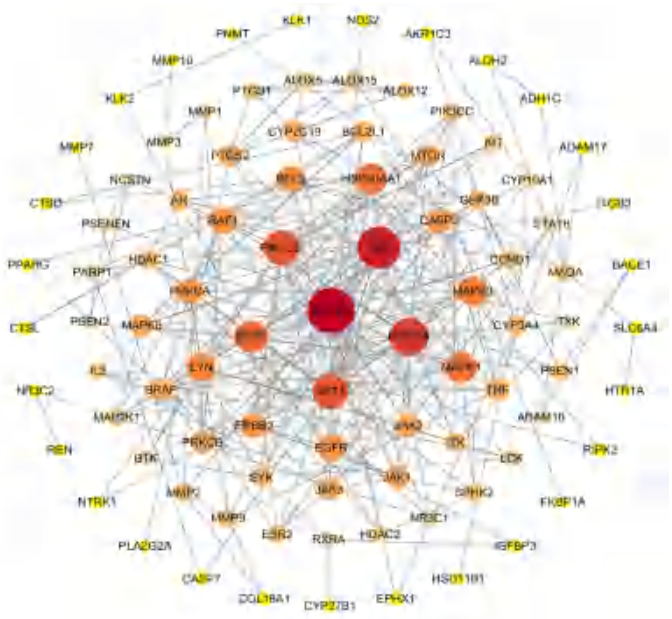

图 2　苦参与 AD 交集靶点的 PPI 网络图

Fig 2　PPI network diagram of intersection targets of Sophora flavescens and AD

2.6.3　GO 和 KEGG 富集分析　将交集靶点导入 DAVID 数据库，物种选择“智人”，进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析，筛选 $P < 0.05$ 的条目。GO 富集分析结果显示，生物过程（BP）得到 252 个条目，主要涉及丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）级联的正向调节、炎症反应等；分子

功能（CC）得到 54 个条目，主要涉及质膜、薄膜筏等；细胞成分（MF）得到 68 个条目，主要涉及内肽酶活性等，见图 3。KEGG 富集分析得到 151 个条目，主要涉及 PI3K-AKT 信号通路、ErbB 信号通路等，选取排名前 20 的条目进行展示，见图 4。

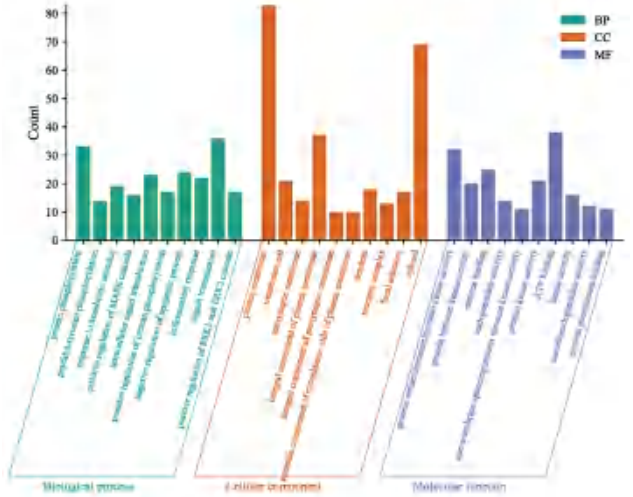

图 3 苦参与 AD 交集靶点的 GO 富集分析

Fig 3 GO enrichment analysis of intersection targets of Sophora flavescens and AD

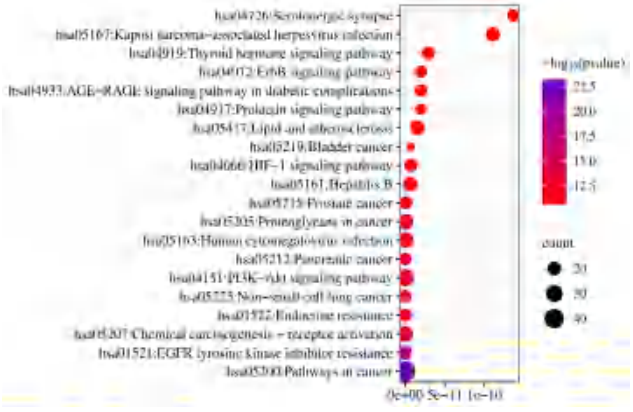

图 4 苦参与 AD 交集靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig 4 KEGG pathway enrichment analysis of intersection targets of Sophora flavescens and AD

2.6.4 药物 - 成分 - 靶点 - 通路 - 疾病网络图 将上述 20 条 KEGG 通路、141 个交集靶点以及 18 个活性成分进行联合分析，通过 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“药物 - 成分 - 靶点 - 疾病 - 通路网络图”，见图 5。

该网络共有 178 个节点，794 条边，其中苦参啶醇、苦醇 Q 等成分的度值较大，表明这些成分是作用于 AD 的重要活性成分。STAT3、AKT1、表皮生长因子受体（EGFR）等靶点及 PI3K-AKT 等信号通路度值较大，表明是参与调控 AD 的重要靶点与通路。

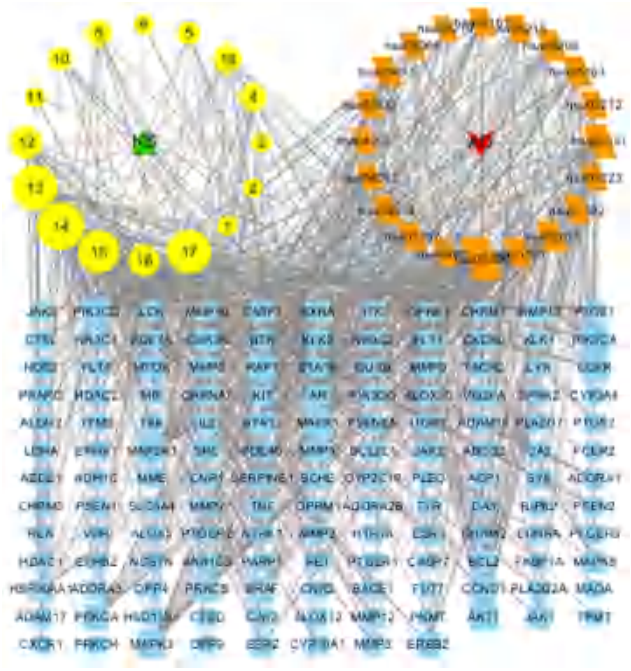

图 5 药物 - 成分 - 靶点 - 通路 - 疾病网络图

Fig 5 Network diagram of drug-component-target-pathway-disease

注：黄色圆形代表活性成分；蓝色矩形代表靶点；橙色平行四边形代表通路。

Note：Yellow circles represent the active components；blue rectangles represent the target；orange parallelograms represent the pathway.

3 讨论

AD 引起的瘙痒疼痛、睡眠障碍等症状严重影响患者的生活和心理健康，AD 相关流行病学调查显示，全球成人 AD 患病率在 2.0% ～ 17.6%[7]。临床中常外用乳膏、搽剂等药物治疗 AD[8]，经皮给药可避免肝脏首过效应与胃肠道降解，毒副作用小，使用方便。基于以上思考，本研究通过 UPLC-QTOF-MS 技术，定性分析得到小鼠体内皮肤滞留原形成分 18 个以及入血原形成分 4 个，主要为生物碱及黄酮类化合物。

药物 - 成分 - 靶点 - 通路 - 疾病网络图分析显示，苦参啶醇、苦醇 Q、苦参碱及氧化苦参碱等成分可能是苦参治疗 AD 的重要活性成分。氧化苦参碱可以减轻 AD 小鼠的皮损肿胀程度，改善皮损状况[9]，可抑制小鼠体内炎性细胞数目及细胞因子表达[10]。苦参碱及氧化苦参碱均存在较强的抗马拉色菌作用[11]，进而达到治疗或缓解 AD 的效果。苦参啶醇、苦醇 Q 对 AD 的治疗作用尚未得到证实，这为苦参治疗 AD 的作用机制给出了新的化合物预测。

PPI 网络结果显示，苦参的活性成分可能通过 STAT3、AKT1 等关键靶点发挥治疗 AD 的作用。STAT3 作为重要的炎症调控信号因子，由詹

纳斯激酶（JAK）激活并在 AD 的发病机制中发挥关键作用[12]。王丹妮等[13]研究发现氧化苦参碱可抑制 STAT3 蛋白的表达、抑制 JAK/STAT 信号通路激活，改善豚鼠银屑病样皮损。槐果碱可抑制 STAT3 及其磷酸化蛋白的表达，从而抑制炎症反应[14]。金雀花碱可抑制 STAT3 及其磷酸化蛋白的表达，发挥抗肿瘤作用[15]。

KEGG 富集分析结果显示，苦参治疗 AD 的作用靶点主要为 PI3K-AKT 信号通路，富集在该通路上的交集靶点有 EGFR、AKT1 等 31 个。PI3K-AKT 信号通路参与并调控细胞增殖、分化、凋亡等活动[16]，PI3K-AKT- 哺乳动物雷帕霉素靶点（mTOR）信号通路参与导致 AD 症状的致病机制，如表皮屏障缺陷、炎症等[17]。AKT1 参与正常角质化包膜的形成，在 AD 皮肤中聚丝蛋白的表达降低以及皮肤屏障功能受损与 AKT1 活性降低有关[18]。EGFR 可刺激表皮细胞生长，抑制炎症并加速创面愈合[19]，AD 患者的病变皮肤中 EGFR 蛋白的表达低于健康对照组[20]。贾绍华等[21]研究发现苦参碱可能通过降低 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化发挥抗肿瘤作用。杨柳等[22]研究发现氧化苦参碱血清能够抑制 PI3K 和 AKT 的磷酸化，从而抑制人肝星状细胞增殖。Lin 等[23]研究发现苦参碱可抑制背部皮肤组织中 STAT3、AKT1 和 EGFR 的 mRNA 水平。

综上所述，本研究通过液质联用技术，结合网络药理学方法，初步探索了苦参经皮给药治疗 AD 的潜在药效成分及作用机制，可为后续研究提供理论依据。但上述结论为理论推测，后续课题组会对其具体的作用机制进行进一步的动物、细胞等实验验证。

参考文献

[1] Ständer S. Atopic dermatitis [J]. N Engl J Med，2021，384（12）：1136-1143.

[2] 赵睿智 . 特应性皮炎中药治疗处方规律分析 [D]. 天津：天津中医药大学，2021.

[3] 李莉 . 苦参软膏外用治疗老年性阴道炎的临床效果观察 [J]. 内蒙古中医药，2022，41（9）：99-101.

[4] 雷娜 . 外用苦参总碱治疗轻中度寻常型银屑病疗效观察及对外周血 TNF-α、IL-17 影响研究 [D]. 济宁：济宁医学院，2020.

[5] 单丽华，张秀娟 . 苦参酊治疗尖锐湿疣的临床观察 [J]. 中医药学报，2000（1）：61.

[6] 张钟媛 . 苦参的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 云南中医中药杂志，2015，36（6）：104-106.

[7] Sacotte R，Silverberg JI. Epidemiology of adult atopic dermatitis [J]. Clin Dermatol，2018，36（5）：595-605.

[8] 王晓钰，王倩倩，张方辰，等 . 升麻素经皮给药对小鼠特应性皮炎的作用机制 [J]. 中国药理学通报，2023，39（9）：1648-1654.

[9] 刘慎 . 氧化苦参碱对 DNCB 诱发的小鼠 AD 模型的疗效观察 [D]. 大连：大连医科大学，2019.

[10] 孙赟，陈桂芳，高娟，等 . 氧化苦参碱对特应性皮炎模型小鼠的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志，2021，31（9）：10-15.

[11] 杨凡，管连城，赵泽鑫，等 . 苦参治疗特应性皮炎相关机制 [J]. 西部中医药，2020，33（11）：59-62.

[12] Bao L，Zhang HY，Chan LS. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis [J]. JAKSTAT，2013，2（3）：e24137.

[13] 王丹妮，游晓意 . 氧化苦参碱对银屑病样模型豚鼠詹纳斯激酶 / 信号转导和转录激活因子信号通路的调控作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（20）：3332-3336.

[14] 张剑美，朱雅碧，邓星，等 . 槐果碱治疗小鼠实验性结肠炎的机制研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（15）：3081-3087.

[15] 王浩 . 金雀花碱调节活性氧诱导人肺癌细胞凋亡的研究 [D]. 大庆：黑龙江八一农垦大学，2020.

[16] 秦爽，莫秀梅，陈达灿 . 基于网络药理学和蛋白模块探讨培土清心颗粒治疗特应性皮炎的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理，2021，32（2）：191-199.

[17] Mercurio L，Albanesi C，Madonna S. Recent updates on the involvement of PI3K/AKT/mTOR molecular cascade in the pathogenesis of hyperproliferative skin disorders [J]. Front Med（Lausanne），2021，8：665647.

[18] Roy T，Boateng ST，Uddin MB，et al. The PI3K-Akt-mTOR and associated signaling pathways as molecular drivers of immune-mediated inflammatory skin diseases：update on therapeutic strategy using natural and synthetic compounds [J]. Cells，2023，12（12）：1671.

[19] 戚东卫，史丙俊，唐雪勇，等 . 基于网络药理学研究甘芩治疗特应性皮炎作用机制 [J]. 中药与临床，2022，13（3）：58-60，85.

[20] Sääf A，Pivarcsi A，Winge MC，et al. Characterization of EGFR and ErbB2 expression in atopic dermatitis patients [J]. Arch Dermatol Res，2012，304（10）：773-780.

[21] 贾绍华，丁海鑫，孙萌遥，等 . 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的苦参碱诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬及其机制的研究 [J]. 食品与药品，2023，25（2）：159-163.

[22] 杨柳，张景允，韩萧萧，等 . 含氧化苦参碱大鼠血清通过阻断 PI3K/AKT 通路抑制砷对 LX2 人肝星状细胞增殖活化的刺激作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志，2022，38（7）：598-604.

[23] Lin Y，Chen XJ，He L，et al. Systematic elucidation of the bioactive alkaloids and potential mechanism from Sophora flavescens for the treatment of eczema via network pharmacology [J]. J Ethnopharmacol，2023，301：115799.

（收稿日期：2023-12-12；修回日期：2024-02-23）

UPLC-ESI-QTOF/MS 快速表征鉴定九华黄精的化学成分

吴小渊[1]，俞年军[2, 3]，邢丽花[2]，梁娟[2, 3]，韩荣春[2, 3]，朱勤[4]，胡佳贵[5]，周安[1, 3*]（1. 安徽中医药大学科研技术中心，合肥 230038；2. 安徽中医药大学药学院，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 237399；4. 池州市农业科学院，安徽 池州 247000；5. 东至县农业农村综合技术服务中心，安徽 池州 247200）

摘要：目的 采用超高效液相色谱电喷雾电离四极杆飞行时间质谱（UPLC-ESI-QTOF/MS）结合 UNIFI 软件对九华黄精中的主要化学成分进行快速表征和鉴定。**方法** 采用 ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱进行分离，柱温 30 ℃，以乙腈 - 水为流动相进行梯度洗脱，流速为 0.3 mL • min^{-1}；质谱采用正、负离子 MS^E 的全扫描模式分别采集质谱数据。**结果** 正、负离子下共表征鉴定 47 个化学成分，包括甾体皂苷类 15 个、黄酮类 8 个、有机酸类 9 个，生物碱类 4 个，氨基酸类 1 个，其他类 10 个，其中 3 个经对照品鉴定，8 种化合物为首次从九华黄精中发现。**结论** 该方法实现了九华黄精中主要化学成分的快速质谱表征和鉴定，为九华黄精的质量评价和药效物质基础研究奠定了基础。

关键词：UPLC-ESI-QTOF/MS；九华黄精；化学成分；甾体皂苷；裂解规律
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1238-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.020

Rapid identification of compositions in *Polygonatum cyrtonema* Hua by UPLC-ESI-QTOF/MS

WU Xiao-yuan[1], YU Nian-jun[2, 3], XING Li-hua[2], LIANG Juan[2, 3], HAN Rong-chun[2, 3], ZHU Qin[4], HU Jia-gui[5], ZHOU An[1, 3*] (1. *Research and Technology Center*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230038; 2. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 3.*Functional Activity and Resource Utilization on Edible and Medicinal Fungi Joint Laboratory of Anhui Province*, *Luan Anhui* 237399; 4. *Chizhou Academy of Agricultural Sciences*, *Chizhou Anhui* 247000; 5. *Dongzhi Agricultural and Rural Comprehensive Technical Service Center*, *Chizhou Anhui* 247200)

Abstract: Objective To rapidly characterize and identify the chemical compositions in *Polygonatum cyrtonema* Hua with ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF/MS) and Waters UNIFI software. **Methods** A ZORBAX SB-C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) column was used for the gradient elution with acetonitrile-water solution as the mobile phase at the flow rate of 0.3 mL • min^{-1}, and the column temperature was 30 ℃. The data were collected by scanning in both positive and negative ion modes. **Results** Totally 47 compounds were identified, including 15 steroidal saponins, 8 flavonoids, 9 organic acids, 4 alkaloids, 1 amino acid, and 10 others. Three of these compounds were accurately identified by reference compounds. **Conclusion** This method can rapidly and qualitatively analyze the chemical components in *Polygonatum cyrtonema* Hua, providing a scientific basis for elucidating its material basis and promoting quality evaluation.

Key words: UPLC-ESI-QTOF/MS; *Polygonatum cyrtonema* Hua; chemical composition; steroidal saponin; fragmentation pathway

基金项目：安徽省重大科技专项项目（No.202003a07020011）；池州市九华黄精道地性研究项目（No.CZB42022121）；安徽省高校自然科学基金项目（No.2023AH050767）。

作者简介：吴小渊，女，硕士研究生，主要从事药物分析新技术和方法研究，email：xiaoyuanwu@stu.ahtcm.edu.cn *通信作者：周安，男，教授，博士研究生导师，主要从事药物分析新技术和方法研究，email：anzhou@ahtcm.edu.cn

九华黄精又名地藏黄精[1]，为安徽省九华山区域所产多花黄精的干燥根茎。九华黄精作为安徽道地中药材和“十大皖药”之一，以肉厚、味甘者为佳，药食两用历史悠久。现代药理学研究表明，多花黄精具有降血糖[2]、抗氧化[3]、抗肥胖[4-5]、抗肿瘤[6]、抗肝纤维化[7]等多种药理活性。多花黄精富含多糖、皂苷、黄酮、生物碱、氨基酸[6]等多种化学成分，其中多糖和皂苷类成分为其主要的活性成分[5-6]。本课题组前期研究发现九华黄精提取物能够通过调节脂质代谢和肠道菌群发挥降糖、降脂效果[5, 8-9]，还对不同产地多花黄精中单糖组成进行了分析比较[10]，进一步对九华黄精炮制前后多糖类成分结构变化进行了研究[11]，发现九华黄精除多糖外，还富含多种小分子活性成分，其化学成分有待进一步研究。

超高效液相色谱电喷雾电离四极杆飞行时间质谱（UPLC-ESI-QTOF/MS）具有高分离性能、高分辨率、快速和高灵敏度等特点，广泛应用于连翘、甘草、荆芥穗等多种中药复杂成分的表征[12-14]，是中药成分强有力的分析手段。有研究将此技术用于多花黄精、滇黄精、鸡头黄精、玉竹等黄精属植物成分分析[15-16]，发现不同品种的黄精属植物化学成分种类和含量均存在差异，但该类研究忽略了道地产区独特的生态条件对中药材成分的影响，仅考虑品种优势无法解释九华黄精作为道地药材的优质性和独特性。

本研究以安徽道地药材九华黄精为研究对象，建立九华黄精 UPLC-ESI-QTOF/MS 分析方法，对其提取物正丁醇部位中化学成分进行整体表征和系统分析，根据化合物色谱保留行为、质谱裂解途径，结合 UNIFI 软件快速表征鉴定九华黄精中化学成分，为九华黄精药效物质基础的研究提供依据和参考。

1 材料

1.1 仪器

高速粉碎机（上海汗诺仪器有限公司），电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司），EX125DZH 型十万分之一准微量天平[奥豪斯仪器（常州）有限公司]，ST-16R 型高速冷冻离心机[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，RE3000A 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂），UPH-III-20TN 型超纯水机（四川优普超纯科技有限公司），KQ-500DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、Waters Xevo G2-XS 型 Q TOF/MS、Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱系统、MasslynxV4.1 工作站、UNIFI 1.8.1.073 科学信息系统（美国 Waters 公司）。

1.2 试药

甲醇（HPLC 级）和乙腈（LC-MS 级）（德国 Merck 公司）；无水乙醇、正丁醇（分析纯，江苏强盛功能化学股份有限公司）；薯蓣皂苷（纯度≥ 98.0%，批号：Y04J12Z136341）、芦丁（纯度≥ 98.0%，批号:J01IB203749）、薯蓣皂苷元（纯度≥ 98.0%，批号：C10J9Q52616）（上海源叶生物科技有限公司）；九华黄精生药材采集于安徽省池州市青阳县乐园村（30°34' N，117°58' E），经安徽中医药大学生药系俞年军教授鉴定为百合科黄精属植物多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 的干燥根茎。

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 供试品溶液配制 九华黄精经清洗、切片、烘干、粉碎、过 3 号筛后备用。称取九华黄精粉末 2.0 g 置于烧杯中，加入 40 mL 50% 乙醇超声提取 60 min（功率 360 W；频率 50 kHz），取上清液并减压浓缩得到提取物。提取物加入 15 mL 正丁醇和 15 mL 纯水，充分振荡，摇匀，离心，取上层正丁醇相（3000 r • min^{-1}，10 min）。将正丁醇部位减压浓缩后加入 2 mL 甲醇溶解，经 0.22 μm 滤膜过滤备用。

2.1.2 对照品溶液配制 分别精密称取对照品薯蓣皂苷元、芦丁、薯蓣皂苷适量，加甲醇配制成质量浓度均为 1 mg • mL^{-1} 的各对照品储备液；精密吸取各对照品储备液，混合并稀释成含各化合物质量浓度约 50 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤备用。

2.2 色谱条件

ZORBAX SB-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相为乙腈（A）和水（B），梯度洗脱（0 ～ 30 min，95% ～ 35%A；30 ～ 60 min，35% ～ 5%A）；流速 0.3 mL • min^{-1}；柱温 30 ℃；样品室温度 8 ℃；进样量 3 μL。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源以正（ESI^+）、负（ESI^-）离子模式采集数据，亮氨酸 - 脑啡肽溶液（0.2 ng • mL^{-1}）用作实时校准溶液。扫描质量范围 *m/z* 50 ～ 1200；毛细管电压 2.5 kV（ESI^-）或 3.0 kV（ESI^+）；锥孔电压为 60.0 eV，离子源和辅助气体温度分别是 120 ℃和 350 ℃。低能量设置为 6 eV，高能量 50 ～ 80 eV。数据采集由 MassLynxV 4.1 工作站控制。

2.4 数据分析方法

以黄精、化学成分等为关键词，在中国知网、

PubMed、TCMSP 等数据库中进行检索，整理黄精化学成分信息；使用 ChemDraw 19.0 绘制这些化合物的结构式，并以 MOL 文件的格式保存，形成黄精化学成分数据库。将自建库和样品质谱数据导入 UNIFI 软件进行数据自动筛查、鉴定，筛选质量误差小于 5×10^{-6} 的化合物，再结合碎片离子精确质量数和保留时间对各化合物进行人工识别和确认。

3　结果与分析

九华黄精提取液的正、负离子模式基峰色谱图（BPI 图）见图 1。通过相关文献以及对照品信息进行数据分析，对采集的正、负离子模式的九华黄精提取物高分辨质谱数据进行解析，初步表征了 47 个成分，其中甾体皂苷类化合物 15 种，黄酮类化合物 8 种，有机酸类 9 种，另有氨基酸类、生物碱类等其他成分。通过与对照品比对确证了 3 种化合物，详细信息见表 1。

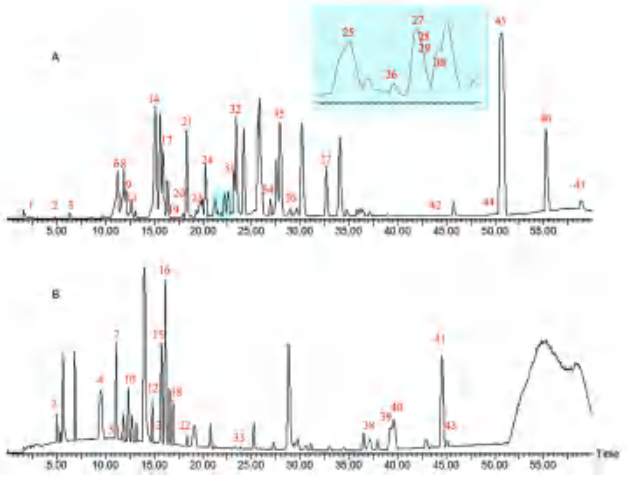

图 1　负离子模式（A）和正离子模式（B）下的九华黄精样品基峰色谱图

Fig 1　Chromatogram of the base peak of *Polygonatum cyrtonema* Hua under negative ion mode（A）and positive ion mode（B）

表 1　九华黄精化学成分表征结果

Tab 1　Chemical constituents identified of *Polygonatum cyrtonema* Hua

No.	t_R /min	化合物	加和离子	化学式	*m/z*（理论值）	*m/z*（实测值）	误差 / $\times10^{-6}$	主要碎片离子	类别
1	2.20	蔗糖 [17-18]	$[M-H]^-$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	341.1084	341.1097	3.81	179.0563，161.0449，143.0344，119.0350，113.0244，101.0233，89.0247	其他
2	4.76	黄精碱 A[19-20]	$[M-H]^-$	$C_9H_{11}NO_2$	164.0712	164.0711	− 0.61	134.0471，147.0455	生物碱类
			$[M+H]^+$	$C_9H_{11}NO_2$	166.0868	166.0863	− 3.01	148.0726，136.0741，120.0816	
3	6.31	色氨酸 [16]	$[M-H]^-$	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	203.0821	203.0815	− 2.95	159.0957，130.0672，116.0504	氨基酸类
4	9.37	6- 甲氧基 -2-（2- 苯乙基）色原酮 [21]	$[M+NH_4]^+$	$C_{18}H_{16}O_3$	299.1521	299.1509	− 4.01	281.1160，263.1038，189.0384，177.0607	其他
5	10.17	异夏佛托苷 [16]	$[M+Na]^+$	$C_{26}H_{28}O_{14}$	587.1377	587.1368	− 1.53	565.1534，547.1400，529.1337	黄酮类
6*	11.14	芦丁 [22]	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1456	609.1441	− 2.46	301.0379，193.0506，161.0475，160.0418，145.0218	黄酮类
7	11.47	LysoPE 18∶1[18]	$[M+NH_4]^+$	$C_{23}H_{46}NO_7P$	498.3434	498.3426	− 1.61	480.2927，462.2979，437.2632，421.2779，419.2560，311.1282	其他
8	11.89	*N*- 阿魏酰章鱼胺 [23]	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{19}NO_5$	328.1185	328.1176	− 2.74	310.1066，190.0522，175.0387，161.0241，135.0438，134.0590，132.0438，117.0332	生物碱类
9$^{\Delta}$	12.18	kingianoside C[24]	$[M-H]^-$	$C_{45}H_{72}O_{20}$	931.4539	931.4551	1.29	769.4137，593.1490，179.0591，161.0241	甾体皂苷类
10	12.33	穿心莲内酯 [21]	$[M-H_2O+H]^+$	$C_{20}H_{28}O_5$	331.1909	331.1920	3.32	349.2352，295.1650，249.0865，213.1526，201.1264	其他
11	12.39	水仙苷 [18]	$[M-H]^-$	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.1612	623.1592	− 3.21	593.1490，315.0508，310.1138，284.0312	黄酮类
12	14.70	2，3- 二氢 -3，5 二羟基 -6- 甲基 -4（H）- 吡喃 -4- 酮 [23]	$[M+H]^+$	$C_6H_8O_4$	145.0501	145.0502	0.69	115.0625	其他
13$^{\Delta}$	15.06	26-*O*-（*β*-D- 葡萄糖吡喃糖基）- 呋甾 -5- 烯 -3*β*，14*α*，22*α*，26- 四醇 [25]	$[M+H-H_2O]^+$	$C_{53}H_{86}O_{26}$	1121.5380	1121.5371	− 0.80	959.5421，797.7535，593.5363	甾体皂苷类
14	15.09	*N*- 反式 - 对香豆酰酪胺 [26]	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{17}NO_3$	282.1130	282.1141	3.90	174.0549，162.0564，119.04918	生物碱类
15	15.69	13- 羟基 -9，11- 十六碳二烯酸 [21]	$[M+K]^+$	$C_{16}H_{28}O_3$	307.1675	307.1671	− 1.30	207.1371，193.1597，183.1404	有机酸类
16	15.98	3-（9，12- 十八碳二烯酰基）甘油 [23]	$[M-H_2O+H]^+$	$C_{21}H_{38}O_4$	337.2743	337.2747	1.19	221.1824，147.1153，135.1149，121.1034，105.0781	其他
17	16.33	十二烷基硫酸盐 [27]	$[M-H]^-$	$C_{12}H_{26}O_4S$	265.1474	265.1486	4.53	265.1486，96.9608	其他

续表 1

No.	t_R /min	化合物	加和离子	化学式	*m/z*（理论值）	*m/z*（实测值）	误差 / $\times10^{-6}$	主要碎片离子	类别
18	17.63	狮足草碱[21]	$[M-H_2O+H]^+$	$C_{20}H_{25}NO_3$	310.1807	310.1813	1.93	328.1973，282.1359，264.1237，250.1081，204.0973	生物碱类
19	17.89	pratioside D_1[16]	[M-H]-	$C_{45}H_{70}O_{19}$	913.4433	913.4415	−1.97	751.5126，589.4317，383.1895	甾体皂苷类
20	18.24	纤细薯蓣皂苷[16]	[M-H]-	$C_{45}H_{72}O_{17}$	883.4691	883.4680	−1.25	721.5314，557.4329，145.0823	甾体皂苷类
21	18.31	disporopsin[23]	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{14}O_6$	301.0712	301.0698	−4.65	191.0344，179.0344，125.0239，121.0304，109.0284	黄酮类
22$^{\Delta}$	18.58	橙皮苷[28]	$[M+Na]^+$	$C_{28}H_{34}O_{15}$	633.1795	633.1813	2.84	593.1865，465.1312，447.1225，309.1103，285.0753	黄酮类
23	19.04	天师酸[28]	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{34}O_5$	329.2328	329.2339	3.34	293.2166，229.1428，211.1352，183.1790，171.1030，139.1130，127.1141	有机酸类
24	20.19	羟基芫花素[27]	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{12}O_6$	299.0556	299.057	4.68	245.0418，241.0138，227.0387，139.0382	黄酮类
25$^{\Delta}$	21.11	5，7-二羟基-3-（4'-羟基苄基）-苯并吡喃-4-酮[23]	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{14}O_5$	285.0763	285.0768	1.75	255.0663，243.0634，241.0487，179.0317，165.0178，151.0031，145.0307，139.0431，119.0491	黄酮类
26	21.85	cyrtonemoside A[23]	$[M-H]^-$	$C_{51}H_{80}O_{24}$	1075.4961	1075.4911	−4.65	1121.4987，913.4460，325.1855，311.1702	甾体皂苷类
27	22.18	polygodoside A[25]	$[M-H]^-$	$C_{50}H_{78}O_{23}$	1045.4856	1045.4851	−0.48	1091.4895，1081.4625	甾体皂苷类
28$^{\Delta}$	22.20	POD-II[25]	$[M-H]^-$	$C_{50}H_{80}O_{23}$	1047.5012	1047.5037	−2.39	833.5189，325.1855，179.0317，131.0513	甾体皂苷类
29	22.25	汉黄芩素[21]	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{12}O_5$	283.0606	283.0612	2.12	269.0470，161.0267，121.0282，107.0128	黄酮类
30	22.46	香草酸甲酯[27]	$[M-H]^-$	$C_9H_{10}O_4$	181.0501	181.0492	−4.97	165.0178，139.0382，121.0282	有机酸类
31	23.19	6-羟基-4-甲氧基-5-甲基-3H-2-苯并呋喃-1-酮[23]	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	193.0501	193.0506	2.59	179.0317，165.0546，151.0415，137.0265，121.0282	其他
32	23.38	5-羟甲基糠醛[23]	$[M-H]^-$	$C_6H_6O_3$	125.0239	125.0239	0.00	123.0446，109.0290，107.0128，79.0207	其他
33	23.80	4-甲氧基肉桂酸[18]	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{10}O_3$	179.0708	179.0704	−2.23	161.0591，133.0629，118.0403，107.0442	有机酸类
34	26.05	远志皂苷 F[28]	$[M-H]^-$	$C_{51}H_{82}O_{23}$	1061.5169	1061.5169	0.00	1107.5322，1099.4996，899.4464，737.4199，575.3279	甾体皂苷类
35*	27.92	薯蓣皂苷[29]	$[M-H]^-$	$C_{45}H_{72}O_{16}$	867.4742	867.4700	−4.84	721.4194，705.5510，375.3630，575.3610	甾体皂苷类
36	28.70	kingianoside A[16]	[M-H]-	$C_{39}H_{60}O_{14}$	751.3905	751.3926	2.80	589.4167，179.0924，161.0764，131.0624，113.0511	甾体皂苷类
37	33.91	（9*Z*，11*E*）-13-羟基-9，11-八十八碳二烯酸[27]	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{32}O_3$	295.2273	295.2273	0.00	277.2168，195.1357，113.0965	有机酸类
38	37.51	LysoPE 18∶2[18]	$[M+H]^+$	$C_{26}H_{50}NO_7P$	520.3403	520.3425	4.23	184.0831，282.0534，502.3298	其他
39$^{\Delta}$	39.84	呋甾-5，25（27）-二烯-1β，14α，22α，26-四醇 26-*O*-β-D-葡萄糖苷[25]	$[M+Na]^+$	$C_{33}H_{52}O_{10}$	631.3458	631.3432	−4.12	647.3149，591.3538	甾体皂苷类
40*	39.86	薯蓣皂苷元[19]	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{42}O_3$	415.3212	415.3204	1.93	271.2102，253.2017	甾体皂苷类
41	44.27	3β-羟基硬脂酸-5-烯-7-酮[30]	$[M+H]^+$	$C_{29}H_{48}O_2$	429.3732	429.3719	−3.03	427.3560，413.3400，383.3282，357.2730，345.2809，343.2573，287.1971	甾体皂苷类
42$^{\Delta}$	44.59	aspidistrin[23]	[M-H]	$C_{50}H_{80}O_{22}$	1031.5063	1031.5108	4.36	899.6064，869.5936，737.5315，575.4576	甾体皂苷类
43$^{\Delta}$	44.95	polygodoside H[29]	$[M+K]^+$	$C_{38}H_{64}O_{13}$	767.3984	767.3963	−2.74	579.3880，549.3776	甾体皂苷类
44	50.16	棕榈酸[19]	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{32}O_2$	255.2324	255.2329	1.96	237.2209，125.0353	有机酸类
45	50.62	亚油酸[19]	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{32}O_2$	279.2324	279.2318	−2.15	261.2225，205.1996，99.9262	有机酸类
46	56.40	油酸[27]	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{34}O_2$	281.2481	281.2488	2.49	282.2515，349.2356，585.4911	有机酸类
47	59.26	棕榈酸甲酯[27]	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{34}O_2$	269.2481	269.2483	0.74	255.2362，241.2203，239.2385，209.0772	有机酸类

注：*经对照品比对确认的化合物；$^{\Delta}$首次从九华黄精中报道的化合物。

Note：*Compound for comparison with control；$^{\Delta}$firstly find in *Polygonatum cyrtonema* Hua.

3.1　甾体皂苷类

甾体皂苷是黄精中研究最多的一类化合物，具有抗肿瘤、调节免疫、抗炎等药理活性[31]。甾体皂苷由甾体苷元和糖基残基缩合而成，根据 C_{25} 的构型和 F 环的环化可分为螺甾烷醇皂苷、异螺甾烷醇皂苷、呋甾烷醇皂苷和假螺甾烷醇皂苷，连接糖基部分常见葡萄糖、半乳糖、木糖、鼠李糖和阿拉伯糖[29]。甾体皂苷类在质谱中常发生糖基脱离，形成特征碎片离子，通常根据糖基的种类和数量进行化合物表征。九华黄精提取物正丁醇部位共表征鉴定出 15 种甾体皂苷，包括化合物 **9**、**13**、**19**、**20**、**26**、**27**、**28**、**34**、**35**、**36**、**39**、**40**、**41**、**42**、**43**。

化合物 **19**、**20**、**26**、**28**、**35**、**36**、**40**、**42** 属于异螺醇皂苷，该类化合物具有 25*R* 的构型，结构与螺甾烷醇皂苷相似，但化学性质更稳定，含量最多[29]。化合物 **35** 在负离子模式下显示准分子离子峰为 *m/z* 867.4700[M-H]$^-$，推测化学式为 $C_{45}H_{72}O_{16}$，准分子离子在高能量轰击下连续脱去 2 分子鼠李糖，分别得到碎片离子 *m/z* 721.4194，*m/z* 575.3610，通过与对照品比对，鉴定该化合物为薯蓣皂苷，其在负离子模式下的二级质谱图及具体的质谱裂解途径见图 2。化合物 **40** 在正离子模式下准分子离子 *m/z* 415.3204[M-H]$^-$，推测化学式为 $C_{27}H_{42}O_3$。在高能碰撞下开环得到 *m/z* 271.2102，在此基础上丢失 1 分子 H_2O 得到 *m/z* 253.2017 特征碎片，与对照品一致，鉴定该化合物为薯蓣皂苷元。

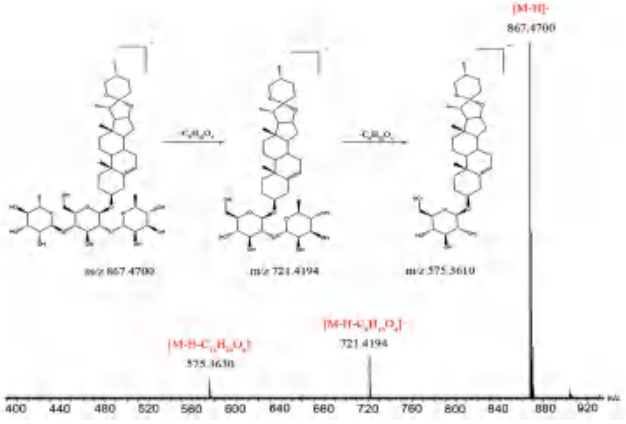

图 2　薯蓣皂苷二级质谱图及裂解途径

Fig 2　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of dioscin

化合物 **9**、**34**、**13**、**39** 属于呋甾烷醇皂苷，特征为独特的 F 开环，是螺醇类皂苷的衍生物。化合物 **13** 在正离子模式下出现准分子离子峰 *m/z* 1121.5371[M ＋ H-H_2O]$^+$，推测化学式为 $C_{53}H_{86}O_{26}$，高能量轰击下连续脱去 2 分子葡萄糖得到特征碎片 *m/z* 959.5421、797.7535，随后接着脱去 1 分子葡萄糖、1 分子半乳糖和 1 分子乙酰氧基，产生特征碎片离子 *m/z* 593.5363，结合文献[25]报道，推测该化合物 26-*O*-（*β*-D- 葡萄糖吡喃糖基）- 呋甾 -5- 烯 -3*β*，14*α*，22*α*，26- 四醇。

3.2　黄酮类

黄酮类化合物是黄精属植物中另外一类重要的化学成分，具有抗肿瘤、抗氧化、调节脂代谢[23-25]等多方面的药理作用。黄酮类化合物一般是指两个苯环通过三个碳原子相连而形成的一组化合物，是具有 C_6-C_3-C_6 结构的一系列化合物的总称，在高能碰撞下通常容易在 C 环发生逆狄尔斯 - 阿尔德反应（RDA）裂解和氢重排而产生相应特征碎片离子[19]。本研究在九华黄精中共表征鉴定出 8 种黄酮类物质，分别为化合物 **5**、**6**、**11**、**21**、**22**、**24**、**25**、**29**。

化合物 **21** 在负离子模式下产生准分子离子 *m/z* 301.0698[M-H]$^-$，二级质谱图中主要的碎片离子峰有 191.0344、109.0284、179.0344、121.0304。高能量轰击下化合物发生 *α* 裂解，得碎片离子 *m/z* 179.0344、121.0304、191.0344、109.0284，其裂解行为与文献[26]报道的 disporopsin 的裂解行为高度相似，推测化合物 **21** 为 disporopsin，其质谱图及详细裂解途径见图 3。化合物 **6** 在负离子质谱中可以观察到准分子离子 *m/z* 609.1441，推测分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$，化合物在高能轰击下脱去 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖，得到骨架碎片离子 301.0379，参照文献报道[27]确定化合物 **6** 峰苷元与黄酮苷元相同，鉴定化合物 **6** 为芦丁。

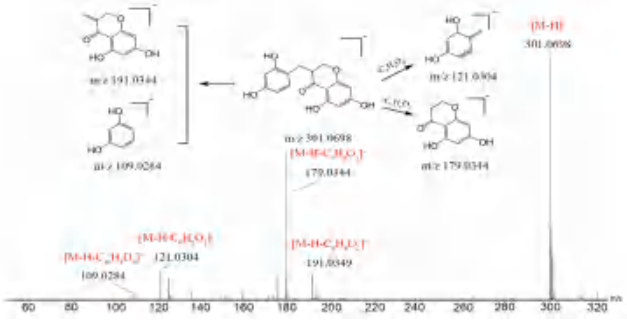

图 3　Disporopsin 二级质谱图及裂解途径

Fig 3　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of disporopsin

3.3　生物碱类

黄精属植物中含有的生物碱量较低，结构多样，按照结构可分为苯丙胺类、酰胺类、吲哚嗪类、喹啉类和噁呤类[28]。在九华黄精正丁醇部位共表征出 4 种生物碱成分，分别为化合物 **2**、**8**、**14**、**18**。

以化合物 **8** 为例进行质谱解析，其准分子离子峰 [M-H]$^-$ 为 *m/z* 328.1176，二级质谱图中主要的碎片离子峰有 *m/z* 310.1066、190.0522、175.0387、161.0241、135.0438 等，其裂解途径可归纳为 2 种：① 先脱去 1 分子 H_2O，得到碎片离子 *m/z* 310.1066，

然后发生麦氏重排裂解，分别得到碎片离子 *m/z* 134.0590、132.0438、117.0332；② 直接发生麦氏重排裂解，得碎片离子 *m/z* 135.0438、190.0522；发生 *α* 裂解，得碎片离子 *m/z* 175.0387，其再脱去 1 分子 CH_3 得到碎片离子 *m/z* 161.0241。其裂解行为与文献数据 [26] 中报道相符，可推测该物质为 *N*- 阿魏酰章鱼胺，其具体裂解途径见图 4。化合物 **2** 在正离子模式下准分子离子峰为 *m/z* $[M+H]^+$ 166.0863，高能量轰击下产生碎片离子 *m/z* 148.0726、136.0741 和 120.0816，表明有 CO、H_2O、CH_2OH 等碎片的丢失，根据文献 [29] 推测其为黄精碱 A。

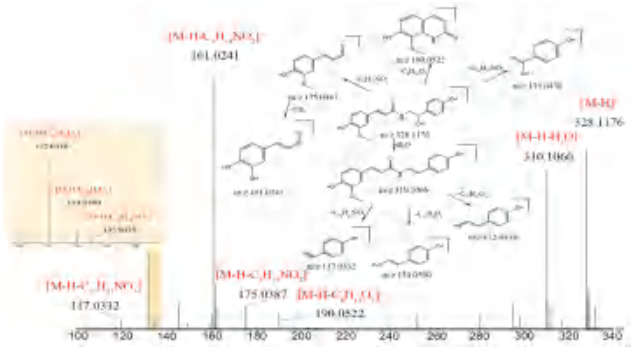

图 4　*N*- 阿魏酰章鱼胺二级质谱图及裂解途径

Fig 4　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of *N*-feruloyloctopamine

3.4　氨基酸类

氨基酸是一类同时含有氨基和羧基的化合物，高能量轰击下易丢失 CO_2、H_2O 等中性分子而形成相应特征碎片离子，本研究仅表征出 1 种氨基酸类化合物，为化合物 **3**。对其进行质谱解析，其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 *m/z* 203.0815，主要二级碎片离子有 *m/z* 159.0957、130.0672 和 116.0504，依据其质荷比及裂解行为初步推测为色氨酸，其裂解途径见图 5。

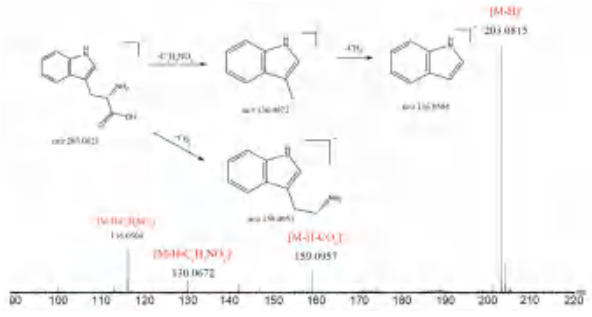

图 5　色氨酸二级质谱图及裂解途径

Fig 5　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of tryptophan

3.5　有机酸类

有机酸为带有羧基的长碳链结构，易在羧基处断裂得到碎片离子，加之有多个不饱和键，则易发生麦氏重排断裂，得到相应碎片离子 [26]。在九华黄精中表征得到了 9 个有机酸，分别为化合物 **15**、**23**、**30**、**33**、**37**、**44**、**45**、**46**、**47**。

以化合物 **45** 为例进行质谱解析，其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 *m/z* 279.2318，高能轰击下化合物脱去 1 分子 H_2O 得到碎片离子 *m/z* 261.2225，再进一步发生麦氏重排断裂得到碎片离子 *m/z* 205.1996。其裂解行为与文献数据 [26] 中报道的亚油酸的裂解行为高度相似，初步判断该化合物为亚油酸。具体裂解途径详见图 6。

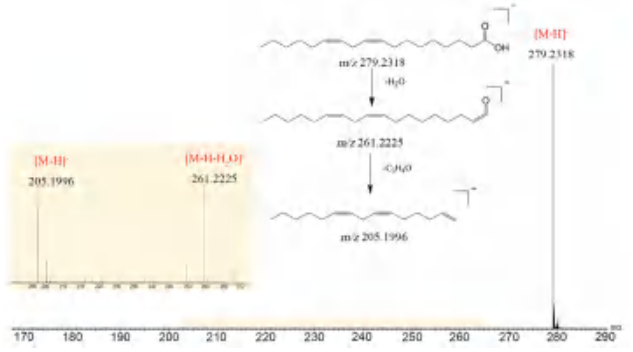

图 6　亚油酸二级质谱图及裂解途径

Fig 6　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of linoleic acid

3.6　其他

10 个其他类化合物大多属于不同成分类别，如糖类、糠醛类、酯类、酮类等。以化合物 **32** 为例进行质谱解析，负离子模式下会产生准分子离子 *m/z* 125.0239$[M-H]^-$，高能量轰击下脱去 1 分子 H_2O，产生碎片离子 *m/z* 107.0128，随后丢失中性离子 CO 得到 *m/z* 79.0207，根据文献 [26] 推测是 5- 羟甲基糠醛。5- 羟甲基糠醛是果糖或葡萄糖经加热处理降解得到的产物，多数中药经过加热的炮制过程后均会产生该化合物，其裂解途径详见图 7。

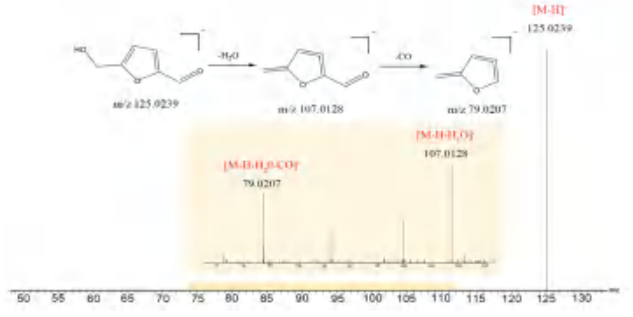

图 7　5- 羟甲基糠醛二级质谱图及裂解途径

Fig 7　MS/MS spectrum and MS fragmentation pathway of 5-hydroxymethylfurfural

4　讨论

本研究运用 UPLC-ESI-QTOF/MS 技术结合 UNIFI 软件，通过对照品和相关文献对九华黄精提取液正丁醇部位中的化学成分进行表征分析，根据保留时间、相对分子质量、碎片离子等信息，辨识出九华黄精提取物正丁醇部位中的 47 个化合物；同时分析了甾体皂苷类、黄酮类、生物碱

类等代表成分的质谱裂解规律。目前仅有学者对九华黄精水提液进行化学成分定性分析，尚无对其正丁醇部位进行定性分析。本研究实现了华黄精中主要化学成分的快速质谱表征和鉴定，丰富了九华黄精的成分信息，可为该药材质量评价及药效研究提供参考。

参考文献

[1] 彭腾，巫晓霞，李羿，等 . 黄精名称及其基原的本草考证 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（1）：75-81.

[2] 徐君，王秋丽，俞年军，等 . 多花黄精生品及九蒸品粗多糖降糖功效对比研究 [J]. 中华中医药杂志，2022，37（1）：391-394.

[3] 刘政祥，陈文军，李九九，等 . 产地和炮制次数差异对黄精多糖结构和体内抗氧化活性影响 [J]. 辽宁中医药大学学报，2023，25（5）：58-62.

[4] Liang J，Chen WD，Zong K，et al. Study on the interventional effects of *Polygonatum cyrtonema* polysaccharides on high-fat-diet-induced obese model mice through serum and liver metabolomics [J]. J Funct Foods，2022，95：105160.

[5] Liang J，Xu RJ，Zong K，et al. Structural analysis and anti-obesity effect of *Polygonatum cyrtonema* polysaccharide against obesity induced by high-fat diet in mice [J]. Int J Food Sci Technol，2021，56（9）：4473-4483.

[6] 张英朔 . 黄精皂苷的制备、抗癌活性及其机理 [D]. 合肥：合肥工业大学，2019.

[7] 刘政祥 . 基于 TLR4/MyD88/NF-κB 通路研究黄精水提物对 CCL4 诱导的小鼠慢性肝纤维化的保护作用 [D]. 合肥：安徽医科大学，2023.

[8] 刘亚鹏 . 多花黄精多糖通过调节肠道菌群减轻营养性肥胖的作用机制 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2023.

[9] 胡嘉懿 . 产业化蒸制过程中九华黄精的品质评价及降血糖作用差异研究 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2023.

[10] 徐如静，梁娟，俞年军，等 . 九华黄精炮制前后多糖类成分结构变化研究 [J]. 安徽中医药大学学报，2021，40（2）：91-96.

[11] Hu JY，Cheng H，Xu J，et al. Determination and analysis of monosaccharides in *Polygonatum cyrtonema* Hua polysaccharides from different areas by ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole trap tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci，2021，44（18）：3506-3515.

[12] 赵毅萌，张礼欣，杨舒昀，等 . 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的中药荆芥穗化学成分表征与鉴定 [J]. 中国中药杂志，2024，49（2）：420-430.

[13] 牟越，刘博，张璇，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的连翘不同部位成分分析及其抗炎活性评价 [J]. 中国中药杂志，2024，49（4）：968-980.

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

[15] 杨波，黄金月，郑时嘉，等 . 基于 UPLC-Q/TOF-MS 技术的东北黄精、多花黄精及滇黄精成分分析 [J]. 中医药学报，2022，50（10）：43-51.

[16] 赵平 . 黄精属药用植物亲缘关系及多糖的研究 [D]. 天津：天津大学，2021.

[17] Jin J，Lao J，Zhou RR，et al. Simultaneous identification and dynamic analysis of saccharides during steam processing of rhizomes of *Polygonatum cyrtonema* by HPLC-QTOF-MS/MS [J]. Molecules，2018，23（11）：2855.

[18] Lee MY，Moon BC，Kwon YK，et al. Discrimination of *Polygonatum* species and identification of novel markers using ^{1}H NMR-and UPLC/Q-TOF MS-based metabolite profiling [J]. J Sci Food Agric，2016，96（11）：3846-3852.

[19] 张莉 . 炮制前后多花黄精水提物抗氧化活性成分的比较研究 [D]. 合肥：合肥工业大学，2021.

[20] Zhang XK，Han ZZ，Yang L，et al. New alkaloids from *Polygonatum* zanlanscianense Pamp [J]. Nat Prod Res，2022，doi: 10.1080/14786419.2022.2163484.

[21] Huang ZZ，Du X，Ma CD，et al. Identification of antitumor active constituents in *Polygonatum sibiricum* flower by UPLC-Q-TOF-MS^{E} and network pharmacology [J]. ACS Omega，2020，5（46）：29755-29764.

[22] Wang J，Lu CS，Liu DY，et al. Constituents from *Polygonatum sibiricum* and their inhibitions on the formation of advanced glycosylation end products [J]. J Asian Nat Prod Res，2016，18（7）：697-704.

[23] 任洪民，张金莲，邓亚羚，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的多花黄精酒制前后化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（4）：110-121.

[24] Li XC，Yang CR，Makoto I，et al. Steroid saponins from *Polygonatum kingianum* [J]. Phytochemistry，1992，31（10）：3559-3563.

[25] Liu DY，Kikuchi T，Li W. Characterization and comparison of steroidal glycosides from *Polygonatum* Species by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Molecules，2023，28（2）：705.

[26] 陈鑫凤，张学兰，张艳雪，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析黄精炆制前后化学成分差异 [J]. 中药材，2022，45（7）：1595-1600.

[27] Luo GL，Lin JH，Cheng WQ，et al. UHPLC-Q-Orbitrap-MS-based metabolomics reveals chemical variations of two types of rhizomes of *Polygonatum sibiricum* [J]. Molecules，2022，27（15）：4685.

[28] 梁泽华，潘颖洁，邱丽媛，等 . UPLC-Q-TOF-MS^{E} 法分析黄精在九蒸九晒过程中的差异代谢物 [J]. 中成药，2022，44（1）：326-333.

[29] Xu CF，Xia BH，Zhang ZM，et al. Research progress in steroidal saponins from the genus *Polygonatum*：chemical components，biosynthetic pathways and pharmacological effects [J]. Phytochemistry，2023，213：113731.

[30] 李光达，赵红梅，帅放文，等 . 滇黄精炮制品中甾体类化学成分研究 [J]. 云南农业大学学报（自然科学），2023，38（1）：144-148.

[31] Zhao P，Zhao CC，Li X，et al. The genus *Polygonatum*：a review of ethnopharmacology，phytochemistry and pharmacology [J]. J Ethnopharmacol，2018，214：274-291.

（收稿日期：2024-01-16；修回日期：2024-02-23）

5 种不同的植物激素对白花前胡种子萌发的影响

殷齐慧[1, 2]，王胜华[1, 2]，王茂锁[1, 2]，张艳梅[2, 3]，韩邦兴[1, 2*]，查良平[1*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 皖西学院，安徽　六安　237012；3. 安徽农业大学，合肥　230038）

摘要：目的　研究生长素（IAA）、细胞分裂素（6-BA）、赤霉素（GA3）、脱落酸（ABA）和乙烯（ET）5 种植物激素对白花前胡种子萌发的影响。**方法**　以宁国产并在室温放置 12 个月的白花前胡种子为材料，把 5 种不同的植物激素均配制成 4 个梯度浓度（1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4} mg·mL^{-1}），对白花前胡种子进行浸种处理。通过培养皿萌发试验，分析种子的发芽率、根长和鲜重的变化情况。**结果**　在 4 个梯度范围内，6-BA 对白花前胡种子的生长状态整体起抑制作用。把 1×10^{-1} mg·mL^{-1} 和 1×10^{-2} mg·mL^{-1} 设置为高浓度，1×10^{-3} mg·mL^{-1} 和 1×10^{-4} mg·mL^{-1} 设置为低浓度。其中 6-BA 无论是高浓度还是低浓度均对白花前胡种子的生长状态整体起抑制作用。而 GA3 和 ET 在高浓度（1×10^{-1} mg·mL^{-1} 和 1×10^{-2} mg·mL^{-1}）及 ABA 和 IAA 在低浓度（1×10^{-3} mg·mL^{-1} 和 1×10^{-4} mg·mL^{-1}）下均对白花前胡种子的萌发率、根长和鲜重都表达出明显的促进作用。**结论**　植物激素对白花前胡种子的生长发育均有不同程度的影响，其中 ET 在 1×10^{-2} mg·mL^{-1} 时，对白花前胡种子的生长发育影响最为显著，白花前胡种子的萌发率，最大根长和最大鲜重均高于其他组。

关键词：植物激素；白花前胡；种子萌发；生长素；赤霉素；脱落酸；细胞分裂素；乙烯
中图分类号：S567.219；S668.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1245-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.021

Effect of 5 phytohormones on the germination of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds

YIN Qi-hui[1, 2], WANG Sheng-hua[1, 2], WANG Mao-suo[1, 2], ZHANG Yan-mei[2, 3], HAN Bang-xing[1, 2*], ZHA Liang-ping[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *West Anhui Institute*, *Luan Anhui* 237012; 3. *Anhui Agricultural University*, *Hefei* 230038)

Abstract: Objective　To determine the effect of 5 phytohormones [growth hormone auxin (IAA), cytokinin (6-BA), gibberellin (GA3), abscisic acid (ABA) and ethylene (ET)] on seed germination of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds was studied. **Methods**　The experiment was conducted with *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds produced in Ningguo and left at room temperature for 12 months. Five different phytohormones were prepared with 4 gradient concentrations (1×10^{-1}, 1×10^{-2}, 1×10^{-3}, and 1×10^{-4} mg·mL^{-1}), and the seeds of *Peucedanum praeruptorum* Dunn were imbibed. Changes in germination rate, root length and fresh weight of seeds in petri dish germination experiments were compared. **Results**　Over a range of 4 gradients, 6-BA overally inhibited the growth of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds. In contrast, both GA3 and ET at high concentrations (1×10^{-1} mg·mL^{-1} and 1×10^{-2} mg·mL^{-1}), and ABA and IAA at low concentrations (1×10^{-3} mg·mL^{-1} and 1×10^{-4} mg·mL^{-1}) at promoted the germination rate, root length, and fresh weight of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds. **Conclusion**　Phytohormones show different effects on the growth and development of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds. ET at (1×10^{-2} mg·mL^{-1})

基金项目：安徽省高校优秀青年科研项目（No. 2022AH030147）；皖西学院高层次人才科研启动项目（No. WGKQ202001010）。
作者简介：殷齐慧，女，在读硕士研究生，主要从事药用植物资源利用与保护研究，email：15855314770@163.com　*通信作者：韩邦兴，男，教授，博士研究生导师，主要从事药用植物资源保护与利用、中药生态农业研究，email：Hanbx1978@sina.com；查良平，女，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药资源及其质量评价研究，email：zlp_ahtcm@126.com

shows the most obvious effect on the growth and development of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds, reaching high germination rate, maximum root length and fresh weight.

Key words: phytohormones; *Peucedanum praeruptorum* Dunn; seed germination; growth hormone auxin; gibberellin; abscisic acid; cytokinin; ethylene

白花前胡又叫鸡脚前胡、官前胡等，主要分布在山东、陕西、安徽、江苏、浙江、福建、湖北、四川等地[1-3]，是比较常见的中药材，属伞形科前胡属多年生草本植物。白花前胡的用药部位主要是根部，具有疏风散热、止咳祛痰的功效[4]，临床常用于风热头痛、痰多咳喘、上呼吸道感染、胸膈胀闷、呕逆等症，药理作用表现为降血压、抗心力衰竭、抗心脑缺血、平喘、抗肿瘤等[5]。

白花前胡作为我国传统中药材，在市场上十分畅销，传统的野生资源和人工栽培前胡已经不能满足人们的需求，为此，本课题组对白花前胡进行栽培研究[6]。其中种子是植物生长最基础的材料，种子的萌发成功也是植物发展最重要的环节[7-8]。种子萌发不仅表明植物开始进入生长发育的初始阶段，也意味着进入了植物生命周期中第一个关键阶段[9]。在研究白花前胡种子萌发的过程中，我们选择对其种子的发芽特性进行相关的研究[10]。

种子的萌发率受内部因素和外部因素（种子质量、温度、空气和植物激素等）的共同调控[11]。目前，白花前胡种子的萌发率偏低是当下中药材发展存在的最大问题。本研究从以下两点入手：

一是种子质量。根据李青风等[12]的研究表明，前胡的新鲜种子在室温空气中放置很快会丧失活力，失去发芽能力，从而降低白花前胡种子的质量。二是植物激素。植物激素作为植物本身所具有的激素[13-15]，且是影响种子萌发的因素，它可以通过提高新陈代谢来对种子发育产生影响[16]。综合以上两点关于白花前胡种子萌发目前存在的问题。我们选取的种子是在自然环境下放置 12 个月的白花前胡种子。

目前我国针对白花前胡种子的萌发的研究主要集中在植物激素上，但由于植物激素的品种和浓度的不同，对白花前胡种子萌发的速率和活力也大不相同，因此有必要深入研究以及确定白花前胡种子所需最适宜植物激素及浓度，最大效益提高白花前胡的质量和产量。因此本研究采用不同浓度以及不同植物激素如生长素[17]、赤霉素[18]、脱落酸[19]、细胞分裂素[20]和乙烯[21]。对在自然环境下放置 12 个月的白花前胡种子进行浸种处理，通过测定种子的发芽率、根长和鲜重等指标，探究不同浓度及不同种类的植物激素对白花前胡种子萌发的影响，从而为今后缩短白花前胡育种周期，提高萌发率提供理论依据。

1 材料

1.1 种子

购买来源于安徽省宁国市产的白花前胡种子，种植在皖西学院白花前胡试验田中进行相关试验。2022 年 11 月对开花后的白花前胡植株进行种子采收，采收后的种子经皖西学院韩邦兴教授鉴定为宁国产白花前胡种子。把采收后的种子在自然环境下放置 12 个月，在试验前对种子进行筛选，选择无霉变、无杂质的净种子。

1.2 药物

植物激素为生长素（IAA），细胞分裂素（6-BA），赤霉素（GA3），脱落酸（ABA）和乙烯（ET）（1 mg • mL^{-1}，除菌，Phygene 公司），甲醇（色谱纯，纯度：99%，上海麦克林生化科技公司）。

1.3 仪器

十万分之一天平（青岛精诚仪器仪表有限公司 -JC-TP110-5B）；超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司 -KQ-700DB）；智能光照培养箱（合肥左科仪器设备有限公司 -GZC-300B）。

2 方法

2.1 浓度设计

每种植物激素（IAA、6-BA、GA3、ABA 和 ET）的母液设定为 1 mg • mL^{-1}。均配制成 4 个梯度浓度（1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4} mg • mL^{-1}）。

2.2 白花前胡种子的处理

选取颗粒饱满、大小相对均匀的白花前胡种子。先将种子用蒸馏水洗去表面的杂质，然后在 45 ℃恒温水中浸泡 12 h 提高种子活力，取出，沥干水分，然后把种子用 0.1% 的氯化汞消毒 10 min，去离子水冲洗 3 ～ 5 次，吸干种子表面水分，再把白花前胡种子用不同植物激素以及去离子水（对照组）分别浸种 18 h，沥干水分，均匀排列在灭过菌的培养皿（直径 9 cm，内部垫上 1 层湿润

的滤纸）中，每个处理 30 粒，进行 3 次重复。置于 20 ℃恒温培养箱中，光照 12 h/ 黑暗 12 h 培养。

2.3　*白花前胡种子的萌发率*

白花前胡种子的萌发试验为 2023 年 11 月 1 日—11 月 30 日，共 30 d。结果在 11 月 20 日（萌发 20 d），不同植物激素处理白花前胡种子的萌发率趋于稳定。因此，选取前 20 d 白花前胡种子的萌发结果作为试验数据。按时观察并记录白花前胡种子的萌发情况，当种子萌发后，胚芽长达到种子长度的一半视为萌发。发芽试验期间定期滴加蒸馏水，保持发芽环境湿润，防止水分不足影响种子萌发。

发芽率（%）=（发芽结束时总发芽种子数 / 供试种子数）×100%。

2.4　*白花前胡种子的根长*

当发芽结束后，从各处理及重复对照中取出发芽的幼苗，用游标卡尺测定根长。根长为每 1 组处理中测量根长的平均值（单位 cm，小数点保留 2 位）。

2.5　*白花前胡种子的鲜重*

当测量完根长后，用十万分之一的天平测量白花前胡根长的鲜重（g）。鲜重为每 1 组处理中测量鲜重的平均值（单位 g，小数点保留 4 位）。

2.6　*统计学方法*

使用 Origin2021 进行数据处理和制图。使用 SPSS 20.0 软件进行显著性分析，结果均数 ± 标准差表示。每个试验进行 3 次生物复制。单因素方差分析后，不同字母表示差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

3　结果与分析

3.1　*植物激素对白花前胡种子发芽率的影响*

对 5 种植物激素的标品进行了梯度稀释均配制成 4 个梯度浓度（1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3} 和 1×10^{-4} mg • mL^{-1}）并处理白花前胡种子，统计萌发率。结果不同植物激素在不同浓度下对白花前胡种子萌发作用存在明显的差异。其中 IAA 和 6-BA 在 4 个梯度浓度（1×10^{-1}，1×10^{-2}，1×10^{-3} 和 1×10^{-4} mg • mL^{-1}）中，均降低白花前胡种子的萌发率。而高浓度（≥ 1×10^{-2} mg • mL^{-1}）的 ET、ABA 和 GA3 中，除了 1×10^{-1} mg • mL^{-1} 的 ET 和 ABA 对白花前胡种子的萌发起抑制作用，其余浓度均对白花前胡种子萌发起促进作用。而低浓度（< 1×10^{-2} mg • mL^{-1}）的 ET、ABA 和 GA3 中，除了 1×10^{-3} mg • mL^{-1} 的 ET 和 GA3 对白花前胡种子萌发起抑制作用，其余浓度对白花前胡种子萌发都起促进作用（见图 1A）。其中 1×10^{-2} mg • mL^{-1} 的 ET 对白花前胡种子的萌发促进作用最大，比对照组提高了 38%，并且与对照组差异显著（见图 1B）。

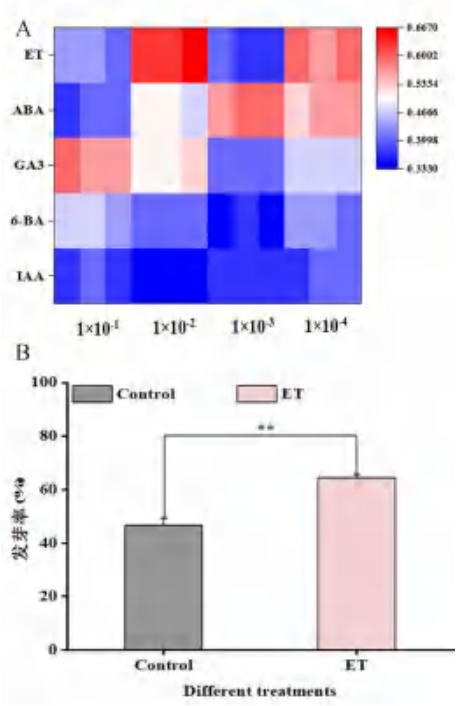

图 1　不同植物激素处理对白花前胡种子发芽率的影响

Fig 1　Effect of different phytohormones on the germination rate of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds

A. 梯度浓度植物激素处理下白花前胡种子萌发率的热图（heatmap of seed germination rate of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds under gradient concentration of phytohormone treatments）；B. 1×10^{-2} mg • mL^{-1} ET 处理下白花前胡种子发芽率柱状图分析（histogram analysis of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds under 1×10^{-2} mg • mL^{-1} ET）

注：与对照组相比，$^{**}P < 0.01$。

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

3.2　*不同植物激素处理对白花前胡种子根长的影响*

不同浓度不同植物激素处理下白花前胡种子根长存在明显差异。其中 6-BA 在各浓度下均对白花前胡种子的根长起抑制作用。GA3 在高浓度（1×10^{-1} mg • mL^{-1}）中，白花前胡种子的根长与对照组相比提高到 102.91%，其余低浓度对白花前胡的根长无影响。而 IAA 与之相反，在低浓度（1×10^{-4} mg • mL^{-1}）中，白花前胡种子的根长与对照组相比提高到 101.05%，其余低浓度对白花前胡的根长无影响。ABA 在低浓度（1×10^{-3} mg • mL^{-1} 和 1×10^{-4} mg • mL^{-1}）对白花前胡种子的根长起促进作用，且分别为对照组的 103.86% 和 105.57%；其高浓度（1×10^{-1} mg • mL^{-1}）对白花前胡的根长起抑制作用。ET 在高浓度（1×10^{-2} mg • mL^{-1}）和低浓度（1×10^{-4} mg • mL^{-1}）对白花前胡种子的根长

起促进作用，分别是对照组的 129.31% 和 101.81%，其余浓度对白花前胡根长呈现抑制作用。综上所述，1×10^{-2} mg•mL^{-1} 的 ET 对根长促进作用最为显著，是对照组的 1.29 倍（见图 2）。

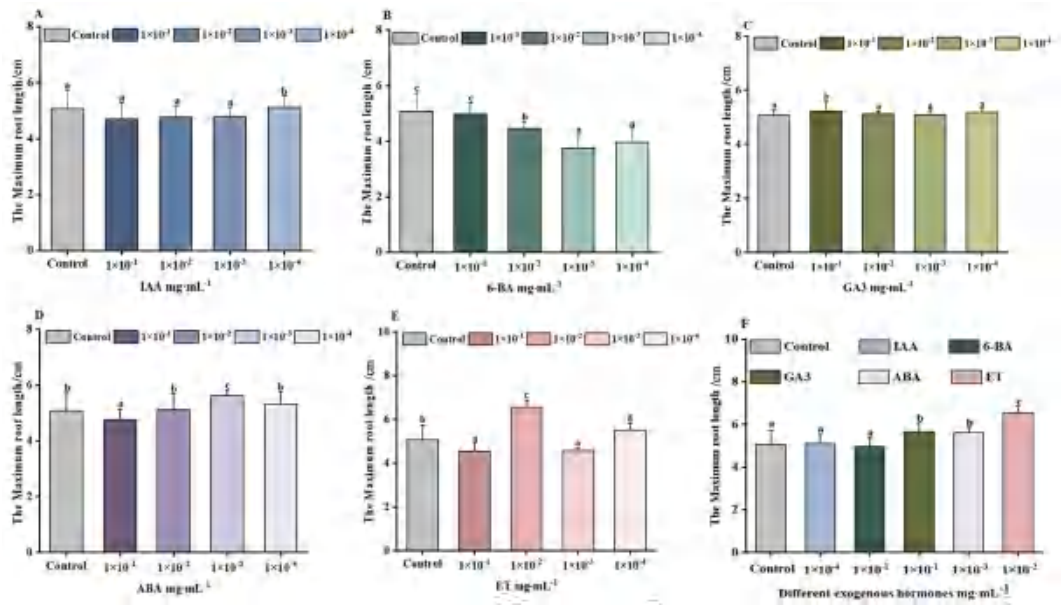

图 2　不同植物激素处理对白花前胡种子根长的影响

Fig 2　Effect of different phytohormone treatments on the root length of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds

注：不同小写字母表示不同植物激素对白花前胡种子根长的影响差异具有统计学意义（$P < 0.05$）.

Note：Lowercases in the figure indicate significant differences between phytohormones on the root length of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds（$P < 0.05$）.

3.3　不同外源激素处理对白花前胡种子鲜重的影响

不同浓度不同植物激素对白花前胡鲜重的调控作用不一样，其中 6-BA 整体对白花前胡种子的鲜重呈现抑制趋势，且随着激素浓度的增加，抑制效果越强。在 GA3 中，除了低浓度（1×10^{-3} mg•mL^{-1}）对白花前胡种子的鲜重起抑制作用，其余浓度对白花前胡的鲜重均有明显的促进作用，其中以 1×10^{-1} mg • mL^{-1} 促进效果最为显著，是对照组的 1.15 倍。而 ABA 与之相反，在低浓度（$< 1\times10^{-2}$ mg • mL^{-1}）对白花前胡种子鲜重有显著的促进作用，其中以 1×10^{-3} mg • mL^{-1} 促进效果最为显著，是对照组的 1.19 倍。IAA 和 ET 在低浓度（1×10^{-4} mg • mL^{-1}）及 ET 在高浓度（1×10^{-2} mg • mL^{-1}）对白花前胡种子的根长起明显的促进作用，且分别是对照组的 1.04 倍、1.17 倍和 1.39 倍。综上所述，1×10^{-2} mg•mL^{-1} 的 ET 对鲜重促进作用最为显著，比对照组提高了 139%（见图 3）。

4　讨论与结论

杜京旗等 [15] 研究发现，种子萌发不仅与自身生物学特性有关，而且与植物激素的种类与浓度也密切相关。可以通过促进新陈代谢来提高种子的萌发率。目前植物激素已普遍用于大豆 [22]、玉米 [23]、花生 [14] 和绿豆芽 [24] 等农作物中，大大提高了经济效益。其中植物激素 ET 具有促进果实成熟，促进根毛生长，打破某些植物种子和芽休眠等作用。刘金海等 [21] 研究发现，以国产莫拉特Ⅱ杂交臂形草种子为试验材料，采用质量浓度为 0（CK）、100、200、300、400、500 和 600 mg • L^{-1} 的 ET 溶液浸种 24 h，发现 ET 在这六种不同的浓度下均能促进种子的萌发。这与本研究使用 ET 在 100 mg • mL^{-1} 下浸种 18 h 对白花前胡种子有明显促进作用结果基本一致。本试验中对白花前胡种子促进作用最明显的是 100 mg • mL^{-1} 的 ET，而在刘金海等 [21] 的研究中，促进效果最为显著的是 400 mg • L^{-1} 的 ET，两个研究 ET 浸种的浓度和浸种时间不同，说明 ET 对种子萌发的促进作用还与种子种类、浸种时间等条件有关。因此在育种过程中，不同作物品种对同一植物生长调节剂的反应也可能存在差异，其适合的浓度应该通过试验进行研究，以保证达到最佳的作用效果。本研究结果表明：植物激素 ET 对于种子的萌发有一定的促进作用。可见在白花前胡种子萌发初始阶段，添加适量的植物激素对调控白花前胡种子的质量和生长具有极其重要的作用，可为提高白花前胡的产量和质量奠定基础，对进一步揭示和利用白花前胡资源保护和产

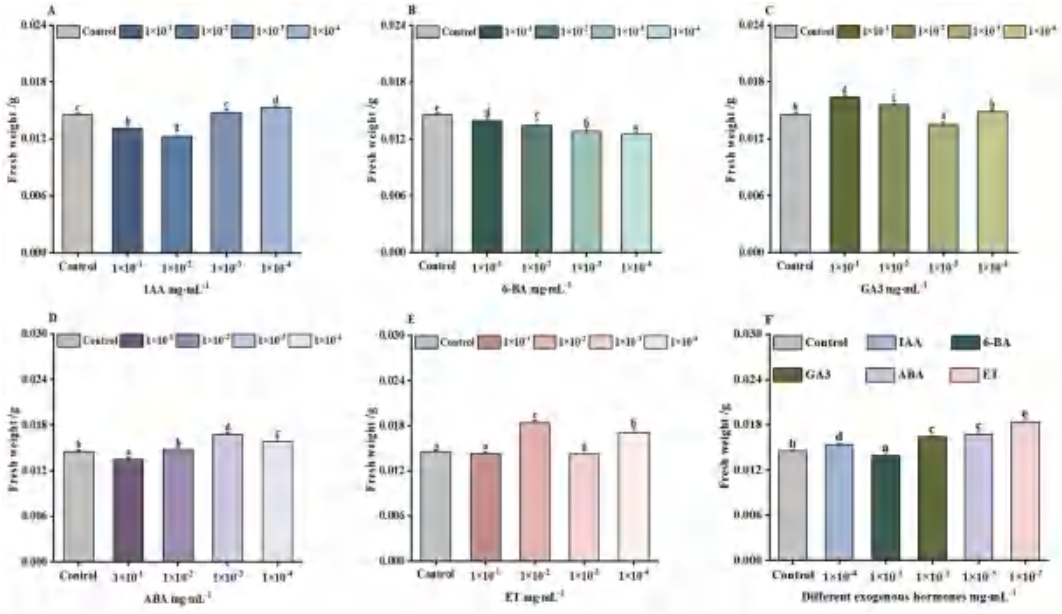

图 3　不同植物激素处理对白花前胡种子鲜重的影响

Fig 3　Effect of different phytohormones on the fresh weight of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds

注：不同小写字母表示不同植物激素处理下对白花前胡种子鲜重差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。

Note：Different lowercase letters in the figure indicate statistically significant differences in fresh weight of *Peucedanum praeruptorum* Dunn seeds under different phytohormone treatments（$P < 0.05$）.

量提升提供理论依据。

参考文献

[1] 刘佳陇，王胜升，李晓菲，等 . 白花前胡产地资源现状调研分析 [J]. 现代农业科技，2021（1）：89-92，99.

[2] 周先建，张建国，杨玉霞，等 . 四川野生白花前胡资源调查研究 [J]. 安徽农业科学，2020，48（13）：176-178.

[3] 汪康，聂竹霞，孙云鹏，等 . 白花前胡化学成分研究 [J]. 安徽中医药大学学报，2018，37（5）：83-85.

[4] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：277.

[5] 陶弘景 . 名医别录 [M]. 北京：人民卫生出版社，1986.

[6] 杨红兵，陈科力 . 白花前胡的种植技术研究及应用 [J]. 现代中药研究与实践，2013，27（1）：12-14.

[7] 田振华 . 白花前胡种子的发芽特性研究 [J]. 种子，2011，30（2）：92-93.

[8] 马婷燕，罗飞，Clement N，等 . 国内外 36 个苜蓿品种的发芽特性综合评价 [J]. 种子，2019，38（1）：44-53.

[9] 王晓龙，杨婴，李红，等 . 低温对 7 个苜蓿品种种子萌发的影响 [J]. 种子，2022，41（5）：93-97.

[10] 张启明 . 玉米种子发芽试验技术分析 [J]. 种子科技，2022，40（9）：22-24.

[11] 沈雁，杨伟波，刘蕊，等 . 植物生长调节剂及不同温度处理对油莎豆块茎萌发的影响 [J]. 西南农业学报，2010，23（5）：1464-1467.

[12] 李青风，金吉芬，白志川，等 . 不同处理方式对白花前胡种子萌发的影响 [J]. 种子，2013，32（11）：77-79.

[13] 李佳婷，高静阳，孙春雨，等 . 油莎豆快速繁殖体系的研究 [J]. 热带亚热带植物学报，2019，27（4）：446-451.

[14] 董建华，陈定光，王秉忠 . 植物激素对花生种子活力指数、过氧化物酶及可溶性蛋白质的影响 [J]. 热带作物学报，2000（2）：23-29.

[15] 杜京旗 . 外源植物激素对燕麦种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 种子，2019，38（9）：99-102.

[16] 陈如兵 . 前胡种子生物学特性、萌发技术及种植标准化研究 [D]. 杭州：浙江中医药大学，2019.

[17] 刘明，靳容，赵鹏，等 . 外源生长素调控甘薯根系响应低钾胁迫的效应 [J]. 江苏师范大学学报（自然科学版），2023，41（2）：29-34.

[18] 毛永成 . 赤霉素（GA3）对干旱胁迫下鸡冠花种子萌发的影响 [J]. 热带农业科学，2023，43（8）：13-17.

[19] 王原秀，唐博希，田慧源，等 . 脱落酸对植物芽休眠和侧枝生长的调控 [J/OL]. 分子植物育种 . https：//kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230706.1944.014.html.

[20] 莫江玲 . 外源细胞分裂素对卷丹百合籽球形成的影响 [D]. 昆明：云南大学，2022.

[21] 刘金海，徐翠，罗钦，等 . 乙烯利对国产杂交臂形草种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 云南农业大学学报（自然科学），2022，37（4）：679-683.

[22] 王玉斌，刘薇，张彦威，等 . 乙烯对大豆幼苗盐胁迫响应的调控机制研究 [J]. 大豆科学，2022，41（5）：580-587.

[23] 田文杰 . 乙烯利浸种对玉米种子萌发的影响 [J]. 现代农业科技，2018（15）：1-2.

[24] 钟群，潘祉名，余江涛，等 . 乙烯利对绿豆芽前期生长和品质的影响 [J]. 上海师范大学学报（自然科学版），2020，49（6）：650-656.

（收稿日期：2023-10-10；修回日期：2024-01-25）

记忆型双特异性 CAR-T 细胞的工艺优化研究

邹婷[1, 2]，马岩松[3]，陈泽建[4]，李长林[2]，王蓉蓉[5, 6]，唐颖鑫[4]，周文婷[4]，陈德玉[4]，周芳[4]，向双林[1, 4*]（1. 湖南师范大学生命科学学院，长沙 410081；2. 湖南省药品监督管理局，长沙 410013；3. 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心，北京 100044；4. 湖南远泰生物技术有限公司，长沙 410221；5. 湖南省药品检验检测研究院，长沙 410001；6. 细胞治疗产品关键质量属性研究湖南省重点实验室，长沙 410001）

摘要：目的 研究能够显著降低 CAR-T 细胞的体外分化程度、维持记忆型 CAR-T（CAR-Tm）细胞高浓度稳态的新工艺路径，提升和延长 CAR-T 细胞的肿瘤杀伤效果。**方法** 采用流式细胞分析（FACS）技术，对原工艺采用 CD3/CD28 磁珠分选 $CD3^+$ T 细胞，在体外培养过程中不断补充 IL-2 细胞因子，和新工艺利用 CD4/CD8 磁珠分选出 $CD4^+$和 $CD8^+$ T 细胞并用耦联人源化抗体纳米粒（TransAct）活化，在体外培养过程中添加 IL-7 和 IL-15 培养所得 T 细胞分别进行 CAR-Tm 细胞亚群分析，并通过对比不同 TransAct 用量和培养时间获得最优制备工艺。**结果** 新工艺得到的低分化记忆型 CAR-T（CAR-Tscm ＋ CAR-Tcm 亚群）细胞占总 T 细胞和 CAR-T 细胞的比例显著高于原工艺（$P < 0.05$），TransAct 的最佳用量为 20%，细胞体外最佳培养时间为 12 d。**结论** 联用 IL-7 细胞因子、IL-15 细胞因子、TransAct 有利于维持靶向 CD19/CD37 双特异性低分化 CAR-Tm 细胞高位数量和维持时间，提高持久性，为其后续临床研究及产业化奠定了基础。

关键词：CAR-Tm 细胞；白细胞介素 -7；白细胞介素 -15；耦联人源化抗体纳米粒
中图分类号：R730.51 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1250-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.022

Optimization of the process of memory dual specificity CAR-T cells

ZOU Ting[1, 2], MA Yan-song[3], CHEN Ze-jian[4], LI Chang-lin[2], WANG Rong-rong[5, 6], TANG Ying-xin[4], ZHOU Wen-ting[4], CHEN De-yu[4], ZHOU Fang[4], XIANG Shuang-lin[1, 4*] (1. *College of Life Sciences*, *Hunan Normal University*, *Changsha* 410081; 2. *Hunan Provincial Drug Administration*, *Changsha* 410013; 3. *Center for Food and Drug Inspection of NMPA*, *Beijing* 100044; 4. *Forevertek Biotechnology Co.*, *Ltd.*, *Changsha* 410221; 5. *Hunan Research Institute of Drug Testing*, *Changsha* 410001; 6. *Laboratory for Critical Quality Attributes of Cell Therapy Products*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To develop a new process to reduce the differentiation degree of CAR-T cells in vitro, maintain the high concentration steady state of memory CAR-T (CAR-Tm), and enhance and prolong the tumor-killing effect of CAR-T cells. **Methods** We used flow cytometry (FACS) technology, to conduct memory CAR-T cell subpopulation analysis of T cells with the original process from $CD3^+$ T cells which were sorted from CD3/CD28 magnetic beads, and were continuously supplemented by IL-2 cytokines in vitro, and by using the new process from $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were sorted from CD4/CD8 magnetic beads, and activated by TransAct in vitro, and were added by IL-7 and IL-15 cytokines. Then, by comparing different TransAct dosages and cultivation times, the best process was determined. **Results** The proportion of low-differentiated memory CAR-T cells (CAR-Tscm ＋ CAR-Tcm) in total T cells and CAR-T cells by the new process method was significantly higher than that by the original process ($P < 0.05$). The optimal amount of TransAct was 20%, and the optimal culture time was 12 days. **Conclusion** Combination of IL-7 cytokines, IL-15 cytokines and TransAct helps maintaing the

基金项目：湖南省科药联合基金项目（No.2022JJ80019）。
作者简介：邹婷，女，硕士研究生，主管药师，主要从事药品生产现场检查方面的研究，email：13667366967@163.com *通信作者：向双林，男，湖南省“芙蓉学者”计划特聘教授，博士研究生导师，主要从事基因功能及其调控，小分子 RNA 的功能与作用机制和核酸药物与基因治疗方面的研究，email：xshlin@hunnu.edu.cn

high levels and numbers of tduration of low-differentiated targeted CD19/CD37 dual specificity memory CAR-T cells, laying a foundation for subsequent clinical research and industrialization.

Key words: memory CAR-T cell; IL-7; IL-15; TransAct

嵌合抗原受体 T 细胞（chimeric antigen receptor T cell，CAR-T）免疫疗法是将通过基因修饰技术制备表达嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor，CAR）的 T 淋巴细胞，经体外扩增后再回输至患者体内的一种个体化治疗方法，识别肿瘤抗原不依赖于主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC），可增强效应 T 细胞的靶向性、杀伤性、持久性，已在治疗急性淋巴细胞白血病以及多发性骨髓瘤等血液系统癌症中取得了突破性进展 [1]。随着对 CAR-T 疗法研究的不断深入，近年来利用 CAR-T 细胞治疗胃癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌等实体瘤的研究相继开展。

CAR-T 细胞的治疗效果和持久性与其分化状态显著相关。现有大部分 CAR-T 细胞均是基于终末分化效应 T 细胞，使其难以在体内发挥持久的抗肿瘤效应 [2]。已有研究表明，过继输注年轻化 T 细胞能够在小鼠体内自我更新及分化，具有长期存活的能力，并展示出显著优于终末分化的效应 T 细胞的抗肿瘤能力。低分化状态的免疫细胞在临床治疗上更具应用潜力 [3-5]，记忆型 T 细胞（Tm）的分化受多种因素如转录因子、细胞因子、代谢检查点及 Micro RNA 等的调控 [6-7]。

CAR-T 细胞被相应的抗原激活后，同样成为效应 CAR-T（CAR-TE）细胞，并在受到肿瘤细胞或被感染细胞的攻击后死亡。部分活化的 CAR-T 细胞分化成记忆型 CAR-T（CAR-Tm）细胞，CAR-Tm 细胞包括几个亚群，分化状态从低到高分别为干性 CAR-Tscm、中央 CAR-Tcm、效应 CAR-Tem 和驻留 CAR-Trm 细胞。CAR-Trm 细胞仅对继发感染作出即时反应。CAR-Tscm 和 CAR-Tcm 具有较高的自我更新潜能，刺激后产生 CAR-Tem 和 CAR-TE 细胞。与 CAR-Tscm 和 CAR-Tcm 细胞相比，CAR-Tem 和 CAR-TE 细胞对靶细胞的杀伤活性较高，但 CAR-Tem、CAR-TE 和 CAR-Trm 细胞对种群扩张的潜力有限，并趋于终末分化，随后死亡或耗尽 [8]。CAR-Tm 作为适应性免疫应答形成和维持的关键细胞亚群，具有较 CAR-TE 细胞更强的增殖能力和免疫记忆维持能力，以及 CAR-TE 细胞所不具备的细胞重建能力。当 CAR-Tm 再次遇到相同抗原刺激时，更容易活化，引发快速、强烈、特异、有效的免疫应答，在机体保护性免疫中发挥重要作用。同时，CAR-Tscm、CAR-Tcm、CAR-Tem 的分化程度依次递增，但其扩增、重建能力、体内持久性、应用价值则依次降低。

综上，体外制备分化程度低的 CAR-Tm 细胞，并维持低分化 CAR-Tm 细胞（CAR-Tscm ＋ CAR-Tcm 亚群）高浓度稳态，扩增得到更多年轻化、记忆能力强的低分化 CAR-Tm 细胞，是本研究重点探讨的问题。

1　材料

1.1　生物原材料

全血（患者自体）；外周血单个核细胞（PBMC，全血分离）；人胚肾细胞（HEK 293TS，WCB20210312PD17，远泰生物）。

1.2　化学原材料

杜氏磷酸盐缓冲盐溶液（DPBS，批号：2428796，Thermo Fisher 公司）；淋巴细胞分离液（Ficoll，GE Healthcare 公司）；造血干细胞培养基（Xvivo-15，批号：21MB073，Lonza 公司）；CD3/CD28 磁珠（批号：A2-012003E，Thermo Fisher 公司）；注射用重组人白细胞介素 -2（IL-2，批号：20230408-1）、注射用重组人白细胞介素 -15（IL-15，批号：5211204878，四环生物制药）；注射用重组人白细胞介素 -7（IL-7，批号：6211100118）、耦联人源化抗体纳米粒（TransAct）（批号：6211100274）、TexMACS 培养基（批号：7210400012）、磷酸缓冲盐＋乙二胺四乙酸缓冲液（PBS ＋ EDTA）、FACS 缓冲液、CD4 磁珠、CD8 磁珠（美天旎公司）；免疫血清替代物（ICSR，批号：2390243，Thermo Fisher 公司）；注射用水（批号：K23042002，科伦制药）；PEI 转染试剂（批号：20220322，Polysciences Inc）；Biotin-FMC63 抗体（批号：20220504，远泰生物）。

1.3　仪器

生物安全柜（江苏苏净集团有限公司）；低速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；移液器（德国 Eppendorf 公司）；倒置显微镜（麦克奥迪实业集团有限公司）；程序降温仪（美国赛默飞世尔科技公司）；流式细胞仪（安捷伦科技有限公司）；RTCA 实时细胞分析仪（美国 ACEA 公司）；分离柱、分选器（美天旎公司）。

2 方法

2.1 CAR 结构载体质粒合成和慢病毒的制备

编码靶向 CD19/CD37 双特异性 CAR 的慢病毒载体质粒由 Promab，USA 设计合成，GMP 级 KanR 抗性包装质粒由湖南远泰生物技术有限公司提供。采用 CD19/CD37 双特异性 CAR 载体质粒以及 P004、P005、P006 三种包装质粒的四质粒系统，与 PEI 转染试剂混合后，瞬时转染人胚肾（HEK 293TS）细胞，转染 48 h 后收获 HEK 293TS 细胞培养上清液收毒；粗毒液经超滤、凝胶柱层析获得纯化的慢病毒原液。病毒原液过滤，分装，于－ 80 ℃冰箱保存。

2.2 CAR-T 细胞制备工艺

取外周血离心，获得上层血浆。血浆经 56 ℃灭活 30 min，冰浴 10 min，离心获得上清液，即灭活血浆。用 DPBS 稀释剩余血液，轻轻吹打混匀，每管加入 20 mL Ficoll，将稀释血液缓慢加至 Ficoll 分离液上层，离心。吸弃白膜层上方的血浆 /DPBS，获得白膜层，加入 DPBS 清洗，离心。加入 DPBS 重悬，计数。

原工艺：取适量 PBMC 细胞悬液，离心去上清，加入 Xvivo-15，与 CD3/CD28 磁珠混合，调整细胞密度至 1.0×10^7 个 • mL^{-1}，室温低速旋转孵育 30 min。置于磁力架上静置，获得磁珠 -$CD3^+$ 阳性细胞。加入与孵育时等体积的 Xvivo-15 静置去磁化，重复操作两次。用 CAR-T 细胞培养基（Xvivo-15 ＋自体血浆＋ IL-2）重悬，计数，调整细胞密度至 1.0×10^6 个 • mL^{-1}，继续培养。T 细胞激活 24 h 后，按照感染复数（MOI）＝ 2 加入慢病毒对 T 细胞进行转导，隔日对 CAR-T 细胞进行补液，后续每隔 2 d 加入相应 CAR-T 细胞培养基对其进行扩大培养，直至收获细胞。

新工艺：取适量 PBMC 细胞悬液离心。用 PBS ＋ EDTA buffer 重悬细胞，离心。加入 buffer、CD4 磁珠、CD8 磁珠，室温旋转孵育 15 min。将磁珠 - 细胞悬液加到安装在 miniMACS 分选器上的分离柱中，结合磁珠的 T 细胞被吸附到柱子上。通过分离柱和 miniMACS 分选器将结合磁珠的细胞和 buffer 冲洗出来，离心。用 TexMACS 培养基润洗细胞，离心。用 CAR-T 细胞培养基（TexMACS 培养基＋ ICSR ＋ IL-7 ＋ IL-15）重悬细胞，计数，加入 TransAct 活化，补充培养基至细胞密度为 1.0×10^6 个 • mL^{-1}，继续培养。T 细胞激活 24 h 后，按照 MOI ＝ 2 加入慢病毒对 T 细胞进行转导，后续每隔 2 d 加入相应 CAR-T 细胞培养基对其进行扩大培养，直至收获细胞。

2.3 流式细胞术（FACS）检测 CAR-T 细胞表面标记抗原

结合本实验 CAR-T 细胞产品的特点，参考记忆型 T 细胞表面抗原标记信息（见表 1），根据各抗原表达丰度、荧光强弱等，建立流式分析方法，对 CAR-Tm 进行亚群分析。具体步骤：取 2×10^5 个细胞，用 FACS 缓冲液清洗，离心。室温封闭 10 min。每管加入 Biotin-FMC63 抗体，4 ℃孵育 30 min，然后加入 FACS 缓冲液，离心。每管加入各荧光抗体试剂，4 ℃孵育 30 min，加入 FACS 缓冲液，离心。用 FACS 缓冲液重悬，加入死活染料，室温避光孵育 5 min，置于 4 ℃，1 h 内完成流式上机。

表 1 记忆性 T 细胞的表面抗原标记信息

Tab 1 Surface antigen labeling information of Tm

细胞	亚群	CD3T 淋巴细胞	CD45RO 应激后淋巴细胞	CD62L 归巢因子受体	CD95TNF 受体家族成员
T 细胞	Tn	＋	－	＋	－
	Tscm	＋	－	＋	＋
	Tcm	＋	＋	＋	＋
	Tem	＋	＋	－	＋
	Teff	＋	－	－	＋

2.4 CAR-T 细胞体外杀伤效果检测

采用 RTCA 实时细胞分析系统进行 CAR-T 细胞体外杀伤效果检测，针对 CD19/CD37 特异性 CAR-T 细胞（C930）选择了两种过表达靶向抗原的靶细胞，以验证基于新工艺制备的 CAR-T 的体外杀伤效应。靶细胞铺板数量确定原则为：铺板 24 h 内一直处于对数生长期，在 48 h 实验结束时应接近或处于平台期。靶细胞铺板后 24 h 添加效应细胞，继续运行 24 h，计算 C930 细胞的杀伤效率。计算公式如下：

C930 杀伤效率（%）＝（Mock-T $NCI_{48\,h}$ － C930 $NCI_{48\,h}$）/（Mock-T $NCI_{48\,h}$）×100%

其中，Mock-T：未转导 T 细胞；NCI_{48h}：未转导 T 细胞的 48 h 归一化细胞指数。

2.5 统计分析

采用 Graphpad prism 软件对新、原工艺制备的各组记忆型 CAR-T 细胞比例进行非配对 t 检验，除培养细胞总数未达检测限的组别外，未排除其他任何异常值。同时，对靶向 CD19/CD37 双特异性 CAR-T 细胞和 Mock-T 细胞对靶细胞杀伤率数据对比进行多重 *t* 检验，未排除任何异常值。所有检验的显著性阈值均设定为 $P < 0.05$。

3 结果

3.1 两种 CAR-T 细胞制备工艺低分化 CAR-Tm 细胞的占比情况分析

采集两例淋巴瘤患者的单采血，通过原工艺、新工艺制备 CAR-T 细胞，对比两种工艺 T 细胞流式检测表型结果。图 1、表 2 结果显示：两种工艺 CAR-Tm 细胞数量占总 T 细胞比例较为接近，无显著差异；但新工艺 CAR-Tm 细胞数量占 CAR-T 细胞比例较原工艺有所提高；同时，新工艺的 CAR 阳性 T 细胞占总 T 细胞比例也有所增加。表 3 结果显示：经多重 *t* 检验分析，新工艺的低分化 CAR-Tm 细胞占总 T 细胞量比例和占 CAR-T 细胞量的比例显著高于原工艺（$P < 0.05$）。

表 2　基于新、原工艺制备的两例 IIT 项目 CAR-T 细胞的细胞表型结果 (%)

Tab 2　Cell phenotypes of two CAR T cells of IIT projects based on the new and the original process (%)

供者	工艺	采血天数	CAR 阳性 T/T 细胞总量	CAR-Tc/T 细胞总量	CAR-Th/T 细胞总量	CAR-Tm/T 细胞总量	CAR-Tm/CAR-T 细胞量	低分化 CAR-Tm/T 细胞总量	低分化 CAR-Tm/CAR-T 细胞量
Donor1	原工艺	D10	22.9	14.6	8.4	22.1	96.4	7.9	34.6
		D12	23.1	17.8	5.3	22.3	95.7	6.0	26.0
	新工艺	D10	28.9	15.5	13.5	27.8	95.8	21.3	73.2
		D12	26.5	15.8	10.7	25.4	95.7	18.4	69.3
Donor2	原工艺	D10	22.6	4.9	17.8	22.5	99.7	11.4	50.6
		D12	20.3	4.8	15.6	20.3	99.9	9.9	48.5
	新工艺	D10	56.6	15.5	41.2	56.5	99.8	37.8	66.7
		D12	54.9	13.6	41.3	54.9	100.0	35.2	64.1

表 3　新、原工艺低分化 CAR-Tm 细胞占比显著性分析结果

Tab 3　Significance of low-differentiated CAR-Tm cells by the new and the original process

供者	采血天数	低分化 CAR-Tm/T 细胞总量 /%			低分化 CAR-Tm/CAR-T 细胞量 /%		
		原工艺	新工艺	*P*	原工艺	新工艺	*P*
Donor1	D10	7.9	21.3	0.0141	34.6	73.2	0.0302
	D12	6.0	18.4		26.0	69.3	
Donor2	D10	11.4	37.8		50.6	66.7	
	D12	9.9	35.2		48.5	64.1	

3.2　T 细胞激活剂 TransAct 对 CAR-T 细胞制备的影响

进一步对新工艺参数进行优化，评价 T 细胞激活剂 TransAct 用量与 CAR-T 细胞质量关系。将同一供者外周血来源的起始 T 细胞分成体积相同的 5 组，等比递减 TransAct 量分别加入各组 T 细胞后进行体外培养。表 4、图 2 数据显示：体外培养 9 d，组别 1 ～ 5 的低分化 CAR-Tm 细胞占 CAR-T 细胞量的比例表现出些许差别，随着 TransAct 用量降低，各组 CAR-T 细胞扩增总倍数逐渐降低，但 CAR-Tm 细胞比例都在 98% 以上。综合考虑 CAR-Tm 占总 T 细胞比例、占 CAR-T 细胞量的比例以及低分化 CAR-Tm 占总 T 细胞比例、占 CAR-T 细胞量的比例，得到组别 3 TransAct 20% 用量相对较优。

表 4　不同用量 TranscAct 制备的 CAR-T 细胞在第 9 日的表型结果

Tab 4　Phenotypes of CAR T cells prepared with different amounts of TranscAct on day 9

组别	TransAct 用量 /%	扩增倍数	CAR 阳性 T/T 细胞总量 /%	CAR-Tc/T 细胞总量 /%	CAR-Th/T 细胞总量 /%	CAR-Tm/T 细胞总量 /%	CAR-Tm/CAR-T 细胞总量 /%	低分化 CAR-Tm/T 细胞总量 /%	低分化 CAR-Tm/CAR-T 细胞量 /%
1	80	173	21.4	11.2	10.2	21.4	100.0	21.3	99.6
2	40	123	27.4	10.9	16.5	27.4	99.7	27.2	99.0
3	20	117	30.0	8.2	21.8	29.9	99.7	29.4	97.8
4	10	54	39.3	7.6	31.7	38.9	98.8	36.1	91.7
5	5	15	26.1	4.7	21.4	25.8	99.0	24.5	93.9

3.3　CAR-T 细胞最佳体外培养时间研究

为研究体外培养时间对 CAR-T 细胞的影响，分别在第 6 日、10 日、13 日对基于新工艺制备的 CAR-T 细胞进行取样，检测 CAR-Tm 细胞表型。表 5 数据显示到第 13 日时，CAR-Tm 细胞占 T 细胞总量比例随培养时间仍在扩增，但 CAR-Tm 细胞量占 T 细胞比例，特别是低分化 CAR-Tm 细胞占 T 细胞总量、占 CAR-T 细胞总量的比例，在第 6 ～ 10 日明显增加，第 10 ～ 13 日有所下降，说明第 10 日后 CAR-T 细胞随着体外培养时间延长逐渐

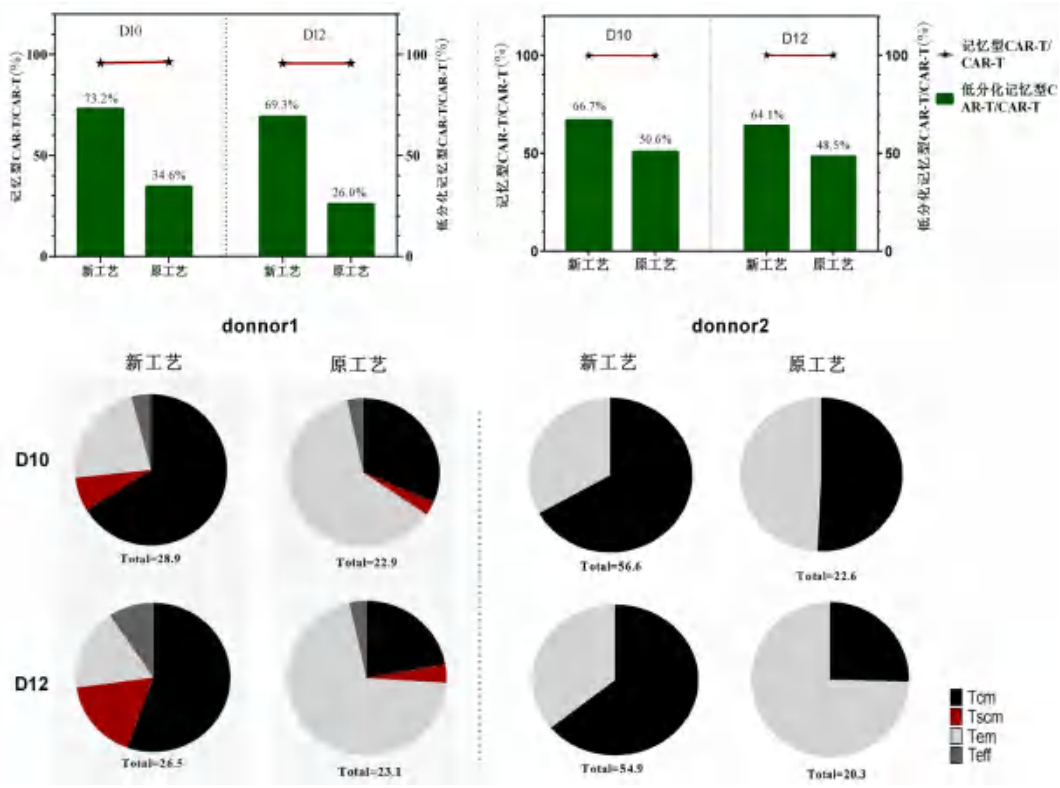

图 1 基于新、原工艺制备的两例探索性临床研究（IIT）项目 CAR-T 细胞的比例及细胞表型结果

Fig 1 Cell phenotypes of two IIT projects CAR-T cells prepared with both the new process and the original process

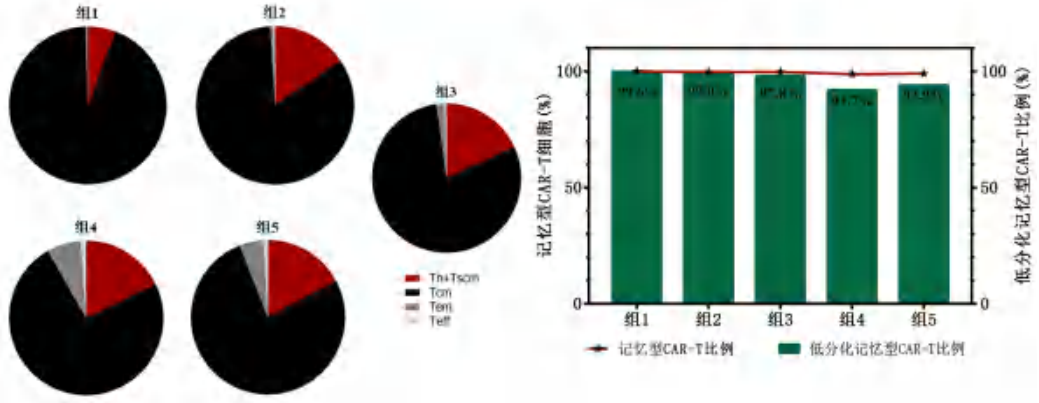

图 2 加入不同用量的 TransAct 制备的 CAR-T 细胞表型及比例

Fig 2 Phenotypes of CAR-T cells prepared with variant levels of TransAct

表 5 新工艺制备的 CAR-T 细胞在三个时间点的表型结果 (%)

Tab 5 Phenotypes of CAR-T cells at three time points (%)

时间	CAR 阳性 T/T 细胞总量	CAR-Tc/T 细胞总量	CAR-Th/T 细胞总量	CAR-Tm/T 细胞总量	CAR-Tm/CAR-T 细胞总量	低分化 CAR-Tm/T 细胞总量	低分化 CAR-Tm/CAR-T 细胞量
D6	42.1	8.7	33.5	41.4	98.2	18.5	44.3
D10	52.2	23.1	29.1	51.5	98.6	43.7	83.7
D13	56.0	37.1	18.9	53.2	95.1	37.9	67.9

分化，综合考虑 CAR-Tm 细胞总体扩增情况，得到 CAR-T 细胞体外培养最佳体外培养时间为 12 d。

3.4 CAR-T 细胞体外杀伤效果研究

利用 RTCA 实时细胞分析系统，将基于新工艺制备的 C930 作为效应细胞分别与靶细胞 Hela-CD19 稳定细胞系（CD19 表达阳性）和 CHO-CD37 稳定细胞系（CD37 表达阳性）共孵育。效应细胞与靶细胞比例选择依据：T 细胞的杀伤效率低于 10%，但 CAR-T 细胞仍显示有特异性杀伤能力。当效靶比为 1∶1 时，CAR-T 细胞针对不同靶细胞的杀伤效率均为 30% 以上，杀伤图谱如图 3。经多重 *t* 检验分析（见表 6），靶向 CD19/CD37 双特异性 CAR-T 细胞对

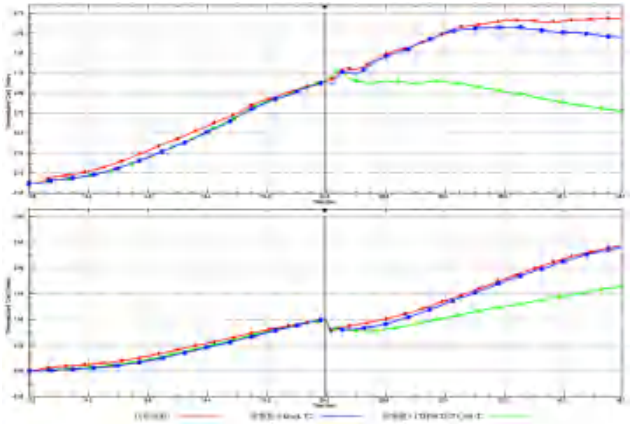

图 3　CAR-T 细胞（效靶比为 1∶1）的杀伤图谱

Fig 3　RTCA killing assay of CAR-T cells（E∶T＝1∶1）

注：上图 . Hela-CD19 稳定细胞系（CD19 表达阳性）；下图 . CHO-CD37 稳定细胞系（CD37 表达阳性）。

Note：Upper. Hela-CD19 stable cell lines（CD19 positive expression）；Below. CHO-CD37 stable cell lines（CD37 positive expression）.

表 6　CD19/CD37 双特异性 CAR-T 细胞与 Mock-T 细胞对靶细胞的杀伤率

Tab 6　Killing rate of target cells of CD19/CD37 dual targeted CAR-T cells versus Mock-T cells

靶细胞	组别	均值 /%	*SD* 值（标准偏差）	*P* 值（多重 *t* 检验）
Hela-CD19	Mock T	11.87	0.089	0.002 16
	CAR-T	56.17	0.018	
CHO-CD37	Mock T	1.633	0.044	0.002 22
	CAR-T	32.93	0.064	

靶细胞的杀伤率数据与 Mock-T 细胞对靶细胞的杀伤率数据对比，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

4　结论

有研究表明，在离体扩增期间用 IL-2 重复刺激 T 细胞会导致 T 细胞耗竭、T 细胞持久性降低[9-10]，而使用 IL-7 和 IL-15 有助于维持低分化记忆 T 表型，抑制 T 细胞耗竭；TransAct 是一种耦联有人源化 CD3 抗体和 CD28 抗体的纳米级微粒，其中 anti-CD3 提供增殖信号，anti-CD28 提供共刺激信号，高效模拟抗原递呈过程，可以用来实现高效、持久的 T 细胞激活，采用 TransAct 活化的 T 细胞可以增加 CAR-Tm 细胞比例。本实验在原有 CAR-T 细胞培养工艺的基础上，摸索出更优的 CAR-Tm 细胞培养方法，即：采用 CD4/CD8 磁珠分选出 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞并用 TransAct 活化，在体外培养过程中补充 IL-7 和 IL-15 促进 CAR-T 细胞增殖，以上新工艺对 CAR-Tm 细胞激活作用优于原采用抗 CD3/CD28 包被磁珠分选并活化 $CD3^+$ T 细胞，并在细胞外培养过程中不断补充 IL-2 细胞因子的工艺，通过与 Mock-T 细胞体外杀伤效应（RTCA 法）比对确证其体外杀伤效应能够达到预期。

为进一步优化工艺条件，本实验又研究了 T 细胞激活剂 TransAct 用量的影响，结果显示 TransAct 用量对 CAR-Tm 数量和 CAR-Tm 在 CAR-T 细胞中所占比例影响不大，对低分化 CAR-Tm 数量和低分化 CAR-Tm 在 CAR-T 细胞中所占比例以及稳态维持影响较为显著，确定一定比例的 TransAct 用量有助于维持低分化 CAR-Tm 高位数量和持续时间；同时，本实验在工艺优选时也发现，新工艺采用的 CD4/CD8 磁珠可以在较短的时间内培养获得足够的 T 细胞，有利于缩短整个 CAR-Tm 制备周期。此外，本实验采用的靶向 CD19/CD37 的双特异性 CAR，是一个全新的串联双靶点，通过本实验的实施有利于推动 CD19/CD37 双特异性 CAR-T 细胞的临床应用，也为后续其他 T 细胞相关细胞药物维持稳态记忆型水平，提高持久性提供了思路。

参考文献

[1] 王尚鑫，陈紫来，郭振，等 . CAR-T 细胞治疗结直肠癌的研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2024，38（1）：97-101.

[2] Lim WA，June CH. The principles of engineering immune cells to treat cancer [J]. Cell，2017，168（4）：724-740.

[3] Wang X，Wong CW，Urak R，et al. Comparison of naïve and central memory derived $CD8^+$ effector cell engraftment fitness and function following adoptive transfer [J]. Oncoimmunol，2016，5（1）：el072671.

[4] Busch DH，Frassle SP，Sommermeyer D，et al. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy [J]. Semin Immunol，2016，28（1）：28-24.

[5] Klebanoff CA，Gattinoni L，Restifo NP. Sorting through subsets：which T-cell population mediate highly effective adoptive immunotherapy? [J]. J Immunother，2012，35（9）：651-660.

[6] Chang JT，Wherry EJ，Goldrath AW. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation [J]. Nat Immunol，2014，15（12）：1104-1115.

[7] Pollizzi KN，Powell JD. Integration canonical and metabolic signaling programmes in the regulation of T cell responses [J]. Nat Rev Immunol，2014（7）：435-446.

[8] Golubovskaya V，Wu LJ. Different subsets of t cells，memory，effector functions，and CAR-T immunotherapy [J]. Cancers，2016，8，36：8003036.

[9] Liu YY，Zhou NN，Zhou L，et al. IL-2 regulates tumor-reactive $CD8^+$ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor [J]. Nat Immunol，2021，22（3）：358-369.

[10] Kwon B. The two faces of IL-2：a key driver of $CD8^+$ T-cell exhaustion [J]. Cell Mol Immunol，2021，18（7）：1641-1643.

（收稿日期：2023-10-27；修回日期：2024-02-08）

紫草素纳米结构脂质载体的制备与评价

王昕怡，陈佳佳，谢祎帆，杨帆，尚上，齐梦飞，向亚津晶，张颜，童瑛，沈家燕，刘葭，吴清*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 制备并优化紫草素纳米结构脂质载体（NLC），并对其进行表征、创面刺激性测试及抗炎活性评价。**方法** 通过饱和溶解度测定、脂质相容性和乳化能力筛选了紫草素 NLC 的处方。以粒径和多分散系数（PDI）为指标，考察紫草素 NLC 的制备方法，并采用该方法制备紫草素 NLC，单因素法考察固液脂质比、总脂质用量、乳化剂用量和投药量的范围。通过正交试验考察固液脂质比、总脂质用量、投药量对 PDI 和载药量的影响，得到最优处方，并对其进行验证及表征。通过在大鼠背部表皮造成破损后连续给药，测试紫草素 NLC 的创面刺激性。采用脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型，以 NO 释放率为指标评价紫草素 NLC 的体外抗炎活性。**结果** 采用 Transcutol P 为液体脂质，固体脂质为双硬脂酸甘油酯，乳化剂为 BRIJ®O20，采用薄膜水化法制备 NLC，最优处方：乳化剂用量为 6%，固液脂质比为 4∶6，总脂质用量为 6%，投药量为 20 mg。大鼠背部破损皮肤均未见红斑或水肿，皮肤组织结构均基本正常，同时等剂量下的紫草素 NLC 抑制 RAW264.7 释放 NO 的能力存在比紫草素更强的趋势。**结论** 制得的紫草素 NLC 载药量高，粒径均一。紫草素被制成 NLC 后，对创面无刺激性，细胞毒性有所下降，同时具有较好的抗炎活性。

关键词：紫草素；纳米结构脂质载体；正交试验设计；表征；刺激性评价
中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1256-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.023

Preparation and evaluation of shikonin nanostructured lipid carriers

WANG Xin-yi, CHEN Jia-jia, XIE Yi-fan, YANG Fan, SHANG Shang, QI Meng-fei, XIANG Ya-jin-jing, ZHANG Yan, TONG Ying, SHEN Jia-yan, LIU Jia, WU Qing* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To prepare and optimize the formulation of shikonin nanostructured lipid carrier (NLC) and to evaluate its characterization, wound irritation testing and anti-inflammatory activity. **Methods** The prescriptions of shikonin NLC were screened by saturated solubility, lipid compatibility and emulsification ability. With particle size and polymer dispersity index (PDI) as indexes, the preparation method of shikonin NLC was examined. The ranges of solid-liquid lipid ratio, total lipid dosage, emulsifier dosage and drug dosage were investigated by single factor method. Effects of solid-liquid lipid ratio, total lipid dosage and drug dosage on PDI and drug loading were determined by orthogonal experiment, and the optimal prescription was verified. The characterization of shikonin NLC was completed. The wound irritation of shikonin NLC was tested by continuous administration after damage causing to the dorsal epidermis of rats. Lipopolysaccharide induced RAW264.7 cell inflammation model was used to evaluate the in vitro anti-inflammation activity of shikonin NLCs with nitric oxide release rate as the indicator. **Results** Transcutol P was used as a liquid lipid, the solid lipid was glyceryl distearate, and the emulsifier was BRIJ®O20. The optimal prescription of shikonin NLC prepared by film-dispersion and hydration method was as follows: emulsifier dosage of 6%, solid-liquid lipid ratio of 4∶6, the total lipid dosage at 6%, and drug dosage at 20 mg. No erythema or edema was seen on the damaged skin on the rats' back, and the skin tissue

作者简介：王昕怡，女，硕士研究生，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：825659032@qq.com *通信作者：吴清，女，博士研究生导师，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：qwu@vip.sina.com

structure was basically normal. At the same dose, shikonin NLC better inhibited the release of nitric oxide from RAW264.7 than shikonin alone. **Conclusion** Nanoparticles with high drug loading and uniform particle size are obtained. Shikonin NLC do not irritate the wound surface, with decreased cytotoxicity and good anti-inflammation activity.

Key words: shikonin; nanostructured lipid carrier; orthogonal test design; characterization; irritation evaluation

紫草素为萘醌类成分[1]，因 5，8 位有两个酚羟基，整体呈现紫色，为紫色片状结晶或结晶性粉末。紫草素是临床常用中药紫草的主要活性成分[2]，具有抗炎、抗肿瘤[3]、抑菌[4]、抑制脂肪生成[5]等药理作用。紫草素为脂溶性成分，通常以油剂[6]和乳膏剂[7]为主要剂型，用于治疗外伤或皮肤病。由于紫草素水溶性极低，口服经胃肠道吸收差，生物利用度不高，毒性大且缺乏选择性，目前临床应用的制剂释药不规律、质量不稳定[8]。由于紫草素脂溶性强，难以直接载入水凝胶基质中，需要寻找合适的载药体系。纳米结构脂质载体（nanostructured lipid carriers，NLCs），是以一定比例的液态和固体脂质为载体，将药物吸附或包裹于脂质中形成的具有核壳结构的粒径为 10 ～ 1000 nm 的纳米体系，与初代固体脂质纳米粒相比，具有更高的稳定性、载药量和包封率[9]。可在皮肤表面上形成一层薄膜，这种封闭的薄膜能够防止皮肤中水分散发，提高皮肤的含水量，借由“覆盖效应”更好地与表皮脂质屏障发生融合作用，有利于所包载药物的经皮渗透[10]；同时，由于皮肤自身具有保持水分浓度梯度的性质，纳米结构脂质载体可通过融合和适度变形的渗透机制透过皮肤，从而促进纳米结构脂质载体的渗透[11]；其纳米级别的粒径可以通过毛囊进入皮肤，在皮肤中形成药库[12]，控制药物长时间缓慢释放[13]，常用于局部药物递送，如在肺部以及眼部给药研究中，可以提高药物的整体治疗效果[14]。并且纳米结构脂质载体是由生物可降解脂质制成，因此有更好的生物相容性，对皮肤无毒且刺激性小，可避免长期经皮给药治疗导致的皮肤受损和炎症[15]。所以考虑将紫草素开发为紫草素纳米结构脂质载体。

本研究通过测得紫草素在不同辅料中的饱和溶解度为指标初步筛选出辅料种类，以脂质相容性为指标筛选固液脂质种类，以乳化能力为指标筛选乳化剂种类。以载药量、包封率和多分散系数（PDI）为指标，采用单因素试验和正交试验设计进行处方优化。通过在大鼠背部表皮造成破损后连续给药，测试紫草素纳米结构脂质载体的创面刺激性，以期制备出安全、无刺激性且具有较好的抗炎作用的紫草素纳米结构脂质载体，为后续紫草素水凝胶的制备及药效学研究奠定基础。

1　材料

1.1　动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 6 ～ 7 周龄，（240±20）g [北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2021-0011]，饲养于北京中医药大学动物实验中心屏障环境，环境温度（25±2）℃，湿度（50±10）%，12 h 循环光照。

1.2　试药

紫草素（上海源叶生物科技有限公司，纯度 ≥ 98%，批号：B21682），聚氧乙烯蓖麻油 EL-20（批号：S27652）、聚氧乙烯氢化蓖麻油 CO-40（批号：S25692）、油酸聚乙二醇甘油酯（试剂级，批号：S27127）、山嵛酸甘油酯（试剂级，批号：S25279）、辛癸酸甘油酯（纯度 99%，批号：S24816）（上海源叶生物科技有限公司），油酸（分析纯，批号：20191012）、硬脂酸（批号：20200902）、吐温 80（批号：20200724）、司盘 80（批号：20200402）、十六醇（纯度 98%，批号：20200922）、十八醇（纯度 99%，批号：20200507）、聚乙二醇 4000（批号：20160604）（天津市光复精细化工研究所），肉豆蔻酸异丙酯（纯度 98%，批号：I811858）、棕榈酸异丙酯（纯度 97%，批号：I811770）、聚乙二醇 400（批号：P815616）、双硬脂酸甘油酯（纯度 97%，批号：D855622）、十六十八醇（纯度 99%，批号：C913430）（上海麦克林生化科技有限公司），辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯（Labrasol，法国 Gattefossé 公司，批号：175459），二乙二醇单乙醚（Transcutol P，法国 Gattefossé 公司，批号：175642），泊洛沙姆 188（北京欧北生物科技有限公司，批号：OB11161），聚氧乙烯 20 油醚（BRIJ®O20，上海阿拉丁试剂有限公司，批号：B107104），脂多糖（LPS，美国 Sigma 公司，批号：L2880），无水乙醇（北京化工厂，分析纯，批号：20170725），甲醇（色谱级，美国 Grace 化工科技有限公司），纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司），超滤管（50 kDa，

美国 Millipore 公司），温和型脱毛膏（法国 Veet 公司），砂纸（240 目，北京东新研磨工具有限公司），无菌生理盐水（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号：G4702），胎牛血清（FBS）、DMEM 高糖培养基（上海达特希尔生物技术有限公司），一氧化氮（NO）试剂盒（北京百瑞极生物科技有限公司），CCK-8 细胞增殖 - 毒性检测试剂盒（北京兰博利德商贸有限公司）。

1.3　仪器

BSA224S 型电子天平、BT 125D 型电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司），LC-20AT 高效液相色谱仪、SPD-20A UV-VIS 检测器（日本岛津），SB-5200 DTD 超声波清洗仪（宁波新芝生物科技股份有限公司），DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器（北京科伟永兴仪器有限公司），Zetasize Nano ZS 纳米粒径仪（英国 Malvern），XMTD205 数显恒温磁力搅拌水浴锅（湖南前沿科技有限公司），Velocity 15HR 台式离心机（英国 Dynamica Scientific），JEM 1400 Flash 型透射电镜（日本电子），PHURONA 透射电镜相机（德国 EMSIS）。

2　方法与结果

2.1　紫草素 HPLC 含量测定方法学考察

2.1.1　色谱条件　色谱柱为 Hypersil GOLD（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇 - 水（75∶25），流速为 1.0 mL • min^{-1}，检测波长为 516 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL。

2.1.2　系统适用性考察　精密称定紫草素对照品 11.00 mg，置于 100 mL 量瓶中，甲醇定容，配制成质量浓度为 0.11 mg • mL^{-1} 的对照品溶液，摇匀备用。按“2.1.1”项下色谱条件进样，紫草素的出峰时间为 7.186 min，理论塔板数为 12 766.290，符合药典要求。

2.1.3　线性关系考察　精密量取对照品溶液，用甲醇稀释定容，配制成质量浓度为 1.1、5.5、11、22、27.5、55、110 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样检测，记录峰面积。以峰面积为纵坐标，进样质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标，绘制标准曲线，并计算回归方程。结果表明紫草素在 1.1 ～ 110 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈现良好的线性关系，$Y = 1.054\times10^{4}X + 1.213\times10^{4}$，$R^2 = 0.9997$。

2.1.4　专属性考察　精密量取 0.5 mL 不含紫草素的空白液体辅料，置 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀后 0.45 μm 微孔滤膜滤过，得阴性样品溶液。取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液适量，按“2.1.1”项下方法进样，记录色谱图，见图 1。阴性样品溶液在对照品色谱相应位置处无吸收峰，表明在该试验条件下方法专属性较好。

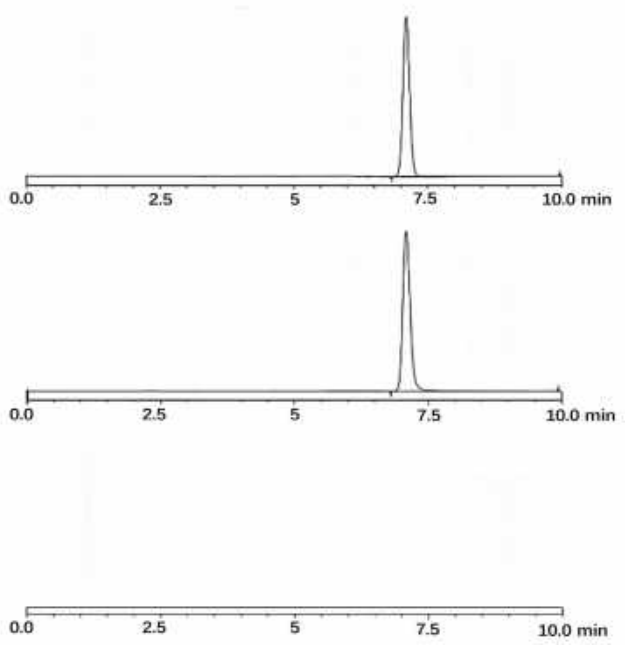

图 1　紫草素专属性 HPLC 色谱图

Fig 1　Specific HPLC chromatogram of shikonin

A. 对照品溶液（control solution）；B. 供试品溶液（test solution）；C. 阴性样品溶液（negative sample solution）

2.1.5　精密度考察　精密吸取适量浓度的对照品溶液 10 μL，重复进样 6 次，计算峰面积 *RSD* 值。结果 *RSD* ＝ 0.34%，表明仪器精密度符合要求。

2.1.6　重复性、稳定性、加样回收率考察　将一定量的紫草素加入司盘 80、油酸聚乙二醇甘油酯、油酸、Labrasol、聚乙二醇 400、Transcutol P、肉豆蔻酸异丙酯、辛癸酸甘油酯、棕榈酸异丙酯等液体辅料中，平行制备 6 份。精密量取 0.5 mL，置 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀后 0.45 μm 微孔滤膜滤过，得重复性供试品溶液。取上述供试品溶液在制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h 分别进样测定，计算 *RSD*。再取已知紫草素含量的液体辅料供试品溶液约 0.5 mL，共 6 份，分别精密加入一定量的紫草素对照品溶液进样测定，计算加样回收率及 *RSD*。结果各供试品溶液重复性、稳定性、加样回收率考察中紫草素含量的 *RSD* 均小于 3%，符合要求。

2.2　紫草素纳米结构脂质载体制备方法筛选

常见的纳米结构脂质载体制备方法有微乳法（熔融乳化法）、溶剂蒸发法、高压均质法、薄膜水化法。预试验发现，采用高压均质法制备纳米结构脂质载体时，由于固体脂质在温度稍下降后会很快变黏、凝固，易堵塞机器，无法作为可行的方案。因此，本研究以粒径和 PDI 为指标，对

熔融乳化法、溶剂蒸发法、薄膜水化法进行考察。

处方总体积为 6 mL，总脂质用量为 5%，固体脂质 - 液体脂质＝ 7∶3，乳化剂用量为 10%，加入油相中，以纯水作为水相。采用滴入冰水法冷却，将形成的乳液滴入 30 mL 冰水中，搅拌冷却 20 min。制备好的乳液均用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，观察并测定平均粒径和 PDI。

熔融乳化法：油相加热至 85 ℃充分熔融，200 r • min^{-1} 搅拌 30 min 混匀。在油相中逐滴加入等温的水相，200 r • min^{-1} 乳化 30 min，将形成的乳液冷却。结果见图 2A。

溶剂蒸发法：油相溶于 9 mL 无水乙醇中，加热至 85 ℃。在油相中加入等温的水相，200 r • min^{-1} 乳化 30 min，将形成的乳液旋转蒸发至无醇味，冷却。结果见图 2B。

薄膜水化法：油相溶于 9 mL 无水乙醇中，85 ℃旋转蒸发除去无水乙醇获得薄膜。将等温的水相加入圆底烧瓶，继续 200 r • min^{-1} 搅拌乳化 30 min，将形成的乳液冷却。结果见图 2C。

结合图 2 可知，熔融乳化法制得的乳液澄清透明，微有乳光，测得平均粒径为 12.10 nm，PDI 为 0.330；溶剂蒸发法制得的乳液呈乳白色，测得平均粒径为 53.39 nm，PDI 为 1.000；薄膜水化法制得的乳液澄清透明，微有乳光，测得平均粒径为 9.911 nm，PDI 为 0.220。可见薄膜水化法制得的纳米结构脂质载体最为均一，因此选择薄膜水化法作为后续制备纳米结构脂质载体的方法。

2.3　固体脂质和液体脂质的相容性考察

在前期试验中，对紫草素分别在固体和液体辅料中的饱和溶解度进行测定，结果紫草素在固体脂质山嵛酸甘油酯、十八醇、十六醇、十六十八醇、双硬脂酸甘油酯中具有较高溶解度，在液体脂质 Transcutol P 中溶解度最高。根据以上试验结果，进行固液脂质相容性考察。称取不同的固液脂质比（9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5、4∶6、3∶7、2∶8、1∶9）的固液脂质共 1 g，脂质混合物在 75 ℃水浴中熔融，涡旋混匀后于 75 ℃中水浴 2 h。冷却至室温 24 h 后，将脂质混合物涂抹在滤纸上。混合后熔点大于 40 ℃，且在滤纸上无油滴存在的组合即为具有较好相容性的脂质。

试验发现，Transcutol P 与山嵛酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯的相容性较好，因此，后续分别将山嵛酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯与 Transcutol P 混合作为油相，对乳化剂种类进行初步筛选。

2.4　乳化剂种类初步筛选

采用总脂质用量为 5% 的脂质（固液脂质比＝ 7∶3）和用量为 10% 的乳化剂（按照饱和溶解度排序，依次为 BRIJ®O20、双硬脂酸甘油酯、Labrasol、聚乙二醇 400、司盘 80）运用薄膜水化法制备纳米结构脂质载体。若得到的乳液具有澄清透明的外观，则认为乳化剂可以充分乳化脂质。结果见图 3。

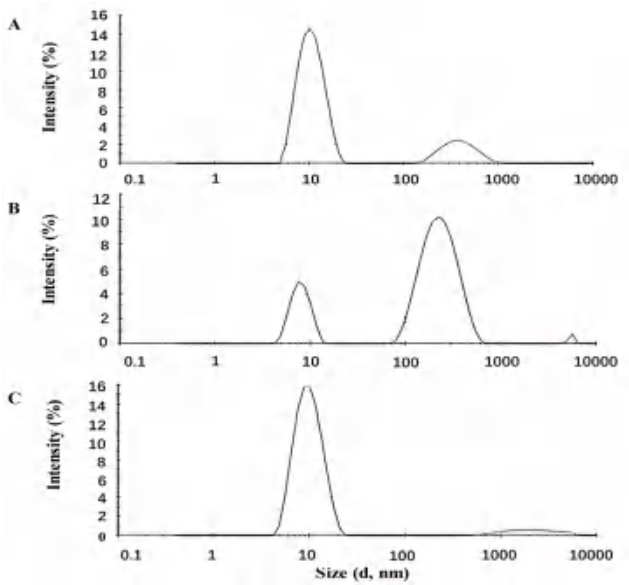

图 2　不同制备方法纳米结构脂质载体粒径分布

Fig 2　Particle size of nanostructured lipid carriers by different preparation methods

A. 熔融乳化法（melt emulsification）；B. 溶剂蒸发法（solvent evaporation method）；C. 薄膜水化法（thin film hydration method）

由图 3 可见，当液体脂质为 Transcutol P，固体脂质为双硬脂酸甘油酯，乳化剂为 BRIJ®O20 时，可形成澄清透明的乳液，后续对该处方进行进一步的优化。

2.5　单因素考察处方范围

称取一定量的双硬脂酸甘油酯、Transcutol P、BRIJ®O20，置于圆底烧瓶，加入 9 mL 无水乙醇。85 ℃旋转蒸发除去无水乙醇，得到混合均匀的薄膜。将纯水加热至 85 ℃作为水相，取 6 mL 加入同温度的油相中，在该温度下 200 r • min^{-1} 搅拌 30 min，得到初乳。将初乳滴入 30 mL 冰水中，搅拌冷却 20 min，即得空白纳米结构脂质载体。观察制剂外观是否均匀、澄清、透明，并对其粒径和 PDI 进行测定，然后以粒径和 PDI 为指标，采用单因素试验考察处方范围。

固定其他项不变，对固液脂质比例（9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5、4∶6、3∶7），总脂质用量（1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%），乳化剂用量（4%、5%、6%、7%、8%、9%），投药量（60、30、25、20、15 mg）进行单

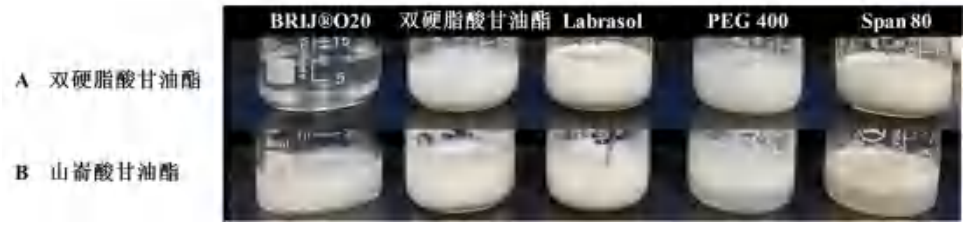

图 3　不同乳化剂制备纳米结构脂质载体

Fig 3　Nanostructured lipid carriers prepared with different emulsifiers

因素考察，结果见图 4。确定乳化剂用量为 6%，选择固液脂质比例 6∶4、5∶5、4∶6，总脂质用量 5%、6%、7%，投药量 15、20、25 mg 进行后续考察，作进一步优化。

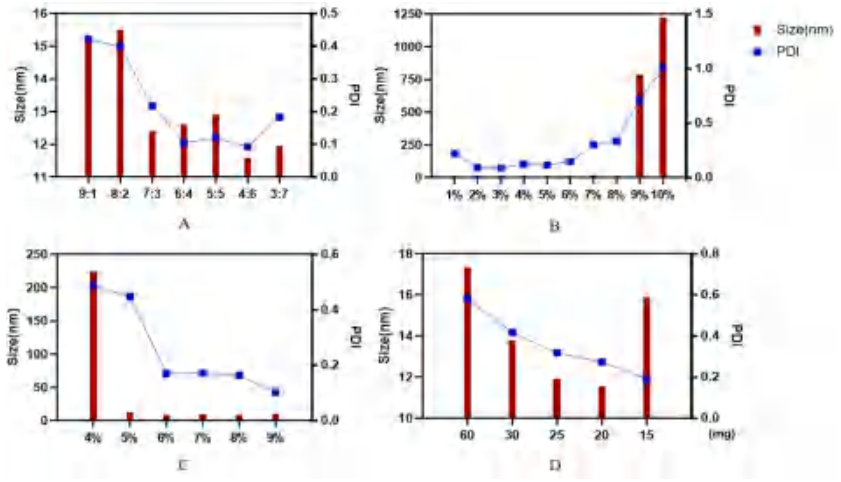

图 4　单因素考察处方范围

Fig 4　Univariate examination of prescription range

A. 固液脂质比（solid-liquid lipid ratio）；B. 总脂质用量（total lipid dosage）；C. 乳化剂用量（emulsifier dosage）；D. 投药量（drug loading）

2.6　*正交试验法优化紫草素脂质载体处方*

根据单因素试验结果，采用正交试验，以载药量、PDI 为指标，进一步对处方进行优化。

2.6.1　正交试验设计　将固液脂质比作为因素 A（6∶4、5∶5、4∶6），总脂质用量作为因素 B（5%、6%、7%），投药量作为因素 C（15、20、25 mg），空白列作为因素 D，采用 $L_9(3^4)$ 正交表，正交试验设计见表 1。

表 1　正交试验设计

Tab 1　Orthogonal test design

水平	因素			
	固液脂质比（A）	总脂质用量（B）/%	投药量（C）/mg	空白（D）
1	6∶4	5	15	—
2	5∶5	6	20	—
3	4∶6	7	25	—

2.6.2　包封率及载药量测定方法　采用高速离心 - 超滤法测定紫草素纳米结构脂质载体的包封率和载药量。取紫草素纳米结构脂质载体混悬液 1.8 mL 置于 2 mL 离心管中，于 10 000 r • min^{-1} 下离心 30 min。取离心后上层液体 0.4 mL 置 30 kDa 超滤管中 6000 r • min^{-1} 离心 40 min，精密移取超滤管外部滤过液，HPLC 测定游离药物含量 W_1。另精密移取离心后上层液体 0.5 mL 于 25 mL 量瓶中，甲醇定容，超声破乳，HPLC 测定总药物含量 W_2，按照公式（1）和（2）分别计算包封率（*EE*，%）和载药量（*DL*，%）。

$$EE = (W_2 - W_1)/W_2 \times 100\% \quad (1)$$

$$DL = (W_2 - W_1)/W_{脂质} \times 100\% \quad (2)$$

2.6.3　载药量结果分析　由表 2、3 可知，三个因素对载药量影响的重要程度排序为固液脂质比例＞总脂质用量＞投药量，固液脂质比和总脂质用量对载药量具有显著性影响，投药量对载药量不具有显著性影响。从 *K* 值可知，当组合为 $A_3B_2C_3$ 时载药量最高。综合直观分析与方差分析结果，确定最优处方为 $A_3B_2C_3$。

2.6.4　PDI 结果分析　由表 4、5 可知，三个因素对 PDI 影响的重要程度排序为固液脂质比＞投药量＞总脂质用量，固液脂质比对 PDI 具有显著性影响，而其他两个因素对 PDI 的影响不显著。从 *K* 值可知，当组合为 $A_3B_2C_2$ 时 PDI 最小。综合直观分析与方差分析结果，确定最优处方为 $A_3B_2C_2$。

表 2　正交试验设计及载药量直观分析结果 (n = 2)

Tab 2　Orthogonal test design and intuitive analysis of drug loading capacity (n = 2)

实验号	因素				载药量 /%
	A	B/%	C/mg	D	
1	6∶4	5	15	1	0.57
2	6∶4	6	20	2	0.78
3	6∶4	7	25	3	0.93
4	5∶5	5	20	3	1.11
5	5∶5	6	25	1	1.40
6	5∶5	7	15	2	1.20
7	4∶6	5	25	2	1.27
8	4∶6	6	15	3	1.33
9	4∶6	7	20	1	1.37
K_1	0.760	0.983	1.033	1.113	
K_2	1.237	1.170	1.087	1.083	
K_3	1.323	1.167	1.200	1.123	
R	0.563	0.187	0.167	0.040	

表 3　正交试验载药量方差分析结果 (n = 2)

Tab 3　Analysis of variance for drug loading in orthogonal test (n = 2)

因素	Ⅲ 类平方和	自由度	均方	F	P
固液脂质比（A）	0.552	2	0.276	212.333	0.005
总脂质用量（B）	0.068	2	0.034	26.333	0.037
投药量（C）	0.043	2	0.022	16.718	0.056
误差	0.003	2	0.001		

表 4　正交试验设计及 PDI 直观分析结果 (n = 2)

Tab 4　Orthogonal test design and PDI visual analysis (n = 2)

实验号	因素				PDI
	A	B/%	C/mg	D	
1	6∶4	5	15	1	0.4000
2	6∶4	6	20	2	0.3395
3	6∶4	7	25	3	0.4010
4	5∶5	5	20	3	0.2615
5	5∶5	6	25	1	0.2970
6	5∶5	7	15	2	0.2815
7	4∶6	5	25	2	0.2800
8	4∶6	6	15	3	0.2060
9	4∶6	7	20	1	0.2485
K_1	0.380	0.314	0.294	0.315	
K_2	0.280	0.281	0.283	0.300	
K_3	0.245	0.310	0.326	0.290	
R	0.135	0.033	0.043	0.025	

表 5　正交试验 PDI 方差分析结果 (n = 2)

Tab 5　Orthogonal test PDI analysis of variance (n = 2)

因素	Ⅲ 类平方和	自由度	均方	F	P
固液脂质比（A）	0.0296	2	0.015	29.699	0.0326
总脂质用量（B）	0.002	2	0.001	1.9791	0.3357
投药量（C）	0.0029	2	0.002	2.9163	0.2553
误差	0.001	2	0.0005		

2.6.5　最优处方验证　根据载药量和 PDI 的正交试验结果分析，认为固液脂质比为 4∶6，总脂质用量为 6%，投药量为 25 mg 或 20 mg 时，可能得到载药量高且粒径均一的纳米粒。接下来对可能的最优处方进行验证，平行制备 3 份，测定其粒径、PDI、包封率、载药量，结果见表 6。

表 6　最优处方验证 (n = 3，$\bar{x}\pm s$)

Tab 6　Optimal prescription verification (n = 3，$\bar{x}\pm s$)

处方	粒径 /nm	PDI	包封率 /%	载药量 /%
$A_3B_2C_3$	13.10±0.65	0.33±0.01	99.49±0.10	1.62±0.16
$A_3B_2C_2$	12.18±0.57	0.29±0.02	99.76±0.23	1.83±0.18

从表 6 可见，$A_3B_2C_2$ 的 PDI、包封率、载药量均略优于 $A_3B_2C_3$，因此选择 $A_3B_2C_2$ 作为最优处方进行接下来的试验，即乳化剂用量为 6%，固液脂质比例为 4∶6，总脂质用量为 6%，投药量为 20 mg。

2.7　紫草素纳米结构脂质载体的外观形态表征

紫草素纳米结构脂质载体直观性状见图 5A，为紫红色澄清液体。将其溶液滴于铜网上，室温干燥过夜后，透射电镜下观察其外观形貌。结果见图 5B，制备的紫草素纳米结构脂质载体为均匀分散的类圆形纳米粒。

2.8　紫草素纳米结构脂质载体的创面刺激性评价

使用宠物剃毛器剔除大鼠背部毛发，并施用脱毛膏，作用 5 min 后擦除脱下的毛发。参考《中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则》，用 240 目砂纸沿同一方向摩擦大鼠背部皮肤，造成表皮损伤，以微微渗血为度，造模成功后，采用无针头的注射器按照剂量滴在大鼠创面上，再均匀涂抹在破损皮肤区域，分别给予低剂量（含紫草素 0.3 mg·mL^{-1}）、高剂量（含紫草素 0.6 mg·mL^{-1}）紫草素纳米结构脂质载体及生理盐水溶液 50 μL，连续给药 7 d。给药结束后，取相应区域皮肤进行组织固定，并进行 HE 染色分析。结果见图 6、7。

由图 6 可见，紫草素纳米结构脂质载体在低剂量和高剂量下连续 7 d 应用于破损皮肤，均未见红斑或水肿。图 7 可见，紫草素纳米结构脂质载体低剂量组和高剂量组的皮肤组织结构均基本正常，视野内表皮结构完整，棘层薄且均匀，未见细胞脱落缺失；真皮层胶原纤维排列整齐，皮肤附属器形态结构正常；组织未见明显炎症细胞浸润。以上结果表明，紫草素纳米结构脂质载体对创面无刺激性。

2.9　紫草素纳米结构脂质载体的体外抗炎活性评价

以 RAW264.7 细胞为研究对象，CCK-8 法测定细胞活力，评价药物的细胞毒性，Griess 法测定 NO 释放率，评价药物的体外抗炎活性。

2.9.1　细胞培养条件　RAW264.7 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基，于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养。待细胞生长至 90% 时，用 37 ℃预热的培养基润洗一次，然后轻柔地吹打培养瓶底面，收集细胞按一定比例传代培养。

A B（×10 000）

图 5 紫草素纳米结构脂质载体直观性状（A）及透射电镜图（B）

Fig 5 Intuitive traits（A）and transmission electron microscopy image（B）of shikonin nanostructured lipid carriers

2.9.2 CCK-8 实验 调整细胞密度，按照每孔 7000 个细胞接种于 96 孔板中，培养过夜，使细胞贴壁。用培养基配制紫草素溶液和含等剂量紫草素的紫草素纳米结构脂质载体溶液，使紫草素终质量浓度均为 0.1 ～ 0.8 μg • mL^{-1}。吸弃原培养基，每孔加入 100 μL 含药培养基，培养 24 h 后，CCK-8 法检测，并计算细胞活力（%），结果见图 8。

由图 8 可见，高质量浓度下（0.8 μg • mL^{-1}）紫草素和紫草素纳米结构脂质载体均对 RAW264.7 细胞具有毒性，但紫草素纳米结构脂质载体对 RAW264.7 细胞的毒性更弱；在 0.4 μg • mL^{-1} 浓度下，紫草素作用后的细胞活力仅为（54.3±6.8）%，而等剂量的紫草素纳米结构脂质载体则为（90.7±6.3）%。以上结果说明，紫草素纳米结构脂质载体相比紫草素，安全性更好。

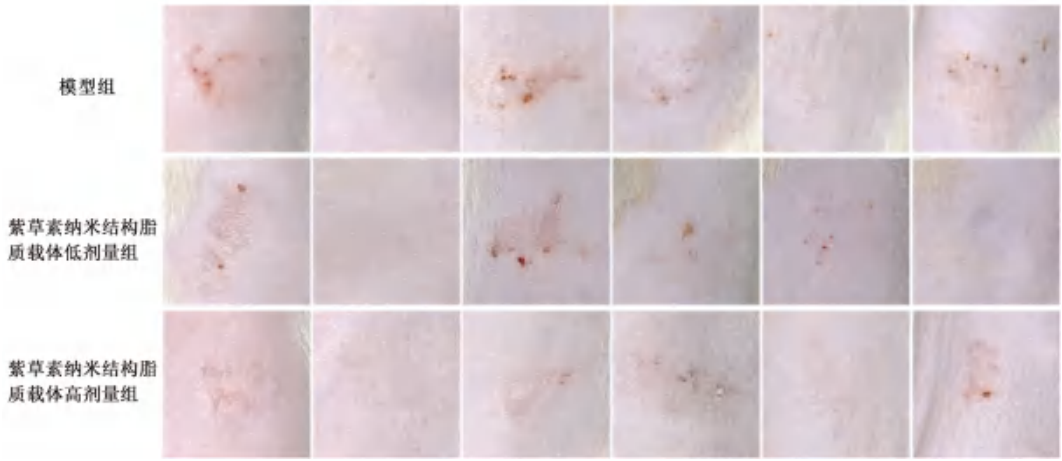

图 6 紫草素纳米结构脂质载体连续给药 7 d 后大鼠破损皮肤区域现状

Fig 6 Status quo of damaged skin areas in rats after 7 consecutive days of shikonin nanostructured lipid carrier

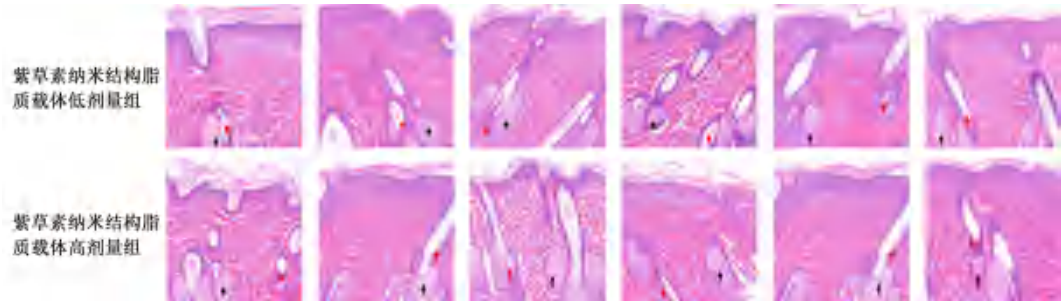

图 7 紫草素纳米结构脂质载体对大鼠破损皮肤的影响（HE 染色，×200）

Fig 7 Effect of shikonin nanostructured lipid carriers on the broken skin of rats（HE staining，×200）

注：红色箭头所示毛囊，黑色所示皮脂腺。

Note：Hair follicles shown by red arrows and sebaceous glands shown in black.

2.9.3 NO 释放实验 调整细胞密度，按照每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔板中，培养 24 h，使细胞周期同步。用培养基配制紫草素溶液和含等剂量紫草素的纳米结构脂质载体溶液，使紫草素终浓质量度为 0.1 ～ 0.8 μg • mL^{-1}。吸弃原培养基，每孔加

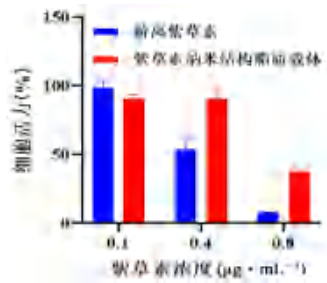

图 8 游离紫草素与紫草素纳米结构脂质载体对 RAW264.7 细胞活力的影响（n = 5，$\bar{x}\pm s$）

Fig 8 Effect of free shikonin and shikonin nanostructured lipid carriers on the viability of RAW264.7 cells（n = 5，$\bar{x}\pm s$）

入 100 μL 含药培养基，37 ℃、5%CO_2 培养 5 h 后，加入 1 μg • mL^{-1} LPS 刺激 19 h。按 NO 检测试剂盒 Griess 法检测，计算 NO 释放率（%），结果见图 9。

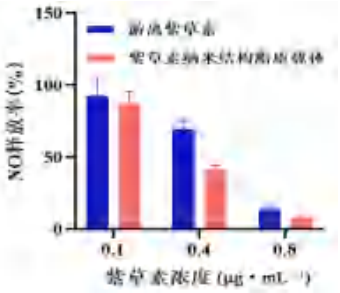

图 9　游离紫草素与紫草素纳米结构脂质载体对 NO 释放率的影响（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

Fig 9　Effect of free shikonin and shikonin nanostructured lipid carriers on the NO release rate ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

在 0.8 μg • mL^{-1} 质量浓度下，紫草素和紫草素纳米结构脂质载体均能够抑制 RAW264.7 细胞的 NO 释放，但等剂量下的紫草素纳米结构脂质载体的抑制能力比紫草素更强；在 0.4 μg • mL^{-1} 质量浓度下，紫草素纳米结构脂质载体作用后的 NO 释放率为（40.9±3.7）%，而紫草素则为（69.7±5.8）%。以上结果说明，紫草素纳米结构脂质载体相比紫草素，抗炎活性更好。

3　小结与讨论

本研究通过测定辅料中紫草素的饱和溶解度，考察固液脂质的相容性，测试乳化能力，筛选出了纳米结构脂质载体的处方，即液体脂质为 Transcutol P，固体脂质为双硬脂酸甘油酯，乳化剂为 BRIJ®O20 时，可形成澄清透明的乳液。基于筛选出的处方采用单因素试验结合正交试验，制备并优化紫草素纳米结构脂质载体，得到最优处方。即总脂质用量 6%，固液脂质比为 4∶6，乳化剂用量 6%，投药量 20 mg。制得的纳米结构脂质载体包封率高、载药量高、粒径均一，透射电镜下观察为均匀的类圆形纳米粒。

采用创面刺激性实验对紫草素纳米结构脂质载体的安全性进行评价，结果表明，制备的紫草素纳米结构脂质载体对创面无刺激性，符合要求。又以 RAW264.7 细胞为研究对象，细胞活力为指标评价药物的细胞毒性，NO 释放率为指标评价药物的体外抗炎活性，结果发现，等剂量紫草素条件下，紫草素纳米结构脂质载体相比紫草素游离溶液，能更好地减少细胞 NO 释放，同时细胞活力相对更好。这说明，紫草素被包载于纳米结构脂质载体后，细胞毒性有所降低而抗炎活性有所提升，可能与纳米结构脂质载体的缓释作用有关。

综上所述，本研究制备了安全、无刺激性且具有较好的抗炎作用的紫草素纳米结构脂质载体，后续将对紫草素冻干制剂工艺、水凝胶的构建等方面做进一步研究。

参考文献

[1] 宋腾，周亚琪，周广玺，等 . 紫草素在免疫相关性疾病中作用的研究进展 [J]. 中国医药，2023，18（4）：629-632.
[2] 王钥，陈斌，蔡蕊，等 . 紫草素抗炎的药理研究进展 [J]. 时珍国医国药，2020，31（3）：682-685.
[3] Zacchaeus OO，Yong J，Lu C，et al. A review on shikonin and its derivatives as potent anticancer agents targeted against topoisomerases [J]. Curr Med Chem，2023，31（8）：920-937.
[4] Li Q，Chae H，Kang O，et al. Synergistic antibacterial activity with conventional antibiotics and mechanism of action of shikonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Mol Sci，2022，23（14）：7551.
[5] 史凡，杨红 . 紫草素纳米结构脂质载体制备与质量评价研究 [J]. 实验技术与管理，2019，36（1）：96-99，109.
[6] 张凡，王绾江，景慧玲 . 紫草的现代药理研究及皮肤科中的应用 [J]. 中医药导报，2020，26（9）：168-172.
[7] 薛彩红，滕明 . 紫草外用治疗皮肤病的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育，2023，21（2）：188-190.
[8] 史凡，高春艳，姚金凤，等 . 紫草素纳米结构脂质载体经 Caco-2 细胞及大鼠肠道的转运特征研究 [J]. 中南药学，2019，17（11）：1834-1838.
[9] 吴赵莉，韩新宇，田思宇，等 . 共载姜黄素与胡椒碱纳米结构脂质载体的体外释放研究 [J]. 中南药学，2023，21（6）：1436-1440.
[10] 马梦超，乔文梅，王鹤樵，等 . 纳米结构脂质载体肺部给药研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（20）：2146-2149.
[11] 李旸，陈晨，方志文 . 吡罗昔康纳米结构脂质载体的制备及体外透皮特性研究 [J]. 中国药师，2017，20（3）：416-420.
[12] 庞建云，刘肖，申宝德，等 . 异补骨脂素纳米结构脂质载体的制备及其体外透皮研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42（13）：2473-2478.
[13] 郭腾，卢键滢，赵继会，等 . 微针结合纳米脂质载体对高乌头生物碱透皮性能的影响 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（5）：2108-2112.
[14] Monika SK，Mehnert W，Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases [J]. Adv Drug Deliver Rev，2007，59（6）：427-443.
[15] 陈铭，张翔珂，董雨萌，等 . 雷公藤红素纳米结构脂质载体的抗肿瘤作用研究 [J]. 中南药学，2023，21（1）：50-57.

（收稿日期：2023-11-02；修回日期：2023-12-20）

基于含量测定和指纹图谱评价电子束辐照灭菌对藏药小檗膏耳用散剂质量的影响

高平[1, 3, 4]，曲悦[2, 4]，王彩芬[4, 5]，伍丽[1, 4, 5]，王弼聪[6]，张继稳[1, 3, 4, 5*]，谢和兵[1, 2, 3*]（1.安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 西藏神猴药业有限责任公司，西藏 日喀则 857000；3. 长三角药物高等研究院，江苏 南通 226000；4. 江苏云构药物科技有限公司，江苏 南通 226000；5. 中国科学院上海药物研究所，上海 201210；6. 北京神州数码有限公司，北京 100080）

摘要：目的 评价电子束辐照灭菌对藏药小檗膏耳用散剂质量的影响。**方法** 分别采用 0、2、4、6、8、10 kGy 剂量的电子束辐照处理小檗膏耳用散剂，研究不同剂量电子束辐照对其性状、指纹图谱、生物负载及指标成分盐酸小檗碱、没食子酸和西红花苷 - Ⅰ含量的影响。**结果** 电子束辐照剂量增加时，粉末颜色略有加深，各组之间无明显变化，均为棕黄色粉末；电子束辐照能够有效降低小檗膏耳用散剂中细菌和霉菌、酵母菌菌落总数，随着辐照剂量增大，其存活数显著降低（$P < 0.05$）；电子束辐照对小檗膏耳用散剂中主要成分盐酸小檗碱、没食子酸和西红花苷 - Ⅰ 的含量无显著影响（$P > 0.05$）。不同剂量电子束辐照处理的小檗膏耳用散剂指纹图谱的相似度均大于 0.958，表明经电子束辐照处理的样品与未辐照样品相比无显著变化。**结论** 10 kGy 以下电子束辐照灭菌对藏药小檗膏耳用散剂的多个指标成分的含量无明显影响，而 6 kGy 以下电子束辐照灭菌即可符合《中国药典》2020 年版微生物限度标准的规定。电子束辐照适用于小檗膏耳用散剂的灭菌，为电子束辐照技术在小檗膏耳用散剂灭菌中的应用提供了科学依据。

关键词：小檗膏耳用散剂；辐照灭菌；盐酸小檗碱；没食子酸；西红花苷 - Ⅰ
中图分类号：R29，R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1264-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.024

Effect of electron beam irradiation sterilization on the quality of Tibetan medicine berberis extract ear powder based on content determination and fingerprints

GAO Ping[1, 3, 4], QU Yue[2, 4], WANG Cai-feng[4, 5], WU Li[1, 4, 5], WANG Bi-cong[6], ZHANG Ji-wen[1, 3, 4, 5*], XIE He-bing[1, 2, 3*] (1. *College of Medicine*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Jiangsu God Mokey Medical Research Co.*, *Ltd.*, *Shigatse Xizang* 857000; 3. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226000; 4. *Jiangsu Yungou Pharmaceutical Technology Co.*, *Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226000; 5. *Shanghai Institute of Materia Medica Chinese Academy of Sciences*, *Shanghai* 201210; 6. *Beijing Digital China Co.*, *Ltd.*, *Beijing* 100080)

Abstract: Objective To evaluate the effect of electron beam irradiation sterilization on the quality of berberis extract ear powder. **Methods** Berberis extract ear powder was treated with 0, 2, 4, 6, 8, and 10 kGy electron beam irradiation to determine the effect of different doses of irradiation on its properties, fingerprint, biological load and the content of index components berberine hydrochloride, gallic acid and crocin-Ⅰ. **Results** The color of powder slightly deepened with the electron beam irradiation dose, but with no obvious change among all groups. Electron beam irradiation effectively reduced the total number of bacterial and fungal yeast colonies in the powder, and the survival number was significantly decreased with the increase of irradiation dose ($P < 0.05$). The content of berberine hydrochloride, gallic acid and crocin-Ⅰ was not significantly affected by electron beam irradiation sterilization ($P >$

基金项目：西藏自治区科技厅区域科技协同创新专项（No.QYXTZX-RKZ2022-07）。
作者简介：高平，女，硕士，主要从事中药药剂学研究，email：pgao.hm@simm.ac.cn *通信作者：谢和兵，男，硕士研究生导师，主要从事高原医学研究及传统藏药的产业化开发研究，email：76445044@qq.com；张继稳，男，博士研究生导师，主要从事药剂学研究，email：jwzhang@simm.ac.cn

0.05). The similarity of fingerprint of berberis extract ear powder treated with different doses of electron beam irradiation was larger than 0.958, indicating no significant change between the samples with irradiation and those without. **Conclusion** Electron beam irradiation sterilization less than 10 kGy has no obvious effect on the quality of multiple index components of berberis extract ear powder. Irradiation at 6 kGy meets the standard 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia. Electron beam irradiation is suitable for the sterilization of berberis extract ear powder, providing a scientific basis for the application of electron beam irradiation in the sterilization process.

Key words: berberis extract ear powder; sterilization by irradiation ; berberine hydrochloride; gallic acid; crocin-Ⅰ

中耳炎是一种中耳感染性和炎症性疾病，包括急性中耳炎、分泌性中耳炎和慢性化脓性中耳炎[1]。中耳炎危害严重，甚至会导致乳突炎、脑膜炎、脑脓肿和面瘫等疾病产生[2-3]。目前临床治疗大多使用内服抗菌药物、解热镇痛药物以及激素类药物，外用药物相对缺乏。

藏药名方小檗眼药膏，藏药名美曼杰坎，处方出自《四部医典》，具有消炎止痛、止痒等功效，藏医临床用于结膜炎、角膜炎、沙眼等引起的眼部充血、奇痒、疼痛、流泪、视疲劳等，亦可用于预防白内障、中耳炎和皮炎，由小檗膏、诃子、西红花、熊胆粉、人工麝香、冰片，打粉制备成膏剂。诃子[4]、西红花[5-6]、冰片[7-8]、麝香[9-10]以及该制剂中主要活性成分盐酸小檗碱均有相关文献报道具有较好的抗炎、抗菌、抗病毒等药理作用。因此，本研究基于小檗眼药膏的处方，开发用于中耳炎治疗的外用小檗膏耳用散剂。

小檗膏耳用散剂采用传统的藏药散剂制备工艺，由生药材直接打粉制备而成，其微生物水平难以符合《中国药典》2020 年版散剂的要求。研究发现采用常规的湿热、干热灭菌工艺[11]，散剂的外观、色泽、气味均发生显著变化，且西红花苷 - Ⅰ 含量显著降低，因此本产品不适用于热灭菌。电子束辐照作为一种冷杀菌技术，既可以达到灭菌效果又能保证有效成分不受破坏，在市面上的运用越来越广泛[12-15]。其具有成本低、效率高、剂量控制更精确等优点，广泛用于食品、医药方面的辐照加工[16-18]。

因此，本研究采用电子束辐照处理小檗膏耳用散剂，以性状、指纹图谱、生物负载及指标成分盐酸小檗碱、没食子酸和西红花苷 - Ⅰ 的含量为考察指标，探究不同剂量电子束辐照对小檗膏耳用散剂灭菌效果及质量的影响，为电子束辐照灭菌技术在小檗膏耳用散剂的应用提供科学依据，也为含有西红花、人工麝香、冰片等药材的藏成药的辐照灭菌工艺研究提供参考，同时本研究还建立了同时测定小檗膏耳用散中 3 种主要指标成分的含量测定方法，为本品的质量标准提供参考。

1　材料

1.1　试药

诃子（批号：20200201）、小檗皮（批号：20200401）由西藏神猴药业有限责任公司提供，经西藏神猴药业有限责任公司副主任藏药师尼玛次仁分别鉴定君子科植物诃子（*Terminalia chebula* Retz.）的干燥成熟果实，小檗科植物刺红珠（*Berberis dictyophylla* Franch.）及同属多种植物茎或根的内皮；盐酸小檗碱对照品（纯度：85.9%，批号：110713-202015）、西红花苷 - Ⅰ 对照品（纯度：88.4%，批号：111588-201704）、没食子酸对照品（纯度：91.5%，批号：110831-201906）、诃子对照药材（批号:121015-201605）、西红花对照药材（批号：121009-201704）（中国食品药品检定研究院）；冰片（批号：220702）、熊胆粉（批号：21121001）、人工麝香（批号：20200301）（西藏神猴药业有限公司），按照《中国药典》2020 年版相关规定检测均合格；甲醇（色谱纯，批号：221027100215）、乙腈（色谱纯，批号：221013100157）、磷酸（批号：71807089）（上海迈瑞尔化学技术有限公司）；乙醇（分析纯，批号：20220826，国药集团化学试剂有限公司）；水为纯水（实验室纯水仪自制，型号：Master-S15UV）。

1.2　仪器

MSA125P-CE 万分之一天平（精度：0.01 mg，北京赛多利斯科学仪器公司）；DK-8AX 电热恒温水槽、BPG-9156A 鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；SB-5200DT 超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；MITR-YXQM-2L 行星球磨机（长沙米淇仪器设备有限公司）；CR9 分光色差仪（深圳市三恩时科技有限公司）；Agilent 1260 高效液相色谱仪 [安捷伦科技（中国）有限公司]。

2　方法与结果

2.1　小檗膏耳用散剂的制备

小檗膏是由小檗皮以料液比 1∶15，提取溶剂乙醇浓度 65%，单次提取时间 90 min，经加热回流重复提取 3 次，干燥而得。小檗膏、诃子使用超微粉碎机粉碎成极细粉，过 200 目筛。西红花 50 ℃真空干燥 3 h，使用行星式球磨机 500 r • min^{-1} 研磨 120 min，得极细粉，过 200 目筛。按配方比例取上述三种药材粉末混合，加入冰片、熊胆粉、人工麝香。使用行星式球磨机 500 r • min^{-1} 研磨 120 min，过 200 目筛，得小檗膏耳用散剂。

2.2　辐照处理

将所制得散剂分装 36 份，每份约 10 g，电子束辐照在中广核戈瑞（深圳）有限公司进行，试验辐照剂量分别设定为 0、2、4、6、8、10 kGy，以上每个剂量设 6 个平行样品，样品辐照完成后即进行色差测定、微生物限度检查、HPLC 含量测定及指纹图谱检测。

2.3　外观性状比较及色差测定

2.3.1　外观性状比较　照 2020 年版《中国药典》，取不同辐照强度样品适量，置光滑纸上，平铺约 5 cm^2，表面压平后，置于明亮处观察，与辐照前样品相比，辐照剂量为 6 kGy 时，粉末颜色有所加深，各组之间无明显变化，均为棕黄色粉末，详见图 1。鼻嗅其气味无显著变化。

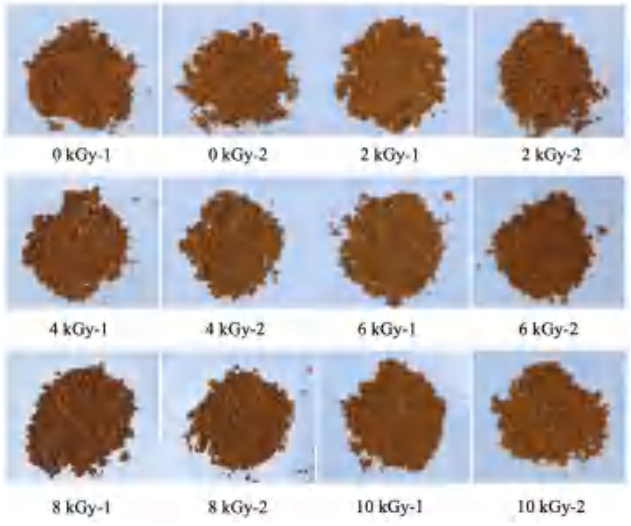

图 1　不同辐照剂量下小檗膏耳用散剂特性

Fig 1　Appearance of berberis extract ear powder with differentir radiation dose

2.3.2　色差测定　用色差仪测定样品的 L^*、a^*、b^* 值，其中 L^* 代表明暗度，a^* 代表红绿色，b^* 代表黄蓝色 [19]。色差测定根据公式（1）计算 ΔE。每个样品选 3 个不同位置进行检测，重复 3 次。结果显示，随着辐照剂量的增加，ΔE 值有所增加，也即样品颜色有所加深，但无统计学意义（$P > 0.05$），表明 0 ～ 10 kGy 电子束辐照灭菌对小檗膏耳用散剂外观性状无显著影响，见图 2。

$$\Delta E=\sqrt{(L^*-L_0)^2+(a^*-a_0)^2+(b^*-b_0)^2} \quad (1)$$

式中：L_0，a_0 和 b_0 表示未辐照样品的色度值；ΔE 代表色差值。

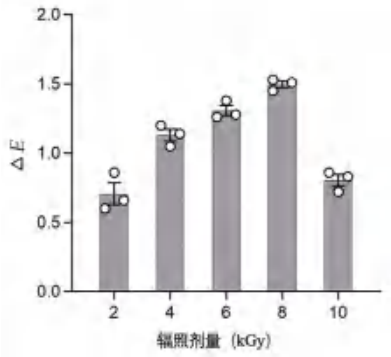

图 2　不同辐照剂量下小檗膏耳用散剂色差值

Fig 2　Chromatism of berberis extract ear powder with differentir radiation dose

2.4　含量测定

2.4.1　对照品溶液配制　精密称取盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ对照品 10.03、10.03、10.08 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，得对照品储备液。分别精密吸取上述储备液 2.0、1.0、0.5 mL 置 10 mL 量瓶中，用 30% 甲醇稀释至刻度，摇匀，即得盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ 含量分别为 200.6、100.3、50.4 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4.2　供试品溶液配制　取小檗膏耳用散剂约 100 mg，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加 30% 甲醇 30 mL，称重。超声提取 30 min，补足失重，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4.3　色谱条件　采用高效液相色谱法测定盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ的含量，具体色谱条件如下：色谱柱为 Agilent 5 TC-C_{18}（2）(250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1% 磷酸溶液（B），梯度洗脱程序见表 1，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 10 μL，使用双波长检测，其中盐酸小檗碱和没食子酸含量及指纹图谱检测波长为 270 nm，西红花苷 - Ⅰ 含量检测波长为 440 nm。

表 1　梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	10	90
16	30	70
28	30	70
30	10	90
32	10	90

2.4.4　专属性　取空白溶剂 30% 甲醇溶液、3 种单一对照品溶液、混合对照品溶液、供试品溶液，按“2.4.3”项下色谱条件进样分析，结果显示空白溶剂在与对照品溶液、供试品溶液色谱图主峰相同时间处未见相同色谱峰，见图 3。

2.4.5　线性关系考察　取“2.4.1”项下混合对照品储备液，依次稀释成质量浓度为盐酸小檗碱 2.508 ～ 100.3 μg • mL^{-1}、没食子酸 1.260 ～ 50.40 μg • mL^{-1}、西红花苷 - Ⅰ 5.015 ～ 200.6 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液。按照“2.4.3”项下色谱条件进行分析，测定对照品的峰面积。以峰面积为纵坐标（*Y*），各成分浓度为横坐标（*X*），采用最小二乘法绘制回归曲线。结果表明，3 种成分在测定浓度范围内呈现良好的线性关系，见表 2。

表 2　小檗膏耳用散剂中 3 种主要活性成分的回归方程、线性范围

Tab 2　Regression equations and linearity for the 3 main active ingredients in berberis extract ear powder

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg•mL^{-1}）
盐酸小檗碱	$Y = 35.28X + 8.997$	＞ 0.999	5.015 ～ 200.6
西红花苷 - Ⅰ	$Y = 53.57X - 16.65$	＞ 0.999	1.260 ～ 50.40
没食子酸	$Y = 29.72X - 1.342$	＞ 0.999	2.508 ～ 100.3

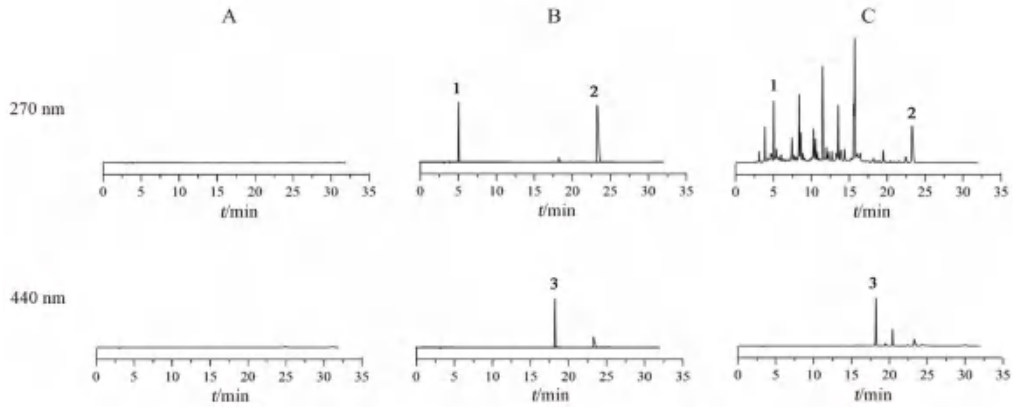

图 3　小檗膏耳用散剂特征成分色谱图

Fig 3　Typical chromatograms of berberis extract ear powder

A. 空白（blank）；B. 对照品（reference）；C. 样品（sample）；1. 没食子酸（gallic acid）；2. 盐酸小檗碱（berberine hydrochloride）；3. 西红花苷 - Ⅰ（crocin- Ⅰ）

2.4.6　检测限和定量限　将混合对照品溶液用 30% 甲醇逐步稀释，按照“2.4.3”项下色谱条件进样分析。由溶液中主峰的响应值约为噪声水平的 10 倍为定量限，3 倍为检测限。结果得出，盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ定量限分别为 2.006、0.502、1.260 μg • mL^{-1}，检测限分别为 1.003、0.251、0.252 μg • mL^{-1}。

2.4.7　仪器精密度　取未经辐照的样品粉末约 100 mg，按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.4.3”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录色谱图，结果盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ峰面积的 *RSD* 分别为 0.050%、0.080%、0.42%，表明仪器精密度良好。

2.4.8　重复性　取未经辐照的样品粉末约 100 mg，共 6 份，按“2.4.2”项下方法平行制备供试品溶液，按“2.4.3”项下色谱条件进样分析，记录峰面积，外标法计算其含量，得盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ含量的 *RSD* 分别为 3.2%、2.0%、1.5%，表明方法重复性良好。

2.4.9　加样回收试验　取未经辐照的样品粉末约 50 mg，精密称定，共 6 份，每份加入盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ对照品各约 2.120、1.040、0.600 mg，按“2.4.2”项下方法制备样品并进样测定。3 种主要成分加样回收率分别为 99.91%、100.59%、102.11%，*RSD* 分别为 1.8%、0.72%、1.1%。

2.4.10　稳定性　取未经辐照的样品粉末约 100 mg，按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液；取“2.4.1”项下对照品溶液。室温放置，于 0、2、4、8、12、24 h 取样，按“2.4.3”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果对照品盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ峰面积的 *RSD* 分别为 0.60%、0.30%、0.84%，供试品 3 种成分峰面积的 *RSD* 分别为 3.1%、1.5%、0.48%，表明对照品溶液、供试品溶液室温放置 24 h 稳定性良好。

2.4.11　盐酸小檗碱、没食子酸和西红花苷 - Ⅰ的含量变化　不同辐照剂量样品中的盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ含量测定结果见表 3。结果显示，0 ～ 10 kGy 电子束辐照处理后，样品中 3 种被测成分的含量无显著变化（$P > 0.05$）。由此说明，电子束辐照处理不会影响样品中的主要成分含量。

2.5　指纹图谱相似度评价

取不同辐照剂量的样品粉末 100 mg，共 6 份，按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液，平行制备供试品溶液 6 份，在“2.4.3”项色谱条件下测定，

表 3　不同辐照剂量下小檗膏耳用散剂中主要成分的含量 (n = 6，%)

Tab 3　Content of main components in berberis extract ear powder at different radiation dose (n = 6，%)

辐照剂量 /kGy	没食子酸	西红花苷 - Ⅰ	盐酸小檗碱
0	1.24	0.38	1.14
2	1.27	0.38	1.16
4	1.27	0.37	1.17
6	1.23	0.38	1.13
8	1.25	0.38	1.15
10	1.27	0.38	1.17
RSD/%	1.4	1.1	1.4

记录色谱图。将样品图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版本）软件》，导入供试品的色谱图，设置参照图谱，选择含量相对高并且稳定的 19 个峰为共有峰，多点校正进行峰匹配，并使用中位数法生成对照图谱，时间窗宽度 0.1 min，进行相似度计算。

通过比对液相图谱中特征峰与混合对照品峰的保留时间，共指认了提取物中 7 个共有峰，分别是没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱。不同辐照剂量处理后样品的 HPLC 指纹图谱见图 4，指纹图谱相似度评价结果见表 4。

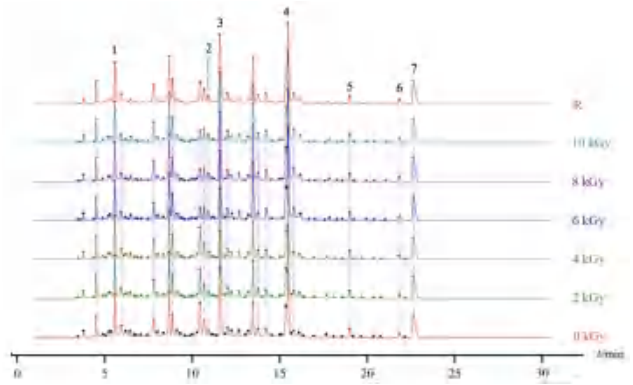

图 4　不同辐照剂量下小檗膏耳用散剂的指纹图谱

Fig 4　Fingerprints of berberis extract ear powder at different radiation dose

1. 没食子酸（gallic acid）；2. 柯里拉京（coriagin）；3. 木兰花碱（magnoflorine）；4. 鞣花酸（gallogen）；5. 盐酸药根碱（jatrorrhizine hydrochloride）；6. 盐酸巴马汀（palmatine hydrochloride）；7. 盐酸小檗碱（berberine hydrochloride）

表 4　不同辐照剂量下小檗膏耳用散剂之间的相似度

Tab 4　Similarity of berberis extract ear powder at different radiation dose

辐照剂量 /kGy	0	2	4	6	8	10	R
0	1.000	0.996	0.996	0.958	0.960	0.961	0.985
2	0.996	1.000	0.999	0.975	0.977	0.977	0.994
4	0.996	0.999	1.000	0.976	0.978	0.978	0.995
6	0.958	0.975	0.976	1.000	0.999	0.999	0.993
8	0.960	0.977	0.978	0.999	1.000	1.000	0.994
10	0.961	0.977	0.978	0.999	1.000	1.000	0.994
R	0.985	0.994	0.995	0.993	0.994	0.994	1.000

相似度计算结果显示，各批次指纹图谱的相似度均高于 0.958，无显著差异，表明经辐照灭菌处理后，小檗膏耳用散产品质量均一，证明了辐照灭菌对小檗膏耳用散灭菌的可行性。

2.6　微生物限度检查

细菌、霉菌和酵母菌、大肠埃希菌总数的检测参照《中国药典》2020 年版四部通则中无菌产品微生物限度检查（1105 微生物计数法、1106 控制菌检查法及 1107 非无菌药品微生物限度标准），检查电子加速辐照前后小檗膏耳用散剂中细菌菌落总数、霉菌和酵母菌菌落总数、大肠菌群的变化。

不同辐照剂量处理的样品粉末的细菌菌落总数、霉菌和酵母菌总数及大肠菌群进行随机抽样检查，结果见表 5。样品经过辐照后，细菌菌落数、霉菌和酵母菌菌落总数均下降，大肠菌群在辐照前后均未检出；当辐照剂量为 6 kGy 时，微生物限度已满足《中国药典》2020 年版的规定，当达到 6 kGy 及以上时微生物均未检出。

表 5　微生物检测结果

Tab 5　Microbial examination

辐照剂量 / kGy	细菌菌落 /（CFU・g^{-1}）	霉菌和酵母菌菌落 /（CFU・g^{-1}）	大肠菌群 /（CFU・g^{-1}）
0	50 015	1010	—
2	8510	—	—
4	1020	—	—
6	190	—	—
8	—	—	—
10	—	—	—

2.7　数据处理

数据采用 SPSS 软件进行分析，采用单因素方差分析中的 t 检验，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行 HPLC 指纹图谱分析。

3　讨论

3.1　电子束辐照应用于中药灭菌的优势

灭菌工艺是中药制剂过程中非常关键的环节，直接影响药品的质量，发展更加安全有效的灭菌技术对提升中药制剂品质、提高储存和使用安全性意义重大，先进的灭菌工艺可以促进中药现代化高质量发展。目前使用较多的中药灭菌方法主要分为物理灭菌法和化学灭菌法两大类，其中物理灭菌法包括热力灭菌、滤过除菌和辐射灭菌等。热力灭菌是目前最方便、应用最广泛的灭菌工艺，但其不适用于含有挥发性成分和热不稳定成分中药的灭菌，也不适用于生药材制备的传统中药，影响中药的有效性；滤过除菌仅应用于液体制剂除菌；化学灭菌法仅杀灭微生物的繁殖体，对芽孢无效，且极易产生

化学物质残留，影响中药的安全性。电子束辐照灭菌是近年新兴的灭菌技术，具有常温、快速、穿透力强、灭菌均匀充分、无毒无残留等优点，尤其适用于含有挥发性、热敏性成分以及含生药粉中药的灭菌[20]。本文对开发的小檗膏耳用散剂进行电子束辐照灭菌，并考察其可行性。

3.2　主要有效成分的选择

小檗皮主要成分为小檗碱、小檗胺、药根碱等生物碱类，诃子主要成分为没食子酸、诃子酸、鞣花酸等多酚类，西红花主要成分为西红花苷、西红花酸等萜类成分。而药理学研究表明，盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷均具有良好的抗感染、抗炎、抗病毒等作用[21-23]。为了提高藏药小檗膏的质量评价水平，本研究以盐酸小檗碱、没食子酸以及西红花苷中特征成分西红花苷 - Ⅰ作为指标成分，并对其同时测定，以明确辐照灭菌对小檗膏中主要有效成分的影响。

3.3　辐照剂量的选择

2015 年原国家食品药品监督管理总局发布《中药辐照灭菌技术指导原则》规定，辐照剂量原则上不超过 10 kGy。因此，本研究选择 2、4、6、8、10 kGy 的不同辐照剂量，以确保中药的安全、有效与质量稳定。结果表明小檗膏耳用散剂辐照前后外观性状无明显改变，菌落数明显降低，盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ含量无显著变化，指纹图谱相似度均高于 0.958，表明电子束辐照灭菌工艺可行，高效安全。

4　结论

不同剂量电子束辐照对小檗膏耳用散剂的外观性状、主要有效成分含量（盐酸小檗碱、没食子酸、西红花苷 - Ⅰ）及其指纹图谱均无显著影响；辐照后粉末菌落数明显降低，6 kGy 时即符合《中国药典》2020 年版微生物限度标准的规定，达到良好的灭菌效果。因此，电子束辐照灭菌是一种有效控制小檗膏耳用散剂质量的方法，对药品质量无显著影响。本研究表明电子束辐照杀菌用于小檗膏耳用散剂的灭菌十分高效安全，可为小檗膏及其成药的灭菌工艺提供参考。

参考文献

[1] Leung A，Wong A. Acute otitis media in children [J]. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov，2017，11（1）：32-40.

[2] Leichtle A，Hoffmann T，Wigang M. Otitis media：definition，pathogenesis，clinical presentation，diagnosis and therapy [J]. Laryngorhinootologie，2018，97（7）：497-508.

[3] Laulajainen-Hongisto A，Jero J，Markkola A，et al. Severe acute otitis media and acute mastoiditis in adults [J]. J Int Adv Otol，2016，12（3）：224-230.

[4] 赵鹿，廖翠萍，杨秀娟，等 . 诃子的研究进展及质量标志物的预测 [J]. 中草药，2020，51（10）：2732-2744.

[5] Ashktorab B，Soleimani A，Singh G，et al. Saffron：the golden spice with therapeutic properties on digestive diseases [J]. Nutrients，2019，11（5）：943.

[6] Moshiri M，Vahabzadeh M，Hosseinzadeh H. Clinical applications of saffron（crocus sativus）and its constituents：a review [J]. Drug Res（Stuttg），2015，65（6）：287-295.

[7] 喻斌，蒋宝平，阮鸣 . 川芎嗪和不同剂量冰片配伍对全脑缺血 / 再灌注大鼠脑区特异性保护作用研究 [J]. 中国药理学通报，2017，33（4）：589-591.

[8] Wang Z，Li QL，Xia L，et al. Borneol promotes apoptosis of human glioma cells through regulating HIF-1a expression via mTORC1/eIF4E pathway [J]. J Cancer，2020，11（16）：4810-4822.

[9] 范彩霞，陈彦姗，陈润娣 . 参芪血府逐瘀汤联合麝香保心丸对急性心肌梗死患者心功能及 CRP 水平的影响 [J]. 中国医学创新，2022，19（3）：120-124.

[10] 朱新庆，张奇志 . 麝香保心丸对急性心肌梗死患者心功能的影响及相关机制探讨 [J]. 世界中医药，2019，14（11）：2969-2972，2977.

[11] 叶媛丽，向成丽，吴章桥，等 . 中药材灭菌方式及其药效成分变化的研究进展 [J]. 现代园艺，2021，44（11）：18-19，22.

[12] 杨小兰，尼玛次仁，白玛旦增，等 . 电子束辐照对藏药十六味杜鹃花丸中主要活性成分及灭菌效果的影响 [J]. 中医药导报，2023，29（7）：81-85.

[13] 余杨健，谢和兵，尼玛次仁，等 . 电子加速器辐照对红花粉末及水提液微生物及羟基红花黄色素 A 含量的影响 [J]. 核农学报，2023，37（7）：1370-1377.

[14] 采金金，谢和兵，尼玛次仁，等 . 电子加速器辐照灭菌对肺热普清散质量的影响 [J]. 中国药业，2023，32（4）：70-74.

[15] 汪慧慧，谢和兵，尼玛次仁，等 . 电子束辐照对诃子中主要活性成分及灭菌效果的影响 [J]. 中国药业，2023，32（21）：67-72.

[16] 王梁燕，洪奇华，孙志明，等 . 电子束辐照技术在生命科学中的应用 [J]. 核农学报，2018，32（2）：283-290.

[17] 戈雅倩，谢和兵，尼玛次仁，等 . 电子束辐照对肉豆蔻药材质量及灭菌效果的影响 [J]. 中国药业，2023，32（16）：90-93.

[18] 余杨健，谢和兵，尼玛次仁，等 . 电子束辐照对藏药材力嘎都质量的影响 [J]. 中南药学，2023，21（7）：1841-1845.

[19] 王伟，柴春祥，鲁晓翔，等 . 色差和质构评定南美白对虾的新鲜度 [J]. 浙江农业学报，2015，27（2）：271-277.

[20] 林彤，毕福钧，吕渭升，等 . 中药的辐照灭菌现状与监管 [J]. 中国药学杂志，2019，54（17）：1442-1447.

[21] Hou Q，HeWJ，Wu YS，et al. Berberine：a traditional natural product with novel biological activities [J]. Altern Ther Health Med，2020，26（S2）：20-27.

[22] 赵芳，赵青，刘玮琳，等 . 没食子酸减轻香烟烟雾诱导的小鼠气道炎性反应 [J]. 基础医学与临床，2023，43（11）：1648-1654.

[23] Shirali S，Bathaie SZ，Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Phytother Res，2013，27（7）：1042-1047.

（收稿日期：2024-01-02；修回日期：2024-03-05）

瓶内处理技术结合快速 LC-MS 提高利培酮血药浓度测定效率

夏爽[1]，李小新[1]，郭晓[1]，张宏伟[1]，宋艳宁[1]，曹世昱[1]，李雅[2]，谢添锦[2]，高芳芳[2]，颜苗[3]，蔡骅琳[3]，王峰[2, 3*]（1. 驻马店市第二人民医院（郑州大学附属脑病医院），河南 驻马店 463000；2. 湖南德米特仪器有限公司，长沙 410011；3. 中南大学湘雅二医院临床药学研究室，长沙 410011）

摘要：目的 评估“瓶内处理”（Bottle-in）技术结合快速 LC-MS 的方法学特性，并验证其对治疗药物监测技术自动化和标准化的促进作用。**方法** 选择利培酮及其主要代谢物 9-羟利培酮作为研究对象，针对两种血样前处理技术——Bottle-in 技术与实验室现行的常规处理（RP）技术，建立并验证相应的 LC-MS 检测方法。实验设计遵循 CLSI EP9-A3 指南，对 60 例服用利培酮的患者血液样本应用两种方法进行利培酮和 9-羟利培酮浓度的测定，并记录样本的报告时间。采用 Spearman 相关性分析、Passing-Bablok 回归分析、Bland-Altman 一致性检验以及医学决定水平（MDL）预期偏倚分析，对两种方法的检测结果进行相关性和差异性评价。**结果** 两种前处理技术下的 LC-MS 方法在测定利培酮和 9-羟利培酮血药浓度时，均满足方法学验证的标准。在 60 例患者的样本中，两组结果均未出现异常值，显示出强烈的相关性（$P < 0.01$）。Passing-Bablok 回归模型显示了良好的线性关系。Bland-Altman 一致性检验结果表明，两者具有高度一致性。MDL 预期偏倚分析进一步证实，两种检测方法的结果未出现显著性偏倚，预期偏倚值（*Bc*）均在可接受的偏倚限值范围内。Bottle-in 技术较 RP 技术在前处理时间上可节约 66.67%，结合快速 LC-MS 技术对 12 例患者样本进行检测，全流程检出时间上 Bottle-in 组较 RP 组能缩短 12.50% 的时长。**结论** Bottle-in 技术凭借其高效的前处理方式，提高了药物监测技术自动化和标准化，可作为替代 RP 技术的一种有效方法，成为现代临床药学监测中的一项重要进展。

关键词：瓶内处理（Bottle-in）技术；样本前处理技术；快速 LC-MS；治疗药物监测技术
中图分类号：R917，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1270-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.025

Bottle-in technology combined with rapid LC-MS to improve the determination efficiency of risperidone plasma concentration

XIA Shuang[1], LI Xiao-xin[1], GUO Xiao[1], ZHANG Hong-wei[1], SONG Yan-ning[1], CAO Shi-xian[1], LI Ya[2], XIE Tian-jin[2], GAO Fang-fang[2], YAN Miao[3], CAI Hua-lin[3], WANG Feng[2, 3*] (1. *The Second People's Hospital of Zhumadian* (*Encephalopathy Hospital Affiliated to Zhengzhou University*), *Zhumadian Henan* 463000; 2. *Hunan Demeter Instrument Co., Ltd., Changsha* 410011; 3. *Clinical Pharmacy Research Laboratory, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha* 410011)

Abstract: Objective To evaluate the methodological characteristics of Bottle-in technology combined with rapid liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and to validate its contribution to the automation and standardization of therapeutic drug monitoring. **Methods** Risperidone and its main metabolite, 9-hydroxyrisperidone, were selected as the research subjects. Corresponding LC-MS detection methods were established and validated for two blood sample pretreatment techniques (Bottle-in technology and the routine processing (RP) technology currently in use in the laboratory). The experimental design followed CLSI EP9-A3 guidelines. Both methods were used to determine the concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in the blood samples of 60 patients taking

作者简介：夏爽，女，主管药师，硕士，主要从事临床药学和治疗药物监测研究，email：511748097@qq.com *通信作者：王峰，男，主管药师，主要从事色谱质谱自动化、生物样本分析及治疗药物监测研究，email：roitech@126.com

risperidone, and the report time of the samples was recorded. Spearman correlation analysis, Passing-Bablok regression analysis, Bland-Altman agreement test, and medical decision level (MDL) expected bias analysis were used to evaluate the correlation and differences between the detection results of both methods. **Results** The LC-MS methods with both pretreatment techniques met the methodological validation standards for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone blood drug concentrations. Results in both groups of showed no outliers in the samples of 60 patients, indicating a strong correlation ($P < 0.01$). The Passing-Bablok regression model showed a good linear relationship. The Bland-Altman agreement test indicated a high degree of consistency between the two methods. MDL expected bias analysis further confirmed that the results of the two detection methods showed no significant bias, with the expected bias values (*Bc*) all within the acceptable limits. Bottle-in technology and RP technology might save 66.67% of pre-processing time. Combined with rapid LC-MS technology, the detection time of 12 patient samples in the Bottle-in group was shortened by 12.50% compared to the RP group in the entire process. **Conclusion** The Bottle-in technology, with its efficient sample pretreatment approach can improve the automation and standardization of therapeutic drug monitoring, which serves as an effective alternative to the RP technique, marking a significant advancement in modern clinical pharmacological monitoring.

Key words: Bottle-in technology; sample pretreatment technique; rapid LC-MS; therapeutic drug monitoring technology

血药浓度监测作为精准用药技术手段，致力于解决临床疗效不佳等问题。近年来，质谱、色谱等高端检测技术迅速崛起。但是严重依赖人工完成的包括样本的前处理和制备、数据分析、方法开发、仪器维护保养等问题持续存在。特别是样本的前处理问题，非常考验操作人员的专业素质，同时也是耗时步骤。目前前处理方法大多采用蛋白沉淀法[1-4]，包括沉淀蛋白 - 旋涡混合 - 高速离心 - 转移等系列操作，该方法在临床应用较为成熟，被认为是常规处理（regular processing，RP）技术。在样本量较大时，不仅操作人员工作量大幅增加，仪器设备的利用率也受到限制。为了实现临床快速测定的目标，同时满足实验室治疗药物监测的指标要求，本研究采用了直接血样技术，即使用瓶内处理（bottle internal processing，简称 Bottle-in）技术，从加样到处理完毕单例样本仅需 30 s，大幅度提高了样本处理效率。

本研究以利培酮和 9- 羟利培酮血药浓度监测为例，按照美国临床实验室标准化协会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）EP9-A3 文件要求设计实验[5]，对本实验室同时采用的 Bottle-in 技术和 RP 技术对样本前处理，在相同的实验条件下建立 LC-MS 测定方法并进行方法学验证，在验证合格的基础上进一步对比两种方法的检测结果一致性、医学决定水平（medicine decide level，MDL）偏倚以及检出时间，以确定 Bottle-in 技术的可替代性。

1　材料

1.1　仪器

DMT 7500SD 二维液相色谱微型质谱仪（湖南德米特仪器有限公司），XW-80A 旋涡混合器（上海琪特分析仪器有限公司），Mini-14K 微型高速离心机（杭州奥盛仪器有限公司），移液枪（百得），超闪瓶（由样品杯和一体适配器组成，湖南德米特仪器有限公司），二维色谱柱（MSCS-2C，3.0 mm×50 mm，3.3 μm，湖南德米特仪器有限公司），MDF-382E（N）－ 80 ℃超低温冰箱（SANYO），HYC-310 医用冷藏冰箱（海尔）。

1.2　试药

利培酮标准曲线试剂（批号：20230508）、ORG-1A 蛋白沉淀剂（批号：20231107-1）、Ⅴ型 MPS-5 质控品（含有利培酮和 9- 羟利培酮，批号：20230508）、NMB-2A 水相（批号：20230921），MMA-2A 有机相（批号：20230628）、利培酮母液、9- 羟利培酮母液（湖南德米特仪器有限公司）。

2　方法与结果

2.1　血浆样品处理方法及所需时间

根据使用不同技术前处理对样本分为 Bottle-in 组和 RP 组。Bottle-in 组前处理方法是取 500 μL 蛋白沉淀剂（含同位素内标 D_4）于样品杯中，加入 200 μL 患者样本，摇晃均匀，将一体化适配器缓慢放入样品杯中均匀施压至与样品杯吻合，示意图见图 1；RP 组前处理方法是取 500 μL 蛋白沉淀剂（含同位素内标 D_4）于 EP 管中，加入 200 μL 患者样本，旋涡混合 1 min 后高速离心（离心力 11 988 *g*）10 min，取 500 μL 上清液于进样瓶中。

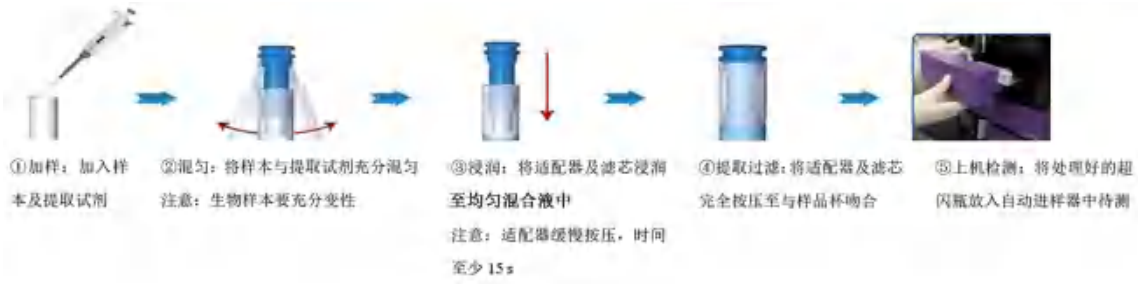

图 1 Bottle-in 组前处理操作示意图

Fig 1 Diagram of pre-processing operation for the Bottle-in group

2.2 色谱与质谱条件

色谱柱 MSCS-2C（3.0 mm×50 mm，3.3 μm），柱温 45 ℃，进样体积 1 μL，流动相比例为 MMA-2A∶NMB-2A ＝ 45∶55，总流速为 0.6 mL • min^{-1}，电喷雾离子源（ESI 源），正离子扫描，以氮气为干燥气，干燥气流量：15 L • min^{-1}，雾化气流量 1.5 L • min^{-1}，加热块温度：280 ℃，用于定量分析的离子对：利培酮 *m/z* 411.10，利培酮 -D_4 *m/z* 415.15，9- 羟利培酮 *m/z* 427.00，9- 羟利培酮 -D_4 *m/z* 431.15，质谱平衡时间为 20 min，采集时间为 2.5 min。

2.3 选择性

取 6 个不同来源的空白血浆，比较空白基质、含有各对照品的标准血浆样品与人血浆中利培酮和利培酮 -D_4、9- 羟利培酮和 9- 羟利培酮 -D_4 色谱峰，比较不同样本在保留时间内色谱峰的分离情况。如图 2 所示，利培酮和内标利培酮 -D_4 的保留时间分别为 1.89、1.82 min，9- 羟利培酮和内标 9- 羟利培酮 -D_4 的保留时间分别为 1.41、1.39 min，空白血浆中的内源性物质不干扰利培酮和 9- 羟利培酮的浓度测定，显示两组方法选择性良好。

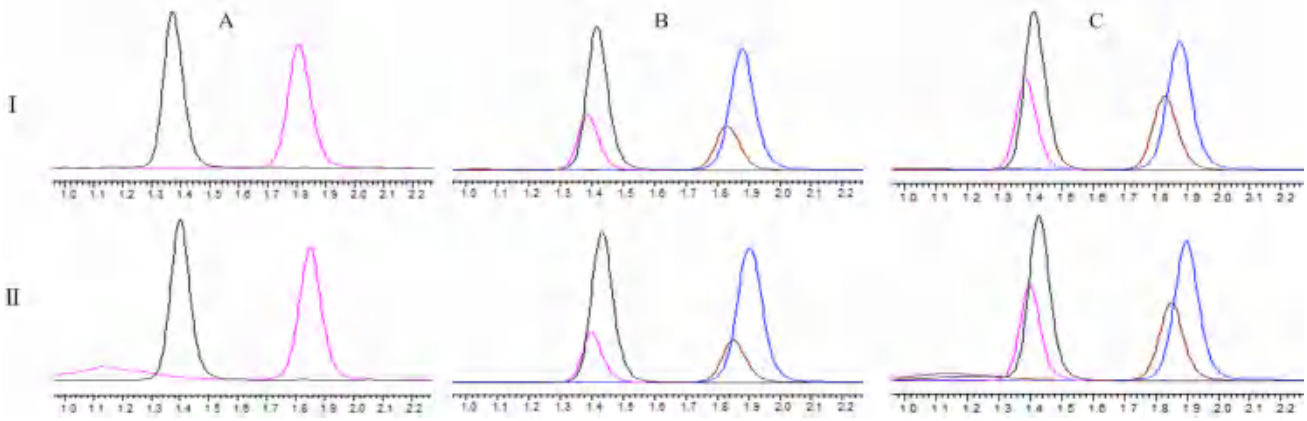

图 2 利培酮、9- 羟利培酮及其同位素内标 D_4 的色谱图

Fig 2 Chromatograms of risperidone，9-hydroxyrisperidoneand isotopic internal standard D4

A. 加入利培酮 -D_4、9- 羟利培酮 -D_4 的空白血浆（blank plasma spiked risperidone-D_4 and 9-hydroxyrisperidone-D_4）；B. 加入利培酮、9- 羟利培酮、利培酮 -D_4 和 9- 羟利培酮 -D_4 的空白血浆（blank plasma spiked risperidone，9-hydroxyrisperidone，risperidone-D_4 and 9-hydroxyrisperidone-D_4）；C. 临床血浆样本（clinical plasma sample）；Ⅰ. Bottle-in 组（Bottle-in group）；Ⅱ. RP 组（RP group）

2.4 线性范围和最低定量限

取标准曲线样品（利培酮质量浓度为 13.19、32.97、65.93、131.87、197.80、329.67 ng • mL^{-1}，9- 羟利培酮质量浓度为 12.37、30.92、61.85、123.69、185.54、309.24 ng • mL^{-1}）按“2.1”项下分组操作，以利培酮与利培酮 -D_4、9- 羟利培酮和 9- 羟利培酮 -D_4 的色谱峰面积比为纵坐标，用加权（$W = 1/\chi^2$）最小二乘法将血浆中利培酮和 9- 羟利培酮的质量浓度（*X*）与峰面积比（*Y*）进行线性回归。最低定量限（lower limit of quantitation，LLOQ）设定为标准曲线的最低浓度。结果显示 Bottle-in 组和 RP 组检测方法的线性关系较好，均可用于利培酮和 9- 羟利培酮的准确定量分析，见表 1。利培酮的 LLOQ 为 13.19 ng • mL^{-1}，9- 羟利培酮的 LLOQ 为 12.37 ng • mL^{-1}。

2.5 精密度和准确度

采用低、中、高 3 个质量浓度的质控样品评估在同一日内和 2 周内不同日期精密度和准确度，每个质量浓度质控样品 6 个重复。结果表明低、中、高 3 个质量浓度的质控品，日间和日内 *RSD* 均＜ 15%，准确度为 99.09% ～ 102.59%。

表 1　利培酮和 9- 羟利培酮的线性方程

Tab 1　Linear equations for risperidone and 9-hydroxyrisperidone

组别	利培酮		9- 羟利培酮	
	校准曲线	*r*	校准曲线	*r*
Bottle-in 组	$Y = 0.0135X + 0.0172$	0.9994	$Y = 0.0148X + 0.0231$	0.9998
RP 组	$Y = 0.0062X + 0.0051$	0.9998	$Y = 0.0064X + 0.0015$	0.9995

2.6　基质效应

低、中、高 3 个质量浓度的质控样品每个浓度平行准备 6 份，进样分析，记录待测物与内标的响应比值 *B*。同浓度的对照品工作液，不经处理直接进样，同法进行分析，记录待测物与内标的响应比值 *A*。内源性物质所引起的基质效应内标归一化基质因子（*F*）表示为 *B*/*A*。结果表明低、中、高 3 个质量浓度的质控样品之间的基质效应无明显差异，不影响检测，基质的存在不干扰利培酮、9- 羟利培酮及其内标 D_4 的测定。

2.7　稳定性

分别考察低、中、高 3 个质量浓度的质控样品在室温条件下储存 24 h 的短期稳定性、样品在－ 80 ℃保存 30 d 后经 3 次冷冻 - 解冻循环后的稳定性。结果表明血浆样品在上述条件下均保持稳定，*RSD* ＜ 15%。

2.8　稀释可靠性

高点稀释的方法学验证采用以下方法：取标准曲线最高点质量浓度血浆样品（*n* ＝ 6），用空白血浆稀释 5、15、30 倍后，按“2.1”项下方法进行处理并检测。结果显示，稀释 5、15、30 倍后测定结果乘以稀释倍数所得的计算值，与标识浓度对比，精密度 *RSD* 均小于 15%，准确度为 95.09% ～ 102.31%，表明对血浆样品进行稀释后经校正后计算的结果能够准确反映超出线性范围的药物浓度。

2.9　患者样本检测

按照 CLSI EP9-A3 文件要求设计实验[5]。2023 年 11 月共收集到驻马店市第二人民医院 60 例服用过利培酮的患者样本（伦理批件号：科审 -2023-001-01），患者于清晨给药前采样，样本经过离心处理后提取血浆分成 2 份，每份不少于 200 μL，储存于－ 80 ℃低温冰箱备用。采用随机、单盲法分别对两组样本进行检测，每例标本重复测量 2 次，每日检测 12 例标本，连续检测 5 d，结果取 2 次检测平均值。

入组标准：① 利培酮血药浓度达稳态（4 ～ 5 个 $t_{1/2}$）的患者血浆样本；② 年龄不限，性别不限。排除标准：① 严重脂血、溶血、高胆红素样本；② 重复的样本。

2.10　患者的基本情况

入组的 60 例患者中，男性 28 例（46.67%），女性 32 例（53.33%），平均年龄（33.54±11.80）岁，平均病程（8.52±8.42）年。

2.11　患者利培酮及其代谢物 9- 羟利培酮的检测值

60 例患者样本分 5 d 检测完成，利培酮血药浓度范围为 Bottle-in 组 1.45 ～ 42.85 ng • mL^{-1}，RP 组 1.29 ～ 43.39 ng • mL^{-1}；9- 羟利培酮血药浓度范围为 Bottle-in 组 8.15 ～ 84.97 ng • mL^{-1}，RP 组 8.22 ～ 85.38 ng • mL^{-1}。

2.12　离群值

根据 CLSI EP9-A3 文件推荐使用广义极端学生化偏差（ESD）方法计算离群值点[6]。经 ESD 法检验，确认本实验数据没有离群值。

2.13　相关性分析

采用 SPSS 对数据进行相关性分析，由于 Bottle-in 组和 RP 组的利培酮以及 9- 羟利培酮的检测结果均不遵循正态分布，我们采用 Spearman 秩相关检验并作散点图。结果表明，Bottle-in 组和 RP 组的利培酮以及 9- 羟利培酮血药浓度监测结果之间存在较高的相关度。相关性分析结果见表 2，散点图见图 3。

表 2　两组利培酮和 9- 羟利培酮监测结果的相关性分析

Tab 2　Correlation analysis of the detection of two groups of risperidone and 9-hydroxyrisperidone

项目	利培酮	9- 羟利培酮	利培酮＋ 9- 羟利培酮
Bottle-in 组	7.21±10.91	32.04±34.83	45.76±40.81
RP 组	6.53±10.63	30.79±34.38	44.82±40.92
r	0.9922	0.9953	0.9976
95%*CI*	0.9868 ～ 0.9954	0.9920 ～ 0.9973	0.9959 ～ 0.9986
P	＜ 0.01	＜ 0.01	＜ 0.01

2.14　回归分析

Passing-Bablok 回归分析显示，利培酮的直线方程为 $Y = 0.9988X + 0.2276$，9- 羟利培酮的直线方程为 $Y = 1.0038X + 0.1622$，显示 Bottle-in 组的检测结果与 RP 组的检测结果非常接近，几乎无偏差。综合利培酮和 9- 羟利培酮的检测结果，回归分析得到的直线方程为 $Y = 1.0068X － 0.2827$，表明两种技术在综合检测结果上的一致性非常好。三组结果均与 $Y = X$ 的恒等线非常接近，表明两种检测技术之间具有很高的一致性，没有显著的系统偏差。回归分析结果见表 3。

2.15　BlanD-Altman 一致性检验

BlanD-Altman 一致性分析中 Bottle-in 组和 RP 组的利培酮和 9- 羟利培酮血药浓度监测结果偏倚差值（bias），偏倚标准差（*SD* of bias），95% 一致性界限（95% limits of agreement，95%LoA）的范围见表 4，未出现 95%LoA 以外的点，证实两种处理方法利培酮和 9- 羟利培酮血药浓度监测结果具有良好的一致性。BlanD-Altman 一致性分析结果见表 4，差值图见图 4。

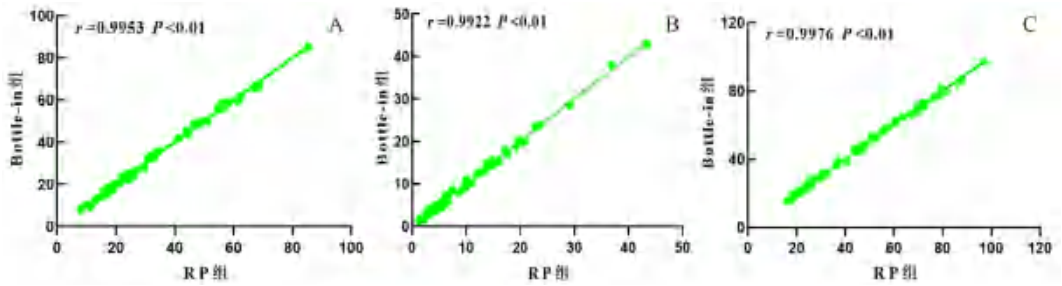

图 3　两种处理方法利培酮和 9- 羟利培酮检测结果的 Spearman 相关散点图

Fig 3　Spearman correlation scatterplot of risperidone and 9-hydroxyrisperidone detection results from both groups

A. 利培酮（risperidone）；B. 9- 羟利培酮（9-hydroxyrisperidone）；C. 利培酮＋ 9- 羟利培酮（risperidone ＋ 9-hydroxyrisperidone）

表 3　利培酮和 9- 羟利培酮检测结果的 Passing-Bablok 回归分析

Tab 3　Passing-Bablock regression of detection of risperidone and 9-hydroxyrisperidone

项目	截距 a	95%*CI*	斜率 b	95%*CI*
利培酮	0.2276	－ 0.0377 ～ 0.3819	0.9988	0.9745 ～ 1.0201
9- 羟利培酮	0.1622	－ 0.3978 ～ 0.6900	1.0038	0.9868 ～ 1.0317
利培酮＋ 9- 羟利培酮	－ 0.2827	－ 0.9598 ～ 0.6510	1.0068	0.9909 ～ 1.0252

表 4　利培酮和 9- 羟利培酮检测结果的 BlanD-Altman 一致性分析

Tab 4　BlanD-Altman consistency of detection of risperidone and 9-hydroxyrisperidone

项目	bias	*SD* of bias	95%LoA
利培酮	－ 0.08	0.60	－ 1.25 ～ 1.08
9- 羟利培酮	－ 0.14	1.12	－ 2.34 ～ 2.05
利培酮＋ 9- 羟利培酮	－ 0.23	1.22	－ 2.62 ～ 2.17

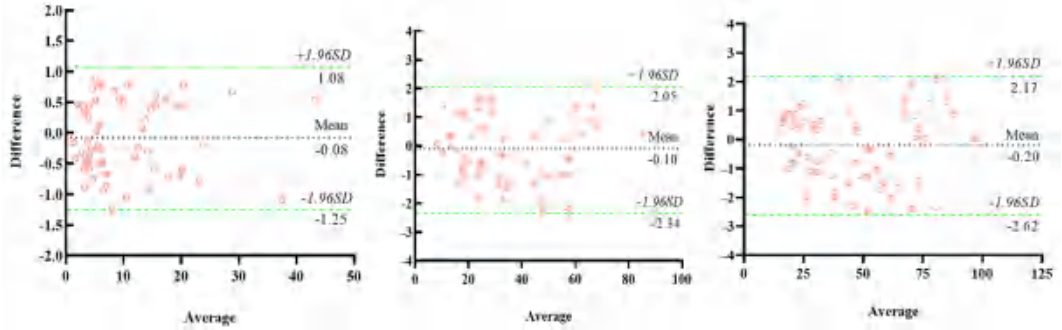

图 4　两种处理方法利培酮和 9- 羟利培酮检测结果 BlanD-Altman 图

Fig 4　BlanD-Altman plot of risperidone and 9-hydroxyrisperidone detection results from both groups

A. 利培酮（risperidone）；B. 9- 羟利培酮（9-hydroxyrisperidone）；C. 利培酮＋ 9- 羟利培酮（risperidone ＋ 9-hydroxyrisperidone）

室间质评标准，以 1/2 TEa（TEa ＝ 30%）作为质量控制的可接受误差标准，进而设定了靶值 ±15% 的允许误差范围。利用 MedCalc 统计软件对预期偏倚估计值（*Bc*）及其 95%*CI* 进行了精确计算，结果见表 5。数据显示，所有样本的 *Bc* 值均位于可接受偏倚限值的范围内，表明 Bottle-in 组与 RP 组之间的检测结果具有高度一致性，且不存在统计学意义上的显著偏倚。此结果进一步验证了 Bottle-in 技术的准确性和可靠性。

2.17　分析流程速度综合评价

在样品前处理阶段，RP 组的 12 例样本所需的前处理时间为 15 min，而采用 Bottle-in 技术的同数量样本仅需约 5 min，这表明 Bottle-in 技术能够将前处理时间减少约 66.67%。样本前处理后，再利用实验中具备平衡稳定用时短，标曲稳定无需随行标曲等特点的 LC-MS 技术可实现样本快速定量检测。由表 6 可知，在系统平衡、12 个样本进样时间及数据处理方面，两组无差异。综合考虑，在 12 例患者利培酮血药浓度全流程检出时间上，Bottle-in 组较 RP 组能缩短 12.50% 的时长。

2.16　MDL 偏倚分析

根据《中国精神科治疗药物监测临床应用专家共识》第七版所提出的（利培酮＋ 9- 羟利培酮）治疗参考范围为 20 ～ 60 ng • mL^{-1}，确定其医学决定水平（*Xc*）为 20 ng • mL^{-1} 和 60 ng • mL^{-1}。在此基础上，遵循国家卫生健康委员会临床检验中心

3　讨论

本研究旨在评估 Bottle-in 样品前处理新技术和 RP 传统技术在利培酮及其主要代谢物 9- 羟利培酮血药浓度检测效能的一致性。采用的适配器具备微孔高分子过滤筒，该设计允许小分子自由通过，而大分子蛋白质则被有效拦截。在实际操作过程中，适配器在下降过程中产生压力，使得样本溶液中的小分子穿透过滤层，而大分子蛋白

表 5　医学决定水平预期偏倚计算

Tab 5　Calculation of expected bias at medical decision-making level

参数	*Xc*/（ng・mL^{-1}）	
	20	60
Bc	－ 0.1460	0.1276
Bc 的 95%*CI*	－ 0.5903 ～ 0.6623	－ 0.4721 ～ 1.1463
可接受的偏倚的限值	－ 3 ～ 3	－ 9 ～ 9

表 6　两种方法样本结合快速 LC-MS 技术对 12 例患者利培酮血药浓度全流程检出时长对比

Tab 6　Detection time of risperidone blood concentration in 12 patients through the entire process with two sets of samples combined with rapid LC-MS technology

组别	初始样本全流程时长				
	时间段 1	时间段 2	时间段 3	时间段 4	总时间
Bottle-in 组	仪器开机自检，添加配套流动相，系统平衡（20 min）	手动加样，摇晃均匀，将一体化适配器缓慢放入样品杯中直接上机（5 min）	样品排序（含质控），建立批处理表，样品在线分析（40 min）	数据处理（5 min）	70 min
RP 组	仪器开机自检，添加配套流动相，系统平衡（20 min）	手动加样，旋涡混合，样品离心，提取上清液至进样瓶（15 min）	样品排序（含质控），建立批处理表，样品在线分析（40 min）	数据处理（5 min）	80 min

果对于临床医师制订个体化给药方案、优化患者就医体验具有重大意义。因此，对基于不同前处理技术建立的血药浓度测定方法所得结果的一致性和偏倚性进行评估，对于确保临床实验室提供准确、可靠的检测结果至关重要[7-10]。

系统比较 Bottle-in 和 RP 前处理技术的 LC-MS 方法测定利培酮和 9- 羟利培酮血药浓度的灵敏度、特异性、精密度、准确度、回收率和稳定性，结果表明，两种方法均可满足临床利培酮和 9- 羟利培酮血药浓度监测的要求，同时也表明 Bottle-in 技术在样品前处理方面不亚于 RP 技术。按照 CLSI EP9-A3 文件中关于使用患者样本进行方法比对及偏移评估的实验要求设计，另外还加入了消除个人意志偏倚因素手段，即在检测前由一人分别对两组样本随机排列，实验人员在不知晓样本信息的情况下进行检测操作。数据显示，两组样本（利培酮＋ 9- 羟利培酮）血药浓度结果未出现离群值，并具有强相关性（$P < 0.01$），相关系数 $r = 0.9976$；Passing-Bablok 回归模型进行拟合后（利培酮＋ 9- 羟利培酮）呈现良好的线性关系（$Y = 1.0068X － 0.2827$），截距 a 95%*CI* 为 － 0.9598 ～ 0.6510，斜率 b 95%*CI* 为 0.9909 ～ 1.0252；BlanD-Altman 检验结果具有良好的一致性，（利培酮＋ 9- 羟利培酮）bias 值为 － 0.23，95%LoA 为 － 2.62 ～ 2.17；MDL 预期偏倚分析表明两组检测结果未出现显著偏倚。Bottle-in 技术较 RP 技术在前处理时间上可节约 66.67%，在样本全流程检测中提高了整体检测效率。

综上所述，Bottle-in 技术具有和 RP 技术相同的药物萃取效率，样本处理自动化程度、处理效率、消耗成本明显优于 RP 技术，结合预制专用流动相和快速 LC-MS 系统的使用，总体上既保证检测结果的准确性，又节约检测时间，大幅提高了临床个体化指导用药效率，不仅使得医疗人员能够更快速地获得关键的药物浓度数据，及时为患者提供精准的治疗方案，还有助于降低实验室操作的复杂性，减少人为错误的可能性，进一步提高了检测流程，成为现代临床药学监测中的一项重要进展。

参考文献

[1] Guo ZX，Wu YE，Shi HY，et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of thirty-nine tyrosine kinase inhibitors in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal，2023，224：115-159.

[2] Dai J，Gao LH，Peng FD，et al. Simultaneous determination of twelve antiepileptic drugs in serum by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr，2020，38（1）：900-905.

[3] 戴丽静，杨烨，刘威杨，等 . 用 LC-MS/MS 法测定人血浆中哌柏西利的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2023，39（9）：1326-1330.

[4] 陈怡菁，肖桃，黄善情，等 . 二维色谱法测定人血清中文拉法辛浓度 [J]. 今日药学，2021，31（9）：674-677.

[5] Clinical And Laboratory Standards Institute. Mea-surement procedure comparison and bias estimation using patient samples [M]. 3rd. Wayne：PA，CLSI，2013.

[6] 徐建华，刘冬冬，黄宪章，等 . 新指南 CLSI EP9-A3 在方法学比对及偏移评估中的应用 [J]. 中华医学杂志，2015，95（12）：894-897.

[7] 果伟，张玲，王刚 . 中国精神科治疗药物监测临床应用专家共识（2022 年版）[J]. 神经疾病与精神卫生，2022，22（8）：601-608.

[8] 孟祥兆，李敏，孙江漫，等 . 两种血清总胆红素临床检测方法的偏倚分析和一致性评价 [J]. 安徽医药，2023，27（5）：925-927.

[9] 于婷，张娟丽，孙晶，等 . 2020 年血清中总胆红素测定比对试验结果分析 [J]. 国际检验医学杂志，2021，42（20）：2523-2526.

[10] 李锋，蔡永梅，王利新，等 . 临床生物化学非配套系统的测量溯源性现状及解决策略浅析 [J]. 中华医学杂志，2015，95（12）：888-890.

（收稿日期：2024-03-20；修回日期：2024-04-23）

综述

帕金森病神经突触损伤及中药干预研究进展

刘璇[1]，靳佳慧[1]，燕子姝[1]，李东娜[1]，张艳军[2, 3]，庄朋伟[1, 2, 3*]，郭虹[1*]（1. 天津中医药大学，天津 301617；2. 天津中医药大学第一附属医院，天津 300072；3. 国家中医针灸临床医学研究中心，天津 300072）

摘要：帕金森病（PD）是一种常见的神经退行性疾病，临床表现主要分为运动症状和非运动症状。运动症状是 PD 的终末核心特征之一，与黑质致密部多巴胺能神经元丢失直接相关。而 PD 运动症状出现之前往往会表现出嗅觉障碍、视觉障碍、睡眠障碍、抑郁、认知障碍等非运动症状，严重影响患者的生活质量。这些症状的产生与大脑特定部位神经突触损伤及功能变化有关，围绕 PD 突触损伤进行早期诊断和干预是防止 PD 进行性加重的重要环节。传统中医药在治疗神经退行性疾病方面具有丰富的理论知识和临床经验，中药是常用手段，且其对突触保护凸显出独特的作用。本文综述了神经突触损伤在 PD 相关症状发生发展过程中扮演的角色，突触损伤的机制和中药对突触损伤的干预作用及潜在机制，以期为神经退行性疾病的有效防治提供新的思路。

关键词：帕金森病；突触损伤；运动症状；非运动症状

中图分类号：R277.7，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1276-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.026

Research progress in synaptic damage in Parkinson’s disease and intervention by traditional Chinese medicine

LIU Xuan[1], JIN Jia-hui[1], YAN Zi-shu[1], LI Dong-na[1], ZHANG Yan-jun[2, 3], ZHUANG Peng-wei[1, 2, 3*], GUO Hong[1*] (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 300072; 3. *National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion*, *Tianjin* 300072)

Abstract: Parkinson’s disease (PD) is a common neurodegenerative disorder characterized by both motor and non-motor symptoms. The motor symptoms, closely associated with the loss of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta, are considered a core feature of PD. However, non-motor symptoms such as olfactory dysfunction, visual impairment, sleep disturbances, depression, and cognitive impairment often precede the onset of PD motor symptoms, significantly impacting patients’ lives. The emergence of these symptoms is linked to synaptic damage and synaptic functional changes in specific brain regions. Early diagnosis and intervention on synaptic damage are crucial for preventing the progressive worsening of PD. Traditional Chinese medicine has rich theoretical knowledge and clinical experience in treating neurodegenerative diseases, utilizing Chinese herbs as a common approach, with a unique role in synaptic protection. This article reviewed the role of synaptic damage in the development of PD-related symptoms, the underlying mechanism, and the intervention and potential mechanism of Chinese herbs in synaptic damage, to provide new insights for the effective prevention and treatment of neurodegenerative diseases.

Key words: Parkinson’s disease; synaptic damage; motor symptom; non-motor symptom

基金项目：天津市中医药重点领域科研项目（No. 2024008）；天津市研究生科研创新项目（No.2022SKY229）；天津中医药大学研究生科研创新项目（No.YJSKC-20221039）。

作者简介：刘璇，女，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：lx19980619@163.com *通信作者：庄朋伟，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药药理学研究，email：zhuangpengwei@163.com；郭虹，女，博士，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药药理学研究，email：cacti1983@163.com

帕金森病（Parkinson’s disease，PD）是世界上第二大常见的神经退行性疾病，仅次于阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）。其临床表现不仅包括典型的运动症状，如震颤、强直、运动迟缓和姿势不稳；还包括一系列非运动症状，如嗅觉障碍、视觉障碍、睡眠障碍、抑郁、认知障碍等。PD 主要病理特征是黑质致密部（substantia nigra pars compacta，SNc）多巴胺（dopamine，DA）能神经元变性丢失，可导致运动障碍[1]。有证据表明，PD 病理状态下不仅多巴胺能系统存在功能受损，而且大脑其他系统（例如海马、皮层、嗅球等）也会发生病理改变，此时突触蛋白水平下降，PD 非运动症状出现[2-3]。且有报道称 PD 神经突触损伤主要与 PD 非运动症状有关[4-5]。突触是神经元间信息传递的主要部位，对神经元交流和大脑功能的维持至关重要。突触损伤会导致突触丢失、大脑功能受损和突触网络被破坏。此外，有研究表明，在 PD 中突触损伤先于神经元变性，提示这是一种早期病理事件[6]，靶向防治突触损伤有望延缓 PD 病理进程。因此，本文主要从神经突触损伤对 PD 相关症状的影响、突触损伤的机制和中药对突触损伤的治疗进行归纳和总结，阐述 PD 病理过程中突触损伤导致的相关症状及潜在机制，以期为临床用药开发提供新思路或新靶标。

1 突触损伤介导 PD 病理进展

PD 在临床上潜伏期较长，发病前期诊断困难，一般依据运动症状进行初步诊断。然而，一旦 PD 患者出现运动障碍，说明多巴胺能神经元已经出现了不可逆丢失。所以，需要对 PD 非运动障碍进行深入探讨，以明确 PD 病程进展中的重要病理环节，寻求新的干预靶点或干预手段。突触是生理学上最活跃的神经元区室，维持着正常的神经环路和脑功能。突触依赖于足够的线粒体提供的三磷酸腺苷（ATP），为突触囊泡（synaptic vesicles，SVs）循环提供动力，维持神经递质的重复释放——神经元间信息传递的主要方式。有证据表明，突触在 PD 的早期阶段受到影响，在病理状态下，细胞因子、可溶性蛋白等功能障碍可导致突触损伤，包括突触传递受损、神经递质释放减少以及突触囊泡内吞作用受损等[7-8]；随后结构或功能性突触功能障碍的机制开始被阐明。

1.1 嗅觉障碍

90% 以上的 PD 患者会出现嗅觉障碍，这也是 PD 常见的非运动障碍之一。在 PD 嗅觉障碍模型中，嗅球（olfactory bulb，OB）中过表达 α-突触核蛋白（α-synuclein，α-Syn），导致嗅球内颗粒细胞（granular cells，GCs）突触前结构改变，GCs 到僧帽细胞突触传递受损，僧帽 / 丛状细胞过度活跃，最终引起小鼠检测气味能力下降，出现嗅觉障碍[9]。在 A53T-α-Syn 小鼠模型中，γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）转运蛋白和囊泡 GABA 转运蛋白异常表达，导致嗅球中 GABA 能传递受损，表现出嗅觉功能障碍[10]。在 A30P 突变 α-Syn 过表达小鼠模型疾病早期发现，嗅球中参与突触内吞作用和突触囊泡介导转运的蛋白表达降低，引发嗅觉障碍[11]。

1.2 视觉障碍

视觉障碍在 PD 的早期阶段出现，症状之一是视觉运动知觉的损害。Parkin 敲除后视网膜中线粒体结构异常，导致突触囊泡释放严重减少，突触传递受损，引起视觉障碍[12]。研究发现，PD 患者的视网膜中多巴胺能细胞与胆碱乙酰转移酶（choline acetyltransferase，ChAT）无长突细胞间突触接触减少和 ChAT无长突细胞密度降低，导致了视觉症状中运动知觉受损[13]。

1.3 睡眠障碍

睡眠障碍也是 PD 患者的早期主要症状，突触功能障碍在睡眠障碍中同样发挥重要作用。在 PD 果蝇的睡眠障碍模型中，富含亮氨酸重复激酶 2（leucine-rich repeat kinase 2，LRRK2）在蘑菇体中过表达会引起突触功能障碍，表现为微小兴奋性突触后电流和兴奋性突触后电位的频率降低[14]。睡眠障碍是昼夜节律紊乱的结果，有证据表明 α-Syn 与突触囊泡中神经递质释放有关，在突触维持中发挥作用。在 A53T 小鼠中，α-Syn 过表达会导致视交叉上核中突触囊泡谷氨酸转运体 2 降低，光夹带受损，引发昼夜节律紊乱，最终导致睡眠障碍[15]。

1.4 焦虑

焦虑可能是 PD 的起始信号，出现在运动症状之前，突触功能障碍与焦虑密切相关。伏隔核（nucleus accumbens，NAc）是腹侧纹状体的一部分，主要负责奖赏和情绪过程。在 A53T-α-Syn 小鼠模型中，NAc 中 α-Syn 过表达会下调突触囊泡蛋白 SNAP-25、syntaxin1 和 VAMP2 的表达，使模型小鼠产生焦虑[16]。外侧缰核（lateral habenula，LHb）是一种上丘脑结构，接收来自基底神经节和边缘前脑的信号，并投射到多巴胺能和血清素能中脑核，与焦虑的病理生理学有关。在注射 6-羟基多巴胺（6-hydroxydopamine，6-OHDA）的 PD 大鼠中，阻断 LHb突触后 GABAB 受体导致神经

元过度活动，GABA/ 谷氨酸比值降低，DA 和 5- 羟色胺释放减少，诱发焦虑样反应 [17]。

1.5 抑郁

抑郁是 PD 早期和晚期最常见的非运动症状之一，大约 40% 的 PD 患者会发生抑郁，难以治愈 [18]。越来越多的证据表明，突触损伤可导致抑郁。在 6-OHDA 诱导的大鼠模型中，前额叶皮层（prefrontal cortex，PFC）突触相关蛋白（如 p-p70s6k、PSD95、synapsin Ⅰ）表达下降、自噬小体增多，导致抑郁 [19]。此外，PFC 中锌转运蛋白 3（zinc transporter 3，ZnT3）负责调节的突触 Zn^{2+} 与抑郁中的突触功能障碍有关。正常情况下，ZnT3 负责将 Zn^{2+} 隔离到谷氨酸能囊泡中，然后作为突触强度的共递质和调节剂释放。而 ZnT3 的减少则会导致突触 Zn^{2+} 调节丧失，诱发抑郁 [20]。海马神经元的突触损伤除了介导认知障碍外，还会导致抑郁。在 PD 抑郁模型中，海马 CA1 区补体蛋白 C1q 和 C3 激活诱导小胶质细胞过度吞噬突触，导致突触丢失，产生抑郁样行为 [21]。在皮质酮诱导的 PD 模型中，抑制 CREB/BDNF/TrkB/ERK 信号通路能降低海马突触相关蛋白 Synaptophysin、PSD95 表达，出现抑郁样症状 [22]。

1.6 认知障碍

认知障碍是 PD 最常见的非运动障碍之一，但目前尚无明确的治疗方法。近年研究证实，突触损伤与 PD 认知障碍密切相关。C1q 是一种含 GluN2C/D 的 *N*- 甲基 -D- 天冬氨酸受体的正变构调节剂，Nouhi 等 [23] 的研究可改善 PD 小鼠的长时程增强（long-term potentiation，LTP），增加纹状体 DA 释放，挽救纹状体突触功能障碍，最终改善运动学习缺陷。然而高浓度的 C1q 会介导小胶质细胞吞噬突触，对 PD 产生有害影响。在注射 6-OHDA 的 PD 小鼠模型中，C1q 和 C3 过度激活会增强小胶质细胞对突触的吞噬能力，进而破坏海马 CA1 区突触结构，降低 Synaptophysin、PSD95 水平，导致记忆功能障碍 [24]。

另外，一些基因突变也参与突触损伤导致的认知障碍。在老年细菌人工染色体转基因小鼠中，因 *LRRK2-G2019S* 突变导致活性增加的 LRRK2 激酶会破坏海马突触功能，导致海马 CA1 区基础突触效率降低 [25]；同样，*LRRK2-G2019S* 突变抑制海马 PSD95 蛋白水平，导致转基因小鼠认知障碍 [26]。PTEN 诱导激酶 1（PTEN induced putative kinase 1，PINK1）功能缺失可能导致海马突触变性，引起兴奋性传递变化，介导 PD 认知障碍 [27]。皮质神经元中 PINK1 缺失也可导致突触密度及功能降低，如树突结构被破坏、树突棘密度下降、兴奋性突触传递降低，导致认知障碍 [4]。另外，Parkin 在海马神经元谷氨酸能突触中具有重要作用，Parkin 功能缺失通过损害 NMDA 和 AMPA 受体转运，减少突触后谷氨酸的突触传递，致使 Homer1 水平下降，介导 PD 认知障碍 [28]。

1.7 运动障碍

在 PD 模型小鼠中，单侧 SNc 中注射病毒 A53T，发现纹状体中 *α*-Syn 表达增加，与突触前囊泡释放和突触后 NMDA 受体功能有关的 CaMK*β*-2 和 NR2B 表达降低，活跃突触减少，引起运动障碍 [29]。此外，在 SNc 中过表达 *α*-Syn 的 PD 模型中，发现纹状体突触功能和结构受损，包括线粒体功能失调、多巴胺能纤维内吞突触囊泡异常积累、轴突突触减少和突触后穿孔密度增加 [6]。Phan 等 [30] 的研究也证明了相同的结果，在过表达 *α*-Syn 的小鼠模型中观察到黑质 - 纹状体轴突病变、突触被破坏、多巴胺能神经传递功能障碍和运动障碍。另一项研究表明，突触蛋白Ⅲ积累导致 *α*-Syn 聚集成更毒性物质，引起纹状体突触损伤 [31]。因此，降低突触蛋白Ⅲ的浓度可缓解 PD 的运动障碍。

有证据表明，LRRK 在调节突触囊泡运输中发挥作用 [32]。研究表明，*LRRK2-G2019S* 突变损害中脑神经元突触囊泡内吞作用 [33]。另外，Auxilin 激酶活性依赖性的 *LRRK2-R1441C* 磷酸化会导致患者来源的多巴胺能神经元突触囊泡内吞功能中断和突触囊泡密度下降 [34]。研究表明，识别新的 Parkin 底物并确定其在突触功能中的作用，有助于更好地理解 PD 的分子基础。在 MPTP 小鼠模型中，Parkin 可以泛素化底物 STEP61，STEP61 水平升高破坏突触功能，表现出纹状体 DA 传递和突触功能障碍，导致运动障碍 [35]。

2 突触损伤的机制

突触损伤的机制主要涉及突触自身损伤和突触过度修剪两方面，包括线粒体功能障碍、自噬失调、炎症因子增加、神经胶质细胞激活介导过度修剪等，导致突触完整性被破坏。

2.1 突触自身损伤

2.1.1 线粒体功能障碍　目前，线粒体功能和动态网络对于维持正常的突触功能至关重要。线粒体功能障碍包括活性氧（reactive oxygen species，ROS）增加、线粒体形态异常和线粒体动力学异常等，可导致 PD 突触损伤。有证据表明，环境因素（如农药）会破坏线粒体功能和动态网络，导致突触传递中断。如拟除虫菊酯农药甲氰菊酯通过降低动力相关蛋白 1 表达诱导线粒体大小改变，导致氧化应激，如 ROS 水平增加和 4- 羟基壬烯醛

产生，最终破坏线粒体功能，损害突触传递[36]。此外，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 -1α（peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1α，PGC-1α）调节线粒体质量控制和能量代谢，是维持突触传递的关键因素。下调 PGC-1α 会导致线粒体功能障碍，破坏 PD 皮层和纹状体的轴突完整性和突触网络完整性[37]。

2.1.2　自噬失调　自噬是细胞清除受损的细胞器和错误折叠、异常聚集的蛋白质以维持细胞稳态的重要过程，对神经元的健康和功能至关重要。自噬发生于突触，受局部调控，并随着神经元活动的增加而增加。正常的突触自噬对于维持多巴胺能突触至关重要。自噬失调会导致突触功能障碍及丢失，在 *LRRK2-G2019s* 突变的果蝇神经肌肉接头突触前末端，发现激酶 LRRK2 及其底物 EndoA 下游的 EndoB 缺失，导致自噬失调，最终出现突触损伤[38]。

2.2　外因素介导突触损伤

神经退行性疾病与突触关系密切的细胞主要是大脑神经胶质细胞。在正常情况下，胶质细胞可通过突触修剪功能维持突触完整性。在病理情况下，胶质细胞过度修剪，致使突触结构不完整、突触数量减少，造成突触损伤。神经退行性疾病中存在神经炎症，过度的炎症环境可激活小胶质细胞，产生炎症因子如肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6、IL-1β、干扰素（IFN），加剧脑中炎症环境，进而引发一系列炎症反应，导致突触丢失[39-41]。有研究表明，SPP1 蛋白主要表达于血管周围巨噬细胞，可激活小胶质细胞上补体 C1q，引起小胶质细胞吞噬突触[42]。还有研究表明，C1q 作为补体经典激活途径的起始因子，其下游补体 C3 异常激活可与活化小胶质细胞表面受体 C3R 相互作用，增加其吞噬能力并导致突触损伤[43-44]。此外，髓系细胞触发受体 2（triggering receptor expressed on myeloid cells 2，TREM2）在小胶质细胞内表达，可控制突触修剪过程；当小胶质细胞激活时，TREM2 信号促进其过度吞噬，导致突触丢失[45]。

星形胶质细胞也是突触通信中活跃且不可或缺的参与者。皮质高频刺激通过激活代谢型谷氨酸受体 5（mGluR5）和三磷酸肌醇 2 型受体（IP3R2）信号通路增加纹状体星形胶质细胞中钙（Ca^{2+}）水平，腺苷（adenosine）积累激活腺苷 A1 受体（adenosine A1 receptor，A1R），抑制谷氨酸（glutamic acid，Glu）释放，导致长时程抑制（long-term depression，LTD）增强[46]，损伤突触可塑性，使突触功能出现障碍。

PD 的病理进展和神经退行性疾病中突触损伤的机制见图 1。

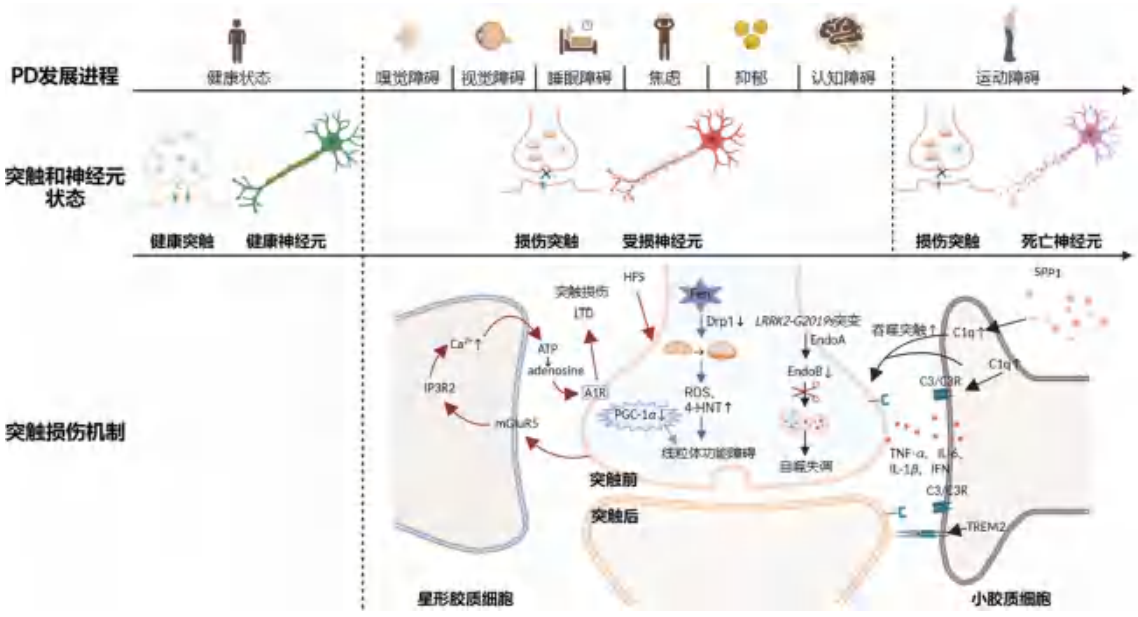

图 1　PD 的病理进展和神经退行性疾病中突触损伤的机制

Fig 1　Pathological progression of PD and mechanism of synaptic damage in neurodegenerative diseases

注（Note）：甲氰菊酯（fenpropathrin，Fen）；动力相关蛋白 1（dynamin-related protein 1，Drp1）；4- 羟基壬烯醛（4-hydroxynonenal，4-HNE）；endophilin A 亚家族（endophilin A，EndoA）；endophilin B 亚家族（endophilin B，EndoB）；高频刺激（high-frequency stimulation，HFS）。

3　中药对神经突触损伤的干预作用及机制

AD 和 PD 是两大常见的神经退行性疾病，在发病率和患病率方面增长速度很快[47-48]。目前，全球超过 5000 万人患有 AD，预计到 2050 年将

达到 1.5 亿 [48]。据估计，全球 PD 患病人数约为 1000 万，并且呈逐年上升趋势 [49-50]。尽管目前已有治疗 AD 和 PD 的药物和疗法，但副作用明显和疗效不足。越来越多的证据表明，中药在一些神经退行性疾病中具有改善症状或干预发病机制的药理作用 [51-52]。神经突触损伤是神经退行性疾病中重要的病理环节，而中药在干预神经突触损伤中具有令人意想不到的效果，故中药干预神经突触损伤有很大的应用前景。

目前，诸多研究表明中药能干预神经突触损伤。比如人参皂苷 Rb_1 能够促进海马 CA3 区 α-Syn 表达，恢复谷氨酸能传递，并增加 PSD95 的表达，改善突触损伤进而改善空间学习和记忆缺陷 [53]。在海马神经元培养中，葛根乙醇提取物能够促进神经元的轴突、树突生长和突触形成，并提供神经营养支持，研究发现给予葛根乙醇提取物后，海马神经元的突触前 SV2 蛋白和突触后 PSD95 增加，从而增强突触功能 [54]。藏红花素通过激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR），保护腹侧被盖区（ventral tegmental area，VTA）中的多巴胺能神经元，从而改善内侧前额叶皮层神经突触功能障碍，缓解 PD 小鼠的抑郁样行为 [55]。此外，也有不少中药用于干预突触损伤。三七总皂苷和栀子苷配伍可以防止 APP/PS1 转基因小鼠海马 CA1 区的树突棘丢失和促进皮质区树突棘相关蛋白的表达，改善突触可塑性 [56]。姜黄素能减轻 5XFAD 转基因小鼠突触超微结构的破坏和促进 Synaptophysin 表达，从而改善突触可塑性，最终改善小鼠的学习记忆能力 [57]。竹节参可上调大鼠脑海马组织中 Synapsin Ⅰ、Synaptophysin 和 PSD95 蛋白的表达，增强突触功能，改善认知功能障碍 [58]。山茱萸通过增加线粒体融合，延缓线粒体分裂，平衡氧化应激进而改善 AD 小鼠神经元突触损伤 [59]。中药复方金思维通过上调 drebrin 蛋白和下调 cofilin 蛋白来维持突触结构蛋白稳态，增加小鼠突触数量、结构及蛋白含量，保护突触功能 [60]。天芪益智方通过提高海马 Synaptophysin 和微管相关蛋白 MAP-2 的表达，保护突触功能，提高大鼠学习和记忆能力 [61]。黄连解毒汤、参枝苓口服液、开心散加味新方可促进小鼠海马 PSD95 表达，改善突触结构，以减轻神经突触损伤 [62-64]。中药还可通过神经胶质细胞途径干预突触损伤。如金钗石斛水提物通过抑制 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区中小胶质细胞和星形胶质细胞数量增加、减少炎症因子释放，缓解 LTP 损伤，改善突触可塑性 [65]。地黄饮子可通过促进星形胶质细胞对 Glu 的再摄取能力，减少其异常累积，上调 Synaptophysin、PSD95 的表达，改善突触结构损伤，增强突触可塑性，最终提高 AD 小鼠学习记忆能力 [66]。另外，中药通过多个通路对突触损伤进行干预治疗。冬凌草甲素通过激活 BDNF/TrkB/CREB 信号通路减少小鼠海马神经元突触丢失，改善学习记忆能力 [67]。知母皂苷 B 激活 Akt/mTOR 信号通路，进而上调皮层神经元 Synaptophysin 和 PSD95 的表达，改善突触可塑性 [68]。孔圣枕中丹通过上调 cAMP-PKA-CREB 信号通路诱导 LTP、刺激突触形成，改善突触可塑性，从而保护认知功能 [69]。龟龄集通过激活 BDNF/TrkB 信号通路促进 SAMP8 小鼠海马 GAP43、Synaptophysin 表达，改善突触功能障碍 [70]。还脑益聪方通过激活小鼠海马 CA1 区 PS/γ- 分泌酶 /α-Nrxn1 通路改善突触可塑性，包括提高兴奋性突触后电位 LTP 时间、增加突触数量及突触后致密带厚度 [71]。酸枣仁汤可激活 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路和抑制 Tau 蛋白磷酸化，增加小鼠海马 CA3 区神经元树突棘密度、树突分支数量及 Synaptophysin 和 PSD95 蛋白表达，改善突触损伤 [72]。

中药对突触损伤的干预作用及机制汇总见表 1。

4 展望

本文综述了突触损伤介导的 PD 病理过程，并阐述了神经退行性疾病中突触损伤的机制及中药对其干预情况。突触损伤在神经退行性疾病的病程进展中举足轻重，其在 PD 中也逐渐受到重视。临床上用于治疗 PD 和 AD 的药物美金刚，已被发现可以改善突触功能。另外，基于神经营养因子的治疗方法也被证实可促进突触可塑性，但是存在给药途径困难和治疗成本高等缺点。因此，针对突触损伤治疗需要寻求创新药物及创新疗法。目前中药因具有不良反应少、多靶点、多通路等优势，在预防突触损伤中越来越受到关注，其可用作一种替代疗法来防治神经退行性疾病。然而，目前中药对突触损伤的干预机制研究仍相对薄弱，其在 PD 中的相关研究相对较少，这提示中药在防治 PD 突触损伤方面还有探索空间。因此，对突触损伤进行干预及药物防治，即在疾病早期关键环节采取干预手段，可为防治神经退行性疾病提供理论基础和新方向。

表 1　中药对突触损伤的干预研究

Tab 1　Intervention of traditional Chinese medicine on synaptic damage

中药	来源或组成	影响突触的表现	文献
人参皂苷 Rb_1	人参	海马 CA3 区 α-Syn 表达↑，恢复谷氨酸能传递，PSD95 表达↑	[53]
葛根乙醇提取物	葛根	神经元轴突、树突和突触形成↑，提供神经营养支持，突触前 SV2 蛋白和突触后 PSD95↑	[54]
藏红花素	藏红花	激活 mTOR 保护 VTA 中多巴胺能神经元，改善内侧前额叶皮层神经突触功能障碍	[55]
三七总皂苷、栀子苷	三七、栀子	海马 CA1 区的树突棘丢失↓，皮质区树突棘相关蛋白表达↑	[56]
姜黄素	姜黄	突触超微结构破坏↓，Synaptophysin 表达↑	[57]
竹节参	—	Synapsin Ⅰ、Synaptophysin 和 PSD95 表达↑	[58]
山茱萸	—	线粒体融合↑，延缓线粒体分裂，平衡氧化应激	[59]
金思维	人参、苁蓉、地黄、远志、石菖蒲、姜黄、茯苓、丹参	drebrin 蛋白↑和 cofilin 蛋白↓，维持突触结构蛋白稳态，小鼠突触数量、结构及蛋白含量↑	[60]
天芪益智方	红芪、红景天	海马 Synaptophysin 和微管相关蛋白 MAP-2 表达↑	[61]
黄连解毒汤、参枝苓口服液、开心散加味新方	黄连、黄芩、黄柏、栀子；党参、桂枝、茯苓等药物；人参、茯苓、远志、石菖蒲、川芎、丹参、巴戟天	海马 PSD95 表达↑	[62-64]
金钗石斛水提物	金钗石斛	小胶质细胞和星形胶质细胞数量↓，炎症因子释放↓，缓解 LTP 损伤	[65]
地黄饮子	熟地黄、山茱萸、肉苁蓉、巴戟天、附子、肉桂、麦冬、石斛、五味子、茯苓、石菖蒲、远志、薄荷、生姜、大枣	星形胶质细胞对 Glu 的再摄取能力↑，Glu 累积↓，Synaptophysin、PSD95 表达↑	[66]
冬凌草甲素	冬凌草	激活 BDNF/TrkB/CREB 通路，小鼠海马神经元突触丢失↓	[67]
知母皂苷 B	知母	激活 Akt/mTOR 通路，皮层 Synaptophysin、PSD95 表达↑	[68]
孔圣枕中丹	龟板、龙骨、远志、石菖蒲	激活 cAMP-PKA-CREB 通路，LTP↑，突触形成↑	[69]
龟龄集	鹿茸、海马、肉苁蓉、补骨脂、锁阳、淫羊藿、菟丝子、熟地黄、天冬、枸杞子、人参、穿山甲、杜仲、牛膝、丁香、砂仁	激活 BDNF/TrkB 通路，海马 GAP43、Synaptophysin 表达↑	[70]
还脑益聪方	何首乌、人参、石菖蒲、黄连、川芎	激活 PS/γ- 分泌酶 /α-Nrxn1 通路，兴奋性突触后电位 LTP 时间↑，突触数量及突触后致密带厚度↑	[71]
酸枣仁汤	炒酸枣仁、茯苓、川芎、知母、炙甘草	激活 PI3K/AKT/GSK-3β 通路，抑制 Tau 蛋白磷酸化，海马树突棘密度、树突分支数量↑，Synaptophysin、PSD95 表达↑	[72]

参考文献

[1] Bloem BR，Okun MS，Klein C. Parkinson’s disease [J]. Lancet，2021，397（10291）：2284-2303.

[2] Horsager J，Okkels N，Hansen AK，et al. Mapping cholinergic synaptic loss in Parkinson’s disease：an [18F] FEOBV PET case-control study [J]. J Parkinsons Dis，2022，12（8）：2493-2506.

[3] Radovanovic L，Petrovic J，Saponjic J. Hippocampal and reticulo-thalamic parvalbumin interneurons and synaptic re-organization during sleep disorders in the rat models of Parkinson’s disease neuropathology [J]. Int J Mol Sci，2021，22（16）：8922.

[4] Otero PA，Fricklas G，Nigam A，et al. Endogenous PTEN-induced kinase 1 regulates dendritic architecture and spinogenesis [J]. J Neurosci，2022，42（41）：7848-7860.

[5] Marxreiter F，Ettle B，May VEL，et al. Glial A30P alpha-synuclein pathology segregates neurogenesis from anxiety-related behavior in conditional transgenic mice [J]. Neurobiol Dis，2013，59：38-51.

[6] Merino-Galán L，Jimenez-Urbieta H，Zamarbide M，et al. Striatal synaptic bioenergetic and autophagic decline in premotor experimental parkinsonism [J]. Brain，2022，145（6）：2092-2107.

[7] Imbriani P，Martella G，Bonsi P，et al. Oxidative stress and synaptic dysfunction in rodent models of Parkinson’s disease [J]. Neurobiol Dis，2022，173：105851.

[8] Schirinzi T，Madeo G，Martella G，et al. Early synaptic dysfunction in Parkinson’s disease：insights from animal models [J]. Mov Disord，2016，31（6）：802-813.

[9] Chen FJ，Liu W，Liu PL，et al. α-synuclein aggregation in the olfactory bulb induces olfactory deficits by perturbing granule cells and granular-mitral synaptic transmission [J]. NPJ Parkinsons Dis，2021，7（1）：114.

[10] Liu XY，Wang K，Deng XH，et al. Amelioration of olfactory dysfunction in a mouse model of Parkinson’s disease via enhancing GABAergic signaling [J]. Cell Biosci，2023，13（1）：101.

[11] Martin-Lopez E，Vidyadhara DJ，Liberia T，et al. α-synuclein pathology and reduced neurogenesis in the olfactory system affect olfaction in a mouse model of Parkinson’s

disease [J]. J Neurosci，2023，43（6）：1051-1071.
[12] Hu ZX，Pu JL，Zheng R，et al. Mitochondrial morphology and synaptic structure altered in the retina of parkin-deficient mice [J]. Neurosci Lett，2022，790：136888.
[13] Sánchez-Sáez X，Ortuño-Lizarán I，Sánchez-Castillo C，et al. Starburst amacrine cells，involved in visual motion perception，loose their synaptic input from dopaminergic amacrine cells and degenerate in Parkinson's disease patients [J]. Transl Neurodegener，2023，12（1）：17.
[14] Sun XC，Ran DZ，Zhao XF，et al. Melatonin attenuates hLRRK2-induced sleep disturbances and synaptic dysfunction in a Drosophila model of Parkinson's disease [J]. Mol Med Rep，2016，13（5）：3936-3944.
[15] Pfeffer M，Zimmermann Z，Gispert S，et al. Impaired photic entrainment of spontaneous locomotor activity in mice overexpressing human mutant *α*-synuclein [J]. Int J Mol Sci，2018，19（6）：1651.
[16] Kim K，Wi S，Seo JH，et al. Reduced interaction of aggregated *α*-synuclein and VAMP2 by environmental enrichment alleviates hyperactivity and anxiety in a model of Parkinson's disease [J]. Genes（Basel），2021，12（3）：392.
[17] Yang YX，Liu J，Wang YX，et al. Blockade of pre-synaptic and post-synaptic $GABA_B$ receptors in the lateral habenula produces different effects on anxiety-like behaviors in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rats [J]. Neuropharmacology，2021，196：108705.
[18] Jellinger KA. The pathobiological basis of depression in Parkinson disease：challenges and outlooks [J]. J Neural Transm（Vienna），2022，129（12）：1397-1418.
[19] Ning BL，Wang ZF，Wu Q，et al. Acupuncture inhibits autophagy and repairs synapses by activating the mTOR pathway in Parkinson's disease depression model rats [J]. Brain Res，2023，1808：148320.
[20] Whitfield DR，Vallortigara J，Alghamdi A，et al. Depression and synaptic zinc regulation in Alzheimer disease，dementia with lewy bodies，and Parkinson disease dementia [J]. Am J Geriatr Psychiatry，2015，23（2）：141-148.
[21] Li Y，Yin Q，Li Q，et al. Botulinum neurotoxin A ameliorates depressive-like behavior in a reserpine-induced Parkinson's disease mouse model via suppressing hippocampal microglial engulfment and neuroinflammation [J]. Acta Pharmacol Sin，2023，44（7）：1322-1366.
[22] Yuan CL，Dai CM，Li ZQ，et al. Bexarotene improve depression-like behaviour in mice by protecting against neuro-inflammation and synaptic damage [J]. Neurochem Res，2020，45（7）：1500-1509.
[23] Nouhi M，Zhang XQ，Yao N，et al. CIQ，a positive allosteric modulator of GluN2C/D-containing *N*-methyl-d-aspartate receptors，rescues striatal synaptic plasticity deficit in a mouse model of Parkinson's disease [J]. CNS Neurosci Ther，2018，24（2）：144-153.
[24] 郭婕，赵颖倩，李华，等 . 电针对帕金森病痴呆小鼠海马突触可塑性和补体依赖性记忆障碍的影响 [J]. 针刺研究，2022，47（12）：1041-1047.
[25] Sweet ES，Saunier-Rebori B，Yue ZY，et al. The Parkinson's disease-associated mutation LRRK2-G2019S impairs synaptic plasticity in mouse hippocampus [J]. J Neurosci，2015，35（32）：11190-11195.
[26] Adeosun SO，Hou X，Zheng BY，et al. Human LRRK2 G2019S mutation represses post-synaptic protein PSD95 and causes cognitive impairment in transgenic mice [J]. Neurobiol Learn Mem，2017，142（Pt B）：182-189.
[27] Feligioni M，Mango D，Piccinin S，et al. Subtle alterations of excitatory transmission are linked to presynaptic changes in the hippocampus of PINK1-deficient mice [J]. Synapse，2016，70（6）：223-230.
[28] Cortese GP，Zhu M，Williams D，et al. Parkin deficiency reduces hippocampal glutamatergic neurotransmission by impairing AMPA receptor endocytosis [J]. J Neurosci，2016，36（48）：12243-12258.
[29] Wang QJ，Chen AD，Chen HC，et al. Noncanonical roles of h*α*-syn（A53T）in the pathogenesis of Parkinson's disease：synaptic pathology and neuronal aging [J]. Neural Plast，2020，2020：6283754.
[30] Phan JA，Stokholm K，Zareba-Paslawska J，et al. Early synaptic dysfunction induced by *α*-synuclein in a rat model of Parkinson's disease [J]. Sci Rep，2017，7（1）：6363.
[31] Faustini G，Longhena F，Varanita T，et al. Synapsin Ⅲ deficiency hampers *α*-synuclein aggregation，striatal synaptic damage and nigral cell loss in an AAV-based mouse model of Parkinson's disease [J]. Acta Neuropathol，2018，136（4）：621-639.
[32] Piccoli G，Onofri F，Cirnaru MD，et al. Leucine-rich repeat kinase 2 binds to neuronal vesicles through protein interactions mediated by its C-terminal WD40 domain [J]. Mol cell Biol，2014，34（12）：2147-2161.
[33] Pan PY，Li XT，Wang J，et al. Parkinson's disease-associated LRRK2 hyperactive kinase mutant disrupts synaptic vesicle trafficking in ventral midbrain neurons [J]. J Neurosci，2017，37（47）：11366-11376.
[34] Nguyen M，Krainc D. LRRK2 phosphorylation of auxilin mediates synaptic defects in dopaminergic neurons from patients with Parkinson's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2018，115（21）：5576-5581.
[35] Kurup PK，Xu J，Videira RA，et al. STEP61 is a substrate of the E3 ligase parkin and is upregulated in Parkinson's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2015，112（4）：1202-1207.
[36] Jiao ZG，Wu YX，Qu SG. Fenpropathrin induces degeneration of dopaminergic neurons via disruption of the mitochondrial quality control system [J]. Cell Death Discov，2020，6：78.
[37] Panes JD，Wendt A，Ramirez-Molina O，et al. Deciphering the role of PGC-1*α* in neurological disorders：from mitochondrial dysfunction to synaptic failure [J]. Neural Regen Res，2022，17（2）：237-245.
[38] Hernandez-Diaz S，Ghimire S，Sanchez-Mirasierra I，et al. Endophilin-B regulates autophagy during synapse devel-

opment and neurodegeneration [J]. Neurobiol Dis，2022，163：105595.
[39] Lecca D，Bader M，Tweedie D，et al.（－）-Phenserine and the prevention of pre-programmed cell death and neuroinflammation in mild traumatic brain injury and Alzheimer’s disease challenged mice [J]. Neurobiol Dis，2019，130：104528.
[40] Ding B，Lin CH，Liu Q，et al. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF-κB signaling pathway in vivo and in vitro [J]. J Neuroinflammation，2020，17（1）：302.
[41] Roy ER，Wang BP，Wan YW，et al. Type I interferon response drives neuroinflammation and synapse loss in Alzheimer disease [J]. J Clin Invest，2020，130（4）：1912-1930.
[42] De Schepper S，Ge JZ，Crowley G，et al. Perivascular cells induce microglial phagocytic states and synaptic engulfment via SPP1 in mouse models of Alzheimers disease [J]. Nat Neurosci，2023，26（3）：406-415.
[43] Hong S，Beja-Glasser VF，Nfonoyim BM，et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models [J]. Science，2016，352（6286）：712-716.
[44] Tremblay ME，Cookson MR，Civiero L. Glial phagocytic clearance in Parkinson’s disease [J]. Mol Neurodegener，2019，14（1）：16.
[45] Filipello F，Morini R，Corradini I，et al. The microglial innate immune receptor TREM2 is required for synapse elimination and normal brain connectivity [J]. Immunity，2018，48（5）：979-991. e8.
[46] Cavaccini A，Durkee C，Kofuji P，et al. Astrocyte signaling gates long-term depression at corticostriatal synapses of the direct pathway [J]. J Neurosci，2020，40（30）：5757-5768.
[47] Dorsey ER，Sherer T，Okun MS，et al. The emerging evidence of the Parkinson pandemic [J]. J Parkinsons Dis，2018，8（s1）：S3-8.
[48] Chu JJ，Zhang WC，Liu Y，et al. Biomaterials-based anti-inflammatory treatment strategies for Alzheimer’s disease [J]. Neural Regen Res，2024，19（1）：100-115.
[49] Omotosho AO，Tajudeen YA，Oladipo HJ，et al. Parkinson’s disease：are gut microbes involved? [J]. Brain Behav，2023，13（8）：e3130.
[50] Zheng WX，He RN，Yan ZX，et al. Regulation of immune-driven pathogenesis in Parkinson’s disease by gut microbiota [J]. Brain Behav Immun，2020，87：890-897.
[51] Chen JX，Xu JK，Huang P，et al. The potential applications of traditional Chinese medicine in Parkinson’s disease：a new opportunity [J]. Biomed Pharmacother，2022，149：112866.
[52] Law BYK，Wu AG，Wang MJ，et al. Chinese medicine：a hope for neurodegenerative diseases? [J]. J Alzheimers Dis，2017，60（s1）：S151-S160.
[53] Qu SG，Meng XJ，Liu Y，et al. Ginsenoside Rb_1 prevents MPTP-induced changes in hippocampal memory via regulation of the α-synuclein/PSD-95 pathway [J]. Aging（Albany NY），2019，11（7）：1934-1964.
[54] Bhuiyan MMH，Mohibbullah M，Hannan MA，et al. The neuritogenic and synaptogenic effects of the ethanolic extract of radix Puerariae in cultured rat hippocampal neurons [J]. J Ethnopharmacol，2015，173：172-82.
[55] Tang JJ，Lu LY，Wang QS，et al. Crocin reverses depression-like behavior in Parkinson disease mice via VTA-mPFC pathway [J]. Mol Neurobiol，2020，57（7）：3158-3170.
[56] 李娇 . 三七总皂苷、栀子苷及其配伍对 APP/PS1 小鼠树突棘损伤的保护作用及机制 [D]. 北京：北京中医药大学，2014.
[57] 郑坤木 . 姜黄素通过抑制 BACE1 水平及 Aβ/Appoptosin 介导的细胞凋亡通路改善 5XFAD 转基因小鼠认知功能 [D]. 福州：福建医科大学，2014.
[58] 兰秀 . 基于“虚 - 瘀 - 痰”病机探讨竹节参对 AD 大鼠认知功能及突触的作用 [D]. 恩施：湖北民族大学，2019.
[59] 曹兵，曾梦楠，梁喜文，等 . 基于线粒体融合分裂探究山茱萸及 Cornuofficinaliside G 对 $Aβ_{25-35}$ 诱导 AD 小鼠神经元突触损伤的影响 [J]. 中华中医药杂志，2023，38（5）：2390-2397.
[60] 黄帅阳 . 基于突触可塑性结构和功能蛋白探讨复方金思维对 SAD 小鼠认知的影响 [D]. 北京：北京中医药大学，2020.
[61] 刘一川 . 天芪益智方对阿尔茨海默病大鼠突触功能的影响 [D]. 北京：北京中医药大学，2016.
[62] 胡铮强 . 黄连解毒汤对微囊藻毒素 -LR 诱导神经损伤的保护作用 [D]. 杭州：浙江大学，2020.
[63] 陈芳 . 参枝苓口服液对 AD 早期髓鞘和突触损伤的保护作用 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.
[64] 刘佳 . 基于调节突触结构与功能研究开心散加味新方对阿尔茨海默病的治疗作用及机制 [D]. 厦门：厦门大学，2018.
[65] 汪家文，吴君，王承飞，等 . 金钗石斛水提物通过调节 APP/PS1 小鼠突触可塑性及胶质细胞激活缓解学习记忆损伤 [J]. 重庆医科大学学报，2023，48（10）：1208-1214.
[66] 余虹霓，孙梦捷，韩广卉，等 . 地黄饮子改善 AD 小鼠星形胶质细胞损伤调节突触结构功能的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，2（8）：27-35.
[67] 王苏雷 . 冬凌草甲素改善阿尔茨海默病模型小鼠认知功能及机制研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2016.
[68] 隋海娟，马瑞国，刘佳颖，等 . 知母皂苷对 $Aβ_{1-42}$ 诱导的皮层神经元突触损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床，2015，31（6）：27-30.
[69] 王素 . 滋肾宁心化痰法改善 MCI 谷氨酸能突触可塑性损伤的作用机制研究 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2020.
[70] 王慧婵 . 龟龄集对 AD 认知功能的疗效评价及突触和髓鞘相关作用研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2020.
[71] 刘南阳 . 还脑益聪方通过干预 PS/γ- 分泌酶 /α-Nrxn 1 通路调节阿尔茨海默病突触可塑性的实验研究 [D]. 北京：中国中医科学院，2021.
[72] 龙清华，赵宾宾，丁莉，等 . 基于 PI3K/AKT/GSK-3 信号通路探讨酸枣仁汤对 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠海马神经元突触损伤的改善作用 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（5）：2546-2551.

（收稿日期：2023-12-12；修回日期：2024-03-07）

花旗松素对神经系统疾病的神经保护作用研究进展

李灵，张晗*（天津中医药大学中医药研究院，现代中药创制全国重点实验室，天津 301617）

摘要：花旗松素是存在于松科植物、蔬菜和水果中的天然黄酮类化合物。本文对近年来花旗松素在神经系统疾病中的研究进展进行综述，包括帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病、脑淀粉样血管病、脊髓损伤、肝性脑病、脑缺血再灌注、胶质瘤和癫痫，并从花旗松素的抗神经元凋亡、抗神经炎症、抗氧化损伤和抑制蛋白异常积累的神经保护作用机制进行探讨，以期为进一步了解和研究花旗松素对神经系统疾病的防治作用提供科学依据。

关键词：花旗松素；神经系统疾病；神经保护；机制

中图分类号：R283，R741 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1284-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.027

Research progress in neuroprotective effect of taxifolin on neurological diseases

LI Ling, ZHANG Han* (*Institute of Chinese Medicine*, *Tianjin University of Chinese Medicine*, *National Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Innovation*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Taxifolin is a natural flavonoid in pinaceae plants, vegetables, and fruits. This article reviewed the research progress in effect of taxifolin in nervous system diseases in recent years, including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease, cerebral amyloid angiopathy, spinal cord injury, hepatic encephalopathy, cerebral ischemia reperfusion, glioblastoma multiforme and epilepsy. The neuroprotective mechanism of taxifolin in anti-neuronal apoptosis, anti-neuroinflammation, anti-oxidative damage and inhibition of abnormal accumulation of proteins was discussed to provide reference for further understanding the preventive effect of taxifolin on nervous system diseases.

Key words: taxifolin; nervous system disease; neuroprotection; mechanism

神经系统疾病包括外周神经系统和中枢神经系统疾病，具有复杂、难治和病死率极高的特点，给社会及患者造成了极大的负担和困扰[1-3]。研究表明，遗传因素、生活方式和感染是诱发神经系统疾病的危险因素[4]。神经系统疾病的症状主要表现为意识模糊、疼痛、认知下降等[5]。神经系统疾病影响脊髓、大脑和周围神经，严重降低了患者的幸福指数。目前，有一些批准的药物如多巴胺激动剂和*N*-甲基-D-门冬氨酸受体（NMDA）受体拮抗剂被用来对抗该类疾病[6]。然而，由于这些神经类疾病发病机制复杂且不同疾病的病理靶点不同，这些药物只能减轻或者短暂地缓解病情，并不能治愈该类疾病。因此，需要尽快研究预防该类疾病进程的药物。在这种情况下，天然活性化合物在抑制神经系统疾病的发展中显示出巨大的应用前景。

黄酮类化合物是来源于草木、水果、蔬菜的具有生物活性的植物化学物质，它们的强抗氧化活性有益于人体健康。此外，它们可以透过血脑屏障（BBB），有助于预防和延缓神经退行性疾病的进程[7]。因黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎和抗神经元凋亡等多效性作用，而非针对单一靶点，其作为神经保护剂的潜质已经吸引广大研究者的关注。花旗松素是一种天然多酚类化合物，属于黄酮类中的黄酮醇类[8]，具有抗高尿酸血症、抗高血糖以及保护肾脏、肝脏和心脏的作

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973792）。

作者简介：李灵，女，硕士研究生，主要从事神经药理学研究，email：16629233548@163.com *通信作者：张晗，女，研究员，主要从事神经药理学研究，email：zhanghan0023@126.com

用[9-10]。并且，花旗松素的安全性和低毒性已有相关报道[9]。值得注意的是，一些研究报道了花旗松素对脑淀粉样血管病（cerebral amyloid angiopathy，CAA）和帕金森病（Parkinson disease，PD）等多种神经系统疾病的体内或体外模型的神经保护作用[11-12]。鉴于花旗松素的潜在特性，本综述对其药理活性以及对神经系统疾病发挥神经保护作用的机制进行详细总结，如图 1 所示，以期进一步探索花旗松素对神经系统疾病的防治潜能，深度挖掘其药用价值。

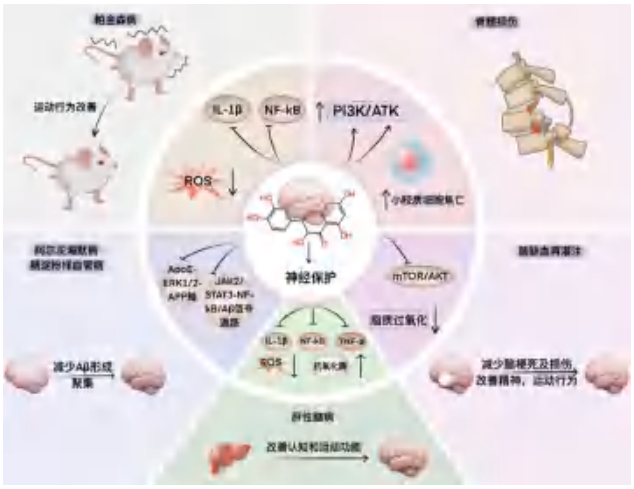

图 1　花旗松素对神经系统疾病的神经保护作用

Fig 1　Neuroprotective effect of taxifolin on nervous system diseases

1　花旗松素的基本性质

1.1　来源

花旗松素最初是从道格拉斯冷杉树皮中分离得到[13]，主要来源于植物长白落叶松、水飞蓟、橄榄油、红花以及芦丁（二氢槲皮素 -3-*O*- 芸香糖苷）。它还可以以游离形式从蜂蜜[14]、果实[15]、洋葱[16]中分离得到。富含花旗松素的植物有茄科、唇形科和菊科[17]。此外，柑橘类、洋葱、苹果和芦笋中也含有一定量的花旗松素[17]。

1.2　花旗松素的药代动力学参数

研究表明，尽管花旗松素具有广泛的药理活性，但其在生物体内的溶解度低、吸收差、代谢快，导致生物利用度低[18]，限制了花旗松素的应用。体外研究发现，花旗松素在 Caco-2 细胞单层显示出较低的生物利用度，仅为 0.17%[19]。以花旗松素的乳化形式口服给药，采集血样分析药代动力学参数显示，口服脂质溶液中花旗松素的生物利用度达到 36%，高于直接口服花旗松素的生物利用度（仅为 0.17%）[20]。

1.3　花旗松素的物理化学性质

花旗松素属于二氢黄酮醇[21]。化学式为 $C_{15}H_{12}O_7$，相对分子量为 304.25，化学名称为 5，7，3'，4'- 四羟基二氢黄酮醇。花旗松素外观呈淡黄色或针状结晶，不溶于非极性溶剂，而易溶于醇和脂质[22]。花旗松素有顺式和反式两种化学结构[23]，具有 4 个酚羟基和 1 个羟基的特殊结构，一般认为，缓解神经炎症和抗氧化是花旗松素发挥神经保护作用的两个关键机制[24]。随着对花旗松素药用价值研究的逐渐深入，其对神经系统疾病的预防和治疗的潜能也被揭示。本文总结花旗松素对神经系统疾病的积极作用及其在神经药理或治疗方面的研究进展。

2　花旗松素的药理活性

花旗松素通过直接或间接与多种分子靶标相互作用，比如蛋白激酶、转录因子、炎症介质、凋亡蛋白，发挥其生物学和药理学潜力，见图 2。

图 2　花旗松素的各种分子靶标

Fig 2　Various molecular targets in taxifolin

2.1　抗炎活性

黄酮类化合物具有抗炎活性，对炎症性疾病有益[25]。花旗松素也具有抗炎活性[26]。花旗松素降低鱼藤酮诱导的 PD 大鼠纹状体中核因子 -κB（NF-κB）信号通路激活基因，包括白细胞介素 -1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、NF-κB 和 IκKB，最终改善大鼠运动能力和震颤行为[27]。研究表明，花旗松素可调节 NF-κB 介导的炎症通路，对 PD 大鼠异常的行为表现发挥治疗作用。此外，在甲醇诱导的大鼠视神经损伤模型中，花旗松素对甲醇诱导的视神经毒性的保护作用是通过发挥其抗氧化和抗炎作用实现的[28]。研究表明，给予花旗松素可以降低大鼠视神经组织 NF-κB 和 TNF-α 水平，并提高总抗氧化水平。另外，花旗松素还通过介导信号通路活性，调节炎症相关信号：在实验性脊髓损伤大鼠中，花旗松素通过激活 PI3K/AKT 信号通路，降低 IL-1β 和白细胞介素 -18（IL-18）的表达，进而减轻炎症反应[29]；细胞实验也证明，花旗松素抑制小鼠小胶质细胞（BV2）活化和氧化应激，进而发挥抗炎和抗氧化作用。类似地，花旗松素通过增强

Nrf2/HO-1 信号通路、降低 p-AMPK 水平，减缓毒死蜱诱导的 BV2 细胞炎症反应、氧化应激和自噬[30]。值得注意的是，花旗松素能缓解金属铬离子引发的炎症现象，成为预防重金属相关心血管疾病的候选药物[31]。这些结果提示，花旗松素通过降低炎症因子刺激或下调不同信号通路活性，减轻氧化应激和炎症反应，发挥抗炎作用。

2.2 抗氧化活性

研究发现，100 mg·kg^{-1}下，花旗松素的抗氧化能力是槲皮素的 3.4 倍，300 mg·kg^{-1}下，花旗松素的抗氧化能力是槲皮素的 4.9 倍，这可能与其苯环酚羟基的数量和位置密切相关[13]。而且，因其强抗氧化能力，花旗松素通常用于食品保鲜[32]。细胞和动物模型均揭示了花旗松素的抗氧化特性[33]。研究表明，花旗松素可抑制体外 GABAergic 神经元的活性氧（ROS）产生和 IL-1β 水平，增加钙离子浓度，发挥神经保护作用[34]。除此之外，在 H_2O_2 诱导的大鼠心肌缺血损伤模型中，花旗松素可以激活 Nrf2 信号，促进大鼠 H9C2 细胞自噬和抗氧化应激[35]。另一项研究表明，花旗松素通过提高抗氧化酶活性，降低丙二醛（MDA）含量，来抑制胃癌细胞 SGC-7901d 氧化应激，进而抑制肿瘤形成[36]。此外，花旗松素通过增强 Nrf2/HO-1 信号传导和降低 MDA 水平来缓解异丙肾上腺素诱导的小鼠急性心肌损伤[37]。花旗松素对镉引起的小鼠肾毒性的保护作用也是通过其发挥抗氧化应激作用来实现的[38]。综上所述，花旗松素通过调控抗氧化物酶活性、ROS 产生和相关信号通路活性发挥抗氧化作用，达到心脏保护、神经保护、肾脏保护、肝脏保护目的[39]。花旗松素具有抗肿瘤、抗病毒和抗菌、抗细胞凋亡、抗血管生成、抗 AD[40-42] 等众多药理活性。

3 花旗松素对神经系统疾病的神经保护作用

研究证实，花旗松素对神经系统疾病提供神经保护作用，可在一定程度上改善认知和运动障碍[43]，对神经退行性疾病、肝性脑病、脑缺血再灌注损伤、脊髓损伤和癫痫具有神经保护作用。

3.1 花旗松素对 PD 的影响

PD 是与年龄相关的神经退行性疾病，据报道，其在 60 岁以上老人中发病率达 1%[44]。花旗松素的抗细胞凋亡和抗炎过程对于改善 PD 病理过程至关重要。花旗松素通过抑制 ROS 产生和增强抗氧化酶活性，挽救蛋白酶抑制剂诱导的 PC12 细胞凋亡，进而抗多巴胺神经元变性[45]，抑制 PD 的发病。研究表明花旗松素通过抑制鱼藤酮诱导的炎症因子的表达，改善氧化应激损伤，从而显著减轻 PD 大鼠模型的运动缺陷和由鱼藤酮毒性引起的纹状体损伤[27, 46]。总之，这些研究充分表明花旗松素直接或间接改善 PD 的神经变性行为和功能障碍。

3.2 花旗松素对阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）的影响

AD 是一种不可逆的神经退行性疾病，其发病率在老年人群中逐年上升，在临床上表现为行为改变、失语、认知障碍等[47]。目前诱发 AD 的主要原因是β-淀粉样肽（β-amyloid peptide，β-AP）和 Tau 蛋白的聚集。此外，炎症过程在促进 AD 的发展中也起着关键作用[48]。因此，抑制淀粉样蛋白的积累和抗炎过程是当前的治疗目标。研究表明，（＋）-花旗松素作用于 Lys 残基，通过抑制β淀粉样肽 42（β-AP42）聚集，治疗 AD[49]。而且，花旗松素通过降低半胱天冬酶 -3（caspase-3）活性，抗 AD 模型的神经元凋亡，从而发挥神经保护作用[50]。另一项研究表明，在海马区注射 Aβ42 的 AD 小鼠模型中，腹腔注射花旗松素，可抑制β-AP42 激活的胞质磷脂酶 A2（cPLA2）和前列腺素 E2（PGE2）两种炎症分子产生，显著改善 AD 小鼠的突触损伤和认知功能[51]。并且，体外研究发现花旗松素改善β-AP42 导致的异常神经元突触形态，维持正常神经元功能。在小鼠脑神经瘤 N2a-Swe 细胞中，单独或联合使用花旗松素能明显降低 JAK2/STAT3 信号通路激活，以及抑制β位点淀粉样蛋白前体蛋白裂解酶 1（beta-site APP cleaving enzyme 1，BACE1）和 NF-κB p65 的表达，最终抑制β-AP 生成[52]。这些研究揭示了花旗松素在炎症、淀粉样蛋白异常积累、细胞凋亡等病理过程中具有神经保护作用，可改善 AD 病理损伤。

3.3 花旗松素对 CAA 的影响

CAA 是由β淀粉样蛋白（Aβ）聚集在脑血管壁导致的脑部并发症[53]。Aβ的沉积是引发 CAA 的主要因素[54]。在 CAA 小鼠模型中，花旗松素通过影响 Aβ的形成和清除，改善 CAA 小鼠的记忆障碍[55]。动物实验表明，花旗松素通过抑制小鼠脑内 ApoE-ERK1/2-APP 信号轴，抑制脑内 Aβ产生，最终改善小鼠的记忆功能[56]；同时，花旗松素通过减少脑内小胶质细胞上 TRM2 受体积累，抑制神经炎症发生[56]。

3.4 花旗松素对亨廷顿病（Huntington’s disease，HD）的影响

HD 是常染色体显性遗传、致命性的神经系统变性疾病，以协调障碍、认知能力下降和精神障碍为症状表现 [57]。据报道，突变的亨廷顿蛋白（mHTT）导致细胞毒性，影响神经元正常功能，最终导致 HD 发生 [58]。目前，治疗方法为利用基因治疗的方式靶向 mHTT mRNA[59]。研究发现 HD 的小鼠和细胞模型中炎症介质的产生和神经胶质细胞活化都增加 [60]。因此，抑制神经炎症的发生是治疗 HD 的潜在治疗方法 [61-62]。研究发现花旗松素可能是针对 HD 的有前途的治疗方式 [43]。但花旗松素对 HD 的神经保护机制仍需要继续探索。

3.5 花旗松素对肝性脑病（hepatic encephalopathy，HE）的影响

HE 属于严重肝病的神经精神并发症，该病具有神经肌肉协调障碍和认知功能异常的特征 [63]。NF-κB 信号通路是治疗神经炎症的有效靶点，而神经炎症与 HE 密切相关 [64]。研究发现，花旗松素通过抑制星形胶质细胞中 NF-κB 的水平，显著减少硫代乙酰胺诱导的炎症介质的产生，包括 TNF-α、IL-1β 和 Bax。在行为学测试中，花旗松素改善了大鼠的认知和运动行为，从而可以防治 HE 的发生 [65]。

3.6 花旗松素对脑缺血再灌注（cerebral ischemia reperfusion，CI/R）的影响

CI/R 损伤是指在脑血管阻塞后恢复血液流通的过程中，为缺血性脑组织重新恢复供血而造成的脑组织二次损伤 [66]。动物实验证明，花旗松素可抑制脑组织 NF-κB 炎症信号通路的激活，减少细胞间黏附分子 -1（intercellular cell adhesion molecule-1，ICAM-1）的表达，降低脂质过氧化水平 [67]，缓解大鼠神经炎症，减少海马神经元损伤，从而减少 CI/R 模型大鼠的脑梗死体积及脑损伤程度 [26]。另外，花旗松素也被证明在肿瘤模型中具有神经保护作用。分子对接技术和体外实验表明，花旗松素通过降低 mTOR/Akt 信号通路活性，减少多形性胶质母细胞瘤中脂质合成和促进自噬，从而保护神经 [68]。总之，在不同的研究对象中，花旗松素可以通过抑制炎症反应、调控氧化应激和自噬反应预防 CI/R 的发生。

3.7 花旗松素对脊髓损伤（spinal cord injury，SCI）的影响

SCI 是一种具有破坏性的严重神经系统疾病，具有极高的发病率和死亡率，会导致神经功能异常和运动感觉障碍，给社会经济和医疗增加负担 [69]。SCI 的根据发病机制分为继发性损伤和原发性损伤。原发性损伤体现在外界机械力破坏；继发性损伤主要涉及细胞水平和全身的变化，包括神经炎症、氧化应激、小胶质细胞的活化等，这些现象会导致轴突功能异常和器官损害 [70]。然而，目前还没有治愈该损伤的药物。花旗松素可以抑制小胶质细胞中促炎介质的产生，避免炎症引起的神经损伤。据报道，花旗松素可增强 PI3K/AKT 信号通路的活性，进而抑制炎性细胞因子（IL-1β 和 IL-18）及 SCI 后焦亡相关蛋白（NLRP3、GSDMD、ASC 和 Caspase-1）的表达，缓解小胶质细胞活化介导的氧化应激水平 [29]。此外，花旗松素通过调控炎症信号通路，缓解大鼠 SCI 后的神经炎症，提高大鼠运动能力 [29]。

3.8 花旗松素对癫痫的影响

癫痫是一种常见的神经系统疾病，患者因为神经元活动异常表现为感觉或者意识障碍 [71]。目前，控制癫痫的发作主要通过物理方法或抗癫痫的药物。花旗松素可以有效抑制氧化应激诱导的癫痫发作。研究表明，在咖啡因诱导的大鼠癫痫模型中，通过脑组织生化检测发现，相较于地西泮，花旗松素预防癫痫的作用更明显，主要表现在花旗松素明显抑制氧化应激指数、髓过氧化物酶、总氧化状态的升高 [72]，提示花旗松素通过抗氧化作用在抗癫痫治疗中发挥神经保护作用。癫痫的发病机制涉及氧化应激损伤、免疫功能紊乱、中风、先天性缺陷等直接或间接因素 [73]。因此，花旗松素的抗癫痫作用是否是其他致病因素的最佳疗法需要进一步研究。此外，动物模型对确认花旗松素的抗癫痫作用也至关重要。因为动物实验不能完全模拟人类癫痫，部分抗癫痫药只能在动物身上起作用 [74]。

4 小结与展望

花旗松素是一种典型的类黄酮化合物，主要富集在水果、松科植物、洋葱等多种植物中。本文主要总结花旗松素对神经系统疾病的积极作用，以及其在神经药理或治疗方面的研究进展（见表 1）。花旗松素主要通过减少炎症反应、抑制氧化应激损伤、清除淀粉样蛋白和抗神经元凋亡途径，发挥神经保护作用。花旗松素在脑部表现的神经保护机制使其可能成为治疗脑部疾病的理想候选药。而且，花旗松素已经被证明具有高安全性，使其具有成为神经系统疾病治疗药物的巨大优势。然而，有关花旗松素的研究仍存在一些不足：一方面，花旗松素在大脑的水溶性较

差，对其神经系统疾病的治疗需要选择合适的给药方式；另一方面，极少的研究涉及花旗松素对HD的神经保护作用，还需要进一步探索。此外，花旗松素在神经发育障碍疾病的应用潜力还没有相关报道。结合花旗松素在神经系统疾病的研究中体现出的强大的生物活性，可改善相关疾病的认知和运动缺陷，据此大胆推测花旗松素可能对自闭症谱系障碍，如脆性X综合征（Fragile X syndrome，FXS）具有积极作用。神经发育障碍疾病的发病机制往往也与炎症反应、细胞凋亡或氧化应激等相关，因此，结合以上论述可以预测花旗松素在防治神经发育障碍疾病方面也具有巨大潜力。

表 1 花旗松素在各种神经系统疾病中的作用机制

Tab 1 Mechanism of taxifolin in various nervous system diseases

疾病	研究对象	作用机制	结果	参考文献
PD	大鼠	抗炎、抗氧化	提高运动能力	[27]
AD	小鼠	抗炎、抑制 JAK2/ATAT3/NF-κB/Aβ 信号通路	改善异常的突触形态、提高认知能力	[52]
CAA	小鼠	抑制 ApoE-ERK1/2-APP 信号通路、减少 Aβ 生成	提高记忆和认知能力	[56]
HD		抗氧化	缓解病理特征	[43]
HE	大鼠	降低 ROS、抑制炎症活性	提高认知和运动能力	[65]
SCI	大鼠	激活 PI3K/AKT 信号通路、抗氧化	促进神经再生	[29]
CI/R	大鼠	抗炎、减少脂质过氧化	减少脑损伤，改善精神、运动能力	[26]
癫痫	大鼠	抗氧化	改善异常的运动行为	[72]

参考文献

[1] Balakrishnan R，Cho DY，Kim IS，et al. Molecular mechanisms and therapeutic potential of α- and β-asarone in the treatment of neurological disorders [J]. Antioxidants（Basel），2022，11（2）：281.

[2] Bagheri S，Salehi I，Ramezani-Aliakbari F，et al. Neuroprotective effect of geraniol on neurological disorders：a review article [J]. Mol Biol Rep，2022，49（11）：10865-10874.

[3] Feigin VL，Vos T，Nichols E，et al. The global burden of neurological disorders：translating evidence into policy [J]. Lancet Neurol，2020，19（3）：255-265.

[4] Lotfi MS，Kalalinia F. Flavonoids in combination with stem cells for the treatment of neurological disorders [J]. Neurochem Res，2023，48（11）：3270-3282.

[5] Rauf A，Rahman MM. Potential therapeutics against neurological disorders：natural products-based drugs [J]. Front Pharmacol，2022，13：950457.

[6] Calderaro A，Patanè GT，Tellone E，et al. The neuroprotective potentiality of flavonoids on Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci，2022，23（23）：14835.

[7] Prasanna P，Upadhyay A. Flavonoid-based nanomedicines in Alzheimer's disease therapeutics：promises made，a long way to go [J]. ACS Pharmacol Transl Sci，2021，4（1）：74-95.

[8] Ma XB，Zhang XK，Lin HL，et al. Magnetic molecularly imprinted specific solid-phase extraction for determination of dihydroquercetin from Larix griffithiana using HPLC [J]. J Sep Sci，2020，43（12）：2301-2310.

[9] Adachi SI，Nihei KI，Ishihara Y，et al. Anti-hyperuricemic effect of taxifolin in cultured hepatocytes and model mice [J]. Cytotechnology，2017，69（2）：329-336.

[10] Eken H，Cimen O，Cimen FK，et al. Effect of taxifolin on oxidative gastric injury induced by celiac artery ligation in rats [J]. Acta Cir Bras，2019，34（4）：e201900404.

[11] Grimm T，Skrabala R，Chovanová Z，et al. Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract（pycnogenol）after oral administration to healthy volunteers [J]. BMC Clin Pharmacol，2006，6：4.

[12] Taniwa K，Murakami K，Sakaguchi Y，et al. Detection of dietary chalcone and flavonoid metabolites in mice using UPLC-MS/MS and their modulatory effects on Amyloid aggregation [J]. J Agric Food Chem，2023，71（39）：14289-14299.

[13] Das A，Baidya R，Chakraborty T，et al. Pharmacological basis and new insights of taxifolin：a comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother，2021，142：112004.

[14] Farkas Á，Horváth G，Kuzma M，et al. Phenolic compounds in Hungarian acacia，linden，milkweed and goldenrod honeys [J]. Curr Res Food Sci，2023，6：100526.

[15] Floare-Avram CV，Covaciu F，Voica C，et al. Differentiation of tomatoes based on isotopic，elemental and organic markers [J]. J Food Sci Technol，2020，57（6）：2222-2232.

[16] Slimestad R，Fossen T，Vågen IM. Onions：a source of unique dietary flavonoids [J]. J Agric Food Chem，2007，55（25）：10067-1080.

[17] Mssillou I，Bakour M，Slighoua M，et al. Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds：a review [J]. J Ethnopharmacol，2022，298：115663.

[18] Pozharitskaya ON，Karlina MV，Shikov AN，et al. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography [J]. Phy-

tomedicine，2009，16（2-3）：244-251.
[19] Vega-Villa KR，Remsberg CM，Takemoto JK，et al. Stereospecific pharmacokinetics of racemic homoeriodictyol，isosakuranetin，and taxifolin in rats and their disposition in fruit [J]. Chirality，2011，23（4）：339-348.
[20] Wang XD，Xia HJ，Xing F，et al. A highly sensitive and robust UPLC-MS with electrospray ionization method for quantitation of taxifolin in rat plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2009，877（18-19）：1778-1786.
[21] 杨松霖，杜姣姣，赵丽娟，等 . 花旗松素的研究进展及展望 [J]. 化工管理，2018（22）：54-55，59.
[22] 张卫鹏，刘伟，付警辉，等 . 长白落叶松中花旗松素的结构鉴定与含量测定 [J]. 食品科学，2013，34（16）：293-296.
[23] 陈雪，费洪新，周忠光，等 . 二氢槲皮素药理作用的研究进展 [J]. 中医药学报，2017，45（1）：90-92.
[24] 叶艳琼，柯国柱，朱平 . 花旗松素与心血管系统保护作用的研究进展 [J]. 饮食科学，2018（2X）：45-47.
[25] Al-Khayri JM，Sahana GR，Nagella P，et al. Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules：a review [J]. Molecules，2022，27（9）：2901.
[26] Wang YH，Wang WY，Chang CC，et al. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation [J]. J Biomed Sci，2006，13（1）：127-141.
[27] Akinmoladun AC，Famusiwa CD，Josiah SS，et al. Dihydroquercetin improves rotenone-induced Parkinsonism by regulating NF-B-mediated inflammation pathway in rats [J]. J Biochem Mol Toxicol，2022，36（5）：e23022.
[28] Ahiskali I，Pinar CL，Kiki M，et al. Effect of taxifolin on methanol-induced oxidative and inflammatory optic nerve damage in rats [J]. Cutan Ocul Toxicol，2019，38（4）：384-389.
[29] Hu ZX，Xuan LN，Wu TT，et al. Taxifolin attenuates neuroinflammation and microglial pyroptosis via the PI3K/Akt signaling pathway after spinal cord injury [J]. Int Immunopharmacol，2023，114：109616.
[30] Zhang C，Zhan JC，Zhao MY，et al. Protective mechanism of taxifolin for chlorpyrifos neurotoxicity in BV2 cells [J]. Neurotoxicology，2019，74：74-80.
[31] Cao XY，Bi RC，Hao JL，et al. A study on the protective effects of taxifolin on human umbilical vein endothelial cells and THP-1 cells damaged by hexavalent chromium：a probable mechanism for preventing cardiovascular disease induced by heavy metals [J]. Food Funct，2020，11（5）：3851-3859.
[32] Sunil C，Xu BJ. An insight into the health-promoting effects of taxifolin（dihydroquercetin）[J]. Phytochemistry，2019，166：112066.
[33] Li XC，Xie H，Jiang Q，et al. The mechanism of（＋）taxifolin’s protective antioxidant effect for •OH-treated bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Cell Mol Biol Lett，2017，22：31.
[34] Turovskaya MV，Gaidin SG，Mal’tseva VN，et al. Taxifolin protects neurons against ischemic injury in vitro via the activation of antioxidant systems and signal transduction pathways of GABAergic neurons [J]. Mol Cell Neurosci，2019，96：10-24.
[35] 苏其利，王晓莉，谭小华，等 . 花旗松素通过激活 Nrf2/HO-1/HIF1/Autophagy 信号通路对 H_2O_2 所致 H9C2 细胞氧化应激保护作用的研究 [J]. 生命科学研究，2017，21（3）：233-238.
[36] 燕二伟，樊占杰，沈冰冰，等 . 花旗松素对 SGC-7901 胃癌细胞生长、运动、氧化应激和 p38MAPK 信号通路的影响 [J]. 淮海医药，2022，40（4）：340-345.
[37] Obeidat HM，Althunibat OY，Alfwuaires MA，et al. Cardioprotective effect of taxifolin against isoproterenol-induced cardiac injury through decreasing oxidative stress，inflammation，and cell death，and activating Nrf2/HO-1 in mice [J]. Biomolecules，2022，12（11）：1546.
[38] Algefare AI. Renoprotective and oxidative stress-modulating effects of taxifolin against cadmium-induced nephrotoxicity in mice [J]. Life（Basel），2022，12（8）：1150.
[39] 赵鑫，苟小军，陈龙，等 . 花旗松素预防 CCl_4 致大鼠急性肝损伤的代谢组学研究 [J]. 上海中医药杂志，2017，51（8）：82-86.
[40] 魏建国，杨大松，陈维云，等 . 粤蛇葡萄的化学成分及其抗血管生成活性研究 [J]. 中草药，2014，45（7）：900-905.
[41] Shou JW，Shaw PC. Therapeutic efficacies of berberine against neurological disorders：an update of pharmacological effects and mechanisms [J]. Cells，2022，11（5）：796.
[42] Islam J，Shree A，Vafa A，et al. Taxifolin ameliorates Benzo[a]pyrene-induced lung injury possibly via stimulating the Nrf2 signalling pathway [J]. Int Immunopharmacol，2021，96：107566.
[43] de Oliveira NKS，Almeida MRS，Pontes FMM，et al. Molecular docking，physicochemical properties，pharmacokinetics and toxicity of flavonoids present in Euterpe oleracea Martius [J]. Curr Comput Aided Drug Des，2021，17（4）：589-617.
[44] Ascherio A，Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson’s disease：risk factors and prevention [J]. Lancet Neurol，2016，15（12）：1257-1272.
[45] Nam YJ，Lee DH，Shin YK，et al. Flavanonol taxifolin attenuates proteasome inhibition-induced apoptosis in differentiated PC12 cells by suppressing cell death process [J]. Neurochem Res，2015，40（3）：480-491.
[46] Ranjan S，Gautam A. Pharmaceutical prospects of Silymarin for the treatment of neurological patients：an updated insight [J]. Front Neurosci，2023，17：1159806.
[47] 张雷，范占芳，张作鹏，等 . 阿尔茨海默病发病机制及相关治疗药物的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志，2021，31（6）：438-446.
[48] 刘保宏 . A 蛋白引发阿尔茨海默病发病机制及检测方

法的研究进展[J]. 医学理论与实践，2021，34（17）：2959-2961.
[49] Sato M，Murakami K，Uno M，et al. Site-specific inhibitory mechanism for amyloid β42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the Lys residues [J]. J Biol Chem，2013，288（32）：23212-23224.
[50] 王秋月，高翔，王晓玲，等 . 花旗松素对β-淀粉样肽损伤神经元的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（24）：164-167.
[51] Wang YY，Wang QW，Bao XM，et al. Taxifolin prevents-amyloid-induced impairments of synaptic formation and deficits of memory via the inhibition of cytosolic phospholipase A_2/prostaglandin E_2 content [J]. Metab Brain Dis，2018，33（4）：1069-1079.
[52] Park SY，Kim HY，Park HJ，et al. Concurrent treatment with taxifolin and cilostazol on the lowering of β-amyloid accumulation and neurotoxicity via the suppression of P-JAK2/P-STAT3/NF-κB/BACE1 signaling pathways [J]. PLoS One，2016，11（12）：e0168286.
[53] Kozberg MG，Perosa V，Gurol ME，et al. A practical approach to the management of cerebral amyloid angiopathy [J]. Int J Stroke，2021，16（4）：356-369.
[54] Greenberg SM，Bacskai BJ，Hernandez-Guillamon M，et al. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease-one peptide，two pathways [J]. Nat Rev Neurol，2020，16（1）：30-42.
[55] Saito S，Yamamoto Y，Maki T，et al. Taxifolin inhibits amyloid-β oligomer formation and fully restores vascular integrity and memory in cerebral amyloid angiopathy [J]. Acta Neuropathol Commun，2017，5（1）：26.
[56] Inoue T，Saito S，Tanaka M，et al. Pleiotropic neuroprotective effects of taxifolin in cerebral amyloid angiopathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2019，116（20）：10031-10038.
[57] 闫森 . 亨廷顿舞蹈病神经发育障碍的研究进展[J]. 中山大学学报（医学科学版），2022，43（5）：691-696.
[58] Duan W，Urani E，Mattson MP. The potential of gene editing for Huntington’s disease [J]. Trends Neurosci，2023，46（5）：365-376.
[59] Tabrizi SJ，Estevez-Fraga C，van Roon-Mom WMC，et al. Potential disease-modifying therapies for Huntington’s disease：lessons learned and future opportunities [J]. Lancet Neurol，2022，21（7）：645-658.
[60] Connolly C，Magnusson-Lind A，Lu G，et al. Enhanced immune response to MMP3 stimulation in microglia expressing mutant huntingtin [J]. Neuroscience，2016，325：74-88.
[61] Teleanu DM，Niculescu AG，Lungu II，et al. An overview of oxidative stress，neuroinflammation，and neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci，2022，23（11）：5938.
[62] Saba J，Couselo FL，Bruno J，et al. Neuroinflammation in Huntington’s disease：a starring role for astrocyte and microglia [J]. Curr Neuropharmacol，2022，20（6）：1116-1143.
[63] Weissenborn K. Hepatic encephalopathy：definition，clinical grading and diagnostic principles [J]. Drugs，2019，79（Suppl 1）：5-9.
[64] 林玉培，王挺帅，刘晓萍，等 . 中医药调控 NF-κB 信号通路改善神经炎症防治肝性脑病的研究进展[J]. 中医学报，2023，38（8）：1606-1613.
[65] Okkay U，Ferah Okkay I，Cicek B，et al. Hepatoprotective and neuroprotective effect of taxifolin on hepatic encephalopathy in rats [J]. Metab Brain Dis，2022，37（5）：1541-1556.
[66] Yuan QH，Yuan Y，Zheng Y，et al. Anti-cerebral ischemia reperfusion injury of polysaccharides：a review of the mechanisms [J]. Biomed Pharmacother，2021，137：111303.
[67] 顾媛媛，姜波，刘旭，等 . 二氢槲皮素对脑缺血损伤模型大鼠炎症因子、氧化应激水平以及脑组织能量代谢影响[J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（6）：36-38.
[68] Yao WQ，Gong HY，Mei H，et al. Taxifolin targets PI3K and mTOR and inhibits glioblastoma multiforme [J]. J Oncol，2021，2021：5560915.
[69] Fan BY，Wei ZJ，Yao X，et al. Microenvironment imbalance of spinal cord injury [J]. Cell Transplant，2018，27（6）：853-866.
[70] Ambrozaitis KV，Kontautas E，Spakauskas B，et al. Pathophysiology of acute spinal cord injury [J]. Medicina（Kaunas），2006，42（3）：255-261.
[71] Xu WL，Gao LS，Li T，et al. Neuroprotective role of agmatine in neurological diseases [J]. Curr Neuropharmacol，2018，16（9）：1296-1305.
[72] Yasar H，Altuner D，Bulut S，et al. Taxifolin as a novel therapeutic agent for epileptic seizures induced by caffeine-induced oxidative stress in rats [J]. Adv Clin Exp Med，2023，doi：10.17219/acem/172448.
[73] Zuo SL，Li Q，Liu X，et al. The potential therapeutic effects of artesunate on stroke and other central nervous system diseases [J]. Biomed Res Int，2016，2016：1489050.
[74] Clifford M，Leah M，Charles N. Antiepileptic properties of quinine：a systematic review [J]. Ann Neurosci，2012，19（1）：14-20.

（收稿日期：2024-01-09；修回日期：2024-03-20）

维奈克拉治疗急性髓系白血病的耐药机制及应对策略

滕喆，杨新宇*（中南大学湘雅医院，长沙　410008）

摘要：急性髓系白血病（AML）是一类克隆性造血干细胞恶性肿瘤，治疗手段有限，死亡率高，但是近些年涌现多种靶向药物有望改善这一困境。2018 年经 FDA 批准的维奈克拉（Venetoclax）极大地提高了 AML 患者的应答率。Venetoclax 是一种 BH3 模拟物，它特异性地抑制抗凋亡蛋白 BCL-2，进而杀伤肿瘤细胞。然而，随着 Venetoclax 在 AML 中的广泛应用，其耐药问题逐渐显现。具体的耐药机制主要表现在肿瘤细胞中靶点蛋白 BCL-2 下调及其他非 BCL-2 抗凋亡蛋白上调、BCL-2 家族中促凋亡蛋白下调及非依赖 BCL-2 家族蛋白的其他耐药机制。本综述将系统地阐述 AML 中 Venetoclax 耐药的分子机制，并总结靶向这些耐药机制的相关治疗策略的新进展。

关键词：维奈克拉；耐药；BCL-2 蛋白家族；氧化磷酸化；通路激活；线粒体
中图分类号：R733.71　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1291-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.028

Mechanism of drug resistance and strategy for Venetoclax in acute myeloid leukemia

TENG Zhe, YANG Xin-yu* (*Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008)

Abstract: Acute myeloid leukemia (AML) is a hematologic malignancy characterized by a low remission and short survival. Fortunately, various targeted drugs in recent year may improve this challenging scenario. Among them, Venetoclax, approved by the FDA in 2018, has significantly enhanced the responses in AML patients. As a BH3 mimic, Venclexta induces tumor cell death by selectively binding to BCL-2 and inhibiting its anti-apoptotic function. However, with the wide use of Venetoclax in various AML scenarios, drug resistance has gradually become an issue. The specific mechanism of drug resistance in tumor cells includes: downregulation of BCL-2 and upregulation of other anti-apoptotic proteins, downregulation of pro-apoptotic proteins within the BCL-2 family, and other mechanisms independent of BCL-2 family proteins. This review systematically explained the molecular mechanism underlying Venetoclax resistance in AML and summarized strategies for addressing these problems.

Key words: Venetoclax; drug resistance; BCL-2 protein family; oxidative phosphorylation; pathway activation; mitochondria

急性髓性白血病（AML）是一种克隆性造血干细胞恶性肿瘤，常预后不良，不适合强化疗的体弱群体中更是如此。即使采用化疗和移植作为主要治疗手段，大部分 AML 患者仍死于疾病复发[1]。最新研究表明，以维奈克拉（Venetoclax）为代表的 BCL-2 抑制剂为 AML 的治疗带来了曙光。BCL-2 是 BCL-2 家族蛋白中的一种抗凋亡蛋白，该家族参与细胞内源性凋亡过程。Venetoclax 可以特异性地抑制 BCL-2 蛋白，促进肿瘤细胞凋亡。目前临床研究和应用中，Venetoclax 对不同情况的 AML 患者均表现出明显的疗效及生存获益[2-5]。然而，早期耐药及缓解后的复发限制了 Venetoclax 长期治疗效果[6]。临床数据显示，以 Venetoclax 为基础治疗的 AML 患者大约有 30%

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.82072152）。
作者简介：滕喆，女，硕士，主要从事血液肿瘤疾病的耐药研究，email：18236936316@163.com　*通信作者：杨新宇，男，教授，主要从事血液肿瘤疾病的致病或耐药分子机制及脓毒症的致病机制研究，email：yangxinyu@csu.edu.cn

发生原发耐药[7-9]。因此，探究其潜在耐药分子机制对于改善 Venetoclax 耐药尤为重要。目前，研究人员发现了几种耐药机制：① 肿瘤细胞中靶点蛋白 BCL-2 的下调及其他非 BCL-2 抗凋亡蛋白的上调引起凋亡抵抗，诱导耐药；② BCL-2 家族中发挥促凋亡作用的蛋白下调，肿瘤细胞发生凋亡抵抗，诱导耐药；③ 非依赖 BCL-2 家族蛋白的其他耐药机制，例如改变肿瘤细胞的代谢途径抵消 Venetoclax 带来的代谢抑制，或者线粒体结构及功能发生改变逃避 Venetoclax 诱导的凋亡等。本文综述了 AML 中 Venetoclax 耐药机制的最新研究进展并探讨了解决这些耐药机制的可能策略。

1 Venetoclax 耐药的分子机制及应对策略

1.1 BCL-2 家族蛋白的改变

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡，在生理和药物抗肿瘤过程中发挥重要作用[10]。BCL-2 家族是调控细胞凋亡的关键因子，其由三类蛋白组成：发挥促凋亡作用的 BH3-only 蛋白（有 BIM、NOXA、BAD 等），促凋亡效应蛋白（有 BAX、BAK 等），以及发挥抗凋亡作用的成员（有 BCL-2、MCL-1、BCL-xL、BCL-w 等）。这三类蛋白的动态结合控制着细胞凋亡的执行。首先，BH3-only 蛋白与促凋亡效应蛋白结合，促使后者在线粒体外膜的寡聚化形成孔洞，释放线粒体中的细胞色素 c，激活下游凋亡信号。抗凋亡蛋白结合并抑制促凋亡蛋白，阻断下游的凋亡信号。AML 细胞中 BCL-2 蛋白通常显著上调，其凋亡往往受到抑制[11-12]。Venetoclax 正是通过靶向抑制抗凋亡蛋白 BCL-2 发挥抗 AML 的作用。然而，治疗过程中，肿瘤细胞中这些蛋白不断变化，可能导致抗凋亡作用的上调，或者促凋亡作用的下调，最终引起肿瘤细胞逃避药物杀伤从而耐药（具体机制见图 1）。

1.1.1 肿瘤细胞中靶点蛋白 BCL-2 的下调及其他抗凋亡蛋白的上调　正常情况下，Venetoclax 高效快速地杀死 BCL-2 高表达的 AML 细胞。一项研究发现经 Venetoclax 处理的 AML 细胞的 IC_{50} 与其 BCL-2 水平成负相关，并且在 Venetoclax 耐药细胞系中发现 BCL-2 低表达[13]。此外，另一项研究发现上调 BCL-2 水平可明显提高细胞对 Venetoclax 的敏感性[14-15]。这些证据从正反两方面证明了靶点蛋白的下调会造成 Venetoclax 脱靶，从而导致 AML 耐药。

作为抗凋亡蛋白，BCL-2 的下调可能会促进凋亡。然而，肿瘤细胞会上调或激活其他抗凋亡蛋白以逃避凋亡。最新研究发现 Venetoclax 治疗过程中，AML 的非 BCL-2 抗凋亡蛋白水平会增加，从而替代 BCL-2 的功能，促进肿瘤细胞生存，这是 Venetoclax 耐药的主要机制之一[16-17]。其中，MCL-1 的上调是研究最多且明确的耐药机制：首先，Venetoclax 通过竞争性结合 BCL-2 释放促凋亡蛋白 BIM，上调的 MCL-1 结合释放的 BIM，替代 BCL-2 在凋亡通路中的作用，抑制下游的凋亡[17-18]；其次，MCL-1 可以替代 BCL-2 维持肿瘤细胞的代谢水平，MCL-1 调节碳水化合物代谢和脂肪酸代谢用以维持线粒体呼吸及细胞代谢水平，帮助肿瘤细胞生存[19-20]。有研究表明，对 Venetoclax 耐药的细胞特异性地依赖 MCL-1 而不是 BCL-2 来维持线粒体呼吸[17]。靶向 MCL-1 可以同时降低耐药 AML 细胞中代偿性升高的脂肪酸代谢及氨基酸代谢水平，最终减少 Venetoclax 耐药[21]。此外，MCL-1 还可以增强白血病细胞表面黏附分子表达，促进其与细胞间质的相互作用，靶向抑制耐药细胞的 MCL-1 后，这种相互作用明显减弱，耐药细胞恢复对 Venetoclax 的敏感性。这些证据表明，MCL-1 上调是 Venetoclax 耐药的关键机制[19]。

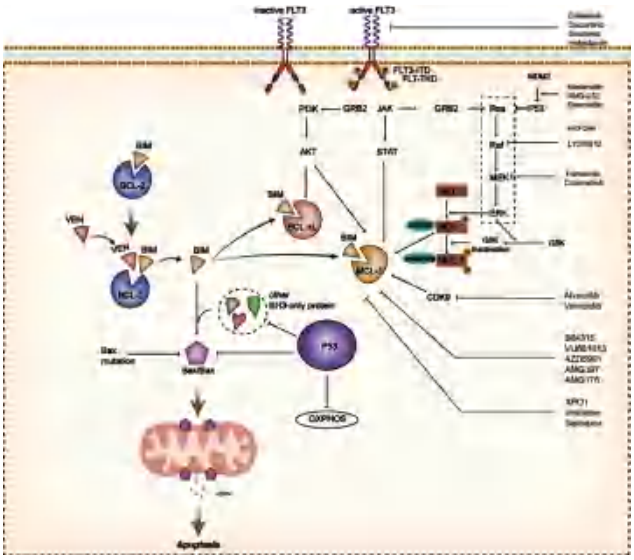

图 1　BCL-2 家族及其上游信号通路的改变导致 Venetoclax 耐药的机制

Fig 1　Resistance induced by changes in BCL-2 family and its upstream signaling pathways

BCL-xL 的上调也与 Venetoclax 耐药相关[15, 22]，Waclawiczek 等[23]探讨了原始 AML 细胞的单核分化状态与 Venetoclax 耐药的联系：处于单核分化状态的 AML 富含一类高表达 MCL-1/BCL-xL 而低表达 BCL-2 的细胞群，在 Venetoclax 的作用下，这种细胞群获得生存优势，使处于单核分化状态的 AML 更易发生耐药作用，再次证明 BCL-2 下调以

及其他抗凋亡蛋白上调与 Venetoclax 耐药相关。

1.1.2 调节其他抗凋亡蛋白的信号通路 最近，研究人员发现抗凋亡蛋白上调与几种信号通路改变相关，例如：FLT3 的激活突变及下游通路、RAS/MAPK 通路、TP53 突变相关信号通路。

FLT3 是 AML 中最常见的突变基因之一。其突变形式 *FLT3-ITD* 和 *FLT3-TKD* 对应的膜蛋白在没有配体的情况下激活下游 PI3K-AKT、RAS-MAPK、JAK-STAT 通路，调节细胞增殖、分化和存活[6，24]。Janssen 等[25]观察到 Venetoclax/ 阿扎胞苷耐药的细胞中 FLT3 及其下游通路中的分子表达上调，同时，在临床实践中也观察到 *FLT3* 突变阳性的 AML 患者往往对含 Venetoclax 的方案反应更差且应答时间更短，另外对比 Venetoclax 治疗复发前后基因克隆情况，研究者发现 *FLT3* 突变克隆扩增会推动疾病复发[6，26-27]。因此无论是本身固有的还是获得性的 *FLT3* 突变均与 Venetoclax 耐药相关，具体机制为 *FLT3* 突变后激活其下游信号，增加抗凋亡蛋白（MCL-1 和 BCL-XL）水平，从而抵消 Venetoclax 拮抗 BCL-2 的效果[28-31]。大量临床前实验证明 *FLT3* 抑制剂联合 Venetoclax 驱动 BIM 与 BCL-2 和 MCL-1 分离，增加 BIM 与细胞死亡介质 BAX 的结合，促进细胞凋亡[24，32]。

其次，RAS/MAPK 通路的激活也会上调 MCL-1，驱动耐药的发生。Zhang 等[17]发现 Venetoclax 耐药的细胞系中的 RAS/MAPK 通路相关分子表达上调。另外，DiNard 团队[6]利用单细胞测序技术，动态观察使用含 Venetoclax 治疗患者的骨髓中激酶基因克隆情况，发现疾病复发时 *RAS* 基因出现明显克隆扩展。这些均证明 RAS/MAPK 通路的激活是驱动 AML 患者对 Venetoclax 耐药的机制，具体是：该通路的下游信号激活可以稳定 MCL-1 蛋白结构，提高了 MCL-1 蛋白水平，结合并抑制游离的 BIM，促进 AML 存活，维持线粒体呼吸及细胞代谢[17，33-34]。

此外，*TP53* 基因失能突变或蛋白缺失同样可以上调其他抗凋亡蛋白，诱导耐药。*TP53* 失能突变的患者往往对含 Venetoclax 的治疗方案耐药[35-36]。同样，对 AML 细胞系进行基因组学筛选也发现 *TP53* 失能突变与 Venetoclax 耐药相关[37-39]。机制上，TP53 蛋白本身可以抑制 RAS/MAPK 通路，将稳定的 MCL-1 转换为不稳定的 MCL-1，下调 MCL-1 的水平，最终促进凋亡，而 *TP53* 突变失活会失去对该通路的抑制作用，上调 MCL-1，导致耐药[34]。

1.1.3 肿瘤细胞中发挥促凋亡作用的蛋白下调 BCL-2 家族中两类促凋亡蛋白的下调同样会参与 Venetoclax 耐药的产生。首先，促凋亡效应蛋白 BAX 下调与 Venetoclax 耐药相关，Carter 等[40]利用 CRISPR-Cas9 缺失筛选技术发现 *BAX* 基因缺失的细胞更易对 Venetoclax 耐药，同时在 Venetoclax 耐药的细胞系中发现 BAX 蛋白表达水平显著减少，从基因和蛋白层面均证明了 *BAX* 下调与 Venetoclax 耐药相关；另一项研究分析了 Venetoclax 治疗后复发的 41 例 AML 患者中，利用二代测序技术检测到 17% 的患者存在 *BAX* 突变，而这种突变在标准化疗后复发的患者中较少见到，说明 *BAX* 有害突变是一种 Venetoclax 治疗相关的耐药因素。在体外模型中，BAX 缺失相关的 Venetoclax 耐药细胞对其他 BH3 模拟物也有交叉耐药，但是对化疗敏感，因此 Venetoclax 治疗方案结合化疗可能会减少耐药[41]。其次，调节抗凋亡蛋白表达的信号通路同样会通过下调 BH3-only 蛋白诱导耐药：*FLT3* 突变激活 RSK、PSK 分子，然后协同 ERK 一起下调 BAD 和 BIM，削弱整体促凋亡作用[42]；此外，TP53 可诱导几种促凋亡效应蛋白 BH3-only（NOXA、PUMA、BIM）的表达。在 *TP53* 突变的背景下，Venetoclax 刺激引起 BH3-only 蛋白减少，影响 BH3-only 激活 BAX/BAK 效应，提高由 Venetoclax 诱导的凋亡的阈值，诱导耐药[43]。

1.1.4 针对 BCL-2 家族成员的改变，探索解决耐药策略 临床前实验证明同时靶向 BCL-2 和其他抗凋亡蛋白可以用于治疗 Venetoclax 耐药。目前的主要策略是联合 Venetoclax 和靶向 MCL-1 的药物，有两种靶向 MCL-1 的策略：

① MCL-1 的直接抑制剂：例如 S64315、VU661013、AZD5991、AMG176 等（见 表 1）。但是，由于 MCL-1 在心脏、肝脏等组织中有广泛的生理作用[44-45]，MCL-1 抑制剂存在潜在的毒副作用，故在临床使用中受限。目前有不少新研发的 MCL-1 抑制剂在进行临床试验时因为心脏毒性而被叫停（如 NCT03218683、NCT03465540、NCT03797261）。② 通过改变上游信号通路间接抑制 MCL-1：首先，*FLT3* 突变、MAPK 通路的抑制剂可以下调 MCL-1 水平；其次，MCL-1 在细胞凋亡过程中受到多种细胞周期蛋白依赖性激酶（CDKs）的调节，其中较为关键的蛋白是 CDK9。因此 CDK9 抑制剂可以通过 MCL-1 的转录沉默下调 MCL-1[46]；此外，核输出蛋白 1（XPO1）是一种在 AML 细胞中过表达的蛋白，临床前实验已经证明其抑制剂 Selinexor 与 Venetoclax

联用会协同抑制 BCL-2 和 MCL-1 与 BIM 的结合，减少耐药[47-49]，相关临床试验正在进行（见表 1）。

除此之外，激活 TP53 并抑制 BCL-2 也有协同改善耐药的作用[34，43]。目前在临床试验中有两种方式可以重新激活 TP53，一种是将突变型 TP53 重新激活发挥野生型活性，另一种是抑制野生型 TP53 和其抑制剂 MDM2/MDM4 的相互作用[50]。最近的研究还提供了一种调节 TP53 的方法：即靶向 CDK7 后通过 CDK7/c-MYC/TP53 轴激活 TP53，体内外实验均确定了 CDK7 抑制剂 XL102 和 Venetoclax 联用有治疗 Venetoclax 耐药的效应[51]。以上抑制剂的临床试验情况见表 1。

表 1 靶向 BCL-2 家族蛋白的相关策略

Tab 1 Strategies for targeting BCL-2 family proteins

靶向药	治疗方案	研究阶段（临床前 / 临床）	研究人群	结果
MCL-1 抑制剂	S64315 ＋ VEN	Ⅰ NCT03672695	初治患者，复发 / 难治患者	—
	S64315 ＋ VOB560	Ⅰ NCT04702425	复发 / 难治患者	—
	VU661013 ＋ VEN	临床前[52]	—	—
CDK9 抑制剂	Alvocidib ＋ VEN	Ⅰ NCT03441555[53]	复发 / 难治患者	CR/CRI 14%
	Voruciclib ＋ VEN	Ⅰ NCT03547115	复发 / 难治患者	—
MEK 抑制剂	Trametinib ＋ VEN ＋ AZA	Ⅱ NCT04487106	复发 / 难治患者	—
	Cobimetinib ＋ VEN	Ⅰ NCT02670044	复发 / 难治患者	—
RAF 抑制剂	LY3009120 单药	临床前[54]	—	—
FLT3 抑制剂	Gilteritinib ＋ VEN	Ⅰ b NCT03625505[55]	复发 / 难治患者	mCRc：75%
	Gilteritinib ＋ VEN ＋ AZA	Ⅰ / Ⅱ NCT04140487[56]	初治患者，复发 / 难治患者，FLT3 突变	初治患者 CR：95%；复发 / 难治患者 mCRc：74%
	Gilteritinib ＋ VEN ＋ AZA	Ⅰ / Ⅱ NCT05520567	初治患者，FLT3 突变	—
	VEN ＋ DEC ＋ 3 种 FLT3 抑制剂	Ⅱ NCT03404193[57]	初治患者，复发 / 难治患者	mCRc：初治患者 92%，复发 / 难治患者 62%
	Quizartinib ＋ VEN ＋ DEC	Ⅰ / Ⅱ NCT03661307[58]	初治患者，复发 / 难治患者	CR/CRi：65%
MDM2 抑制剂	Idasanutlin ＋ VEN	Ⅰ b NCT02670044[59]	复发 / 难治患者	MLFS 14.3%
	Idasanutlin ＋ VEN/ 化疗	Ⅰ / Ⅱ NCT04029688	复发 / 难治患者	—
	AMG-232 ＋ VEN ＋ DEC	Ⅰ NCT03041688	初治患者，复发 / 难治患者	—
	Siremadlin ＋ VEN ＋ AZA	Ⅰ / Ⅱ NCT05155709	初治患者，复发 / 难治患者	—
TP53 激活剂	APR-246 ＋ VEN	Ⅰ NCT04214860[60]	初治患者	ORR 64%
CDK7 抑制剂	XL102 ＋ VEN	临床前[51]	—	—
XPO1 抑制剂	Selinexor ＋ VEN	Ⅰ NCT03955783	复发 / 难治患者	—
	Selinexor ＋ VEN	Ⅰ NCT04898894	复发 / 难治患者	—
	Selinexor ＋ VEN ＋ AZA	Ⅱ NCT05736965	初治患者	—

注（Note）：VEN. 维奈克拉（venetoclax）；AZA. 阿扎胞苷（azacitibine）；DEC. 地西他滨（decitabine）；CR. 完全缓解率（complete remission rate）；CRI. 伴血液学不完全恢复的完全缓解率（CR with incomplete blood count recovery）；mCRc. 改良后的完全缓解率（CR ＋ CRI ＋ MFLS）；MLFS. 形态学缓解的状态（morphologic leukemia-free state）；ORR. 复合缓解率（overall remission rate）。

1.2 非依赖 BCL-2 家族的耐药机制

1.2.1 白血病干细胞（LSCs）的代谢改变 LSCs 是 AML 发展及耐药的关键，因此清除该类细胞对于治疗 AML 至关重要。与其他实体肿瘤细胞不同，LSCs 优先依赖氧化磷酸化（OXPHOS）维持生存，而氨基酸代谢是 LSCs 驱动 OXPHOS 所必需的过程。Venetoclax/ 阿扎胞苷治疗可以通过抑制氨基酸摄取干扰氨基酸代谢、干扰线粒体中电子传递链中的复合物Ⅱ来靶向 LSCs 的 OXPHOS，达到清除 LSCs 的目的[61-63]。用于衡量 OXPHOS 的耗氧量及通过电子传递链的电子量在 Venetoclax 耐药细胞中显著升高[37]，因此 OXPHOS 水平与 Venetoclax 治疗的敏感性成负相关，主要机制是 LSCs 通过上调脂肪酸代谢水平和烟酰胺代谢水平提高自身 OXPHOS 水平，消除对氨基酸代谢供能的依赖，导致其对 Venetoclax 的敏感性显著降低[21，64]。

脂肪酸被氧化为乙酰辅酶 A，进入三羧酸循环为 OXPHOS 提供能量来源。Stevens 等[21]研究发现：经过 Venetoclax/ 阿扎胞苷治疗后，来自耐药和敏感 AML 患者的 LSCs 细胞均存在氨基酸摄取抑制现象，但是耐药患者 LSCs 的 OXPHOS 水平并没有像敏感患者的 LSCs 中那样减低，提示耐药 LSCs 中存在替代机制来弥补氨基酸摄取减低带来的 OXPHOS 下调。对两类患者骨髓中的 LSCs

进行整体代谢物水平分析发现：耐药 LSCs 中多种脂肪酸代谢途径上调以及转运至线粒体的脂肪酸水平增加。另外，对来自耐药患者与初治患者的 LSCs 进行转录谱分析发现，耐药 LSCs 群富集了大量与脂肪代谢相关的基因。相反，抑制脂肪酸代谢可以恢复耐药 LSCs 对 Venetoclax/ 阿扎胞苷的敏感性，以上结果均支持 LSCs 中上调的脂肪酸代谢水平是引起 Venetoclax 耐药的机制之一。

在对 Venetoclax/ 阿扎胞苷耐药的 LSCs 中，不仅有脂肪酸代谢可以弥补能量受损，上调的烟酰胺代谢也有类似作用 [64]，其具体机制是：

① 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）是糖酵解、三羧酸循环及脂肪酸氧化多种酶促反应的辅助因子；耐药患者的 LSCs 细胞中，烟酰胺摄取增加并通过挽救途径合成 NAD^+，促进三羧酸循环为 OXPHOS 供能。② 增加的烟酰胺代谢还加强氨基酸摄取，提高进入三羧酸循环的氨基酸、脂肪酸通量。以上改变提高了整体代谢水平，驱动 OXPHOS，克服 Venetoclax/ 阿扎胞苷引起的 OXPHOS 抑制，维持肿瘤细胞生存，导致耐药。当耐药 LSCs 中烟酰胺代谢为 NAD^+的过程被抑制时，其氨基酸代谢及脂肪酸代谢水平下调，抑制 OXPHOS，减少耐药 LSCs 的活力，反面证明了上调的烟酰胺及烟酰胺代谢水平是引起 Venetoclax 耐药的机制之一。

在代谢层面上，OXPHOS 上调是引起耐药的核心，所以通过靶向 OXPHOS 可以缓解耐药。首先，直接抑制 OXPHOS：临床前实验证明激活 AMPK-PERK 轴和抑制 AXL 均可抑制 OXPHOS，靶向 LSCs，与 Venetoclax 联用显著增加 Venetoclax 的敏感性；另外，抗菌药物泰地唑胺联合 Venetoclax 也可抑制 OXPHOS，诱导肿瘤能量危机，协同抗肿瘤 [65]。其次，可以通过抑制上游旁路代谢间接抑制 OXPHOS：临床前研究发现 8- 氯 - 腺苷通过下调脂肪酸代谢通路的相关蛋白表达来抑制 LSCs 的脂肪酸代谢，最终显著抑制 OXPHOS[66]，其与 Venetoclax 联用治疗复发 / 难治 AML 的Ⅰ期临床试验正在进行；另外，抑制烟酰胺向 NAD^+转换的关键限速酶 NAMPT 可以通过减少氨基酸和脂肪酸进入三羧酸循环的通量，从而减少耐药 LSCs 的 OXPHOS，达到缓解耐药的目的。具体情况见表 2。

表 2　靶向代谢改变的相关策略

Tab 2　Strategies for targeting metabolic alterations

分子 / 细胞靶点	治疗方案	研究阶段（临床前 / 临床）	研究人群	结果
OXPHOS 抑制剂	IACS-010759 单药	Ⅰ NCT02882321	复发 / 难治患者	缺乏有效性终止
AXL 抑制剂	SLC-391 ＋ VEN	临床前 [67]	—	—
AMPK 激活剂	GSK621 ＋ VEN	临床前 [68]	—	—
脂肪酸代谢抑制剂	8- 氯 - 腺苷＋ VEN	Ⅰ NCT05263284	复发 / 难治患者	—
烟酰胺代谢抑制剂	KPT-9274 单药	Ⅰ NCT04914845	复发 / 难治患者	—
糖酵解 /OXPHOS 抑制剂	泰地唑胺＋ VEN	临床前 [65]	—	—

1.2.2　线粒体的改变　线粒体是细胞的能量工厂，其结构完整是细胞存活所必需的，完整的线粒体结构有利于维持稳定的线粒体膜电位，从而确保三磷酸腺苷（ATP）产生和线粒体稳态。与此同时，线粒体也是细胞凋亡的重要调控元件。线粒体结构的改变以及对应激敏感性的改变与 Venetoclax 耐药强相关 [38，69]。OPA1 是一种作用于线粒体嵴连接处的蛋白，在维持嵴稳定性和防止细胞色素 c 释放方面发挥关键作用。为了更好地释放细胞色素 c，Venetoclax 处理之后，线粒体变大，并通过降解 OPA1 蛋白使线粒体内膜发生重构：嵴数目变少以及嵴腔变宽 [70]。相较于敏感细胞，Venetoclax 耐药细胞系的线粒体嵴腔更窄、更紧凑，每个线粒体的嵴数量更多，且 OPA1 蛋白的表达量更高。当面对死亡信号（例如 Venetoclax 刺激）时，细胞色素 c 不易被释放，所以下游的凋亡被抑制，产生耐药 [38]。另外，包括 *MFN2* 在内的编码线粒体外膜的基因也与 Venetoclax 耐药相关。作为同时位于内质网表面和线粒体外膜的分子 GTP 酶，MFN2 主要作用是将两个细胞器对齐，增强线粒体自噬，从而清除功能障碍或缺陷的线粒体，维持细胞存活 [71]。在 BH3 模拟物耐药的细胞中，MFN2 增强线粒体 - 内质网结合，增加自噬，逃避 BH3 模拟物诱导的程序性死亡，最终耐药 [72]。这些证据表明靶向线粒体，例如靶向线粒体结构，可能是治疗 Venetoclax 耐药的有效途径。CLPB 是一种可以避免 OPA1 降解的蛋白，靶向它的分子联合 Venetoclax 可能可以克服耐药。但是鉴于线粒体在正常生理过程的关键作用，其安全性和有效性需要临床研究进一步证实 [38]。

1.2.3　其他机制　除了上述基因和通路，其他信号分子的上调也被证明与 Venetoclax 耐药相关。基

于 RNA 序列衍生的基因表达谱的线性回归分析发现：*S100A8*、*S100A9* 基因表达与 AML 细胞对 Venetoclax 反应成负相关，*S100A8*、*S100A9* 的过表达会引发耐药，其机制可能是 S100A8/S100A9 复合体通过阻碍钙向线粒体的迁移，抑制细胞凋亡。研究发现 BET 溴区结构域的抑制剂 OTX-015 与 *S100A9* 的表达正相关[73]。与之一致的是，体外和体内实验证明了 BET 抑制剂和 Venetoclax 存在协同效应[74-75]。但是临床试验中，两者的联用治疗 R/R AML 的Ⅰ期临床试验结果不理想（复合完全缓解率只有 21%）[76]。因此，BET 抑制剂治疗 Venetoclax 耐药的潜能还需要进一步挖掘。除此以外，研究者发现 CXCL12-CXCR4 通路激活也会导致 Venetoclax 耐药：在 CD44 的参与下，CXCL12 与肿瘤干细胞表面相应的配体 CXCR4 相互作用，通过胚胎干细胞转录因子诱导 BCL-2 蛋白家族中的抗凋亡成员转录增加，进而增强对 Venetoclax 诱导的凋亡的抵抗，促进肿瘤进展[77]。

另外，Venetoclax 在靶细胞中的药代动力学相关改变同样导致该药物的耐药。ATP 结合盒（ABC）转运体是抗肿瘤药物外排的重要调节因子[78]。Ebner 等[79]通过 CRISPR-Cas9 筛选，发现一种 ABC 蛋白——ABCC1 的缺失显著增加 AML 细胞对 Venetoclax 的敏感性。并证明了 Venetoclax 是 ABCC1 的底物，后者过表达降低细胞内 Venetoclax 浓度限制了 AML 细胞对 Venetoclax 的敏感性。ABCC1 失活使 Venetoclax 耐药 AML 细胞重新致敏，增强抗白血病作用。因此 ABCC1 水平有潜力成为预测 Venetoclax 治疗反应的生物标志物[79]。

2 结论

Venetoclax 的出现是 AML 治疗史上的里程碑，然而，随着 Venetoclax 在 AML 中的广泛应用，目前临床中出现的耐药现象仍然是一个尚未解决的难题。研究 Venetoclax 耐药机制，制订有效的联合治疗方案来规避耐药尤为重要。

BCL-2 家族各种蛋白水平的改变是 Venetoclax 耐药的核心机制，主要涉及靶蛋白的缺失、抗凋亡蛋白的上调和促凋亡蛋白的下调。其中，靶点蛋白 BCL-2 的下调及其他抗凋亡蛋白的表达上调是最典型的耐药机制。另外，促凋亡蛋白 *BAX* 的突变或缺失会通过阻碍其定位到线粒体外膜上形成孔洞，影响 Venetoclax 介导的凋亡过程，而促凋亡蛋白 BH3-only 蛋白的下调同样会引起凋亡抵抗。此外，在 Venetoclax 治疗压力下，LSCs 的代谢谱发生变化：上调的脂肪酸或烟酰胺代谢水平增加了 OXPHOS 水平，对抗 Venetoclax 介导的能量代谢抑制，导致细胞对 Venetoclax 的耐受性增加。此外，作为 BCL-2 蛋白家族促进凋亡的平台，线粒体可以通过改变其结构、增加自噬等行为下调对应激信号的敏感性并抑制下游凋亡，引起 Venetoclax 耐药。

随着对耐药机制的了解加深，靶向耐药机制中关键调控分子的药物也正在研究中，大多表现为 Venetoclax 与其他靶向治疗或去甲基化药物或 BCL-2 抗凋亡抑制剂组成二联或三联治疗方案。这些方案在初步的临床试验中取得了一定的效果。然而，目前此类研究大部分是重点关注安全性的单臂研究，其样本量小，虽然部分方案有一定的疗效，但是仍然需要在更大样本量的群体中印证。

除了靶向肿瘤细胞，研究还发现 Venetoclax 对免疫细胞及免疫调节有作用，例如它可以增强免疫 T 细胞和树突状细胞的功能[80-81]，也有研究发现 Venetoclax 耐药的患者的外周血标本中 T 细胞有较为突出的特征[82]。然而 Venetoclax 与免疫细胞、免疫调节的相互作用是否与疗效相关尚不清楚，需要进一步研究验证。

综上所述，Venetoclax 的耐药问题随着药物的不断应用会越来越普遍，如何解决其耐药是未来 AML 治疗的关键问题。因此，未来的研究将着重关注：① 进一步研究耐药的机制，例如 Venetoclax 的免疫调节作用是否参与耐药的发生？② 发现与 Venetoclax 反应性密切相关的指标，利用这些指标尽早地鉴别出可能会对 Venetoclax 耐药的患者，使这一群体及早选择其他包括免疫治疗、异基因移植等治疗手段，并且针对耐药机制的差异，进行个体化联合治疗方案的制订和选择；③ 加快 Venetoclax 联合其他药物的治疗方案的研究进程，在更大群体中验证有效性及安全性。

参考文献

[1] Dombret H，Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia [J]. Blood，2016，127（1）：53-61.

[2] Kadia TM，Reville PK，Borthakur G，et al. Venetoclax plus intensive chemotherapy with cladribine，idarubicin，and cytarabine in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia or high-risk myelodysplastic syndrome：a cohort from a single-centre，single-arm，phase 2 trial [J]. Lancet Haematol，2021，8（8）：e552-e561.

[3] DiNardo CD，Lachowiez CA，Takahashi K，et al. Venetoclax combined with FLAG-IDA induction and consolidation in newly diagnosed acute myeloid leukemia [J]. Am J Hema-

tol，2022，97（8）：1035-1043.
[4] Kadia TM，Reville PK，Wang X，et al. Phase Ⅱ study of venetoclax added to cladribine plus low-dose cytarabine alternating with 5-azacitidine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia [J]. J Clin Oncol，2022，40（33）：3848-3857.
[5] Lachowiez CA，Loghavi S，Zeng Z，et al. A phase Ⅰb/Ⅱ study of ivosidenib with venetoclax±azacitidine in IDH1-mutated myeloid malignancies [J]. Blood Cancer Discov，2023，4（4）：276-293.
[6] DiNardo CD，Tiong IS，Quaglieri A，et al. Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML [J]. Blood，2020，135（11）：791-803.
[7] Pratz KW，Jonas BA，Pullarkat VA，et al. Long-term follow-up of the phase 3 viale-a clinical trial of venetoclax plus azacitidine for patients with untreated acute myeloid leukemia ineligible for intensive chemotherapy [J]. Blood，2022，140（Supplement 1）：529-531.
[8] DiNardo CD，Jonas BA，Pullarkat V，et al. Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med，2020，383（7）：617-629.
[9] Pollyea DA，Pratz K，Letai A，et al. Venetoclax with azacitidine or decitabine in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia：long term follow-up from a phase 1b study [J]. Am J Hematol，2021，96（2）：208-217.
[10] Wong RSY. Apoptosis in cancer：from pathogenesis to treatment [J]. J Exp Clin Cancer Res，2011，30（1）：87.
[11] Teh TC，Nguyen NY，Moujalled DM，et al. Enhancing venetoclax activity in acute myeloid leukemia by co-targeting MCL1 [J]. Leukemia，2018，32（2）：303-312.
[12] Caenepeel S，Brown SP，Belmontes B，et al. AMG 176，a selective MCL1 inhibitor，is effective in hematologic cancer models alone and in combination with established therapies [J]. Cancer Discov，2018，8（12）：1582-1597.
[13] Pan R，Hogdal LJ，Benito JM，et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia [J]. Cancer Discov，2014，4（3）：362-375.
[14] Ye SS，Xiong F，He XF，et al. DNA hypermethylation-induced miR-182 silence targets BCL2 and HOXA9 to facilitate the self-renewal of leukemia stem cell，accelerate acute myeloid leukemia progression，and determine the sensitivity of BCL2 inhibitor venetoclax [J]. Theranostics，2023，13（1）：77-94.
[15] Pei S，Pollyea DA，Gustafson A，et al. Monocytic subclones confer resistance to venetoclax-based therapy in patients with acute myeloid leukemia [J]. Cancer Discov，2020，10（4）：536-551.
[16] Lin KH，Winter PS，Xie A，et al. Targeting MCL-1/BCL-XL forestalls the acquisition of resistance to ABT-199 in acute myeloid leukemia [J]. Sci Rep，2016，6：27696.
[17] Zhang Q，Riley-Gillis B，Han L，et al. Activation of RAS/MAPK pathway confers MCL-1 mediated acquired resistance to BCL-2 inhibitor venetoclax in acute myeloid leukemia [J]. Signal Transduct Target Ther，2022，7（1）：51.
[18] Niu XJ，Zhao JY，Ma J，et al. Binding of released bim to Mcl-1 is a mechanism of intrinsic resistance to ABT-199 which can be overcome by combination with daunorubicin or cytarabine in aml cells [J]. Clin Cancer Res，2016，22（17）：4440-4451.
[19] Carter BZ，Mak PY，Tao W，et al. Targeting MCL-1 dysregulates cell metabolism and leukemia-stroma interactions and resensitizes acute myeloid leukemia to BCL-2 inhibition [J]. Haematologica，2022，107（1）：58-76.
[20] Escudero S，Zaganjor E，Lee S，et al. Dynamic regulation of long-chain fatty acid oxidation by a noncanonical interaction between the MCL-1 BH3 Helix and VLCAD [J]. Molecular Cell，2018，69（5）：729-743. e727.
[21] Stevens BM，Jones CL，Pollyea DA，et al. Fatty acid metabolism underlies venetoclax resistance in acute myeloid leukemia stem cells [J]. Nat Cancer，2020，1（12）：1176-1187.
[22] Kuusanmäki H，Leppä AM，Pölönen P，et al. Phenotype-based drug screening reveals association between venetoclax response and differentiation stage in acute myeloid leukemia [J]. Haematologica，2020，105（3）：708-720.
[23] Waclawiczek A，Leppa AM，Renders S，et al. Combinatorial BCL2 family expression in acute myeloid leukemia stem cells predicts clinical response to azacitidine/venetoclax [J]. Cancer Discov，2023，13（6）：1408-1427.
[24] Mali RS，Zhang Q，DeFilippis RA，et al. Venetoclax combines synergistically with FLT3 inhibition to effectively target leukemic cells in FLT3-ITD ＋ acute myeloid leukemia models [J]. Haematologica，2021，106（4）：1034-1046.
[25] Janssen M，Schmidt C，Bruch PM，et al. Venetoclax synergizes with gilteritinib in FLT3 wild-type high-risk acute myeloid leukemia by suppressing MCL-1 [J]. Blood，2022，140（24）：2594-2610.
[26] Zhang X，Qian JJ，Wang Hf，et al. Not BCL2 mutation but dominant mutation conversation contributed to acquired venetoclax resistance in acute myeloid leukemia [J]. Biomark Res，2021，9（1）：30.
[27] Weng GY，Zhang Y，Yu G，et al. Genetic characteristics predict response to venetoclax plus hypomethylating agents in relapsed or refractory acute myeloid leukemia [J]. J Intern Med，2023，293（3）：329-339.
[28] Ma J，Zhao SJ，Qiao XN，et al. Inhibition of Bcl-2 synergistically enhances the antileukemic activity of midostaurin and gilteritinib in preclinical models of FLT3-mutated acute myeloid leukemia [J]. Clin Cancer Res，2019，25（22）：6815-6826.
[29] Bagrintseva K，Geisenhof S，Kern R，et al. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x（L）[J]. Blood，2005，105（9）：3679-3685.
[30] Kasper S，Breitenbuecher F，Heidel F，et al. Targeting MCL-1 sensitizes FLT3-ITD-positive leukemias to cytotoxic therapies [J]. Blood Cancer J，2012，2（3）：e60.
[31] Yoshimoto G，Miyamoto T，Jabbarzadeh-Tabrizi S，et al. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of

stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD–specific STAT5 activation [J]. Blood，2009，114（24）：5034-5043.
[32] Zhu RQ，Li L，Nguyen B，et al. FLT3 tyrosine kinase inhibitors synergize with BCL-2 inhibition to eliminate FLT3/ITD acute leukemia cells through BIM activation [J]. Signal Transduct Target Ther，2021，6（1）：186.
[33] Zhang HJ，Nakauchi Y，Köhnke T，et al. Integrated analysis of patient samples identifies biomarkers for venetoclax efficacy and combination strategies in acute myeloid leukemia [J]. Nature Cancer，2020，1（8）：826-839.
[34] Pan RQ，Ruvolo V，Mu H，et al. Synthetic lethality of combined Bcl-2 inhibition and p53 activation in AML：mechanisms and superior antileukemic efficacy [J]. Cancer Cell，2017，32（6）：748-760.e6.
[35] Kim K，Maiti A，Loghavi S，et al. Outcomes of TP53 -mutant acute myeloid leukemia with decitabine and venetoclax [J]. Cancer，2021，127（20）：3772-3781.
[36] Wang YW，Tsai CH，Lin CC，et al. Cytogenetics and mutations could predict outcome in relapsed and refractory acute myeloid leukemia patients receiving BCL-2 inhibitor venetoclax [J]. Ann Hematol，2020，99（3）：501-511.
[37] Nechiporuk T，Kurtz SE，Nikolova O，et al. The TP53 apoptotic network is a primary mediator of resistance to BCL2 inhibition in AML cells [J]. Cancer Discov，2019，9（7）：910-925.
[38] Chen XF，Glytsou C，Zhou H，et al. Targeting mitochondrial structure sensitizes acute myeloid leukemia to venetoclax treatment [J]. Cancer Discov，2019，9（7）：890-909.
[39] Savona MR，Rathmell JC. Mitochondrial homeostasis in AML and gasping for response in resistance to BCL2 blockade [J]. Cancer Discov，2019，9（7）：831-833.
[40] Carter BZ，Mak PY，Tao WJ，et al. Maximal activation of apoptosis signaling by cotargeting antiapoptotic proteins in BH3 mimetic-resistant AML and AML stem cells [J]. Mol Cancer Ther，2022，21（6）：879-889.
[41] Moujalled DM，Brown FC，Chua CC，et al. Acquired mutations in BAX confer resistance to BH3-mimetic therapy in acute myeloid leukemia [J]. Blood，2023，141（6）：634-644.
[42] Watanabe D，Nogami A，Okada K，et al. FLT3-ITD activates RSK1 to enhance proliferation and survival of AML cells by activating mTORC1 and eIF4B cooperatively with PIM or PI3K and by inhibiting Bad and BIM [J]. Cancers Basel，2019，11（12）：1827.
[43] Thijssen R，Diepstraten ST，Moujalled D，et al. Intact TP-53 function is essential for sustaining durable responses to BH3-mimetic drugs in leukemias [J]. Blood，2021，137（20）：2721-2735.
[44] Hasan SMM，Sheen AD，Power AM，et al. Mcl1 regulates the terminal mitosis of neural precursor cells in the mammalian brain through p27Kip1 [J]. Development，2013，140（15）：3118-3127.
[45] Hikita H，Takehara T，Shimizu S，et al. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver [J]. Hepatology，2009，50（4）：1217-1226.
[46] Zeidner JF，Karp JE. Clinical activity of alvocidib（flavopiridol）in acute myeloid leukemia [J]. Leuk Res，2015，39（12）：1312-1318.
[47] Etchin J，Montero J，Berezovskaya A，et al. Activity of a selective inhibitor of nuclear export，selinexor（KPT-330），against AML-initiating cells engrafted into immunosuppressed NSG mice [J]. Leukemia，2015，30（1）：190-199.
[48] Lapalombella R，Sun QX，Williams K，et al. Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood，2012，120（23）：4621-4634.
[49] Luedtke DA，Su YW，Liu S，et al. Inhibition of XPO1 enhances cell death induced by ABT-199 in acute myeloid leukaemia via Mcl-1 [J]. J Cell Mol Med，2018，22（12）：6099-6111.
[50] Duffy MJ，Synnott NC，O'Grady S，et al. Targeting p53 for the treatment of cancer [J]. Semin Cancer Biolo，2022，79：58-67.
[51] Gaur T，Poddutoori R，Khare L，et al. Novel covalent CDK7 inhibitor potently induces apoptosis in acute myeloid leukemia and synergizes with Venetoclax [J]. J Exp Clin Cancer Res，2023，42（1）：186.
[52] Ramsey HE，Fischer MA，Lee T，et al. A novel MCL1 inhibitor combined with venetoclax rescues venetoclax-resistant acute myelogenous leukemia [J]. Cancer Discov，2018，8（12）：1566-1581.
[53] Jonas BA，Hou JZ，Roboz GJ，et al. A phase 1b study of venetoclax and alvocidib in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia [J]. Hematol Oncol，2023，41（4）：743-752.
[54] Tambe M，Karjalainen E，Vähä-Koskela M，et al. Pan-RAF inhibition induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells and synergizes with BCL2 inhibition [J]. Leukemia，2020，34（12）：3186-3196.
[55] Daver N，Perl AE，Maly J，et al. Venetoclax plus gilteritinib for FLT3-mutated relapsed/refractory acute myeloid leukemia [J]. J Clin Oncol，2022，40（35）：4048-4059.
[56] Short N，DiNardo CD，Daver N，et al. Updated results from a phase Ⅰ/Ⅱ study of the triplet combination of azacitidine，venetoclax and gilteritinib for patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia [J]. Blood，2022，140（Supplement 1）：2007-2009.
[57] Maiti A，DiNardo CD，Daver NG，et al. Triplet therapy with venetoclax，FLT3 inhibitor and decitabine for FLT3-mutated acute myeloid leukemia [J]. Blood Cancer J，2021，11（2）：25.
[58] Yilmaz M，Muftuoglu M，Kantarjian H，et al. Quizartinib（Quiz）with decitabine（DAC）and venetoclax（VEN）is highly active in patients（pts）with FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia（AML）-RAS/MAPK mutations continue to drive primary and secondary resistance [J]. Blood，2021，138（Supplement 1）：370.
[59] Daver NG，Dail M，Garcia JS，et al. Venetoclax and idasanutlin in relapsed/refractory AML：a nonrandomized，

open-label phase 1b trial [J]. Blood，2023，141（11）：1265-1276.
[60] Garcia-Manero G，Goldberg AD，Winer ES，et al. Eprenetapopt combined with venetoclax and azacitidine in TP53-mutated acute myeloid leukaemia：a phase 1，dose-finding and expansion study [J]. Lancet Haematology，2023，10（4）：e272-e283.
[61] Jones CL，Stevens BM，D'Alessandro A，et al. Inhibition of amino acid metabolism selectively targets human leukemia stem cells [J]. Cancer Cell，2018，34（5）：724-740. e724.
[62] Lagadinou ED，Sach A，Callahan K，et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells [J]. Cell Stem Cell，2013，12（3）：329-341.
[63] Pollyea DA，Stevens BM，Jones CL，et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia [J]. Nat Med，2018，24（12）：1859-1866.
[64] Jones CL，Stevens BM，Pollyea DA，et al. Nicotinamide metabolism mediates resistance to venetoclax in relapsed acute myeloid leukemia stem cells [J]. Cell Stem Cell，2020，27（5）：748-764. e744.
[65] Sharon D，Cathelin S，Mirali S，et al. Inhibition of mitochondrial translation overcomes venetoclax resistance in AML through activation of the integrated stress response [J]. Sci Transl Med，2019，11（516）：eaax2863.
[66] Buettner R，Nguyen LXT，Morales C，et al. Targeting the metabolic vulnerability of acute myeloid leukemia blasts with a combination of venetoclax and 8-chloro-adenosine [J]. J Hematol Oncol，2021，14（1）：70.
[67] Niu XJ，Rothe K，Chen M，et al. Targeting AXL kinase sensitizes leukemic stem and progenitor cells to venetoclax treatment in acute myeloid leukemia [J]. Blood，2021，137（26）：3641-3655.
[68] Grenier A，Poulain L，Mondesir J，et al. AMPK-PERK axis represses oxidative metabolism and enhances apoptotic priming of mitochondria in acute myeloid leukemia [J]. Cell Rep，2022，38（1）：110197.
[69] Bhatt S，Pioso MS，Olesinski EA，et al. Reduced mitochondrial apoptotic priming drives resistance to BH3 mimetics in acute myeloid leukemia [J]. Cancer Cell，2020，38（6）：872-890.e6.
[70] Roca-Portoles A，Rodriguez-Blanco G，Sumpton D，et al. Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition [J]. Cell Death Disease，2020，11（8）：616.
[71] Grimm S. The ER-mitochondria interface：the social network of cell death [J]. Biochim Biophys Acta，2012，1823（2）：327-334.
[72] Glytsou C，Chen XF，Zacharioudakis E，et al. Mitophagy promotes resistance to BH3 mimetics in acute myeloid leukemia [J]. Cancer Discov，2023，13（7）：1656-1677.
[73] Karjalainen R，Liu MX，Kumar A，et al. Elevated expression of S100A8 and S100A9 correlates with resistance to the BCL-2 inhibitor venetoclax in AML [J]. Leukemia，2019，33（10）：2548-2553.
[74] Bui MH，Lin XY，Albert DH，et al. Preclinical characterization of BET family bromodomain inhibitor ABBV-075 suggests combination therapeutic strategies [J]. Cancer Res，2017，77（11）：2976-2989.
[75] Fiskus W，Cai TY，DiNardo CD，et al. Superior efficacy of cotreatment with BET protein inhibitor and BCL2 or MCL1 inhibitor against AML blast progenitor cells [J]. Blood Cancer J，2019，9（2）：4.
[76] Borthakur G，Odenike O，Aldoss I，et al. A phase 1 study of the pan-bromodomain and extraterminal inhibitor mivebresib（ABBV-075）alone or in combination with venetoclax in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia [J]. Cancer，2021，127（16）：2943-2953.
[77] Yu XB，Munoz-Sagredo L，Streule K，et al. CD44 loss of function sensitizes AML cells to the BCL-2 inhibitor venetoclax by decreasing CXCL12-driven survival cues [J]. Blood，2021，138（12）：1067-1080.
[78] Fletcher JI，Haber M，Henderson MJ，et al. ABC transporters in cancer：more than just drug efflux pumps [J]. Nat Rev Cancer，2010，10（2）：147-156.
[79] Ebner J，Schmoellerl J，Piontek M，et al. ABCC1 and glutathione metabolism limit the efficacy of BCL-2 inhibitors in acute myeloid leukemia [J]. Nat Commun，2023，14（1）：5709.
[80] Lee JB，Khan DH，Hurren R，et al. Venetoclax enhances T cell-mediated antileukemic activity by increasing ROS production [J]. Blood，2021，138（3）：234-245.
[81] Zhao LW，Liu P，Mao MS，et al. BCL2 inhibition reveals a dendritic cell-specific immune checkpoint that controls tumor immunosurveillance [J]. Cancer Discov，2023，13（11）：2448-2469.
[82] Zhigarev D，Varshavsky A，MacFarlane AW，et al. Lymphocyte exhaustion in AML patients and impacts of HMA/Venetoclax or intensive chemotherapy on their biology [J]. Cancers（Basel），2022，14（14）：3352.

（收稿日期：2024-02-20；修回日期：2024-03-28）

二氢杨梅素肝脏疾病保护作用及机制研究进展

康萌[1]，李雪梅[1]，万静之[1]，李澳忠[1]，刘启玲[1]，李影娜[2*]，秦绪军[3*]（1. 陕西中医药大学公共卫生学院，陕西 咸阳 712046；2. 珠海高新技术产业开发区人民医院，广东 珠海 519085；3. 西北工业大学生命学院，西安 710072）

摘要：二氢杨梅素是一种主要存在于葡萄科蛇葡萄属植物中的黄酮类化合物，具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗病原微生物、抗衰老、解酒保肝、防治心脑血管及代谢性疾病等多种药理学作用。近年来，二氢杨梅素对肝脏疾病包括急性肝损伤、酒精性肝病、代谢功能障碍相关的脂肪变性肝病、病毒性肝炎、肝纤维化以及肝癌等的保护作用得到了大量的研究和报道。本文对二氢杨梅素对肝脏疾病的保护作用及机制进行综述，以期为二氢杨梅素相关药物研发及临床防治肝脏疾病提供参考。

关键词：二氢杨梅素；抗氧化；氧化应激；药理作用

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1300-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.029

Research progress in the effect of dihydromyricetin on the prevention and treatment of liver diseases and related mechanism

KANG Meng[1], LI Xue-mei[1], WAN Jing-zhi[1], LI Ao-zhong[1], LIU Qi-ling[1], LI Ying-na[2*], QIN Xu-jun[3*] (1. *School of Public Health*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Hospital of Zhuhai High-tech Industrial Development Zone*, *Zhuhai Guangdong* 519085; 3. *School of Life Sciences*, *Northwestern Polytechnical University*, *Xi'an* 710072)

Abstract: Dihydromyricetin is a flavonoid compound mainly present in plants of the Ampelopsis genus in grape family. It has various pharmacological effects such as antioxidation, anti-inflammation, anti-tumor, anti-microbe, anti-aging, anti-alcohol and liver protection, prevention and treatment of cardiovascular, cerebrovascular, and metabolic diseases. Recently, the protective effects of dihydromyricetin on liver diseases including acute liver injury, alcoholic liver disease, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, viral hepatitis, liver fibrosis, and liver cancer have been extensively studied. This article reviewed the protective effect and mechanism of dihydromyricetin on liver diseases, to provide reference for the development of dihydromyricetin-related drugs and products, as well as the clinical prevention and treatment of liver diseases.

Key words: dihydromyricetin; antioxidation; oxidative stress; pharmacological effect

二氢杨梅素（dihydromyricetin，DHM 或 DMY）是一种主要存在于葡萄科蛇葡萄属植物的黄酮类化合物，其中在显齿蛇葡萄（藤茶）中的含量高达 30% ～ 40%[1]，此外，DHM 也存在于杨梅科、杜鹃科、藤黄科、大戟科、橄榄科、豆科、山榄科及柳科等植物中。DHM 的分子式为 $C_{15}H_{12}O_8$，相对分子质量为 320.25，外观是白色针状结晶，可以溶于水和一些有机溶剂，如乙酸乙酯、甲醇和乙醇，但难溶于氯仿和乙醚。DHM 是一种弱酸，可以与碱反应生成相应的盐，也可以发生多种化学反应，例如酯化、酰化和酰胺化。已有大量研究表明，DHM 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗病原微生物、抗衰老、解酒保肝、防治心脑血管及代谢性疾病多种药理学作用[2-3]，而且 DHM 具有毒性较低和安全性良好的

基金项目：陕西省自然科学基础研究计划项目（No.2024JC-ZDXM-50）；陕西省重点研发计划项目（No.2018SF-014）。

作者简介：康萌，女，在读硕士研究生，主要从事二氢杨梅素抗酒精性肝病相关研究，email：2687531461@qq.com *通信作者：李影娜，女，副主任医师 / 副研究员，硕士研究生导师，主要从事老年医学相关研究，email：liyingna@hotmail.com；秦绪军，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事抗氧化营养医学相关研究，email：qinxujun@hotmail.com

特点[4]，在化妆品、医药和食品等领域具有广阔的应用前景。肝脏作为人体重要的解毒代谢器官，在维持机体健康中至关重要。近年来，DHM 在保肝方面的作用也得到了广泛的研究报道，DHM 可以通过多种机制促进肝细胞的再生和修复，抑制氧化应激，提高抗氧化能力，从而减轻肝脏损伤，改善脂质代谢，预防和治疗肝脏疾病。

1　DHM 的机体代谢

DHM 的代谢途径主要涉及肠道代谢和肝脏代谢两个方面。在肠道中，DHM 主要通过肠道细菌的作用被代谢为不同的代谢产物。Fan 等[5]采用口服 DHM 的大鼠模型发现，DHM 可以分布在各个组织中，特别是在胃肠道中，同时发现 DHM 能够穿过血脑屏障。大部分吸收的 DHM 在体内代谢较快，可以在 12 h 内完成代谢，并且可以在粪便中检测到，这与药代动力学研究报道观察到的 DHM 代谢不稳定相一致[6]。在肝脏中，DHM 主要通过细胞色素 P450 酶的作用被代谢为不同的代谢产物。目前认为 DHM 主要通过葡糖醛酸化作用、硫化作用、还原作用、脱羟基作用以及甲基化作用转化成各种代谢产物[5]。但 DHM 代谢产物很多，具体还需要通过代谢研究进一步鉴定。

2　DHM 的肝脏药理学保护作用及机制

肝脏是机体的重要代谢器官，肝脏的疾病直接影响机体健康。临床常见的主要肝脏疾病包括急性肝损伤、酒精性肝病（ALD）、非酒精性脂肪肝、病毒性肝炎、肝纤维化及肝硬化和肝癌等。有研究表明，DHM 具有明确的肝脏保护作用，对以上多种肝脏疾病具有很好的防治效果[7-9]。其中涉及的药理学机制包括抗氧化作用、抗炎作用、抗病原微生物作用以及调控自噬和凋亡作用等（见图 1）。DHM 具有很强的抗氧化能力，除了直接清除自由基外，还可以通过抑制活性氧（ROS）产生、提高抗氧化酶活性和调节氧化应激相关的信号通路等多种机制发挥抗氧化作用。DHM 还能够激活抗氧化转录因子如核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）和叉头蛋白（FoxO），提高抗氧化能力，抑制氧化应激信号通路的活化，从而减轻氧化应激发挥防治疾病的保护作用[2]。DHM 能够通过抑制促炎因子如白细胞介素（IL）-1β、IL-6 和肿瘤坏死因子（TNF-α）的表达，增加抗炎因子如 IL-10 的水平，发挥抗炎作用[7]。已有研究表明，DHM 可通过抑制细菌分裂和增殖，细菌呼吸代谢以及细菌的代谢酶来抵抗病原微生物对机体的损伤[8]。此外自噬和凋亡在多种肝脏损伤疾病中均发挥着重要作用，而 DHM 被证明能够通过自噬和凋亡相关通路来调控自噬和凋亡，改善肝脏相关疾病。

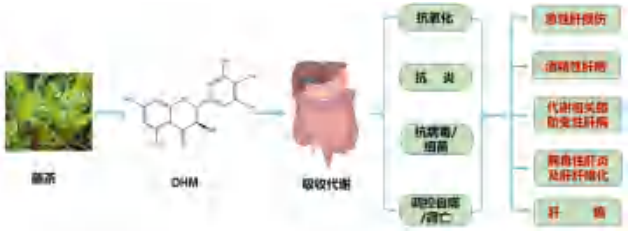

图 1　DHM 对肝脏的药理学作用

Fig 1　Hepatopharmacological effect of DHM

2.1　急性（化学性）肝损伤

急性肝损伤是一种肝细胞突发性损伤，主要由外源性化学毒物 [如四氯化碳（CCl_4）]、药物 [如对乙酰氨基酚（APAP）、甲氨蝶呤（MTX）] 以及病毒等引起。而炎症在急性肝损伤中发挥了重要作用。DHM 具有抑制炎症细胞的活化和炎症因子产生的作用，进而抑制炎症相关信号通路的激活，减轻炎症反应，保护机体免受炎症损伤。CCl_4 诱导的肝损伤是目前应用较广泛的急性肝损伤模型。Xie 等[9]研究发现，DHM 可以通过调控 JNK 通路来抑制 TNF-α 的表达，抑制炎症因子 IL-1β 和 IL-6 水平，减轻细胞凋亡，缓解 CCl_4 诱导的急性肝损伤。DHM 还可以减轻 APAP 引起的肝损伤。Dong 等[10]研究发现，DHM 可以通过抑制肝细胞死亡、促进 p53 依赖的肝再生、改善脂质稳态失衡以及促进 APAP 代谢，来缓解 APAP 诱导的小鼠肝损伤。此外，Matouk 等[11]研究发现，抗癌药物 MTX 会导致肝脏损伤和肝功能恶化，同时伴随着氧化损伤产物增加和抗氧化能力降低，DHM 能够通过 TLR4/NF-κB 通路缓解 MTX 诱导的肝脏损伤和氧化应激。

2.2　酒精性肝病

酒精性肝病是饮酒引起的一系列肝脏代谢疾病，包括酒精性脂肪肝、肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝癌。Shen 等[12]研究发现 DHM 可以缓解急性酒精中毒，通过抑制海马 $GABA_A$ 受体，有效改善酒精引起的中毒症状，如兴奋和焦虑等。酒精进入机体后，在肝脏进行代谢的过程中会产生大量的 ROS，同时也会导致体内抗氧化剂水平降低，破坏机体氧化还原平衡，产生氧化应激。DHM 同时可以通过清除 ROS，缓解氧化应激，降低酒精毒性。此外，DHM 还通过提高乙醇脱氢酶（ADH）的表达，降低机体循环过程中酒精和乙醛的含量，抑制酒精引起的 NAD^+ 的消耗，提

高 NAD^+浓度，减轻酒精毒性作用。Qiu 等[13]采用 C57 小鼠酒精性肝损伤模型发现，DHM 通过 Keap-1/Nrf2 通路调节 p62 和自噬，同时改善了 NF-κB 的核定位紊乱，从而发挥对肝脏的保护作用。Silva 等[14-15]采用慢性酒精性肝病模型发现，DHM 能通过激活腺苷酸激活蛋白激酶（AMPK）和 Sirtuins（Sirt1 和 Sirt3）的表达来提高肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）共激活因子 1α（PGC-1α）的乙酰化水平和线粒体转录因子 A（TFAM）的表达，从而改善线粒体的功能。在持续酒精喂养的小鼠中，DHM 干预能够增加 AMPK 的 Thr172 位点的磷酸化水平，促进肉碱棕榈酰转移酶（CPT）-1a 和乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）-1 的活化，改善脂质代谢，从而减轻肝脏脂肪变性。此外，DHM 还能通过抑制酒精暴露引起的炎症细胞因子水平升高、转氨酶释放和三酰甘油的累积，对酒精诱导的肝毒性发挥保护作用。综上所述，DHM 作为一种新型抗酒精治疗药物，可以通过对抗酒精中毒、抑制氧化应激、改变脂质代谢、抑制炎症反应和刺激自噬通路等机制来改善酒精诱导的肝损伤。

2.3 代谢功能障碍相关的脂肪变性肝病（MASLD）

非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）是最常见的慢性肝病之一，以肝脏脂肪变性为主要特点[16]，近年来专家针对该疾病特点将名称改为代谢功能障碍相关的脂肪性肝病（MAFLD），而最新国际组织一致提议将该病病名改为 MASLD[17]。该疾病从简单的肝脂肪变性逐渐发展为脂肪性肝炎、肝硬化甚至肝癌。近年来的研究表明，DHM 能够有效改善 MASLD。Chen 等[18]在一项双盲随机对照试验中发现，每日给予 MASLD 患者 300 mg 的 DHM，持续 3 个月，能够显著增强肝功能，降低胰岛素抵抗，缓解肝脂肪变性。胰岛素抵抗能够刺激新生脂肪的生成，将机体摄入的葡萄糖重新进入肝脏，此过程进一步使 MASLD 恶化。Le 等[19]采用 MASLD 动物模型发现，DHM 能够降低高脂饮食诱导的胰岛素抵抗大鼠的血糖和血浆胰岛素水平，缓解肝脏脂肪变性。DHM 干预能够抑制胰岛素刺激的 Akt 的 Ser473 和胰岛素受体底物 -1（IRS-1）的 Ser612 磷酸化水平，促使葡萄糖 -6- 磷酸酶（G6Pase）磷酸化以及糖原合成酶激 3β-（GSK-3β）水平升高，进而改善 MASLD。Zeng 等[20]采用高脂饮食喂养的低密度脂蛋白（LDL）受体敲除小鼠模型，发现 DHM 通过激活 AMPK-PGC1α- 雌激素相关受体 α（ERRα）信号通路来增加 SIRT3 表达，改善肝细胞线粒体呼吸能力和氧化还原稳态。同时，DHM 通过降低肝脏中脂质合成酶的表达，促进参与脂质 β 氧化过程中酶的表达，促进脂质代谢，从而缓解脂质累积。Guo 等[21]研究发现，DHM 通过抑制 NF-κB/p53/Bax 等蛋白的表达水平，降低三酰甘油（TG）、白蛋白（ALB）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、丙二醛（MDA）、TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-18 表达水平，提高超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）的水平，从而抑制脂肪肝模型中的氧化应激、炎症和凋亡的发生。此外，DHM 还可以通过调节 PPARγ、AMPK 和蛋白激酶 B（Akt）信号通路，提高抗氧化水平，降低氧化损伤，阻止脂肪肝的发展。

2.4 病毒性肝炎和肝纤维化

病毒性肝炎是由肝炎病毒引起的一类肝脏疾病，会进一步发展为肝硬化甚至肝癌。研究表明 DHM 具有显著的抗病毒作用。Wang 等[22]研究发现，DHM 可以通过激活 HepG2 细胞中的核因子 -κB（NF-κB）、AMPK 和自噬，提高炎性细胞因子和抗病毒物质的信使核糖核酸（mRNA）表达，降低肝核因子 α（HNF-α）的 mRNA 水平，抑制乙型肝炎病毒（HBV）的复制，同时加速 HBV 毒性成分的清除，从而发挥抗病毒作用。

肝纤维化是指肝细胞被破坏后再生，循环反复以应对肝脏慢性损伤做出的病理性修复反应，也是各种肝脏慢性疾病向肝硬化发展的关键步骤。Zhou 等[23]用 CCl_4 建立肝纤维化模型发现，DHM 通过芳香烃受体（AhR）-NF-κB/STAT3-IFN-γ 信号通路诱导自噬抑制肝星状细胞活化，进而延缓肝纤维化进展。Ma 等[24]研究发现，DHM 处理显著抑制了 CCl_4 诱导的肝损伤。DHM 可能通过 Sirt1/ 转化生长因子 β（TGF-β1）/Smad3 和自噬通路抑制 CCl_4 诱导的胶原沉积和纤维结节的形成，改善 CCl_4 诱导的肝纤维化。Zhao 等[25]研究表明，DHM 可以抑制硫代乙酰胺（TAA）诱导的肝纤维化进程。进一步研究表明，DHM 能够通过降低 ALT、AST 水平和 MDA 的含量，同时提高 SOD 和谷胱甘肽（GSH）的水平，抑制 TAA 诱导的 NF-κB 信号通路激活和促进促炎因子如 IL-1β 的释放，来抑制炎症反应，从而缓解肝纤维疾病。此外，DHM 能够显著抑制 α- 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）和 TGF-β1 的表达，抑制纤维化的不断沉积，改善肝纤维化。

2.5 肝癌

肝癌是癌症死亡的第三大原因，主要发生在肝硬化患者中。已有很多研究报道了 DHM 的抗

肿瘤作用[26]。DHM 可以通过多种机制抑制肝癌细胞，主要包括：

① 调控细胞周期：细胞周期蛋白依赖性激酶（CDKs）在调控癌细胞的生存和生长中发挥关键作用。Huang 等[27]研究发现，DHM 能够通过 Chk2/Chk1/Cdc2C 途径诱导 G_2/M 细胞周期停滞，从而抑制肝癌细胞的生长。此外，癌细胞的一个重要特征是细胞 ROS 的水平异常增高，促进癌细胞的增殖[28]。Liu 等[29]研究发现，DHM 作为一种强大的 ROS 清除剂，能够通过减少 ROS 和 ATP 的产生，从而抑制 HepG2 细胞增殖。

② 调控细胞凋亡：DHM 还能促进肝癌细胞的凋亡，通过促进促凋亡蛋白（如 Bax、Bak 和 Caspase-3）的表达来发挥作用。根据 Qi 等[30]研究结果，DHM 可以通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达，增加促凋亡因子 Bax 的水平，从而促进肝癌细胞的凋亡。Wu 等[31]研究发现，DHM 处理可以显著提高 p53 的表达水平，降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平，促进肝癌细胞凋亡。

③ 调控关键信号通路：DHM 还可以通过多种信号通路调控凋亡核心蛋白发挥促肝癌细胞凋亡作用。Zhang 等[32]研究发现，DHM 降低了肝癌细胞 Akt 在 Ser473 位点的磷酸化水平，抑制了促凋亡 Bad 在 Ser136 和 Ser112 位点的磷酸化，促进了 Bax 介导的线粒体凋亡。Qi 等[30]研究发现 DHM 显著激活肿瘤抑制因子 p38MAPK，并且呈剂量依赖关系。进一步研究发现，p38 介导的磷酸化能够通过转录因子 p53 诱导肝癌细胞凋亡[33]。

④ 调控自噬：DHM 能够通过诱导自噬抑制肝癌细胞增殖。Xia 等[34]研究表明，DHM 刺激 HepG2 细胞中自噬溶酶体的积累并诱导自噬抑制癌细胞增殖，这一机制涉及 AMPK、ERK1/2 和 Akt 等信号通路对 mTOR 活化的抑制作用。

⑤ 抑制癌细胞转移：细胞进入循环和细胞迁移是肝癌细胞转移的早期步骤，癌细胞分泌的细胞外基质金属蛋白酶（MMPs）和组织蛋白酶共同促使癌细胞通过基质进行迁移[35]。Zhang 等[36]研究发现，DHM 能显著抑制肝癌细胞（SK-Hep-1 和 MHCC97L）的迁移和侵袭能力，DHM 的这种作用与其抑制 MMP-9 表达密切相关。

3　结论与展望

综上所述，DHM 作为一种重要的黄酮类化合物，广泛存在于多种天然植物中。由于其具有抗炎、抗氧化、抗病原微生物等多种生物学作用，并且安全性高，近年来得到国内外学者的广泛关注和深入研究。研究表明，DHM 具有众多药理学作用，对多种临床疾病和损伤均具有显著的保护作用。肝脏作为重要代谢器官对于维持机体健康至关重要。DHM 对肝脏保护作用的药理学研究涵盖了急性肝损伤、酒精性肝病、代谢功能障碍相关的脂肪变性肝病、病毒性肝炎、肝纤维化以及肝癌，具体机制包括抗炎、抗氧化、调控凋亡及自噬等生物学作用，涉及了众多转录因子和信号通路等。越来越多的证据显示，进一步研发 DHM 药物用于多种临床疾病特别是肝脏疾病的治疗具有巨大潜力和前景。但 DHM 存在着生物利用度不高等问题，需要通过结构修饰、剂型及辅料等方面的优化来提高其利用度，进而更好地发挥保肝护肝作用。而 DHM 对于每一种特定肝脏疾病的保护作用也需要进行更全面深入的机制研究，阐明核心的作用靶点，并以此为基础研发靶点明确的 DHM 肝脏疾病防治药物，以期最终服务于广大临床肝脏疾病患者。

参考文献

[1] Zhang JY，Chen Y，Luo HQ，et al. Recent update on the pharmacological effects and mechanisms of dihydromyricetin [J]. Front Pharmacol，2018，9：1204.

[2] Chen JN，Wang XT，Tian X，et al. Molecular mechanisms and therapeutic implications of dihydromyricetin in liver disease [J]. Biomed Pharmacother，2021，142：111927.

[3] 谭胜蓝，陈磊，何桂霞，等 . 二氢杨梅素心血管保护作用的研究进展 [J]. 中南药学，2017，15（3）：339-343.

[4] Wang YR，Wang JM，Xiang HJ，et al. Recent update on application of dihydromyricetin in metabolic related diseases [J]. Biomed Pharmacother，2022，148：112771.

[5] Fan L，Tong Q，Dong WW，et al. Tissue distribution，excretion，and metabolic profile of dihydromyricetin，a flavonoid from Vine Tea（Ampelopsis grossedentata）after oral administration in rats [J]. J Agric Food Chem，2017，65（23）：4597-4604.

[6] Liu L，Yin XL，Wang X，et al. Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. Pharm Biol，2017，55（1）：657-662.

[7] Hou XL，Tong Q，Wang WQ，et al. Suppression of in-flammatory responses by dihydromyricetin，a flavonoid from ampelopsis grossedentata，via Inhibiting the acti-vation of NF-κB and MAPK signaling pathways [J]. J Nat Prod，2015，78（7）：1689-1696.

[8] Liang HY，He KK，Li T，et al. Mechanism and antibacterial activity of vine tea extract and dihydromyricetin against staphylococcus aureus [J]. Sci Rep，2020，10（1）：21416.

[9] Xie J，Liu J，Chen TM，et al. Dihydromyricetin alle-viates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice [J]. World J Gastroenterol，2015，21（18）：5473-5481.

[10] Dong SJ，Ji JB，Hu LY，et al. Dihydromyricetin alleviates acetaminophen-induced liver injury via the regulation of transformation，lipid homeostasis，cell death and regeneration [J]. Life Sci，2019，227：20-29.
[11] Matouk AI，Awad EM，El-Tahawy NFG，et al. Dihydro-myricetin alleviates methotrexate-induced hepatotoxicity via suppressing the TLR4/NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome/caspase1 axis [J]. Biomed Pharmacother，2022，155：113752.
[12] Shen Y，Lindemeyer AK，Gonzalez C，et al. Dihydro-myricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication [J]. J Neurosci，2012，32（1）：390-401.
[13] Qiu P，Dong Y，Li B，et al. Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury [J]. Toxicol Lett，2017，274：31-41.
[14] Silva J，Spatz MH，Folk C，et al. Dihydromyricetin improves mitochondrial outcomes in the liver of alcohol-fed mice via the AMPK/SIRT-1/PGC-1α signaling axis [J]. Alcohol，2021，91：1-9.
[15] Silva J，Yu X，Moradian R，et al. Dihydromyricetin protects the liver via changes in lipid metabolism and enhanced ethanol metabolism [J]. Alcohol Clin Exp Res，2020，44（5）：1046-1060.
[16] Gong H，Xu HM，Li MY，et al. Molecular mechanism and therapeutic significance of dihydromyricetin in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Eur J Pharmacol，2022，935：175325.
[17] Rinella ME，Lazarus JV，Ratziu V，et al. A multisociety delphi consensus statement on new fatty liver disease no-menclature [J]. J Hepatol，2024，29（1）：101133.
[18] Chen SH，Zhao XL，Wan J，et al. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease：a randomized controlled trial [J]. Pharmacol Res，2015，99：74-81.
[19] Le L，Jiang BP，Wan WT，et al. Metabolomics reveals the protective of dihydromyricetin on glucose homeostasis by enhancing insulin sensitivity [J]. Sci Rep，2016，6：36184.
[20] Zeng XL，Yang JN，Hu O，et al. Dihydromyricetin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by improving mitochondrial respiratory capacity and redox homeostasis through modulation of SIRT3 signaling [J]. Antioxid Redox Signal，2019，30（2）：163-183.
[21] Guo L，Zhang HF，Yan XP. Protective effect of dihydromyricetin revents fatty liver through NF-κB/p53/Bcl-2 associated X protein signaling pathways in a rat model [J]. Mol Med Rep，2018，19（3）：1638-1644.
[22] Wang XF，Hu HM，Hu BF，et al. Dihydromyricetin inhibits hepatitis B virus replication by activating NF-κB，MAPKs，and autophagy in HepG2.2. 15 cells [J]. Mol Biol Rep，2023，50（2）：1403-1414.
[23] Zhou X，Yu L，Zhou M，et al. Dihydromyricetin ameliorates liver fibrosis via inhibition of hepatic stellate cells by inducing autophagy and natural killer cell-mediated killing effect [J]. Nutr Metab（Lond），2021，18（1）：64.
[24] Ma JQ，Sun YZ，Ming QL，et al. Ampelopsin attenuates carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis and hepatic stellate cell activation associated with the SIRT1/TGF-β1/Smad3 and autophagy pathway [J]. Int Immunopharmacol，2019，77：105984.
[25] Zhao YC，Liu XL，Ding CB，et al. Dihydromyricetin reverses thioacetamide-induced liver fibrosis through NF-κB-mediated inflammation and TGF-β1-regulated of PI3K/Akt signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2021，12：783886.
[26] Zhang QY，Liu J，Liu B，et al. Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism [J]. Sci Rep，2014，4：4628.
[27] Huang HL，Hu M，Zhao R，et al. Dihydromyricetin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G_2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C Pathway [J]. Oncol Rep，2013，30（5）：2467-2475.
[28] Sies H，Jones DP. Reactive oxygen species（ROS）as pleiotropic physiological signalling agents [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2020，21（7）：363-383.
[29] Liu B，Tan XY，Liang J，et al. A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Sci Rep，2014，4：7041.
[30] Qi SM，Kou XJ，Lv J，et al. Ampelopsin induces apoptosis in HepG2 human hepatoma cell line through extrinsic and intrinsic pathways：involvement of P38 and ERK [J]. Environ Toxicol Pharmacol，2015，40（3）：847-854.
[31] Wu SX，Liu B，Zhang QY，et al. Dihydromyricetin reduced Bcl-2 expression via p53 in human hepatoma HepG2 cells [J]. PLoS One，2013，8（11）：e76886.
[32] Zhang ZW，Zhang HQ，Chen SY，et al. Dihydromyricetin induces mitochondria-mediated apoptosis in HepG2 cells through down-regulation of the Akt/Bad pathway [J]. Nutr Res，2017，38：27-33.
[33] Zhao QW，Yu MD，Li JX，et al. GLUD1 inhibits hepatocellular carcinoma progression via ROS-mediated p38/JNK MAPK pathway activation and mitochondrial apoptosis [J]. Discov Oncol，2024，15（1）：8.
[34] Xia J，Guo SW，Fang T，et al. Dihydromyricetin induces autophagy in HepG2 cells involved in inhibition of mTOR and regulating its upstream pathways [J]. Food Chem Toxicol，2014，66：7-13.
[35] Massagué J，Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells [J]. Nature，2016，529（7586）：298-306.
[36] Zhang QY，Li R，Zeng GF，et al. Dihydromyricetin inhibits migration and invasion of hepatoma cells through regulation of MMP-9 expression [J]. World J Gastroenterol，2014，20（29）：10082-10093.

（收稿日期：2024-01-03；修回日期：2024-02-30）

度普利尤单抗用于 2 型炎症性皮肤疾病的研究进展

赵玉婷[1, 2]，宋沧桑[1, 2*]，王国徽[1]，张函舒[1]（1. 昆明市第一人民医院药学部，昆明　650000；2. 昆明医科大学附属甘美医院，昆明　650000）

摘要：中国人皮肤疾病患病率高达 40% ～ 70%，其中 2 型炎症性皮肤疾病发病率超过 10%。传统治疗方案包括糖皮质激素联合抗组胺药或免疫抑制剂，存在病情控制不佳、药物不良反应多等弊端。靶向生物制剂度普利尤单抗的研发上市，为 2 型炎症性皮肤疾病提供了全新的治疗选择，但临床上度普利尤单抗常超适应证应用于其他 2 型炎症性皮肤疾病的治疗。本文就近年来度普利尤单抗在 2 型炎症性皮肤疾病中的应用研究进展进行综述，以期为该类患者的治疗提供新思路并且对生物制剂的临床应用进行展望。

关键词：2 型炎症性皮肤疾病；度普利尤单抗；靶向生物制剂；超适应证

中图分类号：R96，R751　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1305-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.030

Progress in dupilumab for type 2 inflammatory skin disorders

ZHAO Yu-ting[1, 2], SONG Cang-sang[1, 2*], WANG Guo-hui[1], ZHANG Han-shu[1] (1. *Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Kunming, Kunming* 650000; 2. *Affiliated Ganmei Hospital, Kunming Medical University, Kunming* 650000)

Abstract: The prevalence of skin disorders in China is as high as 40% ～ 70%, with the incidence rate of type 2 inflammatory skin disease exceeding 10%. Traditional treatment options include glucocorticoids combined with antihistamines or immunosuppressants, which may have drawbacks such as poor disease control and various adverse drug reactions. The development and marketing of dupilumab has provided a new therapeutic option for type 2 inflammatory skin diseases, but dupliumab is often used off-label for other type 2 inflammatory skin diseases clinically. In this review, the application of dupliumab in type 2 inflammatory skin diseases in recent years was reviewed, with a view to providing new ideas for the treatment of this type of patients and looking forward to the clinical application of biologics.

Key words: type 2 inflammatory skin disease; dupilumab; targeted biologics; over-indication

2 型炎症是指以 2 型辅助型 T 淋巴细胞（Th2）、2 型先天淋巴样细胞、嗜酸性粒细胞以及 Th2 型细胞因子 [如白细胞介素（IL）-4、IL-5、IL-13、IL-31] 等为主介导的炎症，它可以激活固有和适应性免疫应答[1]。2 型炎症反应可引发皮肤性疾病包括特应性皮炎（AD）、大疱性类天疱疮（BP）、结节性痒疹（PN）、大疱性表皮松解症（DEB）、慢性荨麻疹（CU）、内瑟顿综合征（NS）、高免疫球蛋白 E 综合征（HIES）等。既往 2 型炎症性皮肤疾病的传统治疗包括糖皮质激素、JAK 抑制剂、免疫抑制剂和 H1 抗组胺药等，但因效果不佳且周期长、毒副作用大、患者经济成本高，进而开发了多种以 Th2 型细胞因子为靶点的药物。度普利尤单抗是一种重组人源化 IgG4 单克隆抗体，是目前首个也是唯一被批准用于治疗 6 个月及以上婴幼儿至成年覆盖全年龄人群的中重度 AD 靶向生物制剂。度普利尤单抗通过靶向异二聚体 IL-4 受体的 α 链，抑制不同组织中 IL-4 和 IL-13 诱导信号传导并下调 AD

基金项目：云南省临床药学中心建设项目；云南省卫生健康委员会医学领军人才培养计划项目（No. L-2018012）；昆明市医学科技领军人才培养项目 [No. 2023-SW（领军）-04]。

作者简介：赵玉婷，女，在读硕士研究生，主要从事临床药学方面的研究，email：1301847951@qq.com　*通信作者：宋沧桑，女，主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学和药物基因组学的研究，email：songcs163@163.com

中的 Th2 炎症反应阻断信号通路、替代巨噬细胞激活以及干扰 B 细胞产生免疫球蛋白 E（IgE）[2]。对于 2 型炎症性皮肤疾病患者来说，这是一种安全、有效的治疗选择，它改善了临床研究中的患者报告结局。本文梳理近年度普利尤单抗在 2 型炎症性皮肤疾病中的临床应用研究进展，并归纳其主要成果，以期为度普利尤单抗在 2 型炎症性皮肤疾病中的临床应用提供理论依据。

1 药效学与药动学

度普利尤单抗国内外推荐初始负荷剂量为 600 mg（不同注射部位注射两次，300 mg/ 次），随后每两周给药 300 mg，约 16 周后达到稳态浓度。生物利用度估计为 60.7%，最大靶介导消除率估计为 0.968 mg/（L·d），但其代谢途径及机制尚不清楚 [3]。多项 AD 临床试验表明度普利尤单抗治疗后较基线时 2 型免疫生物标志物水平下降。度普利尤单抗最常见的不良反应为注射部位反应、结膜炎、关节痛、口腔疱疹和嗜酸性粒细胞增多，偶见超敏反应。目前，尚未开展动物实验评价其致突变性和致癌性。

2 度普利尤应用于 2 型炎症性皮肤疾病

2 型炎症反应主要涉及 Th2 细胞和 2 型先天淋巴样细胞（ILC2）及其分泌的 2 型细胞因子。Th2 细胞中 GATA3 转录因子的激活、IL-4 和 IL-13 基因启动子的去甲基化及该区域 H3 组蛋白的甲基化产生 IL-4 和 IL-13。同时，在转录因子 GATA-3 的参与下，ILC2 接收来自上皮细胞和人胸腺基质淋巴细胞生成素作为激活信号，产生细胞因子 IL-4 和 IL-13，进而促进嗜酸性粒细胞增殖、浸润，参与多种疾病的发生发展 [4-5]。总的来说，Th2 细胞因子刺激 B 细胞增殖并产生抗体、介导体液免疫、调节 B 细胞中 IgE 的分泌以及嗜酸性粒细胞及肥大细胞的活化，加重 PAR2 通路导致的蛋白酶过度活化从而引起角质形成细胞增殖分化、皮肤屏障功能损伤及表皮炎症等。度普利尤单抗可通过与 IL-4 和 IL-13 受体复合物共享的 IL-4Rα 亚基特异性结合而抑制 IL-4 和 IL-13 的信号传导，从而阻断 Th2 细胞炎症反应，逆转表皮屏障缺陷，改善 2 型炎症疾病的分子特征。

国家药品监督管理局（NMPA）批准度普利尤单抗的适应证为 6 个月以上婴幼儿及儿童 / 青少年和成人中重度 AD、中重度成人 PN。美国食品药品监督管理局（FDA）和欧洲药品管理局（EMA）批准的度普利尤单抗适应证还包括 6 岁以上儿童 / 青少年和成人中重度哮喘、成人慢性鼻窦炎伴鼻息肉和 1 岁以上儿童 / 青少年和成人嗜酸性粒细胞性食管炎。

2.1 度普利尤应用于 AD

AD 是一种炎症性复发性瘙痒性皮肤病，患者可伴随哮喘和过敏性鼻炎，并伴有外周血 IgE 和嗜酸性粒细胞升高。Simpson 等 [6] 在一项Ⅲ期临床研究中纳入局部治疗控制不佳的中重度 AD 患者，随机分为安慰剂组和 300 mg 度普利尤单抗组治疗。第 16 周时与安慰剂组相比，度普利尤单抗治疗的患者湿疹面积严重程度（EASI）改善 50%、75% 和 90% 的比例显著提高。Beck 等 [7] 开展的前瞻性长期研究显示，第 148 周度普利尤单抗治疗 AD 达到 EASI-50、EASI-75、EASI-90、研究者整体评分达 0 或 1（IGA0/1）的患者分别为 98.3%、96.6%、87.9% 和 74.1%，表明度普利尤单抗对中重度 AD 患者具有良好的有效性和持久疗效。Paller 等 [8] 分析了 367 例 6 ～ 11 岁中重度 AD 患儿应用度普利尤单抗联合局部糖皮质激素的临床疗效，结果表明度普利尤单抗较安慰剂疗效及耐受良好，可显著改善患儿皮损症状，提高生活质量。Cork 等 [9] 对 367 例 AD 患儿进行治疗周期为 52 周的扩展研究，结果表明临床疗效得到维持，且耐受性良好，没有发现新的不良事件。在 6 个月～ 6 岁儿童的Ⅲ期临床试验中，度普利尤单抗联合外用糖皮质激素组疗效显著优于单用糖皮质激素组，患儿未出现不良反应 [10]。以上研究显示，度普利尤单抗在 6 个月及以上婴幼儿 / 儿童及成年人中长期使用其安全性和疗效较好，可在临床推广应用。

2.2 度普利尤应用于 PN

慢性 PN 或 PN 是慢性痒疹最常见的亚型，以慢性瘙痒和长时间搔抓为特征，导致多发局部或对称分布的广泛性角化过度、结痂和剥脱的结节性病变 [11]。目前，大量研究表明度普利尤单抗对 PN 病变和瘙痒均有改善作用。两项随机、双盲、24 周治疗期临床Ⅲ期试验共纳入 311 例 18 ～ 80 岁 PN 患者，结果显示度普利尤单抗治疗组中近一半患者的皮损症状清除或几乎清除、瘙痒程度减轻，治疗组有效率均优于安慰剂组，严重不良反应发生率低 [12]。以上研究表明，度普利尤单抗对 PN 具有良好的安全性及疗效。Husein-ElAhmed 等 [13] 分析汇总 45 名 PN 患者使用度普利尤单抗，几乎所有患者病情、瘙痒程度及病变范围得到改善，且瘙痒改善情况比病变改善更早，这提示早期改善情况可作为预测未来度普利尤单抗疗效的

关键。多项研究共涉及 118 例度普利尤单抗治疗的 PN 患者病例的报道显示患者的病变范围及瘙痒程度均减轻，进而生活质量提高，进一步证明度普利尤单抗适用于 PN 患者[14-33]。以上有效性和安全性数据支持临床中使用度普利尤单抗治疗 PN，并且针对其疗效仍需进行样本量大、观察期长的真实世界研究。

2.3 度普利尤应用于 BP

BP 是最常见的自身免疫性大疱性疾病之一。BP 患者的水疱液中 Th2 相关细胞因子水平较高，并在 Th2 型反应中发挥作用。有研究表明 2 型炎症是 BP 发病的重要因素[34]。Afarideh 等[35]表明 2 型炎症中的效应物可能是 BP 新的有效治疗靶点。Abdat 等[36]报道的多中心病例数据显示使用度普利尤单抗治疗 BP 后，92.3% 的患者病情缓解，其中 53.8% 的患者皮损完全清除，几乎所有患者瘙痒及病变程度都显著改善。Zhang 等[37]对比分析了 8 例度普利尤单抗联合硫唑嘌呤或泼尼松治疗的 BP 患者和 16 例常规治疗的患者，结果显示联合使用度普利尤单抗可以更好地控制疾病进展、减少糖皮质激素用量，且并未观察到相关不良反应。Liu 等[38]报道了 3 例度普利尤单抗联用常规治疗的顽固性 BP 患者，一周内皮损和瘙痒明显改善，达到了快速控制疾病的效果，这显示度普利尤单抗在治疗难治性 BP 中的潜在作用。上述研究数据提示度普利尤单抗可作为顽固性 BP 患者的新的治疗方式，但需更大样本量进一步研究证实。

2.4 度普利尤应用于 DEB

DEB 是一种由 *COL7A1* 基因突变引起的营养不良型异质性基因皮肤病，纯性大疱性表皮松解症（EBP）是 DEB 一个亚型，已有研究表明 Th2 介导的免疫在 EBP 中的作用。Wu 等[39]对 3 例中国 EBP 患者进行前瞻性研究显示，第 20 周时，患者大疱性表皮松解症活动和瘢痕形成指数（EBDASI）评分得分由 65 降至 55；瘙痒程度视觉模拟评分（VAS）得分由 6 降至 2.5；生活质量评分升高。还有少数病例报道也证实度普利尤单抗改善了 EBP 患者的疾病严重程度、瘙痒程度和生活质量[40-44]。以上研究表明度普利尤单抗治疗 EBP 患者具有良好的疗效，可为临床 EBP 患者提供治疗选择，但由于 EBP 罕见，因此，需进一步开展长期临床研究来验证度普利尤单抗治疗 EBP 的有效性和安全性。

2.5 度普利尤应用于 CU

CU 定义为由各种因素致使皮肤、黏膜、血管发生暂时性炎性充血与组织内水肿，病程持续 6 周以上。国际荨麻疹指南 2021 版[45]将该疾病分为慢性自发性荨麻疹（CSU）或慢性诱导性荨麻疹。奥马珠单抗是 FDA 批准的第一个用于治疗 CSU 的生物制剂，已广泛用于治疗抗组胺耐药难治性 CSU 患者。Lee 等[46]报道显示难治性 CSU 患者使用 600 mg 奥马珠单抗无治疗效果，更换为度普利尤单抗，治疗 3 个月，患者荨麻疹持续时间和严重程度得到缓解。另一项纳入 138 例中重度 CSU 患者的国际多中心Ⅲ期临床研究显示，度普利尤单抗与单用抗组胺药组瘙痒程度评分降低更显著[47]。

目前，正在进行的两项Ⅱ期临床试验评估度普利尤单抗用于成人 CU 和胆碱能荨麻疹患者中的疗效和安全性[48-49]。胆碱能荨麻疹及特应性疾病均存在肥大细胞和 IgE 介导的病理改变，度普利尤单抗可为抗组胺药治疗反应不佳的患者提供更有效的治疗选择。

2.6 度普利尤应用于 NS

NS 是一种罕见的常染色体隐性（AR）型鱼鳞病，由丝氨酸肽酶抑制剂 Kazal 型 5 基因突变引起，该基因编码相关抑制剂，抑制剂抑制表皮中与皮肤脱屑过程有关的钾化因子（KLK）相关肽的活性，KLK 通过激活蛋白酶激活受体 2 随后产生 Th2 促炎细胞因子参与皮肤炎症[50]。Th2 细胞因子在 NS 患者中过度表达，因此，使用度普利尤单抗治疗该疾病在理论上是可行的。5 篇病例报道分析了 8 名 8 ～ 43 岁既往传统治疗效果不佳的 NS 患者接受度普利尤单抗治疗后，其中 7 例患者生活质量提高，EASI 或患者湿疹自我监测（POEM）或瘙痒数字评分表（NRS）评分降低；仅 1 例患者出现注射部位不良反应，表明度普利尤单抗对 NS 患者具有良好的有效性及安全性[51-55]。目前，一项正在进行的随机双盲安慰剂对照试验进一步研究度普利尤单抗在 NS 患者中的疗效[56]。以上研究结果显示度普利尤单抗可作为临床 NS 患者新的治疗选择，有望成为度普利尤单抗新的适应证。

2.7 度普利尤应用于 HIES

HIES 是一种遗传性疾病，表现为 IgE 水平升高、湿疹、复发性感染、骨骼和血管异常。HIES 由不同的突变位点导致常染色体显性疾病或常染色体隐性疾病。度普利尤单抗可干预 HIES 中不平衡的 IL-4 信号，抑制 2 型炎症反应中细胞因子

的作用途径，调控 B 细胞分泌 IgE 过程，这是度普利尤单抗治疗 HIES 的一种可能途径。共有 10 篇病例报道[57-66]包括 16 例 9 ～ 48 岁 HIES 患者接受度普利尤单抗的治疗，结果显示所有患者治疗后 SCORAD 或 POEM、NRS 评分均降低，患者皮损和瘙痒得到改善，2 例患者出现眼部不适，1 例患者出现头疱不良反应，无严重不良反应。这提示度普利尤单抗在临床上治疗 HIES 的可能性。

3 讨论

度普利尤单抗是应用于皮肤、呼吸、变态反应领域的生物制剂，目前国内外获批适应证不同。我国度普利尤单抗批准用于 6 个月及以上婴幼儿和成人中重度 AD 患者、成人 PN 患者。2 型炎症性皮肤疾病患者基数庞大且往往多病共患，长期迁延不愈，无论对于患者、患者家庭，还是医疗系统都是巨大的负担。度普利尤单抗可以治疗相关的 2 型炎症性皮肤疾病，其作用机制为阻断 Th2 细胞分化和巨噬细胞活化，抑制 B 细胞产生 IgE 和其他过敏性炎症标志。此外，它可作用于血管内皮，减少炎症细胞运输，并减轻与过敏反应相关的血管渗漏。生物制剂的研发和临床使用给 2 型炎症性皮肤疾病患者的治疗带来了希望。AD 是一种系统性炎症性疾病，并与特应性共病之间可能存在相同的 2 型炎症通路。确定度普利尤单抗在不同 2 型炎症性皮肤疾病中的作用谱及其对淋巴组织和非淋巴组织中 IL-4 和 IL-13 信号通路的不同影响，进一步扩大 IL-4α 阻断治疗 Th2 细胞炎性疾病的潜力尤其重要。

目前在临床上，临床医师对于 2 型炎症性皮肤疾病缺乏系统的治疗方案，未来度普利尤单抗很可能成为 2 型炎症性皮肤疾病患者广泛治疗的一种选择，后续仍需进一步在真实世界研究中观察度普利尤单抗长期潜在的不良反应。随着对 2 型炎症性皮肤疾病研究的进一步深入，针对不同通路和靶点挖掘更灵敏的生物标志物，有更清晰的证据揭示 2 型炎症是如何参与这些疾病的发病机制，并基于此开发更高效安全的生物制剂应用于临床中，使 2 型炎症性皮肤疾病的治疗方案不断优化，为临床治疗、疾病管理和预后评估带来实质性参考。

参考文献

[1] Gauvreau GM，White L，Davis BE. Anti-alarmin approaches entering clinical trials [J]. Curr Opin Pulm Med，2020，26（1）：69-76.

[2] Oetjen LK，Mack MR，Feng J，et al. Sensory neurons coopt classical immune signaling pathways to mediate chronic itch [J]. Cell，2017，171（217-228）：e13.

[3] Seegrber M，Srour J，Walter A，et al. Dupilumab for treatment of atopic dermatitis [J]. Expert Rev Clin Pharmacol，2018，11（5）：467-474.

[4] Mjösberg J，Spits H. Human innate lymphoid cells [J]. J Allergy Clin Immunol，2016，138（5）：1265-1276.

[5] Schwartz C，Moran T，Saunders SP，et al. Spontaneous atopic dermatitis in mice with a defective skin barrier is independent of ILC2 and mediated by IL-1β [J]. Allergy，2019，74（10）：1920-1933.

[6] Simpson EL，Bieber T，Guttman-Yassky E，et al. Two phase 3 trials of dupilumab versus placebo in atopic dermatitis [J]. N Engl J Med，2016，375（24）：2335-2348.

[7] Beck LA，Thai D，Deleuran M，et al. Dupilumab provides favorable safety and sustained efficacy for up to 3 years in an open-label study of adults with moderate-to-severe atopic dermatitis [J]. Am J Clin Dermatol，2020，21（4）：567-577.

[8] Paller AS，Siegfried EC，Thai D，et al. Efficacy and safety of dupilumab with concomitant topical corticosteroids in children 6 to 11 years old with severe atopic dermatitis：a randomized，double-blinded，placebo-controlled phase 3 trial [J]. J Am Acad Dermatol，2020，83（5）：1282-1293.

[9] Cork MJ，Thai D，Eichenfield LF，et al. Dupilumab in adolescents with uncontrolled moderate-to-severe atopic dermatitis：results from a phase Ⅱ a open-label trial and subsequent phase Ⅲ open-label extension [J]. Br J Dermatol，2020，182（1）：85-96.

[10] Paller AS，Simpson EL，Siegfried EC，et al. Efficacy and safety of dupilumab in children aged ≥ 6 months to ＜ 6 years with moderate-to-severe atopic dermatitis[C/OL]//3rd Annual Revolutionizing Atopic Dermatits Conference（RAD 2021），2021[2022-05-12]. https：//djbpnesxepydt. cloudfront. net/radv/December2021/690_Abstract_AD-1539-Part-B_Primary_Paller-et-al_1639409383487.pdf.

[11] Elmariah S，Kim B，Berger T，et al. Practical approaches for diagnosis and management of prurigo nodularis：united States expert panel consensus [J]. J Am Acad Dermatol，2021，84（3）：747-760.

[12] Silvestre SJF，Romero-Pérez D，Encabo-Durán B. Atopic dermatitis in adults：a diagnostic challenge [J]. J Investig Allergol Clin Immunol，2017，27（2）：78-88.

[13] Husein-ElAhmed H，Steinhoff M. Dupilumab in prurigo nodularis：a systematic review of current evidence and analysis of predictive factors to response [J]. J Dermatolog Treat，2022，33（3）：1547-1553.

[14] Almustafa ZZ，Weller K，Autenrieth J，et al. Dupilumab in treatment of chronic prurigo：a case series and literature review [J]. Acta Derm Venereol，2019，99（10）：905-906.

[15] Beck KM，Yang EJ，Sekhon S，et al. Dupilumab treatment for generalized prurigo nodularis [J]. JAMA Dermatol，2019，155（1）：118-120.
[16] Calugareanu A，Jachiet M，Lepelletier C，et al. Dramatic improvement of generalized prurigo nodularis with dupilumab [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2019，33（8）：303-304.
[17] Ferrucci S，Tavecchio S，Berti E，et al. Dupilumab and prurigo nodularis-like phenotype in atopic dermatitis：our experience of efficacy [J]. J Dermatolog Treat，2021，32（4）：453-454.
[18] Mollanazar NK，Elgash M，Weaver L，et al. Reduced itch associated with dupilumab treatment in 4 patients with prurigo nodularis [J]. JAMA Dermatol，2019，155（1）：121-122.
[19] Rambhia PH，Levitt JO. Recalcitrant prurigo nodularis treated successfully with dupilumab [J]. JAAD Case Rep，2019，5（5）：471-473.
[20] Tanis R，Ferenczi K，Payette M. Dupilumab treatment for prurigo nodularis and pruritis [J]. J Drugs Dermatol，2019，18（9）：940-942.
[21] Calugareanu A，Jachiet M，Tauber M，et al. Effectiveness and safety of dupilumab for the treatment of prurigo nodularis in a French multicenter adult cohort of 16 patients [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2020，34（2）：74-76.
[22] Chiricozzi A，Maurelli M，Gori N，et al. Dupilumab improves clinical manifestations，symptoms and quality of life in adult patients with chronic nodular prurigo [J]. J Am Acad Dermatol，2020，83（1）：39-45.
[23] Criado PR，Pincelli TP，Criado RFJ. Dupilumab as a useful treatment option for prurigo nodularis in an elderly patient with atopic diathesis [J]. Int J Dermatol，2020，59（10）：358-361.
[24] Fachler T，Maria FS，Molho-Pessach V. Dupilumab for pediatric prurigo nodularis：a case report [J]. Pediatr Dermatol，2021，38（1）：334-335.
[25] Giura MT，Viola R，Fierro MT，et al. Efficacy of dupilumab in prurigo nodularis in elderly patient [J]. Dermatol Ther，2020，33（1）：e13201.
[26] Holm JG，Agner T，Sand C，et al. Dupilumab for prurigo nodularis：case series and review of the literature [J]. Dermatol Ther，2020，33（2）：e13222.
[27] Kovács B，Rose E，Kuznik N，et al. Dupilumab for treatment-refractory prurigo nodularis [J]. J Dtsch Dermatol Ges，2020，18（6）：618-624.
[28] Napolitano M，Fabbrocini G，Scalvenzi M，et al. Effectiveness of dupilumab for the treatment of generalized prurigo nodularis phenotype of adult atopic dermatitis [J]. Dermatitis，2020，31（1）：81-84.
[29] Romano C. Safety and effectiveness of dupilumab in prurigo nodularis [J]. J Investig Allergol Clin Immunol，2021，31（2）：162-163.
[30] Tavecchio S，Angileri L，Pozzo GF，et al. Efficacy of dupilumab on different phenotypes of atopic dermatitis：one-year experience of 221 patients [J]. J Clin Med，2020，9（9）：2684.
[31] Tilotta G，Pistone G，Caruso P，et al. Our experience with prurigo nodularis treated with dupilumab [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2021，35（4）：285-287.
[32] Wieser JK，Mercurio MG，Somers K. Resolution of treatment refractory prurigo nodularis with dupilumab：a case series [J]. Cureus，2020，12（6）：e8737.
[33] Winkler JK，Haenssle HA，Enk A，et al. Successful treatment of chronic prurigo with dupilumab [J]. Hautarzt，2021，72（6）：528-532.
[34] Amber KT，Valdebran M，Kridin K，et al. The role of eosinophils in bullous pemphigoid：a developing model of eosinophil pathogenicity in mucocutaneous disease [J]. Front Med（Lausanne），2018，5：201.
[35] Afarideh M，Borucki R，Werth VP. A review of the immunologic pathways involved in bullous pemphigoid and novel therapeutic targets [J]. J Clin Med，2022，11（10）：2856.
[36] Abdat R，Waldman RA，de Bedout V，et al. Dupilumab as a novel therapy for bullous pemphigoid：a multicenter case series [J]. J Am Acad Dermatol，2020，83（1）：46-52.
[37] Zhang YH，Xu QY，Chen LH，et al. Efficacy and safety of dupilumab in moderate-to-severe bullous pemphigoid [J]. Front Immunol，2021，12：738-907.
[38] Liu XT，Ma JC，Qiu XN，et al. Dupilumab，an emerging therapeutic choice for recalcitrant subepidermal autoimmune bullous diseases：a case series of three patients [J]. Eur J Dermatol，2021，31：846-847.
[39] Wu XG，Yan S，Jiang JQ，et al. Successful treatment of epidermolysis bullosa pruriginosa by dupilumab [J]. J Dermatol，2023，50（6）：837-842.
[40] Shehadeh W，Sarig O，Bar J，et al. Treatment of epidermolysis bullosa pruriginos aassociated pruritus with dupilumab [J]. Br J Dermatol，2020，182（6）：1495-1497.
[41] Zhou AG，Little AJ，Antaya RJ. Epidermolysis bullosa pruriginosa treated with dupilumab [J]. Pediatr Dermatol，2021，38（2）：526-527.
[42] Clawson RC，Duran SF，Pariser RJ. Epidermolysis bullosa pruriginosa responding to dupilumab [J]. JAAD Case Rep，2021，16：69-71.
[43] Wang YB，Zhou MM，Zhang L，et al. Amelioration of dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa symptoms with dupilumab：a case report [J]. Dermatol Ther，2021，34（6）：e15130.
[44] Caroppo F，Milan E，Giulioni E，et al. A case of dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa treated with dupilumab [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2022，36（5）：365-367.
[45] Zuberbier T，Abdul LAH，Abuzakouk M，et al. The international EAACI/GA2LEN/EuroGuiDerm/APAAACI

guideline for the definition，classification，diagnosis，and management of urticaria [J]. Allergy，2022，77（3）：734-766.

[46] Lee JK，Simpson RS. Dupilumab as a novel therapy for difficult to treat chronic spontaneous urticaria [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2019，7：1659-1661.

[47] Sanofi. Dupilumab for the treatment of chronic spontaneous urticaria in patients who remain symptomatic despite the use of H1 antihistamine and who are naïve to，intolerant of，or incomplete responders to Omalizumab-LIBERTY-CSU CUPID[EB/OL].（2023-12-1）https：//clinicaltrials. gov/study/NCT04180488?cond ＝ NCT04180488&rank ＝ 1.

[48] Dupilumab in Chronic Spontaneous Urticaria（DUPICUS）. 2021 [EB/OL]. https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT03749135.

[49] Cholinergic Urticaria-Efficacy of Dupilumab（CHED）[EB/OL]. 2023. https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT03749148.

[50] Chiticariu E，Hohl D. Netherton syndrome：insights into pathogenesis and clinical implications [J]. J Invest Dermatol，2020，140：1129-1130.

[51] Andreasen TH，Karstensen HG，Duno M，et al. Successful treatment with dupilumab of an adult with Netherton syndrome [J]. Clin Exp Dermatol，2020，45：915-917.

[52] Aktas M，Salman A，Apti Sengun O，et al. Netherton syndrome：temporary response to dupilumab [J]. Pediatr Dermatol，2020，37（6）：1210-1211.

[53] Murase C，Takeichi T，Taki T，et al. Successful dupilumab treatment for ichthyotic and atopic features of Netherton syndrome [J]. J Dermatol Sci，2021，102：126-129.

[54] Steuer AB，Cohen DE. Treatment of Netherton syndrome with dupilumab [J]. JAMA Dermatol，2020，156：350-351.

[55] Süßmuth K，Traupe H，Loser K，et al. Response to dupilumab in two children with Netherton syndrome：improvement of pruritus and scaling [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2021，35（2）：152-155.

[56] A pilot study of the efficacy and safety of dupilumab versus placebo in patients with Netherton Syndrom（NS-DUPI）[EB/OL]. https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT04244006.

[57] Dixit C，Thatayatikom A，Pappa H，et al. Treatment of severe atopic dermatitis and eosinophilic esophagitis with dupilumab in a 14-year-old boy with autosomal dominant hyper-IgE syndrome [J]. J Allergy ClinImmunol Pract，2021，9（11）：4167-4169.

[58] Joshi T，Anvari S，Gupta M，et al. Dupilumab successfully controls severe eczema in a child with hyper-IgE syndrome：a case repor [J]. J Clin Immunol，2021，41：43-44.

[59] Levy R，Beziat V，Barbieux C，et al. Efficacy of dupilumab for controlling severe atopic dermatitis in a patient with hyper-IgE syndrome [J]. J Clin Immunol，2020，40（2）：418-420.

[60] Lu CW，Lee WI，Chung WH. Dupilumab for STAT3-Hyper-IgE syndrome with refractory intestinal complication [J]. Pediatrics，2021，148（3）：e2021050351.

[61] Moraczewski J，Tison K，Kobrynski L. Novel use of dupilumab in the treatment of recurrent bacterial scalp infections and axillary lymphadenitis in a patient with hyper-IgE syndrome [J]. J Clin Immunol，2021，41：23.

[62] Nataraj P，Bergerson J，Kumar S，et al. Dupilumab therapy in STAT3 deficient hyper IgE syndrome [J]. J Clin Immunol，2021，41：9-10.

[63] Ollech A，Mashiah J，Lev A，et al. Treatment options for DOCK8 deficiency-related severe dermatitis [J]. J Dermatol，2021，48（9）：1386-1393.

[64] Sogkas G，Hirsch S，Jablonka A，et al. Dupilumab to treat severe atopic dermatitis in autosomal dominant hyper-IgE syndrome [J]. Clin Immunol，2020，215：108452.

[65] Staudacher O，Krüger R，Kölsch U，et al. Relieving job：dupilumab in autosomal dominant STAT3 hyper-IgE syndrome [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2022，10（1）：349-351.

[66] Su CJ，Tseng HC. Treatment efficacy of dupilumab in a hyperimmunoglobulin E syndrome patient with severe atopic dermatitis [J]. JAAD Case Rep，2021，11：60-62.

（收稿日期：2023-10-11；修回日期：2024-02-27）

过氧化物酶体增殖活化因子受体γ及其激动剂在类风湿关节炎中的作用研究进展

陈娜，臧雷，刘芳*（中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院药剂科，重庆　400038）

摘要：类风湿关节炎是一种以多关节滑膜炎为主要特征的自身免疫性疾病，其发病机制尚未完全阐明。过氧化物酶体增殖活化因子受体γ（PPARγ）是一类配体激活的核转录因子超家族成员，在免疫调节、炎症控制和骨稳定中发挥重要功能。因此，研究PPARγ在类风湿关节炎中发挥的作用具有重要意义。本文就PPARγ在类风湿关节炎中的作用进行综述，并讨论基于PPARγ靶点治疗药物的发展情况，以期为抗类风湿关节炎新药研发提供思路和参考。

关键词：类风湿关节炎；过氧化物酶体增殖活化因子受体γ；炎症控制；免疫调节；骨稳定
中图分类号：R593.22　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1311-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.031

Research progress in the role of peroxisome proliferator-activated receptor-γ and its agonists in rheumatoid arthritis

CHEN Na, ZANG Lei, LIU Fang* (*Department of Pharmacy*, *First Affiliated Hospital of Army Medical University of Chinese People's Liberation Army*, *Chongqing* 400038)

Abstract: Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease characterized by polyarticular synovitis, whose pathogenesis has not been fully elucidated. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) is a member of the ligand-activated nuclear transcription factor superfamily, which plays an important role in immune regulation, inflammation control and bone stability. It is important to determine the role of PPARγ in rheumatoid arthritis. This article reviewed the role of PPARγ in rheumatoid arthritis, and the development of therapeutic drugs based on the target of PPARγ, so as to provide reference for the development of new drugs for rheumatoid arthritis.

Key words: rheumatoid arthritis; peroxisome proliferator-activated receptor-γ; inflammation control; immune regulation; bone stability

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以多关节滑膜炎、骨及软骨破坏为主要特征的自身免疫性疾病，致残率高、危害性大[1]。目前RA的全球发病率在0.5%～1.0%，且呈现逐年上升的趋势[2]。该病是致残和导致劳动力丧失的主要疾病之一，严重影响患者生活质量，增加家庭和社会负担[3-4]。RA的发病机制尚不完全清楚，可能涉及基因易感性、环境和免疫等因素，其中免疫失衡被证实是RA疾病进展过程中的核心环节，可通过相应的细胞因子影响RA的炎症，导致血管翳增生、骨侵蚀和软骨破坏[5]。过氧化物酶体增殖活化因子受体γ（peroxisome proliferator-activated receptor-γ，PPARγ）是一类配体激活的核转录因子超家族成员，越来越多的研究报道显示，PPARγ在免疫调节、炎症控制和骨稳定中发挥重要功能，参与RA的发生、发展，可能成为RA治疗的新靶点，本文将对PPARγ及其激动剂在RA发病和治疗中的作用进行综述。

1　PPARγ与RA

PPAR属于核激素受体家族，是由配体激活的转录因子。PPAR与维甲酸X受体（retinoid X receptor，RXR）结合形成异源二聚体。当PPAR

基金项目：重庆市自然科学基金项目（No.CSTB2022NSCQ-MSX0202）；重庆市科卫联合中医药项目（2019ZY023488）。
作者简介：陈娜，女，主要从事抗炎中药活性成分筛选与作用机制研究，email：270780661@qq.com　*通信作者：刘芳，女，博士，主要从事抗炎中药活性成分筛选与作用机制研究，email：liufang0209@163.com

被配体激活后，该复合体通过与特定的过氧化物酶体增殖物应答元件（PPAR response element，PPRE）结合，进而发挥调控基因表达的作用[6]。PPAR 目前主要有 3 种亚型，即 PPARα、PPARδ 和 PPARγ。PPARα 主要分布在肝脏、肾脏和内皮细胞；PPARδ 的表达较为广泛，但主要在消化道、心脏和骨骼肌中表达较高；而 PPARγ 则主要在脂肪细胞和免疫细胞中表达[7]。其中，关于 PPARγ 的研究最为广泛。PPARγ 配体包括天然配体和人工合成配体，天然配体主要有花生四烯酸、必需氨基酸等，其中 15- 脱氧 -Δ12，14- 前列腺素 J2（15d-PGJ2）是第一个已确定的 PPARγ 天然配体。而人工合成配体有噻唑烷二酮类药物，如罗格列酮和吡格列酮等，目前主要用于糖尿病的治疗。

现有研究表明，RA 患者具有胰岛素抵抗升高现象[8]，因此患糖尿病风险增高[9]。PPARγ 不仅是糖尿病的治疗靶点，也可通过调节 T 细胞分化、巨噬细胞极化、滑膜细胞增殖、成骨细胞和破骨细胞分化等，发挥免疫调节、炎症控制和骨稳定作用[10]，有望在 RA 的发病机制研究和治疗等方面开拓新领域，下面笔者将分别从 PPARγ 在免疫调节、炎症控制和骨稳定中的作用进行阐述。

2 PPARγ 与免疫调节

2.1 PPARγ 与 T 细胞分化

RA 属于自身免疫性疾病，T 细胞（多数为 $CD4^+$ T 细胞）是 RA 疾病过程的早期、中期和晚期阶段所需的重要致病驱动因素，是 RA 滑膜组织中的主要效应细胞，通过浸入滑膜组织而发挥其病理生理作用[11]。根据细胞因子环境的不同，$CD4^+$ T 细胞可能分化成 T 细胞的几种谱系，包括 Th1、Th2、Th17 和 Treg，其中 Th17 代表促炎亚群，Treg 代表抗炎亚群，Th17/Treg 失衡在 RA 的发病机制中发挥重要作用[12-13]。有学者研究发现，应用新型噻唑烷二酮能显著上调 RA 患者外周血单核细胞中 PPARγ 的 mRNA 表达，进而抑制 IL-17A、IL-22 和 IFN-γ 表达[14]。另有报道，天然化合物槲皮素可通过激活 PPARγ，抑制 Th17 细胞分化，发挥抗关节炎作用[15]；激活的 PPARγ 还可通过抑制 TGF-β/IL-6 等炎症因子诱导的 RORγt 的表达特异性抑制 Th17 细胞分化[16]。另外，PPARγ 缺乏可导致 Th17 细胞活化增多[16]，$CD4^+Foxp3^+$ T 细胞数量减少以及 $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ 细胞数量增加，表明 PPARγ 在调节 Treg 细胞存活和 T 效应细胞功能方面发挥了一定的作用[17]。

2.2 PPARγ 与 B 细胞

RA 患者的 B 细胞功能和数目异常。在 RA 发病过程中，B 细胞可通过提供细胞因子、抗体和其他介质，促进 T 细胞、单核细胞和破骨细胞等的活化、增殖和分化，参与关节炎的疾病发展进程[18]。PPARγ 可通过调节 B 细胞间接调控 T 细胞分化。据报道，PPARγ 缺乏使幼稚 Breg 细胞数量减少，而 Breg 细胞可以产生 IL-10 发挥免疫负向调控作用，抑制 Th1 和 Th17 的分化与增殖，缓解关节炎症[19-20]。

2.3 PPARγ 与树突状细胞（dendritic cell，DC）

DC 是抗原提呈功能最强的抗原呈递细胞，直接参与免疫应答过程，从而参与 RA 的发病过程。在 RA 患者的关节腔和关节滑膜组织中，DCs 的数量明显增加，通过促进幼稚 T 细胞向效应 T 细胞的分化，激活 $CD8^+$ T 细胞，促进 B 细胞的抗体反应，从而参与 RA 免疫反应[21]。另有研究报道，PPARγ 激动剂罗格列酮介导 DC 细胞诱导抗原特异性 Treg 细胞产生，从而改善胶原诱导的关节炎[22]。

由此可见，PPARγ 及其激动剂主要通过直接作用于 $CD4^+$ T 细胞，或间接通过 B 细胞和 DC 细胞等免疫细胞，抑制 $CD4^+$ T 细胞向 Th17 细胞分化，促进其向 Treg 细胞分化，调控 Th17/Treg 失衡，调节免疫，发挥抗关节炎作用[17，23]。

3 PPARγ 与炎症控制

关节滑膜炎症反应是 RA 的临床表现特征。巨噬细胞和滑膜细胞在其发生发展过程中起着关键作用，而 PPARγ 在此两种细胞中均有表达，发挥重要作用。

3.1 PPARγ 与巨噬细胞

巨噬细胞作为机体的主要炎症效应细胞，其浸润激活与 RA 的发生发展密切相关[2]。一般按照功能及表型可将其划分为促炎型（M1 型）和抗炎型（M2 型）两大类。在炎症早期，M1 型巨噬细胞，产生大量肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素 -6（interleukin-6，IL-6）、一氧化氮等促炎因子，旨在帮助机体清除病原菌和外来异物等；而后期 M2 型巨噬细胞转为主导地位，能够吞噬凋亡和碎片的中性粒细胞，并分泌大量抗炎因子和转化生长因子 -β（transforming growth factor-β，TGF-β），参与调控机体炎症消退[24]。

PPARγ 基因缺失的巨噬细胞在长期脂多糖（LPS）刺激下可诱导促炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12 的产生增加，并且与 PPARγ 野生

型细胞相比，抗炎因子 IL-10 的产生减少。此外，PPARγ 缺陷的巨噬细胞显示出吞噬作用受损 [25]。与野生型巨噬细胞相比，PPARγ 条件敲除小鼠骨髓来源的巨噬细胞中，M2 型巨噬细胞的标志物精氨酸酶 1（arginase 1，Arg1）活性显著降低，提示 PPARγ 调控巨噬细胞向 M2 型极化。IL-4 刺激巨噬细胞时，PPARγ 促进 Arg1 转录，促进巨噬细胞向 M2 型极化 [26]。我国学者通过 RAW264.7 细胞模型和 SD 大鼠构建的胶原诱导关节炎（collagen-induced arthritis，CIA）模型，明确给予传统方剂乌头汤可在体内 [1.89 g/（kg • d）和 3.78 g/（kg • d）] 和体外（100 μg • mL^{-1} 和 300 μg • mL^{-1}）通过促进 PPARγ 核移位，抑制巨噬细胞 M1 型极化，促进其 M2 型极化，降低促炎因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的表达，同时增加抗炎因子的表达，改善 CIA 炎症 [27]。另一研究结果类似，灌胃给予传统中药配方清络饮，可通过激活 PPARγ，改变单核细胞和巨噬细胞极化，降低佐剂的诱导关节炎（adjuvant-induced arthritis，AIA）大鼠的炎症 [28]。

3.2 PPARγ 与滑膜细胞

RA 炎症细胞浸润到关节滑膜，出现骨和软骨损伤，最终可能导致关节畸形和功能丧失 [27]。RA 患者滑膜中存在滑膜成纤维细胞（synovial fibroblasts，FLS）在骨和软骨血管膜中的异常迁移、增殖和激活。有研究显示，骨关节炎患者和健康人群相比，PPARγ 在 RA 患者中的表达显著降低，在 AIA 大鼠滑膜中同样显著降低 [29]。随后，该团队继续探讨 PPARγ 在 RA 中的作用和机制，以 TNF-α 刺激 FLS 来模拟关节滑膜细胞的炎症微环境，并使用了大鼠 AIA 模型及 PPARγ$^{+/-}$ 小鼠 CIA 模型研究 PPARγ 在 RA 中的关键作用和潜在机制，结果提示 PPARγ 通过与 p53 结合来缓解 TNF-α 诱导的 FLS 在 RA 中的炎症反应，降低炎症因子 IL-1β、IL-6 等的表达，发挥至关重要的作用 [30]。另有学者研究发现富含半胱氨酸的血管生成诱导剂 61（cysteine-rich angiogenic inducer 61，Cyr61）与慢性炎症相关的疾病有关。而 PPARγ 激动剂可通过下调 Cyr61，降低 TNF-α 诱导的 NF-κB 活化，抑制 RA-FLS 的迁移和侵袭 [31]。传统中药虎杖和藤莓汤也可通过上调 CIA 大鼠关节滑膜组织中 PPARγ mRNA 水平降低炎症因子表达，改善关节炎症 [32-33]。此外，PPARγ 激活还可通过抑制 RA 滑膜细胞中炎症细胞因子的表达并诱导滑膜细胞本身凋亡发挥抗关节炎活性 [34]。

由上可见，PPARγ 及其激动剂，通过调节巨噬细胞极化，抑制 M1 型极化，诱导 M2 型极化，抑制炎症细胞因子的表达，并进一步诱导滑膜细胞凋亡，抑制其迁移和侵袭，控制关节炎症。

4 PPARγ 与骨稳定

RA 以关节炎症、骨与软骨的破坏为临床表现特征。RA 的自身免疫反应导致破骨细胞骨吸收增加和成骨细胞骨形成受损，这种失衡是 RA 骨质流失的基础，包括骨侵蚀、关节周围骨流失 [35]。PPARγ的天然激动剂 15d-PGJ2 和合成激动剂噻唑烷二酮类化合物 Ciglitazone，可通过降低 NF-κB 受体激活剂配体诱导的单核细胞趋化蛋白 -1 生成，减少破骨细胞分化，从而抑制 RA 骨侵蚀 [36]。此外，15d-PGJ2 还可通过促进骨髓脂肪生成，抑制成骨细胞增生，抑制骨代谢 [37]。

以上研究提示，PPARγ 通过双向调控成骨细胞和破骨细胞分化，维系 RA 骨稳定。

5 PPARγ 激动剂应用于 RA 治疗的临床疗效与安全性评估

现临床批准的 PPARγ 激动剂主要为噻唑烷二酮类药物，如罗格列酮和吡格列酮。既往 PPARγ 激动剂主要用于代谢性疾病如糖尿病的治疗，但目前也有部分研究将 PPARγ 激动剂吡格列酮用于 RA 临床治疗。一项随机、双盲安慰剂对照交叉试验的临床研究（NCT00554853）评估了在标准治疗中加入 PPARγ 激动剂吡格列酮对 RA 患者活动度的评价。研究共纳入 143 名非糖尿病成年 RA 患者，每日予 45 mg 吡格列酮或者安慰剂，持续时间为 3 个月，并有 2 个月的洗脱期，随后交叉到另一组继续治疗 3 个月。以 DAS-28 评分、C 反应蛋白（CRP）为指标评估 RA 治疗的有效性，以炎症、胰岛素抵抗等指标评估血管损伤动脉粥样硬化风险。结果显示，与安慰剂治疗相比，在标准治疗中加入 PPARγ 激动剂吡格列酮显著降低了 RA 患者 DAS-28 评分（$P = 0.02$）和 CRP 水平（$P = 0.001$），同时改善了血脂水平 [38]。另一项单中心、随机、双盲、安慰剂对照的交叉研究，将接受稳定治疗的 RA 患者随机分为 PPARγ 激动剂组（吡格列酮，45 mg • d^{-1}，$n = 17$）和安慰剂组（$n = 17$），进行为期 8 周的治疗，随后是为期 4 周的洗脱期和 8 周的交叉治疗。使用混合效应模型和意向性（ITT）分析，以 DAS-28 评分、胰岛素抵抗等指标评估 PPARγ 对 RA 的治疗效果。结果显示与安慰剂相比，吡格列酮可显著改善 RA 患者胰岛素抵抗（$P = 0.025$），并适度降低 DAS28-CRP（$P = 0.046$）[39]。另有一项临床研

究评估吡格列酮与甲氨蝶呤共同服用对 RA 患者 DAS-28 评分和 CRP 的影响，结果与安慰剂相比，吡格列酮治疗组的 DAS-28 评分（$P = 0.001$）和 CRP（$P < 0.0001$）有显著改善，提示吡格列酮和甲氨蝶呤的联合使用可能是 RA 患者的新治疗策略 [40]。此外，有研究使用孟德尔随机化方法评估糖尿病药物靶基因的遗传变异与 RA 之间的关联，旨在探索抗糖尿病药物在 RA 预防中的再利用潜力。研究结果提示噻唑烷二酮类靶标的遗传变异（基因：*PPARG*）与 RA 风险成负相关，提示使用 PPARγ 激动剂可降低 RA 疾病风险 [41]。但仍缺乏严格设计的大样本量临床研究来验证。

安全性问题是 PPARγ 激动剂新药研发过程中需要考虑的一个重要问题。既往有报道使用 PPARγ 激动剂如罗格列酮治疗可诱发心血管风险 [42]，随后大规模临床试验（RECORD）显示，罗格列酮的使用虽然可能会增加心力衰竭和骨折风险，但并不会增加总体心血管发病率或死亡率的风险 [43]。另一项评估 PPARγ 激动剂吡格列酮用于糖尿病长期治疗的心血管安全性的临床随机双盲试验（TOSCA.IT，NCT00700856），研究结果也提示，在二甲双胍基础上联用吡格列酮或磺胺类降糖药，在心力衰竭、膀胱癌、骨折等安全性事件发生率方面，两组差异均无统计学意义 [44]，这为吡格列酮的临床安全使用增强了信心。Marder[38] 也评估了吡格列酮使用的安全性，结果显示，除水肿这一不良反应在吡格列酮组显著高于安慰剂组外，在其他方面如心血管相关不良反应、神经系统相关不良反应等差异无统计学意义，提示吡格列酮在 RA 治疗中耐受性良好 [38]。但目前也仅有吡格列酮用于 RA 治疗的相关临床研究报道，其他 PPARγ 激动剂是否可安全使用，还有待进一步评估。

6 总结与展望

RA 是一种自身免疫性疾病，发病机制复杂，疾病进展环节涉及免疫细胞 - 巨噬细胞 - 成纤维细胞和成骨破骨细胞间的相互作用。自身免疫紊乱是 RA 发病机制的第一步，随后免疫细胞，如活化的 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞，产生促炎因子并刺激 FLS 极化为促炎滑膜成纤维细胞，表达 NF-κB 配体（RANKL）的受体激活剂并诱导破骨细胞促进骨破坏。而 PPARγ 在免疫细胞、巨噬细胞、成纤维细胞以及成骨细胞和破骨细胞内均表达，PPARγ 激动剂通过作用于各个环节，发挥调节免疫、炎症控制和维持骨稳定的作用，其作用机制如图 1 所示。

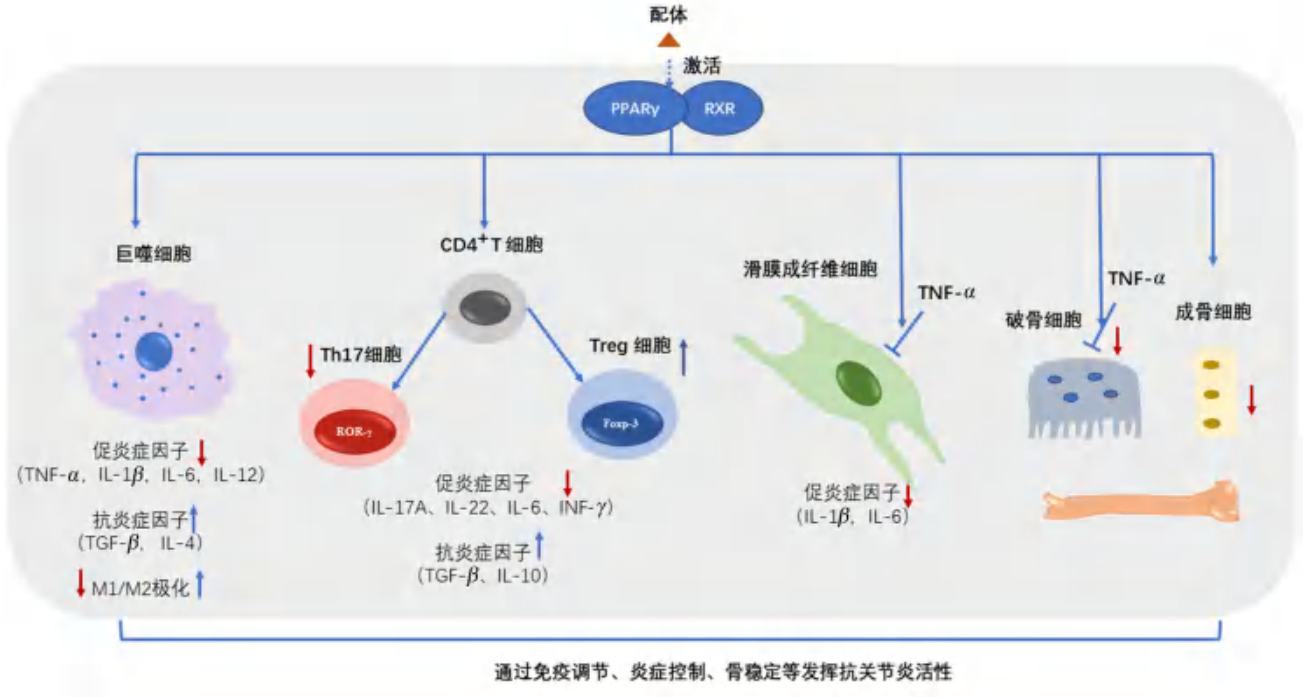

图 1 激活 PPARγ 信号通路发挥抗关节炎活性的作用机制图

Fig 1 Mechanism of activation of PPARγ signaling pathway to exert anti-arthritic activity

综上，PPARγ 激动剂可降低 RA 发病风险，在 RA 传统治疗药物基础上联用 PPARγ 激动剂不仅可以进一步缓解 RA 活动度，还可降低 RA 患者胰岛素抵抗，降低糖尿病患病风险，两者有协

同增效作用。因此，PPARγ可能成为RA治疗的潜在新靶点。

参考文献

[1] Aletaha D，Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis：a review [J]. JAMA，2018，320（13）：1360-1372.

[2] Chen N，Fong DYT，Wong JYH. Secular trends in musculoskeletal rehabilitation needs in 191 countries and territories from 1990 to 2019 [J]. JAMA Netw Open，2022，5（1）：e2144198.

[3] Kiadaliri AA，Kristensen LE，Englund M. Burden of rheumatoid arthritis in the Nordic region，1990—2015：a comparative analysis using the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. Scand J Rheumatol，2018，47（2）：1-101.

[4] Fazal SA，Khan M，Nishi SE，et al. A clinical update and global economic burden of rheumatoid arthritis [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets，2018，18（2）：98-109.

[5] Scherer HU，Haupl T，Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis [J]. J Autoimmun，2020，110：102400.

[6] Takada I，Makishima M. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and antagonists：a patent review（2014-present）[J]. Expert Opin Ther Pat，2020，30（1）：1-13.

[7] Montaigne D，Butruille L，Staels B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions [J]. Nat Rev Cardiol，2021，18（12）：809-823.

[8] Quevedo-Abeledo JC，Sanchez-Perez H，Tejera-Segura B，et al. Higher prevalence and degree of insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis than in patients with systemic lupus erythematosus [J]. J Rheumatol，2021，48（3）：339-347.

[9] Tian Z，McLaughlin J，Verma A，et al. The relationship between rheumatoid arthritis and diabetes mellitus：a systematic review and meta-analysis [J]. Cardiovasc Endocrinol Metab，2021，10（2）：125-131.

[10] Liu Y，Wang JY，Luo SY，et al. The roles of PPARγ and its agonists in autoimmune diseases：a comprehensive review [J]. J Autoimmun，2020，113：102510.

[11] Weyand CM，Goronzy JJ. Immunometabolism in early and late stages of rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol，2017，13（5）：291-301.

[12] Luckheeram RV，Zhou R，Verma AD，et al. CD4 ＋ T cells：differentiation and functions [J]. Clin Dev Immunol，2012，2012：925135.

[13] Noack M，Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases [J]. Autoimmun Rev，2014，13（6）：668-677.

[14] da Rocha Junior LF，Rego MJ，Cavalcanti MB，et al. Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN-gamma，IL-6，IL-17A，and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients [J]. Biomed Res Int，2013，2013：926060.

[15] Yang Y，Shi GN，Wu X，et al. Quercetin impedes Th17 cell differentiation to mitigate arthritis involving PPARgamma-driven transactivation of SOCS3 and redistribution corepressor SMRT from PPARgamma to STAT3 [J]. Mol Nutr Food Res，2022，66（12）：e2100826.

[16] Sanderford V，Barna BP，Barrington RA，et al. PPARgamma deficiency in carbon nanotube-elicited granulomatous inflammation promotes a Th17 response to a microbial antigen [J]. J Nanomed Nanotechnol，2020，11（1）：541.

[17] Choi JM，Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases [J]. Mol Cells，2012，33（3）：217-222.

[18] Wu FP，Gao JF，Kang J，et al. B cells in rheumatoid arthritis：pathogenic mechanisms and treatment prospects [J]. Front Immunol，2021，12：750753.

[19] Su JB，Wang K，Zhou X，et al. B-cell-specific-peroxisome proliferator-activated receptor gamma deficiency augments contact hypersensitivity with impaired regulatory B cells [J]. Immunology，2019，156（3）：282-296.

[20] Ramon S，Bancos S，Thatcher TH，et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma B cell-specific-deficient mice have an impaired antibody response [J]. J Immunol，2012，189（10）：4740-4747.

[21] Wehr P，Purvis H，Law SC，et al. Dendritic cells，T cells and their interaction in rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Immunol，2019，196（1）：12-27.

[22] Byun SH，Lee JH，Jung NC，et al. Rosiglitazone-mediated dendritic cells ameliorate collagen-induced arthritis in mice [J]. Biochem Pharmacol，2016，115：85-93.

[23] Park HJ，Kim DH，Choi JY，et al. PPARgamma negatively regulates T cell activation to prevent follicular helper T cells and germinal center formation [J]. PLoS One，2014，9（6）：e99127.

[24] Parisi L，Gini E，Baci D，et al. Macrophage polarization in chronic inflammatory diseases：killers or builders? [J]. J Immunol Res，2018，2018：8917804.

[25] Heming M，Gran S，Jauch SL，et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates the response of macrophages to lipopolysaccharide and glucocorticoids [J]. Front Immunol，2018，9：893.

[26] Zhang YX，Chen Y，Sun HX，et al. SENP3-mediated PPARγ 2 DeSUMOylation in BM-MSCs potentiates glucocorticoid-induced osteoporosis by promoting adipogenesis and weakening osteogenesis [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：693079.

[27] Lin WJ，Shen P，Huang Y，et al. Wutou decoction attenuates the synovial inflammation of collagen-induced arthritis rats via regulating macrophage M1/M2 type polarization [J]. J Ethnopharmacol，2023，301：115802.

[28] Wang R，Li DF，Hu YF，et al. Qing-Luo-Yin alleviated monocytes/macrophages-mediated inflammation in rats with adjuvant-induced arthritis by disrupting their interaction with（Pre）-adipocytes through PPAR-γ signaling [J]. Drug Des Devel Ther，2021，15：3105-3118.

[29] Li XF，Sun YY，Bao J，et al. Functional role of PPAR-gamma on the proliferation and migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. Sci Rep，2017，7（1）：12671.

[30] Li XF，Yin SQ，Li H，et al. PPAR-γ alleviates the inflammatory response in TNF-α-induced fibroblast-like synoviocytes by binding to p53 in rheumatoid arthritis [J]. Acta Pharmacol Sin，2023，44（2）：454-464.

[31] Kwon EJ，Park EJ，Choi S，et al. PPARγ agonist rosiglitazone inhibits migration and invasion by down-regulating Cyr61 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Int J Rheum Dis，2017，20（10）：1499-1509.

[32] 杨蕾，张正菊，相瑞阳，等 . 虎杖对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 PPARγ/ NF-κB 信号途径的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2019，39（5）：591-596.

[33] 王洁，王亚南，陆妍，等 . 藤莓汤对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 PPARγ/NF-κB 信号途径的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2017，37（4）：458-463.

[34] Ji JD，Cheon H，Jun JB，et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma（PPAR-gamma）on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes [J]. J Autoimmun，2001，17（3）：215-221.

[35] Komatsu N，Takayanagi H. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis-immune cell-fibroblast-bone interactions [J]. Nat Rev Rheumatol，2022，18（7）：415-429.

[36] Hounoki H，Sugiyama E，Mohamed SG，et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression [J]. Bone，2008，42（4）：765-774.

[37] Xiong ZC，Luo P，Zhou J，et al. 15-Deoxy-Δ12，14-prostaglandin J2 as a potential regulator of bone metabolism via PPARgamma-dependent and independent pathways：a review [J]. Drug Des Devel Ther，2019，13：1879-1888.

[38] Marder W，Khalatbari S，Myles JD，et al. The peroxisome proliferator activated receptor-γ pioglitazone improves vascular function and decreases disease activity in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Am Heart Assoc，2013，2（6）：e000441.

[39] Ormseth MJ，Oeser AM，Cunningham A，et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist effect on rheumatoid arthritis：a randomized controlled trial [J]. Arthritis Res Ther，2013，15（5）：R110.

[40] Shahin D，Toraby EE，Abdel-Malek H，et al. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist（pioglitazone）and methotrexate on disease activity in rheumatoid arthritis（experimental and clinical study）[J]. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord，2011，4：1-10.

[41] Qin C，Diaz-Gallo LM，Tang B，et al. Repurposing antidiabetic drugs for rheumatoid arthritis：results from a two-sample Mendelian randomization study [J]. Eur J Epidemiol，2023，38（7）：809-819.

[42] Nissen SE，Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes [J]. N Engl J Med，2007，356（24）：2457-2471.

[43] Home PD，Pocock SJ，Beck-Nielsen H，et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes（RECORD）：a multicentre，randomised，open-label trial [J]. Lancet，2009，373（9681）：2125-2135.

[44] Vaccaro O，Masulli M，Nicolucci A，et al. Effects on the incidence of cardiovascular events of the addition of pioglitazone versus sulfonylureas in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin（TOSCA. IT）：a randomised，multicentre trial [J]. Lancet Diabetes Endocrinol，2017，5（11）：887-897.

（收稿日期：2023-09-10；修回日期：2023-11-05）

药物分析与检验

基于指纹图谱及多成分测定评价运脾消食颗粒制备工艺对其整体质量的影响

林欣荣[1, 2]，高紫薇[1, 2]，赵霞[1, 2*]，吴磊[1*]（1. 南京中医药大学附属医院，南京　210029；2. 南京中医药大学，南京　210029）

摘要：目的　建立运脾消食方的 HPLC 指纹图谱并进行多成分含量测定，考察提取、浓缩、离心、制粒不同工艺阶段对运脾消食颗粒的影响。**方法**　以运脾消食颗粒的提取液、浓缩液、离心液、颗粒为供试品，采用高效液相色谱法建立不同工艺阶段的指纹图谱，同时进行相似度分析与色谱峰指认，测定方中绿原酸、阿魏酸、花旗松素、异牡荆素、芸香柚皮苷、橙皮苷、木犀草素、川陈皮素的含量。**结果**　10 批运脾消食颗粒制备过程中不同工艺阶段与对照图谱相比，相似度均大于 0.990，表明制剂工艺稳定可行，提取液中标定了 19 个共有峰，浓缩、离心后共有峰增至 21 个，颗粒中共有峰为 20 个；含量测定结果显示运脾消食颗粒制备过程中不同工艺阶段对其整体质量有不同程度的影响。**结论**　浓缩期间稳定性较差的成分绿原酸损失较多，橙皮苷分子量相对较大在离心后转移率偏低，制粒后异牡荆素转移率略大于 1。基于不同工艺阶段对运脾消食颗粒质量的影响进行探讨分析，可为中药制剂制备过程中整体质量评价的共性技术提供参考。

关键词：运脾消食方；工艺阶段；制粒；指纹图谱；含量测定
中图分类号：R284.1，O657.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1317-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.032

Influence of different process stages on the overall quality of Yunpi Xiaoshi granules based on HPLC fingerprint and multi-component content determination

LIN Xin-rong[1, 2], GAO Zi-wei[1, 2], ZHAO Xia[1, 2*], WU Lei[1*] (1. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210029; 2. *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210029)

Abstract: Objective　To establish an HPLC fingerprint of Yunpi Xiaoshi prescription and determine the content of multi-components, to determine the effect of extraction, concentration, centrifugation and granulation process on Yunpi Xiaoshi granules. **Methods**　The extract, concentrate, centrifuge and granule of Yunpi Xiaoshi granules were taken as the test products, the fingerprints of different process stages were established by HPLC, the similarity was analyzed and chromatographic peaks were identified at the same time to determine the content of chlorogenic acid, ferulic acid, taxifolin, isovitexin, narirutin, hesperidin, luteolin and nobiletin. **Results**　Compared with the control chromatogram, the similarity of different process stages in 10 batches of Yunpi Xiaoshi granules was greater than 0.990, indicating that the preparation process was stable. Totally 19 common peaks were identified in the extract, which increased to 21 after the concentration and centrifugation, and a total of 20 common

基金项目：江苏省中医药管理局面上项目（No.YB2020014）；江苏省中医院高峰人才项目（No.Y2021rc21）；江苏省中药骨干人才高级研修项目（苏中医科教 [2022]11 号）。
作者简介：林欣荣，女，硕士，主要从事中药及中药制剂开发研究，email：linxinrong2021@126.com　*通信作者：吴磊，男，博士，副主任中药师，主要从事中药及中药制剂开发研究，email：fsyy00682@njucm.edu.cn；赵霞，女，博士，教授，主要从事中医药防治小儿肺脾系疾病、儿童体质、中医药标准化研究，email：zhaoxiahy@126.com

peaks were found in the granules. The content determination showed that different process stages in the preparation of Yunpi Xiaoshi granules had different influence on the overall quality. **Conclusion** During the concentration period, more loss of chlorogenic acid is found in components with poor stability. With molecular weight relatively large transfer rate of hesperidin after the centrifugation is reduced, and the transfer rate of isovitexin after the granulation is slightly greater than 1. This paper provides reference for the overall quality evaluation in the preparation of traditional Chinese preparations.

Key words: Yunpi Xiaoshi prescription; process stage; granulation; fingerprint; content determination

中药产品质量一致性评价是当前中药制剂控制的热点和难点，已成为制约其国际化的瓶颈之一[1]。中药制药过程包括提取、浓缩、纯化、制粒等多个工艺步骤，批次间除了原料药材性质的差异，生产过程的波动，如缺乏科学严格的工艺操作参数及系统的量化指标，也会导致产品质量的波动[2-3]。随着现代分析仪器的不断发展，中药制剂的质量标准逐步向微观内在成分监测和复方制剂整体质量把控方向发展[4]。中药指纹图谱作为一种质量控制手段，能够全面、综合地反映出中药产品的质量变异，有效地进行全过程的质量控制[5-7]。

运脾消食方是根据著名中医专家江育仁教授提出的“脾健不在补贵在运”的科学观点[8-10]总结而得到的，该方由苍术、白术、焦山楂、炒麦芽、鸡内金、生薏苡仁、炒山药、陈皮、莪术等药材组成，临床上用于治疗小儿厌食脾失健运夹积证，疗效确切[11]，为方便携带服用，拟将其研制成颗粒剂。根据前期网络药理学结果及治疗厌食的相关报道，确定了绿原酸、阿魏酸、花旗松素、异牡荆素、芸香柚皮苷、橙皮苷、木犀草素、川陈皮素、白术内酯Ⅰ等 9 个指标成分[12-17]。本研究拟建立运脾消食方提取液、浓缩液、离心液、颗粒的指纹图谱，并对方中多种活性成分进行定量，以期初步研究不同工艺阶段之间化学成分的相似度及含量变化，为运脾消食颗粒制备全过程的质量控制提供参考。

1 材料

安捷伦 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；AR2140 型万分之一天平（奥豪斯仪器上海有限公司）；PL-S60T 数显超声波清洗机（东莞康士洁超声波科技有限公司）；RII- 型 BUCHI 旋转蒸发仪（瑞士 BUCHI 公司）；Thermo ST16 离心机（美国赛默飞公司）；WBF-Ⅱ多功能流化床实验机（重庆英格制药机械有限公司）。苍术、白术、焦山楂、炒麦芽、鸡内金、生薏苡仁、炒山药、陈皮、莪术等药材由江苏省中医院统一购买，由药学部黄亚威主任鉴定为正品。阿魏酸（批号 110773-201915，纯度 99.4%）、绿原酸（批号 110753-202119，纯度 96.3%）、花旗松素（批号 111816-201102，纯度 98.9%）、橙皮苷（批号 110721-202019，纯度 95.3%）、木犀草素（批号 111520-202107，纯度 96.3%）、川陈皮素（批号 112055-202102，纯度 99.7%）、白术内酯Ⅰ（批号 111975-201501，纯度 99.9%）（中国食品药品检定研究院）；异牡荆素（批号 220310，纯度≥ 98%，南京聚康医药化工有限公司）；芸香柚皮苷（批号 18101010，纯度≥ 98%，成都曼斯特生物科技有限公司）。甲醇、乙腈为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0～20 min，7%A；20～26 min，7%～12%A；26 ～ 30 min，12%A；30 ～ 36 min，12% ～ 16%A；36 ～ 42 min，16% ～ 25%A；42 ～ 48 min，25% ～ 50%A；48 ～ 58 min，50% ～ 75%A；58 ～ 63 min，75% ～ 85%A）；流速 1.0 mL·min^{-1}；检测波长 320 nm；柱温 35 ℃；进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取各对照品适量，置同一 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并制成绿原酸、阿魏酸、花旗松素、异牡荆素、芸香柚皮苷、橙皮苷、木犀草素、川陈皮素、白术内酯Ⅰ质量浓度分别为 0.453、0.89、1.014、1.03、0.978、1.062、1.02、1.011、1.05 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液

① 提取液：按一日处方量称取各单味饮片，按照煎药室管理规范确定最佳工艺，即饮片头煎加 3.5 倍量水，浸泡 1 h，文火煎煮 30 min；二煎加 2.4 倍量水，煎煮 20 min，合并煎液并定容至 250 mL，即为提取液。吸取提取液 1 mL 置于 2 mL 量瓶中，加甲醇 1 mL 稀释至刻度，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得提取液供试品溶液。

② 浓缩液：将上述提取液减压浓缩至相对密度为 1.05 ～ 1.08（60 ℃），定容至体积为 50 mL，得到浓缩液。吸取浓缩液 1 mL 置于 2 mL 量瓶中，加甲醇 1 mL 稀释至量瓶刻度，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得浓缩液供试品溶液。

③ 离心液：将上述浓缩液使用超速离心机，

4500 r • min^{-1} 离心 10 min，去除沉淀，定容至 35 mL，即为离心液。吸取离心液 1 mL 置于 2 mL 量瓶中，加甲醇 1 mL 稀释至量瓶刻度，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得离心液供试品溶液。

④ 颗粒：取上述离心液采用最优成型工艺进行流化床制粒，按干膏与糊精比 1∶1.2 加入糊精，置流化床中，设置进风温度为 70 ～ 100 ℃，当物料温度升至约 60 ℃时，开始进液，进液速度控制在 80 ～ 150 r•min^{-1}，雾化压力外 0.2 MPa，内 0.15 MPa；喷雾结束，60 ～ 70 ℃继续干燥 1 h，即得成品颗粒。用 125 mL 热水均匀溶解颗粒，吸取 1 mL，加甲醇 1 mL 稀释至量瓶刻度，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得颗粒供试品溶液。

2.3　HPLC 指纹图谱的建立

2.3.1　精密度试验　取同一批提取液供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，以芸香柚皮苷（14 号峰）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 1.2%，相对峰面积 *RSD* 均小于 2.9%，表明仪器精密度良好。

2.3.2　稳定性试验　取同一批提取液供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，以芸香柚皮苷（14 号峰）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.20%，相对峰面积 *RSD* 均小于 3.0%，表明溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3　重复性试验　取同一份提取液样品，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，以芸香柚皮苷（14 号峰）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.60%，相对峰面积 *RSD* 均小于 3.0%，表明该方法重复性良好。

2.3.4　参照峰选择　在供试品溶液色谱峰中，因芸香柚皮苷（14 号峰）峰面积较大，峰形稳定，保留时间适中，分离度较好，且在所有样品中均存在，故选择其作为参照峰。

2.3.5　提取液的指纹图谱　取适量混合对照品溶液及提取液（S1 ～ S10）供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1 ～ 2。由图 2 可知，提取液指纹图谱中有 19 个共有峰，与对照品比对后指认出 7 号峰为绿原酸，11 号峰为阿魏酸，12 号峰为花旗松素，13 号峰为异牡荆素，14 号峰为芸香柚皮苷，15 号峰为橙皮苷，17 号峰为木犀草素，18 号峰为川陈皮素，21 号峰为白术内酯Ⅰ。将相关指纹图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版）进行相似度分析，以对照图谱（SR）为参照，测得相似度分别为 0.997、0.998、0.997、0.997、0.995、0.997、0.998、0.997、0.997、0.998，均在 0.995 以上，说明各批提取液具有良好的均一稳定性。

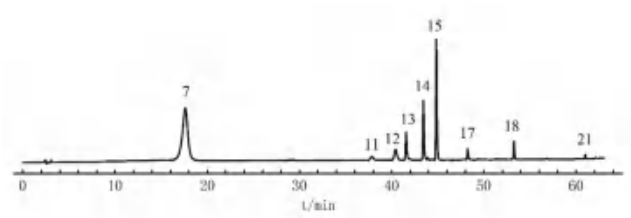

图 1　混合对照品的 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of mixed control solution

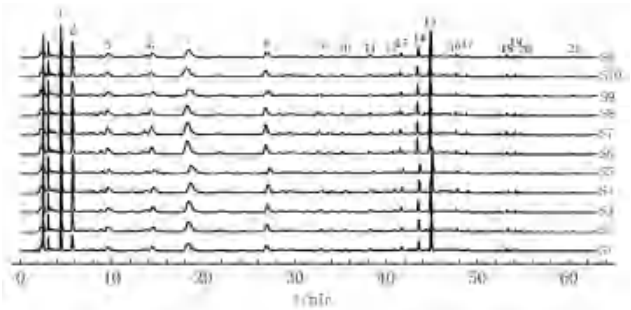

图 2　10 批运脾消食方提取液的 HPLC 图

Fig 2　HPLC fingerprint of 10 batches of Yunpi Xiaoshi prescription extract

7. 绿原酸（chlorogenic acid）；11. 阿魏酸（ferulic acid）；12. 花旗松素（taxifolin）；13. 异牡荆素（isovitexin）；14. 芸香柚皮苷（narirutin）；15. 橙皮苷（hesperidin）；17. 木犀草素（luteolin）；18. 川陈皮素（nobiletin）；21. 白术内酯Ⅰ（atractylenolide Ⅰ）

2.3.6　浓缩液、离心液与颗粒的指纹图谱　取浓缩液（N1 ～ N10）供试品溶液、离心液（L1 ～ L10）供试品溶液、颗粒（Z1 ～ Z10）供试品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 3。由图 3 可知，浓缩液、离心液指纹图谱中各有 21 个共有峰，与对照品比对后也指认出“2.3.5”项下 9 个色谱峰，而颗粒指纹图谱中有 20 个共有峰并指认出 8 个色谱峰，没有 21 号峰白术内酯Ⅰ。

将相关指纹图谱数据分别导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版）进行相似度分析，以对照图谱（NR、LR、ZR）为参照，测得浓缩液（中间体 1）相似度分别为 0.992、0.994、0.991、0.994、0.994、0.994、0.996、0.992、0.996、0.994，离心液（中间体 2）相似度分别为 0.996、0.997、0.996、0.998、0.993、0.998、0.998、0.995、0.995、0.993，颗粒相似度分别为 0.994、0.999、0.995、0.999、0.998、0.998、0.998、0.998、0.998、0.998，均在 0.990 以上，表明制剂工艺稳定可行。

2.3.7　不同工艺阶段中运脾消食方指纹图谱相似度分析　分别导入提取液（S1 ～ S6）、浓缩液（N1 ～ N6）、离心液（L1 ～ L6）及颗粒（Z1 ～ Z6）指纹图谱，评价四者相似度。结果见图 4。由结果可知，4 个阶段指纹图谱共有峰基本一致，但两种中间体以及颗粒的 3、4 号峰并没有在水煎液中形成共有峰，可能是受制备方式或温度等因素影响成

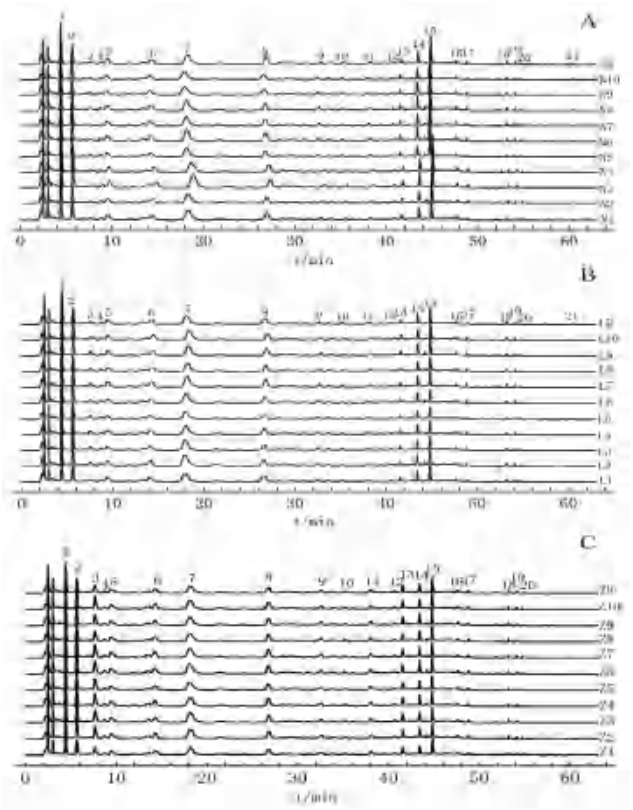

图 3　10 批运脾消食方浓缩液（A）、离心液（B）和颗粒（C）的 HPLC 图

Fig 3　HPLC fingerprint of 10 batches of Yunpi Xiaoshi prescription concentrate（A）, centrifuge（B）and granule（C）

7. 绿原酸（chlorogenic acid）；11. 阿魏酸（ferulic acid）；12. 花旗松素（taxifolin）；13. 异牡荆素（isovitexin）；14. 芸香柚皮苷（narirutin）；15. 橙皮苷（hesperidin）；17. 木犀草素（luteolin）；18. 川陈皮素（nobiletin）；21. 白术内酯Ⅰ（atractylenolide Ⅰ）

分分解转化所致，水煎液和中间体中的 21 号峰没有在颗粒中形成共有峰，可能是由于挥发性成分减少；四者相似度在 0.895 ～ 0.998，表明其相关性较好，该方法可用于工艺制备过程及颗粒质量评价。

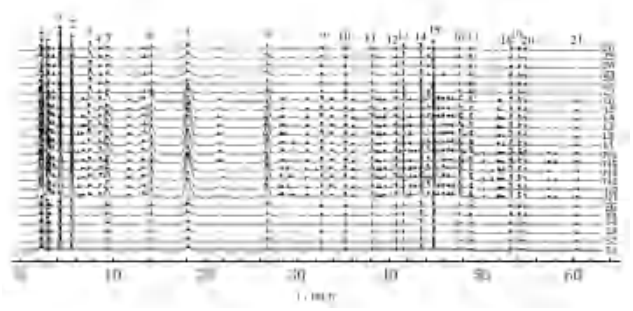

图 4　运脾消食方提取液 - 浓缩液 - 离心液 - 颗粒 HPLC 指纹图谱

Fig 4　HPLC fingerprint of Yunpi Xiaoshi prescription extract-concentrate-centrifuge-granule

2.4　提取液 - 浓缩液 - 离心液 - 颗粒中成分的含量测定

2.4.1　线性关系考察　取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，用甲醇逐级稀释，进样测定，记录各对照品在 320 nm 下峰面积，以各成分质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，得到回归方程及线性范围，结果见表 1。

表 1　回归方程、相关系数 (*r*) 及线性范围

Tab 1　Regression equation，correlation coefficient (*r*) and linear range

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
绿原酸	$Y = 13.398X - 62.328$	0.9991	7.08 ～ 453.00
阿魏酸	$Y = 33.205X - 1.8316$	0.9998	0.28 ～ 17.80
花旗松素	$Y = 5.7798X + 0.4638$	0.9997	1.58 ～ 50.70
异牡荆素	$Y = 12.557X - 3.2352$	0.9997	0.80 ～ 51.50
芸香柚皮苷	$Y = 1.9868X - 3.6947$	0.9997	9.17 ～ 586.80
橙皮苷	$Y = 1.4101X + 12.453$	0.9991	16.59 ～ 1062.00
木犀草素	$Y = 3.8121X - 2.0057$	0.9999	1.59 ～ 51.00
川陈皮素	$Y = 15.159X - 0.4746$	0.9997	0.63 ～ 20.22

2.4.2　精密度试验　精密吸取“2.2.2”项下提取液供试品溶液 10 μL，进样测定 6 次，测得绿原酸、阿魏酸、花旗松素、异牡荆素、芸香柚皮苷、橙皮苷、木犀草素、川陈皮素峰面积 *RSD* 分别为 0.27%、1.4%、2.1%、2.6%、0.48%、0.29%、0.57%、2.8%，表明仪器精密度符合要求。

2.4.3　稳定性试验　取同一份提取液供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，测得绿原酸、阿魏酸、花旗松素、异牡荆素、芸香柚皮苷、橙皮苷、木犀草素、川陈皮素峰面积 *RSD* 分别为 1.1%、0.84%、3.0%、2.7%、1.3%、1.3%、1.5%、2.9%，表明溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4　重复性试验　取同一批提取液，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份提取液供试品溶液，进样测定，测得绿原酸、阿魏酸、花旗松素、异牡荆素、芸香柚皮苷、橙皮苷、木犀草素、川陈皮素峰面积 *RSD* 分别为 1.7%、2.8%、2.7%、2.9%、1.9%、2.9%、2.7%、2.5%，表明此方法重复性良好。

2.4.5　加样回收试验　取已知含量的同一批浓缩液 6 份，每份 1 mL，分别精密加入适量混合对照品溶液，并定容至 10 mL 量瓶中，照“2.2.2”项下方法操作，进样测定，并计算回收率，结果绿原酸、阿魏酸、花旗松素、异牡荆素、芸香柚皮苷、橙皮苷、木犀草素、川陈皮素平均加样回收率分别为 102.98%、100.70%、98.77%、97.66%、98.30%、98.67%、96.59%、99.46%，*RSD* 分别为 1.7%、1.0%、1.6%、1.7%、2.6%、2.6%、1.4%、2.7%。

2.4.6　结果分析　取各供试品溶液进样测定，结果见表 2、表 3 及图 5。绿原酸在提取至浓缩传递过程中与其他成分相比损失略多（转移率低于 80%）；橙皮苷在浓缩至离心传递过程中损失较多。此外，在离心至颗粒物质传递过程中，部分黄酮类成分转移率大于 1。除了绿原酸、橙皮苷外，其他成分平均转移率均大于 80%，含量基本稳定。

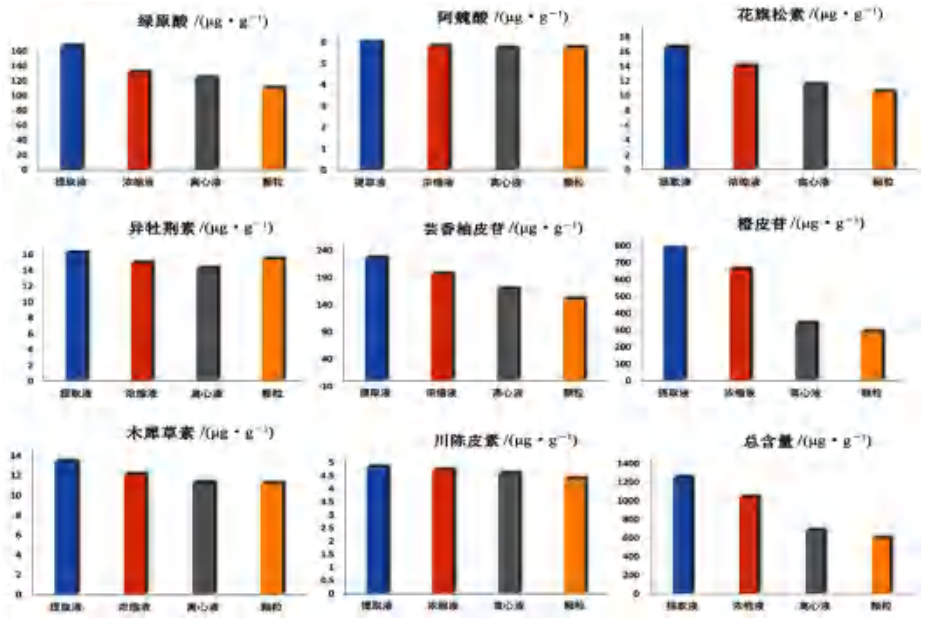

图 5　运脾消食方 8 个指标成分不同工艺阶段含量柱状图

Fig 5　Histogram of 8 index components in Yunpi Xiaoshi prescription with different process stage content

表 2　运脾消食方中各成分的含量 (μg・g^{-1})

Tab 2　Content of each component in Yunpi Xiaoshi prescription (μg・g^{-1})

编号	绿原酸	阿魏酸	花旗松素	异牡荆素	芸香柚皮苷	橙皮苷	木犀草素	川陈皮素
S1	135.449	6.475	13.733	13.656	188.123	633.412	11.956	6.281
S2	167.759	5.412	15.651	16.568	215.836	731.842	13.820	5.156
S3	182.057	6.047	16.474	15.834	216.109	806.262	14.200	4.663
S4	167.224	6.521	18.496	18.324	228.904	846.548	15.148	4.492
S5	142.369	7.317	13.118	13.910	176.329	587.188	12.303	3.837
S6	201.809	5.278	19.278	19.581	287.272	1005.684	15.875	3.805
S7	199.678	5.844	20.685	17.513	246.885	1005.256	13.204	6.420
S8	162.800	6.132	15.974	14.683	266.381	807.842	12.446	4.771
S9	141.825	5.697	16.526	14.970	219.930	712.275	13.078	4.163
S10	171.320	6.118	15.839	18.784	217.928	837.234	12.209	4.759
N1	131.899	6.053	13.674	13.592	191.526	570.853	11.920	4.957
N2	119.630	5.198	12.955	12.905	170.399	550.134	11.086	4.187
N3	170.776	6.042	15.569	17.310	223.235	811.740	16.797	6.160
N4	130.013	5.873	16.561	15.792	196.341	712.704	12.473	4.023
N5	110.161	5.451	11.454	12.935	152.861	458.471	9.474	3.734
N6	154.782	5.521	16.100	14.525	240.906	749.342	14.742	4.179
N7	124.812	5.855	14.089	15.248	169.568	669.086	11.816	6.509
N8	127.860	6.488	14.543	15.106	241.616	774.795	11.193	5.458
N9	124.113	5.630	13.021	15.654	208.421	648.358	11.310	3.792
N10	118.513	5.827	12.713	16.515	170.641	677.135	10.400	4.194
L1	121.182	4.903	11.781	12.922	171.769	375.994	10.413	4.701
L2	146.820	5.769	12.352	13.142	190.816	370.714	10.280	5.079
L3	133.392	6.039	11.589	13.722	153.328	305.829	10.675	4.015
L4	115.027	4.836	10.872	14.287	153.771	325.113	9.897	3.883
L5	97.068	5.918	8.191	13.019	124.499	264.971	7.988	2.379
L6	122.926	6.062	12.511	15.080	177.372	328.104	11.007	3.468
L7	141.748	6.452	13.346	15.190	174.989	306.700	14.730	7.612
L8	105.556	5.288	9.822	13.191	169.804	327.847	11.756	4.897
L9	125.137	5.882	12.479	15.422	201.338	368.535	13.665	5.560
L10	127.817	5.999	12.081	16.769	175.498	424.354	12.675	4.298
Z1	100.883	4.771	10.496	13.506	140.808	309.487	9.704	3.958
Z2	122.459	6.489	11.418	14.335	173.284	322.757	11.969	4.579
Z3	115.917	6.157	10.718	14.154	133.760	256.933	11.178	4.059
Z4	107.062	5.559	10.546	15.466	141.785	274.216	12.424	3.822
Z5	85.662	5.653	7.001	14.361	106.482	242.051	9.466	2.189
Z6	110.833	5.942	12.412	17.049	165.030	291.588	11.471	4.192
Z7	134.089	6.193	11.983	17.832	156.693	258.017	13.085	6.672

续表 2

编号	绿原酸	阿魏酸	花旗松素	异牡荆素	芸香柚皮苷	橙皮苷	木犀草素	川陈皮素
Z8	92.805	5.245	9.417	15.078	157.691	274.099	12.294	4.980
Z9	117.073	5.897	10.811	15.772	177.151	325.277	12.576	4.378
Z10	111.169	5.504	10.360	16.841	155.196	350.206	7.754	5.078

表 3 运脾消食方中各成分的转移率

Tab 3 Transfer rate of each component in Yunpi Xiaoshi prescription

工艺阶段	平均转移率 /%							
	绿原酸	阿魏酸	花旗松素	异牡荆素	芸香柚皮苷	橙皮苷	木犀草素	川陈皮素
提取液→浓缩液	79.20	95.87	85.54	92.25	87.28	83.71	90.15	98.40
浓缩液→离心液	95.35	99.18	82.40	95.81	87.67	52.58	95.44	98.03
离心液→颗粒	88.81	100.74	91.37	108.27	88.96	85.65	100.92	97.30

3 讨论

本研究建立了 10 批运脾消食方提取液、浓缩液、离心液、颗粒的 HPLC 指纹图谱，结果显示相似度均大于 0.990，表明制剂工艺稳定可行。共有峰数量和含量测定结果表明制备过程中不同工艺阶段对运脾消食颗粒质量存在不同程度的影响。从共有峰的数量来看，提取液确定了 19 个共有峰，浓缩液和离心液确定了 21 个共有峰，此阶段产生了新的成分，颗粒阶段确定了 20 个共有峰，可能是制粒过程中受热发生成分转化所致。含量测定方面，绿原酸在提取液 - 浓缩液传递过程中与其他成分相比损失较多，有文献报道绿原酸在碱性条件下易降解 [18]，推测为本制剂在浓缩期间长时间受热，绿原酸发生降解所致 [19]，后续在大生产中可控制 pH 来改善稳定性。橙皮苷在离心过程中平均转移率低于 60%，这可能与橙皮苷疏水性较强、分子量较大相关 [20]，后续大生产可通过对离心的转速和时间进行考察从而控制整体质量；制粒过程影响相对较小，其中异牡荆素转移率略大于 1，原因未见报道，推测是药液中大量黄酮糖苷受热后发生了分解 [21]。含量测定结果表明对制剂的质量进行评价与控制不仅要着重于提高水提液的标准，更要关注从提取到制粒的整个工艺流程。

综上，本研究建立了运脾消食颗粒不同工艺阶段的 HPLC 指纹图谱，结果显示浓缩、离心与制粒均对运脾消食颗粒有一定的影响，但整个生产工艺稳定可行，表明建立的指纹图谱结合定量分析方法可为缩小成品间差异，生产出安全、有效、稳定的运脾消食颗粒提供参考。

参考文献

[1] 赵桉熠，倪凤燕，陈彭月，等 . 以一致性为核心的中成药质量研究现状及优质评价新模式探讨 [J]. 中国中药杂志，2020，45（15）：3740-3748.

[2] 徐男，孙蓉，黄欣，等 . 基于“效 - 毒”相关的经典名方复方制剂质量及制药过程一致性评价的研究思路探讨 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（20）：2118-2125.

[3] 熊皓舒 . 中药质量及制药过程一致性评价方法研究 [D]. 杭州：浙江大学，2013.

[4] 赵冬青 . 中药复方制剂的质量控制方法探讨 [J]. 中医药管理杂志，2022，30（3）：200-202.

[5] 沈春丽，刘学华，刘启平 . 浅析指纹图谱技术在中药质量控制中的作用 [J]. 中医药导报，2005，11（5）：81-82.

[6] 李天娇，包永睿，王帅，等 . 中药质量控制与评价创新方法研究进展及应用 [J]. 中草药，2022，53（20）：6319-6327.

[7] 马双成，王莹，魏锋 . 我国中药质量控制模式十年来的实践与探索 [J]. 中国药学杂志，2023，58（1）：2-9.

[8] 江育仁 . 脾健不在补贵在运——运脾法在儿科临床的实践意义 [J]. 中医杂志，1983（1）：4-6.

[9] 张艳华，王明明 . 运脾法治疗小儿厌食的研究进展 [J]. 山西医药杂志，2016，45（9）：1037-1040.

[10] 孙心亮 . 运脾开胃法治疗小儿厌食症的临床文献与实验研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2006.

[11] 赵霞，吴磊，严花，等 . 一种具有治疗小儿厌食功效的中药组合物及其制备方法与应用: CN114949143A [P]. 2022-08-30.

[12] 蔺湘宁 . 基于运脾消积法的小儿开胃增食合剂对厌食症模型幼龄大鼠血液代谢物影响的实验研究 [D]. 兰州：甘肃中医药大学，2017.

[13] 董亚闻，郭圣璇，蔡秋晗 . 基于网络药理学和分子对接技术探讨儿脾醒颗粒治疗小儿厌食症的作用机制 [J]. 现代药物与临床，2023，38（2）：308-316.

[14] 李丹，刘斯琪，陶嘉悦，等 . 基于网络药理学和分子对接技术探讨异功散治疗小儿厌食症的作用机制 [J]. 现代药物与临床，2022，37（12）：2714-2723.

[15] 杨楠，田文霞，李玉霞 . 基于网络药理学探讨小儿开胃增食合剂治疗小儿厌食症的潜在作用机制 [J]. 实用中医内科杂志，2022，36（3）：1-6，144-146.

[16] 吕彩兰，杨楠，陈静，等 . 苍术 - 白术药对治疗小儿厌食症的机制研究 [J]. 中医药临床杂志，2022，34（1）：76-81.

[17] 明阳灿 . 基于数据挖掘及网络药理学的徐辉甫教授治疗小儿厌食症的研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2021.

[18] 陈钢，侯世祥，胡平，等 . 金银花提取物中绿原酸的稳定性研究 [J]. 中国中药杂志，2003，28（3）：34-37.

[19] 陈佳莹，张兴德，谢辉 . 柴银方水煎液、中间体、颗粒 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定 [J]. 中成药，2022，44（12）：3984-3987.

[20] 李茜，张文周，郝海军 . 橙皮苷磷脂复合物纳米混悬剂的制备、表征及口服药动学研究 [J]. 中草药，2022，53（24）：7740-7750.

[21] 韩慧 . 热处理后大豆异黄酮苷元转化分析与还原能力测定 [D]. 太原：山西医科大学，2010.

（收稿日期：2023-09-02；修回日期：2023-11-05）

藏药五味清热汤散的 HPLC 指纹图谱及 5 种成分含量测定方法的研究

姚新民[1, 3, 4]，谢和兵[1, 2, 3, 4*]，朱业锦[5]，尼玛次仁[2, 3]，白玛旦增[2, 3]（1.安徽中医药大学药学院，合肥 230013；2.西藏神猴药业有限责任公司，西藏　日喀则　857000；3.江苏神猴医药研究有限公司，江苏　南通　226133；4.海门长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；5.南京中医药大学医学院，南京　210023）

摘要：目的　建立藏药五味清热汤散的 HPLC 指纹图谱并测定指标成分没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸的含量。**方法**　采用 Ultimate XB-C18 液相色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以 0.1% 磷酸水溶液（A）- 甲醇（B）为流动相，梯度洗脱，流速 1 mL • min^{-1}，检测波长 270 nm，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。**结果**　五味清热汤散指纹图谱中标识出 18 个共有峰，指纹图谱相似度＞ 0.99；指标成分没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸和鞣花酸线性范围分别为 2.76 ～ 55.17 μg • mL^{-1}（r ＝ 0.9998）、1.56 ～ 31.13 μg•mL^{-1}（r ＝ 0.9997）、5.51 ～ 110.17 μg•mL^{-1}（r ＝ 0.9999）、7.27 ～ 145.31 μg•mL^{-1}（r ＝ 0.9998）、0.90 ～ 18.08 μg • mL^{-1}（r ＝ 0.9997）；精密度、重复性、稳定性试验的 *RSD* 均小于 2.0%（n ＝ 6）；平均加样回收率分别为 98.27%（*RSD* ＝ 0.72%）、98.31%（*RSD* ＝ 0.94%）、96.48%（*RSD* ＝ 0.73%）、96.86%（*RSD* ＝ 0.80%）、96.07%（*RSD* ＝ 0.81%）。8 批样品中没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸和鞣花酸的含量分别为 7.85 ～ 8.25、4.02 ～ 4.23、16.85 ～ 17.77、23.55 ～ 24.51、3.09 ～ 3.18 mg • g^{-1}。**结论**　建立的指纹图谱和指标成分含量测定方法具有简便、准确、稳定、快速等优点，可为五味清热汤散的质量评价提供参考。

关键词：五味清热汤散；诃子酸；鞣花酸；高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1323-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.033

HPLC fingerprint and content determination of 5 components in Tibetan medicine Wuwei Qingre decoction powder

YAO Xin-min[1, 3, 4], XIE He-bing[1, 2, 3, 4*], ZHU Ye-jin[5], Ni-ma-ci-ren[2, 3], Bai-ma-dan-zeng[2, 3] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230013; 2. *Tibet Shenhou Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Xigaze Tibet* 857000; 3. *Jiangsu Shenhou Pharmaceutical Research Co.*, *Ltd*, *Nantong Jiangsu* 226133; 4. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226133; 5. *School of Medicine*, *Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, *Nanjing* 210023)

Abstract: Objective　To establish the HPLC fingerprint of the Tibetan medicine Wuwei Qingre decoction powder and determine the content of gallic acid, methyl gallate, chebulate tannic acid, chebulate acid and ellagic acid. **Methods**　An Ultimate XB-C18 liquid chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, with 0.1% phosphoric acid aqueous solution (A) -methanol (B) as the mobile phase, gradient elution, flow rate of 1 mL • min^{-1}, detection wavelength of 270 nm, column temperature of 30 ℃ , and injection volume of 10 μL. **Results**　Totally 18 common peaks in the fingerprint of Wuwei Qingre decoction powder were confirmed, and the similarity of fingerprint was higher than 0.99, The linear ranges of gallic acid, methyl gallate, chebulate tannic acid, chebulate acid, and ellagic acid were 2.76～55.17 μg•mL^{-1} (r＝0.9998), 1.56～31.13 μg•mL^{-1} (r＝0.9997),

基金项目：西藏自治区科学技术厅 - 日喀则市人民政府区域科技协同创新专项项目（No.QYXTZX-RKZ2022-07）。
作者简介：姚新民，男，硕士，主要从事中药制剂工艺及质量标准研究，email：1532773908@qq.com　*通信作者：谢和兵，男，硕士研究生导师，主要从事高原医学研究和传统藏药的产业化开发，email：76445044@qq.com

5.51 ～ 110.17 μg • mL^{-1} (r = 0.9999), 7.27 ～ 145.31 μg • mL^{-1} (r = 0.9998), and 0.90 ～ 18.08 μg • mL^{-1} (r = 0.9997), respectively. The *RSDs* of precision, repeatability and stability tests were all less than 2.0% (n = 6). The average recoveries were 98.27% (*RSD* = 0.72%), 98.31% (*RSD* = 0.94%), 96.48% (*RSD* = 0.73%), 96.86% (*RSD* = 0.80%) and 96.07% (*RSD* = 0.81%) respectively. The content of the 5 components in 8 batches sample was 7.85 ～ 8.25, 4.02 ～ 4.23, 16.85 ～ 17.77, 23.55 ～ 24.51, and 3.09 ～ 3.18 mg • g^{-1}, respectively. **Conclusion** The fingerprint and content determination method is simple, accurate, stable and rapid, which can provide reference for the quality control of Wuwei Qingre decoction powder.

Key words: Wuwei Qingre decoction powder; chebulate acid; ellagic acid; HPLC; content determination

五味清热汤散（君伦莪汤）是藏医用来治疗“叱乃病”即痛风的经典方剂[1]，出自 1995 年版《卫生部药品标准 - 藏药分册》[2]，并被收录于 2019 年西藏自治区卫生健康委员会公布的《藏医药古代经典名方目录（34 首）》和 2023 年国家中医药管理局公布的《古代经典名方目录（第二批）》，由诃子（去核）、毛诃子（去核）、余甘子（去核）、宽筋藤、印度獐牙菜 5 味药材粉碎成细粉直接入药制备，具有清热凉血，舒筋活络，止痛，干黄水的功效，主要用于“陈普”病，“叱乃”引起的关节红、肿、热、痛、活动受限等。本方藏医临床已经有上千年的应用经验，疗效确切、安全性好。

五味清热汤散在《部颁药品标准》中只规定了性状，2020 年版《中国药典》通则的散剂检查没有含量测定项，质量控制水平较低，产品临床疗效无法得到保障，限制了该产品的临床推广。本试验参考《中国药典》及含量测定相关文献[3-11]，建立五味清热汤散的 HPLC 指纹图谱和 5 种指标成分的定量测定方法，以期为五味清热汤散的质量标准提升以及经典名方的物质基准研究提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

安捷伦 1100 高效液相色谱仪，配置安捷伦紫外检测器（安捷伦科技有限公司）；XSR205DU/AC 十万分之一天平（梅特勒托利多科技有限公司）；TGL-16B 台式高速离心机（常州中捷试验仪器制造有限公司）；HTY-800 g 电动食品加工机（切药机）（永康市红太阳机电有限公司）；UC-250 DE 超声清洗仪（250 W、40 kHz）（上海精其仪器有限公司）；密理博 /Synergy UV 纯水仪（默克密理博公司）。

1.2 试药

没食子酸（批号：110831-201906，纯度：91.50%）、鞣花酸（批号：111959-201903，纯度：88.80%）（中国食品药品检定研究院），诃子联苯酸（批号：DST200927-064，纯度：98.51%）、没食子酸甲酯（批号：DSTDM007701，纯度：99.76%）、诃子酸（批号：DST220420-065，纯度：98.25%）（成都乐美天医药科技有限公司）；甲醇（批号 20230418，色谱纯）、磷酸（批号 20221125，优级纯）（上海国药集团化学试剂有限公司），超纯水（自制）。

诃子（批号：20230619）、毛诃子（批号：20230619）、余甘子（批号:20230619）、宽筋藤（批号: 20200301）、印度獐牙菜（批号: 20230619）（西藏神猴药业有限责任公司，并经江苏神猴医药研究有限公司中药材检测试验室鉴定为正品）。

2 方法与结果

2.1 五味清热汤散的制备

称取诃子（去核）、毛诃子（去核）、余甘子（去核）、宽筋藤、印度獐牙菜各 1000 g，分别粉碎成细粉，过 50 目筛。按照诃子（去核）、毛诃子（去核）、余甘子（去核）、宽筋藤、印度獐牙菜比为 10∶7∶8∶10∶5 称取各药材粉末，混合均匀，铝箔袋封装，即得五味清热汤散，平行制备 8 批（编号：S1 ～ S8）。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取没食子酸 10.05 mg、没食子酸甲酯 10.40 mg、诃子联苯酸 9.32 mg、诃子酸 8.70 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇 -0.1% 磷酸水溶液（7∶3，*V/V*）溶解并定容，摇匀，即得到质量浓度分别为 0.9196、1.0375、0.9181、0.8548 mg • mL^{-1} 的对照品母液。另精密称取鞣花酸 10.18 mg，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，摇匀，即得质量浓度为 0.1808 mg • mL^{-1} 的对照品母液。

2.2.2 混合对照品溶液 精密移取“2.2.1”项下鞣花酸对照品母液 5 mL、没食子酸对照品母液 3 mL、没食子酸甲酯对照品母液 1.5 mL、诃子联苯酸对照品母液 6 mL、诃子酸对照品母液 8.5 mL，置于同一 50 mL 量瓶中，加甲醇 -0.1% 磷酸水溶液（7∶3，

V/V）定容至刻度，摇匀，即得混合对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液　称取五味清热汤散 2 g，精密称定，置于 150 mL 锥形瓶，加入 30% 甲醇 100 mL，称重，超声（功率 250 W，频率 40 kHz）60 min，再次称重，并用 30% 甲醇补足减失重量，抽滤，取续滤液 1 mL 置于 10 mL 量瓶，加甲醇 -0.1% 磷酸水溶液（7∶3，*V/V*）定容，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.2.4　空白溶液　不加药材细粉，按“2.2.3”项下方法制得空白溶液。

2.3　色谱条件

采用 Ultimate XB-C18（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以甲醇 -0.1% 磷酸溶液为流动相，梯度洗脱，流速为 1 mL • min^{-1}，检测波长为 270 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL，梯度洗脱程序见表 1。

表 1　梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution programs

时间 /min	A. 0.1% 磷酸水 /%	B. 甲醇 /%
0	98	2
6	97	3
15	91	9
20	85	15
38	85	15
40	80	20
50	75	25
60	73	27
70	64	36
81	64	36
82	61	39
95	60	40

2.4　指纹图谱研究

2.4.1　精密度试验　取五味清热汤散（S1），按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，连续进样测定 6 次，以 6 号峰（没食子酸）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间的 *RSD*（$n=6$）为 0.18% ～ 0.23%，相对峰面积的 *RSD*（$n=6$）为 0.17% ～ 0.87%，表明方法精密度良好。

2.4.2　稳定性试验　取五味清热汤散（S1），按“2.2.3”项下方法制备，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进行分析，以 6 号峰（没食子酸）为参照峰，测得各共有峰的相对保留时间的 *RSD*（$n=7$）为 0.029% ～ 0.13%，相对峰面积的 *RSD*（$n=7$）为 0.75% ～ 1.5%，表明供试品溶液室温放置 12 h 稳定。

2.4.3　重复性试验　取五味清热汤散（S1），按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，分别进样分析，以 6 号峰（没食子酸）为参照峰，测得各共有峰相对保留时间的 *RSD*（$n=6$）为 0.11% ～ 0.19%，相对峰面积的 *RSD*（$n=6$）为 0.43% ～ 1.7%，表明该方法重复性良好。

2.4.4　对照及指纹图谱的生成　取五味清热汤散（S1 ～ S8），根据“2.2.3”项下方法制备，并按“2.3”项下色谱条件测定，记录色谱图，并导入《中药色谱指纹图谱相似度系统（2012.130723 版本）》，以 S1 样品指纹图谱为参照图谱，时间窗宽度设定为 0.1 min，进行多点校正和色谱峰匹配，生成 8 批五味清热汤散的 HPLC 叠加指纹图谱及对照指纹图谱 R，共标识出 18 个共有峰，见图 1。通过与混合对照品溶液色谱图（S0）进行比对，指认了 5 个共有峰，即 6 号峰（没食子酸）、11 号峰（没食子酸甲酯）、15 号峰（诃子联苯酸）、17 号峰（诃子酸）、18 号峰（鞣花酸），见图 2。

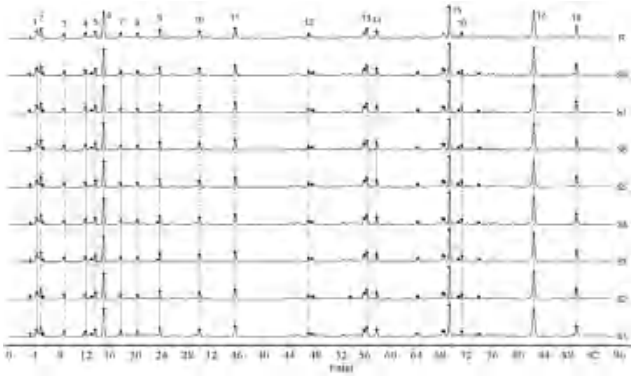

图 1　8 批五味清热汤散 HPLC 叠加指纹图谱

Fig 1　HPLC fingerprint of 8 batches of Wuwei Qingre decoction powder

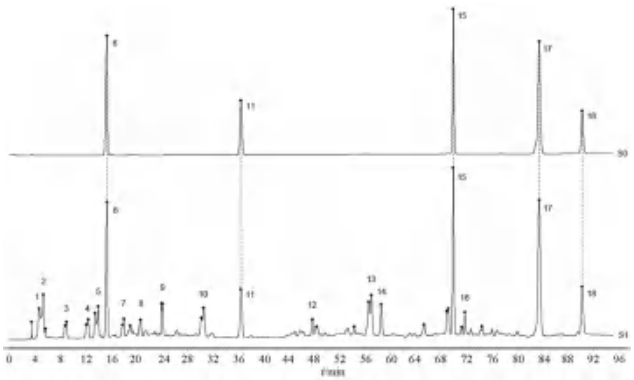

图 2　五味清热汤散共有峰的指认图

Fig 2　Identification of common peaks in Wuwei Qingre decoction powder

6. 没食子酸（gallic acid）；11. 没食子酸甲酯（methyl gallate）；15. 诃子联苯酸（chebulate tannic acid）；17. 诃子酸（chebulate acid）；18. 鞣花酸（ellagic acid）

2.4.5　指纹图谱相似度评价　采用《中药色谱指纹图谱相似度系统（2012.130723 版本）》软件计算

8 批五味清热汤散指纹图谱与对照指纹图谱 R 的相似度。结果显示，8 批五味清热汤散指纹图谱的相似度均在 0.99 以上，说明不同批次五味清热汤散中的化学成分具有一致性，见表 2。

表 2　五味清热汤散相似度评价结果

Tab 2　Evaluation of the similarity of Wuwei Qingre decoction powder

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	R
S1	1.000	0.999	0.998	0.994	0.995	0.998	0.998	0.999	0.999
S2	0.999	1.000	0.999	0.995	0.996	0.999	0.998	0.999	0.998
S3	0.998	0.999	1.000	0.996	0.995	0.999	0.996	0.998	0.999
S4	0.994	0.995	0.996	1.000	0.999	0.995	0.993	0.995	0.997
S5	0.995	0.996	0.995	0.999	1.000	0.996	0.994	0.996	0.997
S6	0.998	0.999	0.999	0.995	0.996	1.000	0.997	0.999	0.999
S7	0.998	0.998	0.996	0.993	0.994	0.997	1.000	0.998	0.998
S8	0.999	0.999	0.998	0.995	0.996	0.999	0.998	1.000	0.999
R	0.999	0.998	0.999	0.997	0.997	0.999	0.998	0.999	1.000

2.5　含量测定

2.5.1　专属性试验　取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶液，进样测定，色谱图见图 3。供试品溶液色谱图中 5 种成分的色谱峰分离度均大于 1.5，拖尾因子在 0.95 ～ 1.05，理论塔板数均高于 3000，且与对照品溶液中各成分色谱峰保留时间一致，空白溶液无影响，表明该方法专属性良好。

2.5.2　线性关系考察　精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 0.5、1、2、4、6、10 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇 -0.1% 磷酸水溶液（7∶3，*V/V*）定容，摇匀，配成不同浓度的混合对照品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定。以对照品溶液质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，5 种成分回归方程见表 3。

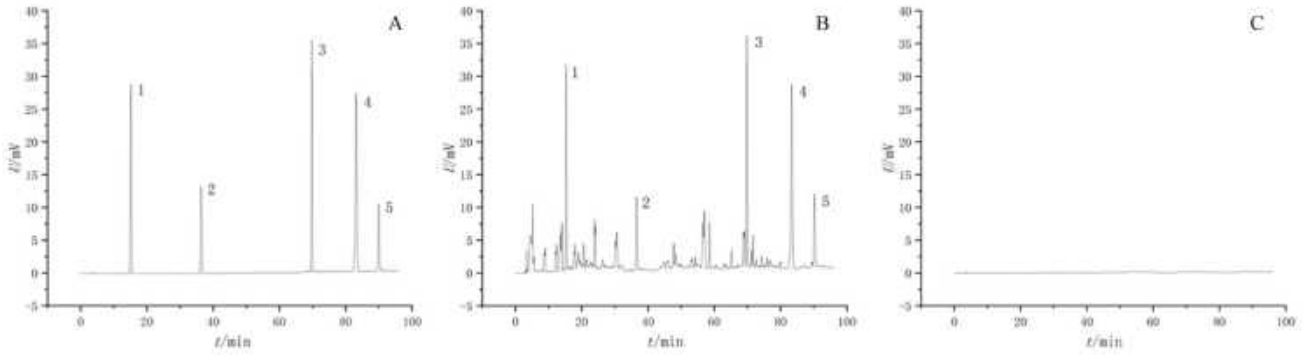

图 3　混合对照品溶液（A）、供试品溶液（B）、空白溶液（C）的 HPLC 图

Fig 3　HPLC chromatogram of mixed reference substance（A），sample（B）and blank solution（C）

1. 没食子酸（gallic acid）；2. 没食子酸甲酯（methyl gallate）；3. 诃子联苯酸（chebulate tannic acid）；4. 诃子酸（chebulate acid）；5. 鞣花酸（ellagic acid）

表 3　回归方程、线性范围和相关系数

Tab 3　Regressive equation，correlation coefficient and linearity

成分	线性方程	线性范围 /（μg・mL^{-1}）	*r*
没食子酸	$Y = 34.94X - 6.306$	2.76 ～ 55.17	0.9998
没食子酸甲酯	$Y = 34.61X - 3.458$	1.56 ～ 31.13	0.9997
诃子联苯酸	$Y = 15.78X - 2.499$	5.51 ～ 110.17	0.9999
诃子酸	$Y = 18.65X - 27.93$	7.27 ～ 145.31	0.9998
鞣花酸	$Y = 48.93X - 18.06$	0.90 ～ 18.08	0.9997

2.5.3　精密度考察　取“2.2.2”项下混合对照品溶液，连续测定 6 次，测得没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸峰面积 *RSD* 分别为 0.70%、0.66%、0.37%、0.35%、0.66%，表明仪器精密度良好。

2.5.4　重复性试验　取五味清热汤散（S1），按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，测得没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸平均含量分别为 7.91、3.98、16.60、23.27、3.18 mg・g^{-1}，*RSD* 分别为 0.84%、1.2%、1.5%、0.93%、1.6%，表明该方法重复性良好。

2.5.5　稳定性试验　取五味清热汤散（S1），按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，室温下放置，于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定，测得没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸峰面积 *RSD* 分别为 0.96%、1.7%、0.60%、0.64%、1.8%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.6　加样回收试验　取已知含量的五味清热汤散（S1）6 份，每份 0.5 g，精密称定，加入各对照品，按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定。测得没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸的平均加样回收率分别为 98.27%、98.31%、96.48%、96.86%、96.07%，*RSD* 分别为 0.72%、0.94%、0.73%、0.80%、0.81%，表明该方法回收率良好。

2.5.7　样品含量测定　取五味清热汤散（编号 S1 ～ S8），分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果见表 4。

表 4　五味清热汤散中 5 个成分的含量测定结果 (mg・g^{-1})

Tab 4　Content of 5 components in Wuwei Qingre decoction powder (mg・g^{-1})

编号	没食子酸	没食子酸甲酯	诃子联苯酸	诃子酸	鞣花酸
S1	7.95	4.02	16.85	23.55	3.16
S2	8.08	4.12	17.66	24.31	3.09
S3	8.25	4.23	17.77	24.51	3.14
S4	8.17	4.20	17.25	24.33	3.10
S5	8.12	4.18	17.15	24.12	3.13
S6	7.99	4.09	17.31	24.47	3.15
S7	7.85	4.21	16.98	23.89	3.11
S8	8.21	4.15	17.03	23.97	3.18

3　讨论

3.1　传统藏成药的质量控制问题

传统藏成药是由生药材打粉直接入药制备，大多数藏成药的质量标准依然参照 1995 年版《卫生部药品标准 - 藏药分册》，无含量测定项，体现不了国家标准的先进性、可控性。只有少部分国药准字藏成药中有含量测定项，但均为单一有效成分的含量测定，比如藏成药肺热普清散（国药准字 Z54020045），其质量标准中有羟基红花黄色素 A 的定量 [12-13]。本研究建立了五味清热汤散中 5 种有效成分的 HPLC 同时定量测定方法，结果表明主要指标成分的色谱峰分离良好，方法稳定准确，可为提升五味清热汤散的质量标准提供依据，同时也可为传统藏成药的质量标准提升提供参考。

3.2　主要指标成分

五味清热汤散富含鞣质和多酚类物质，鞣质类成分在植物中广泛分布，具有收敛止血、抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血脂、降血压等药理活性 [14-16]，其中诃子主要有效成分为没食子酸、诃子酸、诃子鞣酸、鞣花酸 [17-18]；毛诃子主要有效成分为没食子酸、鞣花酸、没食子酸甲酯、诃子鞣酸 [19-20]；余甘子主要有效成分为没食子酸、鞣花酸 [21-22]；宽筋藤的主要酚酸类成分为没食子酸 [23-24]。而且从供试品色谱图中可以看出，没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸的峰面积较大，含量较高，因此，本研究选择上述 5 种成分作为五味清热汤散的主要指标成分。

3.3　供试品溶液的制备

本试验比较了水以及不同浓度甲醇和乙醇对各指标成分提取得率以及色谱峰的影响。结果发现，采用低浓度的甲醇作为提取溶剂，不但色谱峰无杂峰干扰，理论塔板数、分离度均符合 2020 年版《中国药典》规定，而且没食子酸甲酯的提取得率超过 95%。因此，最终优选 30% 的甲醇作为供试品的提取溶剂。

在供试品溶液稳定性的研究过程中发现，30% 甲醇提取的供试品溶液 6 h 内稳定，但 12 h 内不稳定，诃子酸、诃子联苯酸峰面积降低，没食子酸、没食子酸甲酯峰面积增加，可能与在溶剂极性较大的情况下，诃子酸、诃子联苯酸分解为没食子酸，没食子酸又可与甲醇反应生成没食子酸甲酯有关。而 30% 甲醇提取的供试品溶液经 70% 的甲醇稀释后，溶液的稳定性显著提高 [25-26]，12 h 内没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸峰面积 *RSD* 均小于 2.0%。因此，选择先用 30% 甲醇提取，再用 70% 甲醇稀释的方法制备供试品溶液。

3.4　鞣花酸对照品溶液的制备

鞣花酸是没食子酸的二聚衍生物，其分子结构是一种多酚二内酯 [27]，具有四个酚羟基、两个内酯基以及内部四环结构。鞣花酸的水溶性和脂溶性均较低，不溶于醚，微溶于水，在醇、碱、吡啶、二甲基亚砜中溶解度明显提高 [28]。本研究还发现鞣花酸在甲醇中的溶解性显著高于乙醇，且随甲醇浓度的提高，鞣花酸的溶解性显著提高，因此本研究选用纯甲醇作为溶剂配制对照品母液 [29-30]。鞣花酸虽然具有高度的热稳定性，但由于是一种难溶性药物，在溶液状态下极易析出，本研究发现鞣花酸的甲醇溶液室温放置 12 h，即有沉淀析出。pH 对鞣花酸的溶解稳定性有较大影响，有研究表明，鞣花酸在酸性溶液中溶解性随 pH 增高而增加，在中性和碱性溶液中鞣花酸的溶解度较小 [31]，因此，本研究先用甲醇作为溶剂，制备对照品母液，再用甲醇 -0.1% 磷酸水溶液（7∶3，*V/V*）稀释，制备对照品溶液，不但能确保完全溶解，还能使得供试品溶液偏酸性，提高其溶液的稳定性。

4　结论

本研究采用高效液相色谱法建立了五味清热汤散的指纹图谱及其指标成分没食子酸、没食子酸甲酯、诃子联苯酸、诃子酸、鞣花酸的含量测定方法，该方法具有简便、准确、稳定、快速等优点，可为提升五味清热汤散的质量标准提供依据。

参考文献

[1] 西藏自治区藏医院 . 藏药方剂大全 [M]. 拉萨：西藏人民出版社，2006.

[2] 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药：第一册 [S]. 1995：180.

[3] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：61-65.

[4] 胡绮萍，赵书运，吴文平，等 . 基于多指标成分含量测定的诃子和绒毛诃子质量分析 [J]. 中药材，2021，44（2）：374-378.

[5] 邓星，罗莉娅，苟立平，等 . 藏药毛诃子的质量标准提高研究 [J]. 中南药学，2018，16（1）：117-120.

[6] 于涛，赵春草，张继全 . 余甘子总酚主要成分的含量测定和指纹图谱研究 [J]. 上海中医药大学学报，2022，36（3）：61-65.

[7] 姜红，赵生玉，黄浩洲，等 . 三勒浆口服液 HPLC 指纹图谱的建立及多成分定量测定 [J]. 中草药，2017，48（18）：3741-3747.

[8] 戈雅倩，谢和兵，尼玛次仁，等 . HPLC 法同时测定藏药三味檀香汤散中主要指标成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2023，43（5）：748-753.

[9] 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.

[10] 杨小兰，尼玛次仁，白玛旦增，等 . 藏药十六味杜鹃花浓缩丸提取液中间体中总黄酮及羟基红花黄色素 A 的含量测定 [J]. 中医药导报，2023，29（2）：63-67.

[11] 王静，朱春璐，袁子民 . 都梁丸指纹图谱的建立及 4 种成分的含量测定研究 [J]. 中南药学，2023，21（6）：1630-1634.

[12] 戈雅倩，谢和兵，尼玛次仁，等 . HPLC 法同时测定藏药三味檀香汤散中主要指标成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2023，43（5）：748-753.

[13] 采金金，谢和兵，尼玛次仁，等 . 电子加速器辐照灭菌对肺热普清散质量的影响 [J]. 中国药业，2023，32（4）：70-74.

[14] 朱萱萱，白璐，刘晓谦，等 . 近十年来中药鞣质的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2021，46（24）：6353-6365.

[15] 刘畅，金哲雄 . 鞣质的药理活性研究进展 [J]. 黑龙江医药，2015，28（1）：14-17.

[16] 孟达，张雅琼，秦定梅，等 . 余甘子的酚类成分及药理活性研究进展 [J]. 中成药，2022，44（10）：3269-3274.

[17] 张媛媛，曾慧婷，袁源见，等 . 藏药诃子的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国药房，2018，29（14）：2002-2006.

[18] 赵鹿，廖翠萍，杨秀娟，等 . 诃子的研究进展及质量标志物的预测 [J]. 中草药，2020，51（10）：2732-2744.

[19] 李雪冬，罗晓敏，马筝，等 . 毛诃子化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物（Q-Marker）预测分析 [J]. 中草药，2023，54（3）：976-990.

[20] 邓星，罗莉娅，苟立平，等 . 藏药毛诃子的质量标准提高研究 [J]. 中南药学，2018，16（1）：117-120.

[21] 王辉 . 余甘子的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药，2011，13（11）：52-56.

[22] 梁文仪，张秋楠，常子豪，等 . 余甘子药材及去核饮片质量标准修订研究 [J]. 中国药学杂志，2021，56（19）：1600-1606.

[23] 芦永昌，钱帅，赵英，等 . 藏药宽筋藤的化学成分研究 [J]. 中药材，2016，39（12）：2775-2777.

[24] 黄锐，扎西东智，彭戈，等 . 藏药三味宽筋藤汤散质量标准研究 [J]. 中国民族民间医药，2019，28（18）：33-36.

[25] 陈九妹，朱麒臻，鞠成国，等 . 诃黎勒酸和诃子酸的提取、分离工艺优化 [J]. 中国药房，2022，33（22）：2733-2737.

[26] 胡绮萍，赵书运，吴文平，等 . 基于多指标成分含量测定的诃子和绒毛诃子质量分析 [J]. 中药材，2021，44（2）：374-378.

[27] 骆菊文，蒋新元，徐佳敏，等 . 鞣花酸的稳定性及其保护研究 [J]. 日用化学工业，2020，50（8）：547-552.

[28] 屈艳君，王文慧，曹家南，等 . 鞣花酸的制备及应用研究进展 [J]. 中国食物与营养，2022，28（6）：39-45.

[29] 才让草，潘遐，李魁，等 . 藏药石榴莲花散中鞣花酸和胡椒碱含量测定方法研究 [J]. 中国药事，2020，34（2）：215-221.

[30] 许芮菁，刘敏，杨锐，等 . 高效液相色谱法测定普洱熟茶中鞣花酸含量 [J]. 中国茶叶加工，2022（2）：63-68.

[31] 施洋，孙芸，谢莉，等 . 石榴皮中活性成分鞣花酸的平衡溶解度与油水分配系数的测定 [J]. 新疆医科大学学报，2016，39（2）：145-148.

（收稿日期：2023-11-28；修回日期：2024-01-25）

基于 FTIR 的黄芪药材质量评价研究

郝彩琴[1]，周莹[2]，刘明嘉[3*]，孙国祥[3*]（1. 宁夏职业技术学院生命科技学院，银川　750002；2. 抚顺市药品检验检测所，辽宁　抚顺　113006；3. 沈阳药科大学药学院，沈阳　110016）

摘要：目的　建立黄芪药材的红外原始指纹图谱与量子指纹图谱，为其质量控制提供参考。**方法**　采用傅里叶变换红外光谱仪采集 35 批黄芪药材的红外指纹图谱，经数据处理建立黄芪的红外量子指纹图谱，采用系统指纹定量法以及 *t* 检验比较两种指纹图谱是否存在差异，并对量子指纹图谱的共有量子峰面积进行系统聚类分析。**结果**　黄芪药材的红外指纹图谱与量子指纹图谱间并不存在显著性差异，系统指纹定量法将 35 批黄芪分为 8 个质量等级，系统聚类分析表明 35 批黄芪的质量可聚为两类。**结论**　红外量子指纹图谱能够提供大量特征信息，系统指纹定量法能够全面、准确、直观地将黄芪药材分为 8 个质量等级，两者结合可以实现对黄芪等中药材质量的全面评价。

关键词：黄芪；傅里叶变换红外光谱；量子指纹图谱；系统指纹定量法
中图分类号：R282.5，R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1329-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.034

FTIR quantum fingerprints of Radix astragali and quality control

HAO Cai-qin[1], ZHOU Ying[2], LIU Ming-jia[3*], SUN Guo-xiang[3*] (1. *College of Life Science and Technology, Ningxia Polytechnic*, *Yinchuan* 750002; 2. *Fushun Institute for Drug Testing*, *Fushun Liaoning* 113006; 3. *College of Pharmacy*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016)

Abstract: Objective　To establish the infrared original fingerprints and quantum fingerprints of Radix astragali to provide reference for its quality control. **Methods**　The infrared fingerprints of 35 batches of Radix astragali were collected by Fourier transform infrared spectroscopy, and the infrared quantum fingerprints of Radix astragali were established by data processing. The systematically quantified fingerprint method was applied and *t*-test was used to compare whether the two fingerprints differed from each other, and the area of the common quantum peaks of the quantum fingerprints was systematically determined by clustering analysis. **Results**　There was no significant difference between the infrared fingerprints and quantum fingerprints of Radix astragali. The systematic fingerprint quantification method divided the 35 batches of Radix astragali into 8 quality classes, and the cluster analysis showed that the quality of the 35 batches of Radix astragali could be clustered into two groups. **Conclusion**　The infrared quantum fingerprints can provide a large amount of characteristic information, and the systematic fingerprint quantitative method can comprehensively, accurately and intuitively classify astragalus herbs into 8 quality grades. Combination of both can comprehensively evaluate the quality of Radix astragali and other Chinese herbal medicines.

Key words: Radix astragali; FTIR; quantum fingerprint; systematically quantified fingerprint method

黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus memeranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiaz 或膜荚黄芪 *A. membranaceus*（Fisch.）Bge. 的根[1]。黄芪具有补气升阳，固表

基金项目：宁夏中药材开发与利用人才小高地项目（No. 宁人社函 [2019]463 号）；宁夏回族自治区高教项目（No. NGY2020144）。
作者简介：郝彩琴，女，硕士，副教授，主要从事中药资源开发与利用及质量控制，email：hao0418@126.com　*通信作者：孙国祥，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药指纹学和中药一致性评价研究，email：gxswmwys@163.com；刘明嘉，女，硕士研究生导师，主要从事中药质量控制方法研究，email：lmj5652018@163.com

止汗，利水消肿，生津养血，行滞通痹，托毒排脓，敛疮生肌的功效，是应用最广泛的传统中草药之一[2]。黄芪中含有皂苷类、多糖类、黄酮类等多种化学成分[3]，其中《中国药典》2020 年版中黄芪质量控制以黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量作为标准，但是采用 HPLC 建立的分离分析方法耗时烦琐，需使用大量的流动相且具有一定毒性，成本较高，而红外光谱分析法操作简便、准确度高、无污染，能够反映药材中饱和单键的整体信息，是一种常用的结构分析技术[4-5]，已广泛应用于中药材真伪鉴别、产地鉴别、指纹图谱以及药材中有效成分的含量分析。红外量子指纹图谱是孙国祥教授基于中药整体化学成分系统创新性提出的一种新颖、简捷的评价中药一致性的方法，量子化的过程是将连续的指纹图谱数据转变为独立存在的量子峰的过程，最终得到的量子峰具有色谱峰的特点，能够提供红外指纹图谱的大量特征信息[6]。本研究建立了 35 批黄芪药材的红外原始指纹图谱及相应的量子指纹图谱，采用系统指纹定量法（SQFM）并结合化学模式识别对所建立的图谱进行评价，为黄芪药材的质量评价提供参考。

1　材料

1.1　仪器

iCAN9 傅里叶红外变换光谱仪（天津市能谱科技有限公司）；电子分析天平（天津市德安特传感技术有限公司）；小型高速粉碎机（六合国股份有限公司）；溴化钾（KBr，光谱纯，天津市光复科技发展有限公司）。

1.2　样品

35 批黄芪药材（S1 ～ S35），除 S25（山西省）、S35（甘肃省）外，均来自宁夏回族自治区，具体产地见表 1。取 S1 ～ S35 黄芪药材样品粉碎，过 40 目筛，放入干燥器中备用。

2　方法和结果

2.1　红外量子指纹图谱原理

由于获得的原始红外指纹图谱数据点太多导致数据处理繁杂，对黄芪样品评价造成了一定的困难。因此本文采用“光谱量子指纹”处理技术[7-10]。将红外光谱 *.csv 文件导入【中药光谱量子指纹一致性数字化评价系统 4.0】（以下简称为量子软件），基于数据降维原理[11]，通过公式（1）～（3）对连续信号进行简化，采用合并定点法将红外指纹图谱转换为相应的量子指纹，开发并建立 35 批黄芪样品的红外量子指纹图谱。

表 1　35 批黄芪药材产地

Tab 1　Origin of 35 batches of Radix astragali

编号	产地	编号	产地
S1	宁夏固原市	S19	宁夏固原市
S2	宁夏固原市	S20	宁夏固原市
S3	宁夏固原市	S21	宁夏固原市
S4	宁夏固原市	S22	宁夏吴忠市
S5	宁夏固原市	S23	宁夏固原市
S6	宁夏固原市	S24	宁夏固原市
S7	宁夏固原市	S25	山西省
S8	宁夏固原市	S26	宁夏吴忠市
S9	宁夏吴忠市	S27	宁夏固原市
S10	宁夏固原市	S28	宁夏固原市
S11	宁夏固原市	S29	宁夏固原市
S12	宁夏固原市	S30	宁夏固原市
S13	宁夏吴忠市	S31	宁夏固原市
S14	宁夏固原市	S32	宁夏固原市
S15	宁夏固原市	S33	宁夏固原市
S16	宁夏固原市	S34	宁夏固原市
S17	宁夏固原市	S35	甘肃省
S18	宁夏固原市		

$$A = \sum_{i=1}^{n} A_{bi}\ (i = 1,\ 2,\ 3\cdots\cdots,\ n) \quad (1)$$

$$H = A_{bmax} \quad (2)$$

$$W_{1/2} = i/200 \quad (3)$$

H：峰高；A：峰面积；$W_{1/2}$：半峰宽；A_{bi}：每个波数的吸光度；i：合并点数。

2.2　SQFM 原理

SQFM[11-14] 是一种采用 S_m 和 P_m 两个指标对指纹图谱系统进行宏观定性分析和宏观定量分析的方法，具有良好的适用性和兼容性。样本指纹图谱（SFP）和对照指纹（RFP）分别由两个向量 $\boldsymbol{x} = (x_1, x_2, \cdots, x_n)$ 和 $\boldsymbol{y} = (y_1, y_2, \cdots, y_n)$ 表示，其中 x_i 和 y_i 分别表示 SFP 和 RFP 的各指纹峰面积。用定性相似度（S_F）来衡量 SFP 与 RFP 在分布比例中的相似程度。当采用比率定性相似度时，各指纹图谱峰的权重相等。S_m 由 S_F 和 S_F' 的平均值得到，见式（4），可用于监测中药指纹图谱化学成分的数量和浓度分布比例。投影含量相似度（C）影响整体成分的相似程度。定量相似度（P）反映了各小峰的化学成分的含量变化。P_m 是通过 C 和 P 的平均值来计算的，见式（5），可以监测中药中主要成分的总体含量。在 SQFM 的基础上，中药被划分为 8 个质量等级：G1 = [$S_m \geqslant 0.95$，$95\% \leqslant P_m \leqslant 105\%$]，G2 = [$S_m \geqslant 0.90$，$90\% \leqslant P_m \leqslant 110\%$]，G3 = [$S_m \geqslant 0.85$，$85\% \leqslant P_m \leqslant 115\%$]，G4 = [$S_m \geqslant 0.80$，$80\% \leqslant P_m \leqslant 120\%$]，G5 = [$S_m \geqslant 0.70$，$70\% \leqslant P_m \leqslant 130\%$]，G6 = [$S_m \geqslant 0.60$，$60\% \leqslant P_m \leqslant 140\%$]，G7 = [$S_m \geqslant 0.50$，$50\% \leqslant P_m \leqslant 150\%$]，G8 = [$S_m < 0.50$，$0 \leqslant P_m \leqslant \infty$]，质量越好，等级就越低。

$$S_m = \frac{1}{2}(S_F + S'_F) = \frac{1}{2}\left[\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} x_i^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n} y_i^2}} + \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{x_i}{y_i}}{\sqrt{n\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{x_i}{y_i}\right)^2}}\right] \quad (4)$$

$$P_m = \frac{1}{2}(C + P) = \frac{1}{2}\left[\frac{\sum_{i=1}^{n} \overrightarrow{x_i y_i}}{\sum_{i=1}^{n} y_i^2} + \frac{\sum_{i=1}^{n} \overrightarrow{\frac{x_i}{y_i}}}{\sum_{i=1}^{n} y_i} S'_F\right] \times 100\% \quad (5)$$

2.3　数据处理

采用【中药光谱量子指纹一致性数字评价系统 4.0】（软件证书 7037415）进行整体指纹图谱相似度分析，并结合质量评价，采用 SPSS Statistics 26 软件进行系统聚类分析，Origin 2022 用于绘图。

2.4　红外量子指纹图谱的建立

2.4.1　样品处理与测定　在 4000 ～ 400 cm^{-1} 范围内收集 35 批黄芪的光谱数据。为了消除水分对光谱的影响，KBr 粉末使用前于 80 ℃下干燥 30 min。将 1.5 mg 样品粉末和 100.0 mg KBr 粉末于玛瑙研钵中研磨均匀，取 100.0 mg 的混合物精密称重，用压片机（压力：15 MPa，时间：3 min）压成均匀、透明的 KBr 晶片并上机测定。测定条件为分辨率为 32 cm^{-1}、扫描信号累加次数为 16，扫描时应扣除空白 KBr 的干扰，即得样品红外光谱。

2.4.2　精密度试验　为了验证红外指纹图谱的适用性，按照“2.1”项下条件，连续 6 次测量同一样品来检验仪器的精密度，将测得的图谱的 *.csv 文件导入软件中，按照定点合并法中的最大峰高法以 2 点合并一个量子峰，采用系统指纹定量法评价参数 P_m 的 *RSD* 值，进行仪器精密度验证，结果精密度的 *RSD* = 0.26%（n = 6），表明方法可以用于黄芪的指纹图谱分析。

2.4.3　线性关系考察　取黄芪 S14，精密称定 0.50、1.05、1.48、2.00、2.57 mg，按照“2.1”项下条件分别进行检测，将测得图谱的 *.csv 文件导入软件，按照定点合并法中的最大峰高法以 2 点合并一个量子峰，以称样量为横坐标，P_m 为纵坐标绘制标准曲线，线性方程为：$y = 4.24\times10^4x + 36.741$，$R^2$ = 0.944，线性范围为 0.50 ～ 2.57 mg。

2.5　黄芪样品评价结果

取黄芪 S1 ～ S35，按照“2.1”项下方法进行检测，记录采集图像，采用 OMNIC 软件对得到的红外谱图进行平滑处理（5 点），如图 1 所示，35 批黄芪药材的原始红外光谱图的峰形、峰位基本一致，表明所含主要化学成分类似，采用 SQFM 对 35 批黄芪样品的原始指纹图谱评价结果见表 2。将测得的图谱的 *.csv 文件导入软件，按照定点合并法中的最大峰高法以 2 点合并一个量子峰，并采用均值法计算生成标准对照指纹图谱，图 2 为经量子化后处理得到的红外量子指纹图谱，量子化后的红外指纹图谱将连续、复杂、繁多的数据点转化为更简单、直观的量子峰，35 批黄芪红外量子指纹图谱存在 76 个共有量子峰，采用 SQFM 对 35 批黄芪红外量子指纹图谱进行评价，见表 2。

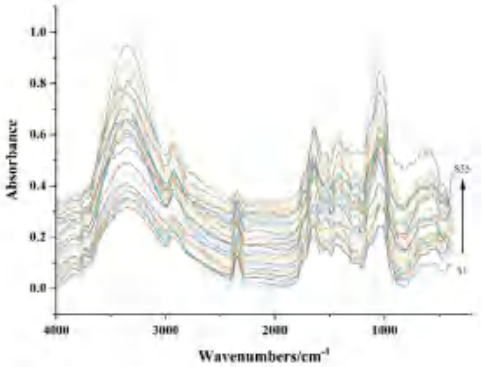

图 1　35 批黄芪样品的红外原始图谱

Fig 1　Infrared original fingerprints of 35 batches of Radix astragali samples

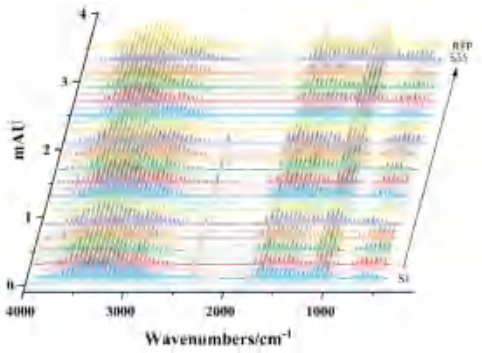

图 2　35 批黄芪样品和对照指纹的量子图谱

Fig 2　Quantum fingerprints of 35 batches of Radix astragali samples and reference fingerprints

为了验证原始图谱与量子指纹图谱间的是否存在差异，采用系统指纹定量法对红外原始图谱和量子化后图谱分别评价，并对比两者的 S_m 和 P_m 以及评价等级如图 3 ～ 5 所示，量子化后的红外指纹图谱与原始图谱的 S_m 和 P_m 总体上一致，而两者的评价等级结果则完全一致，这表明量子化后的指纹图谱不存在数据丢失的现象。为了进一步验证量子化后获得的红外量子指纹图谱与原始图谱是否存在显著性差异，计算指纹图谱的 P_m 值再合并前后的算术差 ΔP_m，并使用 t 检验进行统计分析。35 批黄芪样品的红外指纹图谱未合并时与合并后的 ΔP_m 范围为 − 0.6 ～ 1.4，t 检验显示红外指纹图谱 P 值为 0.996，大于 0.05（双尾），说明红外量子指纹图谱与原始的图谱之间无显著差异。因此，光谱量子指纹在分析复杂、繁多的数据信息方面具有巨大潜力。在 SQFM 中，以 S_m 和 P_m 作为样本相似性评价的参数，将样本大致分为 8 个等级。从基于 SQFM 的定性和定量评价来看（见表 2），黄芪样品的质量等级波

表 2　35 批黄芪红外原始图谱与量子指纹图谱评价结果

Tab 2　Evaluation of infrared original fingerprint and quantum fingerprint of 35 batches of Radix astragali

编号	原始图谱			编号	量子指纹图谱		
	S_m	P_m/%	等级		S_m	P_m/%	等级
S1	0.995	162.2	8	S1	0.996	162.2	8
S2	0.990	72.4	5	S2	0.993	72.0	5
S3	0.990	88.1	3	S3	0.992	87.7	3
S4	0.989	79.8	5	S4	0.992	79.3	5
S5	0.986	79.7	5	S5	0.988	79.1	5
S6	0.985	82.8	4	S6	0.985	83.0	4
S7	0.998	121.3	5	S7	0.998	121.0	5
S8	0.985	57.3	7	S8	0.986	56.8	7
S9	0.996	80.7	4	S9	0.996	80.9	4
S10	0.997	111.8	3	S10	0.997	112.1	3
S11	0.998	116.4	4	S11	0.998	116.7	4
S12	0.997	116.7	4	S12	0.997	116.5	4
S13	0.995	100.6	1	S13	0.996	101.0	1
S14	0.996	165.5	8	S14	0.996	166.3	8
S15	0.999	150.7	8	S15	0.998	150.9	8
S16	0.998	110.0	2	S16	0.998	110.0	2
S17	0.982	105.8	2	S17	0.984	105.8	2
S18	0.993	84.5	4	S18	0.993	84.5	4
S19	0.993	168.1	8	S19	0.993	169.5	8
S20	0.994	89.6	3	S20	0.995	89.9	3
S21	0.996	67.5	6	S21	0.996	67.5	6
S22	0.987	71.6	5	S22	0.988	71.6	5
S23	0.994	135.9	6	S23	0.995	136.9	6
S24	0.995	80.9	4	S24	0.996	81.2	4
S25	0.993	97.5	2	S25	0.993	97.7	2
S26	0.991	92.5	2	S26	0.992	92.6	2
S27	0.983	62.1	6	S27	0.983	61.9	6
S28	0.981	112.9	3	S28	0.982	112.6	3
S29	0.997	98.0	1	S29	0.997	98.1	1
S30	0.996	102.2	1	S30	0.996	101.7	1
S31	0.991	80.3	4	S31	0.993	79.9	4
S32	0.992	82.2	4	S32	0.993	81.9	4
S33	0.992	82.6	4	S33	0.992	82.6	4
S34	0.983	60.6	6	S34	0.984	60.2	6
S35	0.995	117.0	4	S35	0.996	117.4	4
RFP	1.000	100.0	1	RFP	1.000	100.0	1

动较大。35 批黄芪的 S_m 值均在 0.95 以上，说明 35 批黄芪样品具有相似的化学成分与组成，质量稳定均一性好，应将全部样品划分为较好的质量（1 级），但实际只有 3 批样品被判定为 1 级（S13、S29、S30），其余样品由于 P_m 值的跨度太大（56.8% ～ 169.5%），质量等级分布在 2 ～ 7 级。基于 SQFM 理论，26 批黄芪的等级评价结果在 1 ～ 5 级可接受的范围内，而剩余的 9 批样品则为 6 ～ 8 级，这也说明 SQFM 能够从定性与定量多方面地评价样品质量，是一种全面、有效的质量评价方法。

2.6　聚类分析

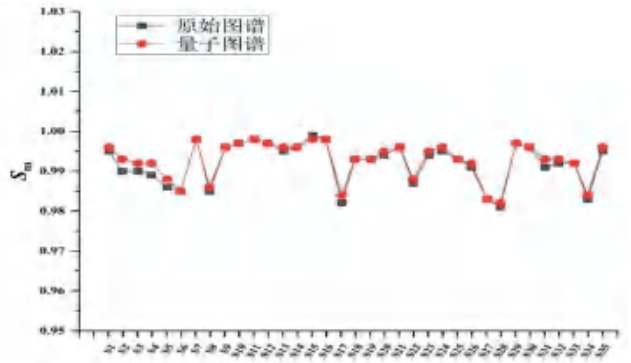

图 3　红外原始图谱与量子图谱的 S_m 对比

Fig 3　S_m between the infrared original fingerprint and quantum fingerprint

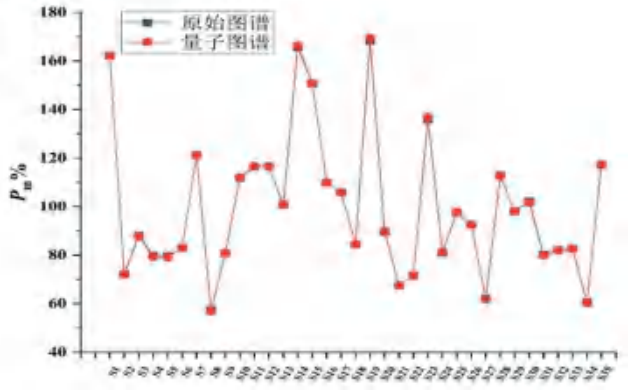

图 4　红外原始图谱与量子图谱的 P_m 对比

Fig 4　P_m between the infrared original fingerprint and quantum fingerprint

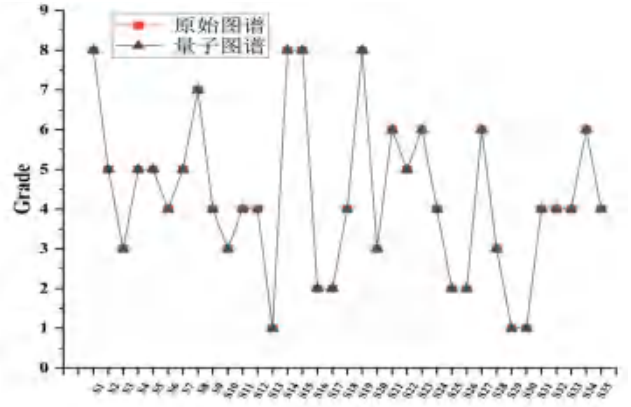

图 5　红外原始图谱与量子图谱的等级对比

Fig 5　Levels between the infrared original fingerprint and quantum fingerprint

使用适当的化学计量学方法分析数据可以有效地获取系统中的有用信息。系统聚类法不仅具有独立的统计功能，还可以与其他统计方法结合使用对数据进行预处理。对聚类后的相似数据建立回归分析，统计分析结果也会更好。采用 SPSS Statistics 26 软件利用组间联接、平方欧氏距离法对 76 个共有红外量子峰的峰面积的数据进行系统聚类分析。由图 6 可知，当欧氏距离为 10 时，35 批黄芪样品可分为两类，其中 S2、S17、S18、S22 聚为一类，而剩余的 31 批样品聚为一类。但

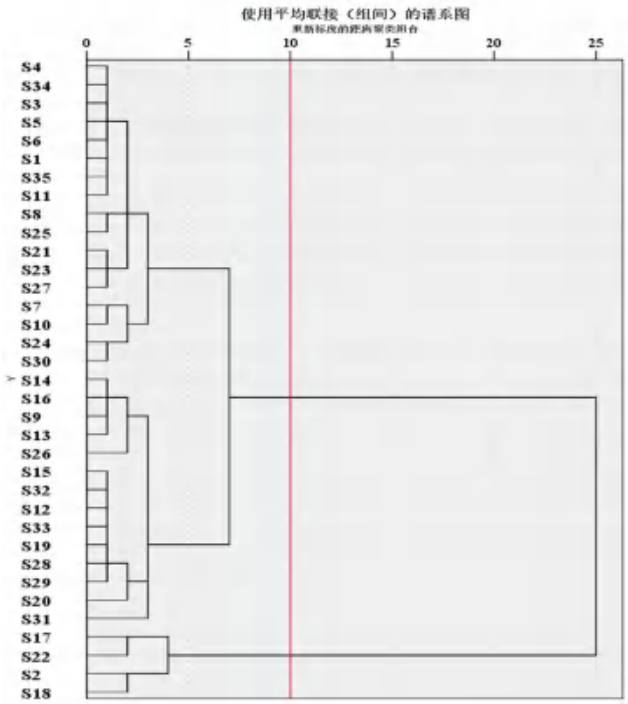

图 6　35 批黄芪样品的系统聚类图

Fig 6　Systematic clustering of 35 batches of Radix astragali samples

与 SQFM 的评价等级结果相比，聚类分析仅能将 35 批样品分成两类，而不能对其进行更加详细的等级分类，这也印证了 SQFM 是一种全面、综合、有效地评级中药质量的方法。

3　结论

中医药是中华民族的重要财富，随着中国社会发展进入新时代，中药在我国医疗卫生事业中的地位日益显著，为我国的经济发展作出了巨大贡献 [15-17]。中药质量是保证中药临床应用安全有效的前提，中药质量相关的研究更是近年来实现中医药事业可持续发展的重中之重 [18]。本研究分析了黄芪药材的红外指纹图谱及量子化的量子指纹图谱，采用 SQFM 对原始图谱与量子图谱分别评价并比较，同时计算原始指纹图谱与量子指纹图谱的 P_m 值的算术平均差 ΔP_m，并使用 t 检验进行统计分析，两者的结果均表明 35 批黄芪药材的指纹图谱与量子指纹图谱差异没有统计学意义。利用量子化后的指纹图谱共有量子峰的峰面积对 35 批黄芪样品进行系统聚类分析仅将 35 批样品分为两类，而 SQFM 可将样品划分为 8 个不同的等级，使评价结果更加准确、直观，比系统聚类分析更有利于黄芪药材的质量评价，因此也可为黄芪的质量评价提供新方向。

参考文献

[1]　中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：315.

[2]　Fu J，Wang ZH，Huang LF，et al. Review of the botanical characteristics，phytochemistry，and pharmacology of Astragalus membranaceus（Huangqi）[J]. Phytother Res，2014，28（9）：1275-1283.

[3]　司晶晶，赵霞，赵鲲鹏，等 . 黄芪主要化学成分及光谱技术在其质量评价中的应用研究进展 [J]. 甘肃中医药大学学报，2022，39（3）：98-105.

[4]　耿淑琴，樊肇胜，刘豪，等 . 短瓣金莲花指标成分的红外光谱快速分析 [J]. 光谱学与光谱分析，2019，39（11）：3624-3628.

[5]　贾豪，雷益铭，张维方，等 . 牛膝药材的红外指纹图谱建立及多元统计分析 [J]. 中国药房，2022，33（2）：153-159.

[6]　孙国祥，杨婷，孙万阳，等 . 中药一致性评价关键技术——中药光谱量子指纹评价中药一致性的理论与应用 [J]. 中南药学，2022，20（7）：1467-1477.

[7]　Zhong WB，Pang Y，Lan LL，et al. Evaluating quality consistency of cigarette by 3 kinds of quantum fingerprints [J]. Spectrochimica Acta，2022，282：121678.

[8]　Yang T，Yang HZ，Ling GX，et al. Evaluating the quality consistency of Keteling capsules by three-dimensional quantum fingerprints and HPLC fingerprint [J]. Spectrochimica Acta，2022，270：120820.

[9]　Li X，Lan LL，Gong DD，et al. Evaluating quality consistency of Mingmu Dihuang pill by 3 kinds of quantum fingerprint combined with anti-oxidation profiling [J]. Microchem J，2022，175：107195.

[10]　Li X，Zhang F，Wang X，et al. Evaluating the quality consistency of Rong’e Yishen oral liquid by UV ＋ FTIR quantum profilings and HPLC fingerprints combined with 3-dimensional antioxidant profiles [J]. Microchem J，2021，170：106715.

[11]　Liu M，Xiao WZ，Zhang H，et al. Quality control strategies of medicine food homology materials based on fingerprint profiling and chemometrics：Citri Reticulata Pericarpium as an example [J]. Spectrochimica Acta，2023，286：121968.

[12]　杨惠智，杨婷，孙万阳，等 . 中药一致性评价新技术——中药太赫兹光谱发展及其量子指纹图谱在中药一致性评价中的应用 [J]. 中南药学，2022，20（7）：1478-1486.

[13]　李雅廉，于静，郭智敏，等 . 金卷升板胶囊挥发性成分气相色谱 - 质谱联用指纹图谱研究 [J]. 中国药业，2022，31（7）：64-67.

[14]　闫慧，孙国祥，孙万阳，等 . 中药一致性评价关键技术——定量指纹图谱联合一线多评法研究 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2237-2244.

[15]　闫慧，孙国祥，迟晗笑，等 . 基于标准制剂控制模式和定量指纹图谱评价复方甘草片的质量一致性 [J]. 色谱，2019，37（11）：1200-1208.

[16]　马双成，王莹，魏锋 . 中药质量控制未来发展方向的思考 [J]. 中国药学杂志，2021，56（16）：1273-1281.

[17]　楚中亚，张博，靳颖颖 . 中药质量控制模式的现状和发展趋势 [J]. 河南医学研究，2021，30（2）：271-273.

[18]　巨珊珊，李耀磊，林志健，等 . 中药质量控制模式的现状分析与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（18）：269-274.

（收稿日期：2023-09-05；修回日期：2023-11-08）

不同材质滤膜对滴眼液中抑菌剂含量的影响

张敬，程婷，周乐春，窦颖辉，倪晓燕*（安徽安科生物工程（集团）股份有限公司，合肥 230088）

摘要：目的 考察不同材质滤膜对滴眼液中苯扎氯铵含量的影响。**方法** 采用材质为聚醚砜（PES）、聚偏二氟乙烯（PVDF）的滤膜过滤滴眼液后，收集滤液，建立高效液相色谱法测定过滤后苯扎氯铵的含量，并对过滤后的滴眼液进行抑菌效力检查。**结果** PVDF 和 PES 膜材过滤前、后的滴眼液中苯扎氯铵含量无明显变化，且过滤后滴眼液的抑菌效力均符合《中国药典》的“A”标准。**结论** PVDF 和 PES 过滤膜材对滴眼液中苯扎氯铵的含量没有影响，即对苯扎氯铵没有吸附作用，此研究为滴眼液的生产提供了过滤膜的选择。

关键词：滴眼液；滤膜；苯扎氯铵；吸附
中图分类号：R943，R927.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1334-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.035

Effect of different filter membranes on bacteriostat content in eye drops

ZHANG Jing, CHENG Ting, ZHOU Le-chun, DOU Ying-hui, NI Xiao-yan* (*Anhui Anke Biotechnology* (*Group*) *Co*., *Ltd*., *Hefei* 230088)

Abstract: Objective To determine the effect of different filter membranes on the content of benzalkonium chloride in eye drops. **Methods** The eye drops were filtered through membranes made of polyether sulfone (PES) and polyvinylidene fluoride (PVDF). The filtrate was collected to determine the content of benzalkonium chloride by an established HPLC method and to check the antimicrobial effectiveness. The eye drops were filtered through membrane made of PES and PVDF. The filtrate was collected to determine the content of benzalkonium chloride by an established HPLC method and to check the antimicrobial effectiveness. **Results** There was no obvious change in benzalkonium chloride content before and after PVDF and PES membrane filtration, and the antimicrobial effectiveness of filtered eye drops met the “A” standard of Chinese Pharmacopoeia. **Conclusion** PVDF and PES filtration membranes have no effect on the content of benzalkonium chloride in eye drops, namely no adsorption effect on benzalkonium chloride. This study helps select filtration membranes in the production of eye drops.

Key words: eye drop; filtration membrane; benzalkonium chloride; adsorption

眼用制剂为无菌制剂，在生产工艺中通常采用除菌过滤的方式来保证药液的无菌性。医药生产企业常用的除菌过滤器按外部构造可分为圆筒式、囊式和平板式，按内部过滤材质主要分为亲水性（水可浸润）除菌过滤器和疏水性（水不可浸润）除菌过滤器[1]。亲水性材质中聚偏二氟乙烯（PVDF）滤膜和聚醚砜（PES）滤膜有良好的稳定性和低吸附性，被广泛地应用在生物制药领域。

2020 年版《中国药典》[2] 规定多剂量包装的滴眼液如果药物本身不具有充分的抗菌效力，则应根据滴眼液特性添加适宜的抑菌剂，以防止滴眼液在正常贮藏或使用过程中由于微生物污染和繁殖，使药物变质而对使用者造成危害。同时，所有抑菌剂都具有一定毒性，所以抑菌剂的添加原则应遵照“最低有效”，即在保证足够抑菌能力的前提下，添加量越少越好[3]。苯扎氯铵属于季铵盐类化合物，具有低过敏性，是滴眼液中最常用的抑菌剂（2009 年针对欧盟 17 个成员国的调查显示约 74%

基金项目：国家科技重大专项项目（No.2011ZX09202-301）。
作者简介：张敬，女，硕士，主要从事制剂开发和已上市制剂的技术改进工作，email：zj68zhangjing@163.com *通信作者：倪晓燕，女，副研究员，硕士研究生导师，主要从事制剂开发和已上市制剂的技术改进工作，email：xiaoyan_nini@163.com

的眼用制剂采用苯扎氯铵为抑菌剂）[4]。有报道称相对于 PES 材质的滤膜，PVDF 材质的滤膜对于苯扎氯铵的吸附性强 [5]，为筛选适用于滴眼液生产的除菌滤膜材质，本试验对过滤前、后滴眼液中苯扎氯铵含量进行了检测，并通过抑菌效力检查考察过滤后的滴眼液是否符合药典相关要求。

1　材料

1.1　仪器

ML203/02 型分析天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]；e2695-2489 型高效液相色谱仪（美国 Waters）；GHP-9080 型隔水式恒温培养箱、MJ-70-I 型霉菌培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）；YXQ-LS-50G 型立式压力蒸汽灭菌器（上海博迅实业医疗器械有限公司）；HTY-302G 型微生物限度检测仪（杭州泰林生物技术设备有限公司）；BHI-1300IIA/B2 型生物安全柜（苏州净化设备有限公司）。

1.2　试药

苯扎氯铵（BAC，湖北葛店人福药用辅料有限责任公司，规格：500 g/ 瓶，批号：F225C200601）；苯扎氯铵对照品（批号：100549-201504，含量：12.19 mg • mL $^{-1}$，中国食品药品检定研究院）；FTKEKV 膜片（PES，11.1 cm^2）、FTKDFL 膜片（PVDF，11.1 cm^2）[颇尔（中国）有限公司]；卵磷脂（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，规格：25 g/ 瓶，批号：K1915226）；聚山梨酯 80（湖南尔康制药股份有限公司，批号：101720200601）；乙腈、三乙胺、冰醋酸等其余试剂均为分析纯；胰酪大豆胨液体培养基（TSB，批号：20210413）、胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA，批号：20191030）、沙式葡萄糖液体培养基（SDB，20200423）、沙式葡萄糖琼脂培养基（SDA，批号：20191125）和 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液（批号：20210318）（青岛高科技工业园海博生物技术有限公司），培养基适用性均符合药典要求。

1.3　菌种

铜绿假单胞菌 [CMCC（B）10104]、金黄色葡萄球菌 [CMCC（B）26003]、白念珠菌 [CMCC（F）98001] 和黑曲霉 [CMCC（F）98003] 均来自中国食品药品检定研究院，试验所用菌株均为第 2 代。

1.4　样品

滴眼液为安徽安科生物工程集团（股份）有限公司实验室自制，批号为 220403，质量符合标准要求。

2　方法与结果

2.1　苯扎氯铵含量检测方法的建立

2.1.1　色谱条件　色谱柱：Waters XBridge C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈 -5 mmol • L $^{-1}$ 醋酸铵溶液（含 1% 三乙胺，用冰醋酸调节 pH 至 5.0）（65∶35，*V*/*V*）；流速：1.0 mL • min $^{-1}$；检测波长：214 nm；柱温：30 ℃；进样量：20 μL；采集时间：30 min。

2.1.2　样品的制备

① 空白溶液：即流动相溶液，称取醋酸铵 0.385 g，加入 950 mL 注射用水搅拌至溶解，加入 10 mL 三乙胺，搅拌均匀，再用冰醋酸调节 pH 至 5.0 后定容至 1000 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤后取 350 mL，与 650 mL 乙腈混匀即得。

② 阴性样品溶液：取按 2 倍处方量配制不含苯扎氯铵的滴眼液直接作为阴性样品溶液。

③ 供试品溶液：取实验室自制滴眼液直接作为供试品溶液。

④ 对照品溶液：精密量取 1.6 mL 苯扎氯铵对照品，置 50 mL 量瓶中，用注射用水定容至刻度，摇匀作为储备液。精密量取储备液 1.2 mL，加注射用水 6.6 mL 稀释制成质量浓度为 60 μg • mL $^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.3　专属性考察　取“2.1.2”项下空白溶液、阴性样品溶液、供试品溶液、对照品溶液，分别按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。由图 1 所知，苯扎氯铵对照品 C_{12} 和 C_{14} 色谱峰保留时间分别为 8.083 min 和 15.916 min，分离度为 20.06，供试品溶液的苯扎氯铵 C_{12} 和 C_{14} 色谱峰保留时间分别为 8.072 min 和 15.890 min，分离度为 19.84，符合要求。空白溶液和阴性样品在苯扎氯铵 C_{12} 和 C_{14} 色谱峰保留时间处无吸收峰，无其他色谱峰干扰苯扎氯铵的测定，表明方法专属性良好。

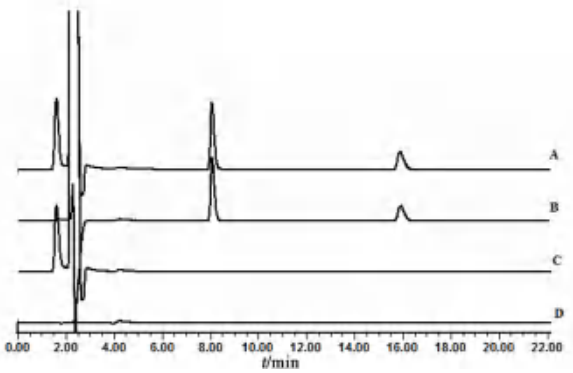

图 1　供试品溶液（A）、对照品溶液（B）、空白溶液（C）、阴性样品溶液（D）色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of test solution（A），reference solution（B），blank solution（C）and negative sample solution（D）

2.1.4　线性范围　精密量取苯扎氯铵对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 补注射用水至 3.9 mL，稀释制成质量浓度为 20、40、60、80、100

μg • mL^{-1} 的苯扎氯铵对照品溶液。按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，以 340×C_{12} 峰面积与 368×C_{14} 峰面积之和（Y）为纵坐标，质量浓度（X）为横坐标，绘制标准曲线，并计算回归方程得：$Y = 6.306\times10^{6}X - 3.156\times10^{6}$，$R^2 = 0.9996$。结果表明，苯扎氯铵在 20 ～ 100 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5　重复性　取苯扎氯铵对照品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件连续测定 6 次，苯扎氯铵 C_{12} 和 C_{14} 色谱峰保留时间的 *RSD* 分别为 0.020% 和 0.010%，峰面积的 *RSD* 分别为 0.31% 和 1.2%。结果表明，此方法重复性良好。

2.1.6　精密度　取供试品 6 支，按照“2.1.1”项下色谱条件分别进样测定，苯扎氯铵 C_{12} 和 C_{14} 色谱峰保留时间的 *RSD* 分别为 0.012% 和 0.0063%，峰面积的 *RSD* 分别为 0.38% 和 0.76%。结果表明，此方法精密度良好。

2.1.7　回收率　精密量取苯扎氯铵对照品储备液 0.96、1.20、1.44 mL，分别加注射用水 2.94、2.70、2.46 mL 进行稀释，混匀后，分别取 1.0 mL 加入 1.0 mL 阴性样品溶液中混匀，制成高、中、低 3 个不同浓度的样品溶液，平行制备 3 份。按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算回收率。结果显示，高、中、低浓度的样品中苯扎氯铵平均回收率分别为 99.54%、99.62%、98.27%，*RSD* 值分别为 1.0%、0.22%、0.68%。

2.1.8　样品稳定性　将供试品溶液放置于 2 ～ 8 ℃环境中，分别于 0、1、2、4、8、12 h 取样，按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录保留时间和峰面积。结果显示，供试品中苯扎氯铵 C_{12} 和 C_{14} 色谱峰保留时间的 *RSD* 分别为 0.0068% 和 0.012%，峰面积的 *RSD* 分别为 0.65% 和 0.87%。表明供试品溶液在 2 ～ 8 ℃放置 12 h 内稳定性良好。

2.1.9　耐用性

① 流速：将色谱条件中的流速分别设定为 0.9、1.0、1.1 mL • min^{-1}，其余色谱条件不变，取苯扎氯铵对照品溶液和供试品溶液分别进样，外标法考察流速对测定供试品中苯扎氯铵含量的影响。结果在 3 种流速下，供试品中苯扎氯铵含量测定值 *RSD* 为 0.53%。说明流动性流速的微小变化对测定结果没有影响。

② 温度：将色谱条件中的柱温分别设定为 25、30、35 ℃，其余色谱条件不变，取苯扎氯铵对照品溶液和供试品溶液分别进样，外标法考察流速对测定供试品中苯扎氯铵含量的影响。结果在 3 种柱温下，供试品中苯扎氯铵含量测定值 *RSD* 为 2.2%。说明柱温对苯扎氯铵含量测定有影响，测定时应注意控制柱温。

2.2　*存活菌数计数方法的确定*

若产品由于抑菌剂或处方原因而具有抑菌性，需对抑菌性进行中和以复苏存活微生物。一般通过使用中和剂、稀释法、薄膜过滤法或几种方法联合使用，实现中和作用[6-8]。参考 2020 年版《中国药典》四部通则 1105“微生物计数法”对滴眼液中存活菌数计数方法进行方法学适用性研究，确定适合对本品抑菌效力检查的计数方法。

苯扎氯铵具有较强的抑菌活性，含 0.5% 聚山梨酯 80 ＋ 1% 卵磷脂的稀释液可消除含量为 0.1% 苯扎氯铵的抑菌活性且对微生物无毒性[9]。本试验样品中苯扎氯铵的含量小于 0.01%，考虑卵磷脂不易溶解的特性，选用 0.5% 聚山梨酯 80 ＋ 0.1% 卵磷脂作为中和剂，联合薄膜过滤法，以中和苯扎氯铵的抑菌活性。

2.2.1　菌液的制备　取冷冻保存的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌，室温下溶化后，取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的冻存物至 TSB 中，30 ～ 35 ℃培养 18 ～ 24 h；取白念珠菌的冻存物至 SDB 中，20 ～ 25 ℃培养 48 h，上述培养物离心收集菌体，用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释并制成每 1 mL 含菌数约为 1×10^{8} cfu 的菌悬液，采用梯度稀释进行计数。取黑曲霉的斜面培养物加入适量含 0.05%（mL/mL）聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液，用接种环刮下孢子，然后用无菌纱布过滤至无菌试管内，用含 0.05%（mL/mL）聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含孢子数 1×10^{8} cfu 的孢子悬液。测定 1 mL 菌悬液中所含的孢子数。

2.2.2　计数方法适用性　取两种膜过滤除菌后的供试品溶液，用含 0.5% 聚山梨酯 80 ＋ 0.1% 卵磷脂的 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液稀释制成 1∶10 的供试液。取供试液 40 mL，均分为 4 份，每份加入 100 μL 各试验菌适宜浓度的菌悬液，混匀，使含菌量不大于 100 cfu • mL^{-1}。取 1 mL 供试液加入薄膜过滤器中，用 100 mL pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗 1 次，冲洗结束后，取下滤膜，薄膜菌面朝上贴于适宜培养基平板，平行制备 2 张滤膜，置于规定温度培养，细菌培养不超过 3 d，真菌培养不超过 5 d，记录菌落数，作为试验组。取 10 mL 供试液，以稀释液代替菌液同试验组操作，作为供试品对照组。取 10 mL 试

验用稀释液替代供试液，加入等量试验菌同试验组操作，作为菌液对照组。两种供试液同法操作，平行试验 3 次，根据菌落计数结果，按以下公式计算回收率：

回收率（%）＝（试验组菌落数－供试品对照组菌落数）/ 菌液对照组菌落数 ×100%。

结果显示，各试验菌的回收率均大于 50%，符合抑菌效力检查要求，结果见表 1。

表 1　试验菌的回收比值（$\bar{x}\pm s$，%，$n=3$）

Tab 1　Recovery of test bacteria（$\bar{x}\pm s$，%，$n=3$）

菌种	PES 滤膜	PVDF 滤膜
金黄色葡萄球菌	98.24±2.26	97.83±2.12
铜绿假单胞菌	94.45±4.19	98.21±3.23
白念珠菌	99.20±3.29	95.24±4.26
黑曲霉	91.24±3.46	97.74±3.51

2.3　不同过滤膜对滴眼液中苯扎氯铵含量及其抑菌效力的影响

2.3.1　对苯扎氯铵含量的影响　取实验室自制滴眼液溶液两份，每份 1000 mL，分别采用 PES 膜、PVDF 膜片除菌过滤，压差 2.0 bar。分别收集滤前、50、100、150、200、300、400、1000 mL。按照“2.1.1”项下色谱条件测定苯扎氯铵含量，过滤前后按以下公式计算吸附率，结果见表 2。

吸附率（%）＝[过滤前苯扎氯铵含量（94.9%）－过滤后苯扎氯铵含量] ／过滤前苯扎氯铵含量 ×100%。

当过滤后苯扎氯铵含量检测结果大于等于过滤前时，吸附率按“0”计算。

结果显示，随着过滤体积的增大，苯扎氯铵的含量没有明显变化，与过滤前的基本一致，可见两种过滤膜材对滴眼液中苯扎氯铵没有吸附作用，对其含量没有影响。

表 2　不同滤膜过滤后滴眼液中苯扎氯铵含量及吸附率对比

Tab 2　Content and adsorption of benzalkonium chloride after the filtration via different membranes

滤液 /mL	PES 滤膜		PVDF 滤膜	
	苯扎氯铵含量 /%（理论值的百分比）	吸附率 /%	苯扎氯铵含量 /%（理论值的百分比）	吸附率 /%
50	94.1	0.8	94.9	0
100	94.5	0.4	95.6	0
150	95.2	0	94.9	0
200	96.9	0	97.0	0
300	95.7	0	95.8	0
400	95.0	0	95.4	0
1000	94.4	0.5	96.3	0

2.3.2　对苯扎氯铵抑菌效力的影响　将“2.3.1”项下采用两种滤膜过滤后的滴眼液分别灌装于无菌的滴眼液瓶中，每支装 10 mL。每种滤膜过滤后的供试品各取 4 支，10 mL/ 支，分别接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌和黑曲霉菌液，使接种后供试液染菌量最终浓度为 $1\times10^5\sim1\times10^6$ cfu·mL^{-1}，充分混匀，25 ℃避光保存。分别于接种后的规定时间点，取 1 mL 供试品，加到 9 mL 含 0.5% 聚山梨酯 80 ＋ 0.1% 卵磷脂的 pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液中，以 10 倍梯度稀释至适宜梯度，取 1 mL 供试液，用 100 mL pH 7.0 氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗过滤。滤膜贴于适宜培养基，在规定温度下培养适宜时间，记录存活菌数，并计算成 lg 值。两种滤膜过滤后的滴眼液抑菌效力测定结果见表 3。

表 3　不同滤膜过滤后的滴眼液抑菌效力测定结果

Tab 3　Bacteriostatic efficacy of eye drops after the filtration via different membranes

滤膜	菌种	接种菌数（lg 值）	减少的 lg 值					级别
			6 h	24 h	7 d	14 d	28 d	
PES 滤膜	金黄色葡萄球菌	6.6	6.6	6.6	6.6	/	6.6	A
	铜绿假单胞菌	6.5	5.2	6.5	6.5	/	6.5	
	白念珠菌	6.3	/	/	6.3	6.3	6.3	
	黑曲霉	6.2	/	/	6.2	6.2	6.2	
PVDF 滤膜	金黄色葡萄球菌	6.6	6.6	6.6	6.6	/	6.6	A
	铜绿假单胞菌	6.5	6.5	6.5	6.5	/	6.5	
	白念珠菌	6.3	/	/	6.3	6.3	6.3	
	黑曲霉	6.2	/	/	6.2	6.2	6.2	

结果显示，两种滤膜过滤后的滴眼液对所有试验菌均有较强的抑制，细菌组（金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌）在 24 h 内均被完全杀死，真菌组（白念珠菌、黑曲霉）在 7 d 内均被完全杀死，28 d 时均未恢复生长。两种滤膜过滤后的滴眼液抑菌效力均符合 2020 年版《中国药典》“1121 抑菌效力检查法”[2] 中有关眼用制剂要求的“A”标准。

3　讨论

3.1 滤膜材质对苯扎氯铵的吸附作用

本试验拟考察不同滤膜膜材对实验室自制的滴眼液中抑菌剂含量的影响，即固定某一种药液，采用同一批药液，经过两种不同材质滤膜过滤，并收集不同体积的滤液进行检测，探讨不同滤膜材质对苯扎氯铵的吸附作用。本研究发现 PVDF 材质和 PES 材质的滤膜对本实验室配制的滴眼液中苯扎氯铵的含量均无明显影响，即均无明显吸附作用。吸附作用是在滤膜过滤药液时常见的一种现象，与药液浓度、过滤时的流速、接触时间、抑菌剂浓度、温度和 pH 等因素有关[10]。覃辉等[5]认为材质为 PVDF 的滤膜对于加替沙星滴眼液中苯扎氯铵有一定的吸附作用，而材质为 PES 的滤膜对于滴眼液中苯扎氯铵无吸附作用，这与本研究结果不同。因此，采用除菌过滤工艺的药液，在不同研究阶段，尤其是不同规模、不同工艺条件时，均应关注滤膜的吸附作用，并进行相关研究。

3.2 抑菌效力的思考

2010 年版《中国药典》首次收载了“抑菌剂效力检查法指导原则”；2015 年版《中国药典》修订为“1121 抑菌效力检查法”，将抑菌效力试验由建议性的指导原则修订为通用性控制要求，可见抑菌剂的合理使用和质量控制已经成为保证眼用滴眼液安全有效的关键问题之一[11]。苯扎氯铵作为目前滴眼液中应用最为广泛的抑菌剂，其具有较好的安全性，常用剂量为 0.004% ～ 0.01%[12]，但也有文献报道其能破坏角膜上皮屏障，引起变态反应性结膜炎及视力减退等[13]，因此滴眼液在筛选处方时，严格遵从“最低有效量”原则，本研究通过考察含不同浓度苯扎氯铵的滴眼液的抑菌效力，确定了最佳添加量。如果除菌过滤膜对苯扎氯铵有吸附作用，其抑菌效力可能会受到影响。为考察过滤膜对滴眼液中苯扎氯铵的吸附影响，本研究进一步对不同材质滤膜进行除菌过滤后的滴眼液进行了抑菌效力评价，结果均符合药典要求，表明 PES 和 PVDF 两种滤膜对滴眼液中苯扎氯铵的抑菌效力未产生影响，即对苯扎氯铵没有吸附作用。

参考文献

[1] 靳文静，韩天娇，乔龙娟 . 除菌过滤器在医药领域的应用 [J]. 科技论坛，2013（10）：95-96.

[2] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：176-177.

[3] 杨晓莉，贺聪莹，绳金房，等 . 中国药典 2015 年版抑菌效力检查法解读 [J]. 中国药师，2016，19（9）：1740-1742.

[4] 申际丽，龚青，张新房，等 . 儿童用药中使用抑菌剂时的关注点及注册申报要求 [J]. 中国医药工业杂志，2022，53（11）：1599-1605.

[5] 覃辉，张茜倩 . 不同材质滤膜对于加替沙星滴眼液中抑菌剂的吸附性研究 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（14）：1379-1382.

[6] 甘永琦，农浚，黄慧，等 . 盐酸美沙酮口服溶液中抑菌剂处方合理性评价及污染菌鉴定分析 [J]. 药物分析杂志，2020，40（12）：2193-2200.

[7] 姬俊，刘婷婷，牛萌萌，等 . 卵磷脂和聚山梨酯 -80 联用在中药制剂抑菌活性中的中和作用 [J]. 中国药师，2017，20（3）：586-588.

[8] 宋玉梦，周红艳，黄鑫，等 . 茶树精油对变异链球菌抑菌浓度及效力的探究 [J]. 实用口腔医学杂志，2020，36（5）：701-705.

[9] 秦涛 . 常用化学消毒剂手部消毒效果观察 [J]. 国际检验医学杂志，2011，32（9）：1010-1011.

[10] 黄晓龙，董巍，唐燕，等 . 除菌过滤器验证（一）：法规要求概述 [J]. 中国新药杂志，2011，20（10）：861-865.

[11] 尚悦，韩鹏，许华玉 . 关于眼用滴眼液中添加抑菌剂的思考 [J]. 中国药品标准，2014，15（1）：12-14.

[12] 宁黎丽 . 眼用滴眼液研发过程中应注意抑菌剂的合理使用和质量控制 [J]. 中国药学杂志，2007，42（23）：1836-1838.

[13] 李宁，陈松杰，陈彦纯，等 . 聚季铵盐 -1 和苯扎氯铵在眼用滴眼液中的应用研究进展 [J]. 今日药学，2015，25（2）：140-143.

（收稿日期：2023-09-18；修回日期：2023-10-20）

基于 HPLC 和化学计量法分析蜘蛛香不同部位 3 类化合物 10 种成分差异研究

程盛勇[1]，胡光线[2]，付志丽[1]，沈祥春[3]，杨军[4]，罗喜荣[3*]（1.贵州护理职业技术学院 基础医学部，贵阳 550025；2.贵州中观生物技术有限公司，贵阳 550081；3.贵州医科大学 药学院，贵阳 561113；4.中国科学院 地球化学研究所，贵阳 550081）

摘要：目的 对蜘蛛香不同部位中酚酸类（新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C），黄酮类（橙皮苷、蒙花苷）及缬草三酯类（乙酰缬草三酯、缬草三酯）化合物含量进行测定，结合化学模式识别比较含量差异。**方法** 采用 HPLC 法对蜘蛛香地上部位（叶）和地下部位（根茎和根）中 10 种成分含量进行测定，对结果进行聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘判别分析。**结果** 地上部位 10 种成分平均含量绿原酸＞异绿原酸 A ＞蒙花苷＞缬草三酯＞橙皮苷＞异绿原酸 C ＞乙酰缬草三酯＞异绿原酸 B ＞新绿原酸＞咖啡酸，地下部位 10 种成分平均含量缬草三酯＞异绿原酸 A ＞橙皮苷＞绿原酸＞乙酰缬草三酯＞异绿原酸 C ＞异绿原酸 B ＞蒙花苷＞新绿原酸＞咖啡酸；蜘蛛香不同部位酚酸类和黄酮类含量均为地上部位＞地下部位，缬草三酯类含量为地下部位＞地上部位；造成蜘蛛香不同部位差异的标志物为缬草三酯、蒙花苷、橙皮苷。**结论** 蜘蛛香各部位样品中 10 个成分的含量存在较大差异；蜘蛛香的非药用部位也含有大量的酚酸类、黄酮类和缬草三酯类，应充分利用，避免中药资源的浪费。

关键词：蜘蛛香；不同部位；HPLC；化学计量学；含量测定
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1339-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.036

Differences of 10 components in 3 types of compounds from different parts of *Valeriana jatamansi* Jones based on HPLC and chemometrics

CHENG Sheng-yong[1], HU Guang-xian[2], FU Zhi-li[1], SHEN Xiang-chun[3], YANG Jun[4], LUO Xi-rong[3*] (1. *Department of Medicine Basic Sciences*, *Guizhou Nursing Vocational College*, *Guiyang* 550025; 2. *Guizhou Zhongguan Biotechnology Co.*, *Ltd.*, *Guiyang* 550081; 3. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 561113; 4. *Institute of Geochemistry*, *Chinese Academy of Sciences*, *Guiyang* 550081)

Abstract: Objective To determine the content of 10 components in 3 types of compounds, including phenolic acids (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, and isochlorogenic acid C), flavonoids (hesperidin and linarin), and valerian triglycerides (valepotriate and acevaltrate) from different parts of *Valeriana jatamansi*, and compare the content differences by combining chemical pattern recognition. **Methods** The content of 10 components in the aboveground parts (leaves) and underground parts (rhizomes and roots) of *Valeriana jatamansi* was detected by HPLC. Hierarchical clustering analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were conducted. **Results** The average content order of 10 components in the aboveground part were as follows: chlorogenic

基金项目：贵州省科技创新基地（黔科合中引地 [2023]003）；贵州省科技计划项目（黔科合基础 -ZK[2023] 一般 126）；贵州护理职业技术学院硕士基金课题（No. gzhlyj2023-16）；贵州护理职业技术学院硕士基金课题（No. gzhlyj2022-06）。
作者简介：程盛勇，男，助教，硕士研究生，主要从事中药民族药及药效物质基础研究，email：1950349547@qq.com
[*]**通信作者：**罗喜荣，女，教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物化学研究，email：1341323603@qq.com

acid ＞ isochlorogenic acid A ＞ linarin ＞ valepotriate ＞ hesperidin ＞ isochlorogenic acid C ＞ acevaltrate ＞ isochlorogenic acid B ＞ neochlorogenic acid ＞ caffeic acid, while the average content of 10 components in the underground part were valepotriate ＞ isochlorogenic acid A ＞ hesperidin ＞ chlorogenic acid ＞ acevaltrate ＞ isochlorogenic acid C ＞ isochlorogenic acid B ＞ linarin ＞ neochlorogenic acid ＞ caffeic acid. The content of both phenolic acids and flavonoids in the different parts of *Valeriana jatamansi* were aboveground part ＞ underground part, and the content of valerian triglycerides was underground part ＞ aboveground part. The markers that caused differences included valepotriate, linarin, and hesperidin. **Conclusion** There are obvious differences in the content of 10 components in different parts of *Valeriana jatamansi*. The non-medicinal parts of *Valeriana jatamansi* also contain a large amount of phenolic acids, flavonoids, and valepotriates, which may be utilized.

Key words: *Valeriana jatamansi* Jones; different part; HPLC; chemometrics; content determination

蜘蛛香（*Valeriana jatamansi* Jones）因其须形如蜘蛛，且有浓烈香味而得名，又因其叶形如马蹄，又名马蹄香，为多年生草本，主要分布于贵州、云南等地区，是唯一被《中国药典》2020 年版收载的缬草类生药，为败酱科缬草属植物[1]。蜘蛛香性温、味辛、微苦，具有镇静安神、理气止痛、消炎止泻、祛风除湿之功效，用于治疗脘腹胀痛、呕吐泄泻、风寒湿痹等[1]。蜘蛛香化学成分丰富，主要含有挥发油、酚酸类、黄酮类、缬草三酯类化合物[2-5]，现代药理学研究表明蜘蛛香具有抗肿瘤、抗焦虑、神经保护、保肝、抗氧化等药理作用[6-7]。蜘蛛香传统以地下部位（根茎和根）入药，是许多附方和中成药的首选主药[8-9]，其地上部位（叶）作为非药用部位常被丢弃，造成极大的资源浪费，本课题组前期已建立了蜘蛛香不同部位（地上部位和地下部位）HPLC 指纹图谱的方法，并建立了 HPLC 法同时测定蜘蛛香地下部位（根茎和根）中多种成分的含量[10-13]。但目前未见关于蜘蛛香不同部位（地上部位和地下部位）多种成分的含量测定，且不同部位的成分的含量差异尚未见报道。基于此，本研究采用 HPLC 法同时测定蜘蛛香不同部位，3 种化学结构类型 10 种成分（包括 6 个酚酸类、2 个黄酮类、2 个缬草三酯类）含量，并利用聚类分析（HCA）、主成分分析（PCA）及偏最小二乘判别分析（PLS-DA）等化学计量学分析技术从化学成分的角度比较分析蜘蛛香不同部位 10 种成分含量的差异，以期为蜘蛛香药材进一步合理开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；FW177 型中草药粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）；KQ3200E 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；BSA224S 型电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）。

1.2 试药

蜘蛛香药材采自贵州、云南等地，经贵州医科大学覃容贵教授鉴定为败酱科植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥地上部位（叶）和地下部位（根茎和根），详见表 1。新绿原酸（批号：MUST-15011412，含量：99.37%）、绿原酸（批号：MUST-15041814，含量：99.39%）、咖啡酸（批号：MUST-15090803，含量：99.99%）、异绿原酸 B（批号：MUST-15081411，含量：99.05%）、异绿原酸 A（批号：MUST-15042518，含量：98.82%）、异绿原酸 C（批号：MUST-15081414，含量：99.84%）（成都曼思特生物科技有限公司）；橙皮苷（批号：110721-201316，含量：95.3%，中国食品药品检定研究院）；蒙花苷（批号：wkq19041605，含量：98.00%）、乙酰缬草三酯（批号：wkq16072004，含量：98.86%）、缬草三酯（批号：wkq16011203，含量：98.21%）（四川维克奇生物科技有限公司）。乙腈、甲醇为色谱纯，水为娃哈哈纯净水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 18 min，12% ～ 30%A；18 ～ 20 min，30% ～ 32%A；20 ～ 23 min，32% ～ 40%A；23 ～ 25 min，40%A；25 ～ 33 min，40% ～ 53%A；

表 1　蜘蛛香样品信息

Tab 1　Sample information of *Valeriana jatamansi*

批次	产地	部位	采集时间
S1	贵州惠水	地上部位（叶）	2017-06-03
S2	贵州惠水	地下部位（根茎和根）	2017-06-03
S3	贵州惠水	地上部位（叶）	2017-08-07
S4	贵州惠水	地下部位（根茎和根）	2017-08-07
S5	贵州贵阳	地上部位（叶）	2017-06-09
S6	贵州贵阳	地下部位（根茎和根）	2017-06-09
S7	贵州惠水	地上部位（叶）	2017-08-08
S8	贵州惠水	地下部位（根茎和根）	2017-08-08
S9	云南保山	地上部位（叶）	2017-08-19
S10	云南保山	地下部位（根茎和根）	2017-08-19

33 ～ 90 min，53% ～ 85%A）；流速：1 mL·min^{-1}；检测波长：0 ～ 33 min 为 327 nm，33 ～ 90 min 为 256 nm；柱温：30 ℃；进样量：20 μL。

2.2　溶液的制备

2.2.1　供试品溶液的制备　参考课题组前期研究[14]，取本品粉末（过 60 目筛）0.2 g 置棕色 EP 管中，加入 50 倍量的 66% 乙醇，称定重量，于 37 ℃超声（功率 200 W，频率 35 kHz）提取 34 min，放置至室温，称定重量，用 66% 乙醇补足减失的重量，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.2.2　混合对照品溶液的制备　精密称取各对照品适量，加甲醇溶解并稀释成每 1 mL 分别含新绿原酸 120.00 μg、绿原酸 418.00 μg、咖啡酸 44.00 μg、异绿原酸 B 210.00 μg、橙皮苷 220.00 μg、异绿原酸 A 330.00 μg、异绿原酸 C 150.00 μg、蒙花苷 286.12 μg、乙酰缬草三酯 200.00 μg、缬草三酯 800.00 μg 的混合对照品溶液。

2.3　线性关系考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量，逐级稀释到不同质量浓度，按“2.1”项下色谱条件进样，以混合对照品溶液中各指标成分的质量浓度为横坐标（x），峰面积为纵坐标（y），绘制标准曲线，得 10 种成分的回归方程，结果见表 2。表明 10 种成分在线性浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.4　专属性试验

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液和供试品溶液各 20 μL，按照“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图见图 1。对照品、供试品的峰形较好，分离度均大于 1.5，且理论塔板数均大于 3000，表明该方法专属性良好。

2.5　精密度试验

取 S6 样品按“2.2.1”项下方法制备供试品溶

表 2　10 种成分的回归方程及线性关系

Tab 2　Regression equation and linearity of 10 components

成分	回归方程	r	线性范围 /（μg·mL^{-1}）
新绿原酸	y = 44.803x − 6.9941	1.0000	0.60 ～ 120.00
绿原酸	y = 29.425x − 1.9011	1.0000	4.18 ～ 418.00
咖啡酸	y = 93.588x − 23.789	1.0000	0.44 ～ 44.00
异绿原酸 B	y = 42.555x − 65.695	1.0000	2.10 ～ 210.00
橙皮苷	y = 2.2284x + 0.6913	1.0000	2.20 ～ 220.00
异绿原酸 A	y = 22.336x − 41.309	0.9998	3.30 ～ 330.00
异绿原酸 C	y = 44.873x − 68.990	1.0000	1.50 ～ 150.00
蒙花苷	y = 21.047x − 24.700	0.9998	2.86 ～ 286.12
乙酰缬草三酯	y = 51.693x − 22.503	1.0000	2.00 ～ 200.00
缬草三酯	y = 40.567x − 66.907	1.0000	8.00 ～ 800.00

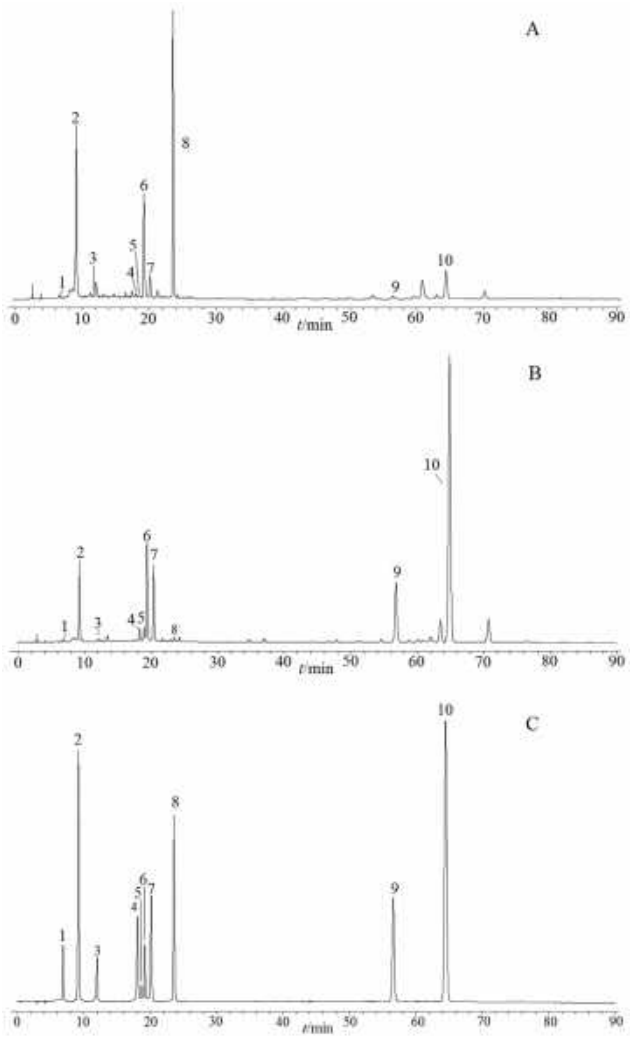

图 1　蜘蛛香地上部位（A）（S5）、地下部位（B）（S6）和混合对照品（C）HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of *Valeriana jatamansi* aboveground parts（A）（S5），underground parts（B）（S6），and mixed reference substance（C）

1. 新绿原酸（nechlorogenic acid）；2. 绿原酸（chlorogenic acid）；3. 咖啡酸（caffeic acid）；4. 异绿原酸 B（isochlorogenic acid B）；5. 橙皮苷（hesperidin）；6. 异绿原酸 A（isochlorogenic acid A）；7. 异绿原酸 C（isochlorogenic acid C）；8. 蒙花苷（linarin）；9. 乙酰缬草三酯（acevaltrate）；10. 缬草三酯（valepotriate）

液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积，计算 10 种成分的峰面积 *RSD* 值，结果 *RSD* 为 0.25% ～ 1.6%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取 S6 样品按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录峰面积，计算 10 种成分的平均含量及其 *RSD*。结果 10 种成分的平均含量分别为 0.006%、0.291%、0.006%、0.047%、0.829%、0.495%、0.217%、0.038%、0.173%、1.018%，*RSD* 分别为 0.00%、2.7%、0.00%、1.6%、0.99%、1.4%、1.5%、1.4%、1.4%、0.89%，表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取 S6 样品按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、3、6、9、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样，记录峰面积，计算 10 种成分的峰面积 *RSD*。结果 10 种成分的峰面积 *RSD* 在 0.27% ～ 2.3%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收试验

取 S6 样品 6 份，精密称定，每份 0.02 g，分别加入混合对照品溶液适量，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，记录峰面积，计算 10 种成分的平均加样回收率和 *RSD* 值。10 种成分的平均加样回收率为 100.33% ～ 109.01%，*RSD* 在 0.54% ～ 2.3%，表明方法的准确度良好。

2.9 10 种成分含量测定

取表 1 样品按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录峰面积，计算蜘蛛香不同部位中 10 种成分含量，样品测定结果见表 3。蜘蛛香不同部位 3 个类别化学成分含量差异柱状图见图 2，结果显示，蜘蛛香不同部位中酚酸类、黄酮类、缬草三酯类成分的含量分布差异较大，以酚酸类或黄酮类成分含量计：地上部分（叶）＞地下部分（根茎和根），以缬草三酯类成分含量计：地下部分（根茎和根）＞地上部分（叶）。

2.10 蜘蛛香不同部位差异性成分表征

2.10.1 聚类分析 将各样品 10 种成分的含量导入 SIMCA 14.1 软件进行聚类分析，结果见图 3。聚类分析结果表明，当判别距离为 5 时，不同部位的蜘蛛香样品可大致分成两类：第 1 类为 S1、S3、S5、S7、S9，是地上部位（叶）样品；第 2 类为 S2、S4、S6、S8、S10，是地下部位（根茎和根）样品，说明蜘蛛香在地上部位和地下部位中含量存在差异。当判别距离为 2.5 时，可以发现相同部位之间的含量差异较小。

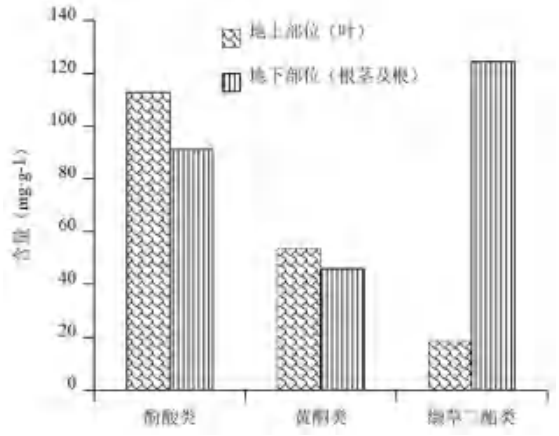

图 2 蜘蛛香中 3 种类型化合物含量分布图

Fig 2 Distribution of 3 types of compound content in *Valeriana jatamansi*

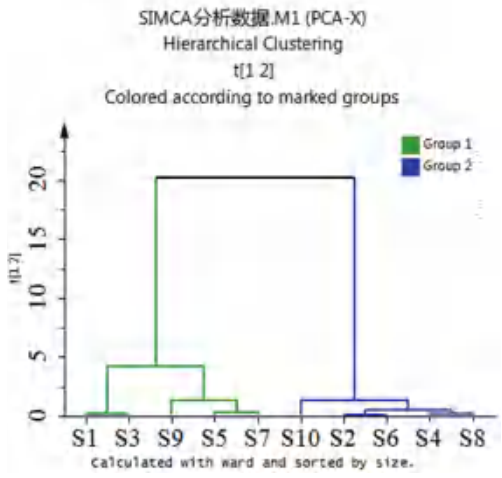

图 3 蜘蛛香不同部位聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis of different parts of *Valeriana jatamansi* tree chart

2.10.2 主成分分析 以 10 个成分的含量为变量导入 SIMCA 14.1 软件，进行主成分分析，选择相关性矩阵，计算主成分特征值、方差贡献率，结果见表 4。前两个主成分的特征值＞ 1，累计方差贡献率为 91.50%，能反映不同部位蜘蛛香样品 91.50% 的信息。根据得到的主成分建立模型，其中能力解释参数 R^2X 为 0.915，Q^2 为 0.788，模型区分度和预测程度均良好。主成分分析得分图见图 4。10 批不同部位蜘蛛香样品可根据部位分为两组，与聚类分析结果一致，结果表明，蜘蛛香不同部位化学成分含量差异较大。

2.10.3 正交偏最小二乘判别分析 为了进一步明确蜘蛛香不同部位的差异性成分，在主成分分析的基础上，进行正交偏最小二乘判别分析，

表 3　蜘蛛香不同部位 10 种指标成分的含量 (mg・g^{-1}，n = 3)

Tab 3　Content of 10 index components in different parts of *Valeriana jatamansi* (mg・g^{-1}，n = 3)

部位		酚酸类						黄酮类		缬草三酯类	
		新绿原酸	绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	橙皮苷	蒙花苷	乙酰缬草三酯	缬草三酯
地上部分	S1	0.064	5.126	0.025	0.159	4.707	0.616	0.875	11.040	0.169	1.316
	S3	0.123	7.121	0.030	0.198	5.060	0.419	1.064	9.722	0.148	3.160
	S5	0.136	12.210	0.022	0.189	14.129	1.050	0.949	13.832	0.178	1.955
	S7	0.117	12.214	0.022	0.264	10.756	1.042	0.861	7.451	0.215	4.248
	S9	0.179	19.432	0.037	0.307	16.513	0.643	0.116	7.486	2.189	4.650
	均值	0.124	11.221	0.026	0.223	10.457	0.754	0.773	9.906	0.580	3.066
地下部分	S2	0.063	3.658	0.065	0.517	6.729	2.681	9.626	0.420	3.475	21.264
	S4	0.090	5.311	0.053	0.750	9.865	4.556	10.999	0.546	3.759	25.794
	S6	0.058	3.528	0.057	0.474	6.475	2.433	8.302	0.384	3.206	20.852
	S8	0.088	7.251	0.033	0.683	8.578	3.886	10.850	0.400	2.418	22.711
	S10	0.052	5.624	0.033	0.911	13.533	3.043	3.875	0.452	7.601	13.378
	均值	0.070	5.074	0.048	0.667	9.036	3.320	8.955	0.440	4.092	20.800

表 4　主成分的累计方差贡献率及特征值

Tab 4　Cumulative variance contribution rate and eigen values of principal components

主成分	特征值	累计方差贡献率 /%	主成分	特征值	累计方差贡献率 /%
1	7.11	71.15	4	0.20	99.50
2	2.04	91.50	5	0.03	99.80
3	0.60	97.50	6	0.01	100.00

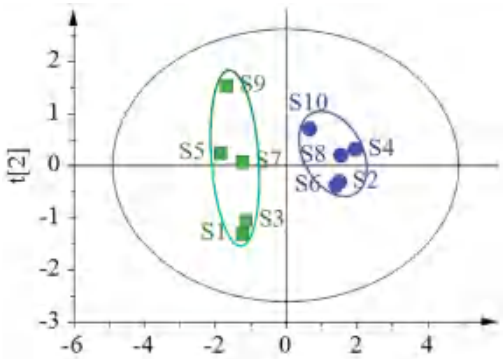

图 4　蜘蛛香不同部位主成分分析得分图

Fig 4　PCA scores of different parts of *Valeriana jatamansi*

结果见图 5，10 批不同部位蜘蛛香样品可根据部位分为两组，与聚类分析和主成分分析结果一致。VIP 值图见图 6，以 VIP ＞ 1 为标准，筛选出造成不同部位蜘蛛香差异的 3 个成分，分别为缬草三酯、蒙花苷、橙皮苷。缬草三酯、橙皮苷在地下部分比地上部位高，蒙花苷在地上部分中含量高。

3　讨论

同一基原的中药，选择的药用部位不同，其有效成分含量的多少和药效强弱存在差异，这也是中医为何选择有效部位入药的原因 [15-16]。蜘蛛香地上部分（叶）和地下部分（根茎和根）的化学

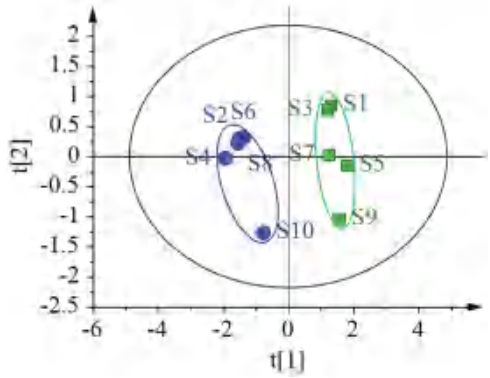

图 5　蜘蛛香不同部位正交偏最小二乘判别分析得分图

Fig 5　PLS-DA scores of different parts of *Valeriana jatamansi*

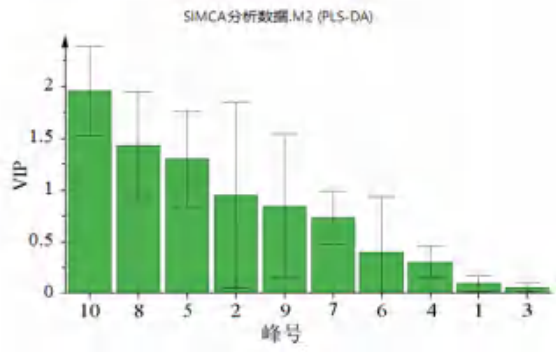

图 6　VIP 值图

Fig 6　VIP value chart

成分构成相近，但成分含量差异较大 [11]，本研究采用 HPLC 法对蜘蛛香的不同部位样品中的 10 种成分进行含量测定，结果表明地上部位 10 种成分平均含量绿原酸＞异绿原酸 A ＞蒙花苷＞缬草三酯＞橙皮苷＞异绿原酸 C ＞乙酰缬草三酯＞异绿原酸 B ＞新绿原酸＞咖啡酸，地下部位 10 种成分平均含量缬草三酯＞异绿原酸 A ＞橙皮苷＞绿原酸＞乙酰缬草三酯＞异绿原酸 C ＞异绿

原酸 B ＞蒙花苷＞新绿原酸＞咖啡酸；总体上以酚酸类或黄酮类成分含量计：地上部分＞地下部分，以缬草三酯类成分含量计：地下部分＞地上部分。聚类分析结果表明蜘蛛香的地上部位和地下部位存在差异；主成分分析得分图中，蜘蛛香不同部位差异较大，正交偏最小二乘判别分析也证实了组间差异，同时找到了地上部分和地下部分蜘蛛香样品中差异性标志物为缬草三酯、蒙花苷、橙皮苷，且缬草三酯、橙皮苷含量在地下部分比地上部位高，蒙花苷含量在地上部分高。

本研究采用的 HPLC 含量测定结合化学计量学方法可在一定程度上体现蜘蛛香不同部位之间 3 种化学结构类型 10 种成分的差异。传统的药用部位是蜘蛛香根茎和根，本试验测得的地上部位和地下部位的酚酸类、黄酮类、缬草三酯类含量存在差异，可能导致其临床功效和作用不同。此外，在蜘蛛香的地上部位中酚酸类和黄酮类含量较高，可以用于酚酸类和黄酮类的制备；蜘蛛香的地下部位中缬草三酯类含量较高，可用于缬草三酯类的制备。综上，本研究结果可为蜘蛛香药材资源进一步合理开发利用提供科学依据，在临床入药时可考虑扩大蜘蛛香药材药用部位。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：385.

[2] 罗喜荣，苑天红，杨军，等 . 超临界 CO_2 萃取蜘蛛香中总缬草三酯的工艺研究 [J]. 广东农业科学，2012，39（16）：119-121.

[3] 郜红利，谭玉柱 . 大孔吸附树脂纯化蜘蛛香总黄酮的工艺研究 [J]. 现代药物与临床，2014，29（10）：1100-1104.

[4] 李强，郑伟，陈林，等 . 蜘蛛香多糖提取工艺的研究 [J]. 食品工业科技，2010，31（7）：273-277.

[5] 刘开萍，杨军，罗喜荣，等 . 蜘蛛香中绿原酸及总酚酸的含量测定 [J]. 湖北农业科学，2017，56（2）：288-290.

[6] 蔡于罗，果佳慧，王鑫国，等 . 彝族药蜘蛛香的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国药物警戒，2023，20（3）：348-352.

[7] 陈朝勇，闫智勇，李少华，等 . 蜘蛛香对高脂血症大鼠血脂及肝功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（19）：154-157.

[8] 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.

[9] 马韩铮，王雪峰 . 醒脾养儿颗粒的临床应用进展 [J]. 中国民族民间医药，2015，24（22）：27-28，31.

[10] 刘开萍，杨军，程盛勇，等 . HPLC 法同时测定蜘蛛香中 7 种成分含量 [J]. 中药材，2018，41（4）：922-924.

[11] 鲁文琴，程盛勇，付洋，等 . 蜘蛛香药材 HPLC 指纹图谱鉴别 [J]. 时珍国医国药，2020，31（1）：114-116.

[12] 程盛勇，付洋，郁林娜，等 . HPLC 同时测定蜘蛛香中 9 种指标成分的含量 [J]. 贵州医科大学学报，2019，44（12）：1413-1418.

[13] 程盛勇，付洋，郁林娜，等 . 蜘蛛香 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中国药学杂志，2019，54（6）：489-493.

[14] 付洋，程盛勇，陈慧，等 . 响应面法结合熵权法多指标优选蜘蛛香提取工艺 [J]. 中药材，2021，44（2）：403-407.

[15] 罗时旋，李守君，滕杨，等 . 非线性化学指纹图谱技术对药用植物不同部位质量的评价 [J]. 黑龙江医药科学，2016，39（1）：28-30，32.

[16] 杨俊莉，时政，李青蔚，等 . 中药废弃物资源分类及开发路径探讨 [J]. 中药材，2023，46（9）：2111-2116.

（收稿日期：2023-12-21；修回日期：2024-02-01）

中药片剂微生物污染鉴定和溯源分析及风险评价

王玢，黄演君，潘子康，王乾蕾（中山市食品药品检验所，广东　中山　528400）

摘要：目的　通过 RiboPrinter 全自动微生物基因指纹鉴定系统对中药片剂待压片粉污染的耐胆盐阴性菌进行溯源分析，找到污染源。**方法**　用 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定系统、RiboPrinter 全自动微生物基因指纹鉴定系统、16SrRNA（16S 核糖体 RNA）序列分析、MALDI-TOF MS（基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱）对待压片粉中和环境中分离的 16 株耐胆盐革兰氏阴性菌进行鉴定并比较结果差异，再采用 RiboPrinter 方法对鉴定结果一致的菌株进行基因指纹图谱比对、溯源，并利用 BioNumerics 软件进行聚类分析。**结果**　待压片粉中分离的 6 株菌株与沸腾干燥机布袋上分离的 1 株菌株鉴定结果一致，为热生泛菌（*Pantoea calida*），通过比较，MALDI-TOF MS 鉴定速度更快，分辨率更高。RiboPrinter 溯源分析表明 7 株热生泛菌同源性极高，相似度为 0.94±0.03。**结论**　通过 RiboPrinter 溯源结果和 BioNumerics 构建树状图分析，推断待压片粉污染来自沸腾干燥机布袋，分析污染风险高低，并提出污染解决措施和方案。

关键词：微生物污染；泛菌属；溯源分析
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1345-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.037

Identification and traceability of microbial pollution in traditional Chinese medicine tablets and its risk evaluation

WANG Fen, HUANG Yan-jun, PAN Zi-kang, WANG Qian-lei (*Zhongshan Institute for Food and Drug Control*, *Zhongshan Guangdong* 528400)

Abstract: Objective　To trace and analyze the source of contamination of bile salt resistant gram-negative bacteria in the powder of traditional Chinese medicine tablets through RiboPrinter method. **Methods**　Totally 16 strains of bile salt resistant gram-negative bacteria isolated from the powder of traditional Chinese medicine tablets and the environment were identified and compared with VITEK2 Compact, RiboPrinter, 16SrRNA, and MALDI-TOF MS methods. Finally, the RiboPrinter method was used to trace the gene fingerprints of the strains with consistent identification results. **Results** The identification of the 6 strains from the powder of traditional Chinese medicine tablets was consistent with 1 strain from the boiling dryer cloth bag, namely *Pantoea calida*. Through comparison, MALDI-TOF MS had a faster identification speed and higher separation rate. RiboPrinter traceability analysis showed that the 7 strains of *Pantoea calida* had extremely high homology, with a similarity of 0.94±0.03. **Conclusion**　Based on the RiboPrinter traceability and BioNumerics analysis, the contamination of the the powder of traditional Chinese medicine tablets may come from the boiling dryer bag. Corresponding measures should be taken to solve the problem.

Key words: microbial pollution; *Pantoea calida* spp.; traceability analysis

中药片剂生产的原材料多来源于植物、动物组织，往往携带大量微生物，包括芽孢、孢子等抗逆性强的结构[1]，容易因灭菌不彻底导致微生物污染，其中大肠埃希菌、沙门氏菌等致病性耐胆盐革兰氏阴性菌的污染易对患者带来二次感染风险。

作者简介：王玢，男，硕士，主管药师，主要从事药品、化妆品微生物检验、毒理学检验等研究，email：26350263@qq.com

微生物快速鉴定分型是药品质量控制的重要方面，主要手段有 API 微生物鉴定系统、VITEK2 Compact（全自动细菌鉴定仪）等生化鉴定技术，16SrRNA（16S 核糖体 RNA）测序、MicroSeq ID DNA 测序系统、RiboPrinter（全自动微生物基因指纹鉴定系统）等分子生物学手段。随着技术的进步，基于蛋白质指纹差异的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）技术，因其经济、快速、准确的特性，在微生物快速鉴定和分型方面被广泛应用[2]。杨燕等[3]对 API、VITEK2 Compact、RiboPrinter 和 Microseq ID DNA 测序四种方法进行比较，证明分子生物学方法的准确性和重现性优于生化反应鉴定。但目前鲜有将 MALDI-TOF MS 与 VITEK2 Compact、RiboPrinter 和 16SrRNA 鉴定进行比较分析的报道。

为快速精准找到微生物污染源，核糖体分型技术（RiboTyping）和多位点序列分析（MLST）技术等分子生物学手段被广泛应用于微生物快速溯源领域。核糖体分型技术是在分子层面对细菌分类和鉴定的重要手段，RiboPrinter 全自动微生物基因指纹鉴定系统基于核糖体分型技术，使用限制性内切酶消化目标菌 DNA 产生基因片段，电泳分离后与已标记的 DNA 探针杂交，利用化学发光产生的信号转换成 rRNA 基因指纹图谱，并与数据库比较从而达到细菌鉴定、分型的目的，目前已被广泛应用于细菌分类和同源性研究[4]，为菌株鉴定与溯源提供了有效便捷的手段，可以更加准确识别污染源并有利于对污染途径进行追踪控制。袁力等[5]分别运用 16SrRNA 序列分析、RiboPrinter、生化鉴定方法对 37 株纯水检出微生物进行鉴定和分型溯源，证明 16SrDNA 序列分析适合群落分布分析，而 RiboPrinter 更适用于同种 / 属细菌的分型及溯源分析。BioNumerics 分析软件基于其内置的聚类分析算法可快速分辨出亲缘关系相近的分离株，被广泛应用于病原微生物溯源分析，黄瑛等[6]将两起食物中毒事件分离的菌种通过脉冲场凝胶电泳得到的图谱利用 BioNumerics 进行聚类分析，得知两起事件均为同一带型山夫登堡沙门菌引起，提示可能为同一传染源。

某药企在 6 个批次中药片剂待压片粉中检出耐胆盐革兰氏阴性菌，虽未超出药典限度，但考虑耐胆盐革兰氏阴性菌潜在致病风险，决定开展污染溯源分析研究。本研究对分离出的 16 株耐胆盐革兰氏阴性菌，用多种手段鉴定及比较结果差异，并采用 RiboPrinter 方法对鉴定结果一致的菌株进行基因指纹图谱比对、溯源，利用 BioNumerics 软件进行聚类分析，以此追溯污染物的来源，为企业制订污染解决方案提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

HR60-ⅡA2 生物安全柜（青岛海尔）；KB400 生化培养箱（德国宾德）；VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统（法国生物梅里埃）；RiboPrinter 全自动微生物基因指纹鉴定系统（美国杜邦）；Autof ms1000 型全自动微生物质谱检测系统（郑州安图），生物安全柜、生化培养箱等均按要求完成校准 / 检定，VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统和 Autof ms1000 型全自动微生物质谱检测系统通过对大肠埃希菌标准菌株（CMCC44102）的鉴定，完成鉴定准确性的验证和确认。

1.2 培养基

胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基、肠道菌增菌液体培养基（批号分别为 1114001、1114271、1087475、1110051，广东环凯生物科技有限公司），血琼脂平板（批号：230717，北京陆桥技术股份有限公司），培养基经适用性检查均符合要求。

1.3 试药

革兰氏阴性细菌鉴定卡（简称 GN 卡，批号为 2412005503，生物梅里埃美国股份有限公司），EcoRI 限制性内切酶（批号为 75622，美国 Hygiena 公司），质谱样本预处理试剂（批号为 20211111，郑州安图生物工程股份有限公司），细菌基因组提取试剂盒（天根生化科技）。

2 方法与结果

2.1 待压片粉污染菌分离纯化和鉴定

2.1.1 分离纯化 按照《中国药典》（2020 年版）耐胆盐革兰氏阴性菌检验方法，分离纯化耐胆盐革兰氏阴性菌，观察菌落形态和显微特征。

2.1.2 鉴定

① VITEK2 Compact 鉴定：挑取纯化后单菌落接入 0.45% 灭菌氯化钠溶液中至合适浓度菌悬液，插入 GN 卡上机鉴定。

② RiboPrinter 鉴定：挑取纯化后单菌落接入 200 μL 样品缓冲液中，振荡均匀，95 ℃热处理 25 min，加入 5 μL 裂解液 A 和裂解液 B，放置于 RiboPrinter 样品孔中并运行程序，选用 EcoRl 酶切系统。

③ 16SrRNA 鉴定：采用正向引物 27F：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和反向引物

1492R：5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'，扩增细菌 16SrRNA 基因序列。委托北京六合华大基因科技有限公司完成 16SrRNA 测序后与 GeneBank 数据库比对。

④ MALDI-TOF MS 鉴定：挑取纯化后单菌落涂布于样品靶板中，取 1 μL 基质溶液覆盖在上述样品点上，室温下晾干后放置于 MALDI-TOF MS 中进行样品图谱采集。

2.2　环境菌采样、分离纯化和鉴定

2.2.1　环境菌采样　对生产有关的洁净室、人员、设备、辅助工具和物料采样。① 洁净室：对称量间、干燥间等房间空气采用浮游菌采样法，对门把手、地面、墙面采取表面擦拭法取样。② 人员：对各工序作业人员的洁净工作服、人员手套、裸手采用表面擦拭法取样。③ 生产设备：对湿法混合颗粒机、沸腾干燥机等生产设备采用表面擦拭法或淋洗水采样法取样。④ 辅助工具：对物料盛装桶、洁净区周转箱和布袋等辅助工具采用表面擦拭法取样。⑤ 物料：开始生产前，所有物料取样，在各步操作结束后中间产品（湿法混合颗粒、湿颗粒、干颗粒、粉碎颗粒、总混颗粒）取样。

2.2.2　环境菌分离纯化　按照“2.1.1”项下方法分离纯化耐胆盐革兰氏阴性菌。

2.2.3　环境菌鉴定　按照“2.1.2”项下方法对分离纯化的耐胆盐革兰氏阴性菌进行鉴定。

2.3　鉴定结果分析

2.3.1　待压片粉分离菌株鉴定结果及分析　如表 1 所示，6 株菌株经 VITEK2 Compact、16SrRNA、MALDI-TOF MS 鉴定结果均为泛菌属，VITEK2 Compact 的鉴定可靠性≥ 96%，16SrRNA 测序结果与 NCBI 中序列比对，相似性达到 100%，质谱鉴定分值达 9.6 以上，结果可靠。RiboPrinter 鉴定结果与 DuPont ID 数据比对，相似性均低于 0.85，未有可靠结果[7]。其中 MALDI-TOF MS 结果为热生泛菌，达到种水平。VITEK2 Compact、16SrRNA 则仅能鉴定至属水平。从时间上来看，VITEK2 Compact、16SrRNA、RiboPrinter、MALDI-TOF MS 鉴定时间分别为 8 h、3 d、6 h、30 min。比较而言，MALDI-TOF MS 具有速度快、分辨率高的优势。6 批次待压片粉污染菌相同，怀疑为同一污染源带入。

表 1　待压片粉耐胆盐革兰氏阴性菌鉴定结果

Tab 1　Identification of bile salt resistant gram-negative bacteria in the powder to be pressed

鉴定编号	紫红胆盐平板上的菌落形态	VITEK2 Compact	RiboPrinter	16SrRNA	MALDI-TOF MS
YP9	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	热生泛菌（*Pantoea calida*）
YP10	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	热生泛菌（*Pantoea calida*）
YP3	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	热生泛菌（*Pantoea calida*）
YP6	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	热生泛菌（*Pantoea calida*）
YP4	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	热生泛菌（*Pantoea calida*）
YP5	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	热生泛菌（*Pantoea calida*）

注：“/”表示没有鉴定结果。

Note：“/” indicates no identification result.

2.3.2　环境分离菌株鉴定结果及分析　如表 2 所示，从人员、物料、设备、辅助用具和洁净室共获得 108 株菌株，其中 12 株为耐胆盐革兰氏阴性菌，采用 VITEK2 Compact、RiboPrinter、16SrRNA 和 MALDI-TOF MS 鉴定。12 株菌株除 RiboPrinter 没有结果外，其他 3 种鉴定手段结果均为泛菌属，MALDI-TOF MS 实现种水平鉴定。HJ14 与待压片粉分离的菌株鉴定结果一致，为热生泛菌，疑似 HJ14 采集位置为污染源。

2.4　同源性分析

将 7 株热生泛菌（YP3、YP4、YP5、YP6、YP9、YP10 和 HJ14）的革兰氏染色、菌落形态、镜检结果比较，采用 RiboPrinter 系统对其基因指纹图谱比对，通过分组情况和组内相似度判断同源性。并将从带压片粉和环境中收集的全部 18 株泛菌的基因指纹图谱数据导入 BioNumerics8.1 数据分析软件处理，构建树状图进行同源性分析。对 7 株菌株的革兰氏染色、菌落形态、镜检结果比较，发现 HJ14 与 YP3、YP4、YP5、YP6、YP9、YP10 革兰氏染色和菌落形态一致，均为阴性短杆菌，在紫红胆盐平板上菌落形态为粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状。如图 1，通过 RiboPrinter 分析，HJ14 与 YP3、YP4、YP5、YP6、YP9、YP10 指纹图谱一致，且同被系统划分为 ECORI704-49-S-4 组，相似度达 0.94±0.03，结合菌种显微特征、菌落特征，认为 7 株菌株高度同源。

以 BioNumerics 软件分析，并绘制树状图见图 2。结果显示，18 株泛菌共划分为 5 组。10 株腐败泛菌被分为 3 组，其中 HJ17、HJ20、HJ19、HJ18、HJ22、HJ12、HJ13、HJ15 被分为组 1，相似度达

表 2 环境耐胆盐革兰氏阴性菌鉴定结果

Tab 2 Identification of bile salt resistant gram-negative bacteria in the environment

取样类型	取样对象 / 工序	鉴定编号	紫红胆盐平板上的菌落形态	显微形态	VITEK2 Compact	RiboPrinter	16SrRNA	MALDI-TOF MS
人员	湿法混合	HJ21	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	清晰泛菌（*Pantoea eucrin*）
		HJ22	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
		HJ16	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
	总混	HJ17	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
辅助工具	布袋	HJ18	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
物料	粉碎后颗粒	HJ20	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
	总混后颗粒	HJ19	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
洁净室	称量间	HJ13	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
		HJ15	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
	制粒干燥间	HJ12	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
	总混间	HJ11	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	腐败泛菌（*Pantoea septic*）
生产设备	布袋（沸腾干燥机）	HJ14	粉红色菌落，中间泛白，光滑、黏稠呈奶油状	革兰氏阴性、短杆菌	泛菌属（*Pantoea* spp.）	/	泛菌属（*Pantoea* spp.）	热生泛菌（*Pantoea calida*）

注：“/” 表示没有鉴定结果。

Note：“/” Indicates no identification result.

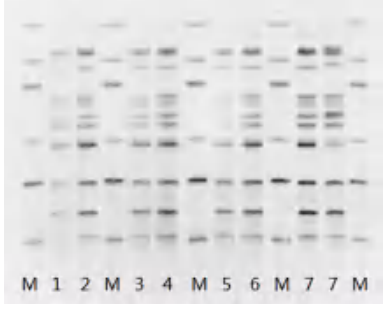

图 1 7 株菌株的杂交图谱

Fig 1 Hybridization patterns of 7 strains bacteria

M. 系统 Marker（system Marker）；1. 菌株 YP3（strain YP3）；2. 菌株 YP4（strain YP4）；3. 菌株 YP5（strain YP5）；4. 菌株 YP6（strain YP6）；5. 菌株 YP9（strain YP9）；6. 菌株 YP10（strain YP10）；7. 菌株 HJ14（strain HJ14）

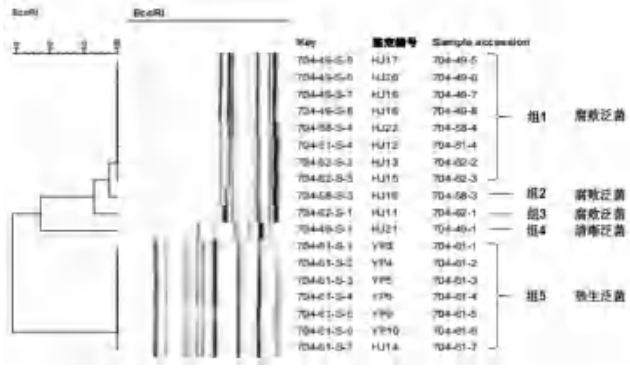

图 2 18 株泛菌的核糖体分型树状图

Fig 2 Genetic relationships of 18 strain *Pantoea* from different regions

100%，完全同源。而 HJ16、HJ11 分为组 2 和组 3，条带与组 1 稍有差别，但相似度达 90% 以上，可能为同种的不同分型。HJ21 为清晰泛菌，被分为组 4，与其他组条带差异明显。待压片粉和环境中分离的 7 株热生泛菌（YP3、YP4、YP5、YP6、YP9、YP10 与 HJ14）被分为组 5，相似度达 100%，HJ14 与待压片粉分离的 6 株菌株完全同源，证明 HJ14 采集的部位极大可能是待压片粉污染来源。

2.5 溯源结果分析

6 株耐胆盐革兰氏阴性菌（YP3、YP4、YP5、YP6、YP9、YP10）于不同批次样品的待压片粉中分离获得，而 HJ14 是在干燥整粒环节的沸腾干燥机的布袋（具有较好的通透性，防止跑料）上收集分离获得，通过 RiboPrinter 核糖体分型溯源和 BioNumerics 数据分析得出结论：① 布袋直接接触药材颗粒，污染菌经布袋带入待压片粉可能性大；② 按照工艺流

程，待压片粉为干燥整粒、总混后的中间产品，而在洁净室、人员、物料和设备上取样均未检出此菌株，排除由其他环节带入的可能性，由布袋带入污染可能性大，进行针对性消毒处理后观察污染是否消除；③ 因布袋上致密的透气孔易藏菌，存在消杀死角，因清洗、消毒不彻底导致污染可能性大。

3　讨论

3.1　污染菌介绍及风险分析

本所分离的耐胆盐革兰氏阴性菌均为泛菌属，*Pantoea* spp.（泛菌属）属于肠杆菌科，广泛分布于动物和人的伤口、血、尿，植物表面及种子、土壤和水中，人的肠道和呼吸道中也常见[8]，是条件致病菌，其代表菌株成团泛菌（*Pantoea agglomerans*）多导致免疫功能低下患者感染，可发生炎症，严重可致败血症、血流感染等[9]。本次污染事件中待压片粉污染菌为热生泛菌、腐败泛菌、清晰泛菌，未检出致病性强的成团泛菌。查阅文献，未有关于这 3 种泛菌的感染性、致病性、毒力和耐药性的相关研究，分析其致病、感染风险较低，可调整消毒液种类和消毒频次解决污染问题。有研究报道泛菌属在高于 60 ℃的环境中存活概率小[10]，但本次污染的是口服片剂，可常温水送服，对免疫力低的人群存在肠道感染风险，因非外用药品，相对风险较小。

3.2　污染菌来源和风险点分析

本次污染菌从干燥整粒工序中沸腾干燥机的布袋分离得到，而其他环节均未发现该菌，分析可能是之前生产中残留的污染菌，因布袋上有致密小孔易藏菌，导致消杀不彻底。因泛菌广泛分布于土壤、空气、植物、水，包括人体呼吸道、肠道、血液等组织中，结合从环境、人员、设备和物料上均采集到不同种的泛菌，考虑原材料、人员、空气是主要风险点，应加强微生物监测。

3.3　污染解决方案

① 更换消毒剂，采取 2 ～ 3 种消毒剂交替使用的方法，对人员、设备、辅助工具、洁净室加强消杀，特别是对布袋彻底地清洗浸泡，消杀处置后，再次对关键生产工序中各环节采样，监测微生物负载情况，关注是否还有此次的污染菌检出。② 优化设备环境清洁消毒程序文件，包括消毒剂的配制和使用原则、不同区域消毒方式的选择和消毒频次等。对此次发现的污染区域进行重点消杀，并做好消毒后验证工作。③ 优化人员管理相关体系文件，包括人员的日常健康状况等级、更衣脱衣、洁净服和工作服的清洁消毒程序等。④ 优化环境、设备和人员日常微生物监测程序文件，加强日常环境、设备和人员的微生物监测频次和取样范围，详细记录微生物的分布、种类及变化趋势。⑤ 制订微生物污染风险应对策略程序：包括微生物污染风险评估报告；制粒车间微生物溯源调查分析方法和微生物污染事件的紧急处置方案。

4　展望

针对中药片剂污染事件，企业可通过多种鉴定手段对污染菌进行鉴定比对，确定最优、最可靠、最快捷且经济的鉴定方式。再结合工艺流程，分析判断可能带入污染的关键点和风险点，制订可靠的环境采样方案。将样品和环境中分离纯化的菌落通过基因指纹图谱比对溯源，确定污染源。企业通过持续收集各批次产品和环境中的分离菌，建立污染菌基因指纹图谱数据库，将进一步提升溯源的效率和可靠性，准确定位污染源及迁移变化，建立更快速、准确的污染风险应对策略。

参考文献

[1] 丁勃，刘艳，孙铜，等 . 中药口服液微生物污染溯源分析及污染风险的评价与控制 [J]. 中国医药工业杂志，2016，47（10）：1311-1315.

[2] 范行良，陈天游，李景云，等 . 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱原理及其在微生物研究中的应用 [J]. 中国新药杂志，2019，28（24）：2969-2973.

[3] 杨燕，蒋波，鲍英，等 . 四种药品微生物快速鉴定技术的方法学一致性评价 [J]. 中国药学杂志，2016，51（22）：1967-1971.

[4] 孙雪奇，肖剑，秦力，等 . 注射剂科氏葡萄球菌污染的鉴定和同源性分析方法研究 [J]. 药物分析杂志，2021，41（10）：1764-1774.

[5] 袁力，余萌，王似锦，等 . 药品微生物实验室水系统分离 37 株微生物的鉴定及分析 [J]. 食品与药品，2020，22（5）：352-357.

[6] 黄瑛，张新，曲梅，等 . 脉冲场凝胶电泳技术用于两起山夫登堡沙门菌疫情溯源 [J]. 中国卫生检验杂志，2013，23（6）：1575-1576.

[7] 王似锦，余萌，胡昌勤，等 . 14 株伯克霍尔德菌的鉴定分析 [J]. 中国抗生素杂志，2019，44（10）：1214-1219.

[8] Cruz AT，Cazacu AC，Allen CH. *Pantoea agglomerans*，a plant pathogen causing humandisease [J]. J Clin Microbiol，2007，45（6）：1989-1992.

[9] Bergman KA，Arends JP，Scholvinck EH. *Pantoea agglomerans* septicemia in three newborn infants [J]. Pediatr Infect Dis J，2007，26（5）：453-454.

[10] 黄佳慧，何冬华，崔碧玲，等 . 非无菌药品中泛菌属微生物污染情况及其危害性探讨 [J]. 今日药学，2022，32（4）：285-289.

（收稿日期：2023-09-19；修回日期：2023-11-14）

微量动态显色法定量检测胎牛血清中细菌内毒素含量

方韵，屠哲玮，黄依雯，季文君*（苏州市药品检验检测研究中心，江苏 苏州 215000）

摘要：目的 探讨微量动态显色法定量检测胎牛血清中的细菌内毒素的可行性，并与凝胶法结果比较。**方法** 采用微量动态显色法鲎试剂，建立标准曲线，通过预干扰试验确定稀释倍数，测定供试品外加内毒素回收率进行干扰试验，对供试品进行定量检测，并与凝胶法试验结果进行比较。**结果** 标准曲线的线性范围为 0.02 ～ 20 EU·mL^{-1}，回归方程为 lg$T$ = 2.9334 − 0.2883 lg$C$，相关系数 | r | = 0.9992，供试品在稀释 200 倍时无干扰作用，细菌内毒素回收率在 50% ～ 200% 内，其中 3 批供试品的内毒素定量检测结果小于规定限值，1 批高于限值，检测结果与凝胶法一致。**结论** 本品可采用微量动态显色法定量检测细菌内毒素含量，进行质量控制。

关键词：微量动态显色法；胎牛血清；细菌内毒素；定量检测
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1350-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.038

Quantitative detcetion of bacterial endotoxin content in fetal bovine serum by micro-kinetic chromogenic method

FANG Yun, TU Zhe-wei, HUANG Yi-wen, JI Wen-jun* (*Suzhou Institute for Drug Control*, *Suzhou Jiangsu* 215000)

Abstract: Objective To determine the feasibility of quantitatively detecting the bacterial endotoxin in fetal bovine serum by micro-kinetic chromogenic method and compare the results with those of gel-clot method. **Methods** The micro-kinetic chromogenic method of limulus reagent was used to establish a bacterial endoxtoxin standard curve. The dilution factor was determined through interference pre-experiment, and the recovery rate of the endotoxin added to the test solution was determined. The interference test was performed to quantitatively detected the bacterial endotoxin content in the test product, and the results were compared with those of the gel-clot method. **Results** The linear range of the standard curve was 0.02 to 20 EU·mL^{-1}, the regression equation was lg$T$ = 2.9334 − 0.2883 lg$C$, and the correlation coefficient | r | = 0.9992. The samples had no interference when being diluted 200 times, the recovery rate of bacterial endotoxin ranged from 50% to 200%. The result of endotoxin quantitative detection for 3 batches of samples was lower than the specified limit, and that of 1 batch was higher than the limit. **Conclusion** Micro-kinetic chromogenic method for quantitative detection of the bacterial endotoxin can be used for the quality control of fetal bovine serum.

Key words: micro-kinetic chromogenic method; fetal bovine serum; bacterial endotoxin; quantitative detection

胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）是从胎牛血液中提取的一种生物制剂，富含血浆蛋白、生长因子、激素、多肽等活性成分，可促进细胞生长与增殖[1-2]，因此，被广泛应用于细胞培养、生物医学及生物制药等领域[3-4]。在生物制药领域，胎牛血清含有大量抗体和丰富的免疫球蛋白[3]，多用于生产抗体药物和诊断试剂盒，以及疫苗的制备和疫苗质量控制等。细菌内毒素是一种强烈的免疫原，可以引起严重的炎症反应和毒性反应，严格控制胎牛血清中细菌内毒素的含量

作者简介：方韵，女，副主任药师，主要从事药理学研究及实验室管理研究，email：32315503@qq.com *通信作者：季文君，女，副主任药师，主要从事药理学研究，email：71306303@qq.com

可降低疫苗生产以及在生命科学领域中的质量风险[5]。因此，一种准确、可靠和快速检测胎牛血清中细菌内毒素含量的方法对于质量控制具有实际意义。

凝胶法可用来检测胎牛血清中细菌内毒素[5]，该方法仅能对供试品中细菌内毒素进行限度检测或半定量检测[6]，且传统的凝胶法鲎试剂用量较大。近年来，由于过度捕捞、栖息地严重破坏等多种因素，鲎资源急剧下降[7-8]，鲎资源的枯竭将危及鲎试剂产业，而我国医药检测行业对鲎资源的需求逐年增多[9]。相较于传统的凝胶法，微量动态显色法具有灵敏度高、鲎试剂用量少及检测范围宽等优点，近年来备受关注[10]。该方法已被尝试应用于注射液、疫苗等中的细菌内毒素定量检测[9-12]。基于对环境的保护、减少鲎试剂使用量及对产品质量更严格控制等考量，本研究采用微量动态显色法对胎牛血清进行内毒素定量检测，并与传统的凝胶法进行比较，以期建立该产品的细菌内毒素定量检测方法。

1　材料

1.1　仪器

TZL-5009 可调速漩涡混匀（苏州珀西瓦尔实验设备有限公司）；EndoProbe 全自动细菌内毒素检测系统（湛江安度斯有限公司）；Multiskan ET 酶标仪（美国 Thermo 公司）；细菌内毒素检查 96 孔反应板（批号：1510080，湛江安度斯生物有限公司）；内毒素凝胶法测定仪（天津天大天发科技有限公司）。

1.2　试药

细菌内毒素工作标准品（批号：150601-202292，规格:90 EU，中国食品药品检定研究院）；细菌内毒素检查用水（BET 水）(批号：2108310，规格：100 mL，湛江安度斯）；微量技术动态显色法鲎试剂 mKCA（批号：2109080，规格：0.35 mL，湛江安度斯）；凝胶法鲎试剂（批号：2210243，规格：0.125 EU • mL^{-1}，湛江安度斯）。特级胎牛血清（批号：J512FA0004，规格：100 mL）；无噬菌体低内毒素特级胎牛血清（批号：23050706，规格：100 mL）；南美高端胎牛血清（批号：P1692553，规格：50 mL）；胎牛血清（批号：S11IM225744，规格：100 mL）。

2　方法与结果

2.1　细菌内毒素限值（*L*）的确定

《中国药典》2020 年版没有明确规定胎牛血清细菌内毒素的限值，只对新生牛血清的细菌内毒素做了检测规定，不应高于 10 EU • mL^{-1}[6]，查阅《美国药典》（43 版），其规定胎牛血清的细菌内毒素限值为 10 EU • mL^{-1}[13]。因此，本研究选用 10 EU • mL^{-1} 作为限值。

2.2　微量鲎试剂动态显色法标准曲线可靠性试验及凝胶法鲎试剂灵敏度复核

2.2.1　微量鲎试剂动态显色法标准曲线可靠性试验　取细菌内毒素工作标准品 1 支（90 EU），加入 BET 水 0.9 mL，涡旋仪振荡混匀 15 min，用 BET 水将其稀释成 20.0、2.0、0.2、0.02 EU • mL^{-1} 4 个浓度的内毒素标准溶液，同时设立阴性对照孔。取 mKCA 鲎试剂，参照 mKCA 法鲎试剂说明书，加 0.35 mL BET 水复溶内容物，吸取 25 μL 鲎试剂，加至 96 孔板上，分别加上述系列浓度细菌内毒素标准溶液 25 μL 与鲎试剂进行反应。每个浓度平行 3 孔。预设吸收度 *A* 值 0.1，反应时间 *T* 为 3600 s，温度（37±0.5）℃，检测波长 405 nm，以反应时间 *T* 的对数为横坐标，浓度 *c* 的对数为纵坐标，绘制标准曲线，计算相关系数 *r* 值。根据鲎试剂动态显色法（微量技术）说明书的规定：标准曲线的相关系数 $|r|$ 应≥ 0.980，变异系数（*CV*）系数≤ 20%，试验方为有效。经检测，测得数据由仪器自动分析得线性回归方程：$\lg T = 2.9334 - 0.2883\lg C$，$|r| = 0.9992 > 0.980$，*CV* 均 < 20%。结果表明在 0.02 ～ 20.0 EU • mL^{-1} 范围内，标准曲线可靠性试验各数据符合要求（见表 1）。

表 1　标准曲线可靠性试验结果 ($n = 3$)

Tab 1　Reliability of standard curve ($n = 3$)

样品	内毒素加入量 /（EU • mL^{-1}）	平均反应时间 /s	内毒素检测值 /（EU • mL^{-1}）	变异系数 /（*CV*）%
阴性对照	0	> 3600	< 0.0069	0
内毒素标准品	0.02	2722.3	0.0182	0.88
内毒素标准品	0.2	1335.0	0.2155	1.03
内毒素标准品	2.0	676.0	2.2839	1.6
内毒素标准品	20.0	373.7	17.8491	1.78

2.2.2　凝胶法鲎试剂灵敏度复核试验　凝胶法鲎试剂按《中国药典》2020 年版四部通则 1143 要求进行灵敏度复核[7]，灵敏度为 0.125，符合规定。

2.3　最大有效稀释倍数（MVD）

根据《中国药典》2020 年版四部通则（1143 细菌内毒素检查法）[6]，按公式 $MVD = cL \cdot \lambda^{-1}$ 计算。式中，*c* 为供试品溶液的浓度，λ 为鲎试剂标示灵敏度（EU • mL^{-1}）或光度测定法中标准曲线中最低点浓度，*L* 为供试品细菌内毒素限值。根据“2.1”项下规定，胎牛血清的细菌内毒素含量应小

于 10 EU • mL^{-1}。当 L 以 EU • mL^{-1} 为单位时，c 为 1 mL • mL^{-1}，λ 为微量动态显色法中标准曲线最低点浓度 0.02 EU•mL^{-1}。经计算 MVD 为 500 倍。

2.4　供试品微量动态显色法干扰预试验

根据供试品最大有效稀释倍数，选取批号为 J512FA0004 的供试品，用 BET 水依次稀释 50、100、200、500 倍，作为供试品溶液（A 液），同时制备同稀释倍数供试品溶液并含内毒素浓度（λ_m）0.2 EU • mL^{-1} 的溶液作为供试品回收溶液（B 液），分别取上述 A 液、B 液及阴性对照溶液（BET 水）和系列浓度的标准品溶液各 25 μL 加入酶标板孔中进行检测，每一浓度平行 2 孔。反应条件同 “2.2.1” 项下。 反应结束后，检测仪根据标准曲线自动计算出平均反应时间、*CV*、实测值、回收率，具体见表 2。供试品稀释 50、100、200、500 倍时，回收率均在 50% ～ 200%，胎牛血清对鲎试剂与细菌内毒素的反应无干扰作用，试验结果有效。综合稀释步骤及回收率等因素，选择稀释 200 倍作为检测浓度进行正式干扰试验。

2.5　供试品微量动态显色法干扰试验及检测结果

表 2　干扰预试验结果 (n = 3)

Tab 2　Interference pre test (n = 3)

稀释倍数	内毒素加入量 /（EU • mL^{-1}）	平均反应时间 /s	*CV*/%	回收率 /%	内毒素检测值 /（EU • mL^{-1}）
50	0.2	1538.5	3.08	62.44	0.13177
100	0.2	1541	6.88	61.25	0.13103
200	0.2	1377	0.56	93.23	0.19335
500	0.2	1351.5	2.88	99.83	0.20656

根据干扰预试验的结果选取 200 倍作为本试验的稀释倍数，0.2 EU • mL^{-1} 作为干扰试验加标细菌内毒素浓度。用 BET 水分别稀释 200 倍制备供试品溶液（A 液），同时制备与同稀释倍数且细菌内毒素含量均为 0.2 EU • mL^{-1} 的溶液作为供试品回收溶液（B 液）。各取 25 μL A 液、B 液、阴性对照溶液（BET 水）和系列浓度的标准品溶液于已加有 25 μL 微量动态显色法鲎试剂的反应孔内，每个样品平行 2 孔。反应条件同 “2.2.1” 项下。结果表明，稀释倍数为 200 倍时，该稀释倍数下供试品对试验无干扰，测得的内毒素数值真实有效，其中 3 批供试品的细菌内毒素含量小于规定限值 10 EU • mL^{-1}，1 批供试品高于限值。结果见表 3。

表 3　干扰试验结果 (n = 2)

Tab 3　Interferece test (n = 2)

供试品批号	稀释倍数	内毒素加入量 /（EU • mL^{-1}）	平均反应时间 /s	内毒素检测值 /（EU • mL^{-1}）	*CV*/%	回收率 /%	原液内毒素含量 /（EU • mL^{-1}）	结论
阴性对照	/	/	＞ 3600	＜ 0.005 99	0	/	/	
23060706	200	/	＞ 3600	＜ 0.005 99	0	/	＜ 4.000	符合规定
		0.2	1360.5	0.204 07	2.34	99.04	/	
P1692553	200	/	1261.5	0.268 39	1.07	/	53.678	不符合规定
		0.2	1086	0.462 05	0.65	96.83	/	
J512FA0004	200	/	＞ 3600	＜ 0.005 99	0	/	＜ 4.000	符合规定
		0.2	1356.5	0.206 27	0.57	100.14	/	
S11IM225744	200	/	3023	0.011 28	0.28	/	＜ 4.000	符合规定
		0.2	1359	0.204 89	0.73	96.81	/	

2.6　细菌内毒素凝胶法检测结果

采用灵敏度为 0.125 EU • mL^{-1} 的凝胶法鲎试剂（批号：2210243），参照《中国药典》2020 年版四部 1143 “细菌内毒素检查法” 凝胶限度试验 [6] 及文献 [5]，对 4 批胎牛血清进行细菌内毒素检查，结果见表 4，微量动态显色法和凝胶法结果一致。

表 4　供试品凝胶法检测结果

Tab 4　Gel-clot test for the sample

鲎试剂批号	供试品批号	阴性对照	阳性对照	供试品阳性对照品	供试品	结论
2210243	23050706	－－	＋＋	＋＋	－－	符合规定
	P1692553	－－	＋＋	＋＋	＋＋	不符合规定
	J512FA0004	－－	＋＋	＋＋	－－	符合规定
	S11IM225744	－－	＋＋	＋＋	－－	符合规定

3　讨论

本研究采用微量动态显色法定量检测胎牛血清中细菌内毒素含量，开展了针对该方法的标准曲线可靠性、干扰试验以及不同厂家胎牛血清内毒素值测定的研究，结果与内毒素凝胶检查法一致。批号 P1692553 胎牛血清的细菌内毒素含量超过本次研究规定的限值，其细菌内毒素偏高可能与生产工艺、原料、流通环节等多因素有关。生产厂家应加强对原料控制，改进工艺，对流通环节全追踪，以期提高其安全性 [14]。

随着鲎试剂灵敏度的不断提高及检测仪的不断完善，细菌内毒素含量测定正向着微量定量检测方向发展[11]。明胶类样品及某些血液样品使用凝胶法进行试验会干扰凝胶的形成，而动态显色法是基于显色基质颜色的变化速率来定量检测内毒素，没有此干扰[15]。本研究既考虑到了鲎资源的匮乏，选用微量鲎试剂从而减少鲎试剂的使用，同时采用定量方法，对质量控制更加严格。此外，本次研究使用全自动仪器，可减少人员操作的误差，操作简单、快捷，具有趋势分析和审计追踪功能，可保证数据完整性[16]。因此本品可用微量动态显色法为胎牛血清质量控制提供可靠依据，实现记录生产运输等环节样品内毒素含量的动态变化，有助于及时发现和分析潜在风险。

值得注意的是，使用全自动细菌内毒素检测仪测定这种带有一定黏性液体的产品，在自动稀释和样品处理的过程中，会产生气泡影响液体的吸取，从而导致检测结果失效。可以通过手动对样品进行一定倍数的稀释，降低其黏度后进行检测，可达到满意的结果。

参考文献

[1] Martins LS，Silvae PC，Abreu ED，et al. Different concentrations of fetal bovine serum affect cytokine modulation in lipopolysaccharide-activated apical papilla cells in vitro [J]. J Appl Oral Sci，2023，31：e20230020.

[2] Liu S，Yang W，Li YL，et al. Fetal bovine serum，an important factor affecting the reproducibility of cell experiments [J]. Sci Rep，2023，13（1）：1942-1942.

[3] Valentina V，Leticia BS，Simoneta F，et al. Fetal bovine serum contains biologically available ATP [J]. Purinerg Signal，2023，20（1）：83-89.

[4] Eduardo FL，Pereira CCD，Mota CM，et al. Effects of fetal bovine serum on trophectoderm and primitive endoderm cell allocation of in vitro-produced bovine embryos [J]. Zygote，2023，31（1）：44-50.

[5] 朱莲，陈军，陈卓 . 胎牛血清细菌内毒素检测方法创建 [J]. 中国卫生检验杂志，2020，30（9）：1059-1062.

[6] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：178-181.

[7] 鲍虞园，李银康，林吴颖，等 . 中国南海北部近海鲎资源调查及北部湾潮间带中华鲎幼鲎潜在栖息地评估 [J]. 生物多样性，2023，31（5）：80-90.

[8] 王振雅 . 濒危的中国鲎 [N]. 健康时报，2023-03-24（003）.

[9] 裴宇盛，陈晨，耿颖，等 . 微量动态显色法与动态显色法的等效性评价 [J]. 中国药理学通报，2022，38（7）：1107-1110.

[10] 朱文娟，李锦妹，翁嘉，等 . 葡萄糖酸钙注射液中细菌内毒素的定量检测 [J]. 食品与药品，2023，25（4）：341-345.

[11] 刘骅，王花花，王珺，等 . 微量鲎试剂动态显色法定量检测重组新型冠状病毒疫苗（CHO 细胞）细菌内毒素的研究 [J]. 中国药理学通报，2022，38（7）：1110-1113.

[12] 杨海燕，周继春，张军霞，等 . 微量动态显色法检测奥拉西坦注射液中细菌内毒素含量 [J]. 中国药事，2020，34（5）：596-601.

[13] The United States Pharmacopeial Convention（43）. Fetal Bovine Serum Quality Attributes And Functionality Tests [S].

[14] 耿雪，肖英，周倩，等 . 不同品种滴眼液细菌内毒素检查方法建立与风险分析 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（11）：1526-1530.

[15] 李树馀，梁进 . 微量动态显色法定量检测 3 种大输液的细菌内毒素 [J]. 中国药师，2014，17（6）：1052-1054.

[16] 宋天扬，唐军，王璇，等 . 动态浊度法检测 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗及其中间产品中细菌内毒素含量 [J]. 中国食品药品监管，2023，（2）：82-89.

（收稿日期：2024-01-05；修回日期：2024-02-20）

GC-MS/MS 法测定阿加曲班中基因毒性杂质 NDMA 和 NDEA

季行行[1, 3, 4]，刘芹[1, 3, 4]，邱荣英[1, 3, 4]，李铁健[1, 3, 4]，李观军[5]，张贵民[2, 3, 4*]（1. 山东新时代药业有限公司，山东 临沂 273400；2. 鲁南制药集团股份有限公司，山东 临沂 276005；3. 国家手性制药工程技术研究中心，山东 临沂 276005；4. 山东省手性制药技术创新中心，山东 临沂 276005；5. 鲁南厚普制药有限公司，山东 临沂 276002）

摘要：目的 采用 GC-MS/MS 法建立一种同时测定阿加曲班中 *N*- 亚硝基二甲胺（NDMA）和 *N*- 亚硝基二乙胺（NDEA）含量的方法。**方法** 以 Agilent DB-WAX UI（30 m×0.25 mm×0.25 μm）气相色谱柱分离，离子源为电子轰击电离源（EI），在多反应离子监测（MRM）模式下检测，按外标法建立标准曲线测定阿加曲班中两种杂质的含量。**结果** NDMA 和 NDEA 分别在 19.20 ～ 128.00 ng • mL^{-1} 和 5.36 ～ 35.73 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好；NDMA 和 NDEA 的定量限分别为 19.20 ng•mL^{-1} 和 5.36 ng•mL^{-1}，检测限分别为 6.40 ng•mL^{-1} 和 1.79 ng•mL^{-1}。NDMA 和 NDEA 低、中、高浓度的平均回收率分别为 110.2%、107.8%、107.2%（*RSD* 为 3.2%，n = 3）和 114.7%、107.3%、107.6%（*RSD* 为 5.6%，n = 3）。**结论** 该方法操作简单，能够有效测定阿加曲班中 NDMA 和 NDEA 的含量。

关键词：阿加曲班；GC-MS/MS 法；*N*- 亚硝基二甲胺；*N*- 亚硝基二乙胺；多反应离子监测
中图分类号：R927.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1354-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.039

Determination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in agatroban by GC-MS/MS

JI Xing-xing[1, 3, 4], LIU Qin[1, 3, 4], QIU Rong-ying[1, 3, 4], LI Tie-jian[1, 3, 4], LI Guan-jun[5], ZHANG Gui-min[2, 3, 4*]
(1. *Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong* 273400; 2. *Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi Shandong* 276005; 3. *National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Linyi Shandong* 276005; 4. *Shandong Technology Innovation Center of chirality Pharmaceutical, Linyi Shandong* 276005; 5. *Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong* 276002)

Abstract: Objective To simultaneously determine of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) in agatroban by GC-MS/MS. **Methods** The sample was separated by Agilent DB-WAX UI chromatographic column (30 m×0.25 mm×0.25 μm), while electron bombardment ionization source (EI) and the multiple reactive ion monitoring were selected for the dectection. A standard curve was established for the determination of both impurities in agatroban. **Results** NDMA and NDEA had good linearity at 19.20 ～ 128.00 ng • mL^{-1} and 5.36 ～ 35.73 ng • mL^{-1}, respectively. The limit of quantification for NDMA and NDEA was 19.20 ng • mL^{-1} and 5.36 ng • mL^{-1}. The limit of detection were 6.40 ng • mL^{-1} and 1.79 ng • mL^{-1}, respectively. And the average recoveries of low, medium, and high concentration of NDMA and NDEA were 110.2%, 107.8%, and 107.2% (*RSD* = 3.2%, n = 3), and 114.7%, 107.3%, and 107.6% (*RSD* = 5.6%, n = 3), respectively. **Conclusion** This method is simple to operate, and can effectively detect the content of NDMA and NDEA in agatroban.

Key words: agatroban; GC-MS/MS; *N*-nitrosodimethylamine; *N*-nitrosodiethylamine; multiple reactive ion monitoring

作者简介：季行行，男，工程师，主要从事药物质量分析工作，email：307874953@qq.com ***通信作者：**张贵民，男，高级工程师，主要从事中药、化药与生物制品的新药研发，email：Lunanzhangguimin@163.com

阿加曲班是一种由 L- 精氨酸合成的小分子凝血酶抑制剂，可与凝血酶的催化位点可逆结合。与间接凝血酶抑制剂肝素相反，阿加曲班直接抑制凝血酶，无需通过辅助因子抗凝血酶Ⅲ来发挥抗血栓活性。它可以通过抑制凝血酶催化或诱导的反应实现其药理作用，如抑制纤维蛋白的生成和调节凝血因子Ⅴ、Ⅷ和ⅩⅢ，以及天然抗凝蛋白 C 的生物活性 [1-2]。该药物正在研究用于治疗肝素诱导的血小板减少症（HIT）或 HIT 合并血栓综合征（HITTS）患者。然而，在阿加曲班原料药的工艺中可能会产生基因毒性杂质 *N*- 亚硝基二甲胺（NDMA）和 *N*- 亚硝基二乙胺（NDEA）[3-4]。当两者的浓度处于较低水平时，就会对人体遗传物质造成损害，并直接引发染色体断裂或者 DNA 突变，从而可能导致癌症的出现 [5-9]。

查询阿加曲班中亚硝胺类基因毒性杂质 NDMA 和 NDEA[10-13] 相关的毒理学数据，根据 CPDB 数据库中查询的结果，NDMA 和 NDEA 的日可接受摄入量分别为 96 ng•d^{-1} 和 26.5 ng•d^{-1}，阿加曲班日最大剂量为 60 mg • d^{-1}，从而计算得到阿加曲班中 NDMA 和 NDEA 的限度分别为 1.6 μg • g^{-1} 和 0.44 μg • g^{-1}。目前尚无针对阿加曲班中 NDMA 和 NDEA 的含量测定方法，因此，本文采用 GC-MS/MS 法建立一种同时测定阿加曲班中 NDMA 和 NDEA 含量的方法，以期为阿加曲班的质量控制和用药安全提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

气相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪（Agilent，8890-7000D GC-TQ，EI 源）；XSR105DU/A 电子分析天平（Mettler Toledo，十万分之一天平）。

1.2　试药

阿加曲班样品（山东新时代药业有限公司生产，批号：210701、210801、210802、210901、210902、210903）；对照品 NDMA（批号：510166-202104，含量：99.5%）及 NDEA（批号：510168-202103，含量：99.7%）（中国食品药品检定研究院）；二甲基亚砜（DMSO，Merck）。

2　方法与结果

2.1　气相色谱条件

色谱柱：Agilent DB-WAX UI（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；载气：高纯氦气；流速 1.0 mL • min^{-1}；分流比 5∶1；进样口温度：200 ℃，进样量 1 mL；顶空平衡温度 120 ℃，平衡时间 15 min；程序升温：初始柱温 40 ℃保持 1 min，以 10 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 160 ℃，然后以 20 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 220 ℃，保持 3 min。

2.2　质谱条件

EI 离子源；电子能量 70 eV；扫描模式 MRM；离子源温度 230 ℃；四极杆温度 150 ℃；溶剂延迟时间 6.5 min；驻留时间 120 ms；其他质谱参数见表 1。

表 1　NDMA 和 NDEA 质谱参数

Tab 1　Mass spectra parmeters of NDMA and NDEA

组分	采集时间 /min	定量离子（*m/z*）	碰撞电压 /eV	定性离子（*m/z*）	碰撞电压 /eV
NDMA	6.5 ～ 9.0	74 → 44	5	74 → 42	20
NDEA	9.0 ～ 11.0	102 → 85	5	102 → 44	15

2.3　溶液制备

2.3.1　NDMA 对照品储备液　取 NDMA 对照品适量，精密称定，用 DMSO 定量稀释制成每 1 mL 中约含 4 mg 的溶液，作为 NDMA 对照品储备液。

2.3.2　NDEA 对照品储备液　取 NDEA 对照品适量，精密称定，用 DMSO 定量稀释制成每 1 mL 中约含 4 mg 的溶液，作为 NDEA 对照品储备液。

2.3.3　混合对照品溶液　分别量取 NDMA 和 NDEA 对照品储备液适量，用 DMSO 定量稀释制成每 1 mL 中约含 160 μg NDMA 和 44 μg NDEA 的溶液，作为混合对照品储备液 1。量取混合对照品储备液 1 适量，用 DMSO 定量稀释制成每 1 mL 中约含 3.2 μg NDMA 和 0.88 μg NDEA 的溶液，作为混合对照品储备液 2。量取混合对照品储备液 2 适量，用 DMSO 定量稀释制成每 1 mL 中约含 64 ng NDMA 和 17.6 ng NDEA 的溶液，精密量取 2 mL，置 20 mL 顶空瓶中，密封，作为混合对照品溶液。

2.3.4　供试品溶液　取阿加曲班样品约 80 mg，精密称定，置 20 mL 顶空瓶中，加入 DMSO 2 mL 溶解，密封，作为供试品溶液。

2.3.5　加标溶液　取阿加曲班样品约 80 mg，精密称定，置 20 mL 顶空瓶中，加入对照品溶液 2 mL 溶解，密封，作为加标溶液。

2.4　专属性试验

取空白溶剂（DMSO）、混合对照品溶液、供试品溶液依法测定，色谱图见图 1。两待测组分能完全分离（NDMA 与 NDEA 的保留时间分别为 8.341 min 和 9.434 min），峰形较好，空白溶剂对两个基因毒性杂质的测定均无干扰，方法的专属性好。

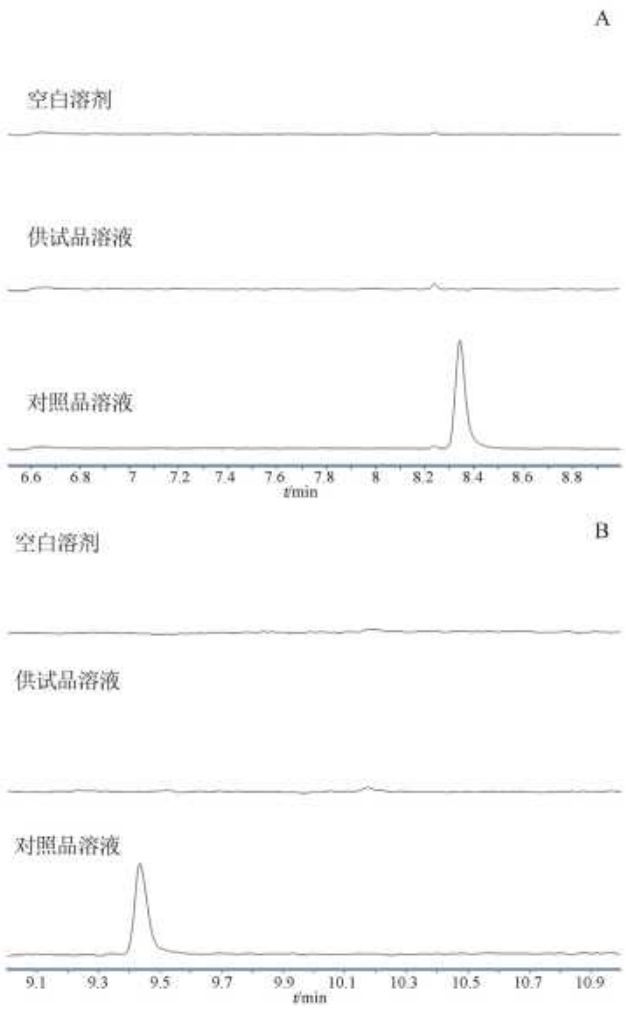

图 1　空白溶剂、供试品溶液和对照品溶液中 NDMA（A）及 NDEA（B）的 MRM 对比谱图

Fig 1　MRM comparative spectra of NDMA（A）and NDEA（B）in blank solvent，test solution and reference solution

2.5　系统适用性试验

取同一混合对照品溶液，依法连续进样 6 次进行测定，记录色谱图，计算 NDMA 和 NDEA 峰面积及保留时间的 *RSD*。结果表明，NDMA 峰面积的 *RSD* 为 5.0%，保留时间的 *RSD* 为 0.020%，NDEA 峰面积的 *RSD* 为 6.3%，保留时间的 *RSD* 为 0.022%，表明该方法的系统适用性良好。

2.6　精密度试验

取空白溶剂、混合对照品溶液、供试品溶液和加标溶液，依法进样测定。结果表明，NDMA 和 NDEA 峰面积的 *RSD* 分别为 3.0% 和 4.3%（n = 6），说明本方法的精密度良好。

2.7　溶液稳定性考察

取对照品溶液和加标溶液于室温下放置，分别于配制后 0、3、6、9、12、24 h 取样检测。结果表明，对照品溶液中 NDMA 和 NDEA 的峰面积与 0 h 时相比，变化均在 93.25% ～ 105.91% 内；加标溶液中 NDMA 和 NDEA 的峰面积与 0 h 时相比，变化均在 87.55% ～ 102.01% 内，说明对照品溶液和加标溶液于室温下放置 24 h 稳定性良好。

2.8　线性关系考察

精密量取混合对照品储备液 2 各适量，用 DMSO 定量稀释制成梯度浓度的线性溶液，依照分析方法测定。分别以 NDMA 和 NDEA 的质量浓度（ng • mL^{-1}）为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归，计算其回归方程分别为 y = 31.24x + 20.25，r = 0.9997；y = 12.10x + 20.91，r = 0.9987。结果表明，NDMA 在 19.20 ～ 128.00 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好；NDEA 在 5.36 ～ 35.73 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.9　定量限与检测限

取混合对照品储备液 2，用 DMSO 逐级稀释制成定量限（*S/N* ≈ 10）和检测限（*S/N* ≈ 3），结果表明，NDMA 定量限和检测限分别为 19.20 ng • mL^{-1} 和 6.40 ng•mL^{-1}；NDEA 定量限和检测限分别为 5.36 ng • mL^{-1} 和 1.79 ng • mL^{-1}。另取定量限溶液连续进样 6 次，NDMA 及 NDEA 峰面积的 *RSD* 分别为 4.9% 和 6.1%。

2.10　准确度试验

称取阿加曲班样品（210701 批）约 80 mg 共 9 份，分别加入对照品溶液，以设定具有低、中、高三个不同浓度水平的准确度试验，NDMA 和 NDEA 的质量浓度分别为 32.00、64.00、96.00 ng • mL^{-1} 和 8.93、17.86、26.79 ng • mL^{-1}。依法测定，以外标法计算回收率。结果 NDMA 低、中、高浓度的平均回收率分别为 110.2%、107.8%、107.2%，*RSD* 均小于 3.2%（n = 3）；NDEA 低、中、高浓度的平均回收率分别为 114.7%、107.3%、107.6%，*RSD* 均小于 5.6%（n = 3），表明本方法的回收率良好。

2.11　耐用性试验

改变“2.1”项下色谱条件，包括流速（1.0±0.05）ng • mL^{-1} 和进样口温度（200±2）℃，取“2.3”项下对照品溶液和加标溶液进行测定。结果加标溶液中 NDMA 和 NDEA 测得值的 *RSD* 分别为 3.7% 和 4.6%（n = 5），说明当色谱条件发生微小变化时，此方法具有良好的耐用性。

2.12　样品中 NDMA 和 NDEA 含量测定

取 6 批阿加曲班样品，依法检测，记录色谱图。按外标法以峰面积计算阿加曲班中 NDMA 和 NDEA 的含量，结果表明 6 批样品中均未检出

NDMA 及 NDEA。

3　讨论

3.1　色谱柱的选择

N- 亚硝基类化合物大多挥发性较好，极性较大[14-15]，本试验考察了非极性毛细管柱（HP-5MS）和极性毛细管柱（DB-WAX UI），两种毛细管柱均能分离各化合物，但 NDMA 和 NDEA 经 HP-5MS 分离后峰形拖尾，而经 DB-WAX UI 分离后峰形良好，因此，本试验选用 DB-WAX UI 色谱柱。

3.2　检测器的选择

阿加曲班原料中 NDMA 和 NDEA 的质控限度分别为 1.6 μg•g^{-1}和 0.44 μg•g^{-1}，此限度较低，若使用常规的氢火焰离子化检测器（FID），灵敏度很难达到要求，故本试验采用灵敏度更高的三重四极杆质谱检测器。

3.3　气相色谱及质谱参数的选择

由于 NDMA 和 NDEA 的沸点不高，顶空进样方式即可满足进样需求，并且相较于直接进样，它能够有效避免原料药基质对仪器产生的污染，故本试验选择顶空进样的方式；对顶空平衡温度及时间进行优化，通过控制变量测试了平衡温度为 110、120、130 ℃及平衡时间分别为 10、15、20、25 min 时 NDMA 与 NDEA 的响应值，结果表明，当平衡温度为 120 ℃，平衡时间为 15 min 时，两种化合物即可达到最佳响应；通过一级质谱对 NDMA 与 NDEA 进行全扫描，选取峰高相对较高、质荷比较大的离子（分别为 74 和 102）作为特征母离子，然后优化二级质谱中的碰撞电压，得到信噪比较强的两个子离子（NDMA 为 44 和 42，碰撞能分别为 5 eV 和 20 eV；NDEA 为 85 和 44，碰撞能分别为 5 eV 和 15 eV），从而确定了两种化合物的定量离子和定性离子。

3.4　小结

本试验采用气相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪结合顶空进样的方法建立了阿加曲班原料药中 NDMA 和 NDEA 含量的测定方法，该法经过各项试验验证，均符合要求，专属性强，灵敏度高，重复性、准确度好，操作便捷，适用于阿加曲班中 NDMA 和 NDEA 的含量测定，从而为阿加曲班的质量控制和用药安全提供参考。

参考文献

[1] Swan SK，Hursting MJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of argatroban：effects of age，gender，and hepatic or renal dysfunction. [J]. Pharmacotherapy，2012，20（3）：318-329.

[2] Reddy BV. Argatroban anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia requiring renal replacement therapy [J]. Ann Pharmacother，2005，39（10）：1601-1605.

[3] 袁莉娟，刘爱民，刘蕾 . 新型凝血酶抑制剂阿加曲班 [J]. 中国新药杂志，2005，14（2）：230-234.

[4] 章为，王晓菲，易必新，等 . UPLC-APCI-MS/MS 法测定二甲双胍格列吡嗪片中 *N*- 亚硝基二甲胺 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1568-1571.

[5] 李俊，张璐，张瑄，等 . GC-MS/MS 测定头孢菌素类药物中 8 种 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. 中国药师，2022，25（2）：350-354.

[6] 邓鸣，曾庆花，梁秋霞，等 . HPLC-MS/MS 法测定注射用盐酸头孢甲肟中 7 种 *N*- 亚硝胺类杂质 [J]. 中南药学，2023，21（8）：2178-2181.

[7] 孔璇 . 药物中 *N*- 亚硝胺类基因毒性杂质检测方法的研究进展 [J]. 天津药学，2022，34（1）：62-67.

[8] 阮晓玲，郑项元，徐洁，等 . 药物中基因毒性杂质分析方法的研究进展 [J]. 中国药科大学学报，2016，47（3）：267-274.

[9] 黄冰，曹卫明，程涛，等 . GC-MS/MS 法测定利伐沙班中亚硝胺杂质 [J]. 广东化工，2023，50（4）：210-213.

[10] 王璐，刘峰 . 气相色谱 - 串联质谱法测定芬地柞酸左旋氯哌斯汀中 *N*- 亚硝基二甲胺和 *N*- 亚硝基二乙胺含量 [J]. 中国药业，2021，30（15）：81-85.

[11] 杨越莛，郑枫，蔡浒，等 . LC-MS/MS 法测定三甲基间苯三酚原料药中 *N*- 亚硝基二甲胺和 *N*- 亚硝基二乙胺的含量 [J]. 中南药学，2022，20（2）：405-409.

[12] Transmission to CHMP. ICH guideline M7 on assessment and control of DNA reactive（mutagenic）impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. [2023-09-24] https：//database. ich. org/sites/default/files/M7 R1Guideline. pdf.

[13] 林睿，徐敦明，黄旖珏，等 . 气相色谱 - 热能分析仪法同时测定食品接触材料及制品中 15 种 *N*- 亚硝胺在酒精类食品模拟物中的迁移量 [J]. 分析测试学报，2022，41（10）：1542-1547.

[14] 朱婧，徐海燕，朱跃芳，等 . 气相色谱串联质谱法检测替格瑞洛原料药中 *N*- 亚硝胺类杂质 [J]. 中国药业，2022，31（12）：84-88.

[15] 刘晶晶，梁智渊，梁爱仙，等 . GC-MS/MS 测定替米沙坦片中 10 种亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（9）：1224-1229.

（收稿日期：2023-09-25；修回日期：2023-12-01）

医院药学

某肿瘤医院免疫检查点抑制剂超说明书用药分析

严婷[1, 2]，廖德华[2]，符一岚[2]，谌赟[2]，刘妮[2]，罗佳[2]，曾媚姿[2]，唐静怡[2]，杨小平[1*]（1. 湖南师范大学医学院，小分子靶向药物研究与创制湖南省重点实验室，湖南师范大学医学院，长沙 410013；2. 湖南省肿瘤医院药学部，长沙 410013）

摘要：目的 探讨某医院免疫检查点抑制剂（ICIs）超说明书用药使用情况及管理要点，为临床合理用药提供借鉴。**方法** 回顾性调查某肿瘤医院 2023 年 1 月至 6 月 ICIs 使用概况及超说明书用药情况，参考高级别循证医学证据，对超说明书用药进行分析、评价并对循证依据进行归纳记录。**结果** 527 例患者共使用 15 个 ICIs，共涉及 16 个肿瘤类型，16.88%（89/527）存在超说明书用药现象。超说明书用药中，肿瘤类型排名前三的为宫颈癌（50.56%）、肝细胞癌（13.48%）、鼻咽癌（10.11%）；ICIs 排名前三为替雷利珠单抗（26.97%）、卡瑞利珠单抗（16.85%）、赛帕利单抗（15.73%）。**结论** 该院 89 例超说明书用药均有高级别循证医学证据支持。超说明书用药规范管理有助于促进临床合理使用。循证医学证据日新月异，药师应紧跟研究前沿，提高循证药学水平，为患者用药安全有效提供保障。

关键词：免疫检查点抑制剂；超说明书用药；肿瘤
中图分类号：R95，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1358-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.040

Off-label usage of immune checkpoint inhibitors in a cancer hospital

YAN Ting[1, 2], LIAO De-hua[2], FU Yi-lan[2], CHEN Yun[2], LIU Ni[2], LUO Jia[2], ZENG Mei-zi[2], TANG Jing-yi[2], YANG Xiao-ping[1*] (1. *Key Laboratory of Study and Discovery of Small Targeted Molecules of Hunan*, *School of Medicine*, *Hunan Normal University*, *Changsha* 410013; 2. *Department of Pharmacy*, *Hunan Cancer Hospital*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To explore the off-label use and management points of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in a cancer hospital, providing a reference for rational clinical drug use. **Methods** A retrospective investigation was conducted on the usage profile and off-label medication use of ICIs in a cancer hospital from January to June 2023. Analyse, evaluate and summarise the evidence base for off-label drug use with reference to high-level evidence-based medical evidence. **Results** Totally 527 patients were treated with 15 ICIs, involving 16 tumor types, and 16.88% (89/527) of them had the off-label drug use. Among them, the top three tumor type were cervical cancer (50.56%), hepatocellular carcinoma (13.48%), and nasopharyngeal carcinoma (10.11%), and the top three ICIs were tislelizumab (26.97%), camrelizumab (16.85%), and zimberelimab (15.73%). **Conclusion** All cases of off-label usage are supported by high-level evidence-based medical evidence. Standardised management of off-label usage can promote rational clinical use of medication. As drug label and guidelines are updated constantly, pharmacists should keep abreast of the research frontiers and pay attention to the evidence-based medical evidence simultaneously, so as to guarantee for the safe and effective use of medication.

Key words: immune checkpoint inhibitor; off-label use; cancer

基金项目：湖南省药学会医院药学研究基金（No.2020YXH001）。

作者简介：严婷，女，硕士，主管药师，主要从事肿瘤药理学方面的研究，email：td2021020107@hunnu.edu.cn *通信作者：杨小平，男，教授，主要从事肿瘤药理及小分子靶向药物创制方面的研究，email：Xiaoping.yang@hunnu.edu.cn

近年来，免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitors，ICIs）通过阻断程序性死亡蛋白受体 1（programmed cell death protein 1，PD-1）、程序性死亡蛋白配体 1（programmed cell death protein ligand 1，PD-L1）和细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4（cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4，CTLA-4）信号通路来增强 T 细胞的免疫功能，发挥抗肿瘤作用，已成为癌症治疗的重要组成部分[1]。2011 年伊匹木单抗作为首个 ICIs 被美国食品药品监督管理局（U.S. Food and Drug Administration，FDA）批准上市，在此之后，PD-1 抑制剂如帕博利珠单抗、纳武利尤单抗，PD-L1 抑制剂如阿替利珠单抗、度伐利尤单抗也被 FDA 批准多个适应证。纳武利尤单抗是首个被我国批准上市的 PD-1 抑制剂。2018 年 12 月，首个国产 PD-1 抑制剂特瑞普利单抗获批上市，随后我国批准了 11 个 PD-1 抑制剂、4 个 PD-L1 抑制剂，1 个 CTLA-4 抑制剂和 1 个 PD-1/CTLA-4 抑制剂上市。

随着恶性肿瘤的发展，尤其是在标准治疗后仍然容易复发和转移的情况下，超说明书用药，特别是免疫治疗药物，在肿瘤领域变得相当普遍。由于目前上市的抗肿瘤药物尚不能完全满足肿瘤患者的用药需求，且药品说明书往往滞后于临床实践，一些建立在高级别循证医学证据（evidence-based medicine，EBM）上的用法也未能及时在药品说明书中明确规定[2]。鉴于疾病治疗的紧迫需求和患者的意愿，医师在临床实践中可能会有超说明书用药现象。国外有研究分析了 5 个 ICIs 的超说明书使用，超适应证占比为 37.1%，并认为出现这种现象的主要原因是适应证未获批[3]。此外，国内研究报道显示临床实践中 7 种 ICIs 超说明书用药占比高达 85.92%[4]。鉴于目前国内已上市 17 个 ICIs，基于此，本研究旨在调查某肿瘤医院该类药物的超说明书使用情况，通过评估使用免疫治疗药物的病例信息，并参考相关的循证医学证据，为这类药物临床合理应用提供参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

在某肿瘤医院的 HIS 系统抽取 2023 年 1—6 月使用 ICIs 的病例，病例信息包括性别、年龄、肿瘤类型、ICIs 药物名称等。使用的 ICIs 药物包括 9 个 PD-1 抑制剂（帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、信迪利单抗、派安普利单抗、赛帕利单抗、斯鲁利单抗），4 个 PD-L1 抑制剂（阿替利珠单抗、度伐利尤单抗、恩沃利单抗、舒格利单抗），1 个 CTLA-4 抑制剂（伊匹木单抗）和 1 个 CTLA-4/PD-1 抑制剂（卡度尼利单抗），共计 15 个 ICIs。

1.2　研究方法

使用 Excel 软件对病例信息进行录入整理，采用 SPSS 20.0 软件对年龄进行描述，对性别、药物名称、肿瘤类型描述频数和占比。

1.3　评价标准

根据国家卫生健康委印发的《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则（2022 年版）》，抗肿瘤药物的使用应严格遵循适应证用药原则，不能随意超适应证使用。在尚无更好的治疗手段等特殊情况下，国际权威学协会或组织发布的诊疗规范、临床诊疗指南，以及经国家卫生健康委员会认可的诊疗规范、临床诊疗指南和临床路径等也可作为新型抗肿瘤药物超说明使用的 EBM 依据[5]。本次超说明书用药评价的 EBM 主要包括国外政府机构批准的药品说明书（如 FDA 说明书）、经国家卫生健康委认可的治疗规范、中国临床肿瘤学会（Chinese Society of Clinical Oncology，CSCO）和美国国家综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network，NCCN）等部门发布的临床指南，以及多中心大样本随机对照试验阳性结果。

2　结果

2.1　病例基本情况

使用 ICIs 的肿瘤患者有 527 例（655 人次），其中男性 361 例（68.50%），女性 166 例（31.50%），年龄 19 ～ 81 岁，平均年龄（55.6±10.4）岁。ICIs 说明书内使用与超说明书使用例数情况比较见图 1。不同肿瘤类型的说明书内使用与超说明书使用例数情况见图 2。

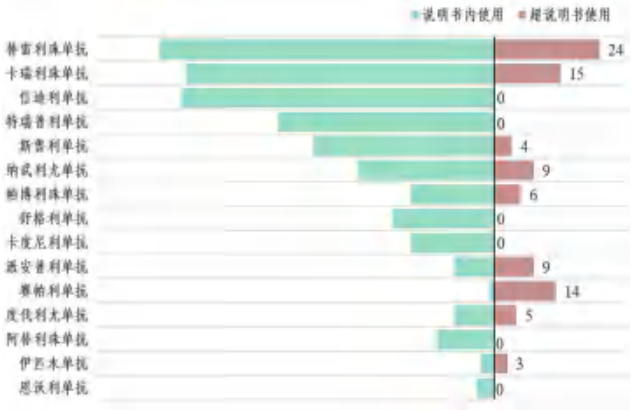

图 1　ICIs 说明书内使用与超说明书使用例数情况

Fig 1　Usage and off-label usage cases of ICIs

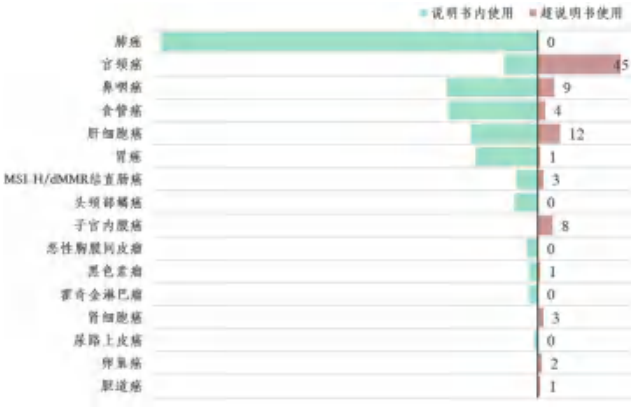

图 2 ICIs 说明书内使用与超说明书使用肿瘤类型

Fig 2 Tumor types of label usage and off-label usage of ICIs

注（Note）：MSI-H. 微卫星高度不稳定（microsatellite instability high）；dMMR. 微卫星高度不稳定错配修复功能缺陷（damage mismatch repair）。

2.2 超说明书用药情况

参考 15 个 ICIs 的最新说明书（截止日期：2023 年 6 月 30 日），527 份病历中，438 例为说明书内使用，89 例为超说明书使用，超说明书用药占比为 16.88%。根据图 1 可知，超说明书使用的主要药物为替雷利珠单抗（24 例）、卡瑞利珠单抗（15 例）、赛帕利单抗（14 例）、派安普利单抗（9 例）、纳武利尤单抗（9 例）。阿替利珠单抗、恩沃利单抗、卡度尼利单抗、舒格利单抗、特瑞普利单抗和信迪利单抗均未有超说明书用药情况。根据图 2，超说明书用药肿瘤类型主要为宫颈癌（45 例）、肝细胞癌（12 例）、鼻咽癌（9 例）、子宫内膜癌（8 例）。15 个 ICIs 涉及肿瘤类型与超说明书用药情况见图 3。

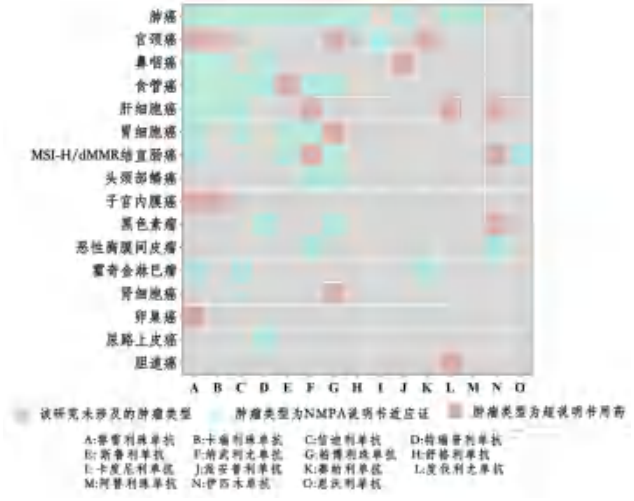

图 3 15 个 ICIs 涉及的肿瘤类型与超说明书用药情况

Fig 3 Tumour types and off-label usage of 15 ICIs

3 分析与讨论

3.1 宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌超说明书用药分析

宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌超说明书用药情况见表 1[6-9]。帕博利珠单抗是全球首个获批用于治疗晚期宫颈癌的 PD-1 抑制剂 [6]。在Ⅱ期临床研究 KEYNOTE-158 中，帕博利珠单抗单药治疗 98 例宫颈癌患者的客观缓解率（objective response rate，ORR）为 14.3%，有 91% 患者的缓解持续时间（duration of response，DOR）超过了 6 个月 [10]。随后 KEYNOTE-826 的结果显示，在一线治疗 PD-L1 阳性[综合阳性评分（combined positive score，CPS）≥ 1]的宫颈癌患者中，帕博利珠单抗联合化疗 ± 贝伐珠单抗的无进展生存期（progression-free survival，PFS）和总生存期（overall survival，OS）明显长于安慰剂组，317 名患者（PD-L1 ≥ 10）的 PFS 分别为 10.4 个月和 8.1 个月，2 年 OS 率分别为 53.0% 和 41.7%[11]。在国内多中心Ⅱ期临床研究 RATIONALE-209 中，基于中国人群 17 例妇科肿瘤患者的数据显示，替雷利珠单抗对于妇科肿瘤的治疗效果良好，ORR 为 53.3%，疾病控制率（disease control rate，DCR）为 60.0%，其中子宫内膜癌患者的 ORR 为 46.2%，卵巢癌和宫颈癌患者的疗效评估为部分缓解 [12]。关于宫颈癌的联合治疗，一项研究结果显示替雷利珠单抗与安罗替尼联合治疗复发宫颈癌的患者时，16 例患者的 ORR 为 31.3%，DCR 为 93.8%[13]。另一种 PD-1 抑制剂与靶向药物的组合是卡瑞利珠单抗联合甲磺酸阿帕替尼，CLAP 研究入组 45 例宫颈癌患者的 ORR 为 55.6%，中位 PFS 为 8.8 个月 [14]。这种联合疗法也对晚期 / 复发性子宫内膜癌患者有获益，21 例患者的 ORR 为 47.6%，中位 PFS 为 11.8 个月 [15]。此外，局部晚期宫颈癌新辅助治疗的卡瑞利珠单抗联合化疗研究也在进行中，其中 48 例患者的 ORR 可达到 100%[16]。Wu 等 [17] 开展了一项Ⅱ期临床研究探索赛帕利单抗治疗既往失败的转移性或复发宫颈癌患者的疗效，90 例患者的 ORR 为 27.8%，DCR 为 54.4%，中位 PFS 为 3.7 个月，中位 OS 为 16.8 个月。

3.2 肝细胞癌、胆道癌超说明书用药分析

肝细胞癌、胆道癌超说明书用药情况见表 2[8，18-23]。FDA 已批准纳武利尤单抗联合伊匹木单抗用于接受过索拉非尼治疗的肝细胞癌患者 [18，20]。CheckMate-040 研究结果表明，对于未经索拉非尼治疗的晚期肝细胞癌患者，纳武利尤单抗联合伊匹木单抗治疗后的中位 OS 长达 28.6 个月，而对于接受过索拉非尼治疗的患者，中位 OS 也达到了 15.6 个月 [24]。HIMALAYA 是一项随机、双盲、Ⅲ期临床研究，比较了另一种 ICIs 联合 CTLA-4 抑制剂

表 1　宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌超说明书用药

Tab 1　Off-label usage for cervical，endometrial and ovarian cancer

药品名称	肿瘤类型	证据类型	参考文献
帕博利珠单抗	宫颈癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：宫颈癌（2023.V1）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[6-8]
替雷利珠单抗	宫颈癌	2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8]
替雷利珠单抗	子宫内膜癌	2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8]
替雷利珠单抗	卵巢癌	妇科肿瘤免疫检查点抑制剂临床应用指南（2023 版）	[9]
卡瑞利珠单抗	宫颈癌	妇科肿瘤免疫检查点抑制剂临床应用指南（2023 版）	[9]
卡瑞利珠单抗	子宫内膜癌	妇科肿瘤免疫检查点抑制剂临床应用指南（2023 版）	[9]
赛帕利单抗	宫颈癌	妇科肿瘤免疫检查点抑制剂临床应用指南（2023 版）	[9]

（度伐利尤单抗＋ tremelimumab）与索拉非尼治疗肝细胞癌的疗效，结果显示，与索拉非尼组相比，联合方案的中位 OS 为 16.4 个月，并且联合方案在 ORR 的 OS 均优于度伐利尤单抗单药组 [25]。另外，在亚洲人群的研究结果与全球人群相一致，表示该方案对亚洲晚期肝细胞癌患者的预后同样有改善 [26]。NCCN 临床实践指南：肝细胞癌（2022.V5）和 2023 CSCO 指南都将该方案作为一线治疗晚期肝细胞癌的Ⅰ级推荐。此外，2023 CSCO 指南还新增了度伐利尤单抗联合吉西他滨＋顺铂治疗晚期胆道癌的Ⅰ级推荐，该推荐是基于 TOPAZ-1 研究的阳性结果。TOPAZ-1 研究是一项评估度伐利尤单抗联合吉西他滨加顺铂对晚期胆道癌患者疗效和安全性的Ⅲ期临床研究，结果显示，与安慰剂加化疗相比，度伐利尤单抗联合化疗显著提高了 OS，2 年 OS 率为 24.9% *vs* 10.4%[23]。

表 2　肝细胞癌、胆道癌超说明书用药

Tab 2　Off-label usage for hepatocellular carcinoma，biliary tract cancer

药品名称	肿瘤类型	证据类型	参考文献
纳武利尤单抗	肝细胞癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：肝细胞癌（2022.V5）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8，18-19]
伊匹木单抗	肝细胞癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：肝细胞癌（2022.V5）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8，19-20]
度伐利尤单抗	肝细胞癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：肝细胞癌（2022.V5）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南；Ⅲ期临床研究（HIMALAYA）	[8，19-21]
度伐利尤单抗	胆道癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：胆道癌（2022.V1）；Ⅲ期临床研究（TOPAZ-1）	[21-23]

3.3　MSI-H/dMMR 结直肠癌、胃癌、食管癌超说明书用药分析

MSI-H/dMMR 结直肠癌、胃癌、食管癌超说明书用药情况见表 3[6，8，18，20，27-28]。Chalabi 等 [29] 开展了一项纳武利尤单抗和伊匹木单抗联合用于早期结肠癌的新辅助治疗的研究，结果显示该方案能够观察到 100% dMMR 肿瘤的病理反应。随后，CheckMate 142 研究进一步探讨了纳武利尤单抗单药或联合伊匹木单抗在转移性 MSI-H/dMMR 患者中的应用 [30]。长期随访结果显示，纳武利尤单抗单药组的 DCR 为 62%，中位 PFS 为 4.2 个月 [31]。联合组的获益似乎更具优势，119 例患者 ORR 为 55%，12 个月的 PFS 率为 71%，OS 率为 85%[32]。鉴于此，FDA 已批准纳武利尤单抗联合伊匹木单抗用于晚期 MSI-H/dMMR 结直肠癌的治疗。针对 HER2 阳性的胃癌患者，对 PD-1 和 HER2 双重阻断的 KEYNOTE-811 研究显示，帕博利珠单抗联合曲妥珠单抗可以显著缩小肿瘤体积，部分患者达到完全缓解，对比安慰剂联合曲妥珠单抗加化疗 ORR 为 52%，帕博利珠单抗联合曲妥珠单抗加化疗的 ORR 升至 74%[33]。斯鲁利单抗是我国第 7 个获批的自主研发的创新型 PD-1 抑制剂。在一项多中心、Ⅲ期临床试验中，551 名 PD-L1 阳性食管鳞状细胞癌患者接受了斯鲁利单抗或安慰剂加化疗的一线治疗，观察到斯鲁利单抗加化疗的中位 PFS（5.8 个月 *vs* 5.3 个月）和中位 OS（15.3 个月 *vs* 11.8 个月）显著延长 [34]。

3.4　鼻咽癌、肾细胞癌、黑色素瘤超说明书用药分析

鼻咽癌、非小细胞肺癌、肾细胞癌、黑色素瘤超说明书用药情况见表 4[6，8，20，35-36]。2022 年美国临床肿瘤学会年会公布了派安普利单抗加吉西他滨联合顺铂或安罗替尼一线治疗转移性鼻咽癌的Ⅱ期临床研究结果，所有患者均获得肿瘤缓

表 3 MSI-H/dMMR 结直肠癌、胃癌、食管癌超说明书用药

Tab 3 Off-label usage for MSI-H/dMMR colorectal cancer，gastric cancer and esophageal cancer

药品名称	肿瘤类型	证据类型	参考文献
纳武利尤单抗	MSI-H/dMMR 结直肠癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：结直肠癌（2022.V2）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8，18，27]
伊匹木单抗	MSI-H/dMMR 结直肠癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：结直肠癌（2022.V2）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8，20，27]
帕博利珠单抗	胃癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：胃癌（2023.V2）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[6，8，28]
斯鲁利单抗	食管癌	2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8]

解，派安普利单抗联合吉西他滨与安罗替尼组的 ORR 达到 100%[37]。该项适应证批准申请目前尚在 NMPA 审核中，2023 CSCO 指南仅作为Ⅲ级推荐。KEYNOTE-426 是一项随机、Ⅲ期临床研究，以 16 个国家的 129 家中心以晚期肾细胞癌患者为对象，相较于舒尼替尼组 PFS 为 11.1 个月，帕博利珠单抗联合阿西替尼的 PFS 更长，为 15.4 个月 [38]。KEYNOTE-581 研究比较了帕博利珠单抗联合仑伐替尼与舒尼替尼治疗晚期肾细胞癌患者的疗效，对比舒尼替尼组 9.2 个月，帕博利珠单抗联合仑伐替尼组的 PFS（23.9 个月）显著延长 [39]。KEYNOTE-564 研究则是评估了帕博利珠单抗单药与安慰剂辅助治疗肾切除术后肾细胞癌患者的疗效，30 个月的随访分析显示，与安慰剂相比，帕博利珠单抗单药组提高了无病生存率 [40]。基于前述研究结果，FDA 批准了帕博利珠单抗联合阿昔替尼或联合仑伐替尼用于成人晚期肾细胞癌患者的一线治疗，而对于肾切除术后或转移病灶切除后的肾细胞癌患者，使用帕博利珠单抗单药可作为辅助治疗 [6]。伊匹木单抗是全球首个上市的 ICIs，也是目前国内唯一获批上市的 CTLA-4 抑制剂。本研究中的黑色素瘤患者使用伊匹木单抗单药治疗，因此仅讨论伊匹木单抗单药治疗黑色素瘤的 EBM 证据。在 MDX010-20 临床试验中，伊匹木单抗对治疗后存活 2 年以上的转移性黑色素瘤患者的疗效显示，与单纯使用 Glycoprotein-100 组相比，伊匹木单抗单药组的中位 OS 率显著提高，2 年 OS 率为 25% *vs* 17%[41]。

表 4 鼻咽癌、非小细胞肺癌、肾细胞癌、黑色素瘤超说明书用药

Tab 4 Off-label usage for nasopharyngeal carcinoma，renal cell carcinoma，melanoma

药品名称	肿瘤类型	证据类型	参考文献
派安普利单抗	鼻咽癌	2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[8]
帕博利珠单抗	肾细胞癌	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：肾癌（2022.V3）；2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南	[6，8，35]
伊匹木单抗	黑色素瘤	FDA 说明书；NCCN 临床实践指南：皮肤黑色素瘤（2022.V3）	[20，36]

3.5 小结

本研究回顾性分析了某肿瘤医院使用 15 个 ICIs 的 527 例病例情况，其中 89 例为超说明书用药，经查阅 FDA 说明书、2023 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南、NCCN 指南和妇科肿瘤免疫检查点抑制剂临床应用指南（2023 版）以及大型 3 期临床研究阳性结果等，89 例超说明书用药均有 EBM 证据支持。针对新型抗肿瘤药物，该院已建立超说明书用药管理，超说明书用药需经过备案、特殊情况知情告知以及用药监护三个重要步骤。相较于国内其他医院 ICIs 超说明书用药占比 85.92%[4]，该院 ICIs 超说明书用药占比较低，仅为 16.88%。就单个药物而言，帕博利珠单抗超说明书用药占比为 24.49%[42]，卡瑞利珠单抗超说明书用药占比为 45.63%[43]，信迪利单抗超说明书用药占比为 27.68%[44]，本研究结果相对文献报道均较低，分别为 6.74%、16.85% 和未发生。

ICIs 的超说明书用药既是医学技术发展的需要，也是治疗疾病和挽救患者生命健康的需要 [45]。尽管最新版的《医师法》已将超说明书用药纳入法规：在尚无有效或者更好的治疗手段等特殊情况下，医师取得患者明确知情同意后，可以采用药品说明书中未明确但具有循证医学证据的药品用法实施治疗 [46]。但由于国内外批准说明书持续更新，权威机构发布的治疗规范、诊疗指南和大型Ⅲ期临床研究阳性结果日新月异，为确保患者治疗方案的最佳有效化，充分权衡治疗方案的风险与获益，药师应紧跟研究前沿，持续关

注最新的循证医学证据，提高循证药学水平，为患者开展超说明书用药监护及药学服务提供保障。

声明：该研究中抗肿瘤药物超说明书使用已经过医院医学伦理委员会审批同意（批件号：湖南省肿瘤医院医学伦理委员会 2023 年特殊事项快审 [1] 号）。

参考文献

[1] Jenkins RW，Barbie DA，Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors [J]. Br J Cancer，2018，118（1）：9-16.

[2] 国家卫生健康委 . 抗肿瘤药物临床应用管理办法（试行）[EB/OL].（2020/12/28）http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/202012/a7600740bed44d1db7015ca5a1be2cc0. shtml.

[3] Kandemir EA，Karaomerlioglu I，Yaradilmis IM. Off-label use of immune checkpoint inhibitors for the treatment of solid tumors：analysis of a nationwide patient sample [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2023，149（11）：8655-8662.

[4] 钱灿，蒋倩，李超，等 . 某院免疫检查点抑制剂类药物超说明书用药分析 [J]. 中国药业，2022，31（9）：5-10.

[5] 国家卫生健康委 . 新型抗肿瘤药物临床应用指导原则（2022 年 版）[EB/OL].（2022/12/30）http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/202212/8df034c9afb44a9d95cd986d4e12fbd8. shtml.

[6] Administration USFaD. Pembrolizumab [EB/OL].（2022/12/16）https：//www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/label/2022/125514s127lbl. pdf.

[7] Network NCC. Cervical Cancer Version 1. 2023 [M]. 3025 Chemical Road，Suite 100，Plymouth Meeting，PA 19462：National Comprehensive Cancer Network，2022.

[8] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 免疫检查点抑制剂临床应用指南（2023）[M]. 北京：人民卫生出版社，2023.

[9] 孔北华，刘继红，殷爱军，等 . 妇科肿瘤免疫检查点抑制剂临床应用指南（2023 版）[J]. 现代妇产科进展，2023，32（5）：321-348.

[10] Marabelle A，Le DT，Ascierto PA，et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer：results from the phase Ⅱ KEYNOTE-158 study [J]. J Clin Oncol，2020，38（1）：1.

[11] Colombo N，Dubot C，Lorusso D，et al. Pembrolizumab for persistent，recurrent，or metastatic cervical cancer [J]. N Engl J Med，2021，385（20）：1856-1867.

[12] Li J，Xu Y，Zang AM，et al. A phase 2 study of tislelizumab monotherapy in patients with previously treated，locally advanced unresectable ormetastatic microsatellite instability-high/mismatch repair deficient solid tumors [J]. J Clin Oncol，2021，39（15_suppl）：2569.

[13] Zheng M，Zhou Y，Zhou J，et al. 564P Efficacy and safety of tislelizumab plus anlotinib in the treatment of cervical cancer resistant to standard therapy：a prospective，single-arm，open labelled phase Ⅱ clinical trial [J]. Ann Oncol，2022，33（SUPPLEMENT 7）：S806.

[14] Lan CY，Shen JX，Wang Y，et al. Camrelizumab plus apatinib in patients with advanced cervical cancer（CLAP）：a multicenter，open-label，single-arm，phase Ⅱ trial [J]. J Clin Oncol，2020，38（34）：4095.

[15] Wang HY，Tian WJ，Ren YL，et al. Camrelizumab plus apatinib in patients with advanced or recurrent endometrial cancer after failure of at least one prior systemic therapy：a single-arm phase Ⅱ trial [J]. J Clin Oncol，2023，41（16_suppl）：5516-5516.

[16] Chen J，Li K，Han Y，et al. 560P Neoadjuvant camrelizumab plus chemotherapy in patients with locally advanced cervical cancer（NACI）：a prospective，single-arm，phase Ⅱ trial [J]. Ann Oncol，2022，33（SUPPLEMENT 7）：S804.

[17] Wu X，Xia L，Zhou Q，et al. 357 GLS-010（Zimberelimab），a novel fully human anti-PD-1 mAb in chinese patients with recurrent/metastatic cervical cancer：results from a multicenter，open-label，single-arm phase Ⅱ trial [J]. Int J Gynecol Cancer，2020，30（Suppl 3）：A147-A147.

[18] Administration USFaD. Nivolumab [EB/OL].（2022/07/14）https：//www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/label/2022/125554s114lbl. pdf.

[19] Network NCC. Hepatobiliary Cancers Version 5. 2022 [M]. 3025 Chemical Road，Suite 100，Plymouth Meeting，PA 19462：National Comprehensive Cancer Network，January 13，2023.

[20] Administration USFaD. Ipilimumab [EB/OL].（2022/11/23）https：//www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/label/2022/125377s130lbl. pdf.

[21] Administration USFaD. Durvalumab [EB/OL].（2022/11/10）https：//www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/label/2022/761069s033lbl. pdf.

[22] Network NCC. Biliary Tract Cancers Version 1. 2022 [M]. 3025 Chemical Road，Suite 100，Plymouth Meeting，PA 19462：National Comprehensive Cancer Network，2022.

[23] Oh DY，He AR，Qin S，et al. Durvalumab plus gemcitabine and cisplatin in advanced biliary tract cancer [J]. NEJM Evidence，2022，1（8）：EVIDoa2200015.

[24] Yau T，Kang YK，Kim TY，et al. Efficacy and safety of nivolumab plus ipilimumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib：the CheckMate 040 randomized clinical trial [J]. JAMA Oncology，2020，6（11）：e204564-e204564.

[25] Kudo M. Durvalumab plus tremelimumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. Hepatobiliary Surg Nutr，2022，11（4）：592-596.

[26] Chan S，Kudo M，Sangro B，et al. 67O Outcomes in the Asian subgroup of the phase Ⅲ HIMALAYA study of tremelimumab（T）plus durvalumab（D）in unresectable

hepatocellular carcinoma（uHCC）[J]. Ann Oncol，2022，33（SUPPLEMENT 9）：S1456.
[27] Network NCC. Colon/Rectal Cancers Version 2. 2022 [M]. 3025 Chemical Road，Suite 100，Plymouth Meeting，PA 19462：National Comprehensive Cancer Network，2022.
[28] Network NCC. Gastric Cancer Version 2. 2023 [M]. 3025 Chemical Road，Suite 100，Plymouth Meeting，PA 19462：National Comprehensive Cancer Network，2022.
[29] Chalabi M，Fanchi L，Van den Berg J，et al. Neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in early stage colon cancer [J]. Ann Oncol，2018，29（SUPPLEMENT 8）：viii731.
[30] Overman MJ，McDermott R，Leach JL，et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer（CheckMate 142）：an open-label，multicentre，phase 2 study [J]. Lancet Oncol，2017，18（9）：1182-1191.
[31] Overman MJ，Bergamo F，McDermott RS，et al. Nivolumab in patients with DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high（dMMR/MSI-H）metastatic colorectal cancer（mCRC）：long-term survival according to prior line of treatment from CheckMate-142 [J]. J Clin Oncol，2018，36（4_suppl）：554-554.
[32] Andre T，Lonardi S，Wong M，et al. Nivolumab ＋ ipilimumab combination in patients with DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high（dMMR/MSI-H）metastatic colorectal cancer（mCRC）：first report of the full cohort from CheckMate-142 [J]. J Clin Oncol，2018，36（4_suppl）：553-553.
[33] Chung HC，Bang YJ，Fuchs CS，et al. First-line pembrolizumab/placebo plus trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive advanced gastric cancer：KEYNOTE-811 [J]. Future Oncol，2021，17（5）：491-501.
[34] Song Y，Zhang B，Xin D，et al. First-line serplulimab or placebo plus chemotherapy in PD-L1-positive esophageal squamous cell carcinoma：a randomized，double-blind phase 3 trial [J]. Nat Med，2023，29（2）：473-482.
[35] Network NCC. Kidney Cancer Version 3. 2023 [M]. 3025 Chemical Road，Suite 100，Plymouth Meeting，PA 19462：National Comprehensive Cancer Network，2022.
[36] Network NCC. Melanoma Cutaneous Version 3. 2022 [M]. 3025 Chemical Road，Suite 100，Plymouth Meeting，PA 19462：National Comprehensive Cancer Network，2022.
[37] Huang S，Chen X，Qu S，et al. Penpulimab plus gemcitabine in combination with cisplatin or anlotinib as first-line treatment for metastatic nasopharyngeal carcinoma（MNPC）：a phase Ⅱ study [J]. J Clin Oncol，2022，40（16_suppl）：e18032-e18032.
[38] Powles T，Plimack ER，Soulières D，et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma（KEYNOTE-426）：extended follow-up from a randomised，open-label，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2020，21（12）：1563-1573.
[39] Motzer R，Alekseev B，Rha SY，et al. Lenvatinib plus pembrolizumab or everolimus for advanced renal cell carcinoma [J]. N Engl J Med，2021，384（14）：1289-1300.
[40] Powles T，Tomczak P，Park SH，et al. Pembrolizumab versus placebo as post-nephrectomy adjuvant therapy for clear cell renal cell carcinoma（KEYNOTE-564）：30-month follow-up analysis of a multicentre，randomised，double-blind，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2022，23（9）：1133-1144.
[41] McDermott D，Haanen J，Chen TT，et al. Efficacy and safety of ipilimumab in metastatic melanoma patients surviving more than 2 years following treatment in a phase Ⅲ trial（MDX010-20）[J]. Ann Oncol，2013，24（10）：2694-2698.
[42] 陈富钦，刘裕华，王敏荧，等 . 某肿瘤医院帕博利珠单抗超适应证用药分析 [J]. 中国处方药，2022，20（9）：87-90.
[43] 戴丽，王凤玲，邢海燕，等 . 103 例患者卡瑞利珠单抗超适应证用药的合理性分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2023，23（8）：1008-1010，1015.
[44] 隋月，李雨，刘广宣 . 信迪利单抗用药评价和分析 [J]. 中南药学，2023，21（4）：1087-1092.
[45] 张雷，马文兵，宋鹏飞，等 . 抗肿瘤药物超说明书使用面临的伦理问题探析 [J]. 中国医学伦理学，2023，36（7）：714-717，723.
[46] 陈慧，孙阳，王峰 . 我院新型抗肿瘤药超说明书用药循证评价标准的应用分析 [J]. 药学与临床研究，2023，31（3）：270-274.

（收稿日期：2023-11-20；修回日期：2024-02-01）

日本汉方药企业专利布局分析——以株式会社津村为例

王铁融[1]，刘盼[2]，侯媛媛[1]，曹雅迪[3]，陈宁[4]，衡宇鑫[1]，刘伟[1*]（1. 北京中医药大学管理学院，北京 100029；2. 北京中医药大学图书馆，北京 100029；3. 北京北中岐黄科技投资管理有限公司，北京 100029；4. 北京中医药大学成果转化中心，北京 100029）

摘要：目的 对株式会社津村 2000—2022 年申请的日本专利和中国专利进行分析，了解其技术研发及专利布局方向，并挖掘其战略处方专利布局，以期对我国中药企业有所启示。**方法** 在 Incopat 专利检索数据库上检索 2000—2022 年株式会社津村申请的专利，对其进行专利标引及专利技术分析。**结果** 株式会社津村围绕汉方制剂产业链上下游技术开展专利布局，专利布局连续且技术主题丰富，对我国中药企业具有潜在威胁，战略处方专利布局具有策略性。**结论** 我国企业要制定灵活的专利布局策略，拓宽中药企业专利布局技术覆盖范围，持续研发投入并做好专利防御，策略性搭建重点中药产品专利网。

关键词：日本汉方药；株式会社津村；专利布局

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1365-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.041

Patent distribution of Japanese Kampo medicine enterprises-TSUMURA & CO as an example

WANG Tie-rong[1], LIU Pan[2], HOU Yuan-yuan[1], CAO Ya-di[3], CHEN Ning[4], HENG Yu-xin[1], LIU Wei[1*] (1. *School of Management*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029; 2. *Library of Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029; 3. *Beijing Beizhong Qihuang Technology Investment Management Co.*, *Ltd.*, *Beijing* 100029; 4. *Center of Technology Transfer*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029)

Abstract: Objective To analyze the Japanese patents and Chinese patents applied by TSUMURA & CO from 2000 to 2022, to understand its research and patent direction and its strategic prescription patents to enlighten Chinese traditional medicine enterprises. **Methods** Patents filed by TSUMURA & CO from 2000 to 2022 were searched in Incopat patent search database. The patent indexes were analyzed. **Results** TSUMURA & CO preparation industry chain was complete, the patent distribution was continuous and rich in technical themes, which posed a potential threat to Chinese traditional medicine enterprises. The prescription patents were strategic. **Conclusion** Chinese enterprises should form flexible patent strategies, broaden the coverage of patent distribution continue investment in R&D and patent defense and strategically construct key Chinese medicine product patent network.

Key words: Japanese Kampo medicine; TSUMURA & CO; patent distribution

据日本厚生劳动省 2019 年公布的《令和元年药事工业生产动态统计年报》统计，源于中国古代传统医学的日本汉方制剂出口远销德国、美国，甚至在中国也有一定的出口占比[1]。株式会社津村（以下简称“津村”）为日本最大的汉方药生产企业，成立于 1893 年，距今已有 130 年的历史，拥有 129 个被纳入日本医疗保险药价标准的医疗用汉方制剂处方，凭一己之力占据日本国内医疗用汉方制剂 80% 以上的市场份额[2]。津村对中国中药企业的一系列收购行为显示出津村早

基金项目：国家知识产权局专利专项研究项目（No.FX202212）。

作者简介：王铁融，男，硕士研究生，主要从事医药知识产权与成果转化研究，email：wxinxin0222@163.com　*通信作者：刘伟，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事医药知识产权保护与成果转化研究，email：nolanlucky@163.com

将目光投向幅员辽阔的中国，据其 2022 年企业报告书记载，中国的中药市场规模约为日本汉方药和饮片的 40 倍。目前津村已在天津、上海和深圳等地设立多所生药采购种植加工基地和饮片生产销售基地，中国业务已成为津村发展的首要课题 [3]。

津村通过合理连续的专利布局，充分占据日本汉方药市场，并在国际竞争中处于进可攻、退可守的有利地位，其在我国不断扩大市场范围的行为已对中药企业部分领域初显威胁。《中药大品种科技竞争力报告》及相关专利检索显示，近 70% 的中药大品种百强企业专利申请数尚未过百。在上述背景下，本文拟对津村 2000—2022 年申请的日本专利和中国专利进行分析，了解其技术研发及专利布局方向，并选取企业经典战略处方进行专利布局案例分析，以期对我国中药企业有所启示。

1 资料来源

综合考虑日本 20 世纪以来从“科技立国”到“知识产权立国”战略的转变以及发明专利的有效期限等因素，本研究选取 2000—2022 年津村申请的专利为研究对象。专利资料来源于 Incopat 专利检索数据库，以“津村株式会社”“TSUMURA & CO”“株式会社津村”“TSUMURAJUNTENDOKK”“株式会社ツムラ”“津村股份有限公司”为申请人，全面检索申请日期为 2000 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日的相关发明专利，共检索到日本专利 147 件，中国专利 52 件（不包含中国台湾专利及中国香港专利）。经人工清洗，去除无关专利 12 件，最终列入 135 件日本发明专利和 52 件中国发明专利为研究对象。

2 株式会社津村日本发明专利申请分析

2.1 专利基本信息

135 件日本发明专利中，25 件通过日本专利局进入了国际阶段，PCT 专利申请技术主题多涉及质量控制方法（13 件）(见图 1)；合作研发专利共 39 件，占比约 29%，主要合作研发对象的类型包括企业、高校和科研院所（见图 2），合作研发专利其技术主题多涉及产品（15 件）、设备装置与系统（12 件）和质量控制（8 件）。其 135 件发明专利技术主题及申请年份分布如图 3 所示。可以看出，产品专利的申请数量在 2000—2006 年爆发式增长，而近些年呈断崖式下降。但其余技术主题特别是质量控制专利则有持续的研发热度，同时津村在生药栽培领域亦开展了专利布局。

2.2 产品

在检索到的 58 件产品专利中，含中药成分的药物组合物占 16 件，针对汉方制剂的专利包括：2000 年公开了一种与大建中汤组方相同的抗炎组合物；2003 年将麦门冬汤中提取出的有效成分制成止咳药；2006 年从黄连解毒汤中提取了前列腺素 E_2 产生促进剂，可用以治疗克罗恩病；2010 年津村与鹿儿岛大学联合从六君子汤中提取出一种改善或缓解与癌症相关恶病质的有效成分。针对生药的专利包括：2000 年将紫苏提取物制成抗抑郁药物；2003 年将生姜提取物用于头发生长剂；2005 年将绿茶提取物用于治疗鼻炎以及皮肤瘙痒；2006 年将陈皮提取物的有效成分制成髓磷脂碱性蛋白 MBP 产生促进剂；2022 年以麻黄提取物为有效成分，制成以预防或治疗新型冠状病毒感染为特征的抗病毒剂。可以看出津村对于汉方药的开发不仅局限于单一生药提取物的研究，更对中药经典方剂的有效成分有所窥探和

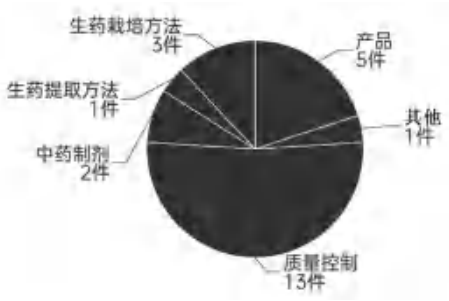

图 1 25 件 PCT 专利技术主题分布

Fig 1 Distribution of technical subjects of 25 PCT patents

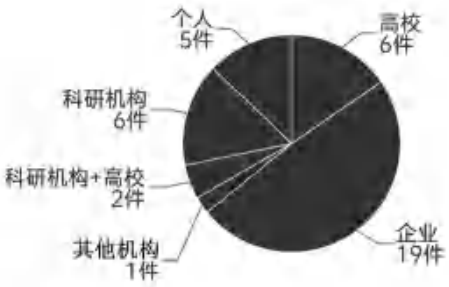

图 2 39 件合作研发专利类型分布

Fig 2 Distribution of 39 cooperative R&D patent types

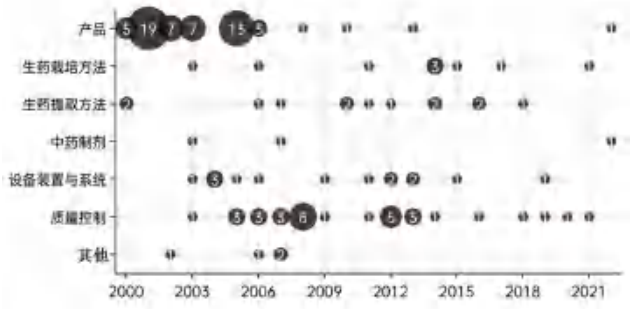

图 3 2000—2022 年株式会社津村申请日本专利的技术主题及申请年份分布

Fig 3 Distribution of TSUMURA & CO’s Japanese patent technology themes and application year from 2000 to 2022

挖掘。值得一提的是，在日本“温泉文化”的影响下，清洁洗浴相关产品的专利高达 26 件，产品中涉及薄荷、甘草、艾草、菖蒲、川芎等多种生药提取物。总体来看，2000—2006 年为津村产品专利研发高潮，共申请了 54 件产品相关专利，而 2007 年至今仅申请了 4 件相关专利（见图 4）。

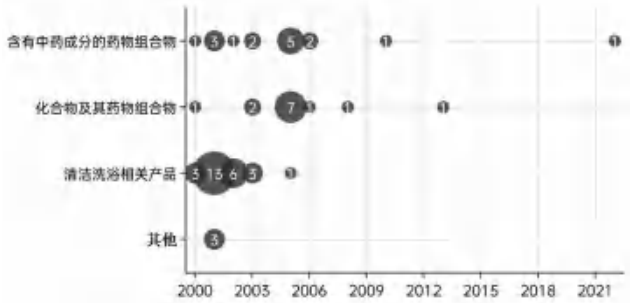

图 4　产品专利技术内容及申请年份分布

Fig 4　Distribution of product patent technology content and application year

通过数据分析及查阅资料可以发现，津村对汉方制剂的开发有所局限，其原因主要有二：

其一，1974 年日本确立《一般用汉方制剂承认基准》，其中包含 210 个处方，主要选自张仲景的《伤寒论》《金匮要略》、孙思邈的《千金方》以及陈师文的《太平惠民和剂局方》，至今《一般用汉方制剂承认基准》已经多次增补修订，2017 年厚生劳动省发布的“新基准”中已含有 210 个处方及 83 个加减化裁方，共 293 个制剂处方 [4]。然而《一般用汉方制剂承认基准》中大部分处方中药材配伍仅仅规定了范围，而药品生产可在此范围内自主规定药材配伍量，同时在只以水为提取溶剂的前提下，即可免除药理和临床研究 [5]。新汉方制剂的研发，仅药理与临床研究便要耗费大量的资金并承担一定的风险，其成本效益比较低。其二，随着汉方市场的不断扩大，津村认为，原料生药采购的稳定和品种管理成为极其重要的经营课题，决意专注于遵循传统医学制作汉方制剂并通过改进专利来确保汉方制剂的稳定性、安全性和有效性，以提供高质量的汉方制剂 [3]。

可以看出，由于政策导向，日本在引进中医药时更注重实用，重视古方方证，而对中医的基本理论研究不足，“弃医存药”是日本汉方药产业特点之一。20 世纪 90 年代日本著名的小柴胡汤事件，便是日本医师以西医理论指导中医用药，导致长期超剂量用药产生严重后果的案例 [6]。津村在 16 件含中药成分的药物组合物产品专利中，也仅涉及生药主要成分提取制成的产品或与 293 件处方相关的汉方制剂新用途的开发，在此政策背景与津村战略转型的双重影响下，新汉方制剂产品的研发热度很低。

2.3　生药栽培方法与生药提取方法

在检索到的 9 件生药栽培方法专利中，涉及的生药有茯苓、黄连、人参、猪苓和黄芩，主要发明点包括改进生药种植技术、控制生药培育环境，以实现提高生药培育产量、减少培育生药成本等效果。在 13 件生药提取方法专利中，涉及的生药有山椒、甘草、苍术、艾叶、白术、前胡、厚朴、补骨脂等。

2.4　中药制剂和设备装置与系统

虽然 2000 年以来，津村只申请了 4 件中药制剂专利，但并不是津村的忽视，津村汉方制剂以颗粒剂为主，而颗粒剂大多数由浸膏制成，早在 20 世纪 90 年代日本小太郎汉方制药公司便开发出了浸膏颗粒剂，如今由生药制成浸膏粉末最终制成颗粒剂的工艺已经相当成熟，在此基础下，津村通过与其他企业的合作引入先进的设备技术，构建智能工厂，极大程度地减少了资源的浪费，在 14 件设备装置与系统专利中，其合作研发专利高达 12 件，涉及发货系统、检测系统、装箱装置以及生药残渣分离装置等。现代化的制剂工艺与自动智能的设备，增加了日本汉方制剂的国际竞争力。

2.5　质量控制

在检索到的 34 件质量控制专利中，17 件涉及生药或生药提取物，技术内容包括对原料生药的鉴别（6 件）、原料生药中微生物、农药或化学物质残留的检测方法（8 件）以及原料生药的杀虫技术（3 件）。13 件涉及汉方制剂，包括大建中汤（2 件）、抑肝散（4 件）以及针对方剂的质量控制方法（7 件），技术内容主要包括用生物测定方法评估汉方制剂药理活性以及更精准地检测制剂有效性的方法。质量控制专利所针对的产品类型及申请年份分布如图 5，可以看出，津村始终重视质量控制专利的申请与研发。

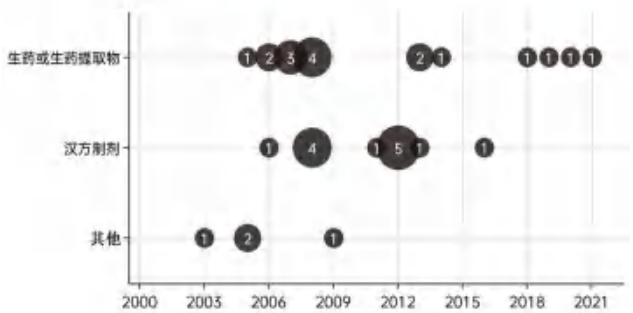

图 5　质量控制专利技术内容及申请年份分布

Fig 5　Distribution of quality control patent technology content and application year

本着“汉方品质始于农田”的观点，面对与日俱增的市场需求，津村在提高生药种植技术、

扩大生药种植基地的同时，在符合 WHO《药用植物种植和采集生产质量管理规范》（GACP）前提下，制定了更为严格的津村 GACP 指南，进行品质控制。种植和加工基地在各地采购原料生药，并进行切除、干燥、蒸制等制备加工后，将符合标准的原料生药交付津村集团进行残留农药、微生物、重金属等品质测试和分选，最终符合品质标准的原料生药将供应给生产汉方制剂的各工厂[3]，在此过程中津村研发了多项专利技术，以保证原料生药质量。

早在 1985 年 5 月，日本厚生省就提出“标准汤剂”的概念，要求制定标准汤剂的化学基准与生物学基准，提供中间体（浸膏）及最终制剂的生产工艺过程，要求汉方药企业生产的制剂与“标准汤剂”进行比较，确保在化学与生物学上与“标准汤剂”一致。所谓“标准汤剂”，是指根据古籍处方内容调整得到的药物煎药。因此对汉方制剂质量的一致性评价也是汉方药企业的特色与重点。在涉及的 13 件专利中，津村均进行了海外专利布局。

3　株式会社津村中国发明专利申请分析

由于专利具有地域性，日本制药企业通常通过专利先行战略占领海外市场[7]。津村积极申请国内专利的同时，也在有条不紊地对中国进行专利布局。通过对津村在中国的专利布局分析，可以进一步了解津村涉及中国业务的核心技术，并对其发展方向有所预判。

3.1　专利基本信息

2000—2022 年津村共申请中国发明专利 52 件，其中共有 29 件专利维持有效，并有 8 件专利处于审查过程中（见图 6），由此推断津村对于中国的专利布局仍未完成。其已申请专利的技术主题及申请年份分布如图 7 所示，可以看出，津村申请的中国专利以质量控制专利为主（23 件），同时近年来津村在生药栽培方法（7 件）及生药提取物方法（5 件）领域亦有持续的专利布局热度。

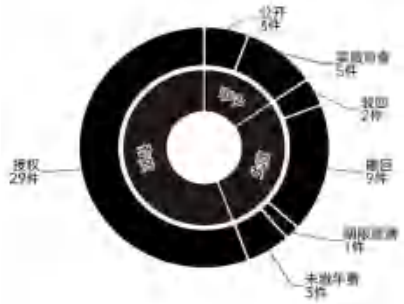

图 6　2000—2022 年株式会社津村申请中国专利法律状态分布

Fig 6　Distribution of TSUMURA & CO’s Chinese patent legal status from 2000 to 2022

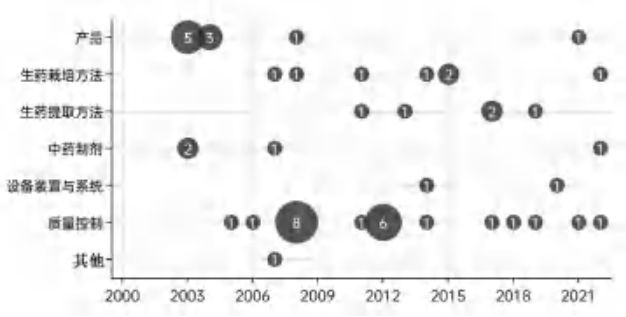

图 7　2000—2022 年株式会社津村申请中国专利技术主题及申请年份分布

Fig 7　Distribution of TSUMURA & CO’s Chinese patent technology themes and application year from 2000 to 2022

3.2　生药栽培方法与生药提取方法

2000—2022 年津村在我国围绕生药猪苓、甘草、人参和茯苓共申请生药栽培方法专利 7 件。根据其专利说明书记载，出于地理环境等因素，此类生药均在日本国内产量较少，其来源高度依赖于津村设立在我国的生药基地的种植与采购。因此津村不断地改进生药栽培技术并在中国进行专利申请：2007 年申请专利，其技术特征为使猪苓与植物病原性低的蜜环菌共生培养，以缩短猪苓栽培周期，并在 2015 年的后续专利中公开了更优的栽培方法以提高猪苓产量；2008 年申请专利，其技术特征为使用满足特定条件的栽培地块以得到甘草酸含量更高的甘草；2011 年申请专利，其技术特征为对传统人参栽培方法进行改进以克服人参连作障碍，并在 2015 的后续专利中公开了一种稳定高效的室内人参栽培方法；2014 年申请专利涉及茯苓的人工栽培方法，并在 2022 年申请专利公开了一种以玉米穗轴为基材的茯苓的栽培方法，其特征在于克服了先前专利少量锯屑混入茯苓需要人工分离的技术难题。详见图 8。

图 8　2000—2022 年株式会社津村生药栽培方法中国专利布局

Fig 8　TSUMURA & CO’s Chinese patent layout for crude drug cultivation methods from 2000 to 2022

生药提取物是将原药材或饮片通过现代科学方法进行提取、分离、纯化等得到的中药制剂中间体，优势在于具有稳定可控的质量以及更加明

确的有效成分，是中药现代化的重要成果[8]。自2000—2022 年津村在我国仅围绕生药山椒、黄连、甘草和吴茱萸共申请生药提取方法专利 5 件，见图 9。

图 9　2000—2022 年株式会社津村生药提取方法中国专利布局

Fig 9　TSUMURA & CO’s Chinese patent layout for crude drug extraction methods from 2000 to 2022

面对日本不断增长的市场需求，津村先后在我国深圳和天津等地建立生药种植与采购平台，对生药栽培技术以及生药有效成分提取技术进行改进，以保证药效、提高产量和降低成本。该企业已经在中国开展中药种植栽培、提取方法等技术的专利布局，这一情况也代表从企业经营角度，中国正在成为津村全球化布局的新一站。国内企业应警惕，随着国内中药材种植基地被日本等境外国家的企业收购，加之其不断扩张的专利布局，国内中药种植栽培及提取制备这一上游产业的竞争格局未来可能进一步加剧或被改变。

3.3　质量控制

2000—2022 年津村在我国共申请质量控制专利 23 件，其中 10 件涉及生药或生药提取物，技术内容包括原料生药的鉴别（4 件），原料生药中微生物、农药或化学物质残留的检测方法（3 件）以及针对原料生药的杀虫技术（3 件）。13 件涉及汉方制剂，包括大建中汤（2 件）、抑肝散（4 件），以及针对方剂的质量控制方法（7 件），进一步阅读相关专利说明书的实施例后发现涉及的方剂还包括桂枝茯苓丸、补中益气汤和桃核承气汤，详见图 10。

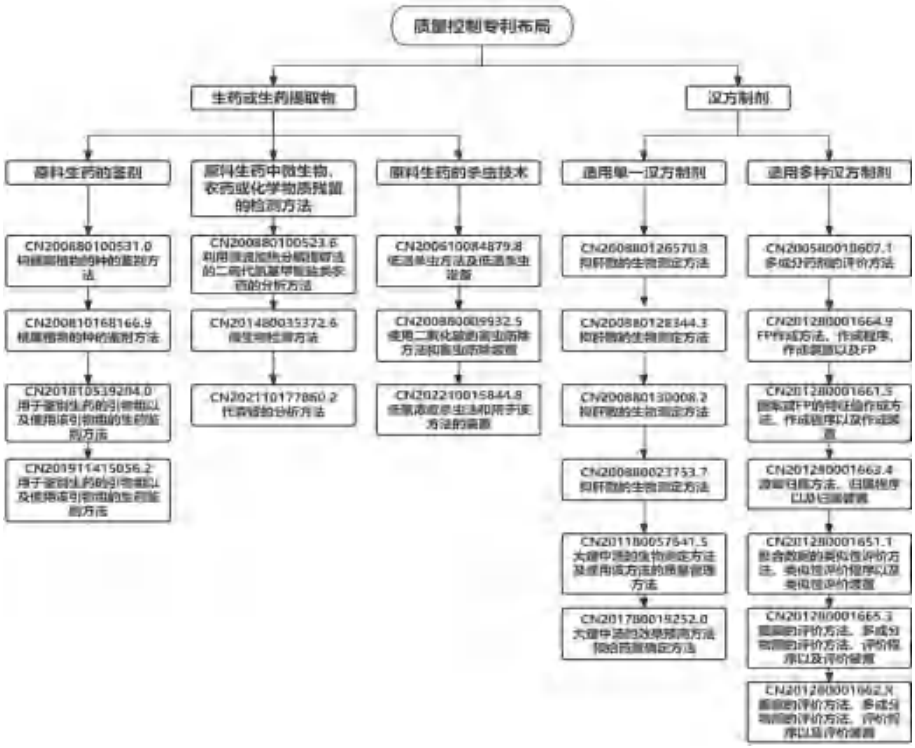

图 10　2000—2022 年株式会社津村质量控制中国专利布局

Fig 10　TSUMURA & CO’s Chinese patent layout for quality control from 2000 to 2022

通过对比发现，津村针对汉方制剂质量控制技术申请的 13 件中国专利均在日本也进行了专利布局，13 件中国专利中仅有 1 件遭受驳回其余均已获得授权。较高的专利授权率表明津村的质量控制技术创新水平较高、专利质量较高，也反映出津村对于质量控制专利的重视。我国中药企业应警惕津村可能对中国相关中药市场的侵占，与津村相同技术领域的国内企业应注意避免专利侵权。

4　经典战略处方的专利布局

自 2004 年起，津村将“医疗需求较高、西药治疗难以奏效而医疗用汉方制剂能发挥奇效”的处方设定为“育药处方”，包括大建中汤、抑肝散、六君子汤、半夏泻心汤以及牛车肾气丸；2016 年又设定“Growing 处方”作为育药处方的

后续重点处方，新调整过的“Growing 处方”包括补中益气汤、加味逍遥散、五苓散、人参养荣汤以及加味归脾汤（2022 年将原“Growing 处方”中的麦门冬汤和芍药甘草汤替换为人参养荣汤和加味归脾汤）。津村将“育药处方”与“Growing 处方”作为重点研发经营的战略处方，根据企业报告书数据显示，2020 年津村 129 个医疗用汉方制剂处方的销售收入明细中，“育药处方”占比 25.9%，“Growing 处方”占比 21.9%，这 10 个战略处方几乎占据津村医疗用汉方制剂处方销售额的半壁江山，可见津村重点产品突出的经营战略[3]。其中，大建中汤为津村销售收入排行第一的“育药处方”，据其 2022 年企业报告书所述，大建中汤以通过 FDA 认证和在美国上市为目标，2005 年 5 月在美国进入临床试验，目前正处于Ⅱ期临床后期，基于上述原因，在 10 个战略处方中选取大建中汤作为典型战略处方进行分析。

大建中汤出自张仲景《金匮要略》的大建中汤方，方中记载其方解为：蜀椒二合（去汗）、干姜四两、人参二两，以水四升，煮取二升，去滓，内胶饴一升，微火煎取一升半，分温再服。津村在大建中汤说明书中记载的适应证为腹部受寒、腹痛和腹胀。津村在美国将术后肠梗阻作为重点疾病研究领域，而大建中汤作为该疾病的治疗药物被寄予厚望。其临床获批与专利布局开始时间相近，为全面了解专利布局，在检索到的专利中筛选出涉及大建中汤相关专利并补充检索同族专利，进行专利布局分析（见图 11）。

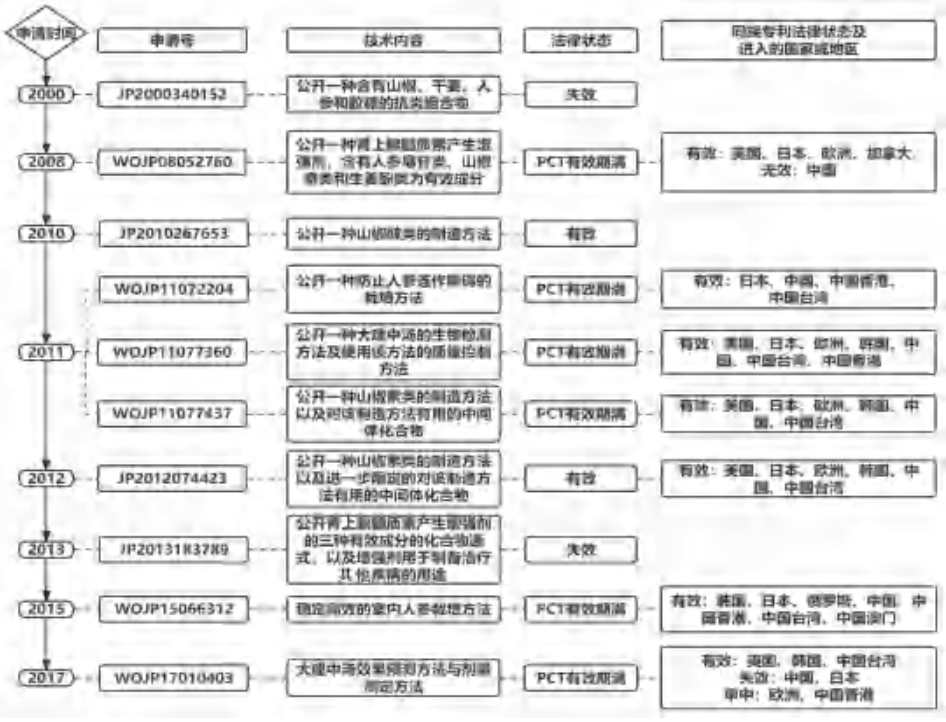

图 11　大建中汤相关专利

Fig 11　Patents related to Dajian Zhongtang

开发组方新用途是津村进行汉方制剂研发的重要方向。2000 年津村申请了 1 项名称为抗炎症组合物的日本专利（申请号为 JP2000340152），所述组合物是含有山椒、干姜、人参和胶糖的抗炎组合物，所述炎症是消化系统器官中的相关炎症。2008 年津村申请 1 件国际专利（申请号为 WOJP08052760）以保护大建中汤中的物质促进肾上腺髓质素产生、增加血流量和抗炎的用途，该专利目前已进入美国、日本、欧洲和加拿大；2013 年津村申请 1 件日本专利（申请号为 JP2013183789）请求保护大建中汤中三种有效成分的化合物通式以及有效物质防治克罗恩病、肺动脉高压、非细菌性炎症等多种疾病的治疗用途。

在原料生药方面，津村于 2011 年对传统人参栽培方法进行了改进以克服人参连作障碍，并于 2015 年再次申请专利涉及一种稳定高效的室内人参栽培方法。通过此类专利的连续布局，津村在减少生药原料成本的同时，也保证了持续性的供应。

在化合物制备方面，自 2010 年起，津村对于药理活性明确的山椒素类化合物，连续三年申请了 3 件专利，不断优化山椒素类化合物的人工合成方法，以减少津村对生药原药的依赖。

在大建中汤质量控制方面，2011 年津村提交了 1 件涉及一种定量的对大建中汤一致性进行评价的生物检测方法的 PCT 专利（申请号为 WOJP11077360），

该专利目前进入了美国、韩国、中国以及欧洲专利局等。2017 年申请 PCT 专利 WOJP17010403，该专利提供运用客观指标预测大建中汤疗效以及通过分析患者肠道菌群来确定剂量的方法，目前已进入美国、韩国、中国等国家和欧洲专利局。由此可见，津村在大建中汤的有效性及安全性方面不断深入研究，并有志于实现个性化的诊疗。

5　建议

5.1　灵活的专利布局策略助企业立于不败之地

津村在日本的专利布局早期以产品专利为主，之后呈现质量控制专利、生药栽培方法专利、生药提取方法专利以及设备装置与系统专利齐头并进的之势；而在中国的专利布局则呈现以质量控制专利为主，生药栽培方法专利和生药提取方法专利为辅的局面。其实日本早期也曾向中国进行大量清洁洗浴相关产品的专利布局，但其法律状态均为撤回，很明显津村出于某种原因放弃了对我国相关领域的布局并及时调整为以质量控制专利为主的专利布局方向。而在津村相关专利布局之初，中国中药的质量控制并没有得到足够的重视，津村的针对性布局使其在竞争中处于“进可攻，退可守”的有利地位，也在一定程度上短期限制了我国中药企业相关技术的发展与使用。这启示我国企业不同地区的专利布局应有不同侧重，如此才能保证资源的有效利用与高效产出。

5.2　拓宽中药企业专利布局技术覆盖范围

通过对我国中药大品种百强企业专利大致检索发现，现阶段我国中药企业中药产品专利居多，但少有企业涉及中药栽培方法以及设备装置与系统的技术研发。反观津村从原药生药的种植采购到汉方制剂的生产销售，拥有完整的产业链，建有自己的科研基地，生产与科研的一体化能准确把握市场需求。在此基础上，津村不断与外部企业、高校合作。大到生药栽种技术、质量控制方法，小到生药粉末计量的阀门设备，津村均拥有自主的知识产权，完备的专利布局极大程度地减少了技术壁垒，增加了企业的竞争力。中医药作为我国的传统医学，在国际上具有得天独厚的竞争优势。面对如此局势和警示，我国中药企业应进一步规范原料生药来源、改进生药栽培技术、运用现代化的技术与设备改进中药剂型与成药包装、实施更为严格的质量控制以保证中药药效的一致性，拓宽中药企业专利布局技术覆盖范围，赋予中药品种更强的竞争力。

5.3　中药企业应持续研发投入并做好专利防御

根据 2022 年企业报告书所述，津村计划在 2022—2024 年投资约 240 亿日元研发汉方制剂。同时不断改进的茯苓、人参栽种方法以及围绕大建中汤多维度的技术开发，均体现出津村高水平、持续性的创新能力。在此基础上通过有策略地专利申请，便可使持续的创新变为持续的垄断。津村陆续收购国内中药企业和中药材种植基地，并在我国持续进行专利申请。我国中药企业应警惕津村在中国布局的相关专利技术，进一步关注该企业在生药提取方法、质量控制、生药栽培方法的产业和专利布局，加大专利研发力度，提高专利保护水平，建立好自身技术壁垒。需要注意的是，不同于其他技术主题专利，津村质量控制专利具有持续的研发热度，这警示我国中药企业，在中药现代化开发与知识产权竞争环境日益激烈的大环境下，质量控制技术作为中药现代化技术方向之一，质量控制专利的价值已经逐渐显露，未来质量控制专利还将继续成为中药行业的专利争夺点。

5.4　策略性搭建重点中药产品专利网

通过对津村经典战略处方的专利布局分析可以看出，在其产品属于中国古代经典名方早已被公开的情况下，津村围绕原料生药、汉方制剂新用途开发、化合物制备以及汉方制剂的质量控制形成了四条保护链，以保证其产品的市场竞争力。除此之外，津村合理地使用专利国际优先权制度，申请多边专利，积极开拓国际市场。凭借连续、合理的专利布局以及较高的研发投入，津村围绕其产品技术基本构建了较为严密的专利网。我国中药企业应分阶段、多层次地对重点中药品种进行专利保护，在防止中药品种遭受专利侵害的同时，变相延长专利保护期，以获取时间更长、范围更广的专利技术垄断。

参考文献

[1] 日本厚生劳动省 .《令和元年薬事工業生産動態統計年報統計表》. https：//www.mhlw.go.jp/topics/yakuji/2019/nenpo/toukeihyou.html.

[2] 株式会社津村官方网站 . https：//www.tsumura.co.jp/index.html.

[3] 株式会社津村官方网站 .《株式会社津村 2022 年企业报告书》. https：//www.tsumura.co.jp/chinese/corporate/integrated-report/item/report-2022_ch_20230614.pdf.

[4] 孙昱 . 日本汉方制剂的品种情况及管理模式分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（8）：1041-1048.

[5] 杨瑾，加茂智嗣，能濑爱加 . 汉方药在日本的发展现状 [J]. 中草药，2016，47（15）：2771-2774.

[6] 张洋，石志超，石鉴泉，等 . 从小柴胡汤事件浅析“古方今病，不相能也”[J]. 中医学报，2021，36（6）：1172-1175.

[7] 孙娟，董丽，曹志华 . 国外企业医药专利战略特点及启示 [J]. 中国新药杂志，2013，22（15）：1743-1745.

[8] 程江雪 . 中药提取物组合物的专利信息分析及专利保护研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2016.

（收稿日期：2023-08-09；修回日期：2023-12-06）

新疆某三甲医院 H 型高血压患者血压控制的影响因素分析

吴洁茹[1, 2]，阿丽耶·拜尔迪[1, 2]，冯文玲[2]，徐勤伟[1, 2]，马丽娟[2]，袁圆[2]，陈渤松[2]，赵军[3*]（1. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830054；2. 新疆医科大学第一附属医院药学部，乌鲁木齐 830011；3. 新疆医科大学第一附属医院药学部，新疆药物临床研究重点实验室，乌鲁木齐 830011）

摘要：目的 调查按照指南规律服用降压药物的 H 型高血压患者的血压控制状况及其影响因素，以期为 H 型高血压的防治提供科学依据。**方法** 回顾性收集新疆医科大学第一附属医院 2019 年 1 月至 2022 年 12 月收治的符合纳排标准的 H 型高血压住院患者 728 例为研究对象。通过查阅病历及电话随访，收集患者入院后的基本信息、实验室信息、合并用药信息、合并疾病信息及随访信息，以患者出院后规律服用降压药 1 个月及以上的血压情况分为未控制组（276 例）和控制组（452 例），通过单因素和 Logistic 回归分析探讨影响血压控制效果的相关因素。**结果** 单因素分析结果显示，两组的高血压分级、降压药物联用情况、钙通道阻滞剂用药史、精神压力状况、饮食习惯、运动频率比较，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。多因素分析结果显示，高血压三级、*MTHFR* C677T 基因多态性中 TT 型、经常感到精神压力大、偏咸的饮食习惯、不运动是影响 H 型高血压患者血压控制水平的独立危险因素（$P < 0.05$）。**结论** 影响规律服用降压药物的 H 型高血压患者血压控制水平的因素包括高血压分级、*MTHFR* C677T 基因型、精神压力状况、饮食习惯及运动频率，可根据相关影响因素采取有效的干预措施，以改善 H 型高血压患者的血压控制水平。

关键词： H 型高血压；血压控制；影响因素；基因多态性
中图分类号： R54，R96 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2024)05-1372-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.042

Factors affecting blood pressure control in patients with H-type hypertension in a tertiary hospital in Xinjiang

WU Jie-ru[1, 2], Aliya • Bardi[1, 2], FENG Wen-ling[2], XU Qin-wei[1, 2], MA Li-juan[2], YUAN Yuan[2], CHEN Bo-song[2], ZHAO Jun[3*] (1. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830054; 2. *Department of Pharmaceutical*, *The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 3. *Department of Pharmacy*, *The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University*, *Xinjiang Key Laboratory of Clinical Drug Research*, *Urumqi* 830011)

Abstract: Objective To determine the blood pressure control and its influencing factors in patients with H-type hypertension who regularly take antihypertensive medication according to guidelines, to provide a scientific basis for the prevention and treatment of H-type hypertension. **Methods** Totally 728 inpatients with H-type hypertension who met the inclusion and exclusion criteria were retrospectively collected from the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University between January 2019 and December 2022. We collected basic patient information, laboratory results, medication and disease information, and follow-up data by reviewing medical records and conducting telephone follow-ups. The patients were divided into two groups based on their blood pressure after being discharged from the hospital and taking regular antihypertensive medication for at least one month: the uncontrolled group (276 patients) and the controlled group (452 patients). Univariate and Logistic regression analyses were used to determine the factors associated with the effectiveness of

基金项目： 新疆维吾尔自治区自然科学基金（No.2019D01C291；No.2021D01C316）；新疆维吾尔自治区“天山英才”医药卫生高层次人才培养项目（No.TSYC202301A051）。

作者简介： 吴洁茹，女，硕士研究生，主要从事临床药学研究，email：1137948848@qq.com * **通信作者：** 赵军，女，主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学和药剂学研究，email：zhaojun700326@163.com

blood pressure control. **Results** The univariate analysis indicated significant differences between the two groups in hypertension grading, antihypertension drug combination, history of calcium channel blocker medication, mental stress condition, dietary habits, and frequency of exercise ($P < 0.05$). The multi-factor analysis showed that hypertension grade Ⅲ, TT type in the *MTHFR* C677T gene polymorphism, frequent mental stress, salt intake habits, and lack of exercise were independent risk factors for blood pressure control in patients with H-type hypertension ($P < 0.05$). **Conclusion** Factors affecting the level of blood pressure control in H-type hypertension patients taking regular antihypertension drugs include hypertension classification, *MTHFR* C677T genotype, mental stress condition, dietary habit and frequency of exercise. Effective interventions can be taken according to the relevant influencing factors to better control the blood pressure in H-type hypertension patients.
Key words: H-type hypertension; blood pressure control; influencing factor; genetic polymorphism

心脑血管疾病是全球范围内最主要的死因之一。高血压被视为是心脑血管疾病的关键风险因素之一，与心脑血管事件的发生密切相关[1-2]。我国高血压患病人数已达 2.45 亿[3]，据中国脑卒中一级预防研究（China stroke primary prevention trial，CSPPT）基线数据，约有 80.3% 的高血压患者属于 H 型高血压[4]。H 型高血压是一种特殊类型的高血压，即伴有同型半胱氨酸（homocysteine，Hcy）升高的（Hcy ≥ 10 μmol•L^{-1}）的原发性高血压[5]。

Hcy 水平的升高与心血管疾病的发生和进展具有显著相关性[6-7]。高 Hcy 与高血压之间存在协同作用，增加心脑血管事件的风险并加剧了卒中事件和卒中死亡的风险[8]。为遏制心脑血管疾病的流行，提高 H 型高血压患者的生活质量和预后，掌握血压控制的关键因素至关重要。了解并确定影响 H 型高血压患者血压控制的因素对于制订更有效的治疗策略和改善患者预后重要，但尚缺乏深入全面的研究[9]。

因此，本研究旨在探讨按照指南规律服用降压药物的 H 型高血压患者血压控制的相关因素，为降压指导和药物治疗提供更全面、有效的依据，以期提高 H 型高血压患者的生活质量和心脑血管疾病的预后。

1.1　一般资料

选取 2019 年 1 月—2022 年 12 月新疆医科大学第一附属医院心血管科收治的 H 型高血压患者，筛选符合纳入与排除标准的 728 例患者作为研究对象。本研究经本院医学伦理委员会批准（批件号为 K202308-06）。

纳入标准：① 原发性高血压患者，符合《中国高血压防治指南（2018 年修订版）》[10] 的相关诊断标准；② 高同型半胱氨酸血症者（Hcy ≥ 10 μmol • L^{-1}）；③患者行 *MTHFR* C677T 基因检测；④ 依据《中国高血压防治指南（2018 年修订版）》[10] 临床推荐正确且规律服用降压药物治疗≥ 1 个月者。

排除标准：① 年龄＜ 18 岁；② 无法获得完整临床资料的患者；③ 存在严重心脑血管疾病、严重肝肾功能障碍、阻塞性睡眠呼吸暂停综合征、恶性肿瘤、甲状腺功能亢进或衰退及严重精神疾病者；④ 妊娠与哺乳期的妇女；⑤ 不能完成随访者。

病例分组：根据随访获得的血压情况分为控制组（收缩压＜ 140 mmHg 且舒张压＜ 90 mmHg）和未控制组（收缩压≥ 140 mmHg 和 / 或舒张压≥ 90 mmHg）。

1.2　方法

1.2.1　资料收集　依据《国家基层高血压防治管理指南（2020 版）》[11]、《中国高血压健康管理规范（2019）》[12] 及“高血压患者随访服务记录表”，为满足研究需求，本研究自行设计了 H 型高血压患者随访表，通过病历系统查询以及电话随访等途径，搜集研究对象以下信息：

① 基本信息：性别、年龄、民族、体质量指数（BMI）、吸烟史、饮酒史、在职情况、受教育程度、高血压病程、高血压家族史、高血压级数以及危险分级；② 实验室检查信息：*MTHFR* C677T 基因型、入院后第一次血浆 Hcy 浓度；③ 用药史：血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）、血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂（ARB）、钙通道阻滞剂（CCB）、β 受体阻滞剂、α 受体阻滞剂、利尿剂、降脂类药物、抗血栓类药物、降糖类药物；④ 并发症：冠心病、动脉粥样硬化、脑梗死、心肌桥、糖尿病、心律失常；⑤ 随访信息：收缩压、舒张压、降压药物用药时长、工作性质、居住地、吸烟情况、精神压力状况、饮食习惯、蔬菜水果摄入情况、运动频率、熬夜情况（近 30 d 内睡觉时间是否超过午夜 12 点）、睡眠质量。

1.2.2　统计学分析　采用 SPSS 26.0 软件对数据进

行统计分析。计数资料以 n（%）表示并行 χ^2 检验，计量资料符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用独立样本 t 检验。通过单因素分析对相关因素进行初步分析及筛选，考虑变量间相互作用以及降低遗漏重要变量的风险，保守选取 $P<0.10$ 的变量进行 Logistic 多因素分析，计算优势比（*OR*）及其 95% 置信区间（95%*CI*），以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　影响 H 型高血压患者血压控制水平的单因素分析

单因素分析结果显示，高血压分级、降压药物联用情况、CCB 用药史、*MTHFR* C677T C 基因型合并、精神压力状况、饮食习惯、运动频率与血压控制水平相关（$P<0.05$），详见表 1。

表 1　两组患者资料信息与血压控制水平单因素分析结果比较

Tab 1　Univariate analysis of patient profile information and blood pressure control level between the two groups

资料信息		未控制组（$n=276$）	控制组（$n=452$）	χ^2/t 值	P 值
性别 [n（%）]	男	200（72.5）	306（67.7）	1.835	0.175
	女	76（27.5）	146（32.3）		
年龄（$\bar{x}\pm s$，岁）		51.77±11.18	52.66±12.17	0.989	0.323
民族 [n（%）]	汉族	173（62.7）	307（67.9）	3.623	0.163
	维吾尔族	78（28.2）	119（26.3）		
	其他	25（9.1）	26（5.8）		
在职情况 [n（%）]	无业	111（40.2）	195（43.1）	0.601	0.438
	在职	165（59.8）	257（56.9）		
受教育程度 [n（%）]	初中及以下	58（21.0）	100（22.1）	0.134	0.935
	高中及大专	131（47.5）	213（47.1）		
	本科及以上	87（31.5）	139（30.8）		
高血压病程 / 年	≤ 5	155（56.2）	261（57.7）	0.900	0.825
	5 ～ 10	63（22.8）	102（22.6）		
	10 ～ 15	26（9.4）	46（10.2）		
	＞ 15	32（11.6）	43（9.5）		
吸烟情况 [n（%）]	无被动吸烟	145（52.5）	251（55.5）	0.960	0.619
	有被动吸烟	37（13.4）	51（11.3）		
	主动吸烟	94（34.1）	150（33.2）		
饮酒史 [n（%）]	无	193（69.9）	320（70.8）	0.062	0.803
	有	83（30.1）	132（29.2）		
高血压家族史 [n（%）]	无	159（57.6）	264（58.4）	0.045	0.832
	有	117（42.4）	188（41.6）		
BMI/（$kg\cdot m^{-2}$）	＜ 24	53（19.2）	86（19.0）	5.569	0.062
	24 ～ 28	110（39.9）	217（48.0）		
	≥ 28	113（40.9）	149（33.0）		
高血压分级 [n（%）]	一级及二级	38（13.8）	112（24.8）	12.699	＜ 0.001
	三级	238（86.2）	340（75.2）		
高血压危险分级 [n（%）]	低危及中危	7（2.5）	16（3.5）	0.564	0.453
	高危、很高危及极高危	269（97.5）	436（96.5）		
MTHFR C677T 基因型 [n（%）]	CC	67（24.3）	135（29.9）	5.010	0.082
	CT	129（46.7）	216（47.8）		
	TT	80（29.0）	101（22.3）		
MTHFR C677T T 基因型合并 [n（%）]	CC	67（24.3）	135（29.9）	2.673	0.102
	CT ＋ TT	209（75.7）	317（70.1）		
MTHFR C677T C 基因型合并 [n（%）]	CC ＋ CT	196（71.0）	351（77.7）	4.045	0.044
	TT	80（29.0）	101（22.3）		
Hcy/（$\mu mol\cdot L^{-1}$）	10 ～ 15	194（70.3）	343（75.9）	2.772	0.096
	≥ 15	109（29.7）	82（24.1）		
降压药物联用情况 [n（%）]	单药	33（12.0）	95（21.0）	12.195	0.002
	二联用药	117（42.3）	195（43.2）		
	三联用药及以上	126（45.7）	162（35.8）		
降压类药物					
ACEI	未服用	266（96.4）	441（97.6）	0.866	0.352
	服用	10（3.6）	11（2.4）		
ARB	未服用	39（14.1）	84（18.6）	2.421	0.120

续表 1

资料信息		未控制组（n = 276）	控制组（n = 452）	χ^2/t 值	P 值
	服用	237（85.9）	368（81.4）		
CCB	未服用	43（15.6）	107（23.7）	6.861	0.009
	服用	233（84.4）	345（76.3）		
β受体阻滞剂	未服用	141（51.1）	235（52.0）	0.056	0.813
	服用	135（48.9）	217（48.0）		
α受体阻滞剂	未服用	249（90.2）	422（93.4）	2.349	0.125
	服用	27（9.8）	30（6.6）		
利尿剂	未服用	253（91.7）	426（94.2）	1.819	0.177
	服用	23（8.3）	26（5.8）		
降脂类药物	未服用	56（20.3）	83（18.4）	0.412	0.521
	服用	220（79.7）	369（81.6）		
抗血栓药物	未服用	103（37.3）	167（36.9）	0.010	0.920
	服用	173（62.7）	285（63.1）		
降糖类药物	未服用	224（81.2）	383（84.7）	1.508	0.209
	服用	52（18.8）	69（15.3）		
合并疾病					
冠心病	否	240（87.0）	392（86.7）	0.008	0.929
	是	36（13.0）	60（13.3）		
动脉粥样硬化	否	141（51.1）	219（48.5）	0.476	0.490
	是	135（48.9）	233（51.5）		
脑梗死	否	181（65.6）	295（65.3）	0.007	0.931
	是	95（34.4）	157（34.7）		
心肌桥	否	213（77.2）	340（75.2）	0.358	0.550
	是	63（22.8）	112（24.8）		
糖尿病	否	220（79.7）	380（84.1）	2.249	0.134
	是	56（20.3）	72（15.9）		
心律失常	否	243（88.0）	402（88.9）	0.136	0.713
	是	33（12.0）	50（11.1）		
降压药物用药时长 / 年	≤ 1	39（14.1）	67（14.8）	5.559	0.135
	1 ～ 3	205（74.3）	305（67.5）		
	3 ～ 5	20（7.3）	54（11.9）		
	＞ 5	12（4.3）	26（5.8）		
工作性质 [n（%）]	退休及无业	111（40.2）	195（43.1）	4.008	0.261
	体力劳动	18（6.5）	27（6.0）		
	脑力劳动	97（（35.2）	130（28.8）		
	体力脑力兼有	50（18.1）	100（22.1）		
居住地 [n（%）]	农村	36（13.0）	46（10.2）	1.409	0.235
	城市	240（87.0）	406（89.8）		
精神压力状况 [n（%）]	经常	45（16.3）	46（10.2）	9.126	0.010
	有时	94（34.1）	136（30.1）		
	没有	137（49.6）	270（59.7）		
饮食习惯 [n（%）]	偏咸	44（15.9）	40（8.8）	8.458	0.015
	不咸不淡	94（34.1）	165（36.6）		
	清淡	138（50.0）	247（54.6）		
蔬菜水果摄入情况 [n（%）]	经常	191（69.2）	338（74.8）	2.717	0.257
	有时	70（25.4）	95（21.0）		
	很少	15（5.4）	19（4.2）		
运动频率 /（次 / 周）	不锻炼	162（58.7）	217（48.0）	9.157	0.010
	≤ 3	36（13.0）	60（13.3）		
	＞ 3	78（28.3）	175（38.7）		
熬夜情况 [n（%）]	经常	40（14.5）	42（9.3）	4.652	0.098
	偶尔	64（23.2）	113（25.0）		
	不会	172（62.3）	297（65.7）		
睡眠质量 [n（%）]	良好	138（50.4）	216（47.8）	0.702	0.704

续表 1

资料信息	未控制组（n = 276）	控制组（n = 452）	χ^2/t 值	P 值
一般	96（35.5）	163（36.0）		
差	39（14.1）	73（16.2）		

2.2 影响 H 型高血压患者血压控制水平的多因素分析

考虑变量间相互作用以及降低遗漏重要变量的风险，保守筛选单因素分析结果中 P < 0.10 的因素，包括 BMI、高血压分级、Hcy 浓度、降压药物联用情况、CCB 用药史、精神压力状况、饮食习惯、运动频率、熬夜情况。在单因素分析中，*MTHFR* C677T 基因型与 *MTHFR* C677T C 基因型合并的分析结果差异均有统计学意义，综合考虑各项因素，本研究最终决定将 *MTHFR* C677T 基因型与筛选出的上述因素共同纳入多因素分析。

Logistics 回归分析结果显示，高血压三级、*MTHFR* C677T TT 基因型、经常感到精神压力大、偏咸的饮食习惯、不锻炼是影响 H 型高血压血压控制的独立危险因素（P < 0.05），详见表 2。

表 2 血压控制水平的多因素 Logistics 回归分析结果

Tab 2 Multifactorial Logistics regression analysis of blood pressure control level

因素	β	SE	Wald	P 值	OR	95%CI
BMI/（kg • m^{-2}）						
24 ～ 28 *vs* < 24	− 0.271	0.221	1.497	0.221	0.763	（0.494，1.177）
≥ 28 *vs* < 24	0.038	0.229	0.027	0.869	1.039	（0.663，1.628）
高血压三级	0.693	0.218	10.094	0.001	1.999	（1.304，3.064）
MTHFR C677T 基因型						
CT 型 *vs* CC 型	0.224	0.198	1.280	0.258	1.251	（0.849，1.843）
TT 型 *vs* CC 型	0.542	0.250	4.708	0.030	1.719	（1.054，2.804）
Hcy ≥ 15 μmol • L^{-1}	− 0.026	0.203	0.016	0.898	0.974	（0.655，1.449）
降压药物联用情况						
单药 *vs* 三药及以上	− 0.487	0.286	2.891	0.089	0.615	（0.351，1.077）
二药 *vs* 三药及以上	− 0.127	0.180	0.498	0.480	0.881	（0.618，1.254）
CCB 用药史	0.239	0.242	0.975	0.323	1.270	（0.790，2.040）
精神压力状况						
经常 *vs* 没有	0.572	0.261	4.791	0.029	1.771	（1.062，2.956）
偶尔 *vs* 没有	0.286	0.187	2.347	0.126	1.331	（0.923，1.920）
饮食习惯						
偏咸 *vs* 清淡	0.623	0.261	5.682	0.017	1.864	（1.117，3.110）
不咸不淡 *vs* 清淡	− 0.045	0.176	0.065	0.798	0.956	（0.678，1.349）
运动频率 /（次 / 周）						
不锻炼 *vs* > 3	0.491	0.185	7.062	0.008	1.634	（1.138，2.347）
≤ 3 *vs* > 3	0.180	0.270	0.445	0.505	1.197	（0.706，2.030）
熬夜情况						
经常 *vs* 没有	0.258	0.272	0.902	0.342	1.294	（0.760，2.204）
偶尔 *vs* 没有	− 0.281	0.207	1.840	0.175	0.755	（0.503，1.133）

3 讨论

H 型高血压是伴有 Hcy 升高的高血压。Hcy 水平升高与高血压的发生和发展密切相关：高 Hcy 可抑制体内内源性硫化氢的生成，活化血管紧张素转换酶，产生血管紧张素Ⅱ作用于血管紧张素Ⅰ型受体，导致血压升高、血管增生等病理过程 [13-14]。因此，Hcy 的增加对高血压起到了促进的作用。

目前对于 H 型高血压疗效影响因素报道相对较少且探究的因素有限，因此本研究在既往报道的基础上 [9]，进一步探索了 H 型高血压患者的遗传因素即与 Hcy 相关的 *MTHFR* C677T 基因型和非遗传因素包括患者的基本资料、实验室信息、合并用药史、合并疾病以及随访信息对血压控制的影响。调查随访了 728 例按临床指南规范使用降压药≥ 1 个月的 H 型高血压患者，发现我院的 H 型高血压患者血压控制不良率高达 37.91%，表明即使患者规律用药，血压控制水平仍未达到理想水平。

单因素分析中，高血压分级、降压药物联用、CCB 用药史、*MTHFR* C677T C 基因型合并、精神压力、饮食习惯、运动频率与血压控制水平相

关（$P < 0.05$）。结果显示，服用 CCB 药物对 H 型高血压患者血压控制有益，这与张敏娟等 [15] 的研究一致。降压药物联用与 H 型高血压患者血压控制有关，说明对于 H 型高血压患者，单一降压药物可能不足以有效控制血压，联合用药可通过不同机制作用来更全面地控制血压，这对于降低心血管事件的风险至关重要。

本研究发现，相对于高血压（一级＋二级）患者，高血压三级的 H 型高血压患者发生血压未控制的风险增加了 1.999 倍。这一发现可能反映出在高血压更严重的情况下，与高 Hcy 水平相关的心血管风险加剧，从而影响血压控制的难度。此外，高血压三级患者的血管损害可能更为严重，这可能加剧由高 Hcy 水平引起的损害 [16]。血管硬化、内皮功能障碍和血管炎症反应的增加，都可能在这一患者群体中更为显著。

本研究发现 *MTHFR* C677T 基因型是影响 H 型高血压患者血压控制的另一个重要因素。*MTHFR* C677T 基因突变导致参与叶酸循环和 Hcy 代谢中的关键酶 *MTHFR* 活性下降 [17]，叶酸供给和吸收障碍，使体内 Hcy 水平升高 [18]。有研究显示，*MTHFR* C677T 基因多态性与高血压风险增加 36% ～ 87% 相关 [19-20]，并对收缩压产生影响 [21]，由此推断 *MTHFR* C677T 基因突变易产生高 Hcy，也与 H 型高血压的发生成正相关 [22]。本研究发现 *MTHFR* C677T TT 基因型患者发生血压未控制的风险是 CC 型患者的 1.719 倍，提示 *MTHFR* 基因 C677T 位点 TT 纯合子突变导致酶的活性和耐热性下降，被认为与较高的 Hcy 水平相关，这可能加剧了心血管风险和血压控制难度 [23]。这一发现突显了基因个体化医疗在 H 型高血压管理中的潜在价值，后续研究应考虑更多有关 H 型高血压的遗传信息，为个体化治疗提供更准确的指导，以提高患者血压治疗控制效果。

本研究结果显示饮食习惯、精神压力状况以及运动频率是 H 型高血压患者血压控制的危险因素。偏咸饮食的患者血压未控制的风险是清淡饮食患者的 1.864 倍。高盐饮食会增加体内钠离子含量，导致水分潴留和血管收缩，进而提高血压水平 [24]。经常感到精神压力大的 H 型高血压患者血压未控制的风险是感到没有压力患者的 1.771 倍，因为长期精神压力会使交感神经过度激活，影响大脑皮质功能，引发全身小动脉痉挛，增加血压的不稳定性 [25]，此外，压力还通过促进炎症反应、内皮功能障碍和动脉粥样硬化等方式间接影响血压和心血管健康 [26]。缺乏体育运动也是血压控制的危险因素。不运动的 H 型高血压患者血压未控制的风险是每周运动次数大于 3 次患者的 1.634 倍。定期运动能改善心血管健康和降低血压 [27]，并通过减少主动脉内皮氧化损伤和减轻炎症反应来减轻高同型半胱氨酸血症的症状 [28]，因此体育锻炼对 H 型高血压患者的血压控制极为重要。

叶酸是 Hcy 重新甲基化的重要辅助底物，高 Hcy 可能反映患者缺乏叶酸 [29]。有报道 [30] 显示补充叶酸能有效降低血液中的 Hcy 水平，并对血压控制产生积极影响。但在我院实际临床环境中，我们前期调研医师对 H 型高血压患者的叶酸医嘱的开具率仅为 5%，且未限制叶酸服用时长；并在随访中发现，绝大多数患者对 H 型高血压使用叶酸重视度不高且依从性较差，导致实际同时服用降压药及叶酸的患者仅达总体的 2%；此外，即便有患者同时服用降压药及叶酸，服用叶酸的剂量和治疗持续时间也因个体意愿而各不相同，从而限制了作为降压效果影响因素考察的样本量。基于叶酸在 H 型高血压中的机制 [31] 和相关指南 [5，10]，实际符合研究规定即叶酸应伴随降压药使用，且两药联用时间相同的患者样本量极小仅 10 例，故本研究将患者合并使用叶酸从血压控制的因素中剔除。希望在未来的研究中，我们可以增加符合规定的使用叶酸患者样本量，进一步探究其对血压控制的影响，以确保叶酸作为血压管理策略的潜在益处能被充分验证。

本研究还存在以下局限性：① 研究采用电话随访收集部分数据，可能存在主观性、不准确回答和血压测量方法准确性等问题。因此，未来研究我们将考虑采用更多数据收集方法，如面对面访谈、科技远程监测，以提高数据收集的精准性和可靠性。② 本研究为单中心研究，可能未全面考虑 H 型高血压患者血压控制的影响因素，未来我们将扩大样本规模，增加研究中心，以增强研究结果的稳定性。

综上所述，高血压级数、*MTHFR* C677T 基因多态性、精神压力、饮食习惯和运动频率对 H 型高血压患者血压控制至关重要。针对这些因素，临床治疗应实施个体化治疗策略，通过综合干预措施强化对患者的治疗与管理，以提高患者的生活质量和治疗效果。

参考文献

[1] Roth GA，Mensah GA，Johnson CO，et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors，1990—2019：update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol，2020，76（25）：2982-3021.

[2] GBD 2019 Risk Factors Collaborators. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories，1990—2019：a

systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet，2020，396（10258）：1223-1249.
[3] 中国心血管健康与疾病报告编写组 . 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要 [J]. 中国循环杂志，2023，38（6）：583-612.
[4] Huo Y，Li JP，Qin XH，et al. Efficacy of folic acid therapy in primary prevention of stroke among adults with hypertension in China：the CSPPT randomized clinical trial [J]. JAMA，2015，313（13）：1325-1335.
[5] 李建平，卢新政，霍勇，等 . H 型高血压诊断与治疗专家共识 [J]. 中华高血压杂志，2016，24（2）：123-127.
[6] Zhao WY，Gao FL，Lv LD，et al. The interaction of hypertension and homocysteine increases the risk of mortality among middle-aged and older population in the United States [J]. J Hypertens，2022，40（2）：254-263.
[7] Shih CC，Shih YL，Chen JY. The association between homocysteine levels and cardiovascular disease risk among middle-aged and elderly adults in Taiwan [J]. BMC Cardiovasc Disord，2021，21（1）：191.
[8] Zhang DD，Liu ZZ，Guo WY，et al. Serum homocysteine level is an independent risk factor for 1-year stroke recurrence in patients with acute ischemic stroke and H-type hypertension：results from the Xi’an stroke registry study of China [J]. Front Neurol，2023，14：11613-11618.
[9] 谭碧峰，黄友良，凌莎，等 . 基于有序 Logistic 回归模型的 H 型高血压疗效影响因素研究 [J]. 医学信息，2022，35（5）：69-73.
[10] 中国高血压防治指南修订委员会，高血压联盟（中国），中华医学会心血管病学分会，等 . 中国高血压防治指南（2018 年修订版）[J]. 中国心血管杂志，2019，24（1）：24-56.
[11] 国家心血管病中心，国家基本公共卫生服务项目基层高血压管理办公室，国家基层高血压管理专家委员会 . 国家基层高血压防治管理指南 2020 版 [J]. 中国循环杂志，2021，36（3）：209-220.
[12] 国家卫生健康委员会疾病预防控制局，国家心血管病中心，中国医学科学院阜外医院，等 . 中国高血压健康管理规范（2019）[J]. 中华心血管病杂志，2020，48（1）：10-46.
[13] Antoniades C，Antonopoulos AS，Tousoulis D，et al. Homocysteine and coronary atherosclerosis：from folate fortification to the recent clinical trials [J]. Eur Heart J，2009，30（1）：6-15.
[14] Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke：a meta-analysis [J]. JAMA，2002，288（16）：2015-2022.
[15] 张敏娟，吕建庄，葛兴利 . 不同钙离子通道阻滞剂联合叶酸治疗老年轻中度 H 型高血压的疗效比较 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2017，15（3）：351-353.
[16] 李婷婷，刘彬，张桂霞 . 原发性高血压患者血浆 PRA、Ang、Hcy、ET-1、NO 的表达变化及其与血压分级的关系 [J]. 中国医学创新，2023，20（3）：19-23.
[17] Nassereddine S，Kassogue Y，Korchi F，et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene（C677T）with the risk of hypertension in Morocco [J]. BMC Res Notes，2015，8（1）：775.
[18] Qin X，Spence JD，Li J，et al. Interaction of serum vitamin B_{12} and folate with *MTHFR* genotypes on risk of ischemic stroke [J]. Neurology，2020，94（11）：1126-1136.
[19] Yang BY，Fan SJ，Zhi XY，et al. Associations of *MTHFR* gene polymorphisms with hypertension and hypertension in pregnancy：a meta-analysis from 114 studies with 15411 cases and 21970 controls [J]. PLoS One，2014，9（2）：e87497.
[20] Yang KM，Jia J，Mao LN，et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and essential hypertension：a meta-analysis of 10 415 subjects [J]. Biomed Rep，2014，2（5）：699-708.
[21] Zhang C，Li J，Zhou J，et al. Effect of *MTHFR* C677T gene polymorphism on early morning blood pressure in elderly female patients with H-type hypertension [J]. Contrast Media Mol Imaging，2022，2022：1-6.
[22] Wu HX，Wang BY，Ban QY，et al. Association of total homocysteine with blood pressure in a general population of Chinese adults：a cross-sectional study in Jiangsu province，China [J]. BMJ Open，2018，8（6）：21103.
[23] Raghubeer S，Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate（MTHFR），the one-carbon cycle，and cardiovascular risks [J]. Nutrients，2021，13（12）：4562.
[24] 李卿，陈珅，林文静，等 . H 型高血压患者血压动态指标与盐摄入量的相关性分析 [J]. 实用临床医药杂志，2022，26（20）：105-109.
[25] 成年人精神压力相关高血压诊疗专家共识 [J]. 中华内科杂志，2021，60（8）：716-723.
[26] 韩旭，任洁 . 成人精神压力相关高血压研究进展 [J]. 中华高血压杂志，2024，32（3）：226-230.
[27] 张燕萍，张晨韵，唐姚，等 . 运动干预对中国高血压患者血压影响的荟萃分析 [J]. 中华高血压杂志，2018，26（8）：745-753.
[28] Chan SH，Hung CH，Shih JY，et al. Exercise intervention attenuates hyperhomocysteinemia-induced aortic endothelial oxidative injury by regulating SIRT1 through mitigating NADPH oxidase/LOX-1 signaling [J]. Redox Biol，2018，14：116-125.
[29] Scazzone C，Bono A，Tornese F，et al. Correlation between low folate levels and Hyperhomocysteinemia，but not with vitamin B_{12} in hypertensive patients [J]. Ann Clin Lab Sci，2014，44（3）：286-290.
[30] Wang WW，Wang XS，Zhang ZR，et al. A meta-analysis of folic acid in combination with anti-hypertension drugs in patients with hypertension and hyperhomocysteinemia [J]. Front Pharmacol，2017，8：585.
[31] 顾炳权，王多宁 . 血浆同型半胱氨酸水平及临床诊断意义 [J]. 中国血液流变学杂志，2004，14（4）：630-634.

（收稿日期：2024-01-05；修回日期：2024-02-20）

人工心脏瓣膜患者华法林抗凝质量影响因素分析及预测模型构建

史金平[1]，梁凯云[2]，张琰[1*]，唐亚娟[1]，白娟[1]，洪术霞[1]，路小寒[1]，王立珍[1]（1.西安国际医学中心医院药学部，西安　710100；2.西安外事学院 医学院，西安　710100）

摘要：目的　研究人工心脏瓣膜患者华法林抗凝质量的影响因素，构建华法林抗凝质量预测模型，甄别低 / 中水平华法林抗凝质量人群，提高其抗凝质量。**方法**　回顾性调取 2020 年 1 月—2023 年 5 月至某院就诊的人工心脏瓣膜患者，以治疗范围内时间百分比为指标，评价华法林的抗凝质量，采用 Logistic 回归方程分析华法林抗凝质量的影响因素，构建人工心脏瓣膜患者华法林抗凝质量列线图预测模型，并对该模型进行内部验证。**结果**　共纳入 236 例患者，其中高抗凝质量组 60 例，低 / 中抗凝质量组 176 例，Logistic 回归分析结果提示：合并心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史 [Exp（*B*）= 0.14，95%*CI*：0.02 ～ 0.87，*P* = 0.04]、焦虑 / 抑郁状态 [Exp（*B*）= 0.06，95%*CI*：0.08 ～ 0.89，*P* = 0.01] 是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的危险因素；高白蛋白水平 [Exp（*B*）= 1.13，95%*CI*：1.02 ～ 1.26，*P* = 0.02]、高 INR 监测频率 [Exp（*B*）= 10.92，95%*CI*：5.11 ～ 23.32，*P* < 0.01] 是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的保护因素，以此构建的列线图预测模型 C-index 指数为 0.940。**结论**　构建的人工心脏瓣膜患者华法林抗凝质量列线图预测模型的区分度及一致性良好，具有较高的临床应用价值，可甄别低 / 中水平华法林抗凝质量，有针对性地开展药学监护，提高患者抗凝质量。

关键词：人工心脏瓣膜；华法林；抗凝质量；治疗范围内时间百分比；影响因素；列线图预测模型

中图分类号：R541.75，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1379-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.043

Influence factors for the anticoagulant quality of warfarin in patients with prosthetic heart valve and construction of a prediction model

SHI Jin-ping[1], LIANG Kai-yun[2], ZHANG Yan[1*], TANG Ya-juan[1], BAI Juan[1], HONG Shu-xia[1], LU Xiao-han[1], WANG Li-zhen[1] (1. *Department of Pharmacy*, *Xi'an International Medical Center Hospital*, *Xi'an* 710100; 2. *School of Medicine*, *Xi'an International University*, *Xi'an* 710100)

Abstract: Objective　To determine the influence factors for warfarin anticoagulation quality in patients with prosthetic heart valve, to construct a prediction model for warfarin anticoagulation quality, and to identify the quality of low/medium level warfarin anticoagulation. **Methods**　We collected the data of patients with prosthetic heart valve in a hospital from January 2020 to May 2023 and evaluated the anticoagulation quality of warfarin using the time within the therapeutic range as the indicator. Logistic regression equation to analyze the influence factors of warfarin anticoagulation quality, construct a prediction model for the anticoagulation quality in patient with prosthetic valve with a nomogram, and internally validate the model. **Results**　Totally 236 patients were included, 60 of which were in the high anticoagulation quality group and 176 were in the low/medium anticoagulation quality groups. The Logistic regression analysis showed that a history of combined myocardial infarction/ischemic stroke [Exp(*B*) = 0.14, 95%*CI*: 0.02 ～ 0.87, *P* = 0.04], and anxiety/

基金项目：西安国际医学中心医院青年课题（No. 2023QN13）。

作者简介：史金平，男，主管药师，主要从事抗凝药物治疗方面的研究，email：903442614@qq.com　　*通信作者：张琰，女，硕士，主管药师，主要从事抗感染药物治疗方面的研究，email：648773953@qq.com

depression status [Exp(*B*) ＝ 0.06, 95%*CI*: 0.08 ～ 0.89, *P* ＝ 0.01] were risk factors for high anticoagulation quality of warfarin in patients with prosthetic valve; high albumin levels [Exp(*B*) ＝ 1.13, 95%*CI*: 1.02 ～ 1.26, *P* ＝ 0.02] , and high INR monitoring frequency [Exp(*B*) ＝ 10.92, 95%*CI*: 5.11 ～ 23.32, *P* ＜ 0.01] were protective factors of high anticoagulant quality of warfarin in such patients. The nomogram constructed based on these factors predicted a C-index index of 0.94 in the model. **Conclusion** The prediction model of warfarin anticoagulation quality nomogram for patients with prosthetic valve has good discrimination, consistency, and clinical application value. It can identify individuals with low/medium levels of warfarin anticoagulant quality, conduct targeted pharmaceutical monitoring, and improve anticoagulation quality in patients.

Key words: prosthetic heart valve; warfarin; anticoagulant quality; time within the therapeutic range; influence factor; nomogram prediction model

心脏瓣膜疾病是导致心血管疾病患者病情加重与死亡的常见原因之一，人工心脏瓣膜置换术是其主要的治疗方式，人工心脏瓣膜患者术后应使用华法林抗凝至少三个月，其中机械瓣膜患者应终身使用华法林抗凝[1]。此类患者的预后与华法林抗凝质量有关，如果治疗期间华法林抗凝质量较低，可显著增加患者瓣膜血栓、体循环血栓及缺血性脑卒中的发生风险[2]。目前国内外多推荐以治疗范围时间百分比（time within therapeutic range，TTR）为指标评价华法林抗凝质量[3]。华法林治疗窗窄，个体差异大，疗效易受诸多因素影响，多数患者难以取得较高水平的抗凝质量，因此多国学者对华法林抗凝质量的影响因素展开研究，并构建了房颤患者华法林抗凝质量预测模型，但因目前非瓣膜性房颤患者华法林使用率较低，且模型预测效能不高，难以广泛用于临床实践[4]。2023 年本项目组基于 meta 分析扩大了样本量，构建了华法林抗凝质量的预测模型，但因纳入人群的抗凝适应证不同，国际标准化比值（international normalized ratio，INR）的目标范围存在差异，使得模型具有较高异质性[5]。本研究拟以人工心脏瓣膜患者为研究对象，构建其华法林抗凝质量的列线图预测模型，可降低研究的异质性，提高模型的精准度。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性选取 2020 年 1 月—2023 年 5 月至某院就诊且住院期间规律使用华法林抗凝的人工心脏瓣膜（包含机械瓣和生物瓣）患者，提取其年龄、性别、合并的基础疾病、烟酒史、NYHA 分级，首次入院时的人血白蛋白水平、红细胞计数、血红蛋白浓度、血小板计数，长期合并用药及 INR 监测频率等信息。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准：均为人工心脏瓣膜患者，年龄≥ 18 岁，使用华法林抗凝，定期至我院监测 INR；排除标准：随访期限内住院期间因任何原因未规律服用华法林者，临床病历资料不全者或无法获取所需信息者，INR 监测次数少于 5 次者。

1.3 研究方法

依据纳入及排除标准入组适宜人群，记录患者在随访期内 INR 的监测次数及达标次数，以线性内插法计算 TTR[6]，以 TTR 是否≥ 70% 将患者分为高抗凝质量组与低 / 中抗凝质量组[7]，探究人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量影响因素，依据筛选的独立影响因素构建列线图预测模型并进行验证。

1.4 INR 目标值

2022 年《心脏瓣膜外科抗凝治疗中国专家共识》推荐[1]：心脏瓣膜术后使用华法林抗凝应维持 INR 1.8 ～ 2.5，合并高血栓风险或其他需要抗凝的因素者应维持 INR 2.0 ～ 3.0，合并需冠心病需抗血小板治疗的患者应维持在 INR 1.8 ～ 2.5，因此本文以 INR 1.8 ～ 3.0 为人工心脏瓣膜患者华法林抗凝的目标值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23 统计软件进行数据分析，计量资料以平均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用方差分析，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义；计数资料以 *n* 或率（%）表示，采用卡方检验，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义；使用 Logistic 回归方程筛选华法林抗凝质量的独立影响因素，通过 R 4.2.2 软件建立华法林抗凝质量的列线图预测模型，并采用 Bootstrap 法对模型进行内部验证，使用 ROCR 及 rms 程序包绘制 ROC 曲线。

2 结果

2.1 纳入者的 TTR 分布

研究共纳入 236 例患者，女性 90 例，男性 146 例，平均年龄（55.63±14.11）岁。平均 TTR 为

（46.78±24.74）%，其中高抗凝质量组（TTR ≥ 70%）60 人，占 25.4%，平均 TTR 为（79.20±8.45）%；低 / 中抗凝质量组（TTR ＜ 70%）176 人，占 74.6%，平均 TTR 为（31.30±14.79）%。

2.2 华法林抗凝质量的单因素分析

经初步筛选，高龄，男性，合并心力衰竭、糖尿病、焦虑 / 抑郁状态、慢性阻塞性肺疾病、心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的危险因素；高人血白蛋白浓度、红细胞计数、血红蛋白浓度、INR 监测频率是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的保护因素，结果如表 1 所示。

表 1 心脏瓣膜术后华法林抗凝质量的单因素分析

Tab 1 Single factor analysis of anticoagulant quality of warfarin after cardiac valve surgery

项目	TTR ≥ 70%（n = 60）	TTR ＜ 70%（n = 176）	χ^2/F	P
年龄 / 年	51.05±11.81	57.19±14.51	8.76	＜ 0.01
性别（男性）	48	98	11.22	＜ 0.01
吸烟史	6	12	0.64	0.42
饮酒史	3	9	0.00	0.97
冠心病	15	33	1.08	0.30
外周血管病	3	24	3.29	0.07
心力衰竭	3	27	4.31	0.04
NYHA ≥Ⅲ级	39	102	0.92	0.34
高血压	21	78	1.60	0.21
糖尿病	0	30	11.72	＜ 0.01
焦虑 / 抑郁状态	35	201	8.42	＜ 0.01
慢性阻塞性肺疾病	0	12	4.31	0.04
心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史	3	41	9.87	＜ 0.01
肝功能不全	3	21	2.35	0.13
肾功能不全	3	15	0.79	0.38
白蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	39.85±5.54	37.88±5.62	5.49	0.02
红细胞 /（$\times 10^{12} \cdot L^{-1}$）	4.34±0.68	4.01±0.82	7.95	0.01
血红蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	130.90±21.82	122.40±25.54	6.65	0.01
血小板 /（$\times 10^{9} \cdot L^{-1}$）	170.85±90.51	176.02±67.12	0.22	0.64
β 受体阻滞剂	30	72	1.51	0.22
胺碘酮	9	18	1.01	0.32
地高辛	15	57	1.15	0.28
钙通道阻滞剂	12	24	1.40	0.24
血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂（ARB）/ 血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）	12	39	0.12	0.73
螺内酯	33	92	0.13	0.72
呋塞米 / 氢氯噻嗪	33	101	0.10	0.75
阿司匹林	3	18	1.51	0.22
氯吡格雷	0	3	1.04	0.31
INR 监测频率 /（次 / 月）	2.73±1.13	0.97±0.68	206.59	＜ 0.01

2.3 华法林抗凝质量的多因素分析

使用 Logistic 回归方程对单因素分析中提取的有统计学意义的因子进行多因素分析，结果提示：合并心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史 [Exp（B）= 0.14，95%CI：0.02 ～ 0.87，P = 0.04]、焦虑 / 抑郁状态 [Exp（B）= 0.06，95%CI：0.08 ～ 0.89，P = 0.01] 是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的危险因素；高白蛋白水平 [Exp（B）= 1.13，95%CI：1.02 ～ 1.26，P = 0.02]、高 INR 监测频率 [Exp（B）= 10.92，95%CI：5.11 ～ 23.32，P ＜ 0.01] 是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的保护因素，结果如表 2 所示。

2.4 华法林高抗凝质量的列线图预测模型

依据华法林高抗凝质量的独立影响因素，建立列线图预测模型。该模型显示，当人工心脏瓣膜患者出现焦虑 / 抑郁状态或既往有心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史两种危险因素时，其对应的分值减小，模型总分值相应减小，患者获得高抗凝质量的概率也随之降低；此外，随着人工心脏瓣膜患者人血白蛋白浓度的升高及每月 INR 监测次数的提高，其对应的分值增加，模型总分值随之增加，患者获得高抗凝质量的概率也随之提高，结果见图 1。

表 2　心脏瓣膜术后华法林抗凝质量的多因素分析

Tab 2　Multivariate analysis of anticoagulation quality of warfarin after heart valve surgery

影响因素	*β* 值	*Wald* 值	*P*	Exp（*B*）	95%*CI*
年龄	－ 0.04	2.83	0.09	0.97	0.93 ～ 1.01
性别（男性）	1.04	2.58	0.11	2.83	0.79 ～ 10.07
心力衰竭	1.17	0.77	0.38	3.23	0.24 ～ 43.82
糖尿病	－ 24.67	0.00	1.00	0.00	0.00 ～数据超限
慢性阻塞性肺疾病	－ 18.97	0.00	1.00	0.00	0.00 ～数据超限
心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史	－ 1.97	4.43	0.04	0.14	0.02 ～ 0.87
焦虑 / 抑郁状态	－ 2.84	6.21	0.01	0.06	0.08 ～ 0.89
白蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	0.12	5.08	0.02	1.13	1.02 ～ 1.26
红细胞 /（$\times 10^{12} \cdot L^{-1}$）	0.63	0.83	0.36	1.87	0.49 ～ 7.15
血红蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）	－ 0.02	1.23	0.27	0.98	0.94 ～ 1.02
INR 监测频率 /（次 / 月）	2.39	38.15	＜ 0.01	10.92	5.11 ～ 23.32

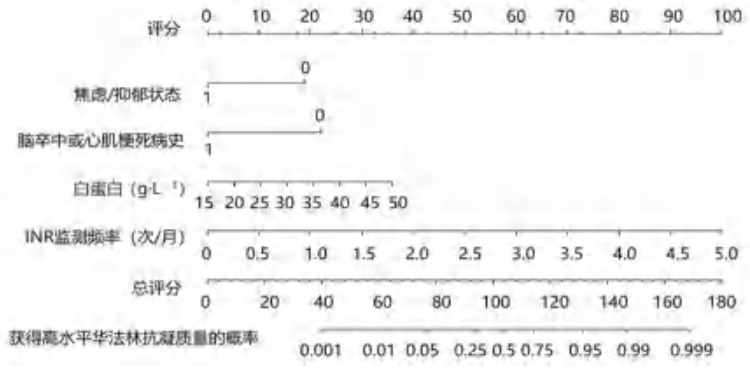

图 1　华法林高抗凝质量列线图预测模型

Fig 1　Prediction model of warfarin high anticoagulant quality

2.5　华法林高抗凝质量的列线图预测模型验证

采用 Bootstrap 自抽样法对华法林高抗凝质量的列线图预测模型进行验证，获得的校准曲线和 $Y = X$ 直线相近，说明该预测模型校准度良好，该预测模型具有良好的区分度，结果如图 2 所示。应用 ROC 曲线分析该模型的预测效率，曲线下面积为 0.940（95%*CI*：0.898 ～ 0.981），表明该模型预测效能良好，最佳临界值为－ 0.136、敏感性为 0.886、特异性为 0.669，结果如图 3 所示。

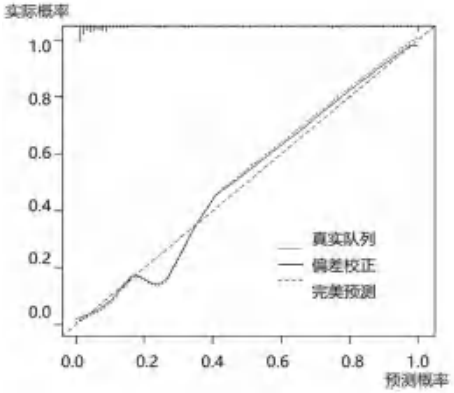

图 2　华法林高抗凝质量列线图预测模型的校准曲线

Fig 2　Calibration curve of warfarin high anticoagulant quality nomogram prediction model

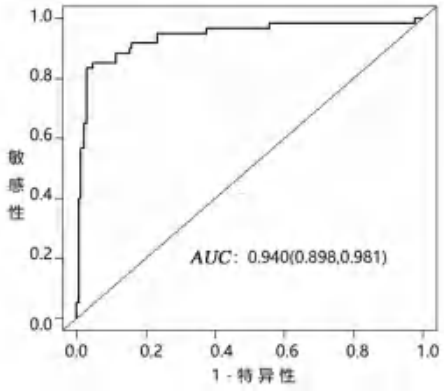

图 3　华法林高抗凝质量列线图预测模型的 ROC 曲线

Fig 3　ROC curve of warfarin high anticoagulant quality nomogram prediction model

3　讨论

3.1　华法林的治疗地位

华法林为甜苜蓿中“双香豆素”类最有效的衍生物，于 20 世纪被研究人员发现并作为灭鼠药使用，后经研究发现其可通过抑制 VKORC1 的活性，干扰维生素 K 依赖性凝血因子的合成，而发挥强效抗凝作用，因此被广泛用于血栓栓塞性疾病的预防与治疗 [8]。随着医学的发展，新型口服抗凝药问世，其虽然疗效不劣于华法林，且

具有药物 / 食物影响小和无需常规监测凝血功能等优点，已在诸多方面逐步代替华法林，但在中重度二尖瓣狭窄及心脏机械瓣膜置换术后患者抗凝治疗中华法林的地位仍无可取代，且此类患者的预后与华法林抗凝质量高度相关[1]。

3.2 研究异质性可能致使多项华法林抗凝质量影响因素存在争议

目前多项研究显示年龄、慢性疾病（糖尿病、脑卒中、冠心病、房颤、心力衰竭）、受教育程度较低、依从性差、合并用药（如胺碘酮）等是影响华法林抗凝质量的影响因素，但部分影响因素因异质性较大存在争议[4-5]。以年龄为例，虽然部分研究提示年龄是华法林抗凝质量的影响因素，但也有研究显示，这与不同国家对不同年龄的患者 INR 目标范围不一致有关[9]。以此推理，不同抗凝适应证的患者 INR 目标范围存在差异，可能导致研究出现异质性，影响研究结果。本文仅纳入了人工心脏瓣膜患者，限定了统一的 INR 目标范围，虽在单因素分析时提示年龄、性别、慢性阻塞性肺疾病、糖尿病等可能影响华法林抗凝质量，但多因素分析结果提示，以上因素均不是华法林抗凝质量的独立影响因素。

3.3 焦虑 / 抑郁状态影响华法林抗凝质量

部分心脏瓣膜术后的患者因社会经济地位较低或对疾病缺乏足够的认知，易出现焦虑、抑郁等症状，此症状可能持续一年以上[10-11]。Baumgartner 等[12]研究发现，焦虑或抑郁状态的患者使用华法林抗凝时缺血性脑卒中与颅内出血风险显著增加。本文研究结果也显示焦虑 / 抑郁状态 [Exp（B）＝0.06，95%CI：0.08 ～ 0.89，P ＝ 0.01] 是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的危险因素，导致这一现象的原因可能是焦虑 / 抑郁状态的患者服药依从性下降[13-14]。基于此，医务人员除了要做好疾病宣教，减轻患者心理负担外，还应加强随访，甚至给予其他干预措施，如音乐疗法等，以消除患者紧张情绪，缓解焦虑或抑郁状态，提高服药依从性[15-16]。

3.4 心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史影响华法林抗凝质量

McAlister 等[17]的研究发现，合并心肌梗死病史的非瓣膜性房颤患者使用华法林抗凝治疗时获得高抗凝质量的比例较低，但机制尚不明确；研究提示：脑卒中患者多伴有后遗症，可使其行动与自理能力降低，无法独立至医院就诊，致使 INR 的监测频率下降，无法及时调整华法林药物剂量，从而导致其出现低抗凝质量的风险较非脑卒中患者增加 7.95 倍[18]。本研究结果显示合并心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史 [Exp（B）＝ 0.14，95%CI：0.02 ～ 0.87，P ＝ 0.04] 是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的危险因素，支持上述研究结论，但仍应进一步研究心肌梗死 / 缺血性脑卒中病史影响华法林抗凝质量的机制。

3.5 人血白蛋白水平影响华法林抗凝质量

尚未查询到直接研究人血白蛋白水平与华法林抗凝质量关系的研究，Kawai 等[19]学者的一项前瞻性队列研究显示，低白蛋白血症患者使用华法林抗凝时 INR 易超出目标值范围，可显著增加患者出血风险。本文研究结果提示，较高白蛋白水平 [Exp（B）＝ 1.13，95%CI：1.02 ～ 1.26，P ＝ 0.02] 是人工心脏瓣膜患者华法林高抗凝质量的保护因素，这可能与华法林药物代谢动力学相关。华法林血浆蛋白结合率高达 99%，可在体内缓慢解离为非蛋白结合型发挥作用，当血浆蛋白浓度降低时，游离药物浓度升高，使 INR 出现波动，从而影响其抗凝质量。

3.6 INR 监测频率影响华法林抗凝质量

INR 监测频率对华法林抗凝质量的影响较为明确，目前多项研究证实提高 INR 的监测次数可使患者获得较高水平的抗凝质量，但频繁监测 INR，可能会对患者生活方式及质量造成影响。

3.7 华法林抗凝质量预测模型的研究

Apostolakis 等[20-21]学者构建了 SAMe-TT2R2 评分系统，用以预测房颤患者华法林抗凝质量，结果提示，当 SAMe-TT2R2 评分≥ 2 分时患者低水平抗凝质量风险较高，需及时干预，但经其他学者验证，该模型预测效能较差，尚不支持用以评估华法林抗凝质量[20-21]。Wang 等[4]基于房颤患者数据，构建了医师 - 药剂师协作诊所（PPCC）模型，用以预测华法林抗凝质量，预测效能中等，但目前新型口服抗凝药已逐步取代了华法林在非瓣膜性房颤治疗中的地位，且该模型尚未验证是否能用于人工心脏瓣膜患者，因此使用范围受限。2023 年本项目组基于 meta 构建了华法林抗凝质量的预测模型，但纳入人群的抗凝适应证不同，使得模型具有较高异质性[5]。本研究以华法林使用最为广泛的人工心脏瓣膜患者为研究对象，构建了华法林抗凝质量预测模型，该模型 ROC 曲线下面积为 0.940（95%CI：0.898 ～ 0.981），具有良好的预测效能。

综上所述，本文构建的人工心脏瓣膜患者华

法林抗凝质量预测模型使用范围较广，且预测效能良好，可用于甄别存在低 / 中抗凝质量风险的人工心脏瓣膜患者，并及时干预，提高其抗凝质量，避免因抗凝质量过低导致的不良事件。

参考文献

[1] 中华医学会胸心血管外科分会瓣膜病外科学组 . 心脏瓣膜外科抗凝治疗中国专家共识 [J]. 中华胸心血管外科杂志，2022，38（3）：164-174.

[2] 丁征，潘文斐，莎兰，等 . 人工心脏瓣膜术后华法林抗凝治疗真实世界研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（20）：1722-1725.

[3] 何帆，任荣，刘关键，等 . TTR 及 FTTR 评价机械瓣置换术后早期患者的抗凝治疗质量 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志，2017，24（2）：110-117.

[4] Wang N，Qiu S，Yang Y，et al. Physician-pharmacist collaborative clinic model to improve anticoagulation quality in atrial fibrillation patients receiving warfarin：an analysis of time in therapeutic range and a nomogram development [J]. Front Pharmacol，2021，12：673302.

[5] 史金平，张琰，唐亚娟，等 . 华法林抗凝质量影响因素的 Meta 分析与预测模型 [J]. 中南药学，2023，21（6）：1684-1689.

[6] 熊彩虹，万建伟，陈敏，等 . 服用华法林患者抗凝治疗现状调查及质量评价 [J]. 药物流行病学杂志，2020，29（5）：332-335，341.

[7] Ageno W，Gallus AS，Wittkowsky A，et al. Oral anticoagulant therapy：antithrombotic therapy and prevention of thrombosis，9th ed：American College of Chest Physicians Evidence-based Clinical Practice Guidelines [J]. Chest，2012，141（2）：e44S-e88S.

[8] 张进华，刘茂柏，蔡铭智，等 . 模型引导的华法林精准用药：中国专家共识（2022 版）[J]. 中国临床药理学与治疗学，2022，27（11）：1201-1212.

[9] Okumura K，Komatsu T，Yamashita T，et al. Time in the therapeutic range during warfarin therapy in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation. A multicenter study of its status and infuential factors [J]. Circ J，2011，75（9）：2087-2094.

[10] Rosson S，Monaco F，Miola A，et al. Longitudinal course of depressive，anxiety，and posttraumatic stress disorder symptoms after heart surgery：a meta-analysis of 94 studies [J]. Psychosom Med，2021，83（1）：85-93.

[11] Chandrasekhar J. Psychosocial fitness for aortic valve replacement：can anxiety，depression，and postcode influence the outcomes? [J]. JACC Cardiovasc Interv，2022，15（22）：2336-2338.

[12] Baumgartner C，Fan D，Fang MC，et al. Anxiety，depression，and adverse clinical outcomes in patients with atrial fibrillation starting warfarin：cardiovascular research network WAVE study [J]. J Am Heart Assoc，2018，7（8）：e007814.

[13] Miyazaki M，Nakashima A，Nakamura Y，et al. Association between medication adherence and illness perceptions in atrial fibrillation patients treated with direct oral anticoagulants：an observational cross-sectional pilot study [J]. PLoS One，2018，13（9）：e0204814.

[14] Cosh SM，Pinto R，Denson L，et al. Understandings and experiences of adherence to secondary prevention for patients with cardiovascular disease and comorbid depression or anxiety [J]. Psychol Health Med，2023，28（6）：1479-1486.

[15] Manzato RO，Ciol MA，Bolela F，et al. The effect of reinforcing an educational programme using telephone follow-up on health-related quality of life of individuals using warfarin：a randomised controlled trial [J]. J Clin Nurs，2021，30（19-20）：3011-3022.

[16] Dong Y，Zhang L，Chen LW，et al. Music therapy for pain and anxiety in patients after cardiac valve replacement：a randomized controlled clinical trial [J]. BMC Cardiovasc Disord，2023，23（1）：32.

[17] McAlister FA，Wiebe N，Hemmelgarn BR. Time in therapeutic range and stability over time for warfarin users in clinical practice：a retrospective cohort study using linked routinely collected health data in Alberta，Canada [J]. BMJ Open，2018，8（1）：e016980.

[18] 杨诗琪 . SAMe-TT2R2 评分对非瓣膜性房颤患者华法林抗凝质量评价的应用研究 [D]. 石河子：石河子大学，2020.

[19] Kawai M，Harada M，Motoike Y，et al. Impact of serum albumin levels on supratherapeutic PT-INR control and bleeding risk in atrial fibrillation patients on warfarin：a prospective cohort study [J]. Int J Cardiol Heart Vasc，2019，22：111-116.

[20] Apostolakis S，Sullivan RM，Olshansky B，et al. Factors affecting quality of anticoagulation control among patients with atrial fibrillation on warfarin：the SAMe-TT_2R_2 score [J]. Chest，2013，144（5）：1555-1563.

[21] Methavigul K，Yindeengam A，Krittayaphong R. Efficacy and safety outcomes of patients with atrial fibrillation compared between warfarin and non-vitamin K antagonist oral anticoagulants based on SAMe-TT_2R_2 score [J]. BMC Cardiovasc Disord，2023，23（1）：43.

（收稿日期：2023-09-25；修回日期：2023-11-28）

HPLC-MS/MS 法同时测定儿童血浆中万古霉素和地高辛的浓度

秦亚彬[1]，姜锡娟[1]，张古英[1]，于斌[2]，邢冬[2]，秦皓[2]，白宗江[2]，韩雨[1]（1. 河北省儿童医院药学部，石家庄 050031；2. 河北医科大学第四医院，石家庄 050011）

摘要：目的　建立同时测定血浆中万古霉素和地高辛浓度的高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS/MS）法，并用于儿童患者治疗药物监测。**方法**　血浆样本经甲醇沉淀蛋白前处理，分别以去甲万古霉素和地高辛 -d3 作为内标，采用 EVO-C18 色谱柱分离，流动相为水（含 0.02% 甲酸和 2 mmol • L^{-1} 乙酸铵）和甲醇，梯度洗脱，流速为 0.55 mL • min^{-1}。质谱检测方式为 ESI 正离子模式，dMRM 扫描。**结果**　万古霉素在 1 ～ 50 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（R^2 ＞ 0.991），地高辛在 0.25 ～ 8 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（R^2 ＞ 0.993）。方法准确度、精密度、基质效应和稳定性均符合要求，并成功应用于 311 个样本的测定。**结论**　本方法操作简便、快速、灵敏度高，适用于人血浆中万古霉素和地高辛浓度的同时分析，可用于儿童患者临床治疗药物监测。

关键词：万古霉素；地高辛；高效液相色谱串联质谱法；治疗药物监测；儿童
中图分类号：R917，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1385-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.044

HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of vancomycin and digoxin in children’s plasma

QIN Ya-bin[1], JIANG Xi-juan[1], ZHANG Gu-ying[1], YU Bin[2], XING Dong[2], QIN Hao[2], BAI Zong-jiang[2], HAN Yu[1] (1. *Department of Pharmacy*, *Hebei Children’s Hospital*, *Shijiazhuang* 050031; 2. *The Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University*, *Shijiazhuang* 050011)

Abstract: Objective　To establish an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of vancomycin and digoxin in children’s plasma, and to monitor children therapeutic drugs. **Methods** The plasma sample protein were precipitated by methanol with the norvancomycin and digoxin-d3 as the internal standards. The analytes were gradient eluted on an EVO-C18 column by HPLC-MS/MS, with the mobile phase consisting of water (0.02% formic acid and 2 mmol • L^{-1} ammonium acetate)-methanol at the flow rate of 0.55 mL • min^{-1}. Ions were monitored in the dynamic multiple reaction monitoring (dMRM) mode, with positive ion electrospray ionization (ESI). **Results**　Calibration plots were established over the concentration range of 1 ～ 50 μg • mL^{-1} for vancomycin (R^2 ＞ 0.991), while 0.25 ～ 8 ng • mL^{-1} for digoxin (R^2 ＞ 0.993). The accuracy, precision, matrix effect and stability all met the requirements. This method was fully verified and used to determine the drug concentrations in 311 plasma samples. **Conclusion**　The method is simple, rapid, sensitive and suitable to monitorthe vancomycin and digoxin in children’s plasma.

Key words: vancomycin; digoxin; HPLC-MS/MS; therapeutic drug monitoring; children

基金项目：河北省医学科学研究课题计划（No. 20221335；No. 20200658）。
作者简介：秦亚彬，男，主管药师，博士，主要从事治疗药物监测研究，email：qinyabinqq@163.com

感染可以导致心肌损伤，从而诱发或者加重心力衰竭，所以儿科重症感染的患者常常会伴发心力衰竭[1]。而患有先天性心脏病的患儿由于血流动力学不畅，自身免疫能力和抵抗力比较弱，极易受到细菌入侵，常会导致肺部充血和感染[2]。感染与心肌损伤往往合并发生，对于重症感染合并心力衰竭或脓毒症心肌抑制的患者，抗菌药物和强心药物常常需要联合使用，而万古霉素和地高辛分别是儿科控制感染和心力衰竭的常用药物，两药在临床上有联用的可能。由于不良反应的发生，万古霉素和地高辛在临床上使用时均建议监测血药浓度[3]。万古霉素和地高辛主要通过肾脏代谢，两者合用会加重肾脏负担，易引起不良反应，所以两药合用更应该监测血药浓度。

近年来，HPLC-MS/MS 法因其较高的色谱分离能力和质谱选择性，可以同时检测多种药物，具有分析速度快、特异性高和灵敏度高等优点，被广泛应用于治疗药物监测（TDM）中[4-6]。但目前有关地高辛的检测方法前处理相对复杂，且未见同时测定万古霉素和地高辛的方法报道[7-10]。本研究旨在建立同时测定血浆中万古霉素和地高辛的 LC-MS/MS 方法，以应用于儿科重症感染合并心力衰竭的患者，为临床合理用药和个体化精准给药提供方法支持。

1　材料

1.1　仪器

1260 型高效液相色谱仪、Ultivo 型三重四极杆质谱仪（美国 Agilent 公司），R20 型低温高速离心机（北京白洋医疗器械有限公司），MIX-2500 型涡旋混合器（杭州佑宁仪器有限公司），Explorer 型电子分析天平（Ohaus 公司）。

1.2　试药

万古霉素（纯度：100%，批号：130360-201302）、去甲万古霉素（纯度：87.7%，批号：130338-201704）（中国食品药品检定研究院）；地高辛对照品（纯度：98.7%；批号：0222-RA 0003，Cato Research Chemicals 公司），地高辛 -d3（纯度：98.0%，批号：B70213，上海源叶生物有限公司）；甲酸（色谱纯，美国 MREDA 司）；乙酸铵、乙腈、甲醇（色谱纯，赛默飞世尔科技有限公司）；水为屈臣氏纯净水（广州屈臣氏公司）。

2　方法与结果

2.1　色谱与质谱条件

2.1.1　色谱条件　分析柱为 Phenomenex Kinetex EVO C18（30 mm×2.1 mm，2.6 μm）；流动相为水（含 0.02% 甲酸和 2 mmol • L^{-1} 乙酸铵）（A）和甲醇（B）梯度洗脱（0 ～ 0.5 min，97%A；0.5 ～ 1.0 min，97% ～ 65%A；1.0 ～ 1.2 min，65% ～ 60%A；1.2 ～ 1.6 min，60% ～ 5%A；1.6 ～ 2.45 min，5%A；2.45 ～ 2.46 min，5% ～ 97%A；2.46 ～ 3.5 min，97%A）。柱温：45 ℃；自动进样器温度：5 ℃；流速：0.55 mL • min^{-1}；进样体积：20 μL。

2.1.2　质谱条件　离子源为电喷雾离子源（ESI 源）；鞘气温度 170 ℃，鞘气体积流量 11 L • min^{-1}；喷嘴电压正离子模式 1500 V；雾化器压力 15 psi；毛细管电压 4000 V；干燥气温度 170 ℃；干燥气体积流量 10 L • min^{-1}；dMRM 多反应监测扫描分析。万古霉素离子通道选择为 725.4 → 144.2，碰撞能（CE）为 17 V，其内标去甲万古霉素离子通道选择为 718.5 → 144.2，CE 为 20 V；地高辛离子通道选择为 798.3 → 651.3，CE 为 8 V，其内标地高辛 -d3 离子通道选择为 801.3 → 654.3，CE 为 8 V。

2.2　溶液制备

2.2.1　标准曲线工作液制备　准确称取万古霉素 20 mg 和地高辛 2 mg，用甲醇 - 水（1∶1，*V*/*V*）溶解，分别置于 5 mL 和 500 mL 量瓶中，稀释至刻度，超声助溶，获得储备液，－ 80 ℃冷冻保存。用甲醇 - 水（1∶1，*V*/*V*）对储备液进行逐级稀释得到万古霉素质量浓度为 20、40、100、200、500 和 1000 μg • mL^{-1} 的标准曲线工作液，地高辛质量浓度为 5、10、20、40、80 和 160 ng • mL^{-1} 的标准曲线工作液。

2.2.2　内标溶液制备　分别称量去甲万古霉素和地高辛 -d3，用甲醇 - 水（1∶1，*V*/*V*）溶解，获得质量浓度为 0.1 mg • mL^{-1} 的内标储备液。内标储备液用水稀释，制成质量浓度为 20 μg • mL^{-1} 去甲万古霉素和 5 ng • mL^{-1} 地高辛 -d3 的混合内标溶液，－ 80 ℃冷冻保存。

2.2.3　系列标准溶液和质控样品制备　在离心管中精密加入 50 μL 万古霉素和 50 μL 地高辛各浓度标准曲线工作液，用 1900 μL 空白血浆（来自河北省儿童医院输血科）进行稀释制成混合标准曲线溶液，万古霉素质量浓度为 1、2、5、10、25 和 50 μg•mL^{-1}，地高辛质量浓度为 0.25、0.5、1、2、4 和 8 ng • mL^{-1}。另取空白血浆适量，加入储备液，分别配制成万古霉素质量浓度为 3、12.5、37.5 μg • mL^{-1} 及地高辛质量浓度为 0.75、1.5、6 ng • mL^{-1} 的低、中、高混合质控溶液。

2.3　样品前处理方法

精密吸取血浆样本 50 μL，加入混合内标溶液

10 μL（20 μg • mL^{-1} 去甲万古霉素和 5 ng • mL^{-1} 地高辛 -d3），再加入甲醇和乙腈等体积混合溶液 150 μL，涡旋振荡 1 min，然后 12 000 g 离心 10 min，取上清液 100 μL，加入 100 μL 水，混匀，进样分析。

2.4 *方法学考察*

2.4.1 专属性　取 6 份不同来源的空白血浆，观察内源性物质对万古霉素和地高辛测定的干扰情况。将空白血浆、质控样品最低定量限及患者血浆样品均按“2.3”项下方法处理后进样分析，记录待测物和内标色谱图。典型色谱图见图 1，血浆中的内源性物质不干扰待测物的测定，方法的专属性良好。万古霉素及去甲万古霉素（IS）的保留时间分别为 1.69 min 和 1.66 min；地高辛及地高辛 -d3（IS）的保留时间分别为 2.41 min 和 2.40 min。

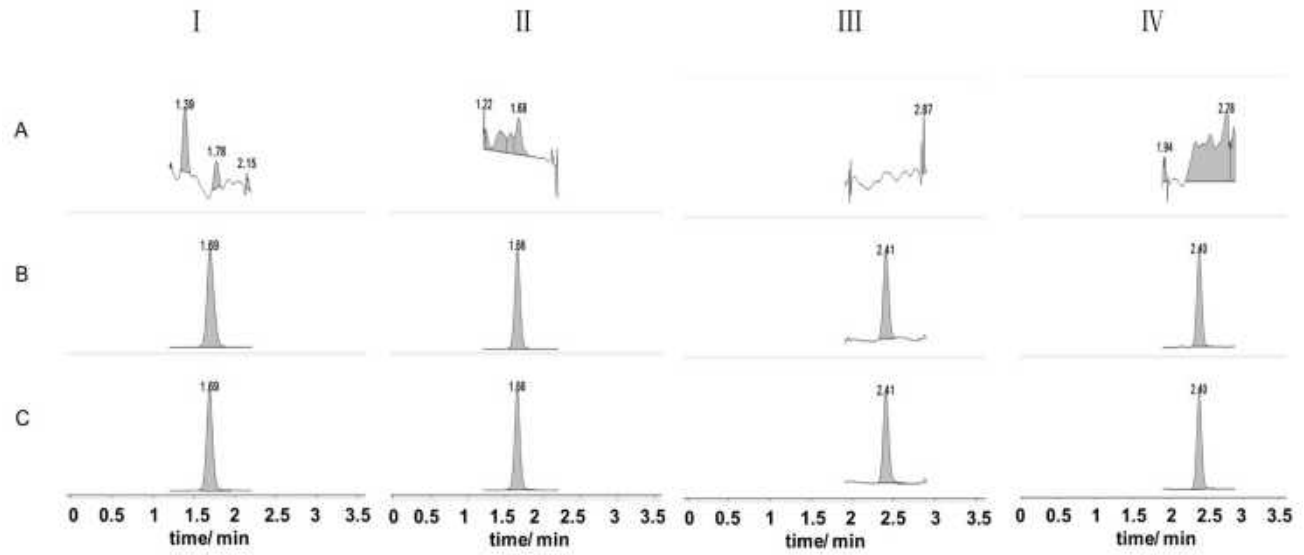

图 1　万古霉素和地高辛的典型色谱图

Fig 1　LC-MS/MS chromatograms of vancomycin and digoxin

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 定量下限（LLOQ）；C. 临床样本（clinical sample）；Ⅰ. 万古霉素（vancomycin）；Ⅱ. 去甲万古霉素（norvancomycin）；Ⅲ. 地高辛（digoxin）；Ⅳ. 地高辛 -d3（digoxin-d3）

2.4.2 标准曲线及定量下限　含药标准曲线样本依照“2.3”项下方法处理，进样检测。以待测物的质量浓度为横坐标（X），待测物与内标物峰面积比值为纵坐标（Y），最小二乘法进行回归分析，权重为 $1/\chi^2$。万古霉素回归方程分别是 $Y_1 = 0.012\,57X + 0.000\,89$（$R^2 = 0.9935$）；$Y_2 = 0.1317X + 0.1004$（$R^2 = 0.9961$）及 $Y_3 = 0.1237X + 0.074\,69$（$R^2 = 0.9918$），线性范围均在 1 ～ 50 μg • mL^{-1}，定量下限均为 1 μg • mL^{-1}。地高辛回归方程分别是 $Y_1 = 0.3444X + 0.025\,98$（$R^2 = 0.9934$）；$Y_2 = 0.3484X + 0.0106$（$R^2 = 0.9966$）及 $Y_3 = 0.3636X + 0.021\,39$（$R^2 = 0.9930$），线性范围均在 0.25 ～ 8 ng • mL^{-1}，定量下限均为 0.25 ng • mL^{-1}。万古霉素和地高辛的标准曲线在各自的线性范围内与峰面积线性良好，LLOQ 信噪比（S/N）大于 5，符合定量要求。

2.4.3 精密度与准确度　取低、中、高混合质控溶液和定量下限溶液按“2.3”项下方法处理，每个浓度平行操作 5 份，连续测 3 批，计算批内和批间精密度与准确度。结果见表 1。

表 1　精密度、准确度结果

Tab 1　Accuracy and precision

化合物	理论浓度	批内（$n = 5$）		批间（$n = 15$）	
		准确度 /%	*CV* /%	准确度 /%	*CV* /%
万古霉素	1 μg • mL^{-1}	96.6	8.9	98.5	9.3
	3 μg • mL^{-1}	103.7	1.7	105.4	8.1
	12.5 μg • mL^{-1}	102.9	4.0	102.6	7.0
	37.5 μg • mL^{-1}	96.6	2.7	96.6	5.1
地高辛	0.25 ng • mL^{-1}	100.0	14.4	100.3	14.5
	0.75 ng • mL^{-1}	95.2	4.0	100.1	9.0
	1.5 ng • mL^{-1}	98.3	4.6	99.1	5.3
	6 ng • mL^{-1}	92.0	1.7	96.8	5.9

2.4.4 提取回收率和基质效应　取“2.2”项下低、中、高浓度的质控样品，每个浓度平行 5 份，按“2.3”项下方法进行操作，进样检测，记录峰面积；另取空白血浆，按“2.3”项下方法进行操作，不加内标，向得到的上清液中加入内标及相应的低、中、高浓度对照品溶液，每个浓度平行 5 份，进样检测，计算相应峰面积比值，即为提取回收率。

取 6 份不同来源的空白血浆，按“2.3”项下

进行处理，不加内标，向上清液中加入适量的低、高浓度对照品溶液及内标，进样检测，记录待测物色谱峰面积为 A_1，内标色谱峰面积为 A_2。用空白溶剂直接配制与上述质控相同浓度不含血浆的质控样品，直接进样检测，记录待测物和内标峰面积分别为 B_1 和 B_2。待测物绝对基质因子 MF ＝ A_1/B_1×100%。将待测物的基质因子除以内标的基质因子得内标归一化的基质因子。计算低、高浓度各化合物的内标归一化基质效应因子的变异系数（CV）。如表 2 所示，6 份不同来源血浆基质效应稳定，符合规定。

2.4.5　残留效应　按照高浓度血浆样品在先，空白血浆样品在后的顺序进样检测残留，万古霉素和地高辛的残留均不超过定量下限的 20%，且内标残留不超过 5%。

2.4.6　稀释可靠性　分别配制含万古霉素 150 μg • mL^{-1} 和地高辛 20 ng • mL^{-1} 的标准样品，分别以 5 倍体积空白血浆稀释上述样品，平行操作 5 份，进样检测，准确度和精密度 *RSD* 均在 15% 之内，符合规定。

表 2　各待测药物在人血浆中的提取回收率和基质效应

Tab 2　Recovery and matrix effect of compounds in human plasma

化合物	理论浓度	提取回收率（n = 5）		基质效应（n = 6）	
		平均值 /%	*RSD*/%	平均值 /%	*CV*/%
万古霉素	3 μg • mL^{-1}	46.4	3.5	113	5.5
	12.5 μg • mL^{-1}	50.9	1.0	—	—
	37.5 μg • mL^{-1}	50.3	0.99	121	8.4
地高辛	0.75 ng • mL^{-1}	85.3	5.6	90.2	11.8
	1.5 ng • mL^{-1}	95.9	5.7	—	—
	6 ng • mL^{-1}	80.6	3.3	87.6	9.3

2.4.7　稳定性　制备低、高质量浓度的混合质控溶液，每个质量浓度平行 5 份，分别于室温放置 24 h、进样器 5 ℃冷藏 8 h、－ 20 ℃ - 室温 3 次冻融循环和－ 20 ℃冷冻 1 个月等条件下储存，测得结果与初始值比较，考察储存稳定性。结果见表 3。

表 3　万古霉素和地高辛稳定性结果（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

Tab 3　Stability of vancomycin and digoxin（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

化合物	理论浓度	实测浓度			
		室温放置 24 h	进样器冷藏 8 h（样品处理后）	3 次冻融循环（－ 20 ℃ - 室温）	－ 20 ℃冷冻 1 个月
万古霉素	3 μg • mL^{-1}	3.15±0.09	3.16±0.09	3.05±0.24	3.10±0.25
	37.5 μg • mL^{-1}	35.67±0.67	35.13±0.68	38.29±1.06	37.09±0.73
地高辛	0.75 ng • mL^{-1}	0.75±0.05	0.79±0.04	0.75±0.04	0.73±0.01
	6 ng • mL^{-1}	5.59±0.16	6.02±0.20	5.88±0.21	5.53±0.20

2.5　方法学应用

该方法经河北省儿童医院伦理委员会批准（医研伦审第 11 号）用于实际临床药物监测，共测定 311 例临床样本，均来源于儿童患者。依据相关参考文献 [11]，儿童患者万古霉素采血时间点为稳态谷浓度，参考范围为 5 ～ 15 μg • mL^{-1}，测定的 69 例服用万古霉素患儿血样中，有 47 例在参考范围内，22 例超出参考范围；地高辛采血时间为服药 6 h 后至下次服药前 0.5 h，其有效血药浓度为 0.5 ～ 2 ng • mL^{-1} [3]，测定的 246 例服用地高辛患儿中，有 147 例在参考范围内，99 例超出参考范围。311 例临床样本中有 4 例合用万古霉素和地高辛这两种药，2 例为脓毒症合并心力衰竭的患儿，1 例为新生儿肺炎合并心力衰竭，另 1 例为先天性心脏病合并重症肺炎。

3　讨论

3.1　色谱及质谱条件优化

在色谱及质谱条件优化过程中，流动相中添加少量的 H^+ 和 NH_4^+，少量的 H^+ 不仅可以有效改善峰形，还可以提高万古霉素的响应。地高辛以 $[M + NH_4]^+$ 形式电离，添加 NH_4^+ 可以增加地高辛响应。另外，离子源温度对地高辛灵敏度有明显影响，当鞘气和干燥气温度设定在 200 ℃以下时，地高辛才有较高的灵敏度，较高的离子源温度可能使地高辛发生源内裂解。经过尝试，本方法最终选择设定到温度 170 ℃。在这个温度下，地高辛有较高的灵敏度，而万古霉素响应也没有明显的降低。

3.2　方法先进性

本研究建立的 HPLC-MS/MS 法与已有的方法相比，有以下优点：① 针对性强，可同时测定万古霉素和地高辛的血药浓度；② 分别以去甲万古霉素和地高辛 -d3 作为内标减少基质效应干扰，血样前处理只需采用简单的蛋白沉淀法，与文献报道的液液萃取法和固相萃取法比 [9-10]，样品前处理简单、方便；③ 与文献报道方法相比 [10]，本方法只需要 50 μL 血浆样本，非常适用于儿童患者。

3.3 万古霉素和地高辛血药浓度监测的临床意义探索

脓毒症是一种器官功能障碍类疾病，在临床上并发症较多，可导致多器官衰竭，炎症侵犯到心肌可引发心脏器质性病变，重症脓毒症患者发生心肌抑制的概率可达 50%，是 ICU 死亡原因之一[12]。在儿科重症监护病房（PICU），万古霉素和地高辛常合用于脓毒症伴有心功能障碍的患儿。重症脓毒症患者发生心肌抑制后的病理生理条件已经发生变化，存在血液灌注不足，肝肾功能受损等情况[13-14]，监测万古霉素和地高辛血药浓度可以提高疗效，减少不良反应的发生。

参考文献

[1] 方翔，王锦权，陶小根，等 . 感染性休克引起心肌损伤的临床研究 [J]. 安徽医科大学学报，2019，54（5）：771-775.

[2] 黎洁雯 . 左向右分流型先天性心脏畸形合并肺部感染的临床研究 [J]. 吉林医学，2019，40（7）：1475-1476.

[3] 中华医学会儿科学分会临床药理学组 . 儿童治疗性药物监测专家共识 [J]. 中华儿科杂志，2015，53（9）：650-659.

[4] 秦亚彬，姜锡娟，张古英，等 . HPLC-MS/MS 法同时测定儿童微量血浆中达沙替尼和甲氨蝶呤浓度 [J]. 中南药学，2023，21（9）：2471-2475.

[5] 姜锡娟，秦亚彬，张古英，等 . HPLC-MS/MS 法快速测定儿童微量血浆中甲氨蝶呤和丙戊酸浓度 [J]. 中南药学，2023，21（8）：2101-2105.

[6] 秦亚彬，张古英，孙玉林，等 . 用 HPLC-MS/MS 法测定儿童微量血浆中多种治疗性药物的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2023，39（23）：3469-3474.

[7] Ballotari M，Taus F，Tolle G，et al. Development of a new ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of digoxin and digitoxin in plasma：comparison with a clinical immunoassay [J]. Electrophereis，2022，43：1019-1026.

[8] Guo P，Liang QC，Zheng JT，et al. Simultaneous determination of canrenone，digoxin and tolvaptan by UHPLC-MS/MS：application in heart failure patients [J]. Bioanalysis，2022，12（9）：569-582.

[9] S Keane，G Wallace，C. Munday，etal. Sensitive and robust LC-MS/MS analysis of digoxin in human plasma through optimization of in-source adduct formation [J]. Bioanalysis，2018，10（17）：1401-1411.

[10] 夏颖，龙佳奕，代浩然，等 . LC-MS/MS 法测定人血浆中地高辛的浓度及其在儿童患者中的应用 [J]. 中国药科大学学报，2021，52（6）：719-724.

[11] He N，Su S，Ye ZK，et al. Evidence-based Guideline for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin：2020 Update by the Division of Therapeutic Drug Monitoring，Chinese Pharmacological Society [J]. J Pharm Biomed Anal，2020，23（71）：S363-S371.

[12] 许彬彬 . 重组人脑利钠肽联合左西孟旦治疗重症脓毒症心肌病患者的效果及对 LVEF、LVEDD 水平的影响 [J]. 中国实用医药，2023，18（21）：102-105.

[13] 庄承林，吴伟生，贝朝昌，等 . 米力农联合乌司他丁应用于脓毒症心肌抑制的疗效 [J]. 中国药物经济学，2023，18（11）：66-69.

[14] 尹晓晗，李志亮，胡紫薇，等 . 脓毒症相关急性肾损伤——病例与思考 [J]. 中国实用内科杂志，2023，43（12）：1000-1006.

（收稿日期：2024-01-12；修回日期：2024-03-15）

药事管理

基于政策工具的我国互联网药品政策三维分析

李晓朋，陈巧，武紫静，王玉伟*（北京中医药大学管理学院，北京 100029）

摘要：目的 分析我国互联网药品相关政策文本，为互联网药品领域相关政策的调整与优化提供一定依据。**方法** 检索 1998 年 1 月—2023 年 11 月国务院及相关部委层面发布的有关互联网药品政策文本。采用内容分析法，从三维度对纳入研究的政策文本进行归类、编码与分析。**结果** 本研究共纳入 30 份政策文本，共编码 265 条政策工具。环境型政策工具（58.49%）和供给型政策工具（33.21%）占比较多；监管系统（51.32%）和政治系统（25.66%）受关注较多；利益相关者多聚焦药品监管及政府相关部门（56.60%）和互联网药品生产经营企业（38.49%）。**结论** 提高需求型政策工具的使用频率，协调内部结构均衡性；重视人力、服务、筹资系统使用，调节内外部子模使用比例；关注消费者、仓储物流平台，平衡多方主体需求。

关键词：互联网药品；文本分析法；政策工具；三维分析框架

中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)05-1390-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.045

Three dimension analysis of China’s internet drug policy based on policy tools

LI Xiao-peng, CHEN Qiao, WU Zi-jing, WANG Yu-wei* (*School of Management, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029)

Abstract: Objective To analyze the texts of China’s internet drug-related policies to provide reference for the adjustment and optimization of related policies concerning internet drugs consumption. **Methods** Policy texts on internet medicines issued at the State Council level and related ministries and commissions from January 1998 to November 2023 were retrieved. The included policy texts were categorized, coded and analyzed from three dimensions using content analysis. **Results** Totally 30 policy texts were included, coding a total of 265 policy instruments. Among them highest proportion were environmental policy tools (58.49%) and supply policy tools (33.21%); more attention was paid to the regulation system (51.32%) and the political system (25.66%); and stakeholders focused more on drug regulation and related government departments (56.60%) and internet-based drug manufacturers and operators (38.49%). **Conclusion** We should increase the frequency use of demand-based policy tools and coordinate the internal structural equilibrium; emphasize the systematic use of manpower, service, and finance to regulate the ratio of internal and external sub-model use; and pay attention to consumers, storage, and logistics to balance the needs of multiple actors.

Key words: internet drug; text analysis; policy instrument; three dimension analysis framework

党的十八大以来，互联网行业坚持党的思想领导，实现了一系列突破性进展。党的二十大作出促进数字经济和实体经济深度融合的重要部署，鼓励传统产业依托信息技术开拓互联网营销渠道[1]，为推进国家高质量发展作出行业贡献[2]。我国药品行业也积极顺应时代发展，据不完全统计，2021 年医药电商直报企业销售总额达 2162 亿元（含第三方交易服务平台交易额），占同期全国医药市场总

基金项目：新时代健康观指导下的健康中国建设实施路径研究（No. 22ZDA096）。

作者简介：李晓朋，女，硕士研究生，主要从事药事管理研究，email：18810200298@163.com *通信作者：王玉伟，女，副教授，主要从事药事管理研究，email：wangyuwei1982@126.com

规模的 8.3%[3]。我国在互联网药品监管、资质认定、职能规定等方面出台了多个相关政策，促进医药资源整合，降低医药服务成本，提高保障国民健康效率[4]。但各政策的聚焦点是否能形成合力推动互联网药品健康发展，需要进一步研究。故本研究从政策工具视角出发，分析互联网药品相关政策文本，探讨现有政策体系的聚焦点及仍存在的问题，为互联网药品相关政策补充与调整提供建议。

1　资料与方法

1.1　资料来源

于 2023 年 11 月以“互联网药品”“网上药品”“网上药店”为关键词检索，对搜集到的政策文件进行反复对比研讨，最终确定国务院及相关部委的官方网站及北大法宝信息网站作为检索库。纳入标准规范如下：

① 内容：与互联网药品相关；② 来源：国务院、中央政府及其直属机构；③ 形式：法律、规定、办法、通知、意见等。根据以上标准，经过筛选排除，最终选取与互联网药品主体贴合紧密，研究价值性较高的国家政策文本 30 篇。其中几个重要的政策文件见表 1。

表 1　我国发布的几个重要的互联网药品相关的政策文件

Tab 1　Internet drug-related policy documents issued in China

编号	发文时间	发文字号	政策名称	发布机构
1	1999 年 12 月	国药管市〔1999〕454 号	《处方药与非处方药流通管理暂行规定》	国家药品监督管理局
2	2007 年 12 月	商改发〔2007〕490 号	《商务部关于促进电子商务规范发展的意见》	商务部
3	2016 年 12 月	商秩发〔2016〕486 号	《全国药品流通行业发展规划（2016—2020 年）》	商务部
4	2017 年 11 月	国家食品药品监督管理总局令第 37 号	《互联网药品信息服务管理办法（2017 修正）》	国家食品药品监督管理总局
5	2020 年 4 月	发改高技〔2020〕552 号	国家发展改革委 中央网信办印发《关于推进“上云用数赋智”行动培育新经济发展实施方案》的通知	国家发展改革委、中央网信办
6	2021 年 4 月	国办发〔2021〕10 号	《国务院办公厅关于服务“六稳”“六保”进一步做好“放管服”改革有关工作的意见》	国务院办公厅
7	2023 年 10 月	国家市场监督管理总局令第 84 号	市场监管总局公布《药品经营和使用质量监督管理办法》	国家市场监督管理总局

1.2　研究方法

本文建立互联网药品相关政策分析框架，从三个维度结合补充印证。将编码分类至分析框架，采用 Excel 2010 纳入的文本进行编码、统计分析。

1.2.1　X 维度：基本政策工具维度　本文将互联网药品政策工具划分为供给型、环境型和需求型政策工具三大类[5]。供给型政策工具是指政府或机构采取措施，旨在为行业发展提供基础保障[6]。环境型政策工具是指政策产生的外部渗透作用，对社会产生的环境影响等。需求型政策工具是指通过政策宣传，减少外部环境不利因素，从而形成拉力。互联网药品政策工具分类及其内容见表 2。

表 2　互联网药品政策工具分类及内容解析

Tab 2　Explanation of the categorization and meaning of Internet medicines policy tools

政策工具类型	政策工具名称	具体内容
供给型	基础设施	政府为满足互联网药品需求，加强基础条件配备和标准化建设
	人才培养	政府根据互联网药品的发展需要，健全人才培养体系
	公共服务	政府为保障互联网药品安全开展的配套服务
	信息支持	政府为促进互联网药品，提供信息化技术服务和技术指导等
	资金投入	政府直接对互联网药品、药物流通等提供财力支持
	税收优惠	国家对互联网药品生产经营企业给予减轻或免除税收负担
环境型	策略性措施	有利于促进互联网药品产业发展的实际性措施与手段
	目标规划	政府为满足互联网药品需求制定的发展目标和发展规划
	法规管制	规范互联网药品管理办法，建立不合格的退出和问责机制
	政策宣传	通过政策宣传，营造良好的社会氛围
	资质标准	对行业进行标准化要求
需求型	服务外包	将互联网药品流通任务委托给企业
	交流合作	推动与其他国家或地区合作设立科研机构或项目，进行相关学术交流与合作
	健康服务	整合药品资源，推动消费者选择便捷快速渠道享受健康服务
	组织协同	各地区、各部门统筹协调，共同促进互联网药品行业发展

1.2.2　Y 维度：系统论维度　根据卫生系统的基本原理，可将政策的驱动力分为内部和外部的作用力 [7]。在本文中，内部子模涵盖了监管、人力、服务和筹资系统；而外部子模则包括政治、经济、社会和技术系统。

1.2.3　Z 维度：利益相关者维度　政策制定的成功与否通常取决于对各方需求的综合考虑以及与利益相关者的密切合作 [8]。本文根据互联网药品的特点，将药品监管及政府相关部门、互联网药品生产经营企业、消费者及物流仓储平台纳入 Z 维度进行分析。

根据 X 维度、Y 维度、Z 维度的划分，构建互联网药品政策的三维分析框架，详见图 1。

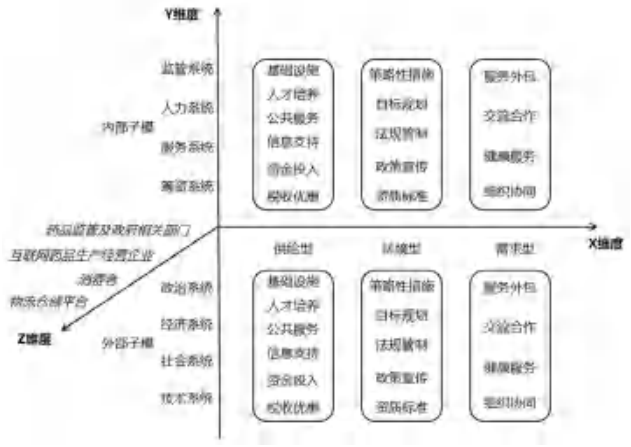

图 1　我国互联网药品政策三维分析框架

Fig 1　Three-dimensional analytical framework for China’s internet drug policy

1.2.4　编码　本文将纳入研究的政策文件逐一按照“政策编号 - 单元编号 - 具体条目编码”进行编码。如 1-3-14 表示第一份文件《处方药与非处方药流通管理暂行规定》中第三章第十四条，对所有政策文件进行梳理分类，共得出 265 条政策编码。

2　结果

2.1　单维分析

X 维度中，可以看出我国互联网药品的政策工具使用有较为明显的偏向性，环境型占比最高，高达 58.49%（155/265），供给型次之，占比 33.21%（88/265），需求型占比最低，仅为 8.30%（22/265）。具体来看，内部二级指标使用也不均衡，详见表 3。

Y 维度分类得出内部子模 159 条（60.00%），外部子模 106 条（40.00%），内、外部子模的八种系统均有涉及，其中监管系统使用最多，占比 51.32%（136/265），经济系统占比最小，仅为 0.75%（2/265），详见表 4。

Z 维度中，药品监管及相关部门和互联网药品生产经营企业两大主体涉及的编码数量超过总数的 90%，而物流仓储平台和消费者主题则涉及极少，详见表 5。

表 3　X 维度工具分布情况

Tab 3　Distribution of X-dimension tools

工具类型	工具名称	频次	占比 /%	合计 [*n*（%）]
供给型	基础设施	30	11.32	88（33.21）
	人才培养	9	3.40	
	公共服务	31	11.70	
	信息支持	14	5.28	
	资金投入	2	0.75	
	税收优惠	2	0.75	
环境型	策略性措施	35	13.21	155（58.49）
	目标规划	9	3.40	
	法规管制	59	22.26	
	政策宣传	6	2.26	
	资质标准	46	17.36	
需求型	服务外包	1	0.38	22（8.30）
	交流合作	7	2.64	
	健康服务	8	3.02	
	组织协同	6	2.26	

表 4　Y 维度系统分布情况

Tab 4　Distribution of Y-dimension tools

一级指标	二级指标	频次	占比 /%	合计 [*n*（%）]
内部子模	监管系统	136	51.32	159（60.00）
	人力系统	8	3.02	
	服务系统	11	4.15	
	筹资系统	4	1.51	
外部子模	政治系统	68	25.66	106（40.00）
	经济系统	2	0.75	
	社会系统	9	3.40	
	技术系统	27	10.19	

表 5　Z 维度主体分布情况

Tab 5　Distribution of Z-dimension tools

利益者相关维度分布	频次	占比 /%
药品监管及政府相关部门	150	56.60
互联网药品生产经营企业	102	38.49
消费者	4	1.51
物流仓储平台	9	3.40

2.2　多维交叉分析

将政策工具维度和系统论维度交叉进行分析，使用最频繁的政策工具子类型为法规管制和资质标准，均属于环境型政策工具，两者涉及的系统论最频繁的维度均为内部子模中的监管系统，详见表 6。

将政策工具维度和相关利益者维度交叉进行分析，使用最频繁的政策工具子类型为法规管制和资质标准，均属于环境型政策工具，两者涉及最频繁的利益相关者为药品监管及政府相关部门和互联网药品生产经营企业，详见表 7。

将系统论维度和相关利益者维度交叉进行分

表 6　X-Y 维度交叉分析频数分布表

Tab 6　Frequency distribution of cross-tabulation analysis of X-Y dimensions

政策工具类型		内部子模				外部子模			
		监管系统	人力系统	服务系统	筹资系统	政治系统	经济系统	社会系统	技术系统
供给型	基础设施	6	0	0	0	18	0	0	6
	人才培养	0	8	0	0	1	0	0	0
	公共服务	8	0	3	1	15	0	1	3
	信息支持	1	0	3	0	7	0	0	3
	资金投入	0	0	0	2	0	0	0	0
	税收优惠	0	0	0	0	0	2	0	0
环境型	策略性措施	23	0	1	0	6	0	2	3
	目标规划	1	0	1	0	7	0	0	0
	法规管制	55	0	0	0	2	0	0	2
	政策宣传	0	0	0	0	0	0	6	0
	资质标准	41	0	0	0	1	0	0	4
需求型	服务外包	0	0	0	0	1	0	0	0
	交流合作	0	0	1	0	3	0	0	3
	健康服务	0	0	1	1	4	0	0	2
	组织协同	1	0	1	0	3	0	0	1

表 7　X-Z 维度交叉分析频数分布表

Tab 7　Frequency distribution of cross-tabulation analysis of X-Z dimensions

政策工具类型		药品监管及政府相关部门	互联网药品生产经营企业	消费者	物流仓储平台
供给型	基础设施	14	11	0	5
	人才培养	5	4	0	0
	公共服务	17	10	3	1
	信息支持	12	1	0	1
	资金投入	2	0	0	0
	税收优惠	2	0	0	0
环境型	策略性措施	27	7	0	1
	目标规划	7	2	0	0
	法规管制	36	23	0	0
	政策宣传	5	1	0	0
	资质标准	8	38	0	0
需求型	服务外包	1	0	0	0
	交流合作	3	3	0	1
	健康服务	5	2	1	0
	组织协同	6	0	0	0

析，使用最频繁的系统论二级指标为内部子模的监管系统和外部子模的政治系统，两者占比超过70%，涉及到频率最高的利益相关者为互联网药品生产经营企业和药品监管及政府部门，详见表 8。

3　讨论

3.1　基本政策工具内外部结构性失衡

我国互联网药品政策的基本政策工具存在结构失衡现象，内部子工具使用结构也出现了非均衡性特征。基本政策工具以供给型和环境型为主。供给型政策是可为企业提供快速、短周期的扶持，但随着公共服务的完善，其效益会逐渐减弱。环境型政策工具存在过溢现象，需以长远规划全面发展该领域[9]。供给型和环境型政策过溢可能挤压需求型政策，三种政策工具在互联网药品领域各有优势，结构失衡不利于政策平稳发展[10]。内部子模工具使用方面，环境型工具中政策宣传工具使用较少，增加此类工具的使用，可更清晰地传递政策意图，提高各主体的理解和信任。供给型工具中，资金投入和税收优惠使用较少，此两者是确保互联网药品平台达到这些合规标准的重要条件[11]。需求型政策工具中，服务外包作为激励互联网药品发展的重要工具，使用频率较少，尚未发挥其应有的作用。

表 8　Y-Z 维度交叉分析频数分布表

Tab 8　Frequency distribution of cross-tabulation analysis of Y-Z dimensions

政策工具类型		药品监管及政府相关部门	互联网药品生产经营企业	消费者	物流仓储平台
内部子模	监管系统	62	73	0	1
	人力系统	4	4	0	0
	服务系统	6	4	0	1
	筹资系统	4	0	0	0
外部子模	政治系统	50	14	4	0
	经济系统	2	0	0	0
	社会系统	8	1	0	0
	技术系统	14	6	0	7

产业政策需优化与改进，一方面要均衡政策工具的使用，即适当减少供给型和环境型政策工具的使用，并且均衡其二级子工具的使用。另一方面要逐步重视需求型政策工具，增加互联网药品行业的创新性和竞争力。互联网的复杂性加之药品的特殊性，使得主体经营难度较大。对此，建议可在借鉴国外成熟的经验和模式的基础上，为生产经营企业提供一定的政策扶持。根据不同发展阶段的生产经营企业主体，制定倾向不同的政策。对于成长期的企业，可通过外包、价格补贴等方式增加需求；对成熟的企业，政府应避免对其过度资助和帮扶，鼓励其积极承担企业责任，给予其足够的发展空间。

3.2　系统论内外部子模使用结构有待优化

数据结果显示，系统论中内外部子模占比差距较大，其内部二级指标的分布也较不平衡。内部子模的监管系统和外部子模的政治系统占比较大，在内部子模中，人力、筹资、服务系统占比较低，可能会增加患者用药的风险[12]，影响消费者选择线上购药的意愿和互联网药品行业的可持续发展。外部子模中，经济和社会系统占比较低。可能会限制企业进行研发和技术创新的能力，影响互联网药品行业的创新水平和行业整体的健康

发展[13]，还有可能导致公众对互联网药品行业的认知不足，增加其对于新兴业务的不信任感。由X-Y维度交叉图分析可知，系统论维度和基本政策工具维度的结论基本相同，可以互相印证。

后续应增加外部子模的使用频次，从而使内外部子模保持相对均衡。内部子模中，监管系统占有较大比例。在未来发展中，建议适当降低监管系统频次，增加其他系统使用频次。首先，推动人力系统的专业发展。可鼓励企业加大在人才培训和招聘方面的投入，倡导企业之间人才共享合作。其次，服务系统直接关系到消费者的体验，提升服务质量将增强用户的信任度。政策制定时应积极鼓励企业对服务系统进行技术升级，建立用户反馈机制，及时了解用户需求，不断改进和完善服务系统。最后，逐步完善筹资系统。政府层面应制定政策引导资本市场对互联网药品企业进行投资，提高筹资多元化途径。推出金融支持政策，鼓励银行和金融机构提供有利于互联网药品企业筹资的融资方案。

3.3 政策工具对利益相关者出现倾斜现象

研究显示，政策文本所涉及的相关利益者数量差异过大，过多关注监管和企业主体，较少关注消费者和物流仓储平台。X-Z维度交叉表分析显示消费者仅涉及公共服务和健康服务，Y-Z维度交叉表显示消费者仅涉及政治系统，可能会导致市场存在潜在的消费者保护问题，例如产品质量、售后服务等方面的缺失，从而影响消费者的用药体验和权益保护[14]。X-Z维度交叉表结果显示物流仓储平台基本未涉及环境型政策工具。Y-Z维度交叉表显示物流仓储平台仅少数涉及监管系统、服务系统以及技术系统。物流仓储平台的有效运转不仅会影响药品的配送速度和安全，同时还影响着数据安全和信息流通。

在保证政府监管部门和生产经营企业的相关政策的同时，应重视消费者和物流仓储平台的角色，确保其在互联网药品体系中的地位得到充分体现。消费者的满意度和信任度直接关系到互联网药品平台的发展。政策应促进提升用户体验，包括网站易用性、信息透明度等方面的提升。在政策制定过程中，可以选择消费者代表参与决策，确保政策更加贴近患者需求。鼓励消费者对互联网药品平台提出意见和建议，增加政策反馈的多元性。物流仓储平台是互联网药品流通中的关键环节，其安全和高效运作直接关系到患者能否及时安全地获得药品。未来政策可引导互联网药品平台建立规范的物流标准，确保药品在整个供应链中的安全有序流通，同时也可通过技术支持政策，鼓励物流仓储平台进行技术创新，提高其信息化水平，最终构建一个更为安全、高效和用户友好的互联网药品发展环境。

参考文献

[1] 惠宁，杨金璇 . 数字经济与文化产业发展的政策梳理及其演进特征分析 [J/OL]. 山西师大学报（社会科学版），https：//doi. org/10.16207/j. cnki. 1001-5957.20231211.004.

[2] 白丽红，薛秋霞，曹薇 . “互联网＋”能驱动传统产业转型升级吗 [J]. 经济问题，2021，499（3）：86-91.

[3] 中华人民共和国商务部 . 2021 年药品流通行业运行统计分析报告 [EB/OL].（2022-09-06）[2023-12-15]. http：//www.mofcom. gov. cn/article/bnjg/202209/20220903345957. shtml.

[4] 刘贵文，陶怡，毛超，等 . 政策工具视角的中国装配式建筑政策文本量化研究 [J]. 重庆大学学报（社会科学版），2018，24（5）：56-65.

[5] 何贤英，孙东旭，王琳琳，等 . “互联网＋”背景下医药电商服务体系构建研究 [J]. 中国卫生事业管理，2021，38（4）：241-243，247.

[6] Smith FM. Industrial innovation and public policy：preparing for the 1980’s and the 1990’s：R. Rothwell and W. Zegveld，Francis Pinter，London（1981），251pp £15.00（hardback）and £6.95（softback）[J]. Long Range Planning，1982，15（2）：133-133.

[7] 赵李洋，胡善菊 . 政策工具视角下我国基本药物政策的文本量化分析 [J]. 中国药房，2020，31（16）：1926-1930.

[8] 范转转，刘园园，姚东明 . 政策工具视角下的我国全科医生政策研究 [J]. 中国全科医学，2018，21（31）：3788-3794.

[9] 孙梦婷，孙思萌，王高玲 . 基于政策工具的我国长期护理保险政策三维分析 [J]. 中国农村卫生事业管理，2019，39（11）：764-769.

[10] 房慧莹，姜可欣，马宏坤，等 . 基于利益相关者理论整合基层医疗卫生服务体系 [J]. 中国卫生经济，2018，37（6）：72-75.

[11] 李鹏利，张宝建，刘晓彤，等 . 国家科技创业政策协调性研究——基于政策工具视角 [J]. 科学管理研究，2021，39（1）：2-10.

[12] 马力，赵姚阳，陈禹铭 . 中国农村人居环境整治政策演变——基于国家宏观政策文本的分析 [J]. 河南科学，2023，41（12）：1850-1857.

[13] 梁红军 . 高水平科技自立自强：内在逻辑、制约因素及实现路径 [J]. 学习论坛，2023（6）：110-117.

[14] 金瑶，钟璐，刘通，等 . 某省医务人员用药风险调查及影响因素分析 [J]. 中国药学杂志，2023，58（10）：939-946.

（收稿日期：2023-11-02；修回日期：2024-02-01）

药物临床试验机构监督检查常见问题及监管建议

杨泽华[1]，李丹[2]，李璟兮[1]，张思维[1]，管志美[1*]（1. 湖南省药品审核查验中心，长沙　410000；2. 中南大学湘雅医院，长沙　410000）

摘要：目的　总结药物临床试验机构在日常监督检查中发现的突出问题，探讨提高监管效能的方法。**方法**　对 2023 年度湖南省药品审核查验中心药物临床试验机构日常监督检查报告进行梳理，针对突出问题做出汇总和分析。**结果**　研究者在研项目过多，项目质量难保证；研究者过度依赖临床协调员，难以正常履行职责；申办方专业水平不强，方案设计能力不足。**结论**　监管部门应根据省内实际情况，加强事中事后监管和风险研判能力，可通过加强法规宣贯，严格依法监管；加强问题处置，实施整改跟踪；加强能力建设，实行动态管理提高对机构的监管能力。

关键词：药物临床试验机构；日常监督检查；监管建议
中图分类号：R194，R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)05-1395-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.05.046

Common problems and suggestions in the supervision and inspection of drug clinical trial institutions

YANG Ze-hua[1], LI Dan[2], LI Jing-xi[1], ZHANG Si-wei[1], GUAN Zhi-mei[1*] (1. *Hunan Drug Inspection Center*, *Changsha* 410000; 2. *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410000)

Abstract: Objective　To summarize the main problems in the daily supervision and inspection of drug clinical trial institutions, and to improve the regulation efficiency. **Methods**　We analyzed the daily supervision and inspection reports from drug clinical trial institutions of Hunan Drug Inspection Center in 2023, and summarized the prominent problems. **Results**　Some research groups had quite many simultaneous projects under research, so the quality of the projects might be difficult to guarantee. Researchers relied too much on clinical research coordinators to perform duties normally. Some sponsors showed poor professionalism and insufficient scheme design ability. **Conclusion**　The regulation department should strengthen the supervision and the risk assessment capacity, and reinforce implementation of laws and regulations. Meanwhile, they need to focus on the problem solving, rectification and tracking. Moreover, they should emphasize capacity building, and dynamically manage the supervision of the institutions.

Key words: drug clinical trial institution; daily supervision and inspection; regulatory supervision and inspection; recommendation

药物临床试验机构的日常管理和试验项目的规范管理、试验记录真实性、可靠性是评价药物临床试验安全有效的关键[1]。随着我国临床试验审评审批制度的改革，我国药品注册监管迎来了前所未有的挑战，也对药物临床试验机构管理提出了更高的标准[2]。目前，我国临床试验日常监管主要参照 2019 年发布的《药物临床试验机构管理规定》和 2020 年修订的《药物临床试验质量管理规范》（GCP）进行[3-4]。近年来，为适应我国医药研发行业的发展，国家药品监督管理局和国家食品药品审核查验中心出台了一系列关于我国临床试验的法规、指导原则和征求意见稿。目前，最新的《药物临床试验机构监督检查办法（试行）》的通告（2023 年第 56 号）于 2024 年 3 月 1

作者简介：杨泽华，男，硕士研究生，主要从事药物临床试验机构监管方面的研究，email：hnsypshcyzx@163.com　***通信作者：**管志美，男，主任药师，主要从事药物临床试验机构监管方面的研究，email：770366320@qq.com

日起实施，《药物临床试验机构监督检查要点和判定原则（征求意见稿）》于 2023 年 7 月 3 日进行大众意见征集[5-6]。新修订的 GCP 和相关法规、指导原则中对临床试验的过程管理要求和可操作性有了很大的提高，管理理念上也与我国临床试验从以往的“认证管理”转变为“加强事中事后管理”模式，更注重加强实施过程中的监督与跟踪管理[7-8]。

1 GCP 机构日常监督检查基本情况

截至 2024 年 1 月 23 日，我省在国家药物临床试验机构备案系统中备案的机构共 67 家，对 2023 年 3 月前备案的 57 家机构抽取 14 家开展日常监督检查，覆盖率为 24.56%。13 家为“基本符合，针对机构、伦理和专业进行整改，整改后符合要求”；1 家为“存在文件制度及标准作业程序（SOP）建立不完善、试验药物管理不到位、备案主要研究者（PI）不符合要求、档案管理不规范等药物临床试验质量管理体系方面的问题，以及伦理委员会存在伦理审查不规范的问题”，核查中心通过函告省局注册处，省局注册处作出处置发函要求该机构“立即停止开展新的药物临床试验，并在 6 个月内完成整改”。

2 现场核查中发现的问题汇总

2.1 机构（含伦理委员会）

主要涉及组织管理部门、文件体系、试验用药品管理、资料管理、伦理审查及临床协调员（CRC）管理等方面。

2.1.1 组织管理部门 一是机构办公室人员配备不足，专职人员较少，尤其是关键岗位由兼职人员担任（如机构秘书、质控员），难以有充足的时间和精力保障药物临床试验机构的日常运行和履行质量控制职责。二是人员任命及备案管理欠规范。比如：机构、伦理委员会的组织架构和人员发生变更，未及时下发任命文件，未及时更新备案信息；未严格审核 PI 资质。三是部分伦理委员会的办公场所及设施设备欠完善。比如，无独立办公场地和资料室，照明设施不能正常工作，打印机和电话未通电等。四是个别伦理委员会的日常管理有待加强。比如：伦理委员档案不完整，仅留存委员的简历和药品临床试验管理规范培训证书，未见执业资格证书、职称证书、学历证书等证明性文件。

2.1.2 文件体系 管理制度及 SOP 仍有待完善，并需及时更新，进一步提高可操作性，尤其关于试验用药品管理、生物样本管理、质量控制、立项管理、伦理审查等方面。比如：一是试验用药品管理方面，麻精药品管理制度欠完善，未建立近效期试验用药品管理等制度及 SOP，GCP 药房领药、转运及回收环节的部分内容与实际操作不一致。二是生物样本管理方面，未建立生物样本采集、处置、保存、转运的 SOP。三是质量控制方面，机构质控 SOP 未明确质控频率及要求，专业质控实际未落实到位。四是立项管理方面，未对合理控制 PI 同期承担临床试验项目数量作出规定。五是伦理审查方面，部分内容未根据实际操作及时修订；受控管理欠规范，主要问题为未进行文件编码、未实施纸张受控、未装订成册、未签批、批准及生效未签字等，个别机构的药物和医疗器械 SOP 共用一套文件编码。

2.1.3 试验用药品管理 部分机构 GCP 药房面积较小，与机构发展水平、所开展临床试验存放药物规模不匹配，试验用药品管理欠规范。比如：不同试验类型、不同品种的试验用药品混放；存放标识信息不完整，通用名相同药品易混淆；个别机构未设置不合格药品区，未设置发药区、合格区、回收区、待验区等功能区。个别机构 GCP 药房防虫、防鼠措施欠完善，视频监控设置区域不合理；试验用药品相关记录内容不完整。比如：药物出入库记录中未记录出入库时间、存放冰箱位置及编号、药物编号等信息；药物接收 / 发放 / 回收记录中未记录存放位置、设备编号等信息；GCP 药房阴凉柜的温湿度未进行完整记录。

2.1.4 资料管理 机构及伦理委员会资料室设施不完善，管理欠规范，主要问题如下：资料室未采取温湿度控制措施，未进行温湿度记录；防潮、防火、防虫、防鼠等措施不到位；资料室未建立归档、借阅及归还等台账；资料借阅未按制度要求进行审批及记录；部分记录未见经手人签字和日期；个别伦理委员会的 GCP 和科研伦理审查资料混放；资料柜未上锁；存在个别项目档案资料缺失的情况。

2.1.5 伦理审查 会议审查实际参会人员不符合制度要求；伦理审查方式的选择未按制度执行；伦理审查相关记录不规范。

2.1.6 CRC 管理 主要问题为机构对专业的 CRC 管理要求有待进一步完善，针对 CRC 在专业组工作开展合规性的院内巡查、督查未形成管理制度及 SOP，未建立巡查 / 督查标准及相关记录。

2.2 专业（含项目）

主要涉及专业组的资质条件、研究人员、文

件体系、试验用药品管理、资料管理和项目运行管理等方面。

2.2.1　资质条件　受试者接待室与主任办公室、医师办公室、护士办公室、GCP 资料室、会议室、生物样本处理室等共用房间，但未建立有关管理制度及 SOP 确保满足受试者知情及随访的需要，未采取措施保证受试者隐私；专业组资料保管条件普遍欠佳。比如：无独立资料室，资料柜放置在科室走廊；资料柜为木质柜，未采取防潮、防鼠等措施；资料存放未采取温湿度控制措施，未进行温湿度记录；临床试验用仪器设备管理有待加强，设备编号、运行状态标识、维护保养台账、使用 / 操作记录、温湿度记录等欠完善，部分存在校准已失效的情况；个别专业组的抢救设备未放置在抢救室。

2.2.2　研究人员　研究人员普遍 GCP 意识欠佳，GCP 相关知识、岗位职责、角色相关管理制度及 SOP 等掌握程度不够，尤其对安全性事件相关概念及法规要求不够熟悉，履职能力有待提高。部分 PI 对所承担临床试验项目的试验方案、研究进度、安全性事件等情况不够了解；个别 PI 同期承担项目数量较多，比如，某肿瘤专业 PI 同时主持在研入组的项目多达 41 项，难以保证有足够的时间实施和完成临床试验；个别 PI 备案专业与执业范围不一致。

2.2.3　文件体系　专业组管理制度及 SOP 欠完善，未及时更新，可操作性有待加强。比如：照抄套搬机构的文件，未建立具有专业特色的制度及 SOP；未建立本专业的临床试验用药品管理、防范和处理突发事件和安全性事件的制度及 SOP；文件未及时按照现行法规要求更新，比如不良事件（AE）定义、严重不良事件（SAE）和可疑且非预期严重不良反应（SUSAR）报告的有关内容；专业组质控方面的制度及 SOP 有待细化，质控频率、节点和例数有待明确；专业组文件体系的受控管理欠规范，培训不到位。比如，未注明页码、无分发记录、无培训计划及记录等。

2.2.4　试验用药品管理　试验用药品与 GCP 资料、常规医疗药物、科研药物、与试验无关的其他切片、临床试验资料等混放；未采取温湿度控制措施、未进行标识、未进行上锁管理等；个别麻醉药品未配备麻精药品双锁储存设备。

2.2.5　项目运行管理　知情同意过程欠充分，知情同意书设计欠完善、签署欠规范。比如：一是知情同意过程欠充分，前后两例受试者知情签署时间间隔极短。二是知情同意书设计欠完善，未明确中途退出受试者的补偿标准和条件，未规定剩余生物样本处理方式。三是知情同意书签署欠规范，部分受试者未签署更新后的知情同意书版本。

签署的知情同意书中受试者相关信息填写不完整，与研究药物相关性判定不合理，依据不充分。比如：一是 AE 前后两次判定不一致，且未注明原因，判定不合理。二是 AE 为项目已知的不良反应，判定为与研究药物无关，依据不充分。

方案偏离未进行报告。比如：一是受试者未按方案要求服药。二是试验用药品曾出现超温，未见稳定性研究报告。三是 AE 漏记情况。比如：随访期实验室检查结果异常，研究者判断有临床意义（CS），未记录 AE；用药后出现高血压，研究者报告“新发病症”，未记录 AE。

分工授权欠规范。比如：授权时间早于方案培训时间，未按照各角色的职责范围进行授权管理，未及时结束授权等。

试验记录的规范性和完整性有待加强。比如：一是门诊病历方面，漏服药物次数与日记卡记录不一致、未记录患者主诉、受试者随机时间记录有误、知情同意仅记录结束时间未记录开始时间、合并用药漏记及记录不规范。二是试验用药品相关记录中，返还次数记录有误，回收数量未签字确认。三是生物样本相关记录中，未见表格编码及分发编号；未记录样本采集量；未记录离心机及冰箱编号；处理、冷冻、寄样等未见复核；转运未记录样本类型。

3　问题原因分析

3.1　研究者在研项目过多，项目质量较难保障

部分医院同时开展项目最多的研究者在研项目 53 个。2020 年 7 月新修订的《药物临床试验管理规范》要求：研究者在临床试验约定的期限内有足够的时间实施和完成临床试验。在临床试验期间，由于申办方聘用大量人员协助研究者开展试验项目，并开展多次监查、稽查，因此，在形式上，研究者一般都可在同期开展多项临床试验项目，但在项目实际运行过程中研究者是否有精力管理如此多的项目存在一定质量风险。

3.2　研究者过度依赖 CRC，难以正常履行职责

研究者依赖申办方提供的 CRC、临床监察员（CRA），没有完全履行药物研究中研究者的职责，比如没有开展质控、对所负责的项目基本情况不熟悉、电子病历报告（eCRF）完全由 CRC 代替输入数据，没有签名审核等。

3.3 质控方式的形式多样，难以保证效果

一是线上建群进行质控，易泄露受试者隐私，部分机构为了提高质控效率，采取建立微信群、QQ 群的模式进行质控，受试者的疾病记录、化验数据等照片，患者的名字、性别、住址等数据群里人员都可见，受试者隐私难以保证。二是部分机构质控文件规定比较粗糙，不具体，难以保证质控的有效性。三是部分机构开展信息化建设过程中，工作衔接不科学，质控记录原始档案不规范。

3.4 申办方专业水平不强，方案设计能力不足

试验方案设计不完善、不细致，存在可操作性差或者表述不清晰容易引起歧义等问题。监察能力不足，未能及时发现临床试验过程中的问题，并进行调整和修正；申办方只关注临床试验进度，不重视试验记录的受控管理，导致原始数据可靠性和完整性较差，容易出现各种规范性问题甚至真实性问题；申办方的受试者权益保护意识不足。

4 临床试验机构监管建议

4.1 加强法规宣贯，严格依法监管

全面落实新发布的《药物临床试验机构监督检查办法（试行）》《药物临床试验机构监督检查要点及判定原则（试行）》要求，加强相关法规及技术指导原则的宣贯，强化临床试验机构的主体责任意识及研究者的质量意识，规范临床试验机构的备案管理，严格专业和项目的质量管理[9-10]。

4.2 加强问题处置，实施整改跟踪

强化对发现问题的分类处置，严格整改材料的审核，形成整改闭环。针对能够立即完成整改的问题，跟踪整改后相关环节运行情况，形成反馈评价机制；针对不能立即完成整改的问题，跟踪是否按照整改计划推进实施，加强整改督办。以风险为导向，分类管控，压实整改责任[11-12]。

4.3 加强能力建设，实行动态管理

一是加强专职 GCP 检查员继续教育培训，有针对性地设置培训课程，提高培训精准度，构建分级培训体系。二是加强国家级和省级 GCP 检查员信息管理，建立准入与退出、调配使用及考核评价等机制，进一步规范 GCP 检查员履职，对未完成规定检查次数的检查员实施淘汰机制，实行动态管理，确保能进能出。三是加强专职、兼职 GCP 检察员组合配对，从不同专业背景、不同角度把关药物临床试验项目安全可靠运行[13]。

参考文献

[1] 徐萍，徐涛，周旋，等 . 新形势下药物临床试验机构管理实践与探索 [J]. 中国医院，2023，27（8）：92-94.

[2] 谭琴，邱攀博，李高扬，等 . 药物临床试验机构质量管理现状调查分析 [J]. 医药导报，2023，42（12）：1884-1889.

[3] 国家药品监督管理局 . 国家药监局 国家卫生健康委关于发布药物临床试验机构管理规定的公告（2019 年第 101 号）[EB/OL].（2023-11-03）[2024.01-02]. https：//www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa////xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20191129174401214.htm.

[4] 国家药品监督管理局 . 国家药监局 国家卫生健康委关于发布药物临床试验质量管理规范的公告（2020 年第 57 号）[EB/OL].（2023-11-03）[2024.01-02]. https：//www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggtg/20200426162401243.html

[5] 国家药品监督管理局 . 国家药监局关于发布《药物临床试验机构监督检查办法（试行）》的通告（2023 年第 56 号）[EB/OL].（2023-11-03）[2024.01-02]. https：//www.nmpa. gov. cn/xxgk/fgwj/xzhgfxwj/20231103175749117.html.

[6] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心 . 关于公开征求《药物临床试验机构监督检查要点和判定原则（征求意见稿）》意见的通知 [EB/OL].（2023-07-03）[2024-01-02]. https：//www. cfdi. org. cn/resource/ news/15515. html.

[7] 李迎春，李英，高成璐，等 . 药物临床试验机构对临床试验质量控制的实践 [J]. 临床医药文献电子杂志，2020，7（38）：190.

[8] 钟绍金，杨莹，程亮，等 . 海南省药物临床试验机构建设现状分析 [J]. 中国新药与临床杂志，2022，41（9）：529-534.

[9] 杨雅莉，李娟 . 备案制后四川省药物临床试验机构现状分析 [J]. 中国药事，2021，35（9）：988-993.

[10] 宁靖，吴昊，高荣 . 药物临床试验机构备案要求及常见问题分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（1）：3-7.

[11] 房虹，樊琦，王欣，等 . 中国药物临床试验机构备案情况分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（4）：458-460，483.

[12] 侯艳，赵卿 . 药物临床试验进程中常见问题分析及措施 [J]. 实用临床护理学电子杂志，2019，4（38）：123.

[13] 高荣，宁靖，王安娜，等 . 从药物临床试验数据核查看药物临床试验机构的职责履行情况 [J]. 中国新药杂志，2019，28（20）：2518-2523.

（收稿日期：2023-09-02；修回日期：2023-11-05）

S·T·M
WJCI
WORLD JOURNAL CLOUT INDEX

科技期刊世界影响力指数（WJCI）报告（2022）

收录证书

This is certificate for

中南药学

（ISSN 1672-2981　CN 43-1408/R）

to be indexed in

World Journal Clout Index(WJCI) Report of Scientific and Technological Periodicals(2022)

项目联合研发单位 Project research units：

中国科学技术信息研究所Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition) Electronic Publishing House Co.Ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

中国科学技术期刊编辑学会 China Editology Society of Science Periodicals

DMT 7500 二维液相色谱微型质谱仪

血药浓度利器 门诊化床旁化质谱系统

可移动至临床科室　反应速度快，工作曲线长期稳定　极简样品处理

湖南德米特仪器有限公司成立于2014年12月，是一家致力于自动化色谱与质谱生产、二维色谱柱体系研制、生物测定方法提供以及临床药物检测整体化方案设计的高新技术企业。公司历经数年研发，掌握色谱与质谱控制性技术，持续进行尖端临床色谱质谱技术研制。

DMT 7500 拥有高稳定的质谱分析能力，测定种类含括 250 多种药物；并具备仪器、色谱柱、试剂、质控完整的医械与 IVD 资质，符合我国 2018 年颁布的《医疗器械分类目录》中的要求。

DMT 7500 微型化机身对实验室占地更加友好，移动式机身让床旁化快速测定成为可能；DMT 7500 具备 30min 冷开机发放首报告的快速反应能力，是门急诊 TDM 项目开展的首选利器！

- 关键流动相产品标准化
- 质量体系：质控校准品溯源体系标准化
- 高端自动化技术
- 高效能测定能力
- 床旁化测定技术
- 专利核心技术
- 全面合规产品系统

Demeter 德米特®

湘械广审（文）第260202－23163号
官方网站：https:// www.hndemeter.com
服务热线：4000-176-898　董经理：137-8718-7146
电子邮箱：market@anax.com.cn
版本号：2024.05.06

德米特公众号

国内统一刊号：CN 43-1408/R　广告经营许可证：4300004000764　邮发代号：42-290　定价：30.00元/册