中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 22 卷　第 11 期（总第 226 期）　2024 年 11 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

湖南省科学技术协会

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

（2837）PR 结构域在 PRDM16 抑制结直肠癌迁移中的作用研究 …… 杨锦燮，张隽，谌倩芸，等

（2846）人参归脾丸防治环磷酰胺化疗胃肠道反应的实验研究 …… 吕英楠，田颖颖，刘闯，等

（2851）南五味子二氯甲烷部位化学成分结构鉴定及对 HepG2 和 INS-1 细胞的影响 …… 冯石卜，王娇娇，姜祎，等

（2858）南五味子多糖对高糖损伤 INS-1 细胞及糖尿病小鼠的改善作用 …… 王娇娇，康惠丽，冯石卜，等

（2864）食消饮改善食积小鼠的药效作用研究 …… 何维维，方晓洋，郭麦平，等

（2871）基于网络药理学及体外实验探讨过氧麦角甾醇对非小细胞肺癌 A549 细胞的作用机制 …… 任文康，罗然，王璐，等

（2880）载葛根素的 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体的制备及其对心肌缺血 / 再灌注损伤的影响研究…… 胡雄彬，李风梅，李胜男，等

（2888）全自动二维液相色谱测定人血清中阿普唑仑浓度及其临床应用 …… 谢小华，欧玮，何纯莲，等

（2893）鸭跖草药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的特征图谱相关性研究及量值传递分析 …… 江斌，梁素仪，蔡小兵，等

（2899）清热消炎宁对急性咽炎大鼠模型的抗炎作用 …… 肖文喜，扶丽君，朱红霖，等

（2905）华中前胡香豆素类化学成分研究… 杨琳媛，朱晗，齐佳萌，等

（2909）五味珍菊片对小鼠化学性肝损伤的辅助保护作用 …… 韦雯怡，刘源焕，谭安蔷，等

（2914）霍山石斛内生真菌 *Trichoderma* sp. 次生代谢产物研究 …… 孙露萍，王举涛，程耀堂

（2919）辛伐他汀对阿霉素诱导的心脏毒性大鼠的保护机制研究 …… 李风梅，白春强，郝长来，等

（2926）槲皮素固体分散体的制备及其用于治疗 2 型糖尿病的研究 …… 陈敏，窦志华

（2932）源内裂解 HPLC-MS/MS 法快速测定造血干细胞移植患儿微量血浆中泊沙康唑和苯妥英浓度 …… 姜锡娟，冯璇，秦亚彬，等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编（按姓氏笔画排列）

王　玉　向大雄　刘　韶　刘芳群
孙国祥　孙铁民　苏薇薇　张毕奎
范国荣　赵志刚　原永芳　潘卫三

编委（按姓氏笔画排列）

丁劲松　于海洋　马恩龙　王　玉
王　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　睢大筵　肇丽梅
翟　青　黎　敏　颜　苗　潘卫三
魏高文

（2937）甜梦口服液对利培酮所致糖脂代谢及内分泌紊乱的作用与机制研究 …… 刘恺，夏清荣，梁俊，等

（2943）两种糖尿病肾病大鼠模型的特点及差异研究 …… 郑晓春，邢瀚文，印艳萍，等

（2950）苦瓜提取物改善柴油尾气颗粒暴露诱导的小鼠糖脂代谢紊乱 …… 唐翎，张婷，肖玲芳，等

（2957）阿莫西林克拉维酸钾不同配比不同剂型的药代动力学研究 …… 万妮莎，张志儒，石禹阳，等

蒙药传统汤散剂剂型改良研究专题

（2962）蒙药闹羊花配方颗粒指纹图谱及含量测定研究 …… 胡恒，王阳，李佳慧，等

（2969）基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定结合化学计量学的蒙药山柰配方颗粒质量评价研究 …… 田闵元，刘梦，韩子璇，等

药品说明书适老化研究专题

（2976）北京地区 737 例老年患者药品说明书阅读问题调研及适老化探讨 …… 鲁秀玲，闫阔，樊栓成，等

（2982）北京地区老年慢性病患者家庭药箱现状及居家药学服务需求调查 …… 国警月，金伟，郭晨阳，等

中药资源开发与利用

（2988）大黄的本草考证…… 郭权，王艳，徐世博，等

药物分析与检验

（2994）炙黄芪多糖的酶解产物指纹图谱构建与化学模式识别分析 …… 李亚栋，赵颖，尚奥丽，等

（3000）UPLC-MS/MS 法测定半夏中根茎膨大剂的残留 …… 徐丹洋，张金星，姚奕然，等

（3006）基于超高效液相色谱 - 质谱指纹图谱及多指标成分含量测定的芦笋质量评价研究 …… 窦传浩，张秋红，张会敏

（3014）基于标准汤剂的麸木香配方颗粒质量标准研究 …… 吴美兰，包世寅，黄红霞，等

（3021）UPLC-MS/MS 法检测定量干血斑中三种抗真菌药物 …… 厉圣斌，刘博宇，姚婉清，等

（3026）抗菌消炎片（胶囊）的 HPLC-DAD-CAD 指纹图谱研究 …… 贾银芝，吴琦，杜月莹，等

（3031）HPLC 法同时测定盐酸丙卡特罗口服溶液中主成分及 3 种抑菌剂的含量 …… 蔡琴，高秀容，程智，等

（3036）固肾定喘丸气相色谱指纹图谱及多成分含量测定研究 …… 程宏辉，江涛，陈丽斯，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。

综述

（3041）天然有机硫化物蒜氨酸抗动脉粥样硬化研究进展 … 尤强，唐媛媛
（3045）中药干预糖尿病血管内皮功能障碍的研究进展 …… 郭万慧，韩超，李小龙，等
（3051）兰尼碱受体在阿尔茨海默病中作用机制的研究进展 …… 史婷，尹莉芳，秦超
（3058）炎症性肠病合并微量营养素缺乏的支持治疗的研究进展 …… 王佳惠，李佳桦，徐佳强
（3062）基于中西医临床病证特点的乳腺增生动物模型研究进展 …… 王召，曹利华，贺红娟，等
（3069）核孔复合物在肿瘤发生发展中的作用研究现状 … 余思琪，袁胜涛

医院药学

（3076）ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌内分泌治疗联合靶向治疗方案的定量评估：基于模型的 meta 分析…… 潘美羽，林妍，杨劲
（3086）我院妇科抗肿瘤药物超说明书用药分析及循证评价 …… 张芸婷，郭静，沈甫明，等
（3091）奥美拉唑原研组和带量采购组在幽门螺杆菌感染根治中疗效、安全性及经济性分析 …… 钱巧，张宁，朱恒波，等
（3096）多黏菌素 B 相关急性肾损伤的危险因素分析 …… 王清，李颖，唐甜甜，等
（3103）门诊癌痛患者止痛药服药依从性影响因素探究及预测模型构建 …… 陆维，宋沧桑，孙蕾，等

临床药师在临床

（3108）临床药师参与 1 例全胃切除术后吸收及消化不良患者的药学实践 …… 高雯雯，尹雁惠，张翔
（3111）临床药师参与肿瘤患者围手术期全营养混合液中脂肪乳诱导血小板减少伴血栓的药学监护 …… 周琴，潘晓锋

中药与临床

（3115）基于方证相应理论探讨四逆散现代临床应用 …… 宋姗姗，黄博臻，王亮，等

药品不良反应

（3120）1 例尿毒清颗粒致肝功能损伤的病例分析 …… 梅玲，周后凤
（3123）β- 内酰胺类抗菌药物交叉过敏致药物超敏反应综合征 1 例 …… 龙靓，刘湘，胡毅翔

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*290*zh*P*30.0*49*2024-11

本期责任编辑：李科，陆窈窈，彭金飞，邬志娟

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 11 November 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

(2837) Effect of PR domain on the anticancer activity of PRDM16 in colorectal cancer cells ····· *YANG Jin-xie, ZHANG Jun, CHEN Qian-yun, et al*

(2846) Prevention and treatment of cyclophosphamide-induced gastrointestinal reaction by Renshen Guipi pills ····· *LYU Ying-nan, TIAN Ying-ying, LIU Chuang, et al*

(2851) Structural identification of chemical constituents in the dichloromethane part of Schisandra sphenanthera and their effects on HepG2 and INS-1 cells ····· *FENG Shi-bo, WANG Jiao-jiao, JIANG Yi, et al*

(2858) Amelioration of Schisandra sphenanthera polysaccharides on high glucose-induced damage in INS-1 cells and diabetic mice ····· *WANG Jiao-jiao, KANG Hui-li, FENG Shi-bo, et al*

(2864) Pharmacological effect of Shixiao decoction on mice with food retention ····· *HE Wei-wei, FANG Xiao-yang, GUO Mai-ping, et al*

(2871) Mechanism of ergosterol peroxide on non-small cell lung cancer A549 cells based on network pharmacology and in vitro experiment ····· *REN Wen-kang, LUO Ran, WANG Lu, et al*

(2880) Preparation of TPP cation/MMP peptide bimodified liposomes loaded with puerarin and its effects on myocardial ischemia/reperfusion injury ····· *HU Xiong-bin, LI Feng-mei, LI Sheng-nan, et al*

(2888) Determination of alprazolam concentration in human serum by automatic two-dimensional liquid chromatography and its clinical application ····· *XIE Xiao-hua, OU Wei, HE Chun-lian, et al*

(2893) Correlation between characteristic spectrum and quantitative value transfer analysis of Commelina communis and its decoction pieces, standard decoction and formula granules ····· *JIANG Bin, LIANG Su-yi, CAI Xiao-bing, et al*

(2899) Anti-inflammatory effect of Qingre Xiaoyanning on acute pharyngitis rat model ····· *XIAO Wen-xi, FU Li-jun, ZHU Hong-lin, et al*

(2905) Coumarins in *Peucedanum medicum* Dunn ····· *YANG Lin-yuan, ZHU Han, QI Jia-meng, et al*

(2909) Auxiliary protective effect of Wuwei Zhenju tablets on chemical induced liver injury in mice ····· *WEI Wen-yi, LIU Yuan-huan, TAN An-qiang, et al*

(2914) Secondary metabolites of endophytic fungus *Trichoderma* sp. in *Dendrobium huoshanense* ··· *SUN Lu-ping, WANG Ju-tao, CHENG Yao-tang*

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.

(2919) Protective mechanism of simvastatin on cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats …… *LI Feng-mei, BAI Chun-qiang, HAO Chang-lai, et al*

(2926) Preparation of quercetin solid dispersion and its application in type 2 diabetes mellitus …… *CHEN Min, DOU Zhi-hua*

(2933) Rapid determination of posaconazole and phenytoin in trace plasma of children with hematopoietic stem cell transplantation by HPLC-MS/MS with in-source collision-induced dissociation …… *JIANG Xi-juan, FENG Xuan, QIN Ya-bin, et al*

(2937) Effect and mechanism of Tianmeng oral liquid on glucose and lipid metabolism and endocrine disorders induced by risperidone …… *LIU Kai, XIA Qing-rong, LIANG Jun, et al*

(2943) Characterization and differences of two rat models of diabetic nephropathy …… *ZHENG Xiao-chun, XING Han-wen, YIN Yan-ping, et al*

(2950) Effect of *Momordica charantia* (Bitter melon) extract on glucose and lipid metabolism disorder induced by diesel exhaust particles in mice …… *TANG Ling, ZHANG Ting, XIAO Ling-fang, et al*

(2957) Pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanate potassium at different proportions and dosage forms …… *WAN Ni-sha, ZHANG Zhi-ru, SHI Yu-yang, et al*

(2963) Fingerprint and content determination of Mongolian medicine Rhododendri Mollis Flos formula granules …… *HU Heng, WANG Yang, LI Jia-hui, et al*

(2969) Quality evaluation of Mongolian traditional medicine Kaempferia formula granules based on HPLC fingerprint and multi-component content determination combined with chemometrics …… *TIAN Min-yuan, LIU Meng, HAN Zi-xuan, et al*

(2977) Survey of problem in reading drug instructions in elderly patients and age-friendly modifications …… *LU Xiu-ling, YAN Kuo, FAN Shuan-cheng, et al*

(2982) Survey of current home medicine cabinets and pharmaceutical service needs among elderly patients with chronic diseases in Beijing …… *GUO Jing-yue, JIN Wei, GUO Chen-yang, et al*

(2988) Decipherment of ancient literatures about rhubarb …… *GUO Quan, WANG Yan, XU Shi-bo, et al*

(2994) Fingerprints and chemical pattern recognition of enzyme hydrolysates of honey-processed Astragali Radix polysaccharides …… *LI Ya-dong, ZHAO Ying, SHANG Ao-li, et al*

(3000) UPLC-MS/MS determination of rhizome expanders residues in *Pinellia sinensis* …… *XU Dan-yang, ZHANG Jin-xing, YAO Yi-ran, et al*

(3006) Quality evaluation of asparagus by UPLC-MS fingerprints and multi-component content determination …… *DOU Chuan-hao, ZHANG Qiu-hong, ZHANG Hui-min*

(3014) Quality standard of bran *Radix Aucklandiae* formula granules based on standard decoction …… *WU Mei-lan, BAO Shi-yin, HUANG Hong-xia, et al*

(3021) **Quantification of three antifungal drugs in dry blood spots by UPLC-MS/MS** ····· *LI Sheng-bin, LIU Bo-yu, YAO Wan-qing, et al*

(3026) **HPLC-DAD-CAD fingerprints of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules)** ····· *JIA Yin-zhi, WU Qi, DU Yue-ying, et al*

(3031) **Simultaneous determination of the main components and three preservatives in procaterol hydrochloride oral solution by HPLC** ····· *CAI Qin, GAO Xiu-rong, CHENG Zhi, et al*

(3036) **Gas chromatography fingerprint and multi-component content determination of Gushen Dingchuan pills** ····· *CHENG Hong-hui, JIANG Tao, CHEN Li-si, et al*

(3041) **Research progress in anti-atherosclerosis property of natural organic sulfide alliin** ····· *YOU Qiang, TANG Yuan-yuan*

(3045) **Research progress in traditional Chinese medicine intervention on vascular endothelial dysfunction in diabetes** ····· *GUO Wan-hui, HAN Chao, LI Xiao-long, et al*

(3051) **Research progress in the mechanism of Ryanodine receptors in Alzheimer's disease** ····· *SHI Ting, YIN Li-fang, QIN Chao*

(3058) **Supportive treatment for inflammatory bowel disease combined with micronutrient deficiency** ····· *WANG Jia-hui, LI Jia-hua, XU Jia-qiang*

(3062) **Animal model of hyperplasia of mammary glands based on clinical characteristics of traditional Chinese medicine and Western medicine** ····· *WANG Zhao, CAO Li-hua, HE Hong-juan, et al*

(3069) **Research status of the role of nuclear pore complexes in tumor occurrence and development** ····· *YU Si-qi, YUAN Sheng-tao*

(3076) **Quantitative evaluation of combination of targeted therapy regimens and endocrine therapy for ER + /HER2 − metastatic breast cancer: a model based meta-analysis** ····· *PAN Mei-yu, LIN Yan, YANG Jin*

(3086) **Evidence-based evaluation of off-label use of antineoplastic drugs in the Gynecology Department in a hospital** ····· *ZHANG Yun-ting, GUO Jing, SHEN Fu-ming, et al*

(3091) **Efficacy, safety and economic analysis of omeprazole original drug and the volume-based procurement drug in the eradication of *Helicobacter pylori* infection** ····· *QIAN Qiao, ZHANG Ning, ZHU Heng-bo, et al*

(3096) **Risk factors for polymyxin B related acute kidney injury** ····· *WANG Qing, LI Ying, TANG Tian-tian, et al*

(3103) **Factors influencing analgesic compliance of outpatients with cancer pain and construction of prediction model** ····· *LU Wei, SONG Cang-sang, SUN Lei, et al*

研究论文

PR 结构域在 PRDM16 抑制结直肠癌迁移中的作用研究

杨锦燮[1, 2]，张隽[3]，谌倩芸[1, 2]，杨芝春[1, 2*]，向跃芸[4*]（1. 中南大学湘雅药学院药理学系，长沙 410078；2. 湖南省心血管研究重点实验室，长沙 410078；3. 中南大学湘雅三医院肿瘤科，长沙 410013；4. 湖南省妇幼保健院检验科，长沙 410003）

摘要：目的 探究 PRDM16 及其 PR 结构域在结直肠癌增殖迁移中的作用。**方法** 应用 TCGA 数据库和生物信息学分析总 *PRDM16*（*tPRDM16*）与结直肠癌的相关性；免疫组化及 PCR 检测结直肠癌组织中 PRDM16 表达；Western blot 检测结直肠癌细胞株中 PRDM16 本底表达水平，然后在高表达株敲低结肠癌细胞株中总 *tPRDM16*，在低表达株中分别过表达全长 *PRDM16*（*fPRDM16*）与短型 *PRDM16*（*sPRDM16*），然后通过 CCK8、平板克隆实验以及划痕实验、Transwell 迁移实验检测 *fPRDM16* 与 *sPRDM16* 对结直肠癌细胞增殖和迁移能力的影响。**结果** 生信分析结果显示，总 *tPRDM16* 水平（包括 *fPRDM16*、*sPRDM16*）是结直肠癌的危险因素，也是免疫检查点抑制剂疗效的预测因素。临床研究结果显示，与正常组织相比，tPRDM16、fPRDM16 和 UCP1 在结直肠癌组织中高表达，且 *UCP1* mRNA 水平与 *fPRDM16*、*sPRDM16* mRNA 均成正相关。敲低 SW480 细胞中 *PRDM16*，发现 *tPRDM16* 与 *fPRDM16* 皆下调，伴细胞迁移能力下降，但对细胞增殖并无明显影响。在 HCT116 细胞中进行 *fPRDM16* 过表达则可抑制肿瘤细胞迁移，伴线粒体解偶联蛋白 UCP1 的蛋白表达水平升高；而过表达 *sPRDM16* 则可降低 UCP1 蛋白水平且促进细胞迁移。进一步研究发现，敲低 *UCP1* 可促进 HCT116 细胞的迁移。**结论** PR 结构域是 *PRDM16* 抑制结直肠癌迁移的功能结构域，其机制可能与维持 UCP1 蛋白的正常表达水平有关。

关键词：结直肠癌；PRDM16；PR 结构域；UCP1
中图分类号：R96，R735.34 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2837-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.001

Effect of PR domain on the anticancer activity of PRDM16 in colorectal cancer cells

YANG Jin-xie[1, 2], ZHANG Jun[3], CHEN Qian-yun[1, 2], YANG Zhi-chun[1, 2*], XIANG Yue-yun[4*] (1. *Department of Pharmacology*, *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410078; 2. *Hunan Key Laboratory of Cardiovascular Research*, *Changsha* 410078; 3. *Department of Oncology*, *the Third Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410013; 4. *Department of Clinical Laboratory*, *Hunan Maternal and Child Healthcare Hospital*, *Changsha* 410003)

Abstract: Objective To determine the effect of PRDM16 on the proliferation and migaration of colorectal cancer (CRC) cells and the role of PR domain in the anti-migaration effect of *PRDM16*. **Methods** The relationship between total *PRDM16* (*tPRDM16*, including two isoforms *fPRDM16* and *sPRDM16*) and CRC was analyzed with TCGA database and bioinformatics. The expression of *PRDM16* protein was detected by immunohistochemistry or PRC Western blot, and then was knocked

基金项目：国家自然科学基金（No. 81673491）；湖南省自然科学基金（No. 2022JJ30792）；湖南省妇幼保健院锐新培育计划（No. 2021RX14）。

作者简介：杨锦燮，女，硕士研究生，主要从事药理学研究，email：y719442926@126.com *通信作者：杨芝春，女，教授，博士研究生导师，主要从事药理学研究，email：yzhichun@126.com；向跃芸，女，副主任技师，主要从事肿瘤标志物相关检测和血栓与止血研究，email：xiangcarrie@163.com

down in SW480 cells, and over-expressed full-length *PRDM16* (*fPRDM16*) or short *PRDM16* (*sPRDM16*) in HCT116 cells respectively. CCK8, wound healing assay, colony formation assay and transwell migration assay were used to determine the proliferation and migration of CRC cells. **Results** Bio-informatics analysis showed that *tPRDM16* level might be considered as both a risk factor for CRC and a predictive factor for treatment with immune checkpoint inhibitors. Clinical studies showed that *tPRDM16*, *fPRDM16* and *UCP1* expressions were all high in CRC tissues, and *UCP1* mRNA was positively correlated with both *tPRDM16* and *fPRDM16*. In vitro experiments showed that down-regulation of *tPRDM16* via shRNA interference inhibited the migration of SW480 cells but didnot affect the proliferation. It was observed that over-expression of *fPRDM16* inhibited the migration of HCT116 cells, while over-expression of short *PRDM16* (*sPRDM16*) promoted the migration. Over-expression of *fPRDM16* also up-regulated *UCP1* expression, while over-expression of *sPRDM16* decreased *UCP1* level in HCT116 cells. Moreover, the knockdown of *UCP1* promoted the migration of HCT116 cells. **Conclusion** PR domain is the functional domain of PRDM16 protein in inhibiting the migration of colorectal cancer, whose mechanism may be related to maintaining the normal expression of UCP1 protein.

Key words: colorectal cancer; PRDM16; PR domain; UCP1

结直肠癌（colorectal cancer，CRC）是常见的消化道肿瘤，死亡率很高[1]。除局部原发肿瘤可采用手术治疗外，临床上治疗往往采用细胞毒性化疗药物（5-氟尿嘧啶、伊立替康、奥沙利铂等）、抗血管内皮生长因子（VEGF）的药物（贝伐单抗、拉穆单抗等）和抗表皮生长因子受体（EGFR）药物（西妥昔单抗、帕尼单抗）等进行治疗[2]。这些药物虽然延长了患者的总生存期和无病生存期，但存在不良反应多，患者耐受性差且易耐药等问题，因此，寻找新的分子靶点对相关药物开发至关重要。

PR/SET 结构域（*PRDM*）基因家族编码 19 种不同的转录因子，包含一个保守的 N 端 PR 结构域，具有潜在的甲基转移酶活性和可变数量的锌指重复序列[3]。*PRDM* 在控制细胞增殖和分化的信号传导中发挥重要作用，并且 PR 结构域的存在可能使 PRDM 蛋白具有抗肿瘤潜能[4]。人 *PRDM16* 基因是 *PRDM* 家族的一员，位于 1 号染色体上，编码一种含有 1242 个氨基酸的蛋白，该蛋白含有一个 N 端 PR 结构域和其他结构域（包括锌指结构域、脯氨酸结构域和抑制结构域）[5]，称为全长 *PRDM16*（*fPRDM16*）。*PRDM16* 可以通过选择性剪接表达不同分子形式的蛋白质，在人类中有两种主要的亚型：一种是含有 PR 结构域（外显子 1-5 位）的全长 *PRDM16*（*fPRDM16*），分子量为 170 kDa（体外分析为 140 kDa）；另一种是缺乏 PR 结构域的短型 *PRDM16*（*sPRDM16*），分子量为 150 kDa（体外分析为 120 kDa）[6-7]。选择性剪接最终得到的多种蛋白产物，可能呈现相同或者不同的功能特性。

目前对于 *PRDM16* 的研究主要着眼于其对产热脂肪形成的调控，现已证明 *PRDM16* 是控制多种前体细胞向产热脂肪分化的关键分子，具有产热耗能减轻体重的作用[8]。但是，在肿瘤研究领域，*PRDM16* 的作用却颇有争议：在急性髓性白血病、前列腺癌和胃癌中，*PRDM16* 的高表达提示预后不良[9-12]，但在肺癌和肾细胞癌中，*PRDM16* 起抑制肿瘤作用[13-14]。这种矛盾产生的机制目前尚不清楚。有研究报道 *PRDM16* 的两种选择性剪切异构体 *fPRDM16* 与 *sPRDM16* 在血液 / 造血系统中作用不一致：*sPRDM16* 可诱导急性髓系白血病和 T 细胞白血病[7, 15-17]，而 *fPRDM16* 的存在对于维持正常造血干细胞功能至关重要[18]。这项研究表明 PR 结构域的存在与否决定 *PRDM16* 影响血液系统肿瘤预后的能力。尽管文献表明 *PRDM16* 是肠道代谢的关键转录调节因子[19]，但其对肠道肿瘤有何影响目前并不清楚。因此，本研究拟通过生信分析、临床研究及细胞实验等探究 PRDM16 的两种亚型对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响。

1 材料

结直肠癌细胞系购自中国典型培养物保藏中心（CCTCC）；靶向 *PRDM16* 的 shRNA 以及 *fPRDM16* 和 *sPRDM16* 的过表达质粒（上海吉玛基因股份有限公司）；CCK-8 试剂盒（美国 Promega 公

司）；实时荧光定量 PCR 检测相关试剂（大连宝生物工程有限公司）；检测组织或细胞中相应蛋白表达的抗 PRDM16 抗体和抗解偶联蛋白（UCP1）抗体（英国 Abcam 公司）；抗 β-actin 和 GAPDH 抗体、山羊抗兔 IgG（H ＋ L）和山羊抗小鼠 IgG（H ＋ L）以及 DAB 试剂盒（中国武汉博士德公司）；转染用到的 Lipofectamine 2000 试剂（美国 Invitrogen 公司），OPTI-MEM 试剂（美国 Gibco 公司）；蛋白酶抑制剂 PMSF（碧云天生物技术股份公司）；PVDF 膜（美国 Millipore 公司）。多功能酶标仪（美国 Beckman-Coulter 公司）；ChemiDoc XRS ＋成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR System（赛默飞世尔科技公司）。

2 方法

2.1 生物信息学分析

从癌症基因组（TCGA）数据库（https：//portal.gdc.cancer.gov/）获得泛癌的 RNA-seq 数据和相应的临床信息。使用 R 语言 v4.0.3 进行单因素 Cox 回归分析，利用 forestplot R 包绘制森林图。使用 R 包“limma”和“beeswarm”来绘制 *PRDM16* 在结直肠癌患者癌组织和癌周组织中的差异表达。采用 R 包“survival”绘制 Kaplan-Meier 曲线，使用 *Log-Rank* 检验进行生存分析。使用‘ggstatsplot’R 软件包和 Spearman 相关分析研究 *PRDM16* 表达与肿瘤突变负荷（TMB）及微卫星不稳定性（MSI）的相关性。

2.2 临床病理组织样本收集及免疫组化检测

分别在中南大学湘雅医院和中南大学湘雅三医院收集 38 例 CRC 患者的石蜡标本（含癌组织、癌周组织和正常肠黏膜组织）以及 21 例明确诊断为 CRC 患者的新鲜癌组织标本。根据 TNM 分期标准和国际抗癌联盟指南确定标本的临床病理分期和分型，患者术前均未接受放疗或化疗，并已获得知情同意和中南大学湘雅三医院伦理委员会的批准（批件号：快 23289）。参考文献，石蜡切片用松节油脱蜡，在酒精溶液中脱水后，在 0.01 mol·L^{-1} 柠檬酸缓冲液（pH 6.0）中高压蒸汽 3 min，切片用正常山羊血清封闭 20 min[20]。切片与一抗在 4 ℃下孵育过夜，PBS 洗涤后与二抗孵育。PRDM16 抗体稀释比例为 1∶500 和 UCP1 抗体稀释比例为 1∶100。DAB 试剂盒染色鉴定阳性表达区域，苏木精染色计数细胞数。随机选择至少 5 个高倍视野评估染色强度。染色强度评分为：1 分（未检测到）、2 分（弱）、3 分（中等）和 4 分（强），然后收集正常肠黏膜、癌组织与癌旁组织各染色强度的病例数进行统计学比较。

2.3 细胞增殖与迁移能力检测

CRC 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中。按照生产厂家的说明书进行转染，即将 1×10^6 个细胞接种于培养瓶中至 70% ～ 80% 融合，然后根据说明书使用 Lipofectamine 2000 试剂和 OPTI-MEM 试剂转染靶向 PRDM16 的 shRNA 或过表达质粒，进行增殖能力与迁移能力检测。将细胞置于 96 孔培养板中，分别孵育 12、24、48、72 h，然后加入 CCK-8 试剂（10 μL/100 μL 培养基），于 450 nm 处测量吸光度。在平板克隆实验中，按每孔 100 ～ 300 个细胞接种于 6 孔板中，在 37 ℃，5%CO_2 培养箱中孵育约 15 d，用 0.1% 结晶紫染色 30 min，PBS 洗涤后成像。为检测细胞迁移能力，分别进行划痕实验和 Transwell 实验。在划痕实验中，待细胞融合后，用 10 mL 无菌针尖划过单层细胞，然后分别在 0、12 和 24 h 镜下观察细胞迁移情况。在 Transwell 小室迁移实验中，上室使用无血清培养基接种细胞，下室加入含 20% 胎牛血清的 RPMI 培养基，孵育 16 h 后取出上室，用 4% 多聚甲醛将细胞固定在底表面约 30 min，然后用 0.1% 结晶紫染色，随机抽取 5 个视野进行计数。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 的表达

参考文献[21]，在样品中加入适量的 Trizol 剂提取 RNA。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 后使用 TB Green 试剂盒，利用 Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR 系统进行实时荧光定量 PCR 检测。PCR 分析条件如下：95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环。引物序列如下：*tPRDM16*（Forward：5'-CCGCCTCCTTCAGCATCTC-3'，Reverse：5'-GGCTCACTGGTGCGTTCT-3'）；*fPRDM16*（Forward：5'-CTTCGGATGGGAGCAAATA-3'，Reverse：5'-TCACTGCCCAGGTCTTCG-3'）；*UCP1*（Forward：5'-CGACGTCCAGTGTTATTAGGTA-3'，Reverse：5'-GTAGAGTTTCATCCGCCCTTC-3'）；*β-actin*（Forward：5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'，Reverse：5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'）。

2.5 Western blot 检测蛋白表达

用含 1% 蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞。用 8%SDS-PAGE 凝胶分离细胞裂解液，然后转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶在室温下封闭 1 h 后，一抗 4 ℃孵育过夜。用 0.1%TBST 洗涤 3 次，室温下二抗孵育 1 h 后再洗涤 3 次，ChemiDoc XRS$^+$ 成像仪成像。PRDM16 抗体稀释倍数为 1∶1000，UCP1 抗体稀释倍数为 1∶5000；β-actin 抗体稀释倍数为 1∶1000，GAPDH 抗体稀释倍数为 1∶1000。

2.6 统计分析

采用 SPSS 18.0 进行统计分析。临床样本相关数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，细胞实验相关数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。正态分布计量资料，两组间采用 *t* 检验进行比较；方差齐性资料采用单因素方差分析进行多组间比较；否则，采用非参数检验的方法进行组间比较。计数资料采用卡方检验判断组间差异。$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生物信息学分析 *tPRDM16* 与 CRC 预后的关系

采用 TCGA 数据库进行泛癌分析，评估总 *PRDM16*（*tPRDM16*）表达水平对疾病特异性生存时间（DSS）的影响，并以森林图的形式呈现单变量 *Cox* 分析结果（见图 1A）。结果发现 *PRDM16* 在肺腺癌（LUAD）和肾透明细胞癌（KIRC）中是保护因子，在脑低级别胶质瘤（LGG）、结肠腺癌（COAD）、直肠腺癌（READ）、肾乳头状细胞癌（KIRP）、葡萄膜黑色素瘤（UVM）和肾上腺皮质癌（ACC）中是危险因子，表明 *PRDM16* 在不同肿瘤的发展中具有不同作用，但引起这种差异的原因目前并不清楚。结合 TCGA 数据库中的 COAD 和 READ 数据（568 例 CRC 患者，44 例正常结直肠组织），分析总 *PRDM16* 水平在结直肠癌组织中的表达差异。结果如图 1B 所示，*tPRDM16* 水平在 CRC 组织中的表达明显高于正常组织。我们绘制 Kaplan-Meier 曲线评估 DSS 与 *tPRDM16* 在 CRC 患者中表达的关系。与总生存期（OS）相比，DSS 的结局指标不包括非疾病原因的死亡，因此 DSS 更具体地反映了临床获益（本文与 DSS 有关的数据由临床生物信息学助理 https：//www.aclbi.com/static/index.html#/prognosis 编制）。生存分析显示，*tPRDM16* 高表达患者的 DSS 生存率低于 *tPRDM16* 低表达患者（见图 1C）。免疫检查点抑制剂（ICI）是近年来肿瘤治疗新策略，而 TMB 或 MSI 可作为评价 ICI 治疗效果的指标[22-24]。Spearman 相关分析结果显示，*tPRDM16* 水平与 TMB/MSI 评分成正相关（见图 1D ～ 1E），提示 *tPRDM16* 水平升高虽然是 CRC 的危险因素，但也是 ICI 疗效的预测因素。

3.2 CRC 组织中 tPRDM16 和 fPRDM16 的表达差异

利用 CRC 组织、癌周组织（距癌组织小于 2 cm）和正常肠黏膜（距癌组织大于 10 cm）的石蜡标本进行免疫组织化学检测，发现 CRC 组织中 tPRDM16 水平显著高于癌周和正常组织（见图 2A），且男性 CRC 患者癌组织中 tPRDM16 水平高于女性患者。此外，CRC 样本中 tPRDM16 蛋白水平与

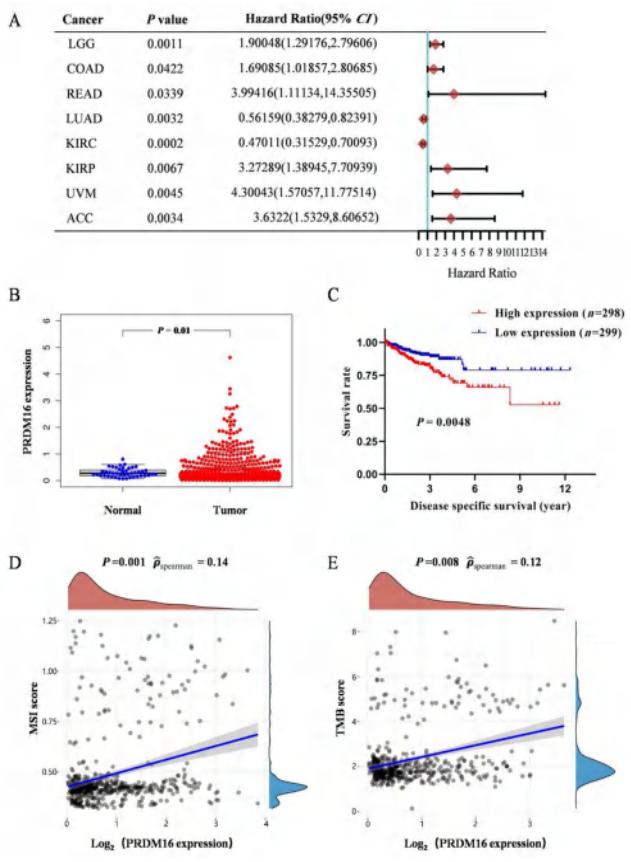


图 1 生物信息学分析

Fig 1 Bio-informatics analysis

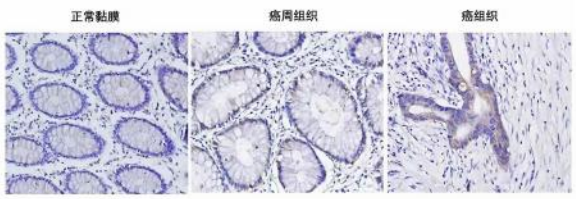
A. *tPRDM16* 与多种肿瘤预后的森林图（prognostic forest plot of *tPRDM16* in multiple tumors）；B. *tPRDM16* 在 CRC 与正常组织中的差异表达（differential expression of *tPRDM16* in CRC compared with control）；C. CRC 患者中 *tPRDM16* 表达水平与 DSS 的关系（the relationship between *tPRDM16* expression and DSS in patients with CRC）；D ～ E. *PRDM16* 表达与 TMB/MSI 的相关性（correlation between *PRDM16* gene expression and TMB/MSI）

TNM 分期成正相关（见图 2B），这与本研究生信分析的结果一致，提示 tPRDM16 水平升高与 CRC 不良预后有关。由于 tPRDM16 包含 fPRDM16 和 sPRDM16 两个异构体，免疫组化无法将 fPRDM16 与 sPRDM16/tPRDM16 区分开来，于是进一步收集新鲜 CRC 组织，分别针对 PR 结构域区域和共同区域设计特异性 PCR 引物来区分 *fPRDM16* 和 *tPRDM16*。由于癌周组织的数据较为离散，CRC 与癌周组织之间 *tPRDM16* 与 *fPRDM16* mRNA 的表达水平并差异无统计学意义（见图 2C ～ 2D），但 CRC 组织中 *tPRDM16* 和 *fPRDM16* mRNA 水平显著高于正常组织（见图 2E ～ 2F）。

3.3 降低 *tPRDM16* 水平可抑制 SW480 细胞迁移

采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 *tPRDM16* 在不同 CRC 细胞系（Cao-2、SW480、SW620、HCT116）中的本底表达。结果如图 3A 所示，在

A



位置	*n*	tPRDM16			*P*
		无表达	弱表达	强表达	
正常黏膜	38	35	3	0	
癌周组织	38	19	18	1	0.000*
癌组织	38	7	20	11	0.000*#

B

基本资料	*n*	tPRDM16			*P*
		无表达	弱表达	强表达	
性别					0.026*
男	22	2	11	9	
女	16	5	9	2	
年龄 /岁					0.810
≤50	19	2	12	5	
>50	19	5	8	6	
肿瘤分化					0.510
高	9	2	5	2	
中	19	4	10	5	
低	10	1	5	4	
TNM 分期					0.031*
I-II	13	4	7	2	
III-IV	25	3	13	9	
恶病质					0.219
是	12	2	9	1	
否	26	5	11	10	

Wilcoxon 秩和检验：*P< 0.05。

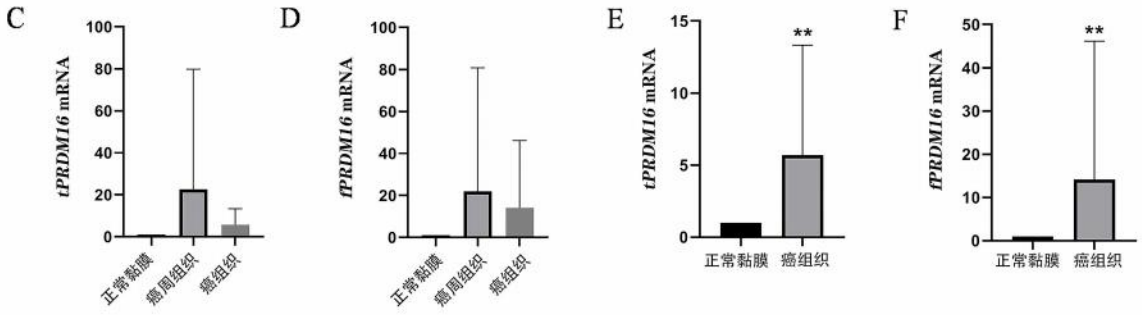


图 2　CRC 组织中 *tPRDM16* 和 *fPRDM16* 的表达水平差异

Fig 2　Differential expressions of *tPRDM16* and *fPRDM16* levels in CRC tissues

注：与正常黏膜比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与癌周组织比较，$^{\#}P < 0.05$。

Note：*vs* normal mucosa，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* pericarcinous tissue，$^{\#}P < 0.05$.

SW480 细胞中 *PRDM16* 的 mRNA 和蛋白表达水平相对较高，在 SW620 和 HCT116 细胞中 *PRDM16* 的表达水平较低。因此，本研究构建了 4 种 *PRDM16* 的短发夹 RNA（shRNA）和对照载体分别转染到 SW480 细胞中以敲低 *PRDM16* 的表达。Western blot 和 qRT-PCR 结果显示，shRNA3 和 shRNA4 显著降低了 *tPRDM16* 的 mRNA 及蛋白表达水平（见图 3B），虽不影响 SW480 细胞增殖（见图 3C ～ 3D），但显著抑制其迁移（见图 3E）。

3.4　过表达 *fPRDM16* 或 *sPRDM16* 对 HCT116 细胞迁移的影响

基于 *tPRDM16* 敲低可同时引起 *fPRDM16* 与 *sPRDM16* 的表达变化，本研究参考文献[7]构建了 *fPRDM16* 和 *sPRDM16* 过表达质粒，进一步探究这两种异构体对 CRC 细胞生物学行为的影响。结果显示，过表达 *fPRDM16*（见图 4A ～ 4B）和 *sPRDM16*（见图 5A ～ 5B）均不影响 HCT116 细胞增殖。采用划痕实验和 Transwell 迁移实验检测 HCT116 细胞的迁移情况，发现过表达 *fPRDM16* 可抑制 HCT116 细胞迁移（见图 4C ～ 4F），而过表达 *sPRDM16* 则促进 HCT116 细胞迁移（见图 5C ～ 5F），表明 PR 结构域可能是 *PRDM16* 抗结直肠癌细胞迁移的重要结构域。由于 *fPRDM16* 与 *sPRDM16* 作用的不一致，与单纯检测 *tPRDM16* 表达相比，进一步检测 *fPRDM16* 水平可能更有助于判断 CRC 的预后。

3.5　*fPRDM16* 抗 CRC 细胞迁移作用与调控 *UCP1* 表达有关

如图 6A 所示，免疫组化分析显示 CRC 组织中 UCP1 蛋白表达显著高于癌周组织和正常肠黏膜；而在新鲜癌组织样本中，癌组织与癌周组织 *UCP1* mRNA 水平均高于正常组（见图 6B ～ 6C），与 *tPRDM16*、*fPRDM16* mRNA 变化趋势一致。Spearman 相关分析结果亦显示 *UCP1* mRNA 水平与 *tPRDM16* 和 *fPRDM16* mRNA 水平成正相关（见图 6D ～ 6E）。因此，本研究检测了 *fPRDM16* 和 *sPRDM16* 对 UCP1 蛋白表达的影响，发现 *fPRDM16* 过表达可上调 HCT116 细胞中 UCP1 蛋白表达（见图 7A ～ 7C），而 *sPRDM16* 过表达则可降低 HCT116 细胞中 UCP1 蛋白水平（见图 7D ～ 7F）。进一步研究发现，敲低 *UCP1* 可促进 HCT116 细胞迁移（见图 7G ～ 7H）。

4　讨论

自免疫检查点抑制剂 PD-1 抑制剂上市以来，肿瘤的免疫治疗受到广泛关注。虽然 PD-1/PD-L1 抑制剂已在美国 FDA 获批十几个癌种的适应证（包

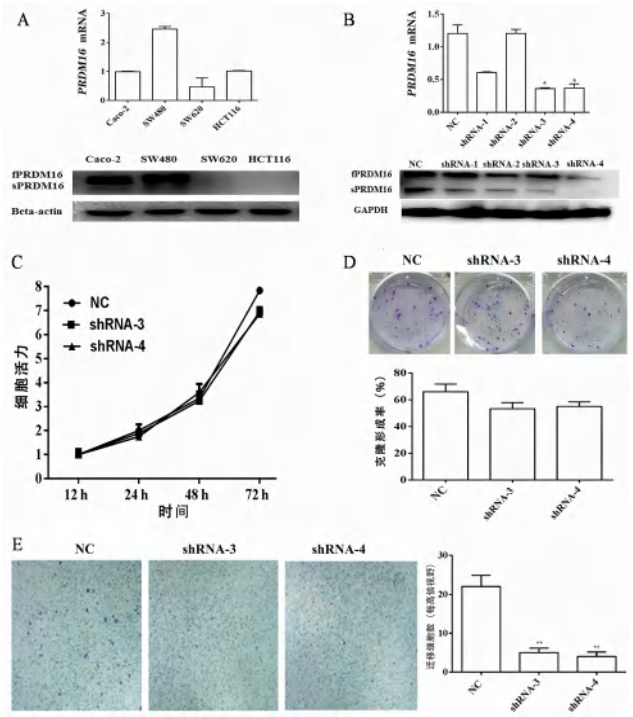


图 3 敲低 *tPRDM16* 对 SW480 细胞增殖和迁移的影响

Fig 3 Effect of *tPRDM16* knockdown on proliferation and migration of SW480 cells

A. *PRDM16* 在不同 CRC 细胞系（Cao-2、SW480、SW620、HCT116）中的基础表达水平 [basal expression levels of *PRDM16* in different CRC cell lines（Cao-2，SW480，SW620，and HCT116）]；B. *PRDM16* shRNA 转染 SW480 细胞敲低 *PRDM16* 表达（knockdown of *PRDM16* by shRNA interference in SW480 cells）；C ～ D. 敲低 *tPRDM16* 对 SW480 细胞增殖的影响（effect of *tPRDM16* knockdown on the proliferation of SW480 cells）；E. 敲低 *tPRDM16* 对 SW480 细胞迁移的影响（effect of *tPRDM16* knockdown on the migration of SW480 cells）。

注：与阴性对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（$n = 3$）。

Note：*vs* the NC group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（$n = 3$）.

括 CRC、胃癌、肝癌等），但其在临床的使用仍面临一些问题。除了经典型霍奇金淋巴瘤单药使用 PD-1 抑制剂有效率高达 80% 外，大部分肿瘤患者单药使用 PD-1/PD-L1 抑制剂有效率在 20% ～ 40%，说明抑制剂有效率存在明显的个体差异 [25-27]。为更加精准地预测免疫检查点抑制剂的疗效，临床上常通过检测 PD-L1 表达、TMB、MSI 来预测治疗效果。TMB 可反映肿瘤细胞所携带的突变总数，高 TMB 的肿瘤细胞具有较高的新抗原水平，有助于免疫系统识别并杀灭肿瘤细胞。MSI 是指 DNA 复制过程中，错配修复机制失灵，致使重复片段增加或减少无法被机体修复，引起微卫星长度变化的现象 [28-29]。通常情况下，PD-L1 表达、TMB、MSI 较高的患者，抑制剂的治疗效果较好。同时，临床上还常采用药物联用的方式，比如 PD-1 抑制剂联合放化疗、CTLA-4 单抗等方式增强治疗效果 [30-31]。

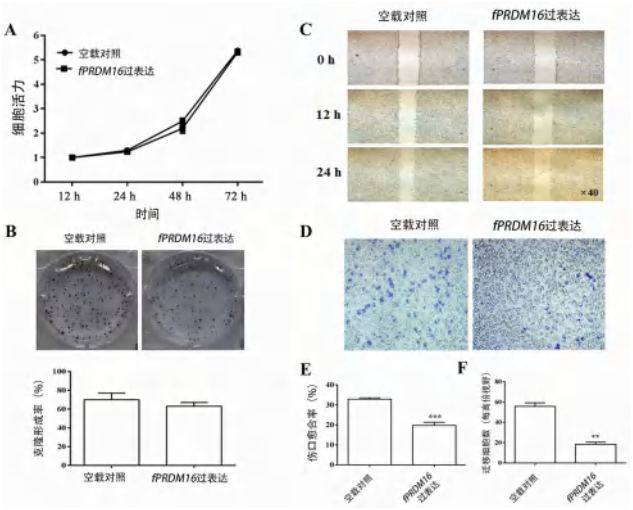


图 4 过表达 *fPRDM16* 对 HCT116 细胞增殖和迁移的影响

Fig 4 Effect of *fPRDM16* over-expression on proliferation and migration of HCT116 cells

A ～ B. *fPRDM16* 过表达对 HCT116 细胞增殖的影响（effect of *fPRDM16* over-expression on proliferation of HCT116 cells）；C ～ F. *fPRDM16* 过表达对 HCT116 细胞迁移的影响（effect of *fPRDM16* over-expression on migration of HCT116 cells）。

注：与空载对照比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：*vs* Vector control，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

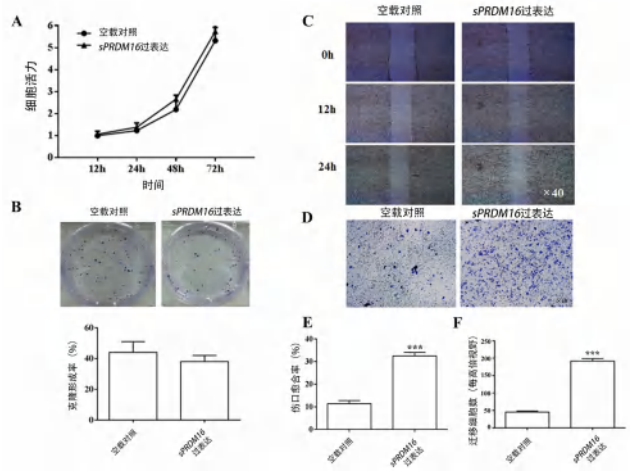


图 5 过表达 *sPRDM16* 对 HCT116 细胞增殖和迁移的影响

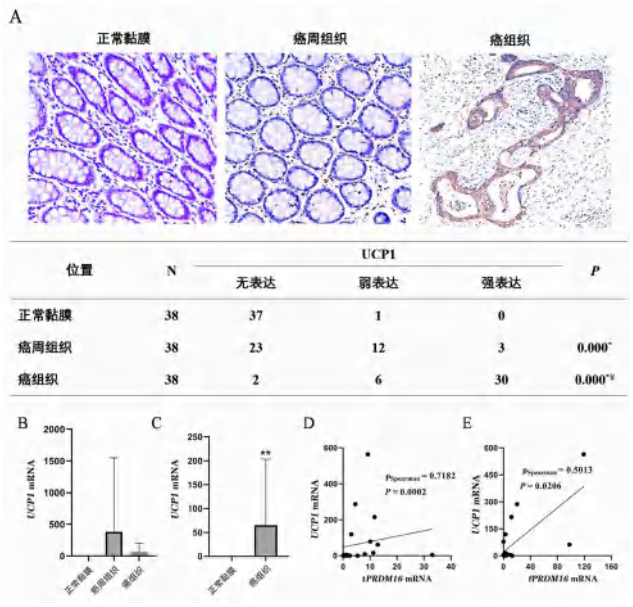
Fig 5 Effect of *sPRDM16* over-expression on proliferation and migration of HCT116 cells

A ～ B. *sPRDM16* 过表达对 HCT116 细胞增殖的影响（effect of *sPRDM16* over-expression on proliferation of HCT116 cells）；C ～ F. *sPRDM16* 过表达对 HCT116 细胞迁移的影响（effect of *sPRDM16* over-expression on migration of HCT116 cells）。

注：与空载对照比较，$^{***}P < 0.001$。

Note：*vs* Vector control，$^{***}P < 0.001$.

生信分析结果显示，肿瘤组织中 *tPRDM16* 水平升高可能是 CRC 的危险因素之一；但它与 MSI/TMB 评分成正相关，提示 *PRDM16* 一方面参与了 CRC 的发生发展，另一方面其表达水平可能反过来影响 CRC 患者 ICI 治疗的效果。基于目前 *PRDM16* 在



位置	N	UCP1 无表达	UCP1 弱表达	UCP1 强表达	P
正常黏膜	38	37	1	0	
癌周组织	38	23	12	3	0.000*
癌组织	38	2	6	30	0.000*#

图 6　结直肠癌组织中 UCP1 的蛋白及 mRNA 表达差异

Fig 6　Differential expressions of UCP1 protein and mRNA in colorectal carcinoma

A. UCP1 蛋白表达（UCP1 protein）；B ～ C. 结直肠癌组织、癌周组织和正常黏膜组织中 *UCP1* mRNA 表达差异（qRT-PCR for *UCP1* mRNA）；D ～ E. *UCP1* mRNA 与 *tPRDM16* 或 *fPRDM16* mRNA 的 Spearman 相关性分析（correlation analysis of *UCP1* mRNA with *tPRDM16* or *fPRDM16* mRNA in CRC patients）。

注：与正常黏膜组织比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与癌周组织比较，$^{\#}P < 0.05$。

Note：*vs* the normal group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the pericarcinous tissue，$^{\#}P < 0.05$.

CRC 增殖转移中发挥何种作用以及其与 CRC 患者 ICI 治疗是否存在关联都不清楚，因此，本研究的主要目的在于初步揭示 *PRDM16* 对 CRC 增殖迁移的影响及可能的机制；在此基础上，后续再研究其对 ICI 治疗效果的影响。

为了验证生物信息学分析结果，本研究检测了肿瘤组织样本中 *tPRDM16* 表达水平，发现 CRC 组织中 *tPRDM16* 表达水平较高，且与性别和 TNM 分期密切相关。同时，本研究在 *PRDM16* 本底表达较高的 SW480 CRC 细胞中进行 shRNA 干扰敲低 *tPRDM16*，发现 *tPRDM16* 水平降低可抑制 SW480 细胞迁移。这些与生信分析结果较为吻合，提示 *tPRDM16* 水平可作为影响 CRC 患者预后的风险因子。本研究发现，在新鲜肿瘤组织中 *tPRDM16* mRNA 水平升高，且 *fPRDM16* mRNA 水平也随之升高。由于目前使用的半定量 PCR 无法将 fPRDM16/tPRDM16 的比例进行准确的测定，因此尚不可知 sPRDM16 是否也随着 tPRDM16 的升高而升高；同样，SW480 CRC 细胞中 *tPRDM16* 敲低后亦会伴有 *fPRDM16* 与 *sPRDM16* 同时降低。

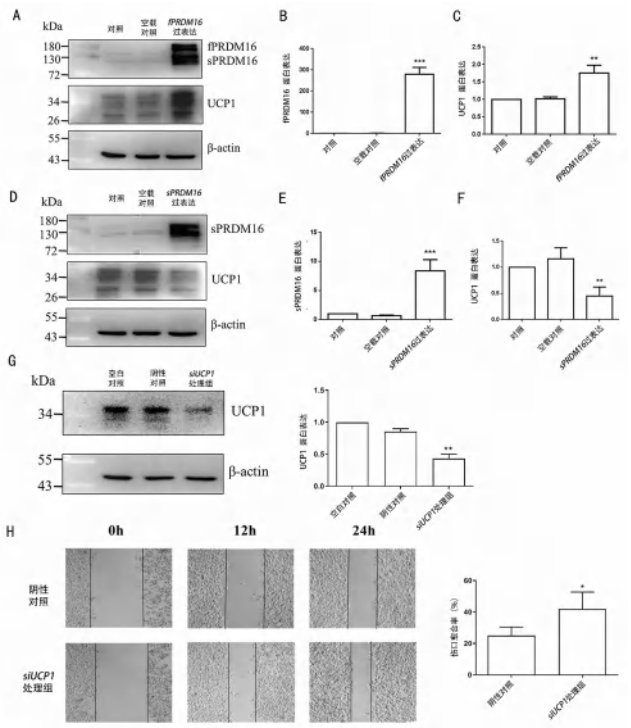


图 7　*UCP1* 介导 *fPRDM16* 抗 HCT116 细胞迁移作用

Fig 7　*UCP1* mediates the anti-migration effect of *fPRDM16* on HCT116 cells

A ～ C. 过表达 *fPRDM16* 后 HCT116 细胞 UCP1 蛋白的变化（changes of *UCP1* protein in HCT116 cells after *fPRDM16* over-expression）；D ～ F. 过表达 *sPRDM16* 后 HCT116 中 UCP1 蛋白的变化（changes of *UCP1* protein in HCT116 cells after *sPRDM16* over-expression）；G ～ H. *UCP1* 敲低对 HCT116 细胞迁移的影响（effect of *UCP1* knockdown on migration of HCT116 cells）。

注：A ～ F. 与空载对照相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；G ～ H. 与阴性对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：A ～ F. *vs* Vector control，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；G ～ H. *vs* the negative control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

基于文献报道 PR 结构域具有抑瘤作用[18]，本研究分别构建了 *fPRDM16* 及其选择性剪切异构体 *sPRDM16* 的过表达质粒，通过细胞实验进一步探究 *fPRDM16* 与 *sPRDM16* 在 CRC 细胞增殖迁移中的作用。结果显示过表达 *fPRDM16* 抑制 CRC 细胞迁移，而过表达 *sPRDM16* 则可促进细胞迁移，因此我们认为检测 fPRDM16 蛋白水平或 fPRDM16/tPRDM16 蛋白的比例比单独检测 *tPRDM16* 水平能更准确地预测患者的预后：即在 tPRDM16 水平相同的情况下，fPRDM16 比例高可能意味着 CRC 预后好。因此，通过抑制 *PRDM16* 的 mRNA 选择性剪接来稳定 fPRDM16，增加 fPRDM16 的比例也可能是治疗 CRC 的新思路。

已知 *PRDM16* 可通过上调线粒体 UCP1 的蛋白表达调控产热脂肪形成，它可以消除线粒体内膜

两侧的跨膜质子浓度差，阻碍 ATP 产生，导致能量消耗增加 [32]。这种解偶联能力在肿瘤中也发挥着重要作用：在肾透明细胞癌中，*PGC-1α*、*PLCL1* 和 *NNT* 通过上调 UCP1 表达发挥抑瘤作用 [33-35]；在卵巢癌中，UCP1 高表达的患者预后较好 [36]；在三阴性乳腺癌中，*UCP1* 通过激活线粒体自噬来抑制肿瘤的恶性行为 [37]。相似地，现有文献表明 CRC 中 UCP1 水平高于正常结肠黏膜，且 UCP1 高表达的患者生存预后更好 [38]。在本研究中，我们也观察到癌组织中 *UCP1* 表达水平高于正常黏膜，与 *tPRDM16* 和 *fPRDM16* 相似；而在 HCT116 细胞中过表达 *fPRDM16* 或 *sPRDM16*，发现 *fPRDM1*6 过表达可上调 UCP1 的表达，而 *sPRDM16* 过表达则可降低 UCP1 的表达水平。此外，敲低 *UCP1* 可增强 HCT116 细胞的迁移能力。这提示 fPRDM16/UCP1 途径激活可能具有抑制 HCT116 细胞迁移作用。近年来有研究报道代谢重编程是恶性肿瘤细胞维持其生物活性所必需的 [39-41]，影响肿瘤细胞的代谢可以调控肿瘤的发生发展 [42]。PRDM16/UCP1 在代谢调控中具有重要作用，其对 CRC 细胞糖脂代谢有何影响尚需进一步研究。

综上所述，本研究首次观察到 *fPRDM16* 与 *sPRDM16* 对结直肠癌迁移具有不同影响，并发现 *UCP1* 可能介导了 *fPRDM16* 的抑瘤作用，推测癌组织中 *fPRDM16*/*UCP1* 表达升高可能是一种代偿性保护作用。如何在升高 *fPRDM16* 的同时，抑制 *fPRDM16* 通过选择性剪切生成 *sPRDM16*，以免削弱其抑瘤效果，值得进一步研究。目前，一种针对 *PRMT5* 依赖的 mRNA 选择性剪接抑制剂正作为新的抗肿瘤药物在研发过程中 [43]，说明靶向 mRNA 选择性剪接的药物研发具有可行性。未来我们不仅要筛选针对 *fPRDM16* 选择性剪切的抑制剂，还要进一步探究其与 ICI 治疗的关系。

参考文献

[1] Biller LH，Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer：a review [J]. JAMA，2021，325（7）：669-685.

[2] Yau TO. Precision treatment in colorectal cancer：now and the future [J]. JGH Open，2019，3（5）：361-369.

[3] Sorrentino A，Federico A，Rienzo M，et al. PR/SET domain family and cancer：novel insights from the cancer genome atlas [J]. Int J Mol Sci，2018，19（10）：3250.

[4] Casamassimi A，Rienzo M，Di Zazzo E，et al. Multifaceted role of PRDM proteins in human cancer [J]. Int J Mol Sci，2020，21（7）：2648.

[5] Di Zazzo E，De Rosa C，Abbondanza C，et al. PRDM proteins：molecular mechanisms in signal transduction and transcriptional regulation [J]. Biology（Basel），2013，2（1）：107-141.

[6] Di Tullio F，Schwarz M，Zorgati H，et al. The duality of PRDM proteins：epigenetic and structural perspectives [J]. FEBS J，2022，289（5）：1256-1275.

[7] Shing DC，Trubia M，Marchesi F，et al. Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice [J]. J Clin Invest，2007，117（12）：3696-3707.

[8] Becerril S，Gomez-Ambrosi J，Martin M，et al. Role of PRDM16 in the activation of brown fat programming. Relevance to the development of obesity [J]. Histol Histopathol，2013，28（11）：1411-1425.

[9] Mochizuki N，Shimizu S，Nagasawa T，et al. A novel gene，MEL1，mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t（1；3）（p36；q21）-positive leukemia cells [J]. Blood，2000，96（9）：3209-3214.

[10] Jo A，Mitani S，Shiba N，et al. High expression of EVI1 and MEL1 is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML [J]. Leukemia，2015，29（5）：1076-1083.

[11] Zhu SX，Xu YP，Song M，et al. PRDM16 is associated with evasion of apoptosis by prostatic cancer cells according to RNA interference screening [J]. Mol Med Rep，2016，14（4）：3357-3361.

[12] Takahata M，Inoue Y，Tsuda H，et al. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells [J]. J Biol Chem，2009，284（5）：3334-3344.

[13] Fei LR，Huang WJ，Wang Y，et al. PRDM16 functions as a suppressor of lung adenocarcinoma metastasis [J]. J Exp Clin Cancer Res，2019，38（1）：35.

[14] Kundu A，Nam H，Shelar S，et al. PRDM16 suppresses HIF-targeted gene expression in kidney cancer [J]. J Exp Med，2020，217（6）：e20191005.

[15] Yu H，Neale G，Zhang H，et al. Downregulation of Prdm16 mRNA is a specific antileukemic mechanism during HOXB4-mediated HSC expansion in vivo [J]. Blood，2014，124（11）：1737-1747.

[16] Nishikata I，Sasaki H，Iga M，et al. A novel EVI1 gene family，MEL1，lacking a PR domain（MEL1S）is expressed mainly in t（1；3）（p36；q21）-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation [J]. Blood，2003，102（9）：3323-3332.

[17] Dong S，Chen JP. SUMOylation of sPRDM16 promotes the progression of acute myeloid leukemia [J]. BMC Cancer，2015，15：893.

[18] Corrigan DJ，Luchsinger LL，Justino de Almeida M，et al. PRDM16 isoforms differentially regulate normal and leukemic hematopoiesis and inflammatory gene signature [J]. J Clin Invest，2018，128（8）：3250-3264.

[19] Stine RR，Sakers AP，TeSlaa T，et al. PRDM16 main-

tains homeostasis of the intestinal epithelium by controlling region-specific metabolism [J]. Cell Stem Cell，2019，25（6）：830-845. e8.

[20] Nakayama S，Karasawa H，Suzuki T，et al. p62/sequestosome 1 in human colorectal carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation [J]. Cancer Med，2017，6（6）：1264-1274.

[21] Liao ZM，Li AN，Cai Y，et al. Skip participates in formation and lipid metabolism of beige adipose and might mediate the effects of SIRT1 activator BTM-0512 on beige remodeling [J]. Biochem Biophys Res Commun，2021，537：109-117.

[22] Schrock AB，Ouyang C，Sandhu J，et al. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer [J]. Ann Oncol，2019，30（7）：1096-1103.

[23] Le DT，Durham JN，Smith KN，et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade [J]. Science，2017，357（6349）：409-413.

[24] Le DT，Uram JN，Wang H，et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency [J]. N Engl J Med，2015，372（26）：2509-2520.

[25] Tang Q，Chen Y，Li XJ，et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers [J]. Front Immunol，2022，13：964442.

[26] Tang J，Yu JX，Hubbard-Lucey VM，et al. Trial watch：the clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors [J]. Nat Rev Drug Discov，2018，17（12）：854-855.

[27] Li J，Deng YH，Zhang WJ，et al. Subcutaneous envafolimab monotherapy in patients with advanced defective mismatch repair/microsatellite instability high solid tumors [J]. J Hematol Oncol，2021，14（1）：95.

[28] Chabanon RM，Pedrero M，Lefebvre C，et al. Mutational landscape and sensitivity to immune checkpoint blockers [J]. Clin Cancer Res，2016，22（17）：4309-4021.

[29] Addeo A，Friedlaender A，Banna GL，et al. TMB or not TMB as a biomarker：that is the question [J]. Crit Rev Oncol Hematol，2021，163：103374.

[30] Hosseini A，Gharibi T，Marofi F，et al. CTLA-4：from mechanism to autoimmune therapy [J]. Int Immunopharmacol，2020，80：106221.

[31] Zhu Y，Chen M，Xu D，et al. The combination of PD-1 blockade with interferon-α has a synergistic effect on hepatocellular carcinoma [J]. Cell Mol Immunol，2022，19（6）：726-737.

[32] Chouchani ET，Kazak L，Spiegelman BM. New advances in adaptive thermogenesis：UCP1 and beyond [J]. Cell Metab，2019，29（1）：27-37.

[33] Xiong ZY，Xiao W，Bao L，et al. Tumor cell “slimming” regulates tumor progression through pLCL1/UCP1-mediated lipid browning [J]. Adv Sci（Weinh），2019，6（10）：1801862.

[34] Xiao W，Xiong ZY，Xiong W，et al. Melatonin/PGC1A/UCP1 promotes tumor slimming and represses tumor progression by initiating autophagy and lipid browning [J]. J Pineal Res，2019，67（4）：e12607.

[35] Xiong ZY，Xiong W，Xiao W，et al. NNT-induced tumor cell “slimming” reverses the pro-carcinogenesis effect of HIF2a in tumors [J]. Clin Transl Med，2021，11（1）：e264.

[36] Huang JF，Wang GL，Liao KD，et al. UCP1 modulates immune infiltration level and survival outcome in ovarian cancer patients [J]. J Ovarian Res，2022，15（1）：16.

[37] Xia J，Chu CB，Li WQ，et al. Mitochondrial protein UCP1 inhibits the malignant behaviors of triple-negative breast cancer through activation of mitophagy and pyroptosis [J]. Int J Biol Sci，2022，18（7）：2949-2961.

[38] Alnabulsi A，Cash B，Hu Y，et al. The expression of brown fat-associated proteins in colorectal cancer and the relationship of uncoupling protein 1 with prognosis [J]. Int J Cancer，2019，145（4）：1138-1147.

[39] DeBerardinis RJ，Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism [J]. Sci Adv，2016，2（5）：e1600200.

[40] Pavlova NN，Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. Cell Metab，2016，23（1）：27-47.

[41] Vander Heiden MG，DeBerardinis RJ. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology [J]. Cell，2017，168（4）：657-669.

[42] Hong J，Guo F，Lu SY，et al. Fnucleatum targets lncRNA ENO1-IT1 to promote glycolysis and oncogenesis in colorectal cancer [J]. Gut，2021，70（11）：2123-2137.

[43] Fedoriw A，Rajapurkar SR，O’brien S，et al. Anti-tumor activity of the type Ⅰ PRMT inhibitor，GSK3368715，synergizes with PRMT5 inhibition through MTAP loss [J]. Cancer Cell，2019，36（1）：100-114. e25.

（收稿日期：2024-03-09；修回日期：2024-05-21）

人参归脾丸防治环磷酰胺化疗胃肠道反应的实验研究

吕英楠[1]，田颖颖[1]，刘闯[1]，赵新月[1]，李依林[1]，左泽平[2]，曹欣垚[2]，杨硕[2]，王婷婷[2]，杨海润[2*]，王志斌[1, 2*]（1.北京中医药大学 中药学院，北京 102488；2.北京同仁堂股份有限公司科学研究所，北京 100079）

摘要：目的 探究人参归脾丸对环磷酰胺致胃肠道反应小鼠的干预作用。**方法** 选取 60 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为阴性对照组，模型组，盐酸昂丹司琼片组 [2.4 mg/（kg·d）] 及人参归脾丸高剂量组 [5.4 g/（kg•d）]、中剂量组 [2.7 g/（kg•d）]、低剂量组 [1.35 g/（kg•d）]，每组 10 只。除阴性对照组外其余 5 组动物分别以 80 mg·kg^{-1} 剂量的环磷酰胺进行隔日腹腔注射，共注射 3 次，造模同时连续灌胃给予相应药物 6 d，每日观察动物状态。隔日称量各组小鼠造模后的体重，给药结束检测胃液 pH 值，计数小鼠肠道派氏结（PP 结），免疫组化法检测小鼠胃肠道组织中 TLR4 蛋白的表达。**结果** 人参归脾丸能够改善环磷酰胺造模小鼠精神状态，促进模型小鼠体重增长，增加 PP 结数量，提高胃液 pH 值，下调胃、十二指肠、空肠及回肠组织 TLR4 蛋白的相对表达量。**结论** 人参归脾丸对环磷酰胺化疗所致胃肠道反应有一定的预防治疗作用，其机制可能与调节胃肠道 TLR4 蛋白表达有关。

关键词：人参归脾丸；环磷酰胺；胃肠道反应
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2846-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.002

Prevention and treatment of cyclophosphamide-induced gastrointestinal reaction by Renshen Guipi pills

LYU Ying-nan[1], TIAN Ying-ying[1], LIU Chuang[1], ZHAO Xin-yue[1], LI Yi-lin[1], ZUO Ze-ping[2], CAO Xin-yao[2], YANG Shuo[2], WANG Ting-ting[2], YANG Hai-run[2*], WANG Zhi-bin[1, 2*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Institute of Scientific Research*, *Beijing Tong Ren Tang Chinese Medicine Co.*, *Ltd.*, *Beijing* 100079)

Abstract: Objective To determine the intervention effect of Renshen Guipi pills on mice with cyclophosphamide-induced gastrointestinal reaction. **Methods** Totally 60 SPF BALB/c mice were randomly divided into 6 groups: a negative control group, a model group, an Ondansetron hydrochloride tablet group [2.4 mg/ (kg • d)], and Renshen Guipi pills high [5.4 g/ (kg • d)], medium [2.7 g/ (kg • d)] and low [1.35 g/ (kg • d)] dose groups, with 10 mice in each group. Except for the negative control group, the other 5 groups were intraperitoneally given 80 mg • kg^{-1} of cyclophosphamide once every other day, 3 injections in total. At the same time, the mice were continuously intragastrically gavaged with corresponding drugs for 6 days, and their daily condition was observed. The weight, pH value of gastric juice, and small intestinal PP nodes of mice were measured after the modeling. Immunohistochemistry was used to detect the expression of TLR4 protein in the gastrointestinal tract of the mice. **Results** Renshen Guipi pills improved the mental state of cyclophosphamide model mice, promoted the body weight growth of model mice, increased the pH value of gastric juice and the number of PP nodes in the small intestine, and down-regulated the relative expression of TLR4 protein in the gastric, duodenum, jejunum and ileal tissues. **Conclusion** Renshen Guipi pills prevent and treat

基金项目：国家科技重点研发计划（No.2019YFC1711400）；国家科技重大专项（No.2018ZX09201-011；No.2018ZX09301-011-003）。
作者简介：吕英楠，男，硕士研究生，主要从事中药药理毒理研究，email：15822262303@163.com *通信作者：杨海润，女，副研究员，主要从事中药药理毒理研究，email：yanghr43@126.com；王志斌，男，教授，主要从事生物活性及药理毒理研究，email：wangzhibin4804@126.com

gastrointestinal reaction induced by cyclophosphamide chemotherapy, whose mechanism may be related to the regulation of gastrointestinal TLR4 protein expression.

Key words: Renshen Guipi pill; cyclophosphamide; gastrointestinal reaction

化疗是恶性肿瘤的重要治疗方案之一，化疗主要通过化学药物杀死肿瘤细胞，从而抑制肿瘤细胞生长以及增殖，达到治疗的目的。但抗肿瘤化疗药物治疗会伴随一定的毒副作用，其中发生率最高的是胃肠道反应，临床主要表现为食欲缺乏、腹泻、恶心、呕吐、便秘等[1]，部分反应严重者可能合并营养不良、水电解质紊乱、消瘦、贫血等表现，严重影响化疗效果，降低患者继续治疗的信心和生活质量[2-3]；因此积极采取措施对预防或减轻化疗药物导致的胃肠道反应，保护胃肠道功能、改善疾病预后效果具有重要意义。

人参归脾丸处方由人参、白术（麸炒）、茯苓、甘草（蜜炙）、黄芪（蜜炙）、当归、木香、远志（去心甘草炙）、龙眼肉、酸枣仁（炒）共 10 味中药组成，主要用于心脾两虚、气血不足所致的心悸、怔忡、失眠健忘、食少体倦、面色萎黄以及脾不统血所致的便血、崩漏、带下等症，具有益气补血、健脾养心的功效。中医认为化疗药物为热毒之邪，易伤人体津液、损伤脾胃，使津液亏虚、脾胃升降功能失调，而临床上的肿瘤患者在手术之后身体虚弱，晚期肿瘤患者多表现为久病气血亏虚。临床上注意调理脾胃、振奋胃气，能取得较好的临床效果[4]。临床报道人参归脾丸具有改善脂质代谢，改善食欲，增强消化及抗消化性溃疡等作用[5]。本研究就人参归脾丸对化疗药物致胃肠道反应小鼠的药效作用进行探讨，以期为临床化疗后不良反应的防治提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 雄性小鼠，7 ～ 8 周龄，体重 20 ～ 22 g [斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010，实验动物质量合格证号：No.110324221106927324]。

1.2 试药

人参归脾丸（北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂，批号：22010650）；盐酸昂丹司琼片（齐鲁制药有限公司，批号：2D0041DE9）。

环磷酰胺（CTX，山西普德药业有限公司，批号：04220402）；ADVIA3 合 1 低值（ABN1）质控（T03-4417-01）和 ADVIA3 合 1 中值（ABN1）质控（T03-4418-01）（北京乐佳康美生物技术有限公司）；细胞计数试剂包（CBC，11103010）、血细胞分类试剂包（12107150）、消泡剂（21102600）、B 型清洗液（13109140）（烟台三得医学科技有限公司）。4.01 pH 标准缓冲液（1H067A）、7.00 pH 标准缓冲液（1H068A）、9.21 pH 标准缓冲液（1H080B）[梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]。Toll 样受体 4（TLR4 抗体）（Abcam，Ab13556），GRP IgG（H ＋ L）（bioss，Bs-0295G-HRP），DAB 显色剂（中杉金桥，ZLI-9019）。

1.3 仪器

ADVIA 2120i 全自动血球分析仪（SIEMENS）；AU480 化学分析仪（BECKMAN）；Thermo Scientific Multifuge X Pro 离心机（ThermoFisher）；TP1020 组织脱水机、EG1150H 组织包埋机、RM2245 半自动切片机、Auto Stainer XL 染色机（Leica）；BX61 光学显微镜（OLYMPUS）。

2 方法

2.1 实验分组

检疫合格小鼠适应性喂养 3 d 后，按体重随机分为阴性对照组（N），模型组（M），盐酸昂丹司琼片组 [XP，2.4 mg/（kg • d）] 及人参归脾丸高剂量组 [G，5.4 g/（kg • d）]、中剂量组 [Z，2.7g/（kg • d）]、低剂量组 [D，1.35 g/（kg • d）]，共 6 组，每组 10 只。

2.2 胃肠反应模型的建立及给药

除阴性对照组外，其余 5 组小鼠分别以 80 mg • kg^{-1} 剂量的 CTX 进行隔日腹腔注射 1 次，共注射 3 次，阴性对照组动物腹腔注射等体积生理盐水，造模同时各给药组灌胃给予相应剂量的药物，阴性对照组和模型组每日灌胃等体积去离子水，灌胃体积 10 mL • kg^{-1}，连续灌胃给药 6 d。

2.3 检测指标

2.3.1 小鼠一般状况、体重及摄食量 从造模开始每日对各组小鼠进行造模及给药前后观察，定期称量小鼠体重，检测摄食量，比较各组间有无差异。末次给药 8 h 后禁食 16 h，腹主静脉取血后取材，进行指标检测。

2.3.2 小鼠胃液 pH 值和肠道派尔集合淋巴结（Peyer patch，PP 结）的计数 解剖取胃，结扎贲门和幽门，滤纸吸干水分后以 4 mL 生理盐水冲洗胃部，收集冲洗液离心取上清液 2 mL，检测胃液 pH 值；同时将剪取的小肠放入含有 PBS 液的培养皿中，清除干净肠黏膜表面的脂肪组织，在小肠的最外层，位于肠系膜的对侧的麦粒状的圆形突起为 PP 结，肉眼观察计数小肠的 PP 结的

数目，每组小鼠的 PP 结取平均值进行比较分析。

2.3.3 胃、十二指肠、空肠、回肠组织中 TLR4 蛋白的表达水平 取小鼠胃及十二指肠、空肠、回肠各 1 cm 的肠管，4% 多聚甲醛固定 24 h 后常规脱水、浸蜡、包埋、切片，使用二甲苯进行脱蜡，梯度乙醇水化，之后进行抗原修复，PBS 洗 3 次，用 3% H_2O_2 溶液孵育 10 min，滴加免抗鼠 TLR4 抗体（1∶80），于 4 ℃过夜，PBS 洗 3 次后滴加 HRP 标记的抗兔免疫球蛋白 G（IgG）二抗孵育 50 min，再用 PBS 冲洗，DAB 显色，脱水，封片。高倍镜下观察切片，棕黄色染色为阳性信号，得免疫组化染色后切片，用 Image J 进行图像分析，测定胃肠道 TLR4 蛋白表达水平。

2.4 数据处理

以 SPSS 27.0 软件分别对体重、血液学指标等计量资料先进行正态分布检验，服从正态分布（$P > 0.05$）的再进行方差齐性检验，方差齐（$P > 0.05$）的进行单因素方差分析（ANOVA），根据方差分析结果进行 LSD 检验；不服从正态分布（$P \leqslant 0.05$）的和方差不齐（$P \leqslant 0.05$）的进行非参数检验。$P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义，实验数据以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。

3 结果

3.1 人参归脾丸对 CTX 致胃肠反应小鼠一般状态和体重的影响

与阴性对照组比较，造模后第 4 日模型组小鼠和给药组小鼠大多开始出现竖毛、被毛粗糙无光泽、探索行动低、不活泼等症状，未观察到明显的拉稀便或便秘现象。造模后第 3、5、6 日模型组动物体重显著下降（$P < 0.01$）；与模型组比较，人参归脾丸高、中剂量组小鼠体重在第 6 日比模型组小鼠显著增高（$P < 0.05$），见表 1。

表 1 人参归脾丸对 CTX 致胃肠反应小鼠体重的影响 (g，$\bar{x} \pm s$，$n = 10$)

Tab 1 Effect of Renshen Guipi pill on body weight of mice with gastrointestinal response after chemotherapy (g，$\bar{x} \pm s$，$n = 10$)

指标	Day1	Day3	Day5	Day6
阴性对照组	20.78±0.69	22.76±0.86	22.25±0.57	22.24±0.54
模型组	20.71±0.80	21.30±0.98$^{\#\#}$	19.41±1.29$^{\#\#}$	18.18±1.39$^{\#\#}$
盐酸昂丹司琼片组	20.65±0.82	20.86±1.20	19.46±1.23	18.56±1.65
人参归脾丸高剂量组	20.88±0.61	21.43±1.18	20.37±1.53	19.88±1.93*
人参归脾丸中剂量组	20.72±0.62	20.98±0.89	19.86±1.29	19.70±1.63*
人参归脾丸低剂量组	20.56±0.59	20.79±1.15	19.59±1.81	19.59±1.81

注：与阴性对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

3.2 人参归脾丸对 CTX 致胃肠反应小鼠胃液 pH 值及肠道 PP 结的影响

与阴性对照组比较，模型组小鼠胃液 pH 值显著下降（$P < 0.05$），小鼠肠道 PP 结的数量显著减少（$P < 0.01$）。给药 6 d 后与模型组比较，盐酸昂丹司琼片组胃液 pH 值显著高于模型组（$P < 0.01$）；与模型组比较，人参归脾丸高、低剂量组胃液 pH 值均显著升高（$P < 0.05$），高、中、低剂量组动物小肠的 PP 结数量均显著增加（$P < 0.05$），详见表 2 及图 1。

3.3 胃、十二指肠、空肠、回肠组织 TLR4 蛋白的表达水平

由小鼠胃、肠组织免疫组化结果可知，TLR4 蛋白主要表达在胃肠黏膜层、黏膜下层、固有层及炎性细胞的胞质及胞膜中，为阳性细胞，表现为弥漫性棕黄色颗粒。其中阴性对照组 TLR4 蛋白偶见表达，且不均一，大部分组织为蓝色阴性细胞（见图 2）。与阴性对照组比较，模型组胃、十二指肠、空肠及回肠的 TLR4 阳性细胞率显著升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠胃、十二指肠、空肠及回肠组织切片的 TLR4 均有降低。结果表明人参归脾丸三个剂量组均可降低胃及各段小肠的 TLR4 表达（见图 3）。

表 2 人参归脾丸对 CTX 致胃肠道反应小鼠胃液 pH 值及肠道 PP 结的影响 ($\bar{x} \pm s$，$n = 10$)

Tab 2 Effect of Renshen Guipi pill on pH value of gastric juice and intestinal PP node in mice with gastrointestinal reaction after chemotherapy ($\bar{x} \pm s$，$n = 10$)

组别	胃液 pH	PP 结 / 个
阴性对照组	4.14±0.51	9.60±2.07
模型组	3.63±0.12$^{\#}$	5.00±1.49$^{\#\#}$
盐酸昂丹司琼片组	4.30±0.51**	6.30±1.57
人参归脾丸高剂量组	4.37±0.94*	6.50±1.65*
人参归脾丸中剂量组	4.21±0.83	6.50±1.51*
人参归脾丸低剂量组	4.34±0.75*	6.90±1.66*

注：与阴性对照组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

4 讨论

中医认为化疗药物为热毒之邪，易伤人体津液、损伤脾胃，使津液亏虚、脾胃升降功能失调，而临床上的肿瘤患者多为手术之后身体虚弱或晚期肿瘤患者，久病气血亏虚。肿瘤患者临床上应注意调理脾胃，振奋胃气，能取得较好的临床效果。人参归脾丸具有健脾养心的功效。方中人参大补元

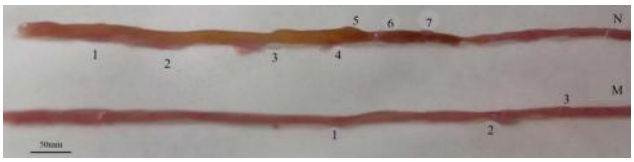


图 1 阴性对照组（N）与模型组（M）小鼠小肠 PP 结对比

Fig 1 Small intestine PP node between the negative control group（N）and the model group（M）

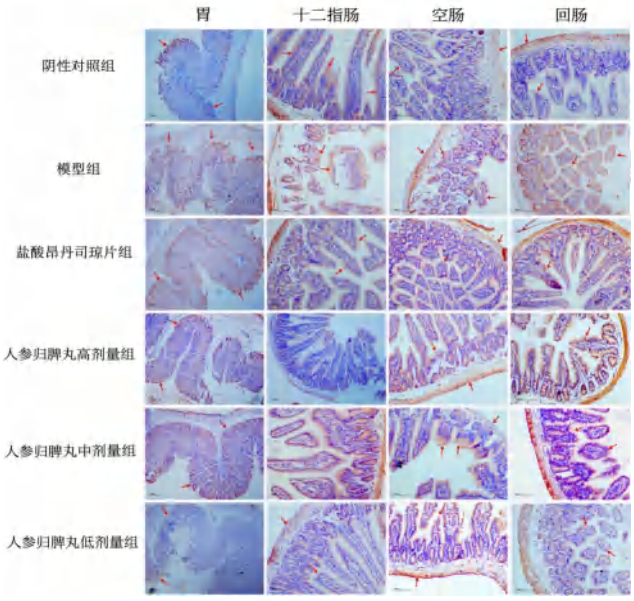


图 2 小鼠胃、十二指肠、空肠、回肠组织中 TLR4 蛋白的表达（×200）

Fig 2 Expression of TLR4 protein in gastric，duodenum，jejunum and ileum tissues of mice（×200）

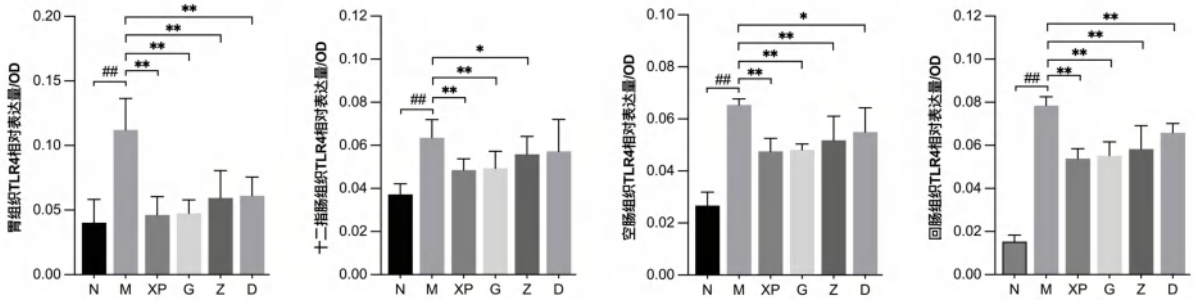


图 3 TLR4 在小鼠肠胃各部分的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig 3 Expression of TLR4 in various parts of the gastrointestinal tract of mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

注：与阴性对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

气，炙黄芪健脾补中，两者共为君药，重在健脾益气，以气生血，气旺通血的功用特点。当归甘温质润，为补血之圣药；龙眼肉能补脾益气养血以安神，共为臣药；君臣相合，补益心脾，化生气血，切中病机。白术、茯苓健脾益气以助生血之源；远志能上开心气，下通肾气，交通心肾，安神益智；酸枣仁养心益肝，宁心安神；木香理气醒脾，防滋补太过，可使全方补而不滞，以上共为佐药。炙甘草能益气和中，调和诸药，为使药。诸药合用，共奏益气补血，健脾养心之效[6]。

胃肠道反应是化疗药的主要毒副作用之一，CTX 作为一种应用广泛的抗肿瘤化疗药物，对多种肿瘤细胞生长以及繁殖产生抑制作用，但在杀死肿瘤细胞的同时也会杀死正常细胞，如胃肠黏膜细胞、肝细胞等，还会带来多种毒副作用如机体抵抗力减弱、免疫功能下降、氧化损伤，尤其是会损伤胃肠道黏膜屏障，严重影响肿瘤患者化疗的正常进行[7-8]。机体内胃酸作为胃和十二指肠黏膜的主要侵袭因素，胃酸过多表现为胃液 pH 值下降，能够造成胃及十二指肠黏膜损伤，形成溃疡或炎症[9]。TLR4 为保守的模式识别受体，表达于肠道黏膜上皮细胞或肠道黏膜免疫相关细胞的表面。胃肠组织中 TLR4 表达的升高，提示肠道黏膜上皮细胞受到侵害；TLR4 是 TLR 家族中重要成员之一[10]。Toll 样受体（TLRs）是天然免疫受体，TLRs 通过诱导小胶质细胞激活，小胶质细胞释放促炎症反应介质，促发天然免疫反应和被动免疫反应。近年来研究发现，TLR4 介导的炎症信号通路的持续激活还可调控肿瘤细胞的增殖过程[11]。PP 结是淋巴细胞在小肠表面聚合、器官化后形成的淋巴滤泡，小鼠 PP 结内含有 60% 的 B 淋巴细胞，25% 的 T 淋巴细胞，10% 的树突状细胞和不足 5% 的巨噬细胞或多形核中性粒细胞[12]。巨噬细胞识别、摄取、转移抗原至 PP 中的淋巴滤泡间，激活 T、B 淋巴细胞，发挥局部免疫作用并减少抗原穿过黏膜上皮细胞的概率[13]。PP 结是肠黏膜免疫功能的诱导部位，其数量、大小与肠道免疫有关，肠道免疫功能完好，免疫效应强，淋巴细胞数量和活性正常，则 PP 结数量较多，面积大，肉眼可见[14]，所以 PP 结数量的变化可以反映黏膜免疫功能的状态，例如云芝多糖具有增强免疫功能的作用[15]，在云芝多糖的研究中，就以 PP 结的数目作为指标进行实验[16]；Nakasaki 等[17]发现给予小鼠全肠外营养时会引起 PP 结数量的减

少，而口服云芝多糖可改善这种情况。故本研究以小鼠胃液 pH，小肠内 PP 结数量，胃肠道组织中 TLR4 的表达量作为人参归脾丸治疗胃肠道反应的药效评价指标。

本实验采用目前应用比较成熟的 CTX 化疗致小鼠胃肠道反应模型，并经前期模型预实验后确定采用 80 mg·kg^{-1} CTX 对小鼠进行隔日腹腔注射 1 次，共注射 3 次诱导小鼠化疗后胃肠道反应，结果表明化疗致小鼠胃肠道反应模型构建成功[18-20]。阳性药盐酸昂丹司琼片能明显升高模型小鼠胃液 pH 值，明显降低小鼠胃、十二指肠、空肠及回肠中 TLR4 蛋白的表达[21-22]。人参归脾丸高剂量组可明显增加模型小鼠体重，升高胃液 pH 值和小肠 PP 结数量；中剂量组可明显增加模型小鼠体重，升高小肠 PP 结数量；高、中剂量组均可明显降低小鼠胃、十二指肠、空肠及回肠的 TLR4 蛋白的表达；低剂量组可明显升高胃液 pH 值和小肠 PP 结数量，降低小鼠胃、空肠及回肠的 TLR4 蛋白的表达。相较于中、低剂量组，人参归脾丸高剂量组的药效表现更加明显，在各检测指标中与阳性药组最为相近，但阳性药组药效略优于高剂量组。

综上，人参归脾丸通过调节 CTX 化疗致胃肠道反应小鼠的体重、全身状态与胃肠道胃液 pH 值和小肠 PP 结数量，改善胃肠道 TLR4 蛋白表达及化疗后胃肠道反应小鼠的胃肠道免疫功能和胃肠道黏膜损伤，从而改善癌症患者化疗引起的胃肠道不良反应，提高患者生活质量而提高抗癌效果。本研究对人参归脾丸防治化疗胃肠道反应的药效进行了初步探索，结果提示其与 TLR4 蛋白表达有关且表现出一定的剂量相关性，为人参归脾丸治疗胃肠道反应提供了临床应用依据。

参考文献

[1] 胡慧 . 中药注射液调节肿瘤化疗患者免疫功能的临床研究进展 [J]. 陕西中医，2018，39（4）：543-545.

[2] 刘玉琴，田碧玲，秦英，等 . 健脾和胃合剂改善肿瘤患者营养不良及生活质量的疗效观察 [J]. 中国肿瘤临床与康复，2019，26（7）：855-857.

[3] 陈绮云，傅晓芸，陈凤兰，等 . 中药益气健脾和胃法治疗乳腺癌患者术后化疗胃肠反应的效果 [J]. 中医临床研究，2018，10（24）：98-100.

[4] 郭重仪，刘永波 . 调脾胃颗粒对抗化疗引起胃肠道反应的药效学研究 [J]. 中药材，2014，37（4）：664-666.

[5] 中国社区医师编辑部 . 人参归脾丸的临床应用 [J]. 中国社区医师，2010，26（21）：13.

[6] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典临床用药须知（2015 年版）X 中药成方制剂卷 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2017.

[7] 曹静，何怡 . 子午流注治疗仪联合护胃止吐药对减轻化疗期间胃肠道反应的效果观察 [J]. 中外女性健康研究，2019（16）：11-12，16.

[8] 薛然 . 火麻仁多糖对环磷酰胺致小鼠肠道黏膜损伤的保护作用研究 [D]. 舟山：浙江海洋大学，2019.

[9] 陈胜良，莫剑忠，陈晓宇，等 . 胆汁反流、胃酸和幽门螺杆菌感染共同作用对胃黏膜损伤程度和分布的影响 [J]. 胃肠病学，2002，7（5）：280-282，285.

[10] 陈联卫 . 调神畅情”针法对 PD 胃肠功能障碍模型大鼠不同部位 TLR4 CXCR4 表达的影响 [D]. 哈尔滨：黑龙江省中医药科学院，2021.

[11] 李生平 . TLR4、NF-κB 及 Ki-67 在结直肠癌中的表达及其临床意义 [D]. 泸州：西南医科大学，2019.

[12] 蒲秀兰，林美斯，罗锐锋，等 . PPs 在免疫相关肠病中的病理机制及中药多糖的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（4）：216-224.

[13] 高娟，李芳兰，周一珺，等 . 不同发育时期大鼠小肠粘膜及派氏结 T 淋巴细胞发育活化的研究 [J]. 中国免疫学杂志，2009，25（8）：678-683.

[14] 牛佳卉，袁静，魏然，等 . 红枣多糖对小鼠肠道免疫屏障的保护作用及机制研究 [J]. 食品工业科技，2021，42（4）：295-300，306.

[15] 牛晓晖，纪凤兰，张伟，等 . 云芝多糖对小鼠细胞因子的影响 [J]. 中国免疫学杂志，2006，22（12）：1124-1127.

[16] Matsunaga K，Morita I，Oguchi Y，et al. The effect of a biological response modifier，PSK，on the intestinal immune system in tumor bearing mice [J]. Anticance Res，1987，7（3 Pt B）：509.

[17] Nakasaki H，Tajima T，Mitomi T，et al. Countermeasures for hypofunction of gut associated lymphoid tissue during TPN in rats [J]. Nippon-Shokakibyo-Gakkai-Zasshi，1996，93（11）：806.

[18] 赵宏艳 . 灵芝多糖对 H22 荷瘤小鼠肠道黏膜免疫功能的影响 [D]. 北京：中国中医科学院，2009.

[19] 邓桦，杨鸿，蒋焱平，等 . 玉屏风多糖对小鼠肠黏膜免疫应答和免疫损伤的调控作用 [J]. 中国兽药杂志，2018，52（12）：43-48.

[20] 张涵淇，王娇，崔圆圆，等 . 不同浓度环磷酰胺和地塞米松对小鼠免疫抑制模型建立的影响 [J]. 湖北科技学院学报，2015，29（6）：461-465.

[21] 黄山鉴，杨保庆，黄奎源，等 . 福沙匹坦双葡甲胺联合昂丹司琼治疗化疗性胃肠道反应的临床效果 [J]. 广西医学，2022，44（13）：1471-1474.

[22] 黄雪青，杨柳，武伟龙，等 . 针灸联合昂丹司琼片治疗胃肠肿瘤化疗患者胃肠道反应的效果观察 [J]. 中国实用医刊，2023，50（9）：121-123.

（收稿日期：2024-03-09；修回日期：2024-05-13）

南五味子二氯甲烷部位化学成分结构鉴定及对 HepG2 和 INS-1 细胞的影响

冯石卜[1]，王娇娇[1]，姜祎[1, 2]，张化为[1, 2]，宋小妹[1, 2]，黄文丽[1, 2]，谢允东[1]，张东东[1, 2, 4]，李玉泽[1, 2, 4]，邓翀[1, 2, 3, 4*]（1. 陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046；2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室，陕西 咸阳 712046；3. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心，陕西 咸阳 712046；4. 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室，西安 712046）

摘要：目的 探讨南五味子二氯甲烷部位（SDP）对 HepG2 细胞胰岛素抵抗和 INS-1 细胞高糖损伤的影响。**方法** 采用 1×10^{-6} mol·L^{-1} 胰岛素建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗和 30 mmol·L^{-1} 葡萄糖建立 INS-1 细胞高糖损伤模型，并使用不同浓度的南五味子二氯甲烷部位进行干预。检测 HepG2 细胞中三酰甘油（TG）、丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、细胞内活性氧（ROS）、腺苷三磷酸水平（ATP）、葡萄糖水平；检测 INS-1 细胞中 MDA、SOD、过氧化物歧化酶（GSH）、ROS、基础葡萄糖（BIS）和高糖（GSIS）水平；并采用 UPLC-MS/MS 法分析 SDP 中的化学成分。**结果** 经胰岛素诱导 48 h 的 HepG2 细胞，模型组 TG、MDA、ROS 葡萄糖升高（$P<0.01$），SOD、ATP 降低，经 SDP 干预后，TG、MDA、ROS 均有所回调，SOD、ATP 显著升高；经高糖诱导 48 h 的 INS-1 细胞，模型组 MDA、ROS 升高（$P<0.01$），SOD、GSH-Px、BIS、GSIS 降低（$P<0.01$），SDP 干预后 MDA、ROS 回调（$P<0.01$），SOD、GSH-Px、BIS、GSIS 上升（$P<0.01$）。从 SDP 样品中共成功鉴定出 1824 个化学成分，其中 134 个木脂素类、283 个酚酸类、283 个香豆素等其他类化合物，而木脂素类化合物相对含量最高。**结论** SDP 能改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗和 INS-1 细胞高糖损伤，分析了 SDP 化学成分，为防治 T2DM 提供实验依据。

关键词：南五味子；HepG2 细胞；INS-1 细胞；UPLC-MS/MS
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2851-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.003

Structural identification of chemical constituents in the dichloromethane part of Schisandra sphenanthera and their effects on HepG2 and INS-1 cells

FENG Shi-bo[1], WANG Jiao-jiao[1], JIANG Yi[1, 2], ZHANG Hua-wei[1, 2], SONG Xiao-mei[1, 2], HUANG Wen-li[1, 2], XIE Yun-dong[1], ZHANG Dong-dong[1, 2, 4], LI Yu-ze[1, 2, 4], DENG Chong[1, 2, 3, 4*] (1. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Shaanxi Key Laboratory of Basic Chinese Medicine and New Drug Research*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 3. *School of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application and Development Engineering Center for Chinese Herbal Medicine*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 4. *Key Laboratory for Research and Development of* “*Qin Medicine*” *of Shaanxi Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine*, *Xi'an* 712046)

Abstract: Objective To determine the effect of dichloromethane part (SDP) of *Schisandra sphenanthera* on insulin resistance in HepG2 cells and hyperglycaemic injury in INS-1 cells. **Methods** HepG2 cell insulin resistance model was established with 1×10^{-6} mol·L^{-1} insulin and INS-1 cell hyperglycaemic injury model with 30 mmol·L^{-1} glucose. Different concentrations of SDP were used for the intervention. Triglyceride (TG), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase

基金项目：国家自然科学基金（No.82174111）；陕西中医药大学学科创新团队项目（No.2019-YL12）。
作者简介：冯石卜，男，在读硕士研究生，主要从事中草药药效物质基础研究，email：1902273146@qq.com *通信作者：邓翀，男，教授，硕士研究生导师，主要从事中草药药效物质基础研究，email：2051079@sntcm.edu.cn

(SOD), intracellular reactive oxygen species (ROS), adenosine triphosphate level (ATP), and glucose expression levels were detected in HepG2 cells. Levels of MDA, SOD, peroxisomal dismutase (GSH), ROS, basal glucose (BIS), and hyperglycemic (GSIS) expressions were detected in INS-1 cells. Components in SDP were analyzed by UPLC-MS/MS. **Results** In HepG2 cells induced by insulin for 48 h, TG, MDA and ROS glucose were significantly increased ($P < 0.01$) and SOD and ATP were decreased in the Model group. After the SDP intervention, and SOD and ATP were increased. In INS-1 cells induced by high glucose for 48 h, both MDA and ROS were increased ($P < 0.01$) while SOD, GSH-Px, BIS and GSIS were decreased ($P < 0.01$) in the model group. The MDA and ROS were decreased ($P < 0.01$), and SOD, GSH-Px, BIS and GSIS were increased ($P < 0.01$) after SDP intervention. Totally 1824 chemical constituents were successfully identified from the SDP samples, including 134 lignans, 283 phenolic acids, 283 coumarins and other compounds, with the highest relative content of lignans. **Conclusion** SDP improves insulin resistance in HepG2 cells and high glucose injury in INS-1 cells. The chemical compositions of SDP are analyzed to provide reference for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus.

Key words: *Schisandra sphenanthera*; HepG2 cell; INS-1 cell; UPLC-MS/MS

截至 2023 年，我国 2 型糖尿病（T2DM）患者人数为 1.25 亿人，是卫生健康研究的热点 [1]。T2DM 是一种慢性疾病，主要源于胰岛素抵抗或胰腺 β 细胞功能受损，导致相对胰岛素缺乏。常见的 T2DM 症状包括尿频、口渴及液体摄入过多、疲劳、视力模糊、体重异常下降、饥饿感增加以及溃疡愈合缓慢。胰岛素抵抗多发生在肝脏组织以及骨骼肌、脂肪中。若肝脏中发生胰岛素抵抗，则会影响葡萄糖的产生和利用，并会降低糖原的合成速度，无法抑制葡萄糖的产生 [2-3]。有研究发现，慢性高血糖会引起氧化应激从而使胰岛 β 细胞的功能受到损伤，影响 T2DM 的发展 [4]。因此，探讨高糖对胰岛 β 细胞功能的影响以及胰岛素抵抗对肝脏功能的影响，对防治 T2DM 十分重要。

南五味子为木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd.et Wils. 干燥成熟的果实，具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效。现代药理研究已证实，南五味子在改善胰岛素抵抗、抗炎、抗凋亡、抗氧化应激、保护肝脏以及调节糖脂代谢等方面具有积极作用，可通过上述作用防治糖尿病 [5-7]。实验室前期研究发现，南五味子二氯甲烷部位（SDP）具有良好的抗 T2DM 作用 [8]，本文研究 SDP 对体外 HepG2 细胞胰岛素抵抗和 INS-1 细胞高糖损伤的影响，以期为南五味子临床防治糖尿病提供参考。

1 材料

1.1 细胞

HepG2 细胞（赛百慷，货号：iCell-h092），INS-1 细胞（赛百慷，货号：iCell-r036）。

1.2 试药

二甲双胍（上海源叶生物科技有限公司，规格：5 mg/ 瓶）；南五味子采购自陕西省商洛市商州区，经陕西中医药大学药学院姜祎教授鉴定为木兰科华中五味子的干燥成熟果实。MEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胰酶、胰岛素（索莱宝）；胎牛血清（货号：11011-8611，天杭生物）；PBS（货号：BL316A，Biosharp）；三酰甘油试剂盒（南京建成）；ATP 检测试剂盒（货号：S0026，碧云天）；CCK-8 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、葡萄糖测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒、丙二醛（MDA）试剂盒、超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒（万类生物）。

1.3 仪器

超纯水系统（香港 Heal Force 公司）；超速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；CO_2 培养箱（上海力申科学仪器有限公司）；倒置相差显微镜（上海 OLYMPUS 公司）；超净工作台（苏州净化仪器有限公司）；超高效液相色谱（UPLC）（ExionLC AD，https：//sciex.com.cn/）和串联质谱（MS/MS）（美国 AB SCIEX 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞用 10%FBS 的 MEM 培养，INS-1 细胞用 10%FBS 的 RPMI-1640 培养，均于 37 ℃、5%CO_2 的培养箱内培养。

2.2 SDP 的制备

取南五味子 4.0 kg，以 60% 乙醇、16 倍量、1 h 煎煮两次 [9]，回收溶剂将药液减压浓缩至 10 L，药液 - 二氯甲烷（1∶0.8）萃取 5 次，回收溶

剂，得到浸膏 175.8 g，收率 4.395%。

2.3 CCK-8 筛选 SDP 对 HepG2 细胞及 INS-1 细胞药物浓度

将 HepG2 细胞接种于 96 孔板中，每孔细胞数为 5×10^3 个，设置 3 个复孔，并设置空白（NC）组、模型（Mod）组、阳性药二甲双胍（Met）组和给药组，模型组与给药组加入 1×10^{-6} mol·L^{-1} 胰岛素的培养基孵育 48 h[10-11]，给药组再加入 SDP（12.5、25、50、100、200、400、800、1600 μg·mL^{-1}）处理 24 h[12-13]，Met 组加入 1 mmol·L^{-1} 二甲双胍处理 24 h 每孔加入 10 μL CCK-8，培养箱内培养 2 h，采用酶标仪测定其 450 nm 处的 *OD* 值。

将 INS-1 细胞接种于 96 孔板中，每孔细胞数为 5×10^3 个，设置 3 个复孔，加入 30 mmol·L^{-1} 葡萄糖的培养基孵育 48 h[14-15]，再加入 SDP（12.5、25、50、100、200、400、800、1600 μg·mL^{-1}），同时设置空白（NC）组、模型（Mod）组，各处理 24 h[16]，每孔加入 10 μL CCK-8，培养箱内培养 2 h，测定 450 nm 处 *OD* 值。

2.4 检测 HepG2 细胞生化指标

使用相应的试剂盒检测 HepG2 细胞上清液中葡萄糖含量，细胞中 TG、ATP、MDA 含量及 SOD 活性；使用 DCFH-DA 试剂盒检测细胞中 ROS 含量，荧光酶标仪分析结果。

2.5 检测 INS-1 细胞生化指标

使用 KRB 缓冲液孵育 1 h，然后使用含 2.8 mmol·L^{-1} 葡萄糖的 KRB 孵育细胞 1 h，留取上清液（BIS）；再接着用含 16.7 mmol·L^{-1} 葡萄糖的 KRB 孵育 1 h，留取上清液（GSIS）。ELISA 法检测 BIS、GSIS 中胰岛素水平，计算胰岛素释放刺激指数（ISI）= GSIS/BIS；试剂盒检测细胞中 ROS 含量，荧光酶标仪分析结果；试剂盒检测细胞中 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活性。

2.6 UPLC-MS/MS 条件

2.6.1 供试品溶液的制备 精密称取 SDP 样品 100 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入甲醇稀释至刻度线，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得 SDP 待测样品。

2.6.2 UPLC-MS/MS 色谱方法 色谱柱：Agilent SB-C18（1.8 μm，2.1 mm×100 mm）；流动相：A 为超纯水（加入 0.1% 的甲酸），B 为乙腈（加入 0.1% 的甲酸）；洗脱梯度（0.00 min，5%B；9.00 ～ 10.00 min，95%B；10.00 ～ 11.10 min，5%B；并以 5%B 平衡至 14 min）；流速 0.35 mL·min^{-1}；柱温 40 ℃；进样量 2 μL。质谱条件：采用 QTRAP 4500 型三重四极杆质谱仪进行样品的质谱信号采集；扫描模式为正负离子两种（电压范围为－ 4000 ～ 5000 V）；数据采集模式为多反应监测；离子源为电喷雾；离子源温度为 550 ℃；碰撞能电离参数设置为高；碰撞气体为氮气。

2.7 统计学分析

采用 Graphpad prism 8.0.2 软件进行统计分析及绘图。计量数据用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用两样本均数的 *t* 检验，多组间样本均数采用方差分析，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CCK-8 筛选 SDP 对 HepG2 细胞的影响

结果见图 1，随着 SDP 浓度的增加，细胞活性越来越接近空白组，综合考虑后，使用 100、200 和 400 μg·mL^{-1} 进行后续实验，记为 SDP-L、SDP-M 和 SDP-H。

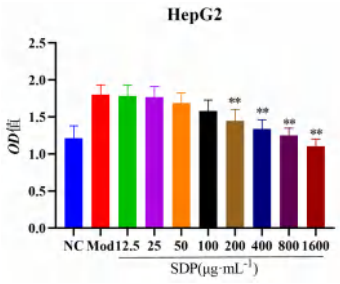


图 1 不同浓度的 SDP 对 HepG2 细胞的影响

Fig 1 Effect of different concentrations of SDP on HepG2 cells

注：与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

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

3.2 CCK-8 筛选 SDP 对 INS-1 细胞的影响

结果见图 2，加入 200、400 和 800 μg·mL^{-1} SDP 的细胞活性较接近空白组，综合考虑后，使用 200、400 和 800 μg·mL^{-1} 进行后续实验，记为 SDP-L、SDP-M 和 SDP-H。

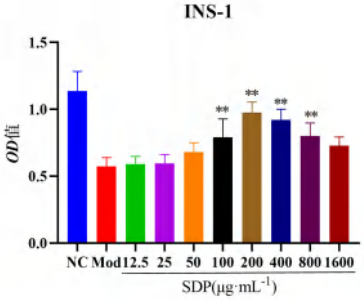


图 2 不同浓度的 SDP 对 INS-1 细胞的影响

Fig 2 Effect of different concentrations of SDP on INS-1 cells

注：与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

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

3.3 SDP 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的影响

图 3 结果显示，与空白组相比，模型组 TG、MDA、ROS 和葡萄糖含量显著升高（$P<0.01$），

SOD 活性及 ATP 含量显著降低（$P < 0.01$）；与模型组相比，阳性组以及 SDP-L、SDP-M 和 SDP-H 组的 TG、MDA、ROS 和葡萄糖含量均有不同程度降低，SOD、ATP 回调（$P < 0.01$），其中 SDP 中、高剂量效果相对较好，使 TG、MDA、ROS 和葡萄糖含量下调（$P < 0.01$），并表现出剂量依赖性。

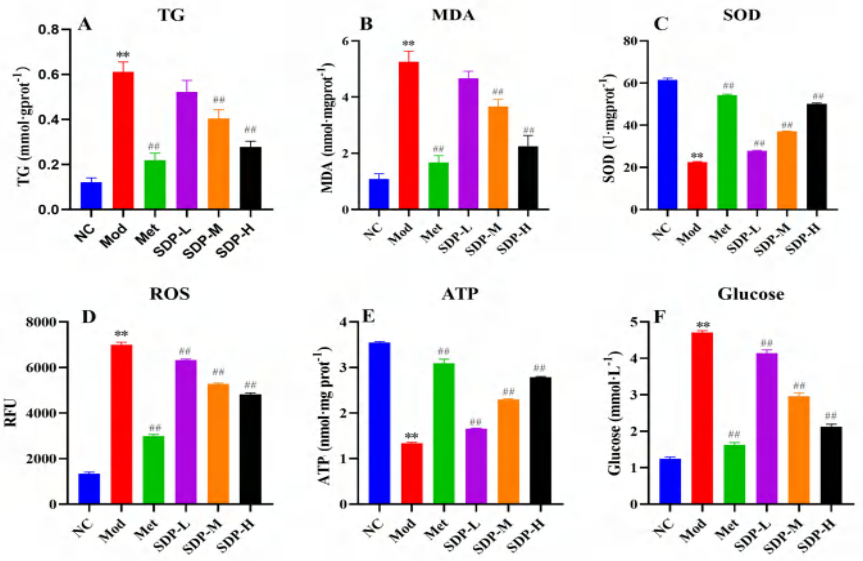


图 3 SDP 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型中 TG、MDA、SOD、ROS、ATP 及葡萄糖的影响

Fig 3 Effect of SDP on TG, MDA, SOD, ROS, ATP and glucose in HepG2 cell insulin resistance

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

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

3.4 SDP 对 INS-1 细胞高糖损伤模型中 MDA、ROS、SOD、GSH-Px 的影响

如图 4 所示，与空白组相比，模型组细胞中 MDA、ROS 含量上升（$P < 0.01$），SOD、GSH-Px 含量下调（$P < 0.01$）；与模型组相比，SDP-L、SDP-M 和 SDP-H 组能降低 MDA、ROS 水平，提高 SOD、GSH-Px 水平（$P < 0.01$）。结果表明，SDP 能提高高糖诱导的 INS-1 细胞抗氧化应激损伤能力，SDP 呈现出剂量依赖性。

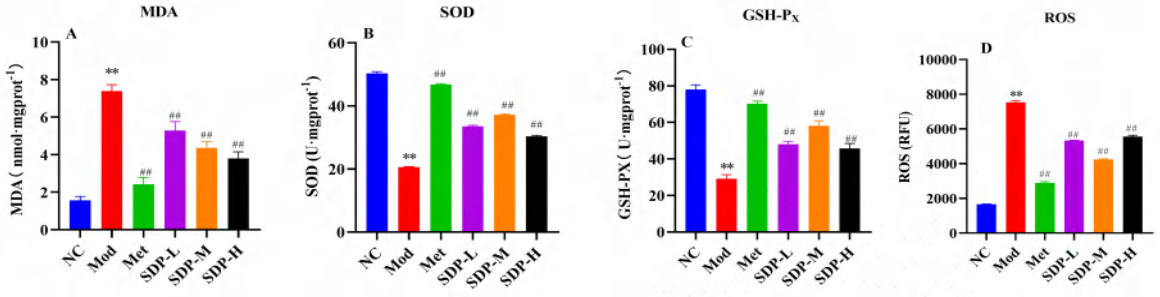


图 4 SDP 对 INS-1 细胞高糖损伤模型中 MDA、SOD、GSH-Px 及 ROS 的影响

Fig 4 Effect of SDP on MDA, SOD, GSH-Px and ROS in hyperglycaemic injury model

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

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

3.5 SDP 对 INS-1 细胞高糖损伤模型中 BIS、GSIS 的影响

如图 5 所示，在低糖与高糖诱导下，与空白组相比，模型组细胞中 BIS、GSIS、ISI 水平显著下调（$P < 0.01$）；与模型组相比，SDP-L、SDP-M 和 SDP-H 组均显著提高了 BIS、GSIS、ISI 水平（$P < 0.01$），SDP-L、SDP-M 和 SDP-H 组细胞在 BIS/GSIS 的状态下分泌出的胰岛素显著增加（$P < 0.01$），表明 SDP 可以提高高糖损伤下 INS-1 细胞在 BIS/GSIS 状态下所分泌的胰岛素量。

3.6 UPLC-MS/MS 结果分析

SDP 样品在正负离子模式下所获得的总离子流图见图 6。经过原始质谱数据的定性定量分析之后，从 SDP 样品中共鉴定出 1824 个化学成分，其中 134 个木脂素类、283 个酚酸类、283 个香豆素、249 个氨基酸、231 个生物碱类、197 个黄

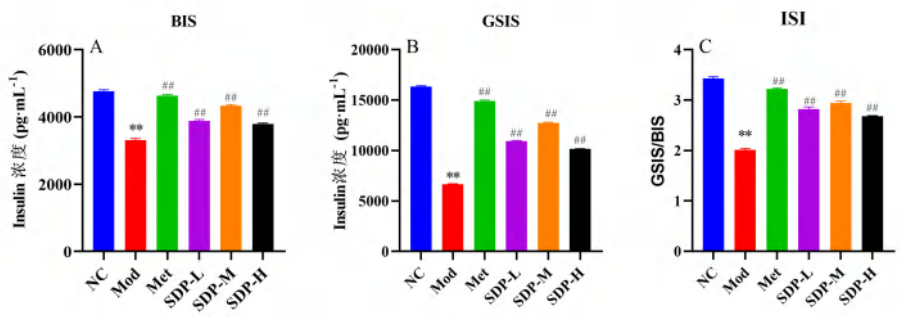


图 5 SDP 对 INS-1 细胞 BIS、GSIS、ISI 水平的影响

Fig 5 Effect of SDP on BIS, GSIS, and ISI levels in INS-1 cells

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

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

酮类、148 个有机酸类、141 个游离脂肪酸、84 个糖类以及 74 个三萜及其衍生物。将 SDP 中相对含量排名前 26 的化学成分汇总成表[17]，详细信息见表 1。

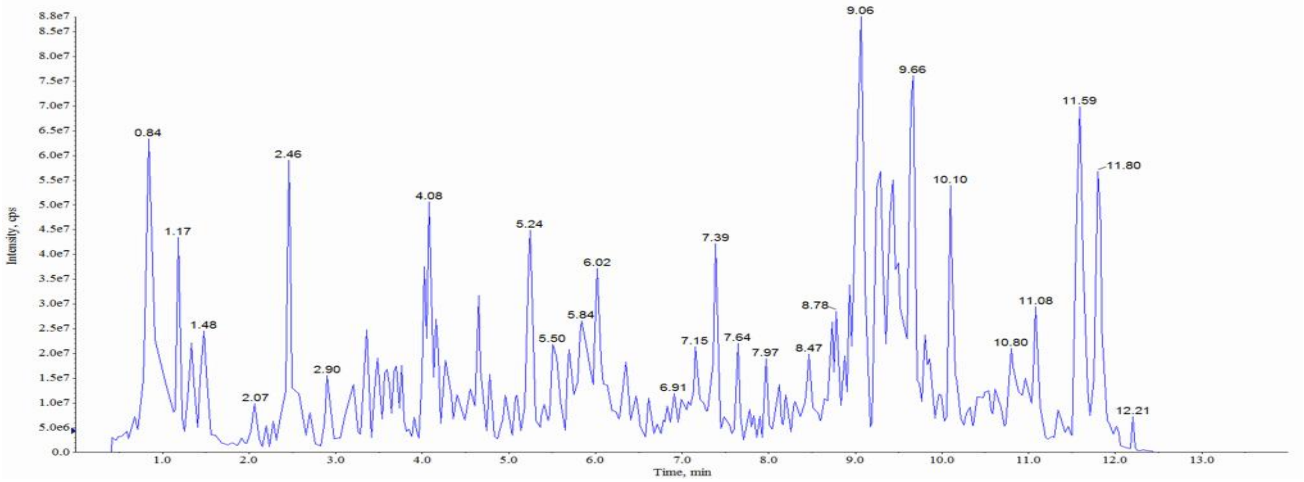


图 6 SDP 在正离子模式下样本质谱检测总离子流图

Fig 6 Total ion flow diagram of SDP in positive ion mode for sample mass spectrometry detection

4 讨论

INS-1 细胞是源自胰岛素瘤的细胞系，具有胰岛素分泌稳定、对氧化应激损伤高度敏感等特点[4]。在糖尿病患者中，血糖不受控制和升高主要是血浆胰岛素水平不足引起的。血浆胰岛素水平的调节通常是由胰岛素清除和β细胞产生分泌共同决定的。正常的胰岛β细胞功能是糖尿病是否发生的重要因素之一。胰岛β细胞损伤和胰岛素抵抗（IR）具有共同的病理基础——氧化应激[17]。因此，有效地干预胰岛β细胞的氧化应激状态并保护其功能，逐渐成为 T2DM 新药研发的重要靶点。氧化应激是指细胞内 ROS 和活性氮自由基的增加，导致细胞脂质过氧化。ROS 产生是细胞正常代谢的一部分，当过量生成的 ROS 超过了内源性抗氧化系统的清除能力时，会导致膜脂类、蛋白质、碳水化合物和 DNA 的氧化损伤[18]。因此，ROS 也被认为是胰岛β细胞损伤的关键因子之一[19-20]；MDA 是膜脂过氧化的最终分解产物，其含量可以反映细胞膜结构和功能上受到损伤的程度。异常的葡萄糖刺激胰岛素分泌是 T2DM 早期的特征，其特点是基础分泌升高和减少对葡萄糖刺激的反应[21-22]。本实验结果显示，经 30 mmol·L^{-1} 葡萄糖处理 48 h 后的 INS-1 细胞，其 ROS、MDA 含量表达明显升高，SOD、GSH-Px、BIS、GSIS 表达明显降低，用 SDP 干预后各指标均有不同程度的回调，说明 SDP 能够减轻 INS-1 细胞高糖损伤的不良影响。

HepG2 细胞是研究 IR 机制及评价药物降糖效果的理想模型[23]。当肝细胞发生 IR 时，会导致葡萄糖的摄取量下降，减少肝糖原的累积，降低脂质的合成，促进其分解[24-25]。本研究结合文献报道，采用 1×10^{-6} mol·L^{-1} 胰岛素对 HepG2 细胞处理 48 h，建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型。研究发现经胰岛素处理后的 HepG2 细胞葡萄糖消耗明显减少，TG 明显升高等糖脂代谢异常状态，说明 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型建立成功。给予

表 1 SDP 化学成分相关信息

Tab 1 SDP chemical composition related information

No.	t_R/min	检测值	理论值	质量误差/$\times10^{-6}$	分子式	MS/MS 碎片	mzVault 最佳匹配	推测成分	类型
1	9.10	403.2115[M+H]$^+$	403.2115	0	$C_{23}H_{30}O_6$	403.2124，371.1918，340.1731，302.1189	1	五味子酚	木脂素
2	9.65	279.2319[M+H]$^+$	279.2319	0	$C_{18}H_{30}O_2$	279.2319，149.1325	3	十八碳 -9*E*，13*E*，15Z- 三烯酸	游离脂肪酸
3	3.26	197.1294[M+H]$^+$	197.1285	4.5655	$C_{10}H_{16}N_2O_2$	197.1271，124.1111，114.9464，72.0792，70.0668	2	环（脯氨酸 - 缬氨酸）	氨基酸及其衍生物
4	1.32	147.0663[M-H]$^-$	147.0663	0	$C_6H_{12}O_4$	147.0658，59.0136，57.0344	1	3，5- 二羟基 -3- 甲基戊酸	有机酸
5	11.10	309.2799[M-H]$^-$	309.2799	0	$C_{20}H_{38}O_2$	309.2806，308.3186，291.1873，134.8943	3	二十碳烯酸	游离脂肪酸
6	11.79	281.2486[M-H]$^-$	281.2486	0	$C_{18}H_{34}O_2$	281.2481，263.2481	1	反油酸	游离脂肪酸
7	11.78	281.2486[M-H]$^-$	281.2486	0	$C_{18}H_{34}O_2$	281.2482，263.2366，210.16，189.9302	1	11- 十八碳烯酸	游离脂肪酸
8	9.96	524.3711[M+H]$^+$	524.3711	0	$C_{26}H_{54}NO_7P$	524.3724，184.0783，104.1099	1	溶血磷脂酰胆碱 18：0	溶血磷脂酰胆碱
9	1.47	117.0193[M-H]$^-$	117.0193	0	$C_4H_6O_4$	117.0191，99.9249，55.0191	1	甲基丙二酸	有机酸
10	4.68	146.0600[M+H]$^+$	146.0600	0	C_9H_7NO	146.0611，118.0699，117.0596，91.0583	3	吲哚 -3- 甲醛	吲哚类生物碱
11	3.72	131.0714[M-H]$^-$	131.0714	0	$C_6H_{12}O_3$	131.0708，85.0652，69.0341	1	2- 羟基异己酸	有机酸
12	1.17	191.0203[M-H]$^-$	191.0197	3.1410	$C_6H_8O_7$	191.0203，111.0093，87.0093，85.03，57.0346	1	异柠檬酸	有机酸
13	4.11	197.0457[M-H]$^-$	197.0455	1.0149	$C_9H_{10}O_5$	197.0448，168.006，123.0079，106.0058，79.0184	1	没食子酸乙酯	酚酸类
14	2.04	117.0193[M-H]$^-$	117.0193	0	$C_4H_6O_4$	117.0193，73.03	1	琥珀酸	有机酸
15	4.73	123.0441[M+H]$^+$	123.0441	0	$C_7H_6O_2$	123.0438，79.0547，51.0245	1	苯甲酸	酚酸类
16	9.25	357.1707[M-H]$^-$	357.1707	0	$C_{21}H_{26}O_5$	357.1688，342.1462，299.1263，270.0875	1	日本南五味子木脂素 C	木脂素
17	4.33	245.1383[M+H]$^+$	245.1285	0.8159	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	245.1283，120.0836，70.0686	1	环（脯氨酸 - 苯丙氨酸）	氨基酸及其衍生物
18	4.63	197.1172[M+H]$^+$	197.1172	0	$C_{11}H_{16}O_3$	197.1167，133.1006	1	黑麦草内酯	倍萜
19	4.33	245.1287[M+H]$^+$	245.1285	0.8159	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	245.1287，120.0838，70.0689	1	环（D- 苯丙氨酸 -L- 脯氨酸）	氨基酸及其衍生物
20	4.34	136.0393[M+H]$^+$	136.0393	0	$C_7H_5NO_2$	136.0399，80.0502，65.0395	3	2- 苯并唑啉酮	生物碱
21	3.14	165.0193[M-H]$^-$	165.0193	0	$C_8H_6O_4$	165.0188，121.0294，77.0405	1	对苯二甲酸	酚酸类
22	9.83	417.2272[M+H]$^+$	417.2272	0	$C_{24}H_{32}O_6$	417.2279，316.1376	1	五味子甲素	木脂素
23	10.57	283.2636[M-H]$^-$	283.2643	2.4711	$C_{18}H_{36}O_2$	283.2135，237.2337，59.0145	3	16- 甲基十七烷酸	游离脂肪酸
24	8.77	485.3272[M-H]$^-$	485.3272	0	$C_{30}H_{46}O_5$	485.3272，467.3182，423.3282	3	2，19- 二羟基 -3- 氧熊果 -12- 烯 -28- 酸	三萜
25	9.83	417.2272[M+H]$^+$	417.2272	0	$C_{24}H_{32}O_6$	417.2279，402.2069，347.152	1	脱氧五味子素	木脂素
26	9.40	329.1751[M+H]$^+$	329.1747	1.2151	$C_{20}H_{24}O_4$	329.1751，175.1128，133.0648	1	安五脂素	木脂素

SDP 及二甲双胍干预后，各组细胞的 TG、MDA、ROS、葡萄糖含量明显降低，SOD 和 ATP 含量升高，说明 SDP 可以减轻 HepG2 细胞的胰岛素抵抗。

本文使用 UPLC-MS/MS 分析了 SDP 中化合物成分，鉴定出 1824 种化合物，其中木脂素类化合物 7 个，且木脂素类化合物相对含量较高，包括五味子酚、日本南五味子木脂素 C、脱氢木脂素和安五脂素等。研究表明，安五脂素能够增加 HepG2 细胞活力，对细胞损伤具有保护作用 [26]；五味子甲素能够减轻 HepG2 细胞中脂质堆积 [27]；五味子、麦冬与山药配伍能促进 HepG2 细胞摄取上清液中葡萄糖，并增加链脲佐菌素致 INS-1 细胞损伤增殖活力，促进细胞修复 [28]；五味子醇甲和五味子丙素能够增强 INS-1 细胞在 GSIS 下的胰岛素分泌 [29]，这与 SDP 对 INS-1 细胞的 GSIS 表达趋势一致，其中五味子丙素对 GSIS 的影响优于 T2DM 的治疗药物格列齐特，并且五味子丙素能够增加 HepG2 细胞和骨骼肌细胞对葡萄糖摄取活性来改善高血糖，其作用可能依赖于 PI3K/AKT 信号通路 [30]。前期使用紫外分光光度仪检测 SDP 中总木脂素含量，测得 SDP 中总木脂素含量约为 43%。根据文献报道及本研究，推测可

能是木脂素类化合物发挥抗糖尿病作用，从而减轻 INS-1 细胞高糖损伤、HepG2 细胞胰岛素抵抗的病理状态。

参考文献

[1] 马丽媛，王增武，樊静，等 .《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读 [J]. 中国全科医学，2023，26（32）：3975-3994.

[2] 王中群 . 重视糖尿病大血管并发症的发病、机制、评估与防治研究 [J]. 中南医学科学杂志，2022，50（1）：1-6.

[3] 李凡念，张文静，郝帅，等 . 藻蓝色素对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢的影响 [J]. 食品科学技术学报，2023，41（3）：54-63.

[4] 钟询龙，徐玮，梁文意，等 . 二至丸对 H_2O_2 诱导的 INS-1 胰岛β细胞氧化应激损伤的影响 [J]. 中药新药与临床药理，2020，31（9）：1008-1014.

[5] 邓翀，南美娟，张化为，等 . 醋制南五味子调节 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢活性部位筛选 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（10）：4658-4662.

[6] 董奥，谭小月，孔琪，等 . 五味子醇提液对糖尿病肾病小鼠氧化应激的保护作用及机制研究 [J]. 中草药，2019，50（24）：6038-6044.

[7] 刘媛媛，黄仕其，李玉泽，等 . 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药，2022，53（6）：1903-1918.

[8] 邓翀，南美娟，张化为，等 . 体内外相结合筛选醋制南五味子抗糖尿病活性部位 [J]. 天然产物研究与开发，2017，29（3）：393-399.

[9] 邓翀，郑洁，姜祎，等 . 醋蒸对南五味子木脂素类成分在大鼠肝脏分布的影响 [J]. 中成药，2015，37（1）：145-149.

[10] Islam R，Kim JG，Park Y，et al. Insulin induces phosphorylation of pyruvate dehydrogenase through RhoA activation pathway in HepG2 cells [J]. FASEB J，2019，33（2）：2072-2083.

[11] Mao ZJ，Lin M，Zhang X，et al. Combined use of astragalus polysaccharide and berberine attenuates insulin resistance in IR-HepG2 cells via regulation of the gluconeogenesis signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2019，10：1508.

[12] 谢燕，李贵平，段月阳，等 . 泽泻提取物改善游离脂肪酸诱导的 HepG2 脂肪变性细胞模型的脂质代谢及氧化应激异常 [J]. 中草药，2024，55（6）：2002-2012.

[13] 江旻，陈李霞，洪超，等 . 重楼皂苷Ⅰ凝结 HepG2 细胞膜胆固醇增加阿霉素敏感性的研究 [J]. 中成药，2024，46（3）：971-976.

[14] Song ZF，Wang H，Zhu L，et al. Curcumin improves high glucose-induced INS-1 cell insulin resistance via activation of insulin signaling [J]. Food Funct，2015，6（2）：461-469.

[15] Winzell MS，Svensson H，Arner P，et al. The expression of hormone-sensitive lipase in clonal beta-cells and rat islets is induced by long-term exposure to high glucose [J]. Diabetes，2001，50（10）：2225-2230.

[16] 肖鑫，许文华，张小清，等 . 梓醇干预 H_2O_2 诱导 INS-1 胰岛β细胞氧化损伤的抗氧化、抗凋亡效应及分子机制 [J]. 中国中药杂志，2022，47（16）：4403-4410.

[17] 梁光平，胡恩明，唐文茜，等 . 猕猴桃根抗结肠癌活性提取物的筛选及其成分分析 [J]. 生物资源，2023，45（3）：250-258.

[18] 钟艳梅，陈坚平，钟静君，等 . 知母总皂苷对 INS-1 胰岛β细胞功能的影响 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（6）：2631-2633.

[19] 贺海波，江伟杰，赵东晓，等 . 青钱柳不同溶剂提取物对高糖诱导大鼠胰岛细胞损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床，2021，37（3）：113-120.

[20] Wang X，Huan Y，Li CN，et al. Diphenyl diselenide alleviates diabetic peripheral neuropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes by modulating oxidative stress [J]. Biochem Pharmacol，2020，182：114221.

[21] Hossain U，Das A，Ghosh S，et al. An overview on the role of bioactive alpha-glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications [J]. Food Chem Toxicol，2020，145：111738.

[22] Elghazi L，Rachdi L，Weiss A，et al. Regulation of beta-cell mass and function by the Akt/protein kinase B signalling pathway [J]. Diabetes Obes Metab，2007，9（Suppl）2：147-157.

[23] 叶开和，王婧茹，马锦锦，等 . 番石榴酸对 INS-1 胰岛β细胞增殖、胰岛素合成与分泌的促进作用及其机制分析 [J]. 中国药理学通报，2014，30（12）：1681-1687.

[24] Cordero-Herrera I，Martin M，Goya L，et al. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells [J]. Food Chem Toxicol，2014，64：10-19.

[25] 李秀丽，贺嵩敏，朱莹，等 . HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（5）：203-207.

[26] 闫冠池，王秀阁，王国强，等 . 苦酸通调方对 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型中 IRS-1、PI3K、Akt 蛋白表达的影响 [J]. 中国老年学杂志，2020，40（2）：392-395.

[27] Gao JP，Yu ZP，Jing S，et al. Protective effect of Anwulignan against D-galactose-induced hepatic injury through activating p38 MAPK-Nrf2-HO-1 pathway in mice [J]. Clin Interv Aging，2018，13：1859-1869.

[28] 冯亚茹 . 五味子甲素改善小鼠非酒精性脂肪肝的机制研究 [D]. 上海：上海中医药大学，2021.

[29] 席啸虎，王世伟，高建平 . 基于成分变化和体外降糖活性优选麦冬的“酸甘化阴”配伍比例和提取工艺研究 [J]. 药物分析杂志，2022，42（8）：1407-1417.

[30] Lee D，Kim YM，Kim HW，et al. Schisandrin C affects glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells and glucose uptake in skeletal muscle cells [J]. Molecules，2021，26（21）：6509.

[31] Zhang J，Shi LL，Zheng YN，et al. Dibenzocyclooctadiene lignans from Fructus Schisandrae Chinensis improve glucose uptake in vitro [J]. Nat Prod Commun，2010，5（2）：231-234.

（收稿日期：2024-03-21；修回日期：2024-06-20）

南五味子多糖对高糖损伤 INS-1 细胞及糖尿病小鼠的改善作用

王娇娇[1]，康惠丽[1]，冯石卜[1]，姜祎[1, 2]，宋小妹[1, 2]，邓翀[1, 2, 3, 4*]（1. 陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046；2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室，陕西 咸阳 712046；3. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心，陕西 咸阳 712046；4. 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 结合体内外实验研究南五味子多糖（SSP）对高糖损伤大鼠胰岛细胞瘤细胞系 INS-1 细胞及糖尿病小鼠的影响，以期为防治糖尿病提供理论支持。**方法** SSP 干预高糖损伤 INS-1 细胞，采用 CCK8 法检测各组细胞活力，ELISA 法测定细胞上清液胰岛素含量，比色法检测 SOD 及 GSH-Px 活性与 MDA 含量，DCFH-DA 荧光探针法检测 ROS 水平。建立糖尿病小鼠模型，随机分为 NC 组、Mod 组、Met 组、SSP-Low 组、SSP-Hig 组。给药 21 d，记录小鼠体重变化。给药结束后，检测小鼠口服葡萄糖耐量、SOD 活性和胰岛素水平以及胰腺组织病理变化。**结果** 对于高糖损伤的 INS-1 细胞，SSP 能够提高胰岛素分泌水平（$P < 0.01$），使 SOD 及 GSH-Px 活性显著上升（$P < 0.01$），MDA 含量和 ROS 水平显著下降（$P < 0.01$）；对于糖尿病小鼠，SSP 能够升高体重，改善糖耐量异常，使胰岛素水平和 SOD 活性增加（$P < 0.05$），胰岛内细胞数量增多，改善胰岛形态。**结论** 南五味子多糖对高糖损伤的 INS-1 细胞和糖尿病小鼠具有改善作用，值得进一步深入研究。

关键词：南五味子多糖；INS-1 细胞；糖尿病
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2858-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.004

Amelioration of Schisandra sphenanthera polysaccharides on high glucose-induced damage in INS-1 cells and diabetic mice

WANG Jiao-jiao[1], KANG Hui-li[1], FENG Shi-bo[1], JIANG Yi[1, 2], SONG Xiao-mei[1, 2], DENG Chong[1, 2, 3, 4*] (1. *College of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Shaanxi Key Laboratory Lab of Chinese Medicine Fundamentals and New Drugs Research*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 3. *College of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 4. *Key Laboratory for Research and Development of* “*Qin Medicine*” *of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To determine the effect of Schisandra sphenanthera polysaccharides (SSP) on high glucose-induced damage in INS-1 cells, a rat insulinoma cell line, and diabetic mice by a combination of in vivo and in vitro experiments to provide theoretical support for preventing and treating diabetes. **Methods** SSP was used to intervene in high glucose damaged INS-1 cells. The cell survival rate in each group was assessed with CCK8 method, while insulin secretion from the cell supernatant was measured by ELISA method. SOD and GSH-Px activities and MDA content were assessed by colorimetrics, while the ROS level of the cells was measured with the DCFH-DA fluorescent probe method. Diabetic mouse models were established and randomly divided into an NC group, a Model group, a Met group, an SSP-low group and an SSP-high group. SSP was administered for 21 d, and the weight changes in mice were monitored. At the end of SSP administration, the oral glucose tolerance, SOD activity and insulin level for mice, and pancreatic histopathological changes were tested. **Results** For high glucose damaged INS-

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82174111）。
作者简介：王娇娇，女，在读硕士研究生，主要从事中草药药效物质基础研究，email：wjjlby1228@163.com *通信作者：邓翀，男，教授，硕士研究生导师，主要从事中草药药效物质基础研究，email：2051079@sntcm.edu.cn

1 cells, SSP increased the insulin secretion level ($P < 0.01$), which led to a notable increase in SOD and GSH-Px activities ($P < 0.01$), and a notable decrease in MDA content and ROS level ($P < 0.01$). For diabetic mice, SSP elevated their body weight and improved the glucose intolerance. It also increased the insulin level and SOD activity ($P < 0.05$), and the number of islet endocytosis and improved islet morphology. **Conclusion** SSP may ameliorate the high glucose-induced damage in INS-1 cells and diabetic mice, which deserves in-depth study.

Key words: Schisandra sphenanthera polysaccharide; INS-1 cell; diabetes

近年来，随着人们生活水平提高，生活方式改变，糖尿病患者逐年增多[1-2]。糖尿病主要分为 1 型糖尿病和 2 型糖尿病，1 型糖尿病患者占 5% ～ 10%，此病的发生是由于患者胰岛 β 细胞自身免疫性损伤从而引起胰岛素绝对分泌不足，又称胰岛素依赖型糖尿病（IDDM）[3-6]。1 型糖尿病的治疗以每日注射重组胰岛素为主，重组胰岛素能够大幅延长患者的生命，但是有较大的副作用，目前还无有效的手段能够阻断自身免疫进程对胰岛的攻击以及延缓早期患者疾病的进展[7-8]。近年来，以“药食同源”物质及其提取物用于预防和辅助治疗糖尿病已成当下研究热点[9]。

南五味子为木兰科植物华中五味子（*Schisandra sphenanthera* Rehd.et Wils）的干燥成熟果实[10-11]。味酸、性温[12]，分布广泛，主产于河南、陕西、湖北、安徽、山西、甘肃等地[13]，具有收敛固涩、补肾宁心、益气生津的功效，在传统中医药中常用其干燥成熟果实治疗咳嗽、腹泻、盗汗、失眠等症状[14]。南五味子中主要含有木脂素、萜类、多糖、有机酸、挥发油等化学成分[15]。现代药理研究表明，南五味子具有降血糖、降血脂、抗氧化、抗炎、保肝活性[16-17]。目前文献对南五味子木脂素成分的报道较多，而对其水溶性成分多糖的研究相对较少。本实验采用体内外结合的方法探究南五味子多糖（SSP）对高糖损伤 INS-1 细胞和糖尿病小鼠的影响，以期为 SSP 的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 试药

柠檬酸（批号：20200515，天津市科密欧化学试剂有限公司）；柠檬酸钠（批号：20200318，天津市天力化学试剂有限公司）；葡萄糖注射液（批号：C230508H1，湖北科伦药业有限公司）；链脲佐菌素（STZ，批号：S0130，Sigma）；盐酸二甲双胍片 [ACL1030 默克制药（江苏）有限公司]；大鼠胰岛素（Insulin）ELISA Kit（武汉菲恩）；超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒（货号：WLA110）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒（货号：WLA107）、丙二醛（MDA）试剂盒（货号：WLA048）、活性氧（ROS）检测试剂盒（DCFH-DA）(货号：WLA131)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（货号：WLA004）(万类生物科技有限公司）；南五味子购于西安药材市场，经陕西中医药大学颜永刚教授鉴定为华中五味子干燥成熟果实。

1.2 仪器

EX125ZH 型电子分析天平（奥豪斯仪器有限公司）；DH36001B 型电热恒温培养箱（天津泰斯特）；98-1-B 型电子调温电热套（天津市泰斯特仪器有限公司）；Proline 型微量移液器（BIOHIT）、ISO2013 型血糖仪罗氏集团有限公司、SynergyH1 型多功能酶标仪（BIOTEK）；JT-12S 型组织自动脱水机、JB-L5 型石蜡饱机、JK-6 型生物组织摊烤片机（武汉俊杰电子有限公司）；RM2016 石蜡切片机、BX51 型显微镜（日本奥林巴斯）。

1.3 动物与细胞株

SPF 级雄性昆明小鼠 [4 周龄，体重 18 ～ 22 g，购于成都达硕实验动物有限公司，动物许可证号：SCXK（川）2020-030，获陕西中医药大学动物伦理委员会批准，批件号：SUCMDL20230406001]；INS-1 细胞（赛百慷，货号：iCell-r036）。

2 方法

2.1 SSP 样品的制备

参考并改进文献方法[18]提取南五味子多糖。称取干燥南五味子果实 300 g，粉碎，加入 10 倍量的 95% 乙醇回流提取两次，每次 1 h。过滤，收集药渣并烘干，分别加入 10 倍量的水煎煮药渣三次，每次 1 h，过滤，合并滤液，将滤液过 AB-8 柱，收集过柱液，浓缩，加入无水乙醇至醇浓度为 85%，冷藏静置 24 h，过滤，烘干得 SSP 粉末 18.69 g，得率为 6.23%。经苯酚 - 硫酸法测得多糖含量为 431.5 mg • g^{-1}。

2.2 SSP 对高糖损伤 INS-1 细胞的影响

2.2.1 SSP 对高糖损伤 INS-1 细胞存活率的检测

大鼠胰岛细胞瘤细胞系 INS-1 于含 10% 胎牛血清、100 U • mL^{-1} 青 / 链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中在 37 ℃、5%CO_2 培养箱培养。选择对数生长期

细胞加入含有 30 mmol • L^{-1} 葡萄糖的培养基孵育 48 h，再加入 SSP（12.5、25、50、100、200、400、800、1600 μg • L^{-1}）处理 24 h，模型组（Mod）为不加 SSP 的高糖损伤 INS-1 细胞，空白（NC）组为空白培养基。利用 CCK8 法和多功能酶标仪在 490 nm 下测定每组细胞的吸光度（*A*），分别计算各处理组的细胞活力 [19]。

2.2.2 SSP 对高糖损伤 INS-1 细胞中 SOD、GSP-Px、MDA 和 ROS 的检测 将胰岛 *β* 细胞分为 5 组接种于 96 孔板中，常规培养 INS-1 细胞作为空白组（NC 组），含 30 mmol • L^{-1} 葡萄糖培养液培养高糖损伤细胞作为模型组（Mod 组），给药组和阳性组在模型组的基础上分别加入 200、400 μg • L^{-1} 南五味子多糖（记为：SSP-Low、SSP-Hig 组）和二甲双胍组（Met 组）。处理结束后收集细胞。

各组细胞使用 KRB 缓冲液孵育 1 h，然后使用含 2.8 mmol • L^{-1} 葡萄糖的 KRB 孵育细胞 1 h，留取上清液；再用含 16.7 mmol • L^{-1} 葡萄糖的 KRB 孵育 1 h，留取上清液 [20]。ELISA 法检测上清液中胰岛素水平，计算胰岛素释放刺激指数（ISI）＝高糖刺激下胰岛素分泌水平（GSIS）/ 低糖刺激下胰岛素分泌水平（BIS）。

根据试剂盒说明书采用比色法检测 SOD 及 GSH-Px 活性与 MDA 含量，DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内的 ROS 水平 [21]。

2.3 SSP 对糖尿病小鼠的影响

2.3.1 分组给药及糖尿病小鼠模型的建立 选取体重 18 ～ 22 g 的 SPF 级小鼠 50 只，喂养一周后随机抽取 10 只小鼠作为空白组（NC 组），其余小鼠禁食不禁水 12 h，快速腹腔注射 STZ 150 mg • kg^{-1}（1% 的 STZ 无菌溶液使用 4 ℃预冷的 0.1 mol • L^{-1} 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液配制，pH 4.2 ～ 4.5），NC 组仅注射等体积的柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲溶液。3 d 后，全部小鼠禁食自由饮水，12 h 后尾部采血测定空腹血糖；3 d 后再次测定其空腹血糖值。以血糖浓度≥ 11.1 mmol • L^{-1} 为成模指标。

将造模成功的小鼠按体重、血糖随机分为 4 组，分别为模型组（Mod 组），阳性二甲双胍组（Met 组），南五味子多糖低（311.5 mg • kg^{-1}）剂量组（SSP-Low 组）、南五味子多糖高（623 mg • kg^{-1}）剂量组（SSP-Hig 组），NC 组和 Mod 组每日灌胃一定量的加 0.5% 的羧甲基纤维素钠的纯净水，连续给药 3 周，其间小鼠自由饮水和进食 [22]。

2.3.2 样本的制备 给药 3 周后，所有小鼠禁食且自由饮水 12 h，眼球取血，处死各组小鼠后，剪开腹腔迅速用剪刀分离胰腺、肝脏，生理盐水冲洗，擦净，称重，称重结束后取胰腺部位在 4% 多聚甲醛中固定，血液样本室温下放置 30 min，8000 r • min^{-1} 离心 15 min，缓慢拿出，吸取上清液装于 EP 管中，－ 80 ℃储存，备用。

2.3.3 小鼠的一般状态 观测小鼠的毛色光泽、体型、活动量、进食和饮水等健康及日常行为状况，每 3 d 记录一次小鼠的体重。

2.3.4 葡糖糖耐量实验（OGTT） 给药干预 3 周后，所有小鼠禁食 12 h，测定空腹血糖，灌胃 2 g • kg^{-1} 葡萄糖溶液，依次测定小鼠灌胃后 0、30、60、120 min 的血糖值，并绘制 OGTT 曲线。

2.3.5 生化指标的测定 采用上海酶联公司的试剂盒检测小鼠血清胰岛素（FINS）水平。肝脏中 SOD 采用试剂盒测定。

2.3.6 胰腺染色 将胰腺组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中 24 h，随后室温下进行乙醇梯度脱水，二甲苯透明、两次浸蜡、常规石蜡包埋、5 μm 左右切片进行 HE 染色，400 倍光学显微镜下观察组织形态。

2.4 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0.2 软件进行分析绘图。数据用均数 ± 标准差表示。多组间样本均数采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 SSP 对高糖损伤 INS-1 细胞的影响

3.1.1 CCK8 法检测各组细胞活力 结果如图 1 所示，与 Mod 组比较，SSP 200、400、800 μg • L^{-1} 组细胞活力显著升高（$P < 0.01$），选择浓度为 200、400 μg • L^{-1} 的多糖溶液进行后续实验。

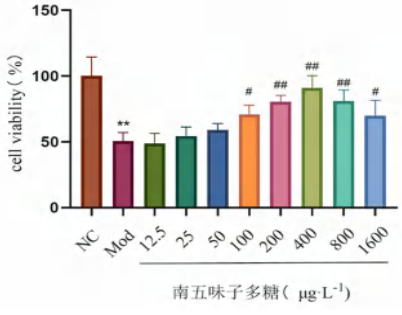


图 1 SSP 对高糖损伤 INS-1 细胞存活率的影响（$n = 3$）

Fig 1 Effect of Schisandra sphenanthera polysaccharide on high-glucose induced INS-1 cells viability（$n = 3$）

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

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

3.1.2 SSP 对高糖损伤 INS-1 细胞胰岛素分泌水平的影响 结果见图 2，在 2.8、16.7 mmol • L^{-1} 葡

萄糖刺激下，与 NC 组相比，Mod 组胰岛素分泌水平、ISI 显著降低（$P < 0.01$）；与 Mod 组比较，各给药组胰岛素分泌水平和胰岛素释放刺激指数显著升高（$P < 0.01$）。

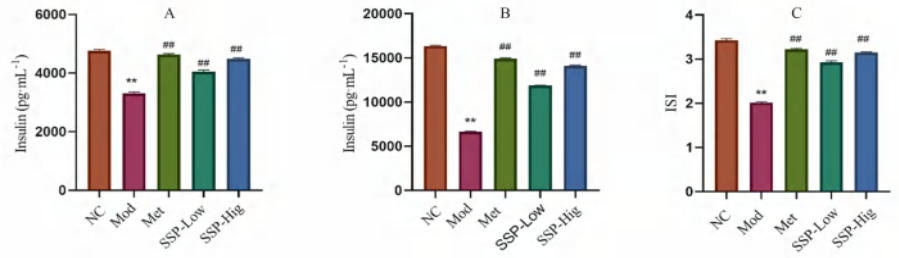


图 2　各组细胞在低糖（A）、高糖（B）刺激下胰岛素的分泌水平及胰岛素释放刺激指数（C）（$n = 3$）

Fig 2　Insulin secretion level in each group under stimulation of low（A）and high（B）sugar and insulin release stimulation index（C）of cells（$n = 3$）

注：与 NC 组相比，$^{**}P < 0.01$；与 Mod 组相比，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

3.1.3　SSP 对高糖损伤 INS-1 细胞 SOD 及 GSH-Px 活性和 MDA 含量、ROS 水平的影响　结果见图 3，与 NC 组相比，Mod 组细胞上清液中 SOD 及 GSH-Px 活性显著降低（$P < 0.01$），MDA 含量和 ROS 水平显著上升（$P < 0.01$）；与 Mod 组相比，各给药组 SOD 及 GSH-Px 活性显著上升（$P < 0.01$），MDA 含量和 ROS 水平显著下降（$P < 0.01$）。

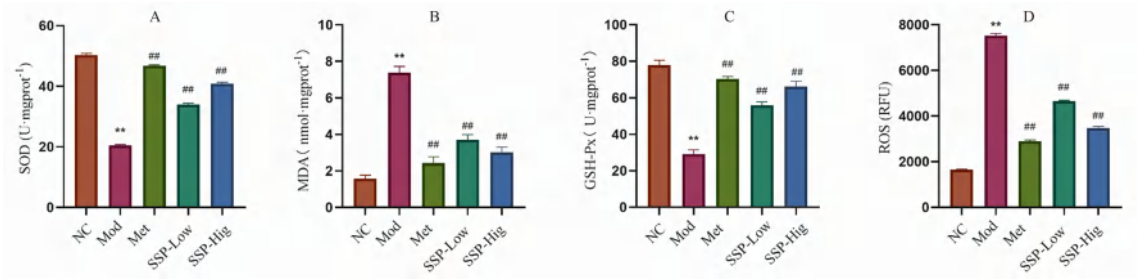


图 3　各组细胞上清液中 SOD（A）、GSH-Px（B）的活性，MDA 的含量（C）以及 ROS 的水平（D）（$n = 3$）

Fig 3　SOD（A）and GSH-Px（B）activities，MDA content（C）and ROS levels（D）in cell supernatants of each group（$n = 3$）

注：与 NC 组相比，$^{**}P < 0.01$；与 Mod 组相比，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

3.2　SSP 对糖尿病小鼠的影响

3.2.1　SSP 对小鼠一般状态及体重的影响　NC 组小鼠摄食和饮水正常，垫料保持干燥，精神状态活泼健康，毛色光亮，身体活动程度良好，且对外界刺激反应较快；Mod 组小鼠的毛色脱落枯黄，饮水摄食量增加、多尿垫料潮湿，行为迟钝，给药干预后，小鼠的精神状况，活跃度，毛色等均有所改善，从造模成功开始，各给药组小鼠的体重显著高于模型组（$P < 0.05$），见图 4。

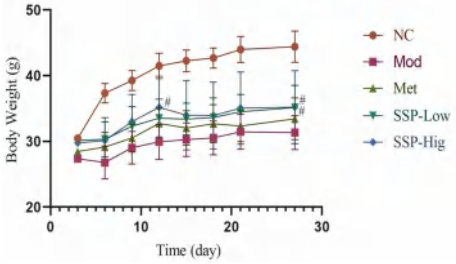


图 4　南五味子多糖对糖尿病小鼠体重的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$，$^{\#}P < 0.05$）

Fig 4　Effect of Schisandra sphenanthera polysaccharides on body weight in diabetic mices（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$，$^{\#}P < 0.05$）

3.2.2　SSP 对各组小鼠 OGTT 的影响　与 NC 组相比，Mod 组小鼠在灌胃葡萄糖时的各时间点的血糖水平均显著高于 NC 组小鼠（$P < 0.01$），OGTT 进行 0 min 时各给药组小鼠血糖均低于 Mod 组；30 min 时各组小鼠血糖显著升高；在葡萄糖耐量 60 min 时，各给药组小鼠血糖水平开始下降，但无显著差异（$P > 0.05$）；当 120 min 时，与 Mod 组相比，SSP-Low 组小鼠血糖值显著降低（$P < 0.05$），见图 5。

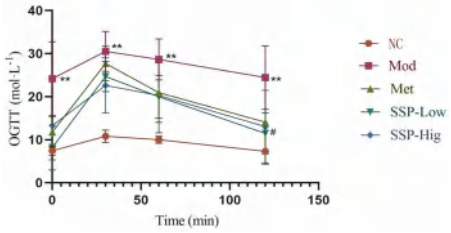


图 5　南五味子多糖对糖尿病小鼠 OGTT 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig 5　Effect of Schisandra sphenanthera polysaccharides on OGTT in diabetic mice（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

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

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

3.2.3 SSP 对各组小鼠胰岛素水平的影响 结果如图 6 所示，与 NC 组相比，Mod 组小鼠的空腹胰岛素水平显著降低（$P < 0.01$），与 Mod 组相比，Met 组、SSP-Hig 组，SSP-Low 组小鼠空腹胰岛素水平显著上升（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

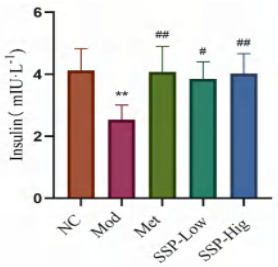


图 6 南五味子多糖对糖尿病小鼠胰岛素水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 6 Effect of Schisandra sphenanthera polysaccharides on insulin level in diabetic mice（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

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

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

3.2.4 SSP 对各组小鼠 SOD 的影响 如图 7 所示，Mod 组小鼠肝脏中 SOD 活性相比于 NC 组显著降低（$P < 0.05$），与 Mod 组相比，各给药组 SOD 活性明显上升（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

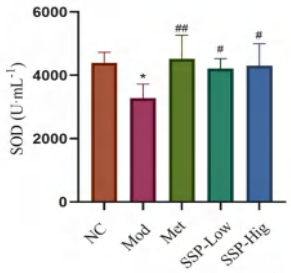


图 7 南五味子多糖对糖尿病小鼠 SOD 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 7 Effect of Schisandra sphenanthera polysaccharides on SOD level in diabetic mices（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

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

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

3.2.5 SSP 对小鼠的组织形态学的影响 如图 8 所示，NC 组小鼠胰腺中具有圆形或者椭圆形的胰岛，而且结构完整、规范、边界清晰，大量的胰岛 β 细胞均匀地分布在胰岛内，细胞形态充实，饱满充盈、排列紧凑；而 Mod 组小鼠胰岛受到严重损害，边界不清，细胞团总量较少，胰岛 β 细胞肿胀、变形。经过给药治疗后，南五味子多糖干预组小鼠胰岛变性有所改善，胰岛内细胞数量有所增加。

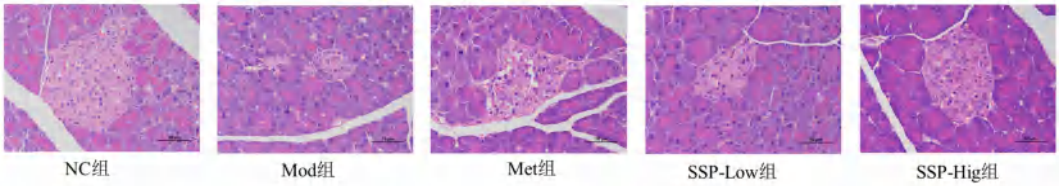


图 8 1 型糖尿病小鼠胰腺病理组织切片（HE 染色，×400）

Fig 8 Histopathology examination of pancreatic in diabetes mellitus type 1 mices（HE staining，×400）

4 讨论

目前，糖尿病已成为一个日益严重的全球健康问题，长期的高血糖升高引起并发症，造成患者身体损伤以及各器官组织的衰竭，严重影响患者的生活质量，给个人甚至社会经济带来严重的负担 [23-24]。

胰岛 β 细胞是专门生成和分泌胰岛素来调节血糖水平的内分泌细胞，其主要功能是感知循环中的营养物质，并通过释放足量的胰岛素对循环中的营养物质水平作出反应，以确保各器官对营养物质的适当吸收和利用，但当机体持续处于高糖水平，可能会导致胰岛 β 细胞功能障碍甚至死亡 [25-26]。同时高糖情况可诱导机体产生氧化应激，氧化应激是由于 ROS 的产生和清除之间的不平衡而发生的，在葡萄糖代谢紊乱中起关键作用，其通过引发胰岛 β 细胞和线粒体功能障碍，导致正常胰岛素信号通路受损，降低 GLUT-4 表达，加剧炎症反应等多种机制降低外周胰岛素敏感性，促进糖尿病发生 [27]。糖尿病患者胰岛 β 细胞自身抗氧化能力较低，长期的氧化应激易诱发慢性炎症损伤胰岛 β 细胞，从而可能导致血糖不受控制 [28]。高血糖、高血脂及炎症都是导致胰岛 β 细胞产生 ROS 的有效因素。因此，高血糖、胰岛 β 细胞损伤、氧化应激和糖尿病之间形成了恶性循环。

中药中多糖类成分大多具有降血脂、降血糖的作用，通过抗氧化、抗炎、促进葡萄糖转运等方式改善胰岛素抵抗，治疗糖尿病 [29]。常悦等 [30] 发现杨树桑黄多糖能够调节血糖水平，降低血脂，减少胰岛素抵抗。李佳雪等 [31] 研究发现灵芝多糖可以缓解糖尿病引发的氧化应激，改善长期高血糖导致的肝脏损伤。刘枘岢等 [32] 的研究表明五味子多糖可能通过调控 AMPK、Nrf2，抑制硫氧还蛋白相互作用蛋白（TXNIP）发挥抗糖尿病作用。已有大量实验证明药食同源中药多糖在糖尿病的治疗中发挥着积极作用，可有效降低血糖，减缓糖尿病症状 [33]。多糖的安全无毒特征使

其在治疗糖尿病时具有更大的优势。

本研究结果显示南五味子多糖可提高高糖损伤 INS-1 细胞的存活率，增加 SOD 和 GSH-Px 活性，降低 MDA 含量和 ROS 水平，提示可能是通过增强细胞内的抗氧化酶活性和抑制脂质过氧化来减少高糖诱导的氧化应激损伤；同时能够提高糖尿病小鼠体重，改善糖耐量异常，提高胰岛素水平和 SOD 含量，增加胰岛内 β 细胞数量，改善胰岛形态。这表明，南五味子多糖具有治疗糖尿病的潜力，推测其可能是通过增强糖尿病小鼠的抗氧化能力、减少胰岛 β 细胞的损伤而改善糖尿病症状，为南五味子多糖的应用提供了基础。

参考文献

[1] 胡馨予，卢文倩，孙晓琪，等 . 宁夏枸杞水提物对四氧嘧啶诱导糖尿病小鼠的降糖作用 [J]. 食品与生物技术学报，2019，38（3）：91-96.

[2] 陆东裕，赵燕琳，金鹏，等 . 桑叶联合二甲双胍对 2 型糖尿病小鼠的糖脂代谢、炎症及肠道微生物的影响 [J]. 中南药学，2023，21（10）：2560-2569.

[3] 冯一帆，吴励萍，张祎盈，等 . 杞丹方对糖尿病小鼠降血糖作用及机制研究 [J]. 南京中医药大学学报，2022，38（6）：504-510.

[4] 郑海珍，吴春芳，林养，等 . 糖尿病自身抗体、CRP 及脂联素在糖尿病患者中的诊断价值 [J]. 名医，2022，（16）：99-101.

[5] 崔帅帅，杨晓红 . miRNA 在骨髓间充质干细胞自我更新、多向分化及命运和功能调控中的作用 [J]. 中国组织工程研究，2022，26（1）：101-105.

[6] Camaya I，Donnelly S，O’Brien B. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic β-cells to enhance their survival and function：an emerging therapeutic strategy for type 1 diabetes [J]. J Diabetes，2022，14（4）：247-260.

[7] 邢朝凤，唐敏怡，徐绮华，等 . ω-3 多不饱和脂肪酸促进 1 型糖尿病模型小鼠胰岛 β 细胞再生的作用研究 [J]. 中国药理学通报，2023，39（11）：2141-2148.

[8] 韩丽男 . 知母 - 黄柏通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活改善糖尿病小鼠学习记忆能力 [D]. 哈尔滨：哈尔滨商业大学，2024.

[9] 许丁凡，周武 . 唐古特白刺化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 华西药学杂志，2023，38（4）：455-463.

[10] 李凡 . 南五味子抗哮喘的药效物质基础及活性初探 [D]. 北京：北京协和医学院，2022.

[11] 强毅，杜心怡，崔浪军，等 . 秦岭华中五味子生境特征及光适应性分析 [J]. 中国农学通报，2023，39（11）：36-42.

[12] 郑立颖，许正强，郝玉兰，等 . 基于红外光谱特点的南五味子鉴别 [J]. 甘肃农业科技，2022，53（3）：55-59.

[13] 高连灏，李宏伟，王俊玲，等 . UHPLC-MS/MS 测定不同产地市售南五味子药材中 8 种木脂素成分 [J]. 中国现代应用药学，2024，41（4）：520-523.

[14] 孙浩，罗川，胡雨 . 多指标权重分析法结合正交试验优选醋南五味子的工艺研究 [J]. 陕西农业科学，2020，66（7）：18-21.

[15] 李斌，萧琪，张嘉诺，等 . 华中五味子果实化学成分的分离鉴定及其抗糖尿病活性研究 [J]. 中草药，2023，54（8）：2379-2387.

[16] 叶江海，陈仁松，罗玉玲，等 . 南五味子根、茎、叶挥发油的 GC-MS 分析及抗氧化能力测定 [J]. 广东化工，2023，50（15）：170-174.

[17] 苏维，王欣悦，付港，等 . 南五味子属植物的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国中药杂志，2024，49（1）：26-38.

[18] 伍勇，韦艾骥，杨堃，等 . 刺梨多糖提取物对小鼠Ⅱ型糖尿病的干预研究 [J]. 广西植物，2023，43（11）：2120-2130.

[19] Shi RY，Li X，Gao B，et al. Phenylethanoid glycosides from traditional Mongolian medicine Cymbaria daurica alleviate alloxan-induced INS-1 cells oxidative stress and apoptosis [J]. Food Sci Hum Well，2023，12（5）：1580-1589.

[20] Li QX，Jia SH，Xu L，et al. Metformin-induced autophagy and irisin improves INS-1 cell function and survival in high-glucose environment via AMPK/SIRT1/PGC-1α signal pathway [J]. Food Sci Nutr，2019，7（5）：1695-1703.

[21] 马存花，高静 . 基于 HGF/c-Met 通路探究矢车菊素 -3-*O*- 葡萄糖苷改善高糖高脂诱导胰岛 β 细胞损伤的机制 [J]. 现代药物与临床，2024，39（1）：1-7.

[22] 段圣洁，戴锦龙，刘波，等 . 复方土茯苓颗粒对 SD 大鼠痛风性关节炎的影响试验研究 [A]// 中国毒理学会中药与天然药物毒理专业委员会第二次（2017 年）学术交流大会论文集 [C]. 苏州，2017.

[23] 张琦，靳雯棋，张乃文，等 . 解毒通络调肝方对 INS-1 细胞糖毒性的保护作用研究 [J]. 环球中医药，2021，14（12）：2135-2141.

[24] 石勇，曹珊珊，张瑞华，等 . 手掌参对 2 型糖尿病认知障碍的作用及机制研究 [J]. 中南药学，2023，21（12）：3179-3185.

[25] 白颖慧 . 灰兜巴修复 2 型糖尿病胰岛 β 细胞损伤的降血糖作用及其机制研究 [D]. 北京：中央民族大学，2021.

[26] Colli ML，Szymczak F，Eizirik DL. Molecular footprints of the immune assault on pancreatic beta cells in type 1 diabetes [J]. Front Endocrinol，2020，11：568446.

[27] Yaribeygi H，Sathyapalan T，Atkin SL，et al. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020（4）：1-13.

[28] 唐奇志，潘伟钰，万小露，等 . 化浊祛毒健脾法治疗早期 2 型糖尿病对胰岛 α/β 细胞及氧化应激的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报，2023，25（6）：10-14.

[29] 刘闯，赵新月，田颖颖，等 . 中药糖类成分生物活性及应用研究进展 [J]. 中国中医药图书情报杂志，2024，48（1）：256-260.

[30] 常悦，吴悦，郭建峰，等 . 杨树桑黄多糖对糖尿病大鼠的降血糖效果及心肌保护作用 [J/OL]. 食品工业科技 . https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024020037.

[31] 李佳雪，李程，宋晓兵，等 . 灵芝多糖饮料对高脂联合 STZ 诱导的糖尿病小鼠糖脂代谢的改善作用 [J]. 食品工业科技，2024，45（19）：9-16.

[32] 刘枘岢，胡园园，李雯翀，等 . 五味子多糖对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及 AMPK/Nrf2/TXNIP 通路的影响 [J]. 中成药，2024，46（2）：635-639.

[33] 王梦婕，魏平，杨思晔，等 . 药食同源中药多糖防治糖尿病多组学与交叉组学机制初探 [J]. 中药药理与临床，2023，39（8）：2-11.

（收稿日期：2024-04-11；修回日期：2024-05-06）

食消饮改善食积小鼠的药效作用研究

何维维[1, 2]，方晓洋[1, 2, 3]，郭麦平[1, 3]，黄傲[1, 3]，许豹[1]，吴宏伟[1]，徐琳本[2]，张水寒[1, 2]，曾宏亮[1, 3*]，蔡萍[1, 2*]（1. 湖南中医药大学，长沙 410208；2. 中药资源研究所，湖南省中医药研究院，长沙 410013；3. 医学实验动物中心，湖南省中医药研究院，长沙 410013）

摘要：目的 探讨食消饮对食积小鼠的药效作用。**方法** 将 120 只 ICR 小鼠随机均分为两个实验（实验 A 和 B），每个实验的小鼠均分为正常组，模型组，食消饮低、中、高剂量组和健胃消食片组。食积模型构建后，各给药组灌胃相应受试药物，每日 2 次，连续 7 d。其中实验 A 小鼠用于脏器系数、血清生化指标、小肠免疫组化、结肠 HE 染色以及肠道菌群的检测，实验 B 小鼠用于胃排空率和小肠推进率实验。**结果** 与模型组相比，食消饮高剂量组小鼠脾脏脏器系数明显升高，中、高剂量组小鼠血清生化指标均得到明显改善，小肠推进率升高、胃内残留率降低。免疫组化结果显示，食积模型小鼠小肠中 C-kit 表达明显降低，食消饮中、高剂量和健胃消食片组小鼠中 C-kit 表达明显升高。HE 结果显示，食消饮中、高剂量组小鼠结肠绒毛长度均增加、隐窝深度均降低、绒毛长度 / 隐窝深度的比值增加。粪便菌群计数结果显示，食消饮高剂量组小鼠粪便中乳杆菌和双歧杆菌增加，肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌均减少。**结论** 食消饮能通过调控小肠 C-kit 表达、胃肠动力相关激素分泌、肠道菌群丰度、肠道黏膜结构等改善食积模型小鼠的胃肠动力与功能。

关键词：食消饮；食积小鼠；肠道菌群；药效研究
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2864-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.005

Pharmacological effect of Shixiao decoction on mice with food retention

HE Wei-wei[1, 2], FANG Xiao-yang[1, 2, 3], GUO Mai-ping[1, 3], HUANG Ao[1, 3], XU Bao[1], WU Hong-wei[1], XU Lin-ben[2], ZHANG Shui-han[1, 2], ZENG Hong-liang[1, 3*], CAI Ping[1, 2*] (1. *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 2. *Institute of Chinese Medicinal Resources*, *Hunan Academy of Chinese Medicine*, *Changsha* 410013; 3. *Medical Laboratory Animal Center*, *Hunan Academy of Chinese Medicine*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the pharmacological effect of Shixiao decoction on mice with food retention. **Methods** This project consisted of experiment A and B. Totally 120 ICR mice were randomly divided into experiment A and B. Both experiments included a normal group, a food retention model group, Shixiao decoction groups (low-, medium- and high-dose), and a Jianwei Xiaoshi tablet group. After establishing the food retention model, we gave the mice corresponding test drugs by gavage twice daily for 7 days. The organ index, serum biochemical indicators, intestinal immunohistochemistry, colonic HE staining, and intestinal flora were detected in experiment A. Gastric emptying rate and intestinal propulsion rate were evaluated in experiment B. **Results** Compared with the model group, the spleinc organ index in the high-dose group was increased, the serum biochemical indicators in the medium- and high-dose groups were much improved. Their intestinal propulsion rate was also increased, while gastric residual rate was decreased. The immunohistochemical test showed that the expression of C-kit protein in the small intestine was much reduced in the model group, while that was increased in Shixiao decoction

基金项目：湖南省教育厅青年项目（No.21B0356）；湖南省自然科学基金面上项目（No.2021JJ30416）。
作者简介：何维维，男，硕士，主要从事中药调节肠道菌群研究，email：807650466@qq.com *通信作者：曾宏亮，男，副研究员，主要从事中药药理研究，email：zenghl155@163.com；蔡萍，女，研究员，主要从事中药制剂及质量标准研究，email：330343348@qq.com

medium- and high-dose group and Jianwei Xiaoshi tablet group. Moreover, HE displayed that the length of colonic villi was increased, the depth of colonic crypt decreased, and the ratio of colonic villi length to crypt depth increased in both the medium- and high-dose groups. Lactobacillus and Bifidobacterium were increased, while Enterobacteriaceae, Enterococcus, and Clostridium perfringens were decreased in the high-dose group based on the fecal microbiota count. **Conclusion** Shixiao decoction can improve the gastrointestinal motility and function in mice with food retention mice by regulating the expression of intestinal C-kit protein, secretion of gastrointestinal motility related hormones, abundance of intestinal flora, the structure of intestinal mucosa.

Key words: Shixiao decoction; mouse with food retention; intestinal flora; pharmacodynamic research

食积，又称“积滞”[1]，为九积之一，食滞不消，日久成积，多因饮食不节或暴饮暴食，损伤脾胃，食物停积而成。西医中食积又称功能性消化不良，主要表现为脘腹胀满、嗳气酸腐、大便溏薄、秘结酸臭、不思饮食等[2]。流行病学调查显示，功能性消化不良全球患病率为 21.8%[3]，我国患病率为 10% ～ 30%，占消化门诊的 50%[4]。西医对功能性消化不良治疗主要为对症处理，但远期疗效不佳，病程迁延，病情反复，给患者身心健康和个人生活质量产生严重影响[5]。该病发病机制复杂，多数学者认为其发病机制主要与胃肠道动力障碍、激素分泌异常和肠道菌群失调相关[1]。

食消饮作为徐州地区的民间验方[6]，由山楂、麦芽、六神曲、陈皮、瓜蒌、莱菔子、香橼、槟榔、紫苏叶、薄荷油组成，功能主治为消食导滞、除积消胀、调理脾胃，现已收入第二批国家非处方药药品目录中成药部分。食消饮组方中大部分药味为健脾消食药，然其改善食积的药效作用研究报道较少，尚未见其调节肠道菌群方面的研究，本研究以 ICR 小鼠为研究对象，构建食积小鼠模型，围绕食消饮对肠道菌群、血清生化指标、胃排空率、小肠推进率等指标的影响，评估其改善食积的药效作用，为临床应用食消饮治疗食积提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 120 只，体重 18 ～ 20 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（湘）2019-0004，实验动物质量合格证号：No.43072721110275225]，饲养于湖南省中医药研究院屏障环境 [实验动物使用许可证号：SYXK（湘）2020-0008]，室温 20.0 ～ 26.0 ℃，相对湿度 40.0% ～ 70.0%，12 h/12 h 光暗交替，自由摄食饮水；小鼠精制饲料与维持饲料（湖南嘉泰实验动物有限公司）。本实验方案经湖南省中医药研究院实验动物福利伦理委员会批准实施（伦理审查编号：IACUC2022-0086），所有实验操作均按照《实验动物护理和使用指南》进行。

1.2 试药

食消饮（批号：10801002，江苏颐海药业有限责任公司，规格：15 g/ 袋），健胃消食片（批号：22098007，江中药业股份有限公司，规格：0.8 g/ 袋），小鼠胃动素（MTL）、胃泌素（Gas）、乙酰胆碱酯酶（AchE）、血管活性肠肽（VIP）、生长抑素（SS）ELISA 试剂盒（湖南艾方生物科技有限公司），伊红美蓝琼脂（广东环凯微生物科技有限公司），LBs 琼脂、胰胨 - 亚硫酸盐 - 环丝氨酸琼脂、叠氮钠 - 结晶紫 - 七叶苷琼脂和 D- 环丝氨酸（北京陆桥技术有限责任公司），BBL 琼脂和枸橼酸铁铵（青岛高科园海博生物技术有限公司），羧甲基纤维素钠、蔗糖、淀粉、活性炭、4% 多聚甲醛等均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。C-kit 抗体（北京博奥森生物技术有限公司），柠檬酸盐修复液（北京中杉金桥生物技术有限公司），伊红染色液、苏木素染液（贝索生物技术有限公司）。

1.3 仪器

PTT-B1000 型电子天平（华志电子科技有限公司），BSC-1100 Ⅱ A2-X 型生物安全柜（山东欧莱博医疗器械有限公司），电热恒温培养箱（武汉一恒苏净科学仪器有限公司），高速冷冻离心机（Thermo Fisher 公司），EnVision 型多功能酶标仪（Perkin Elmer 公司），HP300 型脱水机（Dakewe 公司），YB-8LF 型包埋机（YaGuang 公司），RM2245 型切片机（LeiCa 公司）等。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

小鼠适应性喂养 5 d 后，随机均分为实验 A 和实验 B，每个实验小鼠随机分为正常组，模型组，食消饮低、中、高剂量组和健胃消食片组，

每组 10 只。实验 A 小鼠用于各脏器系数、血清生化指标、肠道菌群丰度及肠道组织形态学检测，实验 B 小鼠用于胃排空率和小肠推进率实验。

除正常组外，其余各组小鼠均采用饲喂精制饲料（面粉、豆粉、奶粉、鱼松按 1∶2∶1∶1 的比例制成[7]）＋灌胃全脂牛奶（0.2 mL/ 只）的方法，连续造模 7 d，构建小鼠食积模型。模型建立成功后，各给药组按照 20 mL・kg^{-1} 灌胃给予相应受试药物，正常组和模型组灌胃给予纯水，每日 2 次，连续 7 d。给药期间，除正常组饲喂维持饲料外，其余各组饲喂精制饲料＋灌胃全脂牛奶维持食积造模，各组给药剂量见表 1。

表 1 实验分组与剂量设计 (实验 A 和 B)

Tab 1 Grouping and dose design of experiments (experiment A and B)

组别	造模与给药	给药剂量 /（g・kg^{-1}）	动物数 / 只	相当于等效剂量的倍数
正常组	正常饲料＋纯水（ig）	0	10	—
模型组	精制饲料＋全脂牛奶（ig）	0	10	—
食消饮低剂量组	精制饲料＋全脂牛奶（ig）＋食消饮（ig）	2.93	10	0.50
食消饮中剂量组	精制饲料＋全脂牛奶（ig）＋食消饮（ig）	5.85	10	1.00
食消饮高剂量组	精制饲料＋全脂牛奶（ig）＋食消饮（ig）	11.70	10	2.00
健胃消食片组	精制饲料＋全脂牛奶（ig）＋食消饮（ig）	1.87	10	2.00

2.2 观测指标

2.2.1 一般状态观察 观察 14 d 内小鼠的精神状态、活动程度、皮毛光泽度以及粪便和尿液情况；造模前及给药后各称重一次。

2.2.2 ELISA 测血清生化指标 实验 A 小鼠末次给药后 1 h，眼眶采血，4 ℃、5000 r・min^{-1} 离心 10 min，分离血清，按照 ELISA 试剂盒操作说明检测血清 MTL、Gas、AchE、SS 和 VIP 的含量。

2.2.3 主要脏器系数计算 脱颈处死小鼠，取心、肝、脾、肺、肾称量湿重，根据动物体重计算各器官脏器系数。

2.2.4 免疫组化观察小鼠小肠 C-kit 表达 取小鼠小肠组织，4% 多聚甲醛溶液固定，常规脱水，石蜡包埋、切片、烤片、脱蜡，抗原修复，过氧化氢溶液浸泡，一抗和二抗孵育，DAB 显色后苏木素复染，最后脱水、透明、封片。应用 Image J 软件计算平均光密度值 *AOD*（累计光密度值与区域面积之比）。

2.2.5 HE 染色观察小鼠结肠组织结构 取小鼠结肠组织，用 4% 多聚甲醛溶液固定后，进行常规石蜡包埋、切片、染色，并于光学显微镜下观察结肠黏膜结构。各组取 3 张染色切片，应用生物显微镜与成像系统处理软件拍取每张切片 3 个视野，测量每张照片中 5 根最长肠绒毛的长度（从绒毛顶端至隐窝开口处的垂直距离）、隐窝深度（从隐窝开口至隐窝基部的垂直距离），并计算绒毛长度 / 隐窝深度的比值（*V*/*C*）。

2.2.6 胃排空率与小肠推进率的测定 实验 B 小鼠末次给药后 1 h，灌胃给予炭末半固体膏。30 min 后脱颈处死小鼠，立即打开腹腔，结扎胃贲门和幽门，剪取完整胃，滤纸擦干称胃全重。生理盐水洗出胃内容物后，滤纸擦干称胃净重，与此同时取出小肠，轻轻剥离肠系膜后将小肠拉成直线，测量幽门至炭末半固体膏前沿的距离（L_1）以及幽门至回盲部的距离（L_2）。胃排空率（%）＝[1 －（胃全重－胃净重）/ 炭末半固体膏质量]×100%，小肠推进率（%）＝ L_1/L_2×100%[8]。

2.2.7 粪便肠道菌群培养与计数 小鼠末次给药前 1 d，采集各组小鼠粪便于无菌离心管中（2 只 / 管），分别采用选择性培养基进行乳杆菌、双歧杆菌、肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌培养并计数，结果以菌落数的对数值（lg CFU）表示，并按结果判定标准对实验结果进行分析。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 进行统计分析，统计学意义的水平设定为 $P < 0.05$[9]，Prism 9 进行绘图。计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，用 Leven’s test 方法检验正态性和方差齐性，对符合正态分布和方差齐性（$P > 0.05$）的数据采用单因素方差分析（ANOVA）和 Post-hoc LSD 统计分析；对非正态分布或方差不齐（$P < 0.05$）的数据进行适当的变量转换，若转换后符合正态分布或方差齐性要求，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍不符合，改用秩和检验进行统计。

3 结果

3.1 食积小鼠一般状态观察

所有实验小鼠造模前精神状态、行为活动、摄食摄水、粪便、尿液及各腔道分泌物等均未见明显异常；与正常组比较，造模后小鼠精神萎靡、进食量减少、体形偏瘦，毛色无光泽，蜷缩聚堆，大便溏软呈棕黄色，提示食积小鼠模型构建成功；

与模型组相比，给药组小鼠精神良好，进食量增加，毛色有光泽，粪便成形，说明消食饮具有改善小鼠食积的作用。

3.2　食消饮对食积小鼠体重的影响

与正常组比较，造模 7 d后模型组小鼠体重明显降低；与模型组比较，给药 7 d后食消饮各剂量组小鼠体重均增加，实验 A 中低、中、高剂量组小鼠体重均显著增加，实验 B 中高剂量组小鼠体重均显著增加（见表 2 ～ 3）；表明食消饮与健胃消食片对食积小鼠体重下降有一定的缓解作用。

表 2　食消饮对各组小鼠体重的影响 (实验 A)(g，$\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Tab 2　Effect of Shixiao decoction on body weight of mice in each group (experiment A)(g，$\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	造模前（第 1 日）	给药前（第 7 日）	给药后（第 14 日）
正常组	26.50±1.08	32.09±1.83	35.02±2.00
模型组	26.71±1.14	28.82±3.21$^{\#}$	30.40±1.62$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	27.16±1.26	29.92±1.73	32.49±1.79*
食消饮中剂量组	26.46±1.05	30.19±1.46	32.78±1.74**
食消饮高剂量组	26.49±0.93	29.27±1.54	32.77±1.82**
健胃消食片组	27.00±0.60	29.96±1.71	32.15±1.98*

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

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

表 3　食消饮对各组小鼠体重的影响 (实验 B)(g，$\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Tab 3　Effect of Shixiao decoction on body weight of mice in each group (experiment B)(g，$\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	造模前（第 1 日）	给药前（第 7 日）	给药后（第 14 日）
正常组	26.58±1.29	31.76±1.21	34.16±1.69
模型组	26.53±1.17	29.67±1.14$^{\#}$	30.98±1.38$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	26.64±0.78	29.87±1.19	32.39±1.83
食消饮中剂量组	26.87±0.81	29.20±1.21	32.52±1.69*
食消饮高剂量组	26.00±1.52	30.64±1.51	33.43±1.57**
健胃消食片组	26.68±1.51	30.32±2.28	32.97±2.44*

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

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

3.3　食消饮对各组小鼠脏器系数的影响

与正常组比较，模型组小鼠心脏、肝脏、肺脏和肾脏脏器系数差异均未见统计学意义，而脾脏脏器系数明显降低；与模型组比较，食消饮各剂量组与健胃消食片组小鼠心脏、肝脏、肺脏和肾脏脏器系数差异均无统计学意义，食消饮各剂量组小鼠脾脏脏器系数均有升高，其中高剂量组明显升高（见表 4）；表明食消饮能够部分改善高蛋白饮食对小鼠脾脏的不利影响。

表 4　食消饮对各组小鼠脏器系数的影响 (%，$\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Tab 4　Effect of Shixiao decoction on the organ index of mice in each group (%，$\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏
正常组	0.56±0.07	5.40±0.65	0.33±0.04	0.63±0.07	0.85±0.06
模型组	0.55±0.06	5.13±0.53	0.29±0.04$^{\#}$	0.66±0.06	0.84±0.11
食消饮低剂量组	0.58±0.07	5.34±0.42	0.29±0.06	0.65±0.05	0.86±0.12
食消饮中剂量组	0.58±0.09	5.43±0.79	0.31±0.04	0.63±0.05	0.85±0.11
食消饮高剂量组	0.53±0.05	5.39±0.55	0.34±0.04*	0.70±0.11	0.89±0.12
健胃消食片组	0.54±0.07	5.04±0.34	0.28±0.03	0.66±0.07	0.87±0.10

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

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

3.4　食消饮对各组小鼠小肠推进率和胃内残留率的影响

与正常组比较，模型组小鼠小肠推进率显著降低、胃内残留率显著增加；与模型组比较，食消饮中、高剂量组与健胃消食片组小鼠小肠推进率显著升高、胃内残留率显著降低（见表 5）。该结果显示食消饮能促进胃排空、增加小肠推进率，改善食积小鼠的胃肠动力功能。

3.5　食消饮对各组小鼠血清生化指标的影响

与正常组比较，模型组小鼠血清 MTL、Gas 和 VIP 水平均显著降低，AchE 和 SS 水平均显著升高；与模型组比较，食消饮中、高剂量组与健胃消食片组小鼠血清 MTL 水平显著升高、Gas 水平显著升高和 SS 水平显著降低，食消饮中、高剂量组小鼠血清 VIP 水平明显升高，AchE 水平显著降低（见表 6 及表 7）；提示食消饮可能通过调节胃肠激素分泌改善胃肠功能。

3.6　食消饮对各组小鼠小肠组织 C-kit 蛋白表达的影响

与正常组比，模型组小鼠小肠 C-kit 蛋白的 *AOD* 值明显降低；与模型组比，食消饮各剂量组与健胃消食片组小鼠小肠 C-kit 蛋白的 *AOD* 值均有升高，其中健胃消食片组明显升高，食消饮中剂量组和高剂量组显著升高（见表 8 及图 1）。提示食消

表 5 食消饮对各组小鼠小肠推进率和胃内残留率的影响（%，$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 5 Effect of Shixiao decoction on the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate of mice in each group (%，$\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	小肠推进率	胃内残留率
正常组	75.12±7.99	30.15±6.11
模型组	47.02±7.70$^{\#\#}$	65.20±13.50$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	55.16±10.34	55.25±14.57
食消饮中剂量组	64.34±5.17**	48.55±13.14*
食消饮高剂量组	70.28±10.64**	41.70±12.88**
健胃消食片组	61.92±9.83**	45.85±9.23**

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

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

表 7 食消饮对各组小鼠血清生化指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 7 Effect of Shixiao decoction on the serum biochemical indicators of mice in each group ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	VIP/（pg·mL^{-1}）	SS/（pg·mL^{-1}）
正常组	243.02±25.79	123.02±18.44
模型组	156.49±24.29$^{\#\#}$	193.37±17.86$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	158.84±24.66	202.43±15.12
食消饮中剂量组	229.35±23.81**	140.99±18.54**
食消饮高剂量组	192.53±26.71**	162.63±20.98**
健胃消食片组	181.50±29.40	166.85±12.65**

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

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

饮可通过调节小肠中 C-kit 表达，改善胃肠功能。

3.7 食消饮对各组小鼠粪便菌落数（lg CFU）的影响

与正常组比较，模型组小鼠粪便中乳杆菌和双歧杆菌明显减少，肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌明显增加；与模型组比较，食消饮各剂量组与健胃消食片组小鼠粪便中乳杆菌和双歧杆菌均有所增加，肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌均有所减少，

表 6 食消饮对各组小鼠血清生化指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 6 Effect of Shixiao decoction on the serum biochemical indicators of mice in each group ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	MTL/（pg·mL^{-1}）	Gas/（pg·mL^{-1}）	AchE/（nmol·L^{-1}）
正常组	313.31±34.69	75.68±8.50	101.11±22.20
模型组	135.76±43.15$^{\#\#}$	50.51±6.76$^{\#\#}$	167.33±18.09$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	171.16±30.56*	50.71±6.95	164.68±20.92
食消饮中剂量组	245.83±39.07**	65.47±10.35**	133.16±25.05**
食消饮高剂量组	210.32±42.07**	60.64±6.88**	139.19±15.66**
健胃消食片组	201.86±52.56**	63.51±8.62**	149.09±21.73

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

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

表 8 食消饮对各组小鼠小肠组织 C-kit 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 8 Effect of Shixiao decoction on the C-kit protein expression in small intestine of mice in each group ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	C-kit 平均光密度值
正常组	0.36±0.02
模型组	0.24±0.02$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	0.28±0.01
食消饮中剂量组	0.36±0.01**
食消饮高剂量组	0.39±0.01**
健胃消食片组	0.35±0.04*

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

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

其中高剂量组与健胃消食片组小鼠粪便中乳杆菌明显增加和双歧杆菌明显增加，高剂量组小鼠粪便中肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌均明显减少（见表 9）；上述结果表明食消饮可上调食积小鼠粪便中有益菌的生长和定植，同时下调有害菌的生长与定植，维持肠道微生物的稳态与功能。

表 9 食消饮对各组小鼠粪便菌落数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 9 Effect of Shixiao decoction on the number of colonies in feces of mice in each group ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	菌落数对数值（lg CFU）				
	乳杆菌	双歧杆菌	肠杆菌	肠球菌	产气荚膜梭菌
正常组	9.69±1.64	9.04±1.16	5.65±1.49	6.32±0.94	2.95±0.44
模型组	8.01±0.95$^{\#}$	7.88±0.73$^{\#}$	7.28±1.38$^{\#}$	8.02±1.21$^{\#\#}$	3.78±0.72$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	8.43±0.87	8.29±1.06	6.61±0.88	7.70±1.02	3.36±0.52
食消饮中剂量组	8.66±0.68	9.07±0.95**	6.16±1.28	7.26±0.95	3.31±0.36
食消饮高剂量组	8.91±0.69*	8.77±0.68*	5.94±1.10*	6.74±1.17*	3.16±0.30*
健胃消食片组	8.84±0.75*	8.72±0.86*	6.20±0.93	7.04±0.67*	3.35±0.38

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

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

3.8 食消饮对各组小鼠结肠黏膜结构的影响

与正常组比较，模型组小鼠结肠绒毛长度显著缩短、隐窝深度明显增高、*V*/*C* 值显著降低；与模型组比较，食消饮低、中、高剂量组与健胃

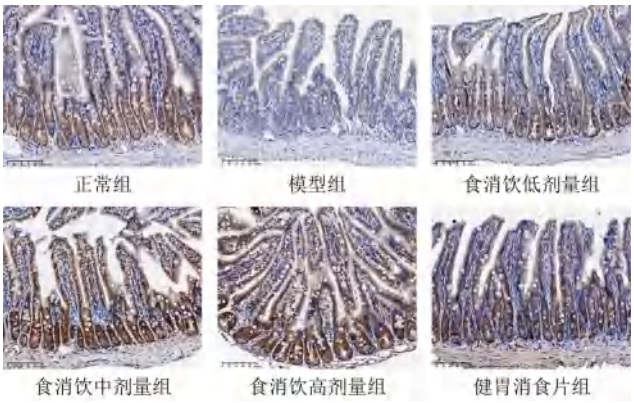


图 1 各组小鼠小肠组织 C-kit 蛋白的表达（IHC，×200）

Fig 1 Expression of C-kit protein in small intestine of mice in each group（IHC，×200）

消食片组小鼠结肠绒毛长度、*V/C* 值均显著增加，隐窝深度均有降低，其中食消饮高剂量组与健胃消食片组明显降低（见表 10 及图 2）。该结果提示食消饮对食积小鼠胃肠道黏膜结构具有明显的改善作用。

表 10 食消饮对各组小鼠粪便菌落数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 10 Effect of Shixiao decoction on the number of colonies in feces of mice in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	绒毛长度 /μm	隐窝深度 /μm	*V/C*
正常组	173.34±20.59	81.36±9.36	2.14±0.28
模型组	113.99±17.06$^{\#\#}$	90.18±8.67$^{\#}$	1.29±0.25$^{\#\#}$
食消饮低剂量组	135.38±23.51*	84.90±2.14	1.59±0.27*
食消饮中剂量组	151.92±27.29**	82.26±10.04	1.84±0.20**
食消饮高剂量组	163.18±19.21**	81.20±9.20*	2.04±0.38**
健胃消食片组	161.50±22.21**	81.42±8.84*	2.01±0.37**

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

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

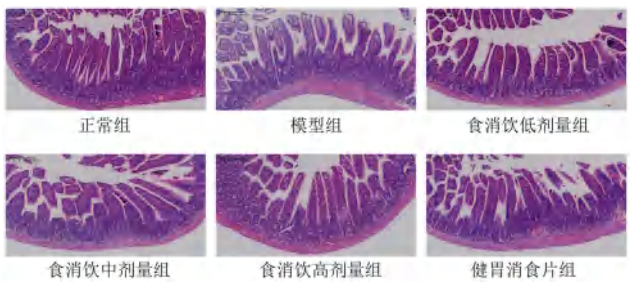


图 2 各组小鼠结肠组织病理变化（HE，×200）

Fig 2 Pathological changes in the colon of mice in each group（HE，×200）

4 讨论

食积，多因饮食不节或暴饮暴食，或恣食生冷，或饮食不洁，致胃失受纳腐熟之功，脾失运化，食物停积而成 [10]。食消饮，徐州地区的民间验方 [6]，方中山楂、麦芽 [11]、六神曲 [12]、槟榔 [13] 均具有行气消食功效，陈皮可理气健脾 [14]，莱菔子可消食除胀 [15]，瓜蒌可利气宽胸 [16]，香橼可疏肝理气宽中 [17]，紫苏叶可行气和胃 [18]，配伍改善食积小鼠模型胃肠动力与功能。本研究采用饲喂精制饲料＋灌胃全脂牛奶的方法建立食积模型，造模后小鼠精神萎靡，进食量减少，体形偏瘦，毛色无光泽，大便溏软呈棕黄色，胃排空率和小肠推进率明显降低，提示食积小鼠模型构建成功。经食消饮治疗后，小鼠一般状况明显改善，胃排空率和小肠推进率明显增加。

胃肠激素为消化道各内分泌细胞合成和释放的多种激素合称，在胃肠消化中发挥重要作用。研究表明，增加 MTL、Gas[19]，降低 SS[20]，可明显促进胃肠蠕动和胃排空率，改善胃酸分泌，增加食物摄入量。同时抑制 AchE 活性，可增强大鼠的胃动力，促进胃肠的运动和胃肠激素的分泌，改善胃动力功能障碍 [21-22]。本实验中食消饮治疗食积小鼠后，小鼠血清中 MTL、Gas 水平含量明显升高，SS 水平和 AchE 水平含量明显降低，说明食消饮能通过调节胃肠激素和 AchE 水平改善食积小鼠的胃肠运动功能。

研究表明胃肠道运动功能与胃肠道 Cajal 间质细胞（ICCs）的数量变化和结构异常密切相关 [23]。ICCs 是胃肠道运动的起搏细胞，节律电位的传递者，广泛分布于胃肠道中 [24]，可介导传递神经内分泌递质，维持胃肠道的正常功能 [25]。其特异性表达的 C-kit 受体可调控 ICCs 的生长发育及功能，也可用于检测 ICCs 的分布、密度和结构 [26]。食积小鼠经食消饮治疗后，小鼠小肠中 C-kit 蛋白的 *AOD* 值明显升高，说明食消饮改善胃肠运动功能可能与调节 ICCs 数量以及 C-kit 表达相关。

在胃肠道功能中，VIP 也是重要的一环，其既能促进胃酸的分泌，也能抑制胃酸的分泌 [27]。研究表明，VIP 还能通过促进肠上皮细胞的分化、增殖和细胞黏附来维持正常的屏障功能 [28]，在肠道微生物群的建立和 / 或维持中发挥重要作用。VIP 缺乏可导致 C57BL/6 小鼠肠道微生物群落发生改变，生物多样性和数量减少 [29]。在本实验中，经食消饮治疗后，食积小鼠血清 VIP 水平明显升高，结肠绒毛长度与 *V/C* 值增加，隐窝深度降低，有益乳杆菌和双歧杆菌明显增加，有害肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌明显减少，说明食消饮能调节 VIP 水平和肠道菌群结构，改善胃肠道黏膜结构，保护胃肠黏膜功能。

综上所述，食消饮能通过调控小肠 ICCs 中 C-kit 蛋白表达、胃肠动力相关激素分泌、肠道黏膜结构与肠道菌群丰度，改善食积小鼠的胃肠动力和功能。因此，食消饮在治疗食积消化不良方面具有较好的应用潜力，但其具体作用机制尚不明确，还需进一步深入研究。

参考文献

[1] 高晴 . 致积食物炭剂对食积小鼠模型治疗效果探究 [J]. 医学理论与实践，2022，35（16）：2701-2703，2708.

[2] 白辰，郑子安，徐竞男，等 . 食积胃肠积热动物模型的探索与评价 [J]. 湖南中医药大学学报，2018，38（2）：125-129.

[3] Ford AC，Mahadeva S，Carbone MF，et al. Functional dyspepsia [J]. Lancet，2020，396（10263）：1689-1702.

[4] 包莉媛，董翔，刘婷婷，等 . 山楂 - 麦芽提取物、益生菌及其联合对高蛋白饮食小鼠胃肠道功能的影响 [J]. 食品研究与开发，2023，44（9）：1-7.

[5] Ford AC，Luthra P，Tack J，et al. Efficacy of psychotropic drugs in functional dyspepsia：systematic review and meta-analysis [J]. Gut，2017，66（3）：411-420.

[6] 袁绍莉，张金炼 . HPLC 法测定食消饮颗粒中橙皮苷的含量 [J]. 科技经济市场，2009（6）：16-18.

[7] 何云山，谭周进，李丹丹，等 . 保和丸对食积小鼠的肠道微生物及酶活性的影响 [J]. 中国微生态学杂志，2019，31（7）：763-767.

[8] 田徽，阮期平，李崇进，等 . 马兰水煎液对小鼠胃排空及小肠推进的影响 [J]. 中国医药指南，2012，10（23）：464-465.

[9] Shi YY，Zheng WX，Yang KT，et al. Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling [J]. J Exp Med，2020，217（5）：e20192282.

[10] 吴宗耀，张明昊，朱星昊，等 . 大安丸对食积小鼠胃肠运动的影响 [J]. 新中医，2021，53（4）：44-46.

[11] 王欢，王敏，刘竹青，等 . 麦芽山楂益生菌复合物对便秘大鼠肠道蠕动改善及肠道菌群调节作用 [J]. 食品科技，2023，48（5）：89-96.

[12] 时海燕，徐男，赵霞，等 . 基于 HS-GC-IMS 技术分析六神曲炮制前后（炒、焦）挥发性物质的变化 [J]. 中草药，2023，54（10）：3120-3131.

[13] 侯倩煜，符礼顺，梁焕宴，等 . LC-PDA 测定槟榔、焦槟榔、大腹皮中 4 种生物碱的含量 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（4）：443-447.

[14] 汤紫玉，程琪庆，欧阳月，等 . 广陈皮药用沿革和现代鉴别方法的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理，2022，33（11）：1582-1588.

[15] 杨佩雯，张培良，韩竹箴，等 . 莱菔子中 2 个新的含硫衍生物 [J]. 中草药，2023，54（11）：3408-3416.

[16] 李艳，王省，张瑞 . 瓜蒌薤白白酒汤的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中药新药与临床药理，2023，34（5）：707-712.

[17] 严辉，高明亮，查玉玲，等 . 香橼化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（7）：976-988.

[18] 牛新茹，朱彤彤，高志杰，等 . 紫苏叶多糖分离纯化及体外抗氧化活性 [J]. 食品研究与开发，2023，44（9）：30-35.

[19] Rehfeld JF. Gastrointestinal hormones and their targets [J]. Adv Exp Med Biol，2014，817：157-175.

[20] Schubert ML，Rehfeld JF. Gastric peptides-gastrin and somatostatin [J]. Compr Physiol，2019，10（1）：197-228.

[21] 王庭槐 . 生理学 [M]. 9 版 . 北京：人民卫生出版社，2018：179.

[22] Kawachi M，Matsunaga Y，Tanaka T，et al. Acotiamide hydrochloride (Z-338) enhances gastric motility and emptying by inhibiting acetylcholinesterase activity in rats [J]. Eur J Pharmacol，2011，666（1-3）：218-225.

[23] 陶永彪，汪龙德，牛媛媛，等 . 中医疗法靶向干预 SCF/c-kit 信号通路治疗功能性消化不良机制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志，2023，30（7）：191-196.

[24] Zhao Q，Xing F，Tao YT，et al. Xiaozhang Tie improves intestinal motility in rats with cirrhotic ascites by regulating the stem cell factor/c-kit pathway in interstitial cells of cajal [J]. Front Pharmacol，2020，11：1.

[25] 陈玮瑕，周国华 . Cajal 间质细胞与炎症性肠病关系的研究进展 [J]. 国际消化病杂志，2020，40（1）：16-18，58.

[26] Joung JY，Choi SH，Son CG. Interstitial cells of cajal: potential targets for functional dyspepsia treatment using medicinal natural products [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：9952691.

[27] Iwasaki M，Akiba Y，Kaunitz JD. Recent advances in vasoactive intestinal peptide physiology and pathophysiology：focus on the gastrointestinal system [J]. F1000Res，2019，8：F1000 Faculty Rev-1629.

[28] Wu X，Conlin VS，Morampudi V，et al. Vasoactive intestinal polypeptide promotes intestinal barrier homeostasis and protection against colitis in mice [J]. PLoS One，2015，10（5）：e0125225.

[29] Bains M，Laney C，Wolfe AE，et al. Vasoactive intestinal peptide deficiency is associated with altered gut microbiota communities in male and female C57BL/6 mice [J]. Front Microbiol，2019，10：2689.

（收稿日期：2024-01-05；修回日期：2024-04-03）

基于网络药理学及体外实验探讨过氧麦角甾醇对非小细胞肺癌 A549 细胞的作用机制

任文康，罗然，王璐，郭晓珊，林宇*，卜明*（齐齐哈尔医学院 药学院，黑龙江 齐齐哈尔 161006）

摘要：目的 基于网络药理学结合体外实验，探究过氧麦角甾醇（EP）对人非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的作用，并分析其可能机制。**方法** 采用网络药理学对 EP 治疗人非小细胞肺癌的关键靶点进行筛选，并通过 Metascape 数据库对其关键靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析；用 0（空白对照）、2.5、5、10、20、40、80 μmol·L^{-1} 的 EP 作用于 A549 细胞 24、48 和 72 h，采用 MTT 法检测各组细胞的增殖活性。以 0（空白对照）、10、20、40 μmol·L^{-1} 的 EP 作用于 A549 细胞 48 h 后，AO/EB 染色法和 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞的凋亡率；JC-1 染色法观察 A549 细胞的线粒体膜电位变化；DCFH-DA 染色法观察细胞的活性氧水平。Western blot 法检测各组细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达变化。**结果** 经网络药理学预测，得出 EP 治疗人非小细胞肺癌存在 170 个共有靶点，GO 富集分析结果显示 EP 治疗人非小细胞肺癌主要涉及的生物过程有蛋白质的磷酸化、磷酸化的正向调节、磷酸转移酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性等，KEGG 富集分析结果显示 EP 治疗人非小细胞肺癌的前列腺癌信号通路、人乳头状瘤病毒感染信号通路、PI3K-AKT 信号通路等；MTT 结果显示 EP 显著抑制 A549 细胞增殖，呈现时间和剂量相关性；与空白对照组相比，经 EP 作用后 A549 细胞的总凋亡率、活性氧水平显著升高，线粒体的膜电位显著下降；此外，p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$）。**结论** EP 可抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖，并诱导其凋亡，其作用机制可能与 PI3K/AKT/mTOR 通路介导线粒体凋亡途径有关。

关键词：过氧麦角甾醇；非小细胞肺癌；A549 细胞；网络药理学；细胞凋亡；活性氧；线粒体膜电位

中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2871-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.006

Mechanism of ergosterol peroxide on non-small cell lung cancer A549 cells based on network pharmacology and in vitro experiment

REN Wen-kang, LUO Ran, WANG Lu, GUO Xiao-shan, LIN Yu*, BU Ming* (*College of Pharmacy*, *Qiqihar Medical Institute*, *Qiqihar Heilongjiang* 161006)

Abstract: Objective To determine the effect of ergosterol peroxide (EP) on the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells based on network pharmacology and in vitro experiment, and related mechanism. **Methods** The key targets of EP treatment in human non-small cells were screened by network pharmacology. The GO and KEGG pathways were enriched by Metascape database. A549 cells were treated with 0 (the control), 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 μmol·L^{-1} EP for 24, 48 and 72 h, and the proliferation of the cells was detected by MTT. A549 cells were treated with 0 (control), 10, 20 and 40 μmol·L^{-1} EP for 48 h, and the apoptosis rate was detected by AO/EB staining and Annexin V-FITC/PI double staining. The changes in mitochondrial membrane potential in A549 cells were observed by JC-1 staining. The reactive oxygen species levels were observed by DCFH-DA staining. The expression of

基金项目：齐齐哈尔医学院研究生创新基金项目（No.QYYCX2022-31）；黑龙江省自然科学基金联合引导项目（No.LH2022H113）。
作者简介：任文康，男，硕士研究生，主要从事药物抗肿瘤基础研究，email：2938357580@qq.com *通信作者：林宇，女，教授，硕士研究生导师，主要从事药物抗肿瘤基础研究，email：linyu7373@163.com；卜明，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物抗肿瘤作用研究，email：buming@qmu.edu.cn

PI3K/AKT/mTOR signaling pathway was detected by Western blot. **Results** There were 170 common targets in EP treatment of human non-small cell lung cancer predicted by network pharmacology. GO enrichment analysis showed that EP treatment of human non-small cell lung cancer mainly involved biological processes such as protein phosphorylation, positive regulation of phosphorylation, phosphotransferase activity, and protein serine kinase activity, etc. KEGG enrichment analysis showed that EP treated human non-small cell lung cancer related pathways included prostate cancer signaling pathway, human papillomavirus infection signaling pathway, PI3K-AKT signaling pathway, etc. MTT showed that EP obviously inhibited A549 cell proliferation in a time-and dose-dependent manner. Compared with the blank control group, the total apoptosis rate and reactive oxygen species levels of A549 cells were significantly increased after the EP treatment, while the membrane potential of the mitochondria was much decreased. In addition, the protein expression levels of p-PI3K, p-AKT and p-mTOR were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** EP can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells, whose mechanism may be related to the mitochondrial apoptosis pathway mediated by PI3K/AKT/mTOR pathway.

Key words: ergosterol peroxide; non-small cell lung cancer; A549 cell; network pharmacology; cell apoptosis; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential

肺癌作为全球死亡率最高的恶性肿瘤，其发病率仅次于乳腺癌[1]。非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）约占所有肺癌类型的 85%，大多数 NSCLC 患者在确诊时已是晚期，失去手术机会，5 年生存率不到 20%[2]。目前，基因突变导致的功能障碍，使受影响的信号通路失去原有的作用机制或失去疗效，是导致 NSCLC 发病的最重要原因[3]。含铂化疗、放疗和靶向治疗等系统性治疗一直是大多数晚期 NSCLC 患者的主要治疗手段，但疾病进展和耐药问题仍未解决。随着 NSCLC 发病率和死亡率逐年上升，阐明 NSCLC 的发病机制并开发新的治疗药物是全球关注的重点。

天然产物拥有悠久的药用历史，因其高效低毒的特点在肿瘤治疗中备受人们关注，目前在天然产物中寻找抗肿瘤药物或辅料，已成为国内外的一个热门研究领域。过氧麦角甾醇（ergosterol peroxide，EP）来源于多种药食菌中，目前已在猴头菌、灵芝、软珊瑚等多种陆地与海洋资源中发现[4-5]，并且被应用到不同的药用领域进行生物活性研究。Kobori 等[6]在研究中通过 DNA 微阵列分析发现过氧麦角甾醇显著上调 *AKR1C 1* 和 *AKR1C 2* 的表达，从而抑制人结肠腺癌细胞的生长。Meza-Menchaca 等[7]通过研究发现过氧麦角甾醇处理的样品能产生活性氧和氮物种，从而显著降低宫颈癌细胞活力。罗然等[8]研究发现，过氧麦角甾醇浓度的增加，可使乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞活力降低，并诱导其凋亡；其作用可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。还有研究表明过氧麦角甾醇可通过调控线粒体途径抑制肝癌 HepG2 细胞生长[9]。本课题组前期通过研究发现过氧麦角甾醇对人 NSCLC A549 细胞生长有良好的抑制作用，但其作用机制尚不明确。因此，本研究以 NSCLC A549 细胞为研究对象，基于网络药理学进行关键靶点预测，结合细胞功能性实验，探究过氧麦角甾醇在 NSCLC 的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

人非小细胞肺癌细胞系 A549（批号：CL-0016，武汉普诺赛生命科技有限公司）。

1.2 试药

过氧麦角甾醇（齐齐哈尔医学院药学院药物化学研究室，纯度＞ 98%）；Ham’s F-12K 培养基（批号：PM150910）、胎牛血清（批号：164210）（武汉普诺赛生命科技有限公司）；MTT 试剂盒（批号：E606334，广州赛维尔生物科技有限公司）；AO/EB 试剂盒 [批号：E607308，生工生物工程（上海）股份有限公司]；Annexin Ⅴ-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（批号 KGA107）（江苏凯基生物技术股份有限公司）；JC-1 试剂盒（批号：abs50016，北京爱必信生物技术有限公司）；活性氧检测试剂盒（批号：CA1410，北京索莱宝科技有限公司）；BCA 试剂盒（批号：E112-01，南京诺唯赞生物科技有限公司）；RIPA 裂解液 [批号：20115E，翌圣生物科技（上海）股份有限公司]；磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）抗体、*β*- 肌动蛋白（*β*-actin）抗体、丝氨酸 - 苏氨酸激酶（AKT）抗体、磷酸化的丝氨酸 - 苏氨酸激酶（p-AKT）抗体、磷脂酰肌醇激酶（PI3K）抗体、磷酸化的磷脂酰肌醇激酶（p-PI3K）抗体、B 细胞淋巴瘤 2（Bcl-2）抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax 抗体、半胱天冬酶 3（caspase-3）多克隆抗体、活化的 caspase-3（cleaved caspase-3）抗体（美国 Cell

Signaling Technology 公司）；山羊抗兔 IgG 二抗（批号：RGAR001，武汉三鹰生物有限公司）；ECL 显色试剂盒 [批号：36208ES，翌圣生物科技（上海）股份有限公司]。

1.3 仪器

Heracell 240i GP CO_2 培养箱（美国 Thermo 公司）；Spark 酶标仪（瑞士 TECAN 公司）；LSM 880 激光共聚焦显微镜（德国 Zeiss 公司）；FACS Calibur 型流式细胞仪（美国 BD 公司）；PowerPac 型电泳仪、ChemiDoc XRS 显影仪（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 过氧麦角甾醇药物靶点获取

通过 PubChem 数据库（https：//pubchem. ncbi. nlm. nIh. Gov/）、PharmMapper 数据库（http：//lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html）、SwissTargetPrediction 数据库（http：//www. SwissTargetPrediction. ch/），预测过氧麦角甾醇所对应的作用靶点。

2.2 非小细胞肺癌疾病靶点获取

以“non-small cell lung cancer”为基础搜索词条，通过 GeneCards（https：//www.Genecards. org/）、在线人类孟德尔遗传资料库（OMIM，http：//OMIM.org/）等对 NSCLC 靶点进行筛选。将过氧麦角甾醇靶点和 NSCLC 靶点进行交集，利用 Venny 平台进行分析，获取过氧麦角甾醇治疗 NSCLC 的潜在靶点信息。

2.3 蛋白相互作用（PPI）网络分析与核心靶点获取

采用 STRING（https：//STRING-db.org/）数据库分析在“2.2”项下得到的交集靶点数据，并制作 PPI 网络。将分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件，利用其 Centiscape 2.2 插件来筛选出核心靶点。

2.4 基因本体（GO）功能富集和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析

利用 Metascape 平台（https：//www.metascape. org）对“2.3”项下筛选得到的核心靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析，并利用微生信（http：//www. bioinformatics.com.cn/）平台进行可视化处理。

2.5 分子对接

从 PubChem 数据库中下载得到过氧麦角甾醇的 3D 结构，并导入 AutoDockTools 软件中进行预处理。同时，利用 PDB 数据库获取相关靶点并用 PyMOL 软件除去 PDB 格式下蛋白结构中的配体和非蛋白分子，并用 AutoDockTool 软件进行加氢和加电荷处理，计算总电荷。对接完成后，采用 Pymol 软件进行可视化处理。

2.6 细胞培养

A549 细胞用含 10% FBS 及 1% 双抗（青霉素 - 链霉素）的 Ham’s F-12K 培养基在 37 ℃、5% CO_2 的环境下培养。

2.7 MTT 法检测细胞活力

以每孔 5×10^3 个细胞，在 96 孔板中接种处于对数期的 A549 细胞，至细胞完全贴壁，吸弃培养基。实验分为空白对照组和 2.5、5、10、20、40、80 μmol·L^{-1} 过氧麦角甾醇组。每孔使用 150 μL 相应的含药培养基进行干预，空白对照组中加入与所加含药培养基等体积的 Ham’s F-12K 培养基。作用 24、48、72 h 后，每孔加入 20 μL MTT 溶液，孵育 4 h 后，弃去培养液，加入 150 μL DMSO，振荡，使用酶标仪在 490 nm 波长下对各孔的吸光度（A）值进行检测。增殖抑制率（%）=（1 − $A_{给药组}$/$A_{空白对照组}$）×100%。用 SPSS 25.0 软件计算过氧麦角甾醇作用于 A549 细胞半数抑制浓度。

2.8 细胞凋亡情况监测

取对数生长期的 A549 细胞以 5.0×10^5 个·mL^{-1} 的密度接种于 6 孔细胞培养板中，继续培养 24 h，使用不同浓度过氧麦角甾醇（0、10、20、40 μmol·L^{-1}）处理细胞 48 h 后，PBS 洗涤，加入 AO、EB 染色液各 5 μL，室温避光孵育 5 min，使用激光共聚焦显微镜观察各组细胞的凋亡形态并拍照（×400）。收集、洗涤细胞，加入 Annexin V-FITC、PI 染液（Binding Buffer ∶ Annexin V-FITC ∶ PI = 100∶1∶1，*V/V/V*），于室温下暗处孵育 30 min，使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.9 DCFH-DA 法检测活性氧变化

细胞按照“2.8”项下方法进行分组给药和培养。A549 细胞洗涤后，加入无血清稀释的 DCFH-DA 探针，37 ℃孵育 20 min 后，使用无血清培养基洗涤细胞后，流式细胞仪检测细胞活性氧含量或使用激光共聚焦显微镜拍照观察（×400）。

2.10 JC-1 法检测线粒体膜电位变化

细胞按照“2.8”项下方法进行分组给药和培养。A549 细胞洗涤后，加入稀释的 JC-1 染色液，37 ℃孵育 30 min 后，用 1×Buffer 洗去多余的染色液，流式细胞仪检测线粒体膜电位变化或使用激光共聚焦显微镜拍照观察（×400）。

2.11 Western blot 法检测相关蛋白的表达

细胞按照“2.8”项下方法进行分组给药和培养。收集各组细胞，加入细胞裂解液后冰浴 30 min，低温高速离心 20 min 提取总蛋白。蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，结束后转至 PVDF 膜，脱脂奶粉封闭 2 h 后，使用 TBST 缓冲液洗 PDVF 膜 3 次；加入稀释后的一抗 4 ℃孵育过夜。使用 TBST 缓冲液洗膜后，加入二抗在常温下孵育 2 h，洗膜后 ECL 发光液显色，利用 BIO-RAD

曝光；运用 Image J V1.8.0 图像分析软件检测条带灰度值，计算蛋白条带相对表达水平。

2.12 数据处理与分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差（One-way ANOVA）分析。

3 结果

3.1 过氧麦角甾醇治疗 NSCLC 潜在作用靶点

通过 PubChem、SwissTargetPrediction、PharmMapper 数据库获得 413 个过氧麦角甾醇的潜在靶点；通过 GeneCards、OMIM 数据库获得 12 754 个非小细胞肺癌的相关靶点。采用 Venny 平台将药物靶点与疾病靶点取交集，获得 170 个共有靶点，即过氧麦角甾醇治疗非小细胞肺癌的潜在作用靶点。

3.2 PPI 网络分析和核心靶点获取

将“3.1”项下获得的共有靶点，通过数据库 STRING 分析，过氧麦角甾醇抗非小细胞肺癌 PPI 网络中共涉及 160 个节点及 716 条边，平均度值（degree）为 8.95。见图 1。利用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行分析；以节点度值为评价参数，核心靶点筛选条件设置为 degree 大于 17.9（2 倍平均度值），共筛选出 20 个核心靶点，核心靶点及拓扑参数见表 1。

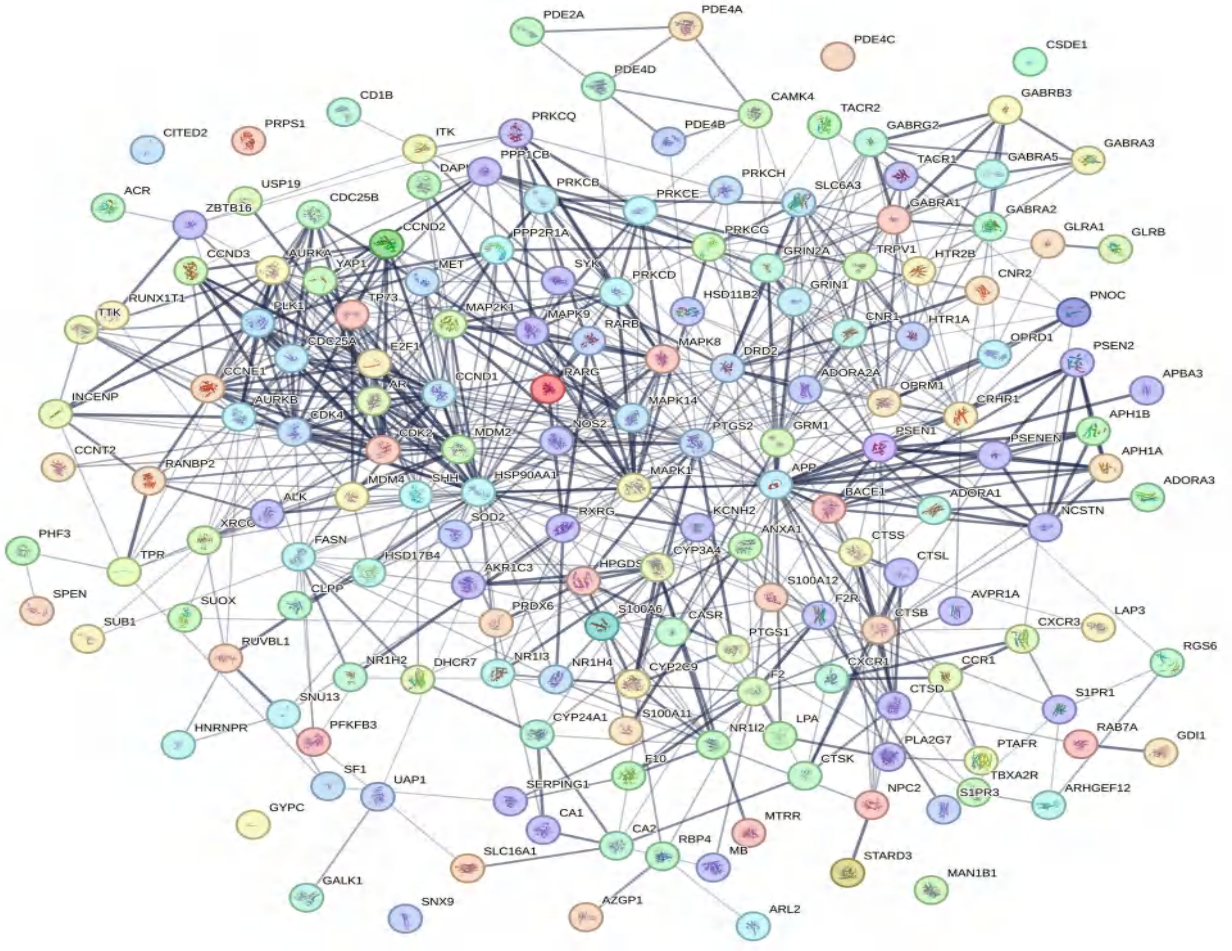


图 1 PPI 蛋白相互作用网络

Fig 1 PPI protein interaction network

3.3 GO 及 KEGG 通路富集分析

在 GO 分析结果中，细胞生物过程富集基因数越多，错误检出率（FDR）越低。以 FDR ＜ 0.05，筛选出细胞生物过程（BP）285 个，如蛋白质的磷酸化、磷酸化的正向调节、细胞周期相变的调节、有丝分裂细胞周期过程等；细胞组成（CC）41 个，如轴突、核包膜、远端轴突、树突等；分子功能（MF）20 个，如激酶活性、蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性等，根据 Count 排序，取前 10 进行可视化处理，见图 2。KEGG 分析中有 119 条信号通路，其中包括多条癌症信号通路，如前列腺癌信号通路、人乳头状瘤病毒感染信号通路、PI3K-AKT 信号通路等，根据 FDR ＜ 0.05 进行排序，对富集基因大于 5 的 54 条通路进行可视化处理，见图 3。结合文献调研及 KEGG 结果分析，选择 PI3K/AKT/mTOR 信号通路进行后续研究。

表 1　过氧麦角甾醇治疗非小细胞肺癌核心靶点互作的拓扑学参数

Tab 1　Topological parameters of core target interactions in ergosterol peroxide treatment of non-small cell lung cancer

No.	名称缩写	中文名称	度值	介数中间性	接近中心性
1	HSP90AA1	热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1	41	0.166	0.503
2	MAPK1	有丝分裂原活性蛋白激酶 1	40	0.181	0.523
3	MDM2	E3 泛素连接酶	31	0.049	0.463
4	CCND1	细胞周期蛋白 D1	30	0.038	0.455
5	HPGDS	造血前列腺素 D 合酶	26	0.070	0.462
6	APP	β 淀粉样前体蛋白	26	0.114	0.488
7	PTGS2	前列腺素 G/H 合酶 2	23	0.048	0.473
8	AR	雄激素受体	23	0.036	0.449
9	MAPK14	丝裂原活化蛋白激酶 14	22	0.033	0.460
10	CDK4	细胞周期蛋白依赖性激酶 4	22	0.015	0.410
11	CCNE1	细胞周期蛋白 E1	22	0.005	0.379
12	CDK2	细胞周期蛋白依赖性激酶 2	22	0.014	0.429
13	AURKB	极光激酶 B	21	0.022	0.391
14	GRIN1	谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 1	20	0.047	0.442
15	CNR1	大麻素受体 1	19	0.046	0.407
16	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8	19	0.012	0.445
17	AURKA	极光激酶 A	19	0.007	0.386
18	PRKCG	蛋白激酶 C，γ	19	0.037	0.423
19	F2	凝血因子Ⅱ	18	0.070	0.444
20	MAP2K1	有丝分裂原活化蛋白激酶 1	18	0.012	0.433

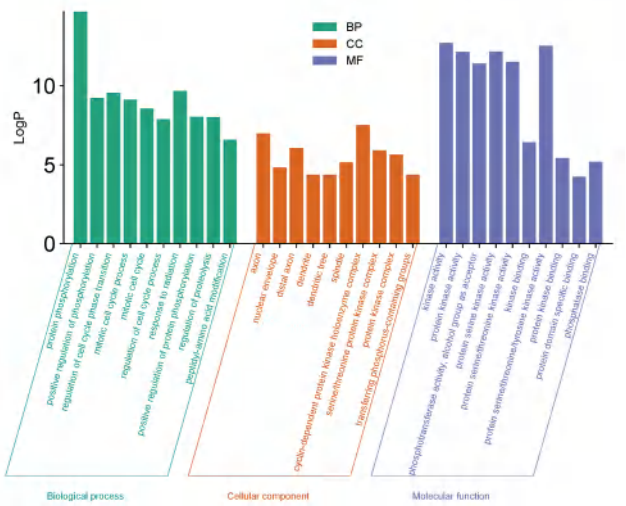


图 2　GO 富集分析柱状图

Fig 2　Histogram of GO enrichment analysis

3.4　分子对接结果

为了更精准地预测过氧麦角甾醇对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的作用，本研究通过 PDB 数据库获得 PI3K（PDB ID：4OYS）、AKT（PDB ID：3O96）、mTOR（PDB ID：3JBZ）蛋白结构，与过氧麦角甾醇进行分子对接，分子对接结果见图 4、表 2。其中过氧麦角甾醇与 PI3K、AKT、mTOR 的对接结合自由能分别为－40.53、－47.90、－38.85 kJ·mol^{-1}，结合自由能均小于－20.93 kJ·mol^{-1}，

图 3　KEGG 通路气泡图

Fig 3　KEGG pathway bubble diagram

表示其结合能力较强。

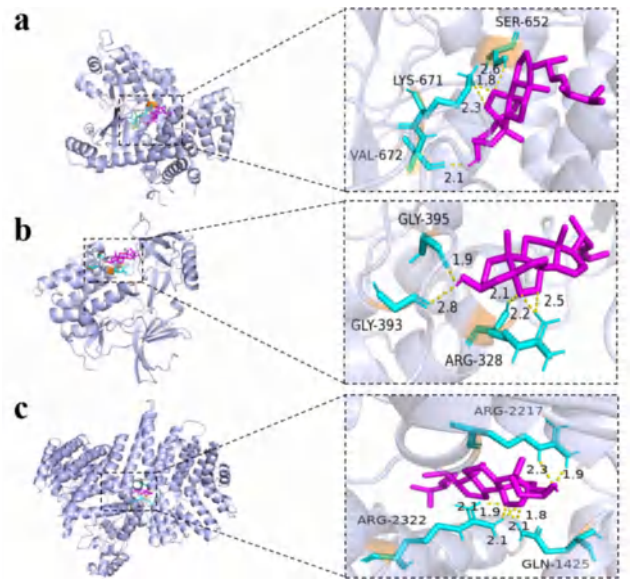


图 4　分子对接 3D 可视化图

Fig 4　3D visualization of molecular docking

a. 过氧麦角甾醇与 PI3K 对接 3D 图（3D docking of ergosterol peroxide and PI3K）；b. 过氧麦角甾醇与 AKT 对接 3D 图（3D docking of ergosterol peroxide and AKT）；c. 过氧麦角甾醇与 mTOR 对接 3D 图（3D docking ofergosterol peroxide and mTOR）

表 2　过氧麦角甾醇与靶点结合能

Tab 2　Binding energy of ergosterol peroxide and target site

基因	PDB ID	结合能 /（kJ·mol^{-1}）
PI3K	4OYS	－40.53
AKT	3O96	－47.90
mTOR	3JBZ	－38.85

3.5 过氧麦角甾醇对 A549 细胞存活率的影响

采用 MTT 法检测过氧麦角甾醇对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的影响。与空白对照相比，给药作用 24、48 和 72 h 后，A549 细胞的存活率均显著下降（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$），并呈现时间和给药浓度相关性。过氧麦角甾醇作用 A549 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为（27.30±1.04）μmol•L^{-1}、（14.81±0.15）μmol•L^{-1}、（11.66±0.30）μmol • L^{-1}，结果见图 5。故后期实验选用过氧麦角甾醇干预的梯度浓度设置为 10、20 和 40 μmol•L^{-1}。

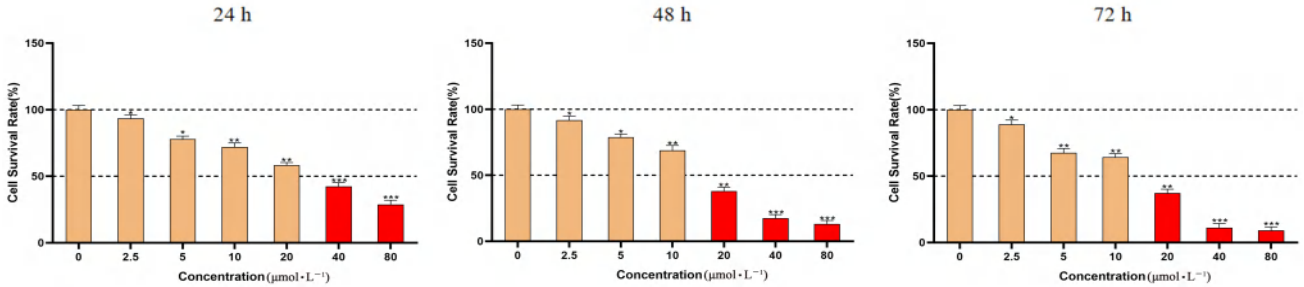


图 5 过氧麦角甾醇对 A549 细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

Fig 5 Effect of ergosterol peroxide on A549 cells viability（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

3.6 过氧麦角甾醇对 A549 细胞凋亡率的影响

AO/EB 双染色法实验结果显示，与空白对照组相比，过氧麦角甾醇处理后 A549 细胞形态发生改变，呈现出绿色荧光的非凋亡状态细胞数量减少，呈现出红色荧光的凋亡细胞数量增加，并且具有浓度依赖性，结果见图 6。采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡率，结果显示与空白对照组比较，10、20 和 40 μmol • L^{-1} 的过氧麦角甾醇作用 A549 细胞 48 h 后，进入早期凋亡和晚期凋亡的细胞比例显著增加，并呈现出显著的药物浓度依赖性，结果见图 7 及表 3。

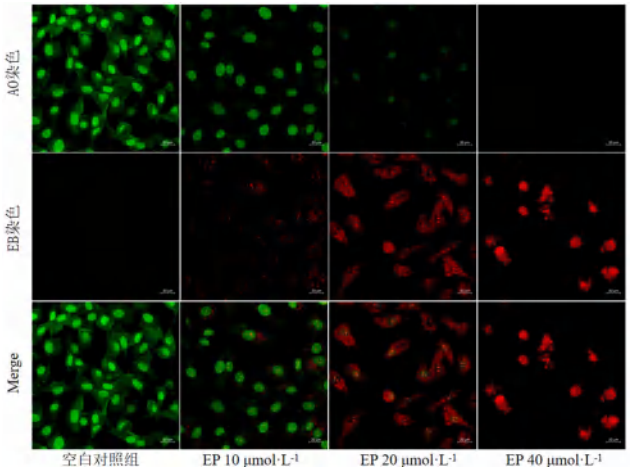


图 6 过氧麦角甾醇对 A549 细胞凋亡的影响（免疫荧光，×400）

Fig 6 Effect of ergosterol peroxide on the apoptosis of A549 cells（immunofluorescence，×400）

3.7 过氧麦角甾醇对 A549 细胞活性氧的影响

激光共聚焦显微镜观察结果显示，不同浓度的过氧麦角甾醇处理 A549 细胞后，细胞内活性氧的荧光随着浓度的增加逐渐增强，结果见图 8。流式

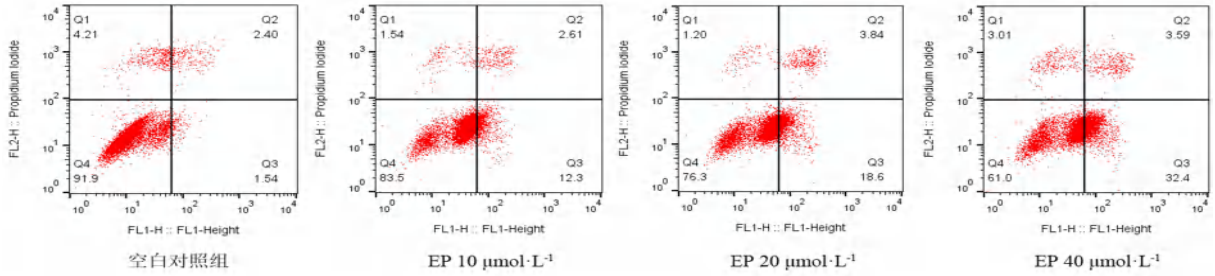


图 7 过氧麦角甾醇对 A549 细胞总凋亡率的影响

Fig 7 Effect of ergosterol peroxide on the total apoptosis rate of A549 cells

表 3 过氧麦角甾醇对 A549 细胞总凋亡率、线粒体膜电位和活性氧的影响 ($n = 3$)

Tab 3 Effect of ergosterol peroxide on total apoptosis rate，mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in A549 cells ($n = 3$)

组别	剂量 /（μmol • L^{-1}）	总凋亡率 /%	线粒体膜电位 /%	活性氧水平
空白对照	—	3.94±0.29	16.66±0.35	2.66±0.31
过氧麦角甾醇	10	14.91±0.74*	10.96±1.38*	9.56±0.22*
	20	22.44±1.82*	3.98±0.67*	51.30±1.49*
	40	35.99±2.08*	2.03±0.54*	136.06±2.84*

注（Note）：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$（Compared with the blank control group，$^{*}P < 0.05$）。

细胞术检测 A549 细胞内活性氧水平结果显示，与空白对照组比较，10、20 和 40 μmol • L^{-1} 的过氧麦角甾醇作用细胞 48 h 后，A549 细胞的活性氧荧光强度值显著升高（$P < 0.05$）。结果见图 9 及表 3。

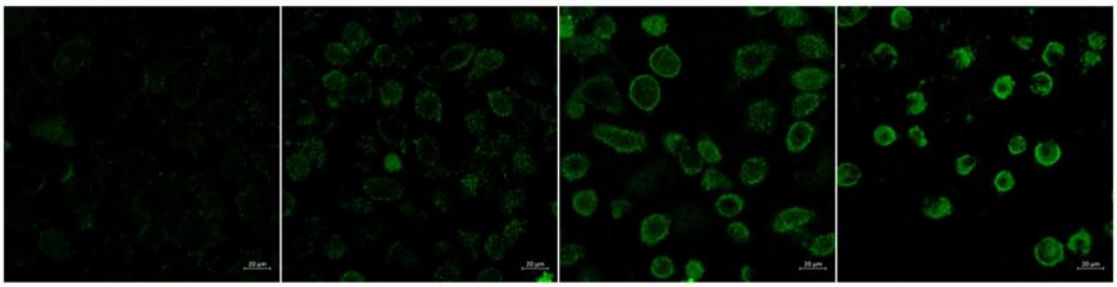


图 8 过氧麦角甾醇对 A549 细胞活性氧水平的影响（免疫荧光，×400）

Fig 8 Effect of ergosterol peroxide on reactive oxygen species in A549 cells（immunofluorescence，×400）

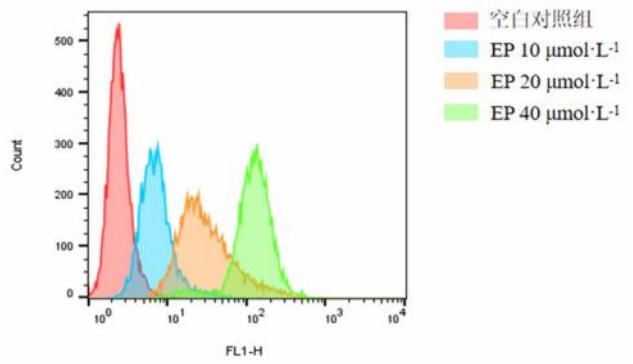


图 9 过氧麦角甾醇对 A549 细胞活性氧水平的影响

Fig 9 Effect of ergosterol peroxide on reactive oxygen species in A549

3.8 过氧麦角甾醇对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位结果如图 10 所示，空白对照组呈现红色荧光，说明此时线粒体膜电位处于正常状态。与空白对照组比较，10、20、40 μmol • L^{-1} 的过氧麦角甾醇作用 A549 细胞 48 h 后，红色荧光逐渐变弱至消失，绿色荧光逐渐加强。流式细胞术检测 A549 细胞内膜电位水平结果显示，受药物浓度影响 A549 细胞内的线粒体膜电位水平呈显著下降（$P < 0.05$）。结果见图 11 及表 3。

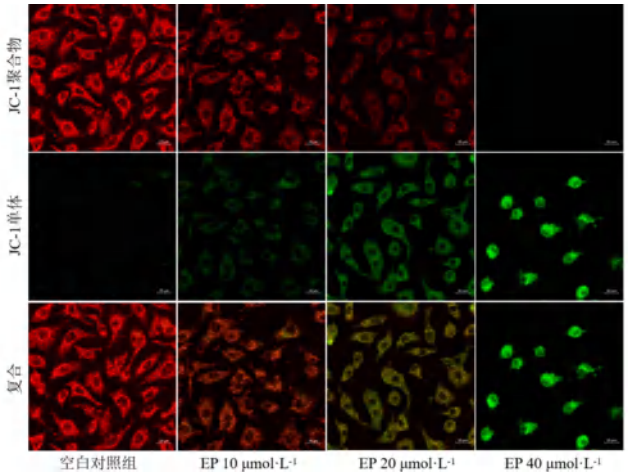


图 10 过氧麦角甾醇对 A549 细胞线粒体膜电位的影响（免疫荧光，×400）

Fig 10 Effect of ergosterol peroxide on mitochondrial membrane potential of A549 cells（immunofluorescence，×400）

3.9 过氧麦角甾醇对 A549 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响

采用 10、20、40 μmol • L^{-1} 的过氧麦角甾醇作用 A549 细胞 48 h 后。与空白对照组比较，过氧麦角甾醇各组的 Bax、Cleaved Caspase-3 的表达

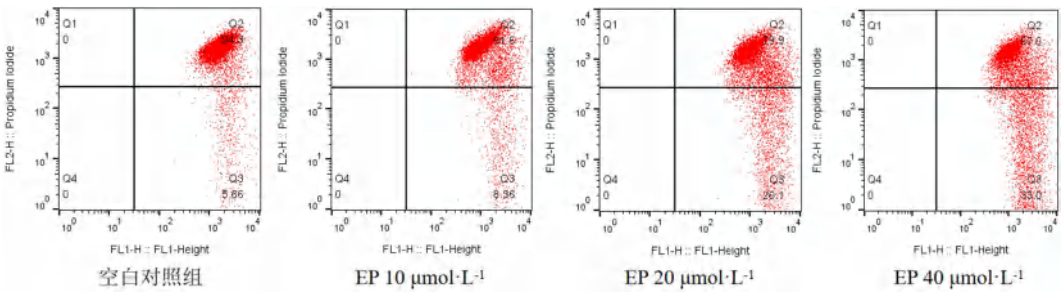


图 11 过氧麦角甾醇对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

Fig 11 Effect of ergosterol peroxide on mitochondrial membrane potential of A549 cells

显著上调，Bcl-2、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 的表达水平均显著下调，结果见图 12。

4 讨论

肺癌是世界上最常见的癌症类型。由于早期诊断的局限性，大多数肺癌患者在中期或晚期被诊断出来。此外，化疗药物耐药性的增加[10-11]，

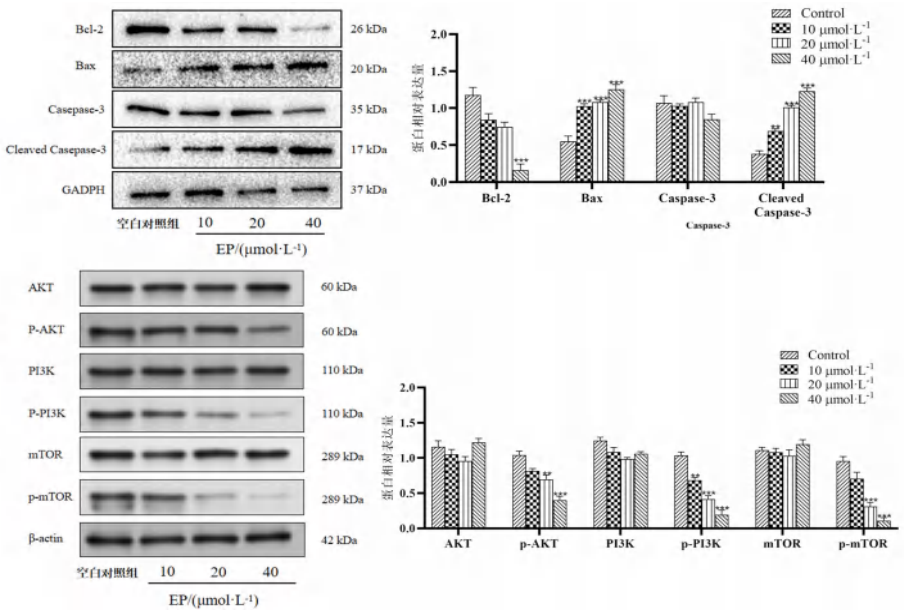


图 12 过氧麦角甾醇对 A549 细胞线粒体凋亡通路及 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 12 Effects of ergosterol peroxide on expression of mitochondrial apoptosis pathway and PI3K/AKT/mTOR pathway related proteins in A549 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注：与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

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

使人们对天然产物治疗肺癌更加关注 [12]。灵芝是我国民间久用的中草药，在中医治疗中被认为是有效的抗肿瘤药物，过氧麦角甾醇是存在于灵芝中的天然产物 [13]，具有多种药理活性，以抗肿瘤和抗炎作用最为突出 [14]。Han 等 [15] 通过研究发现过氧麦角甾醇对 Caspase 8/3 的激活在诱导前列腺癌细胞凋亡中起着关键作用。Zhou 等 [16] 通过 RT-PCR 和空斑实验表明过氧麦角甾醇可以降低 IFN-β 致敏细胞中甲型流感病毒（IAV）感染的炎症。黄花芳 [17] 发现过氧麦角甾醇可以抑制内质网的保护机制从而产生抗肿瘤作用。为了进一步探究过氧麦角甾醇对人 NSCLC 的作用机制，本研究基于网络药理学及分子对接为理论指导，通过体外实验进一步探究其作用机制。

通过网络药理学对过氧麦角甾醇治疗人非小细胞肺癌的靶点进行预测，得到 20 个关键治疗靶点，在 GO 富集分析中发现过氧麦角甾醇治疗人 NSCLC 主要通过调节蛋白质的磷酸化，从而达到治疗 NSCLC 的效果；在 KEGG 通路富集分析中，过氧麦角甾醇对人 NSCLC 的作用主要发生在癌症信号通路、PI3K/AKT 信号通路、FoxO 信号通路等。分子对接结果显示，过氧麦角甾醇与 PI3K、AKT、mTOR 对接结合能均小于 − 20.93 kJ • mol $^{-1}$，提示其作用机制可能与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

线粒体是细胞内氧化损伤的敏感靶点，由于肿瘤细胞中的氧化还原出现异常，导致线粒体功能受损，活性氧水平升高，进而促使细胞发生凋亡 [18]。研究表明，药物对肿瘤细胞具有毒性作用的一个主要原因就是诱导肿瘤细胞产生大量活性氧而引起肿瘤细胞发生氧化应激效应 [19]。同时，过量的活性氧能够增加线粒体的通透性，从而降低线粒体的膜电位，导致细胞凋亡的发生。激光共聚焦和流式细胞术结果显示，过氧麦角甾醇作用 A549 细胞后，细胞总凋亡率升高，细胞内的 ROS 水平显著增加，线粒体膜电位下降，并呈现浓度依赖性地诱导 A549 细胞凋亡。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路是最重要的细胞内途径之一，调节生存、细胞生长、分化、细胞代谢和细胞骨架重组反应一系列信号，包括生长因子受体酪氨酸激酶（RTKs）和 G 蛋白偶联受体信号 [20-22]。在肿瘤的治疗中，PI3K/AKT/mTOR 信号通路已成为研究的热点 [23]。本研究 Western blot 实验结果显示，过氧麦角甾醇处理的 A549 细胞内 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 表达水平显著降低，表明过氧麦角甾醇对人 A549 细胞的影响可能与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

综上所述，过氧麦角甾醇在体外可以显著抑制 A549 细胞增殖，并诱导细胞凋亡，其作用机制可能与 PI3K/AKT/mTOR 通路介导线粒体凋亡途径有关。但是在本研究中未对其他 NSCLC 细胞系进行研究，且对线粒体凋亡途径研究不够深入，因此，过氧麦角甾醇治疗人 NSCLC 的作用机制还需要进一步研究。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. Ca-Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] Garon EB，Hellmann MD，Rizvi NA，et al. Five-year overall survival for patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with pembrolizumab：results from the phase Ⅰ KEYNOTE-001 study [J]. J Clin Oncol，2019，37（28）：2518-2527.

[3] 袁冲 . 基于网络药理学和分子对接的东莨菪素抗非小细胞肺癌的作用机制研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2021.

[4] 卜明 . 5α，8α-过氧甾醇类化合物的设计、合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 北京：北京工业大学，2017.

[5] 李向敏 . 皱盖假芝和灵芝孢子中甾醇类化合物抗肿瘤作用机制研究 [D]. 广州：华南理工大学，2016.

[6] Kobori M，Yoshida M，Ohnishi-Kameyama M，et al. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells [J]. Br J Pharmacol，2007，150（2）：209-219.

[7] Meza-Menchaca T，Poblete-Naredo I，Albores-Medina A，et al. Ergosterol peroxide isolated from oyster medicinal mushroom，pleurotus ostreatus（agaricomycetes），potentially induces radiosensitivity in cervical cancer [J]. Int J Med Mushrooms，2020，22（11）：1109-1119.

[8] 罗然，邓思琦，赵音旭，等 . 基于网络药理学及体外实验探讨过氧麦角甾醇对乳腺癌 MCF-7 细胞的作用机制 [J]. 中国中药杂志，2024，49（13）：3627-3635.

[9] 王璐，罗然，赵音旭，等 . 过氧麦角甾醇通过调控线粒体凋亡途径诱导人肝癌细胞凋亡 [J]. 中国中药杂志，2024，49（12）：3365-3372.

[10] Valdes M，Nicholas G，Goss GD，et al. Chemotherapy in recurrent advanced non-small-cell lung cancer after adjuvant chemotherapy [J]. Curr Oncol Rep，2016，23（6）：386-390.

[11] Al-Tarakji M，Feilchenfeldt J，Haidar A，et al. Rare occurrence of metastasis from lung cancer to the anus：case report and review of the literature [J]. World J Surg Oncol，2016，14（1）：157.

[12] Robles-Fernández I，Rodríguez-Serrano F，Álvarez PJ，et al. Antitumor properties of natural compounds and related molecules [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov，2013，8（3）：203-215.

[13] Wu QP，Xie YZ，Deng Z，et al. Ergosterol peroxide isolated from Ganoderma lucidum abolishes microRNA miR-378-mediated tumor cells on chemoresistance [J]. PLoS One，2012，7（8）：e44579.

[14] Bu M，Yang BB，Hu L. Natural endoperoxides as drug lead compounds [J]. Curr Med Chem，2016，23：383-405.

[15] Han J，Sohn EJ，Kim B，et al. Upregulation of death receptor 5 and activation of caspase 8/3 play a critical role in ergosterol peroxide induced apoptosis in DU 145 prostate cancer cells [J]. Cancer Cell Int，2014，14（1）：117.

[16] Zhou BX，Liang XL，Feng QT，et al. Ergosterol peroxide suppresses influenza A virus-induced pro-inflammatory response and apoptosis by blocking RIG-I signaling [J]. Eur J Pharmacol，2019，860：172543.

[17] 黄花芳 . 过氧化麦角甾醇对不同增殖状态肿瘤细胞的作用 [D]. 福建：福建医科大学，2023.

[18] Xu DM，Li LR，Liu LC，et al. Polychlorinated biphenyl quinone induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cells [J]. Environ Toxicol，2015，30（9）：1063.

[19] Kaplan P，Tatarkova Z，Sivanova MK，et al. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. Int J Mol Sci，2020，21（20）：7698.

[20] Liu PX，Cheng HL，Roberts TM，et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer [J]. Nat Rev Drug Discov，2009，8（8）：627-644.

[21] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer：opportunities，challenges and limitations [J]. Nat Rev Cancer，2009，9（8）：550-562.

[22] Goldar S，Khaniani MS，Derakhshan SM，et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment [J]. Asian Pac J Cancer Prev，2015，16（6）：2129-2144.

[23] Spangle JM，Roberts TM，Zhao JJ. The emerging role of PI3K/AKT-mediated epigenetic regulation in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer，2017，1868（1）：123-131.

（收稿日期：2024-03-24；修回日期：2024-05-13）

载葛根素的 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体的制备及其对心肌缺血 / 再灌注损伤的影响研究

胡雄彬[1, 2, 3]，李凤梅[1, 2, 3]，李胜男[1, 2, 3]，王妍[1, 2, 3]，向大雄[1, 2, 3]，刘新义[1, 2, 3*]（1. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；2. 湖南省转化医学与创新药物工程技术研究中心，长沙 410011；3. 中南大学临床药学研究所，长沙 410011）

摘要：目的 构建载葛根素的 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体（PUE@T/M-L），并研究其减少心肌缺血 / 再灌注（I/R）损伤的作用。**方法** 合成 TPP-PEG-PE 和 MMP-PEG-PE 高分子材料来修饰脂质体，采用薄膜水化法制备 PUE@T/M-L，考察其线粒体靶向性和溶酶体逃逸效果；构建心肌 I/R 损伤模型，评价 PUE@T/M-L 对心肌 I/R 损伤的作用。**结果** PUE@T/M-L 呈圆球形结构，平均粒径为 144 nm，Zeta 电位为－ 19.4 mV，具有较好的线粒体靶向性和溶酶体逃逸效果。动物实验结果表明，PUE@T/M-L 能显著减少心肌梗死面积，降低心肌细胞凋亡率，其减少心肌 I/R 损伤作用明显优于其他类型的脂质体，可能与 MMP 肽靶向和滞留于缺血心肌，再由 TPP 阳离子靶向递送进入心肌细胞线粒体有关。**结论** PUE@T/M-L 可将药物高效递送至缺血心肌细胞线粒体，从而显著增强葛根素降低心肌 I/R 损伤的作用。

关键词：葛根素；心肌缺血 / 再灌注损伤；线粒体靶向；脂质体
中图分类号：R285，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2880-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.007

Preparation of TPP cation/MMP peptide bimodified liposomes loaded with puerarin and its effects on myocardial ischemia/reperfusion injury

HU Xiong-bin[1, 2, 3], LI Feng-mei[1, 2, 3], LI Sheng-nan[1, 2, 3], WANG Yan[1, 2, 3], XIANG Da-xiong[1, 2, 3], LIU Xin-yi[1, 2, 3*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Second Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410011; 2. *Hunan Provincial Engineering Research Centre of Translational Medicine and Innovative Drug*, *Changsha* 410011; 3. *Institute of Clinical Pharmacy*, *Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective To establish puerarin-carrying TPP cation/MMP peptide co-modified liposomes (PUE@T/M-L) and to determine their effect on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** TPP-PEG-PE and MMP-PEG-PE target-head polymer materials were synthesized to modify liposomes. PUE@T/M-L was prepared by thin-film hydration to determine their mitochondrial targeting and lysosomal escape effect, to establish a model of myocardial I/R injury, and to evaluate the effect of PUE@T/M-L in reducing myocardial I/R injury. **Results** PUE@T/M-L showed a spherical structure with an average particle size of 144 nm and a zeta potential of － 19.4 mV, with fair mitochondrial targeting and lysosomal escape effect. PUE@T/M-L largely reduced the area of myocardial infarction and the apoptosis rate of cardiomyocytes. The efficacy of PUE@T/M-L was obviously better than that of other liposomes, which might be related to MMP peptide targeting and retention in the ischemic myocardium, and then the target delivery into the mitochondria of cardiomyocytes by TPP cation. **Conclusion** PUE@T/M-L can efficiently deliver

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No. 2024JJ8126）；湖南省卫健委项目（No. W20243065）；中南大学研究生教育教学改革项目（No. 2024JGB158）；长沙市自然科学基金项目（No. kq2403088）。

作者简介：胡雄彬，男，主管药师，主要从事药物新型递送系统研究，email：huxiongbin@csu.edu.cn *通信作者：刘新义，男，副主任药师，主要从事药物新型递送系统研究，email：liuxinyi128@csu.edu.cn

the drug into the mitochondria of ischemic cardiomyocytes, thus enhancing the drug effect on reducing myocardial I/R injury.

Key words: puerarin; myocardial I/R injury; mitochondrial targeting; liposome

急性心肌梗死具有较高的发病率和死亡率，流行病学数据显示，天津市 2007—2015 年 35 岁以上人群急性心肌梗死发病率约为 0.2%，死亡率达 0.05%，是一种严重危害人类健康的疾病 [1]。临床常用冠状动脉介入治疗、药物溶栓等疏通阻塞冠状动脉的方法来缓解急性心肌梗死的急危症状 [2]。这些介入治疗方法在恢复血脉流通的同时会进一步加剧缺血心肌的损伤，即临床上常见的心肌缺血 / 再灌注（I/R）损伤 [3-4]。心肌 I/R 损伤机制主要表现为线粒体功能障碍及其诱导的心肌细胞大量凋亡 [5]。葛根素（puerarin）是从中药葛根中分离得到的主要生物活性成分，已被证明具有减轻心肌 I/R 损伤作用 [6]。已有研究证实，葛根素可以抑制缺血心肌线粒体 mPTP 的开放，减少线粒体膜电位的下降，从而减少缺血心肌细胞线粒体凋亡 [7-8]。然而普通葛根素药物缺乏心肌细胞线粒体靶向性，到达线粒体效应部位的浓度较低，严重影响其预期疗效和临床广泛应用 [9-10]。因此，构建一种新型递送系统，将葛根素高效递送到缺血心肌细胞线粒体具有重要的临床价值和广阔的应用前景。

现有研究显示，脂质体在缺血心肌部位具有较好的增强渗透和滞留效应（EPR）的作用，可将药物被动聚集在缺血心肌部位 [11]，但再灌注时脉冲血流的不断冲击，影响药物在病灶部位的滞留。Nguyen 等 [11] 研究发现，MMP 肽（NH_2-GGGGCTTHWGFTLC-$CONH_2$）可与缺血心肌部位巨噬细胞分泌的基质金属蛋白酶靶向结合，从而促进纳米胶束靶向聚集在缺血心肌部位 [12-13]。这一研究表明，MMP 肽可作为药物载体滞留缺血心肌的重要靶头。在此基础上，借助三苯基膦（TPP）阳离子的线粒体靶向性，有望将药物进一步递送到缺血心肌细胞线粒体。基于此，本研究拟构建 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体，将葛根素精确递送到缺血心肌细胞线粒体，从而充分发挥葛根素在病灶部位精准调控的治疗作用。

1 仪器与试药

马尔文帕纳科激光粒度仪 Mastersizer 3000（英国马尔文公司），Agilent 1200 高效液相色谱仪（安捷伦公司），JEM-2100 透射电镜（日本电子株式会社），Metter-Toledo 电子分析天平 [梅特勒托利多科技（中国）有限公司]，LSM 900 激光共聚焦显微镜（德国蔡司公司）。

葛根素（上海源叶生物科技有限公司，纯度＞ 95%，批号：202217），大豆卵磷脂（北京奥博星生物科技有限责任公司），胆固醇（美国西格玛奥德里奇公司），二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 - 聚乙二醇 - 琥珀酰亚胺酯（DSPE-PEG-NHS）和氨基聚乙二醇 - 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺（DSPE-PEG-NH_2）（PEG 为 PEG2000，西安瑞喜生物科技有限公司），（3- 羧丙基）三苯基溴化膦（CTPP，上海阿拉丁生化科技股份有限公司），1- 乙基 -（3- 二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺（EDC，美国西格玛奥德里奇公司），N- 羟基丁二酰亚胺（NHS，山东西亚化学工业有限公司），香豆素 6（Coumarin 6，C6，北京百灵威科技有限公司），MMP 肽 [吉尔生化（上海）有限公司]，线粒体红色荧光探针 Mitotracker Red、溶酶体红色荧光探针（Beyotime 公司），其他试剂（国药集团化学试剂有限公司）。H9c2 心肌细胞（武汉普诺赛生命科技有限公司提供）。

2 方法与结果

2.1 MMP 肽修饰的二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇（MMP-PEG-PE）的合成和鉴定

称取 100 mg DSPE-PEG-NHS 和 50 mg MMP 肽溶于 10 mL *N*- 甲基吡咯烷酮，加入 50 μL 三乙胺，在室温条件下搅拌 12 h，转移至透析袋，置于纯水中透析 24 h，除去未反应的物质和副产物，将溶液冷冻干燥，得到 MMP-PEG-PE 的粗品。然后采用制备色谱对 MMP-PEG-PE 粗品进行进一步的纯化，以含有 0.1% 三氟乙酸（TFA）为水相，30% ～ 100% 的乙腈为有机相，进行梯度洗脱。最终的产物 MMP-PEG-PE 聚合物的结构通过 ^{1}H NMR 和 MALDI-TOF 质谱（MALDI-TOF MS）进行结构鉴定。结果见图 1A，^{1}H NMR 表明 MMP-PEG-PE 出现了 MMP 肽在 7.0 ～ 8.7 ppm 的部分氨基酸苯环质子的特征信号，且 DSPE-PEG-NHS 中的琥珀酰亚胺基特征峰在最终产物 MMP-PEG-PE 中消失，此结果表明，MMP 肽的端氨基与 DSPE-PEG-NHS 的琥珀酰亚胺基通过酰化反应成功地结合在一起，形成了 MMP-PEG-PE。图 1B 中 MALDI-TOF MS 表明，DSPE-PEG-NHS（分子量 3004 Da）和 MMP 肽（分子量 1396 Da）通过琥珀酰亚胺和氨基之间的酰化反应，成功合成了 MMP-TP-PEG-PE（分子量 4400 Da），进一步证实了两者等摩尔反应，最终成功合成得到了 MMP-PEG-PE。

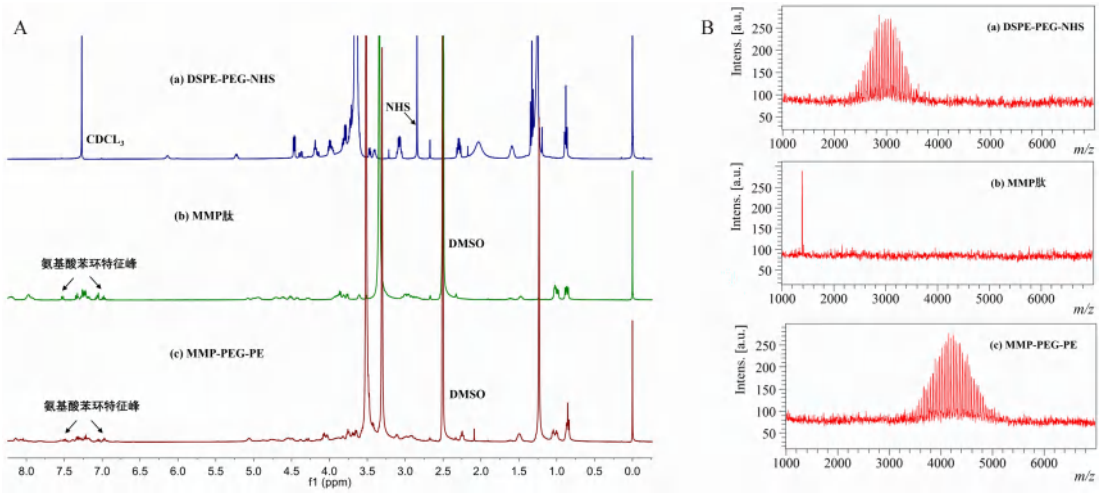


图 1 MMP-PEG-PE 的合成和结构鉴定

Fig 1 Synthesis and structural characterization of MMP-PEG-PE

A. ^{1}H NMR（^{1}H NMR）；B. MALDI-TOF 质谱（MALDI-TOF mass spectra）

2.2 TPP 阳离子修饰的二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇（TPP-PEG-PE）的合成和鉴定

取 6.5 mg CTPP、7.8 mg EDC、4.7 mg NHS 置于 10 mL 的两口圆底烧瓶中，加入 500 μL 二氯甲烷和 10 μL 三乙胺，进行磁力搅拌，向烧瓶中通入氩气以排出其他气体，使用封口膜将接口处封闭，室温避光条件下磁力搅拌 5 h，然后加入 30.9 mg PEG_{2K}-PE-NH_2，并补加 1.2 mL 的二氯甲烷和 13 μL 的三乙胺，在室温避光条件下继续搅拌 48 h。搅拌结束后，将烧瓶中的溶液转移至透析袋置于纯水中避光透析 24 h，此过程中每 4 h 换一次纯水，去除未反应物质及副产物。将透析后的溶液离心（10 000 r • min^{-1}，5 min），收集上清液冷冻干燥，即可获得 TPP-PEG-PE 两亲性聚合物。如图 2A 所示，CTPP 与 DSPE-PEG-NH_2 通过酰胺键连接在一起，形成共聚物 TPP-PEG-PE。图 2B 合成产物的 ^{1}H NMR 谱显示了 PEG 的 -CH_2-CH_2-O- 基团（3.65）和 TPP 的苯环质子（7.75）的特征基团，表明成功合成 TPP-PEG-PE。

2.3 双修饰载葛根素脂质体的制备及表征

称取 3.4 mg 大豆卵磷脂、2.0 mg 胆固醇、7.0 mg TPP-PEG-PE、9.2 mg MMP-PEG-PE（摩尔比 26∶52∶11∶11）溶解于 10 mL 甲醇中，再加入葛根素 4 mg，置于旋转蒸发仪上，37 ℃水浴条件下旋转蒸发 15 min，待甲醇完全蒸发成膜后，加入 3 mL 水，于 37 ℃水浴 20 min，再将溶液超声 5 min 后，使用脂质体挤压器挤压过 200 nm 膜 10 次，即可制备得到 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰的载葛根素脂质体（PUE@T/M-L）。MMP 肽修饰的载葛根素脂质体（PUE@M-L）通过不加 TPP 阳离子制得，其他步骤相同。取 PUE@T/M-L 溶液，将其滴在覆有碳涂膜的 200 目铜网格上，多余的液体用滤纸吸干，风干后使用透射电子显微镜

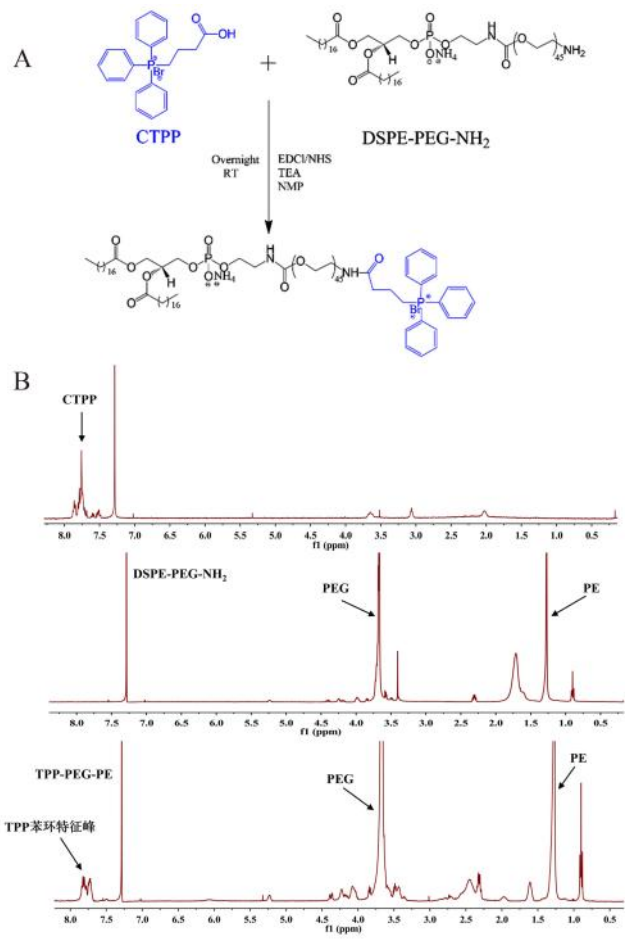


图 2 TPP-PEG-PE 的合成路线和结构鉴定

Fig 2 Synthetic route and structural characterization of TPP-PEG-PE

A. 合成路线（synthetic route）；B. ^{1}H NMR（^{1}H NMR）

进行观察，考察 PUE@T/M-L 的微观形态。采用马尔文粒度分析仪测定 PUE@T/M-L 的粒径和 Zeta 电位。结果见图 3A，透射电镜下的 PUE@T/M-L 形态呈大致规则圆球形结构，马尔文粒度仪测定 PUE@T/M-L

的粒径约为 144 nm（见图 3B），略大于透射电镜检测得到的粒径结果，可能原因是 MMP-PEG-PE 和 TPP-PEG-PE 大分子修饰脂质体后，这些高分子材料在水中自由舒展，导致水合后直径增大。另外，PUE@T/M-L 的 Zeta 电位约为－19.4 mV（见图 3C），明显高于未用 TPP 阳离子修饰的脂质体 PUE@M-L（Zeta 电位为－28.9 mV），其可能的原因是 TPP 阳离子修饰脂质体后，提高了脂质体的 Zeta 电位。

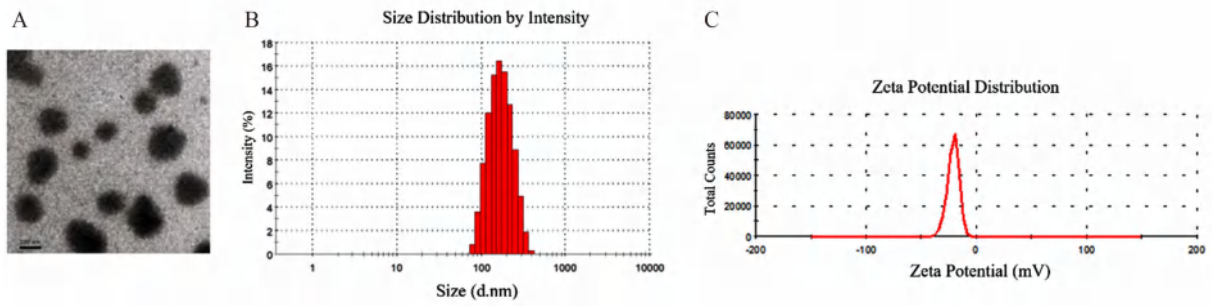


图 3　PUE@T/M-L 的表征

Fig 3　Characterization of PUE@T/M-L

A. 透射电镜图（transmission electron microscopy image）；B. 粒径（particle size）；C. Zeta 电位（Zeta potential）

2.4　双修饰载葛根素脂质体的溶血性考察

考虑到实验需要进行尾静脉注射，为进一步考察所制备递送系统的生物安全性，本研究采取溶血性实验进行评价。在小鼠心脏取血 1 mL 置 EDTA 抗凝管中，加入 0.9% 氯化钠溶液混匀，得到稀释的全血。分别取 PUE@M-L 溶液和 PUE@T/M-L 溶液，以纯水溶液为阳性对照，生理盐水为阴性对照，每管加入 200 μL 稀释全血，室温下静置孵育 30 min，2000 r • min^{-1} 离心 5 min，观察上清液颜色，并用紫外分光光度计测定 545 nm 处吸光度，计算溶血百分率。结果如图 4 所示，PUE@M-L、PUE@T/M-L 这两种载体均未发生溶血的现象，表明安全性良好，可用于体内注射。

2.5　双修饰载葛根素脂质体的载药量和包封率

将 PUE@T/M-L 溶液在冷冻干燥机中冷冻干燥成粉末状，称取 1 mg PUE@T/M-L 干燥粉末，用甲醇定容至 2 mL 量瓶中，得到用于测定载药量的样品。另取 150 μL 的 PUE@T/M-L 溶液，装入截留分子量为 3 kDa 的 Millipore 超滤管中，以 10 000 r • min^{-1} 的速度离心 15 min，下层溶液即为未包载的游离药物，收集下层溶液和原溶液，用于包封率的检测。参照文献确定测量所用色谱条件[14]：色谱柱为 CAPCELL PAK C18（250 mm×4.6 mm，5.0 μm）；流动相为纯水 - 乙腈＝82∶18（*V*/*V*）；检测波长为 250 nm；进样体积为 20 μL；柱温为 30 ℃；流速为 1 mL • min^{-1}。计算载药量和包封率（测量对照品和样品的峰面积，计算出溶液中的葛根素浓度）。计算公式：包封率（*EE*，%）＝（葛根素总浓度－游离葛根素的浓度）/ 葛根素总浓度 ×100%；载药量（*DL*，%）＝脂质体中葛根素质量 / 脂质体质量 ×100%。结果 PUE@T/M-L 的载药量为（6.2±0.1）%，包封率为（78.9±0.6）%，这一结果表明制备得到的 PUE@T/M-L 具有良好的载药性能和包封率。

2.6　线粒体靶向和溶酶体逃逸

用香豆素 6（C6）标记的 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体（C6@T/M-L）来研究 PUE@T/M-L 在递药时葛根素的亚细胞分布，并以 C6 标记的 MMP 肽修饰脂质体（C6@M-L）作为对照组。心肌细胞以 1×10^5 个 / 孔的密度接种在 12 孔板中，参照本团队前期已有的实验方法，建立心肌细胞缺氧 / 复氧模型[15]，来模拟心肌 I/R 损伤，具体方法为：将心肌细胞在不含葡萄糖和血清的 DMEM 培养基中低氧条件（1%O_2，5%CO_2，94%N_2）培养 8 h 后，转入复氧条件（95% 空气，5%CO_2）继续培养，在复氧的初始阶段即进行药物孵育实验。加入 C6@M-L 或 C6@T/M-L，孵育 1、4 h 后吸出培养基并使用 PBS 清洗 3 遍，使用 4% 多聚甲醛固定 20 min，用 PBS 清洗 3 遍，再加入线粒体探针 Mitotracker Red（200 nmol • L^{-1}）37 ℃避光孵育 30 min，用 PBS 清洗 3 次，再加入细胞核染料 DAPI（5 μg • mL^{-1}）孵育 10 min，用 PBS 清洗 3 次后，使用激光共聚焦显微镜观察 C6 标记脂质体在细胞中的分布情况，并通过 Image pro-plus 6.0 Image J 软件完成共定位分析。结果见图 5，孵育 1 h 和 4 h，C6@T/M-L 组均呈现出与线粒体的显著重合现象，其绿色脂质体与红色线粒体重合后的黄色荧光显著强于未经 TPP 阳离子修饰的 C6@M-L 组，其代表重合度的皮尔逊相关系数（*R* 值）在 1 h 和 4 h 分别为 0.77±0.02 和 0.75±0.02，也显著高于相同孵育时间未经 TPP 阳离子修饰的 C6@M-L 组。这一实验结果说明，TPP 阳离子能促进 C6@T/M-L 向心肌细胞的线粒体聚集，具有较好线粒体靶向性。

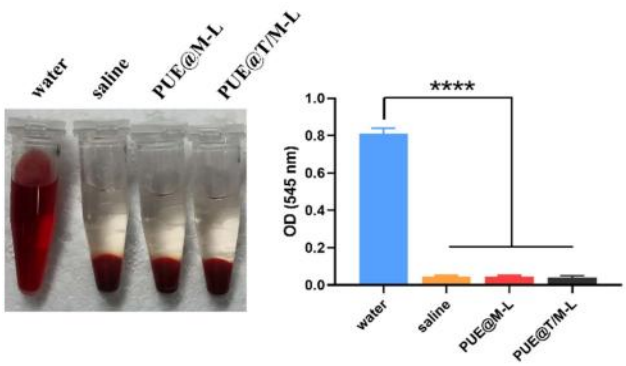


图 4 PUE@T/M-L 的溶血能力考察（$^{****}P < 0.0001$）

Fig 4 Hemolytic ability of PUE@T/M-L（$^{****}P < 0.0001$）

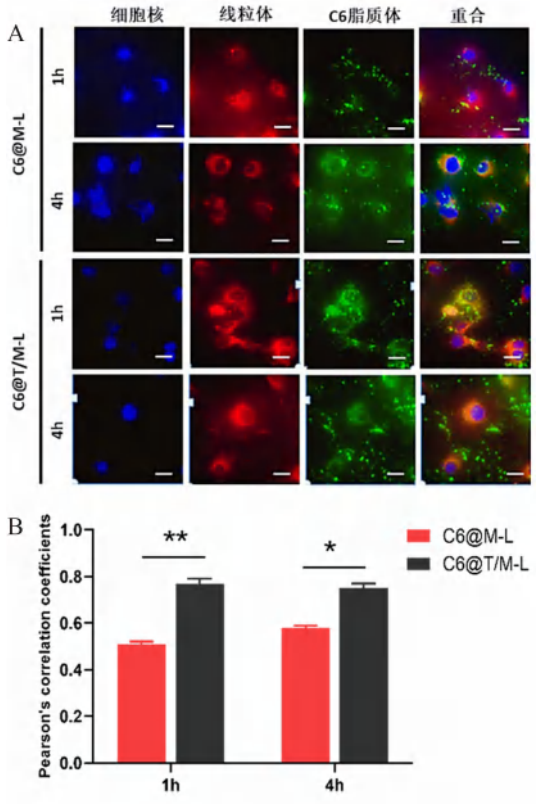


图 5 C6@T/M-L 的线粒体靶向性（标尺为 20 μm，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 5 Mitochondrial targeting of C6@T/M-L（scale bar = 20 μm，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

将心肌细胞以 1×10^{5} 个 / 孔的密度接种在 12 孔板中，建立心肌细胞缺氧 / 复氧模型之后，加入 C6 标记脂质体，孵育 1、4 h，吸出培养基后使用 PBS 清洗 3 遍，使用 4% 多聚甲醛固定 20 min，用 PBS 清洗 3 遍，再加入溶酶体探针 LysoTracker Red（60 nmol • L^{-1}）孵育 30 min，用 PBS 清洗 3 次，加入细胞核染料 DAPI（5 μg • mL^{-1}）孵育 10 min，用 PBS 清洗 3 次后，使用激光共聚焦显微镜观察 C6 标记脂质体在细胞中的分布情况，并通过 Image pro-plus 6.0 Image J 软件完成共定位分析。结果见图 6，C6@T/M-L 随孵育时间的增加，其逃逸溶酶体捕获的现象逐渐明显，尤其在孵育 4 h 时，标记为绿色的脂质体部分已经离开了红色溶酶体区域，其代表重合度的皮尔逊相关系数为 0.49±0.01，显著低于未经 TPP 阳离子修饰 C6@M-L 组的 0.67±0.01（$P < 0.05$）。这一结果说明 TPP 阳离子修饰后的脂质体 C6@T/M-L 具有较好溶酶体逃逸能力。其可能的原因是 TPP 阳离子的“质子海绵”效应，即通过增加溶酶体的 pH，促使氯离子流入以恢复溶酶体酸性环境，随后水流入以抵消由此产生的渗透压不平衡，水的不断流入导致溶酶体肿胀破裂，从而将内容物释放至细胞质中 [16-17]。TPP 阳离子修饰脂质体 C6@T/M-L 的溶酶体逃逸，有助于实现 C6@T/M-L 的线粒体靶向传递。

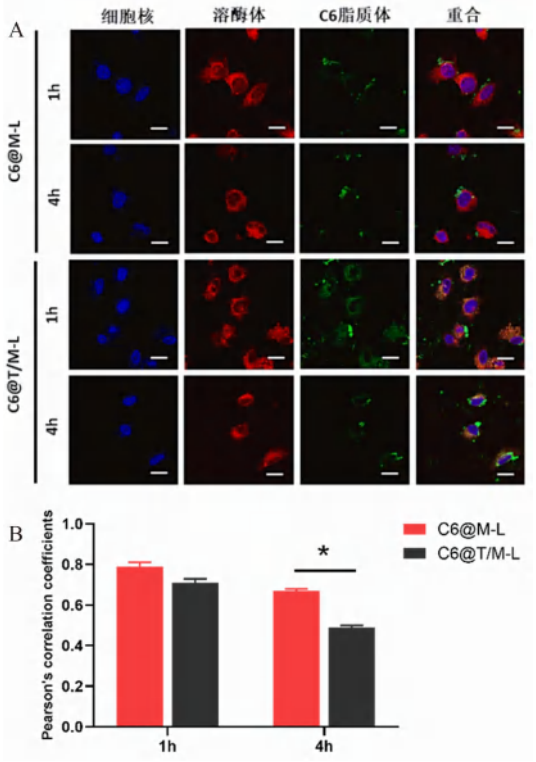


图 6 C6@T/M-L 的溶酶体逃逸（标尺为 20 μm，$^{*}P < 0.05$）

Fig 6 Lysosome escape of C6@T/M-L（scale bar = 20 μm，$^{*}P < 0.05$）

2.7 减少心肌 I/R 损伤

2.7.1 小鼠心肌 I/R 损伤模型的构建及给药处理

动物实验经中南大学湘雅二医院动物伦理委员会批准（批件号：20220547），采用 10 ～ 12 周的雄性 C57BL/6J 小鼠（22 ～ 27 g，湖南斯莱克景达实验动物有限公司），每组 6 只。小鼠心肌 I/R 损伤模型参照前期报道的方法建立 [18]：将实验小鼠腹腔注射戊巴比妥钠（60 mg • kg^{-1}）进行麻醉固定后，对其左胸和下巴处进行脱毛处理。随后对脱毛实验小鼠进行气管插管，呼吸机通氧以维持小鼠生命。插管后，剪开小鼠左胸，使用 8 号缝合线对左前降支冠状动脉进行结扎，结扎成功

后，用纱布盖在小鼠身上进行保暖以防小鼠失温死亡。所有小鼠均通过心脏发白来验证结扎缺血是否成功[19]。结扎 30 min 后解开缝合线，使用 4 号缝合线将胸口和下巴处皮肤缝合后，放入笼中使其再灌注 24 h。在再灌注前约 5 min，以 15 mg·kg^{-1} 葛根素的给药剂量通过尾静脉注射游离 PUE、PUE@L、PUE@M-L 和葛根素脂质体（PUE@T/M-L）。假手术组（Sham）动物操作类似，但不结扎左前降支动脉，心肌 I/R 损伤模型组（I/R）注射等体积的生理盐水。在整个动物实验过程中，当小鼠醒来并能自由活动时就移除呼吸机。小鼠饲养于 SPF 动物实验室，环境温度控制在 25 ℃左右。

2.7.2 心肌梗死面积 经过心肌 I/R 过程后，将小鼠心脏取出，放在－ 80 ℃冰箱中冷冻 10 min，使其变硬易于切割。将心脏均匀切成 6 片，放在 2%TTC 溶液中于 37 ℃避光孵育 20 min，孵育结束后再用 4% 多聚甲醛固定 2 h，拍照，并用 Image J 计算梗死面积。心肌梗死面积的大小常用来评估缺血心肌损伤程度，心脏经过 TTC 染色后，梗死部位变成白色，而正常部分则为红色。心肌梗死率（%）＝（切片总面积－切片红色部分面积）/（切片总面积）×100%。结果见图 7，图 7A 为实验后心脏切片的代表性图片，可以看到假手术组心脏切片为正常的红色，无明显心肌梗死现象，当经过 I/R 处理后，心脏白色部分区域明显增多，经各药物组处理后，心肌梗死面积呈现不同程度的减少，其中 PUE@T/M-L 组改善作用最为明显，其心脏切片颜色基本呈现与假手术组相同的红色，只有较少部分为缺血样白色。图 7B 为经计算后的心肌梗死率量化对比图，其结果与心脏切片直观图一致，PUE@T/M-L 组显示出最显著的改善心脏梗死作用，其心脏梗死改善程度显著优于 PUE@M-L 和 PUE@L。可能是 MMP 肽促进了 PUE@T/M-L 与缺血心肌的结合，TPP 阳离子则促进了 PUE@T/M-L 向缺血心肌细胞线粒体的递送，使更多的葛根素参与调节受损的线粒体功能，从而减少了心肌梗死面积。

2.7.3 心肌细胞凋亡与心肌形态 取出小鼠心脏，生理盐水洗净后固定在 4% 多聚甲醛中，石蜡包埋并切成 5 μm 厚的切片，进行 HE 染色和 TUNEL 染色，使用光学显微镜观察组织病理学变化。观察 HE 染色后心肌组织形态的变化，心肌细胞的凋亡以 TUNEL 阳性细胞的百分比表示。凋亡率（%）＝ TUNEL 阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%。TUNEL 染色的结果显示，正常细胞为蓝色，而凋亡细胞被染成绿色（见图 8A）。假手术组未见明显凋亡细胞，而心脏经 I/R 后，绿色的凋亡细胞明显增多，经不同药物组处理后，其绿色凋亡细胞呈不同程度的减少（见图 8B）。其中，PUE@T/M-L 组相比其他对照组其绿色凋亡细胞显著减少，呈现出最显著的减少心肌细胞凋亡效果。线粒体损伤是心肌细胞凋亡过程中的重要病理机制，在 MMP 肽的帮助下，PUE@T/M-L 首先在缺血心肌部位聚集，然后通过 TPP 阳离子的线粒体靶向作用促进药物向线粒体部位转运，可以将葛根素聚集于线粒体部位，从而提高葛根素抑制心肌细胞凋亡作用。HE 染色各组心肌形态结果（见图 8C）显示，假手术组心肌纤维完整，无断裂现象，而经过心肌 I/R 后，心肌组织表现出严重的细胞排列混乱，心肌纤维肿胀并产生断裂。使用游离葛根素进行治疗后，心肌组织仍有较大损伤，细胞排列虽有所改善，但变化较小。相对于其他药物处理组，PUE@M-L 和 PUE@T/M-L 处理组的心肌形态有了较大的改善，PUE@T/M-L 的改善作用更为显著，其心肌组织排列整齐，断裂情况也显著减少，说明 PUE@T/M-L 可以有效改善心肌组织形态。以上实验结果表明，TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体可实现缺血心肌细胞线粒体的靶向递送，显著增强葛根素降低心肌 I/R 损伤的作用。

3 讨论

本论文研究了载葛根素的 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体减少心肌缺血 / 再灌注损伤作用。

首先通过薄膜水化法结合脂质体挤压器制备了 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体 PUE@T/M-L，通过 TEM 和 Zeta 电位等表征发现，制备得到的 PUE@T/M-L 呈圆球形结构，粒径为 144 nm。经 TPP 阳离子修饰的脂质体，相比未经修饰的脂质体，Zeta 电位明显增加，这将有利于 PUE@T/M-L 进入带负电的线粒体中。研究报道 100 ～ 200 nm 的纳米载体具有较大的增强渗透滞留效应（EPR 效应），这有利于纳米粒子通过 EPR 效应在缺血心肌部位聚集[20]，而纳米材料上修饰的正电荷则能提高载体与带负电线粒体的结合[21]。故本研究构建的 PUE@T/M-L 有望能有效聚集于缺血心肌的线粒体中。

本研究考察了所制备递送系统的线粒体靶向性，实验发现 TPP 阳离子修饰的脂质体具有较好的线粒体靶向能力，这可能主要是由于电荷间的相互作用，使 TPP 修饰的脂质体在线粒体聚集[22]。实验通过溶酶体探针和 C6 标记的脂质体共定位，考察了溶酶体逃逸情况，结果发现 TPP 阳离子修饰后的脂质体具有较好溶酶体逃逸能力。这可能是由于 TPP 阳离子的“质子海绵效应”导致

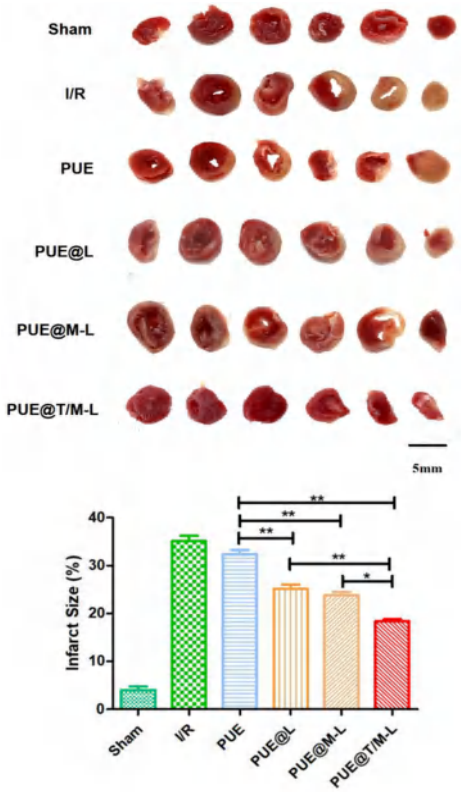


图 7 PUE@T/M-L 对心肌 I/R 损伤梗死面积的影响（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 7 Effect of PUE@T/M-L on the infarct area induced by myocardial ischemia-reperfusion（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

溶酶体的膨胀和破裂[23]，从而使药物从溶酶体中逃离。因此，TPP 修饰的脂质体在溶酶体中的降解减少，实现了载药脂质体的线粒体靶向递送。

在前期体外考察评价的基础上，本研究进一步考察了所制备的 TPP 阳离子 /MMP 肽双修饰脂质体 PUE@T/M-L 在心肌 I/R 损伤小鼠模型中的保护作用。通过 TTC 染色可以直观观察到不同处理组小鼠的心肌梗死情况，与假手术组相比，经过心肌 I/R 处理的小鼠心脏切片出现了较大面积的白色梗死现象，证明已成功建立了心肌 I/R 损伤动物模型，使用不同药物组处理后，心脏梗死程度均有不同程度下降，其中 PUE@T/M-L 改善心肌梗死作用最为显著。这可能是由于 MMP 肽促进了 PUE@T/M-L 与缺血心肌的结合，随后 TPP 阳离子促进了 PUE@T/M-L 向缺血心肌细胞线粒体的递送，使更多药物参与调节受损的线粒体功能，从而有效减少了心肌梗死的产生。通过 TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡情况，发现假手术组心肌细胞无明显凋亡情况，经 I/R 处理后，凋亡细胞显著增加，经各药物组处理后，心肌细胞凋亡数量出现不同程度减少，其中 PUE@M-L 组和 PUE@T/M-L 组相比其他组，心肌细胞凋亡显著减少，且两组间差异无统计学意义。我们推测出现此现象的潜在原因是葛根素治疗心肌 I/R 损伤的机制可能是多重的，除了抗心

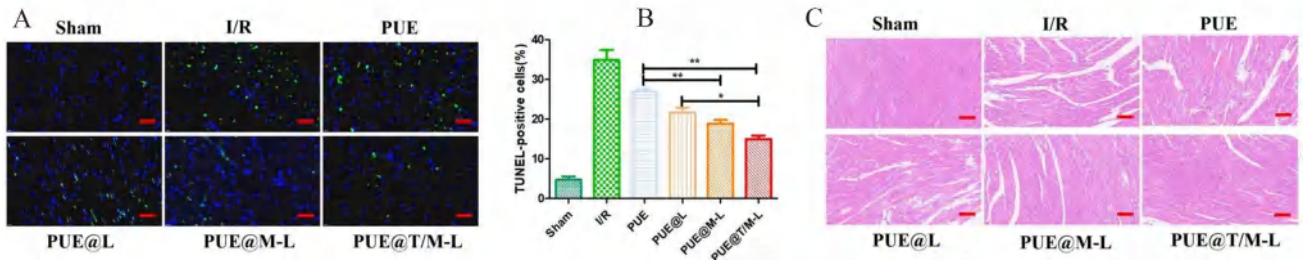


图 8 PUE@T/M-L 减少心肌 I/R 损伤的心肌细胞凋亡（A，B）和心肌 HE 染色结果（C）（标尺为 100 μm，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 8 Cardiomyocyte apoptosis（A，B）and HE staining of myocardium（C）in myocardial I/R injury reduced by PUE@T/M-L（scale bar = 100 μm，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

肌细胞凋亡外，还能通过降低心肌 ROS 水平等起保护作用[24]。所以两种载体递送不同量葛根素到达心肌部位后，不同量葛根素可能会引发多种机制的心肌保护作用，从而出现两组抗心肌细胞凋亡水平相当，但最终改善心肌梗死效果不同的现象。此外，通过 HE 染色进一步观察心肌组织的形态，可以看到经 I/R 后，心肌组织表现出严重的细胞排列紊乱，心肌纤维肿胀并产生断裂。游离 PUE 进行治疗后，心肌组织仍有较大损伤，细胞排列虽有所改善，但变化较小，这可能是由于游离药物生物利用度低且靶向性差，限制了其治疗作用的发挥[25]。经 PUE@M-L 组和 PUE@T/M-L 组处理后，心肌形态有较大程度改善，其中 PUE@T/M-L 组作用更为显著，心肌组织排列整齐，断裂现象也显著减少，说明 PUE@T/M-L 可以有效改善心肌形态。PUE@T/M-L 能有效减少心肌 I/R 损伤，从递送系统的构成分析可能存在以下优势：首先，相比于游离药物，脂质体能提高药物的生物利用度，利用 EPR 效应将药物聚集于缺血心肌部位；其次，缺血心肌部位普遍 MMP 上调，使用 MMP 肽修饰脂质体，可进一步使载药脂质体靶向于心肌细胞；最后，线粒体功能紊乱与心肌细胞凋亡紧密相关，而 TPP 的阳离子性和亲脂性使其修饰的脂质体可与线粒体靶向结合，将药物高效递送至线粒体，最大程度发挥药物调节线粒体功能，减少心肌细胞凋亡的作用，从而降低缺血心肌梗死程度。

综上所述，PUE@T/M-L 可以逃逸溶酶体的捕获，靶向进入线粒体，精准调控缺血心肌细胞线粒体功能，从而有效提高葛根素减少心肌 I/R 损伤作用。

参考文献

[1] 刘阳，天津市 2007—2015 年 35 岁以上人群急性心肌梗死发病率的估算 [D]. 北京：北京协和医学院，2017.

[2] Li MH，Tang XF，Liu XY，et al. Targeted miR-21 loaded liposomes for acute myocardial infarction [J]. J Mater Chem B，2020，8（45）：10384-10391.

[3] Hausenloy D，Yellon D. Targeting myocardial reperfusion injury——the search continues [J]. N Engl J Med，2015，373（11）：1073-1075.

[4] Biswas S，Dodwadkar N，Deshpande P，et al. Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity，target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects in vitro and in vivo [J]. J Control Release，2012，159（3）：393-402.

[5] Gao Q，Pan HY，Qiu S，et al. Atractyloside and 5-hydroxydecanoate block the protective effect of puerarin in isolated rat heart [J]. Life Sci，2006，79（3）：217-224.

[6] Han YH，Wang HL，Wang Y，et al. Puerarin protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury by upregulating LncRNA ANRIL and inhibiting autophagy [J]. Cell Tissue Res，2021，385（3）：739-751.

[7] Alkaç ZK，Korkak FA，Dagoglu G，et al. Puerarin mitigates oxidative injuries，opening of mitochondrial permeability transition pores and pathological damage associated with liver and kidney in Xanthium strumarium-intoxicated rats [J]. Toxicon，2022，213：13-22.

[8] Liu C，Zhang XJ，Yang HY，et al. PEG-modified nano liposomes co-deliver Apigenin and RAGE-siRNA to protect myocardial ischemia injury [J]. Int J Pharm，2024，649：73-78.

[9] Yue PF，Yuan HL，Zhu WF，et al. The study to reduce the hemolysis side effect of puerarin by a submicron emulsion delivery system [J]. Biol Pharm Bull，2008，31（1）：45-50.

[10] Hou SZ，Su ZR，Chen SX，et al. Role of the interaction between puerarin and the erythrocyte membrane in puerarin-induced hemolysis [J]. Chem Biol Interact，2011，192（3）：184-192.

[11] Nguyen J，Sievers R，Motion J，et al. Delivery of lipid micelles into infarcted myocardium using a lipid-linked matrix metalloproteinase targeting peptide [J]. Mol Pharm，2015，12（4）：1150-1157.

[12] Li WQ，Wu JY，Xiang DX，et al. Micelles loaded with puerarin and modified with triphenylphosphonium cation possess mitochondrial targeting and demonstrate enhanced protective effect against isoprenaline-induced H9c2 cells apoptosis [J]. Int J Nanomedicine，2019，14：8345-8360.

[13] Lesnefsky EJ，Chen Q，Tandler B，et al. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion：implications for novel therapies [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol，2017，57：535-565.

[14] Jin L，Li XM，Chen X，et al. A study on puerarin in situ gel eye drops：formulation optimization and pharmacokinetics on rabbits by microdialysis [J]. Int J Pharm，2023，642：176-183.

[15] Wang Y，Li FM，Wei SS，et al. Puerarin-loaded liposomes co-modified by ischemic myocardium-targeting peptide and triphenylphosphonium cations ameliorate myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Int J Nanomedicine，2024，19：7997-8014.

[16] Choi YS，Kwon K，Yoon K，et al. Photosensitizer-mediated mitochondria-targeting nanosized drug carriers：subcellular targeting，therapeutic，and imaging potentials [J]. Int J Pharm，2017，520（12）：195-206.

[17] Marrache S，Dhar S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2012，109（40）：16288-16293.

[18] Xu H，Cheng J，Wang XB，et al. Resveratrol pretreatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting STIM1-mediated intracellular calcium accumulation [J]. J Physiol Biochem，2019，75（4）：607-618.

[19] Vandergriff A，Huang K，Shen D，et al. Targeting regenerative exosomes to myocardial infarction using cardiac homing peptide [J]. Theranostics，2018，8（7）：1869-1878.

[20] Leporatti S. Thinking about enhanced permeability and retention effect（EPR）[J]. J Pers Med，2022，12（8）：1259-1264.

[21] Liu Y，Zhang J，Tu Y，et al. Potential-independent intracellular drug delivery and mitochondrial targeting [J]. ACS Nano，2022，16（1）：1409-1420.

[22] 席宁，王永辉，王丽森，等 . 线粒体靶向性的姜黄素 TPP-PEG-PLGA 脂质体的制备及促肝癌细胞凋亡研究 [J]. 中国药学杂志，2022，57（17）：1438-1446.

[23] Wang H，Zhang FK，Wen HY，et al. Tumor-and mitochondria-targeted nanoparticles eradicate drug resistant lung cancer through mitochondrial pathway of apoptosis [J]. J Nanobiotechnol，2020，18（1）：8-13.

[24] Wang SG，Zhang SM，Wang SP，et al. A comprehensive review on pueraria：insights on its chemistry and medicinal value [J]. Biomed Pharmacother，2020，131：734-741.

[25] Li WQ，Wu JY，Zhang J，et al. Puerarin-loaded PEG-PE micelles with enhanced anti-apoptotic effect and better pharmacokinetic profile [J]. Drug Deliv，2018，25（1）：827-837.

（收稿日期：2024-06-06；修回日期：2024-09-11）

全自动二维液相色谱测定人血清中阿普唑仑浓度及其临床应用

谢小华[1, 2]，欧玮[2]，何纯莲[1*]，杨新良[2]，王峰[3*]（1. 湖南师范大学 医学院，长沙 410081；2. 岳阳市中心医院 药学部，湖南 岳阳 414000；3. 中南大学湘雅二医院，长沙 410011）

摘要：目的 建立一种简便、快速、准确测定人血清中阿普唑仑浓度的分析方法，供临床治疗药物监测使用。**方法** 将样本去除蛋白后采用二级单工方法检测，第一维萃取柱为 Aston SC2（3.5 mm×25 mm，5 μm），流动相为 NCD-1D（甲醇 - 乙腈 - 磷酸铵缓冲液＝ 13.5∶16.5∶70，*V/V/V*），流速为 0.8 mL • min^{-1}；捕获柱为 Aston SH（3.5 mm×10 mm，5 μm）；第二维分析柱为 Aston SN（4.6 mm×125 mm，5 μm），流动相为乙腈 - 磷酸铵（氨水调 pH 7.4）- 甲醇（18∶32∶50，*V/V/V*），流速为 1.2 mL • min^{-1}。紫外检测波长 286 nm 和 261 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 500 μL。建立了全自动二维液相色谱仪测定人血清中阿普唑仑的方法，并对该方法学进行了验证。**结果** 人血清中阿普唑仑在 5.00 ～ 100.04 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，标准曲线为 $y = 6.423\times10^{3}x - 2.617\times10^{3}$（$r = 0.9998$），定量下限为 5.00 ng • mL^{-1}，日内精密度 *RSD* ≤ 6.2%，日间精密度 *RSD* ≤ 9.7%。低、中和高质量浓度的回收率在 96.2% ～ 100.7%，样品在所有考察的条件下均稳定。**结论** 本研究建立的分析方法准确性高、稳定性强，简便快捷，自动化程度高，可为临床阿普唑仑血药浓度监测、中毒患者的药物筛查以及阿普唑仑个性化给药提供实验依据。

关键词：阿普唑仑；治疗药物监测；全自动二维液相色谱；药物中毒

中图分类号：R917，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2888-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.008

Determination of alprazolam concentration in human serum by automatic two-dimensional liquid chromatography and its clinical application

XIE Xiao-hua[1, 2], OU Wei[2], HE Chun-lian[1*], YANG Xin-liang[2], WANG Feng[3*] (1. *College of Medicine*, *Hunan Normal University*, *Changsha* 410081; 2. *Department of Pharmacy*, *Yueyang Central Hospital*, *Yueyang Hunan* 414000; 3. *The Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective To establish an analytical method to rapidly, and accurately determine alprazolam concentration in human serum and monitor its therapeutic effect. **Methods** Samples were detected by the second-level single work mode after protein removal. The first-dimension column was an Aston SC2 column (3.5 mm×25 mm, 5 μm), with the mobile phase NCD-1D (methanol-acetonitrile-ammonium phosphate ＝ 13.5∶16.5∶70, *V/V/V*) at 0.8 mL • min^{-1}. The capture column was Aston SH (3.5 mm×10 mm, 5 μm). The second-dimensional analytical column was an Aston SN (4.6 mm×125 mm, 5 μm), with the mobile phase was acetonitrile-ammonium phosphate (ammonium hydroxide adjusted to pH 7.4)-methanol (18∶32∶50, *V/V/V*) at 1.2 mL • min^{-1}. The UV detection wavelengths were 286 nm and 261 nm, the column temperature was 40 ℃ , and the injection volume was 500 μL. An automatic two-dimensional liquid chromatography was established to monitor the blood concentration of alprazolam, and validate the methodology. **Results** The linearity of alprazolam in human serum was good at 5.00 ～ 100.04 ng•mL^{-1}, with the standard curve of $y = 6.423\times10^{3}x - 2.617\times10^{3}$ ($r = 0.9998$). The lower limit of quantification was 5.00 ng • mL^{-1}. The *RSD*s of intra-

基金项目：岳阳市创新平台与人才计划重点实验室项目 [岳市科发（2022）30 号]。

作者简介：谢小华，男，硕士研究生，主要从事临床药学及治疗药物监测研究，email：xiexiaohua66@126.com ***通信作者：**何纯莲，女，教授，主要从事天然产物活性成分提取分离、纳米材料设计与合成，email：chunlianhe6688@163.com；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

day precision were all less than 6.2%, and the *RSD*s of inter-day precision all less than 9.7%. The recoveries ranged 96.2% ～ 100.7% for low, medium and high mass concentration, and the samples remained stable under all conditions. **Conclusion** The analytical method established is highly fast, stable, simple, accurate and automatic, which provides experimental bases for therapeutic monitoring of alprazolam, screening of drug poisoning patients and individualized administration of alprazolam.
Key words: alprazolam; therapeutic drug monitoring; automatic two-dimensional liquid chromatography; drug poisoning

阿普唑仑是一种 1，4- 三唑苯二氮䓬类药物类似物，药理作用与地西泮相似，作用于 γ- 氨基丁酸（GABA）A 受体，从而降低神经元的兴奋性，具有抗焦虑、镇静、催眠、抗抑郁等药理作用 [1]，为临床常用的抗焦虑药和镇静催眠药 [2]。

阿普唑仑，药物不良反应多，个体差异大，其治疗窗窄，归属二类精神药品管控。若过量服用容易引起中毒，且其毒性明显高于其他苯二氮䓬类药物 [3]。简单、快速地测定血液中阿普唑仑的浓度，有助于治疗时根据患者血药浓度调整给药方案，采用最低有效剂量，避免阿普唑仑过量而引起的药物中毒现象。

阿普唑仑的监测方法有多种，采用 LC-MS/MS 测定阿普唑仑浓度的方法虽在灵敏度、准确度方面有优势 [4-5]，但质谱易受流动相、色谱柱、离子化温度、真空度、电离稳定性、碎片稳定性等多方面因素影响，工作曲线不具备长期稳定性 [6]；且购买成本高，基层医疗单位难以配备，使用范围受限，不利于推广。采用高效液相色谱法测定阿普唑仑浓度的方法中设定的线性范围，远高于服用单剂量阿普唑仑后的体内浓度，无法满足临床真实样品的检测需要 [7-10]。采用 GC-MS 测定阿普唑仑浓度的方法，前处理操作复杂、耗时长，且灵敏度较低，监测中毒患者阿普唑仑血药浓度时难以做到快速、准确 [11-15]。

基于此，本研究旨在建立一种前处理简单、稳定性好、专属性强、自动化程度高的血清阿普唑仑浓度测定的二维液相色谱法，并应用于临床阿普唑仑的血药浓度监测、药物中毒筛查及个性化给药。

1　材料

1.1　仪器

全自动二维液相色谱（日本岛津 LC-20AT 和湖南德米特仪器有限公司 FLC 2701）；HR-200 电子分析天平（日本株式会社 A&D 公司）；iCEN-24 高速离心机（杭州奥盛仪器有限公司）；TDZ4-WS 低速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；DW-HL340 － 80 ℃冰箱（中科美菱低温科技股份有限公司）；XW-80A 漩涡混合器（上海琪特分析仪器有限公司）；BCD-221NMV 冷藏冷冻冰箱（广东星星制冷设备有限公司）；EKUS-I-120 纯水仪（四川宜科纯水设备有限公司）。

1.2　试药

阿普唑仑对照品（中国食品药品检定研究院，批号：171218-200603，纯度：100%）；NCD-1D 移动相、ORG-2 去蛋白剂（湖南德米特仪器有限公司）；甲醇、乙腈、异丙醇（色谱纯）；纯净水为纯水仪所制（不低于 GB17323 执行标准）；健康人空白血清。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

分析柱：第一维萃取柱为 Aston SC2（3.5 mm×25 mm，5 μm），第一维泵流速：0.8 mL • min^{-1}；中间捕获柱为 Aston SH（3.5 mm×10 mm，5 μm），第二维分析柱为 Aston SN（4.6 mm×125 mm，5 μm）；流动相：一维流动相为 NCD-1（甲醇 - 乙腈 - 磷酸氨稀释液＝ 13.5∶16.5∶70，pH 5.4）；二维流动相 A-B-C 通道分别为乙腈 - 磷酸铵（氨水调 pH 7.4）- 甲醇（18∶32∶50，*V/V/V*）；第一维泵流速：1.2 mL • min^{-1}；柱温：40 ℃，紫外检测波长：286/261 nm，进样量：500 μL。工作程序见表 1。

表 1　工序对应时间程序

Tab 1　Time program for process diagram

工序流程	时间 /min	系统工作状态
工序 1	0 ～ 3.2	LC1 色谱柱工作，进行样品初级分离
工序 2	3.2 ～ 4.2	LC1 与中间柱连通，样品中目标组分的捕获
工序 3	4.2 ～ 12	LC2 与中间柱连通，样品中目标组分的分离检测

2.2　溶液配制

2.2.1　对照品工作液的配制　准确称取阿普唑仑对照品 2.501 g，用异丙醇定容至 25 mL，得到质量浓度为 100 040.00 ng • mL^{-1} 的母液，再进一步稀释定容，得到 10 004.00、1000.40 和 756.30 ng • mL^{-1} 对照品工作液，置于－ 80 ℃冰箱中避光保存，备用。

2.2.2 标准曲线和质控品溶液的配制 精密吸取不同浓度的阿普唑仑对照品工作液，用空白血清稀释定容，逐级稀释成质量浓度分别是 5.00、10.00、20.01、40.02、60.02 和 100.04 ng • mL^{-1} 标准曲线工作液。另取空白血清将阿普唑仑对照品工作液稀释定容，制备成 15.13、45.38、75.64 ng • mL^{-1} 的低、中、高 3 个浓度的质控品溶液，置于－ 80 ℃冰箱中避光保存，备用。

2.3 *血液样品的预处理*

将血样放入低速离心机中，以 3000 r • min^{-1} 离心 5 min；精密吸取 400 μL 上层血清至盛有 1000 μL ORG-2 去蛋白剂 EP 离心管中，涡旋振摇 1 min，转入高速机（14 500 r • min^{-1}）离心 8 min，取 1000 μL 上层清液至进样瓶中，进样分析。

2.4 *方法学验证*

2.4.1 专属性 将空白人血清（6 份不同来源的空白血清混合）、空白血清＋阿普唑仑对照品和服用阿普唑仑的患者血清，分别按 “2.3” 项下方法进行前处理；按 “2.1” 项下方法测定分析，观察有无内源性物质干扰目标峰。结果如图 1 所示，阿普唑仑在 10.64 min 左右出峰，色谱峰峰形好，血清内源性物质及其他杂质均不干扰样品的分离测定，说明本方法专属性高。

2.4.2 标准曲线和定量下限 将标准曲线工作液分别按 “2.3” 项下方法进行前处理，按 “2.1” 项下方法测定分析。以阿普唑仑浓度为自变量（x），以阿普唑仑血药浓度的峰面积为因变量（y）进行线性回归，建立标准曲线为 $y = 6.423\times10^{3}x - 2.617\times10^{3}$（$r = 0.9998$）；表明阿普唑仑血药浓度在 5.00 ～ 100.04 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性良好。取已知浓度的人血清样品进样，检查其信噪比 *S/N* 为 10 时，表示该方法能检测出阿普唑仑的最低浓度点，即为定量下限（LLOQ）。在此条件下平行测定 6 次已知浓度样品，测得定量下限为 5.00 ng • mL^{-1}，*RSD* 为 3.2%。

2.4.3 精密度与准确度 取阿普唑仑低、中、高（15.13、45.38、75.64 ng • mL^{-1}）3 个浓度的质控样品，按 “2.3” 项下方法前处理后进样分析。1 d 内每个质控浓度平行检测 5 组样品，连续 3 d 配制并测定质控样品。测出的结果代入线性回归方程得出浓度，比较该浓度与理论添加的浓度。阿普唑仑在此方法条件下准确度在 96.2% ～ 100.7%；日内精密度在 2.1% ～ 6.2%，日间精密度在 3.8% ～ 9.7%，均符合生物等效性分析方法学研究要求。

2.4.4 绝对回收率（提取回收率） 将对照品用二维流动相溶剂稀释相应的倍数，作为对照样品。将对照品用空白血清稀释相同的倍数，按 “2.3” 项下方法前处理后进样分析。分别进样 3 针，计算两者的峰面积之比。提取回收率（%）＝血清稀释样品峰面积 / 对照样品峰面积 ×100%。此条件下测得提取回收率为 98.65%。

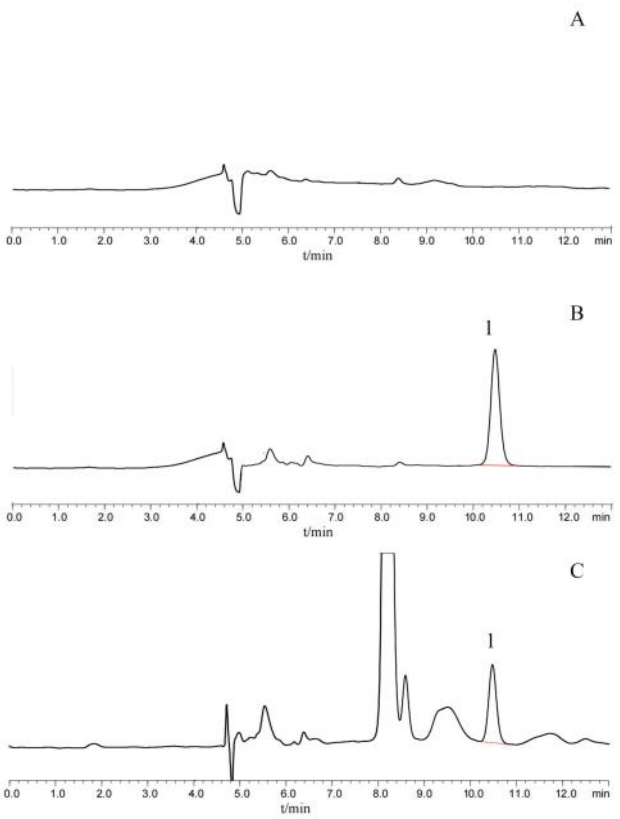


图 1 二维液相色谱仪典型色谱图

Fig 1 Two-dimensional liquid chromatograph typical chromatogram

A. 空白血清（blank blood sample）；B. 阿普唑仑对照品工作液（alprazolam control solution）；C. 服用阿普唑仑的患者血清（plasma of patients taking alprazolam）；1. 阿普唑仑（alprazolam）

2.4.5 稳定性 取质量浓度分别为 15.13、45.38、75.64 ng • mL^{-1} 的低、中、高浓度的质控品溶液，每个质控浓度设置 5 个平行样品，分别于室温避光放置 4 h，－ 20 ℃避光放置 21 d，－ 80 ℃避光放置 14 d 后，按 “2.3” 项下方法操作处理。另外，于－ 80 ℃冷冻保存 24 h 后室温下自然解冻，反复冻融连续 3 次。按 “2.3” 项下方法前处理后进样分析。结果表明，样品在室温避光放置 4 h，－ 20 ℃避光冻存 21 d、反复冻融 3 次条件下稳定性均较好。

2.5 *临床应用*

将本方法应用于服用阿普唑仑效果不佳或耐受性较差以及怀疑阿普唑仑中毒的病例进行血药浓度监测，指导临床合理用药和协助临床判断药物中毒，为下一步的临床治疗提供依据。2022—2023 年

共检测阿普唑仑样本 42 例，阳性结果样本 22 例，典型病例如表 2。根据 2017 年神经精神药理学与药物精神病学协会治疗药物监测专家组发布指南[16]，推荐对于服用阿普唑仑期间效果不佳或者出现头晕、嗜睡等不良反应的患者进行血药浓度监测。专家组推荐阿普唑仑的治疗窗范围为 5 ～ 50 ng•mL^{-1}，中毒浓度（实验室警戒值）为 100 ng • mL^{-1}[16-17]。

表 2 临床典型病例样品检测结果

Tab 2 Test results of typical clinical cases

编号	年龄 / 岁	性别	诊断	科室	检测结果 /（ng • mL^{-1}）	检测日期
病例 1	56	男	意识丧失	神经内科	167.12	2022-9-30
病例 2	77	女	意识模糊、昏迷	急诊科	412.85	2023-1-4
					25.69	2023-1-6
病例 3	74	女	药物中毒性意识障碍	急诊科	187.19	2023-3-11
					23.13	2023-3-12
病例 4	73	男	脑梗死、意识障碍	神经内科	92.38	2023-4-11
					47.68	2023-4-12
病例 5	78	女	药物中毒、意识丧失	急诊科	122.36	2023-11-1
					20.57	2023-11-4

病例 2，患者，女性，77 岁，有失眠病史。2023 年 1 月 4 日因“意识障碍 9 h”入我院急诊科。入院后神志昏迷，呼之不应，双瞳等大等圆，对光反射消失，初步诊断为意识障碍查因：脑梗死？药物中毒？头部 CT 显示无明显异常。据患者家属诉，患者 3 个月前因失眠购买过阿普唑仑。医师建议行阿普唑仑血药浓度监测。采血 1 h 后，使用本方法测定阿普唑仑血药浓度，结果超过检测上限，经稀释后测得结果为 412.85 ng • mL^{-1}，远超过阿普唑仑的中毒浓度，遂立即行氟马西尼解救，同时进行血液透析治疗。入院第 3 日采血复测，阿普唑仑的血药浓度为 25.69 ng • mL^{-1}。患者意识逐渐恢复，呼之能应。入院第 9 日，患者神志清楚，自行睁眼，生命体征平稳，办理出院。

3 讨论

3.1 方法学的选择

本研究采用的全自动二维液相色谱（2D-LC/UV）是近年来发展起来的新型液相色谱技术，现已成为药物分析的重要手段之一[18]，在药物血药浓度测定方面应用甚广[6, 19-21]。该技术通过两种不同分离机制的色谱技术串联结合，采用具有捕获和传递功能的中间柱作为转移接口，大幅增强了抗干扰能力，显著提高了分析的敏感性[22]。相较于传统液相色谱系统，该方法具有色谱柱平衡时间短，检测完成后色谱柱无需清洗以及流动相可以长期放置（商业化试剂已事先灭菌和密封）等诸多优点[20]。这些技术显著减少了治疗药物监测工作中仪器准备和维护的时间，提高了血药浓度测定的时效性。而 LC-MS/MS 的采购、维护成本及对操作人员要求均较高，不利于在基层医院开展。

3.2 前处理方法的优势

文献报道采用固相萃取法[8-9]对阿普唑仑血样进行前处理，操作复杂，整个过程耗时 2 ～ 3 h，不利于临床大样本量监测。选择有机溶剂萃取的预处理方法[13, 23]，耗时长，萃取过程中有机试剂挥发对操作人员存在潜在危害。本研究采用特异性的 ORG-2 为蛋白沉淀剂，去蛋白离心后，取上清液直接进样。操作简单，耗时短（整个过程 8 min 左右即可完成），极大简化了前处理过程，提高了检测效率。

3.3 方法学的应用

因存在个体差异，部分患者服用正常剂量的阿普唑仑，也可能出现药物蓄积，导致嗜睡、头晕、乏力、精神障碍等不良反应。采用此方法进行阿普唑仑血药浓度监测，可协助临床医师调整给药方案，提高用药安全性。临床实践发现，因误服或尝试自杀而出现阿普唑仑中毒的病例逐渐增多。采用本方法能快速检测出阿普唑仑浓度，为临床诊断提供了科学依据，为患者抢救赢得了宝贵时间。

综上所述，本研究建立的全自动二维液相色谱方法前处理简单快捷、稳定性好、专属性强、自动化程度高，适用于临床阿普唑仑血药浓度监测工作及中毒药物的筛查。

参考文献

[1] Burkat PM. Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of alprazolam：implications for anxiety and addiction [J]. Br J Clin Pharmacol，2023，89（8）：2569-2581.

[2] Kalogria E，Pistos C，Panderi I. Hydrophilic interaction liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of alprazolam and α-hydroxy-alprazolam in human plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2013，942-943：158-164.
[3] Isbister GK，O'regan L，Sibbritt D，et al. Alprazolam is relatively more toxic than other benzodiazepines in overdose [J]. Br J Clin Pharmacol，2004，58（1）：88-95.
[4] 阎佳，宋昆泽，张进权，等 . 液相色谱 - 串联质谱法测定人血浆中阿普唑仑的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2022，38（21）：2624-2627.
[5] Furugen A，Nishimura A，Kobayashi M，et al. Quantification of eight benzodiazepines in human breastmilk and plasma by liquid-liquid extraction and liquid-chromatography tandem mass spectrometry：application to evaluation of alprazolam transfer into breastmilk [J]. J Pharm Biomed Anal，2019，168：83-93.
[6] 王峰，朱运贵，罗雪梅，等 . 新型二维液相色谱测定百草枯尿液浓度的研究 [J]. 中国药学杂志，2017，52（10）：871-879.
[7] 李宇，田海燕，李智慧，等 . 超高效液相色谱法测定阿普唑仑片的含量 [J]. 海峡药学，2020，32（6）：65-67.
[8] 张扬，马永春，吴人杰，等 . HPLC-DAD 法同时测定血清中 4 种苯二氮䓬类药物的浓度及临床应用 [J]. 中国临床药学杂志，2015，24（4）：211-215.
[9] 郑付春，石刚刚 . 固相萃取 - 高效液相色谱法同时测定血浆中氯米帕明和 4 种苯二氮䓬类药物浓度方法的研究 [J]. 中国药理学通报，2015，31（4）：582-585.
[10] 李嫄，于晓菲，段旭 . 高效液相色谱法同时测定血浆和尿中阿普唑仑和硝西泮浓度 [J]. 医药导报，2009，28（4）：445-446.
[11] 李青丽 . 阿普唑仑残留溶剂检测方法研究 [J]. 中国处方药，2018，16（5）：35-36.
[12] Papoutsis II，Athanaselis SA，Nikolaou PD，et al. Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood：applications in clinical and forensic toxicology [J]. J Pharmaceut Biomed，2010，52（4）：609-614.
[13] 耿忠兴，邹清龙 . 中空纤维膜液相微萃取 - 气相色谱 - 质谱法测定血中 3 种苯二氮䓬类药物 [J]. 理化检验（化学分册），2018，54（11）：1334-1338.
[14] Álvarez-freire I，Brunetti P，Cabarcos-Fernández P，et al. Determination of benzodiazepines in pericardial fluid by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal，2018，159：45-52.
[15] Goldberger BA，Chronister CW，Merves ML. Quantitation of benzodiazepines in blood and urine using gas chromatography-mass spectrometry（GC-MS）[J]. Methods Mol Biol，2010，603：75-87.
[16] Hiemke C，Bergemann N，Clement HW，et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology：update 2017 [J]. Pharmacopsychiatry，2018，51（1-2）：9-62.
[17] 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.
[18] Venkatramani CJ，Patel A. Towards a comprehensive 2-D-LC-MS separation [J]. J Sep Sci，2006，29（4）：510-518.
[19] 张胜男，周宇雪，王丹姝，等 . 二维液相色谱法测定人血浆中泊沙康唑药物浓度及其在儿科临床的应用 [J]. 中南药学，2023，21（1）：249-252.
[20] 刘加涛，孙小珊，宋帅，等 . 全自动二维液相色谱法测定甲氨蝶呤血药浓度及其临床应用 [J]. 中南药学，2022，20（2）：366-370.
[21] 孔滢，刘红，彭洪薇，等 . 二维液相色谱法同时测定人血浆中伊马替尼及去甲伊马替尼药物浓度及临床应用 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（17）：2229-2235.
[22] Iguiniz M，Heinisch S. Two-dimensional liquid chromatography in pharmaceutical analysis. Instrumental aspects，trends and applications [J]. J Pharm Biomed Anal，2017，145：482-503.
[23] 石磊，曾晓晖，关慧，等 . 液相色谱 - 串联质谱法测定人血浆中阿普唑仑及其代谢物的浓度 [J]. 中国临床药理学杂志，2010，26（3）：221-225.

（收稿日期：2024-03-18；修回日期：2024-04-24）

鸭跖草药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的特征图谱相关性研究及量值传递分析

江斌[1, 2, 3]，梁素仪[1, 2, 3*]，蔡小兵[1, 2, 3]，李璐[1, 2, 3]，张辉[1, 2, 3]，谭沛[1, 2, 3]（1. 华润三九现代中药制药有限公司，广东　惠州　516000；2. 中药配方颗粒安徽省重点实验室，安徽　淮北　235000；3. 华润三九医药股份有限公司，广东　深圳　518000）

摘要：目的　建立鸭跖草药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的超高效液相色谱法（UPLC）特征图谱，并测定香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁成分的含量，考察这 5 个化学成分的传递与差异。**方法**　采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3（1.8 μm，100 mm×2.1 mm）色谱柱，以甲醇和 0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱，流速为 0.3 mL·min^{-1}，柱温为 30 ℃。以含量、特征图谱共有峰传递数及相似度为主要评价指标，分析其量值传递规律。**结果**　15 批鸭跖草药材、饮片、标准汤剂及 3 批配方颗粒特征图谱均呈现 9 个共有特征峰，与各自对照特征图谱相似度均大于 0.90，指认出香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁 5 个成分，并测定其含量，未出现离散数据。**结论**　鸭跖草药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的主要化学成分基本相同，UPLC 特征图谱相关性良好，5 个成分在测定范围内线性关系良好。所建立质量评价模式能够反映鸭跖草 4 种形态多成分的整体面貌，为鸭跖草配方颗粒质量控制提供数据支撑。

关键词：鸭跖草；标准汤剂；配方颗粒；含量测定；特征图谱
中图分类号：R282.4，R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-2893-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.009

Correlation between characteristic spectrum and quantitative value transfer analysis of Commelina communis and its decoction pieces, standard decoction and formula granules

JIANG Bin[1, 2, 3], LIANG Su-yi[1, 2, 3*], CAI Xiao-bing[1, 2, 3], LI Lu[1, 2, 3], ZHANG Hui[1, 2, 3], TAN Pei[1, 2, 3] (1. *China Resources Sanjiu Modern Chinese Medicine Pharmaceutical Co., Ltd., Huizhou Guangdong* 516000; 2. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Huaibei Anhui* 235000; 3. *China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen Guangdong* 518000)

Abstract: Objective　To establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) for the characteristics of Commelina communis and its decoction pieces, standard decoction and formula granules, and to determine the content of vanillic acid, orientin, isoorientin, vitexin, and rutin, and the transfer and difference of the five chemical components. **Methods**　The chromatography was performed on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm, 100 mm×2.1 mm) with methanol (A) and 0.1% formic acid solution (B) as the mobile phase in gradient elution. The flow rate was 0.3 mL·min^{-1}, and the column temperature was 30 ℃. The content, common peak transfer number and similarity of characteristic map were used as the main evaluation indexes. The law of magnitude transfer was determined. **Results**　Nine common characteristic peaks were detected in the characteristic maps of 15 batches of Commelina communis and its decoction pieces, standard decoction and 3 batches of formula granules, with similarity between them and the control characteristic maps greater than 0.90. Five components (vanillic acid, orientin, isoorientin, vitexin, and rutin) were identified and their

基金项目：深圳市科技计划项目（No.JSGG20191129093418578）。
作者简介：江斌，男，硕士，主要从事中药饮片及中药配方颗粒质量标准研究，email：JIANGBIN51@999.com.cn　*通信作者：梁素仪，女，硕士，主要从事中药饮片及中药配方颗粒质量标准研究，email：LIANGSUYI@999.com.cn

content determined without discrete data. **Conclusion** The main chemical components of Commelina communis and its decoction pieces, standard decoction and formula granules are basically the same, with good correlation of UPLC characteristic map. The linear relationship of the above 5 components is good in the determination range. The established evaluation model can reflect the overall quality of the four forms and multi-components of Commelina communis, providing data support for the quality control of formula granules of Commelina communis.

Key words: Commelina communis; standard decoction; formula granule; content determination; characteristic chromatogram

鸭跖草始载于唐代陈藏器著《本草拾遗》[1]，具有清热泻火、解毒、利水消肿的功效。2020 年版《中国药典》规定其基原为鸭跖草科植物鸭跖草（*Commelina communis* L.）[2]，其用药部位为干燥地上部分，夏、秋二季采收。现代药理研究表明其具有镇痛、抑菌、抗氧化、抗炎等作用 [3]。鸭跖草中主要含有黄酮类、酚酸类、三萜类、甾醇类等成分 [4]，其中黄酮类成分是鸭跖草的主要活性成分 [5-11]，具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、镇痛等作用。中药配方颗粒是以饮片标准汤剂作为标准参照物，用于衡量其与临床汤剂疗效是否基本一致 [8]。

目前，2020 年版《中国药典》鸭跖草药材项下无特征图谱及含量测定项，山东、四川等 20 个省市中药饮片炮制规范鸭跖草项下均未规定特征图谱及含量测定项，仅有《香港中药材标准》（第十册）中增加了异荭草苷的含量测定。各省份颁布的中药配方颗粒质量标准中，仅有上海及湖北省颁布的鸭跖草配方颗粒质量标准中规定了特征图谱及 4- 香豆酸的含量测定。相比于上海及湖北省颁布标准中测定的特征图谱成分为有机酸类（原儿茶酸、对羟基苯甲酸、4- 香豆酸等已知成分）及含量测定 4- 香豆酸，并不是鸭跖草的主要活性成分黄酮类成分；而本研究开发方法测定的特征图谱成分以黄酮类成分为主，开发成分信息及专属性均更好，含量测定选择香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁等成分亦能更好地代表鸭跖草的质量。为了全面控制鸭跖草配方颗粒质量，本研究采用超高效液相色谱法（UPLC）建立鸭跖草药材、饮片、饮片标准汤剂和配方颗粒的特征图谱检测方法，同时可以测定香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁等成分的含量，并对鸭跖草药材至鸭跖草配方颗粒之间的相关性进行研究，为鸭跖草配方颗粒的质量研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Vanquish Flex 型超高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技）；ME36S 型百万分之一天平（瑞士梅特勒公司）；Sartorius SQP SECURA225D-1CN 型十万分之一天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；SynergyUV 型超纯水系统（默克股份有限公司）；KQ-400KDB 型超声波仪（昆山市超声仪器有限公司）；YMW 型机械分体煎药壶（深圳一枚王有限公司）。

1.2 试药

甲醇（色谱纯，赛默飞世尔科技有限公司）；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。对照品荭草苷（批号：111777-202003，纯度≥ 98.0%）、香草酸（批号：110776-201503，纯度≥ 99.8%）、异荭草苷（批号：111974-201401，纯度≥ 94.0%）、芦丁（批号：10080-202012，纯度≥ 91.6%）、牡荆苷（批号：111687-202306，纯度：99.5%）（中国食品药品检定研究院）。

1.3 样品及制备方法

本研究所使用的 15 批鸭跖草药材，经安徽中医药大学的刘守金教授鉴定为鸭跖草科植物鸭跖草 *Commelina communis* L. 的干燥地上部分，均符合 2020 年版《中国药典》要求，信息见表 1。

本研究根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》（简称《要求》）制备鸭跖草饮片标准汤剂冻干粉，根据标准汤剂的质量标准制备鸭跖草配方颗粒。

鸭跖草饮片标准汤剂冻干粉工艺参数：浸泡时间 30 min；煎煮 2 次，一煎加 12 倍水量，煎煮 30 min，二煎加 10 倍水量，煎煮 25 min；60 ℃减压浓缩，冷冻干燥。

鸭跖草配方颗粒工艺参数如下，浸泡时间为 30 min；煎煮 2 次，一煎加 12 倍水量，煎煮 30 min，二煎加 10 倍水量，煎煮 30 min；60 ～ 80 ℃减压浓缩，喷雾干燥，干法制粒。

2 特征图谱方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照药材溶液 取鸭跖草对照药材 2 g，加水 40 mL，加热回流 45 min，滤过，滤液蒸干，残渣加 60% 甲醇 10 mL，超声处理 30 min，取出，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

表 1　样品信息

Tab 1　Information of samples

编号	产地	鸭跖草药材批号	鸭跖草饮片批号	鸭跖草饮片标准汤剂批号	鸭跖草配方颗粒批号
1	江苏省徐州市邳州市	2107001	2107001Y	BT2107001	KL2112001
2	江苏省徐州市邳州市	2107002	2107002Y	BT2107002	KL2112002
3	江苏省徐州市邳州市	2107003	2107003Y	BT2107003	KL2112003
4	安徽省亳州市谯城区	2107004	2107004Y	BT2107004	—
5	安徽省亳州市谯城区	2107005	2107005Y	BT2107005	—
6	安徽省亳州市谯城区	2107006	2107006Y	BT2107006	—
7	四川省成都市双流区	2107007	2107007Y	BT2107007	—
8	四川省成都市双流区	2107008	2107008Y	BT2107008	—
9	四川省成都市双流区	2107009	2107009Y	BT2107009	—
10	广西壮族自治区防城港市东兴市	2107010	2107010Y	BT2107010	—
11	广西壮族自治区防城港市东兴市	2107011	2107011Y	BT2107011	—
12	广西壮族自治区防城港市东兴市	2107012	2107012Y	BT2107012	—
13	河北省保定市安国市	2107013	2107013Y	BT2107013	—
14	河北省保定市安国市	2107014	2107014Y	BT2107014	—
15	河北省保定市安国市	2107015	2107015Y	BT2107015	—

2.1.2　对照品溶液　精密称取香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁对照品适量，加 60% 甲醇制成每 1 mL 含 11.5、38.2、101.6、35.1、75.8 μg 的混合对照品储备液，即得。

2.1.3　供试品溶液

① 鸭跖草药材、饮片：取粉末 2 g，加水 40 mL，加热回流 45 min，过滤，滤液蒸干，残渣加 60% 甲醇 10 mL，超声处理 30 min，取出，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

② 饮片标准汤剂、配方颗粒：取粉末约 0.5 g，加 60% 甲醇 10 mL，超声处理 30 min，取出，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2　色谱条件及系统适用性试验

色谱柱：Waters ACQUITY UPLC HSS T3（1.8 μm，100 mm×2.1 mm），流动相：甲醇（A）-0.1% 甲酸溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，5%A；5 ～ 30 min，5% → 27%A；30 ～ 38 min，27% → 30%A；38 ～ 55 min，30%A），流速：0.3 mL•min^{-1}；柱温：30 ℃，检测波长：270 nm，理论板数按异荭草苷峰计算应不低于 10 000。

2.3　方法学考察

2.3.1　专属性与系统适用性的验证　取鸭跖草配方颗粒及阴性颗粒，按 “2.1.3” 项下方法制备供试品、阴性样品溶液，按 “2.2” 项下色谱条件进样测定，结果见图 1，阴性样品对特征图谱无干扰，色谱方法系统适用性和专属性良好。

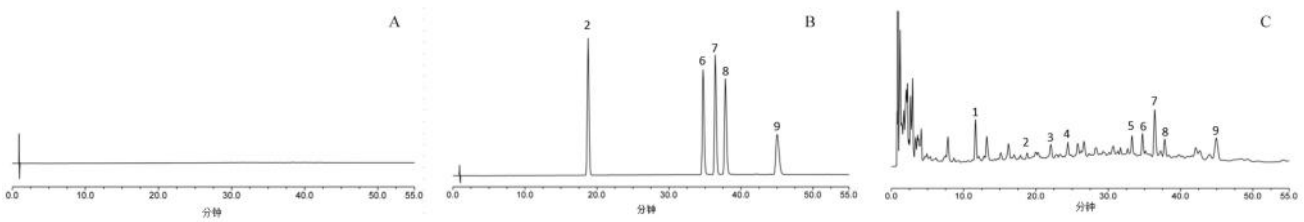


图 1　UPLC 特征图谱专属性色谱图

Fig 1　Specific chromatogram of characteristic UPLC chromatograms

A. 阴性样品（negative sample）；B. 对照品（reference sample）；C. 供试品（sample）；2. 香草酸（vanillic acid）；6. 荭草苷（orientin）；7. 异荭草苷（isoorientin）；8. 牡荆苷（vitexin）；9. 芦丁（rutin）

2.3.2　重复性试验　按 “2.1.3” 项下方法平行制备 6 份鸭跖草配方颗粒供试品溶液，按 “2.2” 项下色谱条件进样测定，结果供试品色谱中呈现与对照药材参照物色谱中 9 个保留时间相对应的特征峰，各特征峰的相对保留时间 *RSD* 为 0.010% ～ 0.16%，表明该方法重复性良好。

2.3.3　仪器精密性试验　按 “2.1.3” 项下方法制备鸭跖草配方颗粒供试品溶液，按 “2.2” 项下色谱条件重复进样 6 次测定，结果供试品色谱中呈现与对照药材参照物色谱中 9 个保留时间相对应的特征峰，各特征峰的相对保留时间 *RSD* 为 0.010% ～ 0.060%，表明仪器精密度良好。

2.3.4　中间精密度试验　分别由 3 名人员制备鸭跖草配方颗粒供试品溶液并测定，结果供试品色谱中呈现与对照药材参照物色谱中 9 个保留时间相对应的特征峰，各特征峰的相对保留时间 *RSD* 为 0.010% ～ 0.14%，表明该方法中间精密度良好。

2.3.5　稳定性试验　取同一份鸭跖草配方颗粒供

试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 按“2.2”项下色谱条件进样测定，结果供试品色谱中呈现与对照药材参照物色谱中 9 个保留时间相对应的特征峰，各特征峰的相对保留时间 *RSD* 为 0.010%～0.19%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 鸭跖草多批特征图谱共有模式建立

取 15 批鸭跖草药材及对应批次的鸭跖草饮片、鸭跖草饮片标准汤剂和 3 批鸭跖草配方颗粒（以下简称“样品”），按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液。在“2.2”项色谱条件下进样测定，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012）”软件进行分析，选出峰形及分离效果较好的 9 个共有峰作为特征峰，进行多点校正、Mark 匹配以及相似度分析，建立共有模式图谱，结果见图 2，经过与对照品比对，确定 5 个已知峰成分。以异荭草苷（峰 7）为 S 峰，计算各特征峰与 S 峰（异荭草苷）的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 ±10% 范围之内，规定值为：0.32（峰 1）、0.51（峰 2，香草酸）、0.60（峰 3）、0.67（峰 4）、0.91（峰 5）、0.95（峰 6，荭草苷）、1.04（峰 8，牡荆苷）、1.23（峰 9，芦丁）。

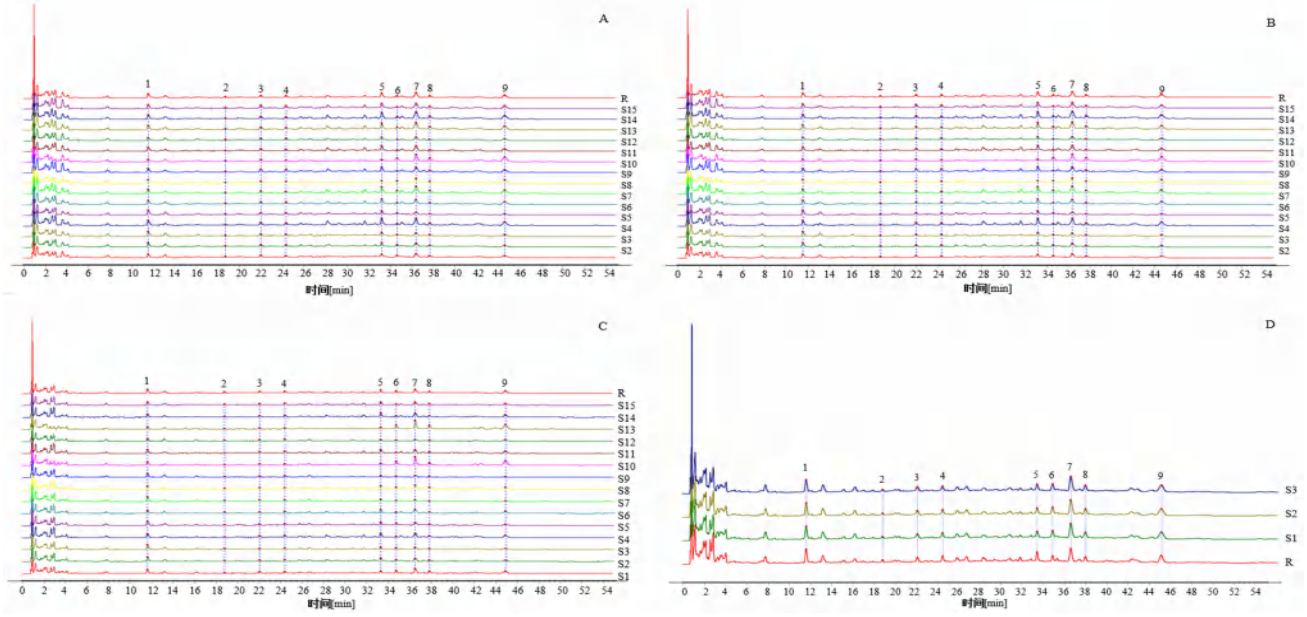


图 2 鸭跖草的指纹图谱

Fig 2 Fingerprint chromatogram of Commelina communis

A. 鸭跖草药材（Commelina communis）；B. 鸭跖草饮片（Commelina communis decoction piece）；C. 鸭跖草饮片标准汤剂（Commelina communis standard decoction）；D. 配方颗粒（Commelina communis formula granule）

2.5 相似度计算

分别计算样品与各自对照特征图谱的相似度，结果见表 2。结果表明，15 批鸭跖草药材特征图谱的相似度范围为 0.927～0.987，说明 15 批不同产地的鸭跖草药材化学成分具有较高的相似度。15 批鸭跖草饮片特征图谱的相似度范围为 0.924～0.989，15 批鸭跖草饮片标准汤剂的特征图谱相似度范围为 0.932～0.991，3 批配方颗粒特征图谱相似度分别为 0.977、0.981、0.972，说明不同批次间样品质量相对稳定。9 个特征峰在各样品中均有存在，说明各环节工艺能较好地保留药材特征成分。该特征图谱方法适用于鸭跖草药材到配方颗粒全过程控制。

表 2 鸭跖草相似度计算结果

Tab 2 Similarity of Commelina communis

编号	药材	饮片	标准汤剂	配方颗粒
1	0.968	0.972	0.985	0.977
2	0.972	0.974	0.968	0.981
3	0.963	0.971	0.988	0.972
4	0.985	0.989	0.991	—
5	0.948	0.943	0.959	—
6	0.985	0.989	0.980	—
7	0.987	0.982	0.977	—
8	0.941	0.943	0.983	—
9	0.979	0.981	0.933	—
10	0.927	0.924	0.932	—
11	0.984	0.980	0.985	—
12	0.965	0.969	0.962	—
13	0.955	0.952	0.946	—
14	0.983	0.982	0.982	—
15	0.978	0.981	0.972	—

3 含量测定方法与结果

3.1 溶液的制备

3.1.1 对照品溶液 精密移取“2.1.2”项下混合对照品储备液 1、2.5、5、10、25、50 mL，置于 50 mL 量瓶中，用 60% 甲醇定容至刻度，混匀，即得混合对照品溶液。

3.1.2 供试品溶液

① 鸭跖草药材、饮片：取粉末约 1 g，加入 60% 甲醇 10 mL，超声处理 30 min，取出，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

② 饮片标准汤剂、配方颗粒：制备方法同“2.1.3”项下。

3.2 含量测定方法学验证

3.2.1 线性关系、精密度、重复性、稳定性考察

根据“2.2”项下色谱条件建立鸭跖草配方颗粒中 5 个成分的含量测定方法，其线性及方法学考察结果见表 3。鸭跖草配方颗粒中香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁的含量测定方法专属性较好；线性关系、精密度、重复性、稳定性均良好。

表 3 线性关系及方法学考察结果

Tab 3 Linearity and methodological examination

成分	线性方程	相关系数（r）	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	*RSD*/%		
				精密度	重复性	稳定性
香草酸	$Y = 0.298X + 0.0254$	0.9992	0.23 ～ 11.5	0.98	0.88	0.74
荭草苷	$Y = 0.324X + 0.0849$	0.9997	0.76 ～ 38.2	0.75	1.2	0.98
异荭草苷	$Y = 0.416X - 0.111$	0.9999	2.03 ～ 101.6	0.52	0.59	0.92
牡荆苷	$Y = 0.283X + 0.172$	0.9997	0.70 ～ 35.1	0.54	0.97	0.86
芦丁	$Y = 0.299X + 0.330$	0.9998	1.52 ～ 75.8	0.81	1.4	1.1

3.2.2 加样回收试验 取 9 份已知含量的鸭跖草配方颗粒 0.25 g，每 3 份一组，每组分别加入相当于鸭跖草配方颗粒中各成分含量的 80%、100% 和 120% 的对照品溶液，制备成供试品溶液进样测定。结果表明香草酸的平均回收率分别为 100.5%、99.5%、101.1%，*RSD* 分别为 1.7%、1.8%、1.7%；荭草苷的平均回收率分别为 97.7%、99.3%、97.0%，*RSD* 分别为 1.5%、1.2%、1.4%；异荭草苷的平均回收率分别为 100.7%、99.9%、100.1%，*RSD* 分别为 1.2%、2.0%、2.3%；牡荆苷的平均回收率分别为 97.8%、101.6%、98.1%，*RSD* 分别为 1.8%、1.9%、1.6%；芦丁的平均回收率分别为 101.0%、100.7%、98.9%，*RSD* 分别为 2.6%、2.5%、0.76%。

3.3 多指标含量测定及转移率计算

按“2.2”项下方法对鸭跖草样品 5 种成分含量进行测定，并计算转移率 [12]，结果见表 4。

表 4 含量测定结果

Tab 4 Content determination

批号	香草酸 /（mg • g^{-1}）			荭草苷 /（mg • g^{-1}）			异荭草苷 /（mg • g^{-1}）			牡荆苷 /（mg • g^{-1}）			芦丁 /（mg • g^{-1}）		
	饮片	标汤	颗粒	饮片	标汤	颗粒	饮片	标汤	颗粒	饮片	标汤	颗粒	饮片	标汤	颗粒
2107001Y	0.0063	0.022	0.021	0.060	0.079	0.075	0.18	0.21	0.21	0.063	0.089	0.083	0.11	0.15	0.15
2107002Y	0.0057	0.020	0.020	0.054	0.071	0.071	0.16	0.19	0.19	0.057	0.081	0.077	0.10	0.14	0.14
2107003Y	0.0060	0.022	0.021	0.057	0.079	0.072	0.17	0.21	0.20	0.060	0.089	0.081	0.10	0.15	0.14
2107004Y	0.011	0.027	/	0.10	0.10	/	0.30	0.28	/	0.11	0.12	/	0.18	0.19	/
2107005Y	0.0046	0.020	/	0.044	0.076	/	0.13	0.20	/	0.057	0.087	/	0.080	0.14	/
2107006Y	0.011	0.024	/	0.10	0.096	/	0.31	0.25	/	0.10	0.085	/	0.17	0.18	/
2107007Y	0.0046	0.023	/	0.043	0.088	/	0.13	0.24	/	0.046	0.080	/	0.080	0.16	/
2107008Y	0.014	0.052	/	0.14	0.20	/	0.41	0.54	/	0.14	0.18	/	0.25	0.41	/
2107009Y	0.0039	0.026	/	0.037	0.10	/	0.11	0.27	/	0.039	0.079	/	0.071	0.21	/
2107010Y	0.010	0.044	/	0.097	0.15	/	0.29	0.42	/	0.10	0.12	/	0.18	0.32	/
2107011Y	0.0088	0.026	/	0.083	0.090	/	0.25	0.25	/	0.080	0.070	/	0.15	0.19	/
2107012Y	0.0056	0.024	/	0.053	0.088	/	0.16	0.24	/	0.056	0.080	/	0.11	0.19	/
2107013Y	0.014	0.046	/	0.14	0.17	/	0.41	0.46	/	0.14	0.15	/	0.25	0.37	/
2107014Y	0.014	0.041	/	0.13	0.14	/	0.40	0.39	/	0.14	0.13	/	0.25	0.32	/
2107015Y	0.0050	0.025	/	0.043	0.084	/	0.13	0.23	/	0.046	0.077	/	0.090	0.19	/
均值	0.0083	0.029	/	0.079	0.11	/	0.24	0.29	/	0.082	0.10	/	0.14	0.22	/
RSD/%	0.0037	0.011	/	0.037	0.039	/	0.11	0.11	/	0.037	0.032	/	0.065	0.089	/

由表 4 可知，15 批鸭跖草饮片标准汤剂指标成分香草酸的含量为 0.020 ～ 0.052 mg • g^{-1}，转移率为 28.0% ～ 51.3%；荭草苷的含量为 0.071 ～ 0.20 mg • g^{-1}，转移率为 11.2% ～ 19.8%；异荭草苷的含量为 0.19 ～ 0.54 mg • g^{-1}，转移率为 10.0% ～ 18.0%；牡荆苷的含量为 0.070 ～ 0.18 mg • g^{-1}，转移率为 9.9% ～ 16.8%；芦丁的含量为 0.14 ～ 0.41 mg • g^{-1}，转移率为 12.1% ～ 21.5%。5 个成分含量及转移率均未超过均值 ±3SD 范围，未出现离群值。测定 3 批鸭跖草配方颗粒中 5 个成分（香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁）含量及转移率与对应批次鸭跖草饮片标准汤剂的含量基本一致，且在多批次饮片标准汤剂含量限度范围内。以上结果表明，鸭跖草指标成分的含量在饮片标准汤剂至配

方颗粒的研究过程中，量值传递较好。

4 讨论

4.1 药材资源的调研

鸭跖草资源丰富，我国南北大部分地区均有产，主要分布于我国第二阶梯以东各省市，地上部分入药使用，用量较小，无道地产区[13-14]。通过浏览中药材天地网、康美中药网、药通网，对近几年发布的鸭跖草药材产地供应信息加以统计，发现鸭跖草药材流通主要集中于江苏、安徽、湖北、四川、云南、广西、河北等地。其中江苏邳州、安徽亳州是目前市场鸭跖草的主供产地。鸭跖草药材当前以野生资源为主，本研究选择江苏省徐州市邳州市、广西壮族自治区防城港市东兴市、四川省成都市双流区、河北省保定市安国市、安徽省亳州市谯城区 5 个产地为研究样本采集地，上述产地资源较为丰富，同时涵盖了鸭跖草的主产区，研究用 15 批药材均为野生品，按 2020 年版《中国药典》方法检测均合格，故本研究选用的药材在产地和品质方面具有代表性。

4.2 色谱条件的优化[15-19]

本研究考察了不同流动相（甲醇 -0.1% 甲酸溶液、甲醇 -0.1% 磷酸溶液、甲醇 -0.1% 乙酸溶液、乙腈 -0.1% 甲酸溶液、甲醇 -0.2% 甲酸溶液）及检测波长（DAD 检测器波长范围：230 ～ 360 nm）下各特征峰的峰形与分离效果，确定了特征图谱的流动相体系及最佳吸收波长。最终选择甲醇 -0.1% 甲酸溶液为流动相，检测波长为 270 nm。该方法简单、高效，在不同仪器上重现性好，可用于鸭跖草的质量评价。

4.3 相关性研究及量值传递分析

本研究对鸭跖草药材及对应批次饮片、饮片标准汤剂和鸭跖草配方颗粒的特征图谱及含量成分进行了系统性研究，以特征图谱的相似度和 5 个成分（香草酸、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、芦丁）的含量作为主要评价指标。研究所用的 15 批鸭跖草饮片标准汤剂中，5 个成分含量实测值及转移率均在《要求》规定范围之内，未出现离群值，3 批鸭跖草配方颗粒含量及转移率在标准汤剂范围内。15 批鸭跖草药材及对应批次饮片、饮片标准汤剂和配方颗粒特征图谱的相似度均大于 0.90，表明从鸭跖草药材经炮制、煎煮、浓缩、干燥、制粒等过程制备成鸭跖草配方颗粒中化学成分能够较为稳定传递，物质基础无明显变化，保证了鸭跖草配方颗粒与鸭跖草饮片标准汤剂的质量一致性，从而确保临床疗效。本研究结果反映了鸭跖草配方颗粒生产全过程的相关性及量值传递规律，为鸭跖草配方颗粒全过程监控及质量标准建立提供参考。

参考文献

[1] 唐·陈藏器撰，尚志钧辑释 .《本草拾遗》辑释 [M]. 合肥：安徽科学技术出版社，2004：114.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：294-295.

[3] 王兴业，李剑勇，李冰，等 . 中药鸭跖草的研究进展 [J]. 湖北农业科学，2011，50（4）：652-655.

[4] 徐丽，艾志福，曾令峰，等 . 鸭跖草化学成分的研究 [J]. 中成药，2019，41（7）：1592-1597.

[5] 袁莉，王晓，李庆舒，等 . 天然黄酮异荭草素研究进展 [J]. 食品与生物技术学报，2020，39（7）：21-27.

[6] 郭红，徐俊 . 荭草苷药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2014，23（10）：5-6.

[7] 顾成波，蔡曼，袁肖韩，等 . 牡荆苷的植物资源及药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（3）：382-389.

[8] 王龙，高鑫，闫信豪，等 . 中药配方颗粒研发生产中若干关键问题研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（9）：2008-2014.

[9] 罗旖璐，王格瑩，罗嘉仪，等 . 基于多成分含量测定结合化学计量学评价不同产地鸭跖草药材质量 [J]. 中国中药杂志，2023，48（2）：356-365.

[10] Zhang X，Liang CJ，Li CL，et al. Simultaneous qualitative and quantitative study of main compounds in Commelina communis Linn. by UHPLC-TOF-MS-MS and HPLC-ESI-MS-MS [J]. J Chromotatogr Sci，2018，56（7）：582-584.

[11] 中华人民共和国香港特别行政区卫生署 . 基香港中药材标准第十册 [S]. 2020：55.

[12] 李振雨，刘晓霞，冯涌微，等 . 基于 HPLC 指纹图谱和含量测定的半边莲饮片与标准汤剂量值传递规律研究 [J]. 天然产物研究与开发，2023，35（11）：1864-1876.

[13] 中国科学院中国植物志编辑委员会，中国植物志 [M]. 第 13 卷，第 3 分册，北京：科学出版社，1997：127.

[14] 江苏新中医 . 中药大辞典（下册）[M]. 上海：上海科学技术出版社，1996：1845.

[15] 邱连建，王银，陈会朋 . 高效液相色谱法同时测定鸭跖草中的 3 种有效成分 [J]. 天津药学，2021，33（3）：23-26.

[16] 李雪营，梁黔生，林先燕，等 . 不同采收期黔产鸭跖草中异荭草素含量及生物产量的动态变化 [J]. 亚太传统医药，2020，16（9）：75-76.

[17] 张霞 . 基于液质联用技术的中药黄酮类成分的体内外代谢研究以及鸭跖草化学成分的定性定量分析 [D]. 石家庄：河北医科大学，2018.

[18] 叶聪，谢裴裴，李国卫，等 . 基于 UPLC 特征图谱的苦杏仁、桃仁及甜杏仁药材的鉴别研究 [J]. 中南药学，2024，22（2）：315-321.

[19] 周海琴，何雨晴，陈盛君 . 基于 UPLC 指纹图谱和多指标成分定量的野生与栽培贯叶金丝桃的质量评价 [J]. 中南药学，2023，21（12）：3274-3280.

（收稿日期：2024-03-18；修回日期：2024-03-27）

清热消炎宁对急性咽炎大鼠模型的抗炎作用

肖文喜[1]，扶丽君[1]，朱红霖[1]，彭冬冬[2, 3]，刘学武[2, 3]，彭印[2, 3]，姜德建[2, 3*]（1.天地恒一制药股份有限公司，长沙　410331；2.新药药效与安全性评价湖南省重点实验室，长沙　410331；3. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司，长沙　410331）

摘要：目的　探究清热消炎宁（QRXYN）干膏粉对大鼠急性咽炎的药效作用及抗炎机制，为临床应用提供依据。**方法**　选取 SD 大鼠 96 只，随机分为对照组，模型组，清喉利咽颗粒组（1.35 g • kg^{-1}）及 QRXYN 低、中、高剂量组（6.08、12.15、24.30 g 生药 • kg^{-1}）。采用 2.5% 氨水涂抹于咽部诱导大鼠急性咽炎模型，检测各组大鼠咳嗽潜伏期和 5 min 内咳嗽次数，检测咽喉组织中白细胞介素 -6（IL-6）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、环氧化酶 2（COX-2）的含量及核转录因子 kappa B（NF-κB）和抑制因子 κB（IκB）的蛋白表达，并进行组织病理学检查；采用二甲苯致小鼠耳郭肿胀模型，观察 QRXYN 对小鼠耳郭肿胀度、肿胀率和肿胀抑制率的影响。**结果**　与急性咽炎模型组相比，QRXYN 能明显延长咳嗽潜伏期，减少咳嗽次数，改善咽部组织炎症及病理变化，降低 TNF-α、COX-2、IL-6 的水平和 NF-κB、IκB 蛋白表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。与模型组相比，QRXYN 能显著减轻小鼠耳郭肿胀程度，降低肿胀率（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论**　QRXYN 对于急性咽炎具有明显治疗作用，同时具有抗非特异性炎症作用，其作用机制可能与降低局部组织炎性因子水平和 NF-κB/IκB 蛋白表达有关。

关键词：急性咽炎大鼠；清热消炎宁；耳廓肿胀模型；NF-κB；IκB
中图分类号：R285，R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-2899-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.010

Anti-inflammatory effect of Qingre Xiaoyanning on acute pharyngitis rat model

XIAO Wen-xi[1], FU Li-jun[1], ZHU Hong-lin[1], PENG Dong-dong[2, 3], LIU Xue-wu[2, 3], PENG Yin[2, 3], JIANG De-jian[2, 3*] (1. *Hinye Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha* 410331; 2. *Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha* 410331; 3. *Human Prima Drug Research Center Co., Ltd., Changsha* 410331)

Abstract: Objective　To determine the anti-inflammation effect of Qingre Xiaoyanning (QRXYN) on acute pharyngitis rats, and provide a basis for clinical application. **Methods**　Totally 96 SD rats were selected and randomly divided into a control group, a model group, Qinghou Liyan granule group (1.35 g•kg^{-1}), QRXYN low, medium, and high-dose groups (6.08, 12.15, and 24.30 g raw medicine•kg^{-1}). Acute pharyngitis rat model was induced by applying 2.5% ammonia solution to the pharynx. The latency and frequency of cough within 5 minutes in each group of rats were measured. The content of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the pharyngeal tissue were detected. The protein expressions of nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) and inhibitory factors κB (IκB) were detected, and histopathologically examined. A xylene induced mouse ear swelling model was established to observe the effect of QRXYN on mouse swelling degree, rate, and inhibition rate. **Results**　Compared with the acute pharyngitis model group, QRXYN prolonged the cough latency, reduced its frequency, improved inflammation and pathological

基金项目：湖南省重点研发计划基金资助项目（No.2023SK2080）。
作者简介：肖文喜，男，工程师，主要从事新药研发及药理毒理研究，email：x12ww@sina.cn　*通信作者：姜德建，男，研究员，主要从事新药药效与安全性评价研究，email：jiangdejian@hnse.org

changes in the pharyngeal tissue, and reduced TNF-α, COX-2, IL-6 levels, and protein expression of NF-κB and IκB ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the auricle swelling model group, QRXYN reduced the degree of auricle swelling in the mice and lowered the swelling rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** QRXYN has a significant therapeutic effect on acute pharyngitis and anti non-specific inflammation effect. Its mechanism of action is to reduce local tissue inflammatory cytokine levels and related protein expression of NF-κB and IκB.

Key words: acute pharyngitis rat; Qingre Xiaoyanning; ear swelling model; NF-κB; IκB

急性咽炎（acute pharyngitis，AP）是常见的急性炎症性病变[1]，常由病毒或细菌感染所致。临床上表现为咽喉肿痛、吞咽不适，并常引起咳嗽。急性咽炎临床发病率约 5%[2]。目前多以抗病毒、抗菌药物、糖皮质激素类药物治疗为主[3]，为减少抗菌药物的耐药性，减少毒副作用及二重感染，医学界越来越重视发展植物药治疗及非药物替代治疗[4]。

清热消炎宁片是已上市中成药，具有清热解毒、消炎止痛的功效，临床上用于流行性感冒、咽喉炎等疾病[5]，临床报道清热消炎宁胶囊治疗急性咽炎疗效确切，安全可靠[6]，但机制仍不清晰，因此本研究基于急性咽炎大鼠模型，通过研究清热消炎宁制剂对咽部组织的炎症因子及信号通路的调控情况，对其机制进行探讨，为临床治疗用药提供理论依据。

1 材料

1.1 试药

清热消炎宁干膏粉（代号：QRXYN，批号：090210502，天地恒一制药股份有限公司）。清热消炎宁干膏粉临床拟用剂量：口服，1 次 3 ～ 6 片，一日 3 次。清热消炎宁成品中每片含有清热消炎宁干膏粉 0.38 g（清热消炎宁片的浸膏粉中间体）。成人体重以 60 kg 计，根据体表面积法换算成大鼠等效剂量为 0.62 g 干膏粉 • kg^{-1}。氨水致急性咽炎实验选用等效剂量作为大鼠实验的低剂量。另设置等效剂量的 2、4 倍作为清热消炎宁干膏粉中、高剂量组给药剂量，即 1.24、2.48 g 干膏粉 • kg^{-1}（相当于 6.08、12.15、24.30 g 生药 • kg^{-1}）。

根据体表面积法换算成小鼠等效剂量为 0.89 g 干膏粉 • kg^{-1}。二甲苯致小鼠耳郭肿胀实验选用等效剂量作为小鼠实验的低剂量组，另设置等效剂量的 2、4 倍作为清热消炎宁干膏粉中、高剂量组给药剂量，即 1.78、3.56 g 干膏粉 • kg^{-1}（相当于 8.72、17.44、34.89 g 生药 • kg^{-1}）。

清喉利咽颗粒 [批号：200532，桂龙药业（安徽）有限公司，规格：5 g/ 袋]。临床治疗用量为 1 次 5 g，一日 3 次，成人体重按 60 kg 计，按体表面积换算成大鼠等效剂量约为 1.35 g • kg^{-1}，作为给药剂量。

阿司匹林肠溶片（批号：21030101，沈阳奥吉娜药业有限公司）。以每日 1.8 g 作为阿司匹林解热、镇痛和抗炎的临床治疗用量，成人体重按 60 kg 计，按体表面积换算成小鼠等效剂量约 0.23 g • kg^{-1}，作为给药剂量。

上述药物均以纯水配制备用。

浓氨水（纯度：25%，批号：20160921，衡阳市凯信化工试剂股份有限公司）。二甲苯（纯度：99%，批号：20210519，国药集团化学试剂有限公司）。白细胞介素 -6（IL-6）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、环氧化酶 2（COX-2）（江苏酶免实业有限公司）；大鼠 WB 抗体、NF-κB、IκB、内参蛋白（β-actin）、羊抗小鼠 IgG 二抗、山羊抗兔 IgG 二抗（美国 Proteintech）。

1.2 动物

96 只 SD 大鼠，SPF 级，雌雄各半，体重 163.1 ～ 191.4 g，5 ～ 6 周龄 [动物合格证号：No.110322211102135666，北京华阜康生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2019-0008]。50 只 ICR 小鼠，SPF 级，雌雄各半，体重 18.5 ～ 22.6 g，3 ～ 4 周龄 [动物合格证号：No.430727211102105768，湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（湘）2019-0004]。上述动物饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境，实验动物使用许可证号：SYXK（湘）2020-0015，动物实验经公司实验动物管理伦理委员会批准 [伦理审批号：IACUC-2021（2）038]。

1.3 仪器

DMIL 倒置显微镜、DFC 420C 病理成像系统（德国 Leica 公司），TD4 型台式低速离心机（湖南

省凯达实业发展有限公司），Spectra Max i3x 型多功能酶标仪（上海美谷光子公司），多功能诱咳引喘仪（济南益延科技发展有限公司），PL203 型电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司] 等。

2 方法

2.1 对大鼠急性咽炎模型的影响

2.1.1 分组、造模[7-9]与给药 选取检疫合格的 SPF 级 SD 大鼠 96 只，按性别体重随机分为 6 组，每组 16 只动物，分别为对照组，模型组，清喉利咽颗粒组（1.35 g • kg^{-1}），QRXYN 低、中、高（6.08、12.15、24.30 g 生药 • kg^{-1}）剂量组。除对照组以外，其余各组动物均以无菌棉签蘸取 2.5% 氨水涂抹于咽部（上午造模），每日 1 次，连续 7 d，对照组采用同样方法于咽部涂抹生理盐水。给药前采用纯水将药物配制成相应浓度，造模同时各组动物每日下午按 10 mL • kg^{-1} 灌胃给予相应药液，每日 1 次，连续 7 d，对照组、模型组分别灌胃给予等体积的纯水。

2.1.2 指标检测

① 一般生理观察：给药期间每日对各组动物进行一般临床观察，包括精神状态、一般行为等生理状况，并于 D4、D7 称重。

② 咳嗽检测：于末次给药后 1 h，采用 10% 氨水溶液诱导大鼠咳嗽，采用诱咳引喘仪检测各组大鼠 5 min 内咳嗽次数和咳嗽潜伏期。

③ 组织病理学检查：末次给药后次日，采用异氟烷（诱导麻醉 1% ～ 4%，维持麻醉 0.25% ～ 2%）吸入麻醉后腹主动脉放血安乐死，解剖取咽部组织，置于 10% 甲醛中固定，石蜡包埋，切片，HE 染色，显微镜下观察咽部组织病理学变化，从黏膜充血、血管扩张及浆液渗出、黏膜炎症细胞浸润、黏膜肿胀增厚等进行评分。具体评分标准如下：无明显异常，计为 0 分；轻度，计为 1 分；中度，计为 2 分；重度，计为 3 分。

④ 咽部组织中 IL-6、TNF-α、COX-2 的含量及 NF-κB、IκB 蛋白表达的检测：于末次给药后次日，选择剩余 6 只动物，同前方法安乐死，取 2 份咽部组织，其中一份按咽部质量（g）：0.9% 氯化钠注射液（mL）＝ 1∶9 的比例采用高速匀浆机进行匀浆，制成组织匀浆液，4 ℃环境中 14 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，利用 ELISA 试剂盒检测咽部组织中 IL-6、TNF-α、COX-2 的含量。另一份加入蛋白裂解液，于冰上匀浆，离心取上清液，得总蛋白。蛋白定量后，采用免疫印迹法（Western blot）进行蛋白变性、SDS- 聚丙烯酰胺电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、显影以检测大鼠咽部组织中 NF-κB 和 IκB 的蛋白含量。

2.2 对二甲苯致小鼠耳郭肿胀的影响

2.2.1 分组、造模[10]与给药 ICR 小鼠按性别及体重随机分为空白对照组，阿司匹林肠溶片组（0.23 g•kg^{-1}），QRXYN 低、中、高剂量组（8.72、17.44、34.89 g 生药 • kg^{-1}），每组 10 只。给药前各组小鼠按 20 mL • kg^{-1} 灌胃给予相应剂量的药液，每日 1 次，连续 7 d，空白对照组灌胃给予等体积纯水。

2.2.2 检测指标 于末次给药后 1 h，各组小鼠右耳涂抹 50 μL 的二甲苯致炎，左耳不涂作为对照，30 min 后处死，沿耳廓基线剪下双耳，用直径 6 mm 打孔器冲下左耳和右耳同一部位的圆片，称取左、右两耳重量，计算，肿胀度＝右耳重量－左耳重量，肿胀率（%）＝（右耳重量－左耳重量）/ 左耳重量 ×100%，肿胀抑制率（%）＝（对照组肿胀率－给药组肿胀率）/ 对照组肿胀率 ×100%。

2.3 统计与分析

本实验数据统计所用软件为 SPSS 22.0。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析（One-way ANOVA）进行组间比较，结合最小显著性差异法（LSD）进行多重比较；病理分级资料采用秩和检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠急性咽炎模型的影响

3.1.1 对一般生理的影响 如表 1 所示，与对照组相比，模型组大鼠 D4、D7 体重明显下降（$P < 0.01$）；与模型组相比，清喉利咽颗粒组、QRXYN 高剂量组 D4 体重明显增加（$P < 0.01$），清喉利咽颗粒组及 QRXYN 中、高剂量组 D7 体重明显增加（$P < 0.01$）。

表 1 QRXYN 对急性咽炎模型大鼠体重的影响 (g，$\bar{x}\pm s$，$n = 16$)

Tab 1 Effect of QRXYN on body weight of acute pharyngitis model rats (g，$\bar{x}\pm s$，$n = 16$)

组别	D4	D7
对照组	210.4±11.9	235.2±12.3
模型组	187.7±8.9$^{\#\#}$	188.9±11.1$^{\#\#}$
清喉利咽颗粒组	198.6±6.8**	210.8±12.9**
QRXYN 低剂量组	189.0±7.2	196.3±9.5
QRXYN 中剂量组	190.9±7.3	200.8±9.7**
QRXYN 高剂量组	198.9±8.2**	210.0±10.8**

注：与对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

3.1.2 对咳嗽的影响 如表 2 所示，与对照组相比，模型组大鼠咳嗽潜伏期明显缩短（$P < 0.01$），咳嗽次数明显增多（$P < 0.01$）。与模型组相比，给药后各组的咳嗽潜伏期明显延长（$P < 0.01$），咳嗽次数明显减少（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

表 2 QRXYN 对急性咽炎模型大鼠咳嗽的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 16$）

Tab 2 Effect of QRXYN on cough in acute pharyngitis model rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 16$）

组别	咳嗽潜伏期 /s	咳嗽次数 / 次
对照组	300.0±0.0	0.0±0.0
模型组	27.8±17.2$^{\#\#}$	8.1±3.0$^{\#\#}$
清喉利咽颗粒组	82.9±51.6**	4.8±1.4*
QRXYN 低剂量组	65.9±39.6**	5.2±1.5**
QRXYN 中剂量组	99.4±57.9**	2.8±1.5**
QRXYN 高剂量组	82.0±50.0**	4.3±1.7**

注：与对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.1.3 对咽部组织 IL-6、TNF-α、COX-2 含量的影响 如表 3 所示，与对照组相比，模型组大鼠咽部组织中 COX-2、IL-6 和 TNF-α 含量明显升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。与模型组相比，清喉利咽颗粒组和 QRXYN 高剂量组均能显著降低 COX-2、IL-6 和 TNF-α 水平（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），QRXYN 中剂量组对 TNF-α 水平也有显著降低作用（$P < 0.01$）。

3.1.4 对咽部组织病理学的影响

① 对咽部组织形态的影响：如图 1 所示，与对照组相比，模型组动物咽部黏膜出现肿胀增厚，且黏膜伴有明显部分淋巴细胞和少量中性粒细胞浸润；给药后各组咽部组织炎症均有减轻，病理情况得到改善。

② 对咽部组织病理评分的影响：如表 4 所示，与对照组相比，模型组病理评分显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，给药后 QRXYN 中、高剂量组病理评分均明显降低（$P < 0.05$），QRXYN 低剂量组病理评分虽有降低的趋势，但差异无统计学意义。

表 3 QRXYN 对急性咽炎模型大鼠细胞因子的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 6$）

Tab 3 Effect of QRXYN on cytokines in acute pharyngitis model rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 6$）

组别	COX-2/（ng・mL^{-1}）	IL-6/（pg・mL^{-1}）	TNF-α/（pg・mL^{-1}）
对照组	64.062±4.238	116.317±6.956	265.738±15.822
模型组	89.589±15.580$^{\#}$	133.678±12.011$^{\#\#}$	352.494±52.195$^{\#\#}$
清喉利咽颗粒组	62.538±3.091*	117.655±6.734*	288.141±6.012**
QRXYN 低剂量组	71.352±12.409	123.468±13.875	327.102±22.334
QRXYN 中剂量组	66.046±5.886	122.710±12.838	301.072±15.742**
QRXYN 高剂量组	61.566±4.492*	120.305±6.932*	302.200±22.099**

注：与对照组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

表 4 QRXYN 对急性咽炎模型大鼠咽部组织病理的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

Tab 4 Effect of QRXYN on pharyngeal tissue pathology in acute pharyngitis model rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

组别	肺组织病理评分
对照组	0.0±0.0
模型组	1.5±1.4$^{\#\#}$
清喉利咽颗粒组	0.5±0.9
QRXYN 低剂量组	0.8±1.3
QRXYN 中剂量组	0.4±1.0*
QRXYN 高剂量组	0.4±0.8*

注：与对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

3.1.5 对咽部组织中 NF-κB 和 IκB 蛋白表达的影响 如图 2 所示，与对照组相比，模型组 NF-κB 和 IκB 蛋白表达明显升高（$P < 0.05$）。给药后，与模型组相比，QRXYN 高剂量组 NF-κB 和 IκB 蛋白表达明显降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

3.2 对二甲苯致小鼠耳郭肿胀的影响

如表 5 所示，与空白对照组相比，阿司匹林肠溶片组和 QRXYN 高剂量组的肿胀度显著下降（$P < 0.01$），肿胀率也明显降低（$P < 0.01$），肿胀抑制率分别达到 57.47% 和 48.75%，QRXYN 低剂量组的耳廓肿胀度也显著下降（$P < 0.05$）。

表 5 QRXYN 对二甲苯致小鼠耳郭肿胀的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

Tab 5 Effect of QRXYN on ear swelling in mice induced by xylene（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

组别	肿胀度 /g	肿胀率 /%	肿胀抑制率 /%
空白对照组	0.020±0.010	123.43±57.16	—
阿司匹林肠溶片组	0.008±0.003**	52.49±21.36**	57.47
QRXYN 低剂量组	0.013±0.004*	93.77±23.71	24.03
QRXYN 中剂量组	0.014±0.010	109.16±91.68	11.56
QRXYN 高剂量组	0.010±0.004**	63.26±29.57**	48.75

注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

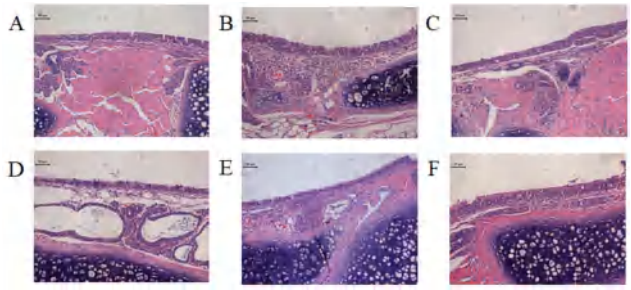


图 1　咽部组织病理切片（HE，×100）

Fig 1　Pathological section of pharyngeal tissue（HE，×100）

A. 对照组（control group）；B. 模型组（model group）；C. 清喉利咽颗粒组（Qinghou Liyan granule group）；D. QRXYN 低剂量组（QRXYN low-dose group）；E. QRXYN 中剂量组（QRXYN medium-dose group）；F. QRXYN 高剂量组（QRXYN high-dose group）

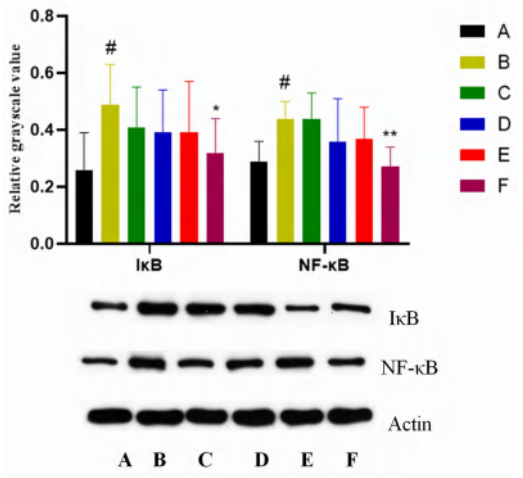


图 2　QRXYN 对急性咽炎模型大鼠蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 2　Effect of QRXYN on the protein expression in acute pharyngitis model rats（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

A. 对照组（control group）；B. 模型组（model group）；C. 清喉利咽颗粒组（Qinghou Liyan granule group）；D.QRXYN 低剂量组（QRXYN low-dose group）；E.QRXYN 中剂量组（QRXYN medium-dose group）；F.QRXYN 高剂量组（QRXYN high-dose group）

注（Note）：与对照组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$（Compared with the control group，$^{\#}P<0.05$；compared with the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

4　讨论

急性咽炎起病迅速，发展也较迅速，中医称为急喉痹，根据病因可分为外感风热证、外感风寒证、肺胃热盛证，治法当以疏风清热 / 散寒，解毒利咽，消肿 [11]。清热消炎宁制剂是由九节茶一味药制成的制剂，九节茶又名观音茶，是药食同源的安全性高的中药材，现代药理研究表明本品具有清热解毒、消肿、消炎、抗病毒、抗菌等功效 [12]。

本研究采用氨水在咽部喷雾的方法，可以模拟临床上人类急性咽炎的发病因素。氨水作为碱性刺激物质，局部喷雾能刺激大鼠咽部黏膜，使之充血肿胀，形成急性炎症。造模成功的大鼠临床表现、病理形态学、超微结构等方面的观察结果均出现典型急性咽炎的病理生理特征，与临床上人类急性咽炎的病理表现基本一致，该方法操作简单，造模时间短，重复性好，为经典的急性咽炎的方法。

炎症是机体对各种致炎因子引起的损伤所产生的以防御反应为主的病理过程，局部表现为红肿热痛，二甲苯是常用的化学致炎剂，可引起局部毛细血管通透性增加，炎症细胞浸润、水肿，常用二甲苯诱导小鼠耳肿胀模型模拟机体的急性炎症病理状态 [13]，与临床常见急性炎症相似，操作简单、复制成功率高的特点，动物实验遵循 3R 原则（Reduction、Replacement 和 Refinement）[14]，因此每组 10 只动物足以保证实验结果的统计要求。

NF-κB 信号通路是经典且重要的炎症信号通路，NF-κB 是免疫应答的主要转录因子，在静息状态下，它常与细胞质中的 IκB 等抑制因子结合。当细胞受到各种胞内外刺激后，上游信号如髓样分化因子 88（MyD88）、Toll 样受体 4（TLR4）通过调节蛋白的受体相关因子，作用于 IκB 激酶被激活，从而导致 IκB 蛋白磷酸化，泛素化，然后 IκB 蛋白被降解，NF-κB 二聚体得到释放，调节 TNF-α、IL-6 等下游炎症细胞因子的表达，参与免疫反应、炎症反应、细胞凋亡等反应 [15]，TNF-α 是一种主要由巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子，在细胞生长、分化、炎症反应、免疫调节等方面起重要作用。IL-6 是由成纤维细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等产生的促炎细胞因子，IL-6 可通过与其受体结合，促进血管生成及转移、炎症反应，参与免疫应答 [16]。此外，有研究表明 NF-κB 活化可上调其下游的 COX-2，COX-2 能将花生四烯酸氧化成前列腺素 H2（PGH2），PGH2 通过增加血管通透性和血管舒张引起发红、肿胀、僵硬和疼痛促进炎症的进展 [17]。在本实验中，清热消炎宁干膏粉阻断了 NF-κB 信号通路的激活，抑制信号通路下游的炎症因子表达，避免其造成的瀑布式放大效应，降低咽部组织受到的炎症损伤。异嗪皮啶为九节茶的主要有效成分，具有显著的抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、神经保护、抗凝及心脏保护等作用 [18]。在抗炎抗氧化方面，研究证实异嗪皮啶能抑制 NF-κB 活化、降低 COX-2 的表达；下调脂多糖诱导的巨噬细胞及小鼠肺炎模型中 TNF-α 的表达水平，同时抑制 IκB 的水平 [19-20]；降低经 IL-1β 诱导的人髓核细胞中炎症因子一氧化氮（NO）、TNF-α 和 IL-6 水平，抑制 COX-2、PGH2 等酶的活性 [21]。

本文利用氨水建立大鼠急性咽炎模型，模型大鼠咽部组织出现明显炎性浸润，咳嗽潜伏期明显缩短，咳嗽次数显著增多，清热消炎片干膏粉给药后能明显延长咳嗽潜伏期，减少咳嗽次数，减轻咽部组织的病理变化，同时还能降低咽部组织 IL-6、TNF-α 和 COX-2 的含量，下调 NF-κB 和 IκB 蛋白的表达，对于急性咽炎有明显药效作用。采用二甲苯对小鼠耳郭致炎造耳肿胀模型，清热消炎宁干膏粉能显著减轻耳廓肿胀度，明显降低肿胀率，具有明显抗炎作用。

综上所述，清热消炎宁干膏粉对于急性咽炎具有明显治疗作用，同时具有抗非特异性炎症作用，其作用机制可能与降低局部组织炎性因子水平和调节 NF-κB/IκB 蛋白表达有关。

参考文献

[1] 中国医师协会儿科医师分会儿童耳鼻咽喉专业委员会 . 儿童急性扁桃体炎诊疗——临床实践指南（2016 年制定）[J]. 中国实用儿科杂志，2017，32（3）：161-164.

[2] Shaikh N，Leonard E，Martin JM. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children：a meta-analysis [J]. Pediatrics，2010，126（3）：557-564.

[3] 李岩，陶荆华，汪婧怡，等 . 中医外治法治疗急性咽炎的研究进展 [J]. 中国中医急症，2021，30（11）：2065-2068.

[4] 张霞，谢雁鸣，李光熙，等 . 中医药治疗急性咽炎的优势与问题探讨 [J]. 中国中药杂志，2017，42（19）：3819-3825.

[5] 江涛，彭红英，曾晨，等 . 清热消炎宁颗粒一步制粒工艺研究 [J]. 中南药学，2022，20（11）：2548-2552.

[6] 杨权生，杨光钦 . 清热消炎宁胶囊治疗急性咽炎 152 例 [J]. 中国中医药信息杂志，2003，10（2）：44.

[7] 苗明三，常兵杰，白明，等 . 急性咽炎动物模型制备规范（草案）[J]. 中药药理与临床，2018，34（1）：175-178.

[8] Zhu WB，Su FZ，Sun YP，et al. Antipharyngitis effects of *Syringa oblata* L. ethanolic extract in acute pharyngitis rat model and anti-inflammatory effect of Ir-Idoids in LPS-induced RAW 264.7 cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，18（12）：5111752-5111768.

[9] 权伟，刘畅，周英，等 . 基于 NF-κB/STAT 信号通路探究朱砂根治疗大鼠急性咽炎的作用机制 [J]. 中草药，2022，53（19）：6083-6092.

[10] 刘秀丽，李锋，裴乐，等 . 红豆草单宁对动物机体炎症的反应机制研究 [J]. 兽医导刊，2022，45（3）：39-44.

[11] 胡思源 . 急性咽炎和扁桃体炎中药临床试验设计与评价技术指南 [J]. 药物评价研究，2023，46（2）：245-250.

[12] 李际强，梁浩斌，黎雄 . 中药肿节风抗感染作用研究进展 [J]. 江西中医药大学学报，2017，29（2）：113-116.

[13] 谷捷，李鑫，余黄合，等 . 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立 [J]. 湖南中医药大学学报，2016，36（5）：32-35.

[14] 杨劲松 . 实验动物的福利伦理与“3R”原则 [J]. 河南医学研究，2015，24（8）：64-65.

[15] 单佳铃，程虹毓，文乐，等 .TLR/MyD88/NF-κB 信号通路参与不同疾病作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报，2019，35（4）：451-455.

[16] 王志琪，李赛，邹俊驹，等 . 喉咽清口服液对大鼠急性咽炎及炎症因子影响的实验研究 [A]// 中国药理学会第十三次全国学术大会论文集 [C]. 北京，2015：30.

[17] 陶迎秋，梁统，周克元 . 花生四烯酸三条代谢通路在炎症反应中的作用 [J]. 国际免疫学杂志，2010，33（4）：303-306.

[18] 潘慧敏，姜保平，肖伟，等 . 九节茶的研究进展 [J]. 中国现代中药，2013，15（7）：614-619.

[19] Tsai YC，Chen SH，Lin LC，et al. Anti-inflammatory principles from *Sarcandra glabra* [J]. J Agr Food Chem，2017，65（31）：6497-6505.

[20] Li WF，Xing W，Wang SC，et al. An online coupled peritoneal macrophage/cell membrane chromatography and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method to screen for anti-inflammatory components from the Chinese traditional medicine *Chloranthus multistachys* Pei [J]. Biomed Chromatogr，2013，27（11）：1580-1586.

[21] Su XQ，Liu B，Gong FT，et al. Isofraxidin attenuates IL-1β-induced inflammatory response in human nucleus pulposus cells [J]. J Cell Biochem，2019，120（8）：13302-13309.

（收稿日期：2024-03-18；修回日期：2024-04-16）

华中前胡香豆素类化学成分研究

杨琳媛[1]，朱晗[2]，齐佳萌[2]，王雨轩[2]，张嘉怡[2]，王薇[2]，宋小妹[2]，张东东[2*]（1. 西安医学高等专科学校药学院，西安 710309；2. 陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 研究华中前胡（*Peucedanum medicum* Dunn）的香豆素类成分。**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、MS 等波谱学技术进行结构解析。**结果** 从华中前胡药材中鉴定了 8 个香豆素类化合物，分别为 7- 羟基香豆素（**1**）、补骨脂素（**2**）、芸香亭（**3**）、3'（*R*）-hydroxy-3'，4'-dihydroxanthyletin（**4**）、丝立尼亭（**5**）、白花前胡丁素（**6**）、白花前胡素 E（**7**）、cis-3'，4'-diisovalerylkhellactone（**8**）。**结论** 化合物 **1** ～ **8** 为首次从华中前胡中分离得到。

关键词：华中前胡；提取分离；化学成分；结构鉴定；香豆素
中图分类号：R284.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2905-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.011

Coumarins in *Peucedanum medicum* Dunn

YANG Lin-yuan[1], ZHU Han[2], QI Jia-meng[2], WANG Yu-xuan[2], ZHANG Jia-yi[2], WANG Wei[2], SONG Xiao-mei[2], ZHANG Dong-dong[2*] (1. *School of Pharmacy*, *Xi'an Medical College*, *Xi'an* 710309; 2. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To determine the coumarins in *Peucedanum medicum* Dunn. **Methods** Silica gel column chromatography, gel column chromatography and semi-preparative liquid chromatography were used for the separation and purification, and the physicochemical properties and spectroscopic data, NMR and MS were used to detect the structures. **Results** Totally 8 coumarins were isolated from *Peucedanum medicum* Dunn and identified as 7-hydroxycoumarin (**1**), psoralen (**2**), rutaretin (**3**), 3' (*R*)-hydroxy-3', 4'-dihydroxanthyletin (**4**), selinidin (**5**), praeruptorin D (**6**), (＋)-praeruptorin E (**7**), and cis-3', 4'-diisovalerylkhellactone (**8**). **Conclusion** Compounds **1** ～ **8** have been isolated from *Peucedanum medicum* Dunn for the first time.

Key words: *Peucedanum medicum* Dunn; extraction and isolation; chemical composition; structure characterization; coumarin

华中前胡（*Peucedanum medicum* Dunn）属于伞形科前胡属，为多年生草本植物，主要生长于海拔 700 ～ 2000 m 的山坡草丛中，在我国主要分布于四川、贵州和湖北等地[1]。前胡属植物药理活性显著，临床应用广泛，具有降气化痰、散风清热的功效[2-4]。研究表明，前胡属植物主要含呋喃和吡喃香豆素类、挥发油、黄酮、脂肪酸等活性成分[2-9]，具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等药理活性[10-14]。临床上主要用于治疗痰热喘满、咯痰黄稠等症[10-14]。前胡属植物近年来的关注度持续提升，但其主要研究集中于紫花前胡与白花前胡，尚未有华中前胡的化学成分研究。本实验对华中前胡甲醇提取物进行系统性化学成分研究，共分离得到 8 个香豆素类化合物，分别为 7- 羟基香豆素（**1**）、补骨脂素（**2**）、芸香亭（**3**）、3'（*R*）-hydroxy-3'，4'-dihydroxanthyletin（**4**）、丝立尼亭（**5**）、白花前胡丁素（**6**）、白花前胡素 E（**7**）、cis-3'，4'-diisovalerylkhellactone（**8**），以上化合物均为首次从华中前胡中分离得到。

1 材料

基金项目：陕西省科技厅自然科学基础研究计划项目（No.2021JQ-744）；陕西中医药大学创新团队项目（No.2023-CXTD-05）。
作者简介：杨琳媛，女，讲师，主要从事药物制剂质量标准研究及高等职业教育，email：fmb0201@163.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

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）；AVANCE400 型核磁共振仪（瑞士 Burker 公司）；WFH-203 三用紫外分析仪（上海精科实业有限公司）；舒美 KQ-500DE 型超声波清洗仪（昆山市超声波仪器有限公司）；HB10digital 型旋转蒸发仪（德国 IKA 公司）；HH-2 恒温水浴锅（常州国华电器有限公司）；GB204 分析天平（瑞士梅特勒托利多公司）。

1.2 试药

柱色谱硅胶（100 ～ 200 目和 200 ～ 300 目，青岛海浪硅胶干燥剂厂）；SephadexLH-20 色谱填料（美国 Pharmacia 公司）；薄层层析硅胶板 HSGF 254（烟台江友硅胶开发有限公司）；色谱甲醇及分析甲醇、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。

华中前胡药材于 2023 年 8 月采自贵州省铜仁市，经过陕西中医药大学药学院王薇教授鉴定为伞形科（Apiaceae）前胡属（*Peucedanum*）华中前胡（*Peucedanum medicum* Dunn）的干燥根，标本（编号 202308-1）保存于陕西中医药大学中药标本馆。

2 提取分离

华中前胡药材 2.0 kg，粉碎后用 10 倍量甲醇，超声提取 3 次，每次 30 min，过滤，合并提取液，减压浓缩得总浸膏 242 g。将总浸膏经硅胶柱色谱石油醚 - 乙酸乙酯（1∶0 ～ 2∶1）进行梯度洗脱，得到 10 个组分 Fr.1 ～ Fr.10。Fr.1（9.2 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 65∶35）得到 6 个组分 Fr.1-1 ～ Fr.1-6。Fr.1-1（0.1 g）经 Sephadex LH-20 柱（纯甲醇）纯化得到化合物 **2**（11 mg）。Fr.3（10.7 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 70∶30）得到 5 个组分 Fr.3-1 ～ Fr.3-5。Fr.3-1（0.9 g）经 Sephadex LH-20 柱（纯甲醇）洗脱得到 2 个组分 Fr3-1-1 ～ Fr.3-1-2。Fr.3-1-2（0.5 g）经半制备液相色谱（正己烷 - 异丙醇＝ 80∶20）分离得到化合物 **6**（320 nm，t_R ＝ 23.0 min，18 mg）和化合物 **4**（320 nm，t_R ＝ 26.6 min，9 mg）。Fr.3-2（0.1 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 76∶24）分离得到化合物 **7**（320 nm，t_R ＝ 50.4 min，13 mg）和化合物 **5**（320 nm，t_R ＝ 63.6 min，24 mg）。Fr.4（12.8 g）经 Sephadex LH-20 柱（纯甲醇）洗脱得到 4 个组分 Fr.4-1 ～ Fr.4-4。Fr.4-4（0.1 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 40∶60）分离得到化合物 **3**（320 nm，t_R ＝ 39.1 min，5 mg）。Fr.6（12.1 g）经 Sephadex LH-20 柱（纯甲醇）洗脱得到 5 个组分 Fr.6-1 ～ Fr.6-5。Fr.6-1（0.1 g）经硅胶柱色谱二氯甲烷 - 甲醇（20∶1 ～ 2∶1）进行梯度洗脱得到化合物 **8**（19 mg）。Fr.6-2（0.1 g）经半制备液相色谱（甲醇 - 水＝ 78∶22）分离得到化合物 **1**（320 nm，t_R ＝ 52.8 min，16 mg）。化合物的化学结构如图 1 所示。

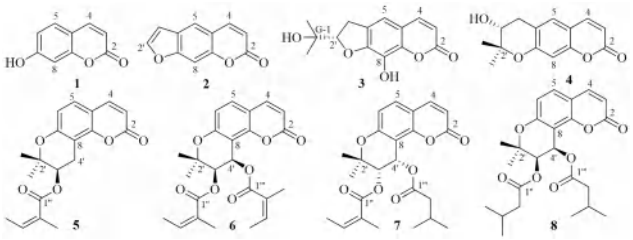


图 1 化合物 **1** ～ **8** 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of compounds **1** ～ **8**

3 结构鉴定

化合物 **1**：无色针状结晶（甲醇），ESI-MS *m/z* 163.0 $[M + H]^+$（计算值：163.0）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.20（1H，d，J ＝ 9.6 Hz，H-3），7.93（1H，d，J ＝ 9.6 Hz，H-4），7.54（1H，d，J ＝ 8.4 Hz，H-5），6.79（1H，dd，J ＝ 2.4，8.4 Hz，H-6），6.72（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-8）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：160.9（C-2），113.6（C-3），145.0（C-4），130.2（C-5），111.7（C-6），161.8（C-7），102.6（C-8），155.9（C-9），111.9（C-10）。NMR 数据与文献 [15] 基本一致，鉴定化合物 **1** 为 7- 羟基香豆素。

化合物 **2**：淡黄色球状结晶（甲醇），ESI-MS *m/z* 187.0 $[M + H]^+$（计算值：187.0）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.44（1H，d，J ＝ 9.6 Hz，H-3），8.18（1H，d，J ＝ 9.6 Hz，H-4），8.02（1H，s，H-5），7.74（1H，s，H-8），8.11（1H，d，J ＝ 2.3 Hz，H-2'），7.11（1H，d，J ＝ 2.3 Hz，H-3'）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：160.7（C-2），114.6（C-3），145.5（C-4），121.2（C-5），125.0（C-6），156.2（C-7），99.8（C-8），152.0（C-9），115.8（C-10），148.4（C-2'），107.2（C-3'）。NMR 数据与文献 [16] 基本一致，鉴定化合物 **2** 为补骨脂素。

化合物 **3**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 263.1 $[M + H]^+$（计算值：263.1），$[\alpha]_D^{20}$ － 57.0（*c* 0.07，甲醇）。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.17（1H，d，J ＝ 9.4 Hz，H-3），7.81（1H，d，J ＝ 9.4 Hz，H-4），6.92（1H，s，H-5），4.75（1H，t，J ＝ 8.9 Hz，H-2'），3.25（2H，overlap，H-3'），1.24（3H，s，H-2"），1.30（3H，s，H-3"）；^{13}C-NMR（100 MHz，

CD_3OD）δ：162.2（C-2），110.5（C-3），145.4（C-4），113.6（C-5），125.7（C-6），151.4（C-7），129.0（C-8），143.8（C-9），113.6（C-10），91.1（C-2'），29.8（C-3'），71.0（C-1"），23.8（C-2"），24.0（C-3"）。NMR 数据与文献[17]基本一致，鉴定化合物 **3** 为芸香亭。

化合物 **4**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 247.1 $[M+H]^+$（计算值：247.1），$[\alpha]_D^{20}$－18.5（*c* 0.12，甲醇）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.19（1H，d，J ＝ 9.7 Hz，H-3），7.91（1H，d，J ＝ 9.7 Hz，H-4），7.44（1H，s，H-5），6.73（1H，s，H-8），3.41（1H，dd，J＝10.2，2.0 Hz，H-3'），2.97（1H，dd，J＝13.7，2.0 Hz，H-4'），2.35（1H，dd，J＝13.7，10.2 Hz，H-4'），1.12（3H，s，H-1"），1.10（3H，s，H-2"）；^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：160.6（C-2），111.1（C-3），144.7（C-4），130.3（C-5），125.1（C-6），159.5（C-7），101.5（C-8），153.6（C-9），110.9（C-10），76.8（C-2'），71.7（C-3'），31.3（C-4'），26.2（C-1"），24.7（C-2"）。NMR 数据与文献[18]基本一致，鉴定化合物 **4** 为 3'（*R*）-hydroxy-3'，4'-dihydroxanthyletin。

化合物 **5**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 351.1 $[M+Na]^+$（计算值：351.1），$[\alpha]_D^{20}$－7.7（*c* 0.10，甲醇）。氢谱图中 $J_{5',6}$ 为 8.2 Hz，C-2' 上有两个甲基的单峰，结合碳谱数据 76.5（C-2'），69.3（C-3'），22.5（C-4'），说明化合物 **5** 为角型呋喃香豆素[19-21]，碳谱中 166.9，127.2，138.6，14.5，19.2 为当归酰基信号。以上数据（见表 1 和表 2）与文献[19]基本一致，鉴定化合物 **5** 为丝立尼亭。

化合物 **6**：无色方晶，ESI-MS *m/z* 427.2 $[M+H]^+$（计算值：427.2），$[\alpha]_D^{20}$－8.6（*c* 0.10，甲醇）。氢谱具有凯林内酯类化合物的特征，其 $J_{3',4'}$ 为 4.8 Hz，且连接在 C-2' 上的两个甲基氢的化学位移值仅相差 0.03，说明 C-3' 和 C-4' 取代基的相对构型为顺式[4]。碳谱中 166.3，127.0，138.4，20.4，15.6 和 160.5，127.4，139.8，20.3，15.8 为两组当归酰基信号。以上数据（见表 1 和表 2）与文献[20]基本一致，鉴定化合物 **6** 为白花前胡丁素。

化合物 **7**：无色针晶，ESI-MS *m/z* 429.2 $[M+H]^+$（计算值：429.2），$[\alpha]_D^{20}$＋13.8（*c* 0.12，甲醇）。化合物 **7** 的平面结构与 **6** 较为类似，不同的是化合物 **7** 中 4' 位取代基为异丁酰基（171.5，42.9，25.4，22.6，22.6），以上数据（见表 1 和 2）与文献[21]基本一致，鉴定化合物 **7** 为白花前胡素 E。

化合物 **8**：无色针晶，ESI-MS *m/z* 431.2 $[M+H]^+$（计算值：431.2），$[\alpha]_D^{20}$－11.7（*c* 0.12，甲醇）。化合物 **8** 的平面结构与 **6** 较为类似，不同的是化合物 **8** 中 3' 和 4' 位取代基为两组异丁酰基（171.7，42.9，25.5，22.6，22.6 和 171.6，42.7，25.4，22.6，22.6），NMR 数据（见表 1 和表 2）与文献[20]基本一致，鉴定化合物 **8** 为 cis-3'，4'-diisovalerylkhellactone。

表 1 化合物 5 ～ 8 的 ^{1}H NMR 数据 (400 MHz)

Tab 1 ^{1}H NMR data for compounds 5 ～ 8 (400 MHz)

编号	**5**（in CD_3OD）	**6**（in CD_3OD）	**7**（in CD_3OD）	**8**（in DMSO-d_6）
3	6.22（1H，d，9.5 Hz）	6.23（1H，d，9.5 Hz）	6.31（1H，d，9.6 Hz）	6.30（1H，d，9.5 Hz）
4	7.86（1H，d，9.5 Hz）	7.60（1H，d，9.5 Hz）	7.99（1H，d，9.6 Hz）	7.99（1H，d，9.5 Hz）
5	7.40（1H，d，8.2 Hz）	7.37（1H，d，8.8 Hz）	7.65（1H，d，8.4 Hz）	7.63（1H，d，8.6 Hz）
6	6.82（1H，d，8.2 Hz）	6.82（1H，d，8.8 Hz）	6.90（1H，d，8.4 Hz）	6.88（1H，d，8.6 Hz）
3'	5.23（1H，t，5.3 Hz）	5.44（1H，d，4.8 Hz）	5.34（1H，d，4.8 Hz）	5.26（1H，d，4.9 Hz）
4'	3.23（1H，dd，17.8，5.3 Hz）	6.71（1H，d，4.8 Hz）	6.48（1H，d，4.8 Hz）	6.43（1H，d，4.9 Hz）
	3.01（1H，dd，17.8，5.3 Hz）			
2'-CH_3	1.40（3H，s）	1.48（3H，s）	1.41（3H，s）	1.38（3H，s）
2'-CH_3	1.39（3H，s）	1.45（3H，s）	1.42（3H，s）	1.38（3H，s）
2"				1.99（2H，m）
3"	6.12（1H，m）	6.03（1H，m）	6.19（1H，m）	1.64（1H，m）
4"	1.85（3H，br d，7.3 Hz）	1.97（3H，br d，7.2 Hz）	1.90（3H，br d，7.2 Hz）	0.92（3H，m）
5"	1.81（3H，s）	1.83（3H，s）	1.82（3H，br s）	0.92（3H，m）
2"'			2.16（2H，m）	1.99（2H，m）
3"'		6.11（1H，m）	1.07（2H，m）	1.64（1H，m）
4"'		1.97（3H，br d，7.2 Hz）	0.89（3H，d，6.7 Hz）	0.92（3H，m）
5"'		1.85（3H，s）	0.88（3H，d，6.7 Hz）	0.92（3H，m）

表 2 化合物 5 ～ 8 的 ^{13}C NMR 数据 (100 MHz)

Tab 2 ^{13}C-NMR data for compounds 5 ～ 8 (100 MHz)

编号	5	6	7	8
	（in CD_3OD）	（in CD_3OD）	（in CD_3OD）	（in DMSO-d_6）
2	161.9	159.7	159.7	159.8
3	112.3	113.3	113.0	112.9
4	144.8	143.2	144.9	143.1
5	126.9	129.2	130.6	129.1
6	114.1	114.4	114.4	114.5
7	156.5	156.7	156.5	156.4
8	106.5	107.6	107.0	107.0
9	153.2	154.1	153.8	153.8
10	111.5	112.5	112.9	112.9
2	76.5	77.5	77.8	77.8
3'	69.3	70.2	70.2	70.0
4'	22.5	60.2	60.7	60.7
2'-CH_3	23.4	25.4	25.1	26.0
2'-CH_3	22.3	22.5	22.8	22.5
1"	166.9	166.3	166.2	171.7
2"	127.2	127.0	139.6	42.9
3"	138.6	138.4	20.5	25.5
4"	14.5	20.4	127.0	22.6
5"	19.2	15.6	15.9	22.6
1"'		160.5	171.5	171.6
2"'		127.4	42.9	42.7
3"'		139.8	25.4	25.4
4"'		20.3	22.6	22.6
5"'		15.8	22.6	22.6

4 结论

本研究综合运用多种色谱分离技术及波谱学手段对华中前胡药材的化学成分进行系统性研究，共分离鉴定了 8 个香豆素类化合物，均为首次从该药材中分离得到，进一步丰富了其化学成分，为其质量评价和药理活性等其他研究提供物质基础。研究发现前胡属中主要的化学成分为香豆素类化合物，其被广泛认可为前胡属植物的活性成分，如白花前胡丁素和 E 素具有羧酸酯酶抑制活性，补骨脂素具有抗肿瘤、降血脂、治疗骨关节炎等药理作用[22-23]。因此，后续可继续深入研究华中前胡药材的香豆素类成分，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] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：277.

[2] 张村，肖永庆，李丽，等 . 白花前胡化学成分研究（Ⅴ）[J]. 中国中药杂志，2012，37（23）：3573-3576.

[3] 王玉玺，刘训红，杨巷菁 . 泰山前胡与前胡的挥发油化学成分比较 [J]. 中草药，1992，23（6）：329，332.

[4] 孔令义，侯柏玲，王素贤，等 . 白花前胡挥发油成分的研究 [J]. 沈阳药学院学报，1994，11（3）：201-203.

[5] 俞年军，刘守金，梁益敏，等 . 不同产地白花前胡饮片挥发油化学成分的比较 [J]. 安徽中医学院学报，2007，26（1）：44-45.

[6] 雷华平，邹书怡，张辉，等 . 三种前胡挥发油成分分析 [J]. 中药材，2016，39（4）：795-798.

[7] Skalicka-Woźniak K，Szypowski J，Głowniak K. HPLC analysis of kaempherol and quercetin derivatives isolated by different extraction techniques from plant matrix [J]. J AOAC Int，2011，94（1）：17-21.

[8] Sarkhail P，Sarkheil P，Khalighi-Sigaroodi F，et al. Tyrosinase inhibitor and radical scavenger fractions and isolated compounds from aerial parts of *Peucedanum knappii* Bornm [J]. Nat Prod Res，2013，27（10）：896-899.

[9] 宋芷琪，李斌，田琨宇，等 . 前胡与紫花前胡的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药，2022，53（3）：948-964.

[10] Yu CL，Yu YL，Yang SF，et al. Praeruptorin A reduces metastasis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting ERK/MMP1 signaling pathway [J]. Environ Toxicol，2021，36（4）：540-549.

[11] Wu MH，Lin CL，Chiou HL，et al. Praeruptorin A inhibits human cervical cancer cell growth and invasion by suppressing MMP-2 expression and ERK1/2 signaling [J]. Int J Mol Sci，2017，19（1）：10.

[12] Liu CM，Shen HT，Lin YA，et al. Antiproliferative and antimetastatic effects of praeruptorin C on human non-small cell lung cancer through inactivating ERK/CTSD signaling pathways [J]. Molecules，2020，25（7）：1625.

[13] Xiong YY，Wu FH，Wang JS，et al. Attenuation of airway hyperreactivity and T helper cell type 2 responses by coumarins from *Peucedanum praeruptorum* Dunn in a murine model of allergic airway inflammation [J]. J Ethnopharmacol，2012，141（1）：314-321.

[14] Jung SY，Kim KM，Cho S，et al. Effects of pretreatment with methanol extract of Peucedani Radix on transient ischemic brain injury in mice [J]. Chin Med，2017，12（3）：30.

[15] 冯卫生，王彦志，郑晓珂，等 . 马尾松松针中化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 药学学报，2004，6（3）：190-193.

[16] 李文，封士兰，胡芳弟，等 . 少毛北前胡的香豆素类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2009，34（10）：1231-1234.

[17] Okuyama T，Takata M，Shibata S. Structures of linear furano-and simple-coumarin glycosides of Bai-Hua Qian-Hu [J]. Planta Med，1989，55（1）：64-67.

[18] Yi LK，Li XW，Masatake N. Two dihydropyranocoumarins from *Peucedanum wawrii* [J]. Heterocycles，2003，60（3）：599-599.

[19] 廖志超，姜鑫，田文静，等 . 紫花前胡中化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42（15）：2999-3003.

[20] 陈二林，封士兰，胡芳弟，等 . 少毛北前胡的化学成分研究 [J]. 中草药，2009，40（4）：525-528.

[21] 张村，肖永庆，谷口雅彦，等 . 白花前胡化学成分研究Ⅱ[J]. 中国中药杂志，2006，31（16）：1333-1335.

[22] 柯昌虎，李志浩，陈琴华，等 . 补骨脂素防治乳腺癌的研究进展 [J]. 中南药学，2016，14（7）：731-734.

[23] 董熠，刘丽佳，韩潞雯，等 . 香豆素类化学成分的药理作用及毒性机制研究进展 [J]. 中草药，2023，54（16）：5462-5472.

（收稿日期：2024-06-24；修回日期：2024-07-11）

五味珍菊片对小鼠化学性肝损伤的辅助保护作用

韦雯怡[1]，刘源焕[2]，谭安蔷[2]，陈晓艺[2]，庞晓云[2]，罗宇东[2*]（1. 广西中医药大学，南宁　530299；2. 广西中医药大学百年乐制药有限公司，南宁　530023）

摘要：目的　探讨五味珍菊片对四氯化碳（CCl_4）诱导和急性酒精诱导小鼠肝损伤的保护作用。**方法**　小鼠称重后分为空白组（蒸馏水）、模型组（蒸馏水）和五味珍菊片给药组（1.0、2.0、4.0 g·kg^{-1}），连续给药 30 d后，模型组和五味珍菊片给药组给予 5 mL·kg^{-1} 的 1%CCl_4 诱发急性肝损伤模型。生化试剂盒测定小鼠血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶活力；HE 染色法评价肝脏病理组织学情况。另将 50 只雄性小鼠称重后随机分成空白组（蒸馏水）、模型组（蒸馏水）、五味珍菊片给药组（1.0、2.0、4.0 g·kg^{-1}），于第 30 日将模型组及五味珍菊片组以 12 mL·kg^{-1} 剂量一次灌胃给予 50% 乙醇，建立急性酒精肝损伤小鼠模型。取肝组织，检测肝组织丙二醛、还原型谷胱甘肽、三酰甘油等指标，并进行病理组织学检查。**结果**　与模型组比较，各剂量五味珍菊片均能显著降低 CCl_4 诱导肝损伤模型小鼠的血清谷丙转氨酶水平（$P < 0.05$）、减轻肝组织损伤程度；能明显降低酒精诱导肝损伤小鼠的肝组织丙二醛、三酰甘油等含量，减轻肝组织的损伤程度。**结论**　五味珍菊片对 CCl_4 和酒精致小鼠急性肝损伤均有辅助保护作用。

关键词：五味珍菊片；化学性肝损伤；酒精肝损伤
中图分类号：R285，R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-2909-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.012

Auxiliary protective effect of Wuwei Zhenju tablets on chemical induced liver injury in mice

WEI Wen-yi[1], LIU Yuan-huan[2], TAN An-qiang[2], CHEN Xiao-yi[2], PANG Xiao-yun[2], LUO Yu-dong[2*] (1. *Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530299; 2. *Guangxi University of Chinese Medicine Bainianle Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Nanning* 530023)

Abstract: Objective　To determine the protective effect of Wuwei Zhenju tablets (WWZJT) on CCl_4-induced and acute alcohol-induced liver injury in mice. **Methods**　The mice were divided into a blank group (distilled water), a model group (distilled water) and 3 WWZJT groups (1.0, 2.0, and 4.0 g·kg^{-1}) after the weighing. After 30 days of administration, the mice in the model group and WWZJT groups were given 1% CCl_4 (5 mL·kg^{-1}) to induce the acute liver injury model. The contents of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in the serum was determined by biochemical kit. The histopathological changes in the liver were evaluated by HE staining. In addition, 50 male mice were randomly divided into a blank group (distilled water), a model group (distilled water) and 3 WWZJT groups (1.0, 2.0, and 4.0 g·kg^{-1}). On the 30th day, the model group and WWZJT groups were given 50% ethanol at 12 mL·kg^{-1} to establish a mouse model of acute alcoholic liver injury. The level of malondialdehyde, reduced glutathione, triglyceride in the liver tissues of mice in each group were detected, and the histopathology were examined. **Results**　Compared with the model group, WWZJT significantly reduced the level of alanine aminotransferase ($P < 0.05$) and the degree of liver tissue injury in mice with CCl_4 induced liver injury. It also reduced the content of malondialdehyde and triglyceride in the liver tissue of mice with alcohol-induced liver injury and the degree of liver tissue damage. **Conclusion**　WWZJT has an auxiliary protective effect on both CCl_4-induced and alcohol-induced liver injury.

Key words: Wuwei Zhenju tablet; chemical induced liver injury; alcoholic-induced liver injury

基金项目：广西技术创新项目（No. 园区 20210054）；南宁市青秀区技术创新引导专项（No.2020026）；广西中管局中医药自筹经费科研课题（No.GXZYA20230119）；南宁市创新创业领军人才“邕江计划”资助项目（No.2019020）。

作者简介：韦雯怡，女，在读硕士研究生，主要从事中药新药开发及中药制剂质量控制的研究工作，email：1604002894@qq.com
*通信作者：罗宇东，男，主任药师，主要从事中药、壮药与保健食品新产品开发工作，email：154402746@qq.com

肝脏是人体最重要的内脏器官之一，具有多种功能，如解毒、蛋白质合成和生产消化所需的生化物质等[1-2]，同时也是人体新陈代谢最重要的器官之一。随着社会快节奏的发展及受环境污染的影响，近年来，肝炎、肝癌、肝硬化等肝病的发病率逐年升高[3]，针对该类疾病的预防和治疗对改善人们的健康起着关键作用。研究表明，大多数化学性肝损伤（chemical liver injury，CLI）的发病机制是由化学物质代谢转化为反应性中间物质（如亲电化合物或自由基）引发的，这些中间物质可能会改变细胞大分子的结构和功能，而环境因素、生活方式、外源性物质（如酒剂、药物、有毒化学物质）等是诱发化学性肝损伤的发病机制[4-6]。

壮药五味珍菊片（WWZJT）为国家一类新药，其处方为壮医药专家在挖掘总结中（壮）医预防和治疗肝损伤的传统药物的基础上，筛选广西特色药食同源壮瑶药材配伍而成，临床用于预防和治疗化学性肝损伤，效果显著。WWZJT 处方由决明子[7]、菊花[8-9]、葛根[10-11]、枸杞子[12-13]、珍珠[14]等药材组成，有安神定惊、清肝明目、保肝护肝的功能。本研究依据《保健食品功能检验与评价方法》（2023 年版）等有关要求，开展 WWZJT 对化学性肝损伤的辅助保护功能的功能学评价。

1 材料

1.1 试药

WWZJT [批号：20210501，广西中医药大学百年乐制药有限公司，人日用量为每日 6 片（2 g/片）]，实验药物以蒸馏水配制成所需浓度；谷丙转氨酶（ALT，批号：140123009）、谷草转氨酶（AST，批号：140223008）试剂盒（深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司）；小鼠丙二醛（MDA）、还原型谷胱甘肽（GSH）、三酰甘油（TG）试剂盒（上海科兴商贸有限公司）；苏木素伊红染色液（HE，北京雷根生物技术有限公司）；饱和油红 O（索莱宝生物科技有限公司）；四氯化碳（CCl_4，分析纯，天津市风船化学试剂科技有限公司）；无水乙醇（分析纯，天津市北辰方正试剂厂）；花生油（莱阳鲁花浓香花生油有限公司）。

1.2 仪器

BS-600 全自动生化分析仪（深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司）；TDL-5-A 离心机（上海安亭科学仪器厂）；Multiskan 酶标仪、Excelsior 全封闭脱水机（美国赛默飞公司）；冷冻台、石蜡包埋机、全自动轮转式切片机、显微镜、Leica Application Suite 软件（德国徕卡公司）。

1.3 实验动物

SPF 级 KM 小鼠，雄性，18 ～ 22 g [长沙市天勤生物技术有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0014]。饲养条件：室温 24 ～ 26 ℃，湿度 60%[动物使用许可证号：SYXK 桂 2022-0001]；饲料 [北京科澳协力饲料有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0003]。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示，使用 GraphPad Prism 9 统计软件，多组间行方差分析、组间采用 t 检验，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 方法与结果

2.1 对小鼠 CCl_4 肝损伤的保护作用

2.1.1 动物分组、造模与给药 小鼠适应性喂养 3 d，称重后随机分为 5 组，分别为空白组，模型组及 WWZJT 低（1.0 g • kg^{-1}，为人体推荐量的 10 倍剂量）、中（2.0 g • kg^{-1}）、高（4.0 g • kg^{-1}）剂量组（简称低剂量组、中剂量组、高剂量组），每组 10 只，灌胃体积为 20 mL • kg^{-1}。空白组和模型组灌胃等体积蒸馏水，连续给药 30 d 后，每周称重两次。于实验第 30 日将各组动物隔夜禁食 16 h，模型组及 WWZJT 组以 5 mL • kg^{-1} 剂量一次灌胃给予 1%CCl_4（花生油稀释），空白组给予花生油，WWZJT 组继续灌胃各剂量 WWZJT 至实验结束（与 CCl_4 灌胃间隔 4 h 以上）。

2.1.2 小鼠血清中 ALT、AST 的测定 造模完成 24 h，戊巴比妥钠麻醉并摘取眼球取血，常规分离血清，试剂盒测定小鼠血清中 ALT、AST 的活性，以反映肝功能情况。结果如图 1 所示，各组小鼠给予 CCl_4 24 h 后，与空白组比较，模型组血清 ALT、AST 明显升高（$P < 0.01$ 或 $P < 0.05$）；各给药组以 WWZJT 低、中、高剂量连续 30 d 灌胃给药后，与模型组比较，高剂量组小鼠的血清 AST 和各剂量给药组的小鼠血清 ALT 均降低（$P < 0.05$）。说明 WWZJT 可降低 CCl_4 诱导肝损伤模型小鼠的血清 ALT 水平。

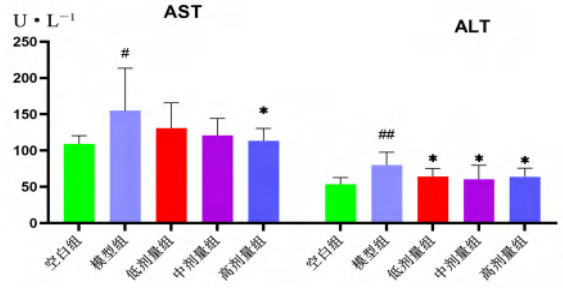


图 1 WWZJT 对小鼠血清 ALT、AST 水平的影响

Fig 1 Effect of WWZJT on the serum ALT and AST levels in mice

注：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$。

Note: *vs* the blank group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; *vs* the model group, $^{*}P < 0.05$。

2.1.3 小鼠肝脏组织病理学检查 取血后，解剖小鼠取出肝脏，用 4% 多聚甲醛溶液固定，常规制片后，用 HE 染色法对各组小鼠进行肝组织病理学检查。

分别记录每个视野中肝细胞气球样变、脂肪变性、胞质凝聚、肝细胞水样变性和细胞坏死等各种病变得分，并累计所观察视野的病变总分[15]。结果如图 2、3 所示，病理组织学检查表明，模型组肝细胞水样变性、坏死没有显著增加（$P > 0.05$），气球样变、脂肪变性、胞质凝聚等病理变化明显，相关病变评分及其总评分差异均有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。

与模型组比较，WWZJT 低、中、高剂量组肝细胞的气球样变、脂肪变性、胞质凝聚均不同程度减轻，其中低剂量组的胞质凝聚和高剂量组的气球样变差异有统计学意义（$P < 0.05$），低、中、高剂量组的脂肪变性及其总评分差异均有统计学意义（$P < 0.01$）。表明 WWZJT 对化学性肝损伤有辅助保护功能作用。

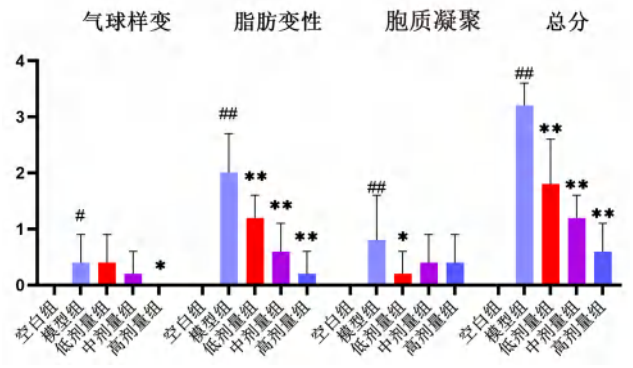


图 2 WWZJT 对 CCl_4 诱导肝损伤小鼠的肝脏病理变化评分影响

Fig 2 Effect of WWZJT on liver pathological changes in mice with liver injury induced by CCl_4

注：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：*vs* the blank group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；*vs* the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

2.2 对小鼠酒精肝损伤的保护作用

2.2.1 动物分组、造模与给药 小鼠适应性饲养 3 d 后称重，随机分成空白组，模型组及 WWZJT 低、中、高剂量组（1.0、2.0、4.0 g • kg^{-1}），每组 10 只。WWZJT 各剂量组每日灌胃给药，空白组和模型组给予蒸馏水，动物每周称重两次。于实验第 30 日将模型组及 WWZJT 组以 12 mL • kg^{-1} 剂量一次灌胃 50% 乙醇，建立小鼠急性酒精肝损伤模型，空白组给蒸馏水。禁食 16 h 后，麻醉小鼠，取肝脏组织，然后观测各组小鼠肝脏组织生化指标和病理组织。

2.2.2 小鼠肝组织中 MDA、GSH、TG 水平测定 于小鼠腹腔注射戊巴比妥钠（150 mg • kg^{-1}）进行麻醉后取肝脏，4 ℃生理盐水洗净，除去组织表面的粘连和结缔组织，用滤纸吸干水分。取肝组织块（0.1 ～ 0.2 g），与生理盐水（1∶9）加入冷冻组织匀浆机 8000 ～ 10 000 r • min^{-1} 匀浆，离心 5 min，制成 10% 的肝组织匀浆，取上清液，严格依据各试剂盒说明书要求进行肝组织 MDA、GSH、TG 等指标检测。

结果见图 4，模型组小鼠以 12 mL • kg^{-1} 给予 50% 乙醇 16 h 后，与空白组比较，其肝组织的 MDA、TG 明显升高，GSH 明显降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；与模型组比较，低、中、高剂量组均能明显降低肝组织的 MDA 含量，中、高剂量组均能升高肝组织中 GSH、TG 的含量（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。

2.2.3 小鼠肝脏组织病理学检查 肝脏组织经 4% 多聚甲醛固定后，脱水、包埋，制成石蜡切片（5 μm），用 HE 染色，镜下观察肝脏组织细胞形态结构（×400）[16]。病理组织学检查表明，模型组小鼠肝组织中脂滴沉积显著，其评分差异有统计学意义（$P < 0.01$）。WWZJT 以各剂量连续 30 d 给药，与模型组比较，均能明显减轻肝组织的脂肪变性，其肝组织病理变化评分差异有统计学意义（$P < 0.01$）。结果见图 5、6。说明 WWZJT 对酒精引起的肝损伤有辅助保护功能作用。

3 讨论与结论

肝脏是多种类型的口服治疗药物、酒精和肠道吸收等的最初接触部位，也因此易受到化学物质引起的损伤[17-19]，严重的可发展为肝癌，危害人类的健康。通过数据挖掘发现，对化学性肝损伤的辅助功能作用的检验主要是以 CCl_4 和酒精肝损伤模型为主[20]，本实验也是基于此来比较 WWZJT 不同给药剂量对肝损伤的保护情况。化学物质引起的肝脏疾病的范围较广，包括剂量依赖性肝毒性、其他细胞病变毒性和急性脂肪变性。饮酒在世界范围内普遍存在，过量饮酒与死亡、癌症和损伤风险增加有关[21-22]，根据世界卫生组织关于酒精与健康的全球现状报告，饮酒每年导致约 330 万人死亡，占所有死亡人数的 5.9%[23-24]，而传统改善化学性肝损伤和酒精肝损伤多以药物治疗为主，而大多数的药物均具有一定的不良反应，因此，开发具有较强保肝护肝作用的药食同源 WWZJT 新药对干预化学性肝损伤和酒精肝损伤病理情况具有重要意义。

ALT、AST 是判断肝损伤程度的指标，临床上常用于评估肝功能[25-26]，是急性肝细胞损伤的敏感

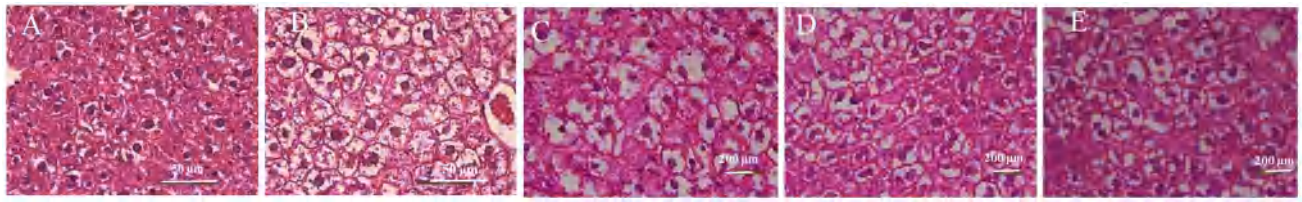


图 3 WWZJT 对 CCl_4 诱导肝损伤小鼠的肝组织病理学检查（HE，×400）

Fig 3 Liver histopathological examination of WWZJT on liver injury in mice induced by CCl_4（HE，×400）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. WWZJT 低剂量组（low-dose WWZJT）；D. WWZJT 中剂量组（middle-dose WWZJT）；E. WWZJT 高剂量组（high-dose WWZJT）

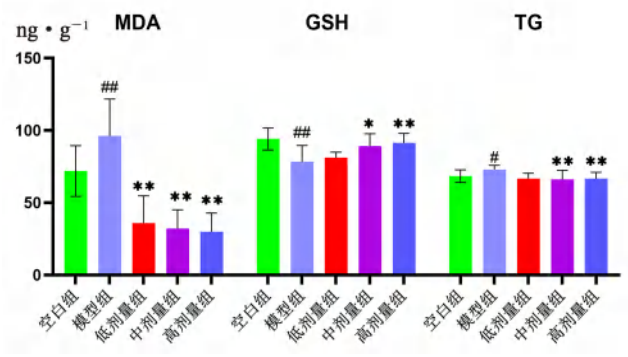


图 4 WWZJT 对酒精肝损伤小鼠肝组织中 MDA、GSH、TG 水平的影响

Fig 4 Effect of WWZJT on the levels of MDA，GSH and TG in liver tissue of mice with alcoholic liver injury

注：与空白组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：*vs* the blank group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；*vs* the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

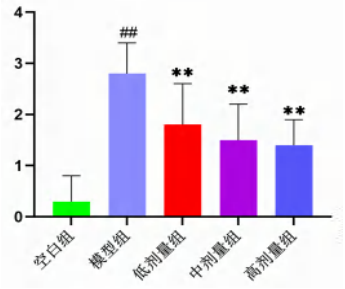


图 5 WWZJT 对酒精肝损伤小鼠的肝脏病理变化评分影响

Fig 5 Effect of WWZJT on the pathological changes of liver in mice with alcoholic liver injury

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

Note：*vs* the blank group，$^{\#\#}P < 0.01$；*vs* the model group，$^{**}P < 0.01$。

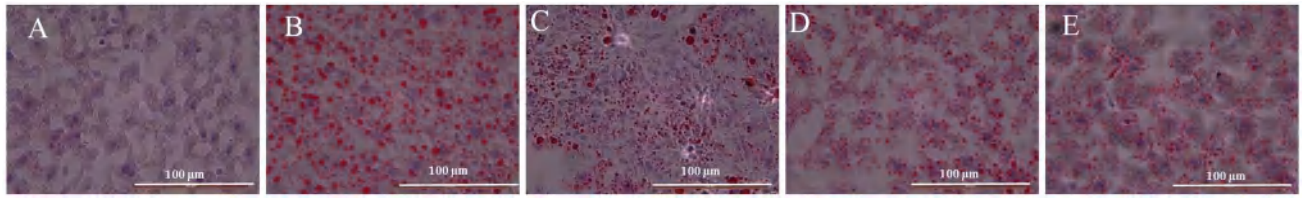


图 6 WWZJT 对小鼠酒精肝损伤的肝组织病理学检查（HE，×400）

Fig 6 Effect of WWZJT on the liver histopathological of mice with alcoholic liver injury（HE，×400）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C.WWZJT 低剂量组（low-dose WWZJT）；D. WWZJT 中剂量组（middle-dose WWZJT）；E. WWZJT 高剂量组（high-dose WWZJT）

高 [27-28]，因此研究小鼠血清生化指标能较灵敏地反映肝脏的损伤程度 [29]，对小鼠血清中 ALT、AST 水平的测定是研究 WWZJT 对 CCl_4 肝损伤小鼠辅助保护功能作用的关键。

本研究测定了 CCl_4 诱导肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量，发现两者明显升高，服用 WWZJT 组的 ALT 和 AST 有所降低。因此，WWZJT 对 CCl_4 所致的肝损伤有保护作用。MDA 的含量可间接反映肝细胞受氧化和受损伤的程度，是机体内自由基攻击脂质形成的氧化代谢产物 [20]，而 GSH 是一种抗氧化剂，可以清除自由基，保护蛋白质、酶和其他分子中的巯基 [30]。急性酒精肝损伤可导致相关肝脏疾病和活性氧（ROS）的产生，ROS 与细胞色素 P450 2E1（CYP2E1）酶相关，可影响脂质代谢，如 TG、GSH、MDA[31]。当酒精进入人体后，会导致脂肪酶生成的增强，促使 TG 在肝脏中的沉积，从而使肝脏组织中 TG 含量的升高 [5，20]。通过实验发现，酒精肝损伤小鼠肝脏中 MDA、TG 水平显著升高，而 GSH 的含量明显降低，经 WWZJT 治疗后，MDA、TG 在肝脏中的含量明显降低，有效减少了肝脏中脂肪的堆积；此外，给予 WWZJT 治疗后，肝脏组织中的 GSH 有所升高，可见 WWZJT 可以一定程度上恢复酒精肝损伤导致的肝损伤。小鼠肝脏组织进行病理组织学检查对判断肝脏的损伤程度有更直观的作用，在各类诱导肝损伤模型中被广泛应用 [31]。从两个检验方法中的相关病理结果可以反映

出 WWZJT 对治疗 CCl_4 和酒精肝损伤有明显的辅助保护作用。

综上，WWZJT 具有对 CCl_4 和酒精引起的化学性肝损伤有一定的辅助保护作用，根据各项指标测定的结果发现，其保护功能与 WWZJT 剂量成正相关。本研究为进一步阐述 WWZJT 预防和治疗化学性肝损伤的作用机制奠定了基础。

参考文献

[1] Zhang F，Wang XT，Qiu XC，et al. The protective effect of esculentoside A on experimental acute liver injury in mice [J]. PLoS One，2014，9（11）：e113107.

[2] 吕东霞，张帆，秦佳琪，等 . 中草药相关肝损伤诊断的现状与进展 [J]. 中草药，2024，55（5）：1761-1769.

[3] 程晶，温扬敏，谢永华 . 榄绿粗叶木茎甲醇提取物对 CCl_4 致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中南药学，2016，14（2）：122-125.

[4] Gu XS，Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury [J]. Expert Rev Mol Med，2012，14：e4.

[5] 宋婧，郝梦奇，翟晓虎，等 . 桔梗多糖对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中南药学，2023，21（1）：110-115.

[6] 董颖，李纪丰，张宇欣，等 . NLRP3 炎症小体：化学性肝损伤防治靶点 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2023，37（9）：703-710.

[7] 葛肖波，薛晓琳，李鑫，等 . 基于现代文献探讨干预血脂异常的药食同源类药物用药特点及其病机分析 [J]. 世界中西医结合杂志，2020，15（5）：845-849.

[8] 周衡朴，任敏霞，管家齐，等 . 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药，2019，50（19）：4785-4795.

[9] 谢占芳，张倩倩，朱凌佳，等 . 菊花化学成分及药理活性研究进展 [J]. 河南大学学报（医学版），2015，34（4）：290-300.

[10] 杨敏，丁传波，马葭葭 . 葛根素药理活性研究进展 [J]. 人参研究，2021，33（6）：62-64.

[11] 曹盼，张樱山，魏学明，等 . 葛根素药理作用研究新进展 [J]. 中成药，2021，43（8）：2130-2134.

[12] Ahn M，Park JS，Chae S，et al. Hepatoprotective effects of Lycium Chinense Miller fruit and its constituent betaine in CCl_4-induced hepatic damage in rats [J]. Acta Histochemica，2014，116（6）：1104-1112.

[13] Xiao J，Liong EC，Ching YP，et al. Lycium barbarum polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis-induced injury [J]. Nutr Diabetes，2013，3：e81.

[14] 方玉香，贺雅玲，罗兴中 . 珍珠蛇胆明目液治疗视疲劳的临床研究 [J]. 中西医结合眼科杂志，1996，14（4）：193-194.

[15] 杨帆，魏小果，赵鑫，等 . 白头翁皂苷 B4 对四氯化碳致急性肝损伤模型小鼠的保护作用及机制研究 [J]. 中药材，2021，44（12）：2938-2942.

[16] 黄子涵，毛新亮，余宗盛，等 . 玉米肽保护急性酒精性肝损伤的作用研究 [J]. 今日药学，2023，33（11）：807-813.

[17] Gu X，Manautou J. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury [J]. Expert Rev Mol Med，2012，14：e4.

[18] 高月求，刘耀文，单俊杰 . 天然多糖对实验免疫性和酒精性肝损伤的干预评价研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2017，44（11）：1075-1084.

[19] 姚蕙，麻浩，骆芙瑶，等 . 猫爪草活性多糖 RTP-60-3V-Ⅲ化学结构及抗药物性肝损伤的作用 [J]. 中国新药杂志，2024，33（4）：360-371.

[20] 谭烨敏，李嘉嘉，余雯琦，等 . 爬岩红提取物对化学性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 龙岩学院学报，2024，42（2）：44-52.

[21] Smyth A，Teo KK，Rangarajan S，et al. Alcohol consumption and cardiovascular disease，cancer，injury，admission to hospital，and mortality：a prospective cohort study [J]. Lancet，2015，386（10007）：1945-1954.

[22] 栗雯华，王强，郭晓彤，等 . 异甘草素对小鼠酒精性肝损伤的影响 [J]. 中国兽医学报，2023，43（11）：2314-2320.

[23] Asrani S，Devarbhavi H，Eaton J，et al. Burden of liver diseases in the world [J]. J Hepatol，2018，70（1）：151-171.

[24] 方玉，刘子琪，王薇，等 . 肿瘤合并肝硬化、脂肪肝，药物性肝损伤等肝病的临床流行病学特征现况调查 [A]// 第十四届亚洲营养大会论文集 [C]. 成都，2023.

[25] Labenz C，Toenges G，Wörns MA，et al. Liver injury in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infection：a systematic review and meta-analysis [J]. Eur J Gastroen Hepat，2021，33（9）：1194-1200.

[26] 谢海燕 . 脂肪肝临床诊断中 ALT、AST 肝功能指标与 TG、TC 血脂指标的临床价值 [J]. 黔南民族医专学报，2022，35（4）：259-261.

[27] Chen S，Zhang CL，Zhou XF，et al. Anti-inflammatory and antioxidative properties of helicid protect against CCl_4 induced acute liver injury in mice [J]. Biotech Histochem，2020，95（7）：483-489.

[28] 张婷，冯石卜，姜祎，等 . 山茱萸果核提取物不同洗脱部位对急性药物性肝损伤的作用研究 [J]. 中南药学，2023，21（3）：652-656.

[29] 张维，张运超，胡丞铭，等 . 姜黄素对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的预防机制 [J]. 武汉轻工大学学报，2023，42（6）：37-46.

[30] Valko M，Leibfritz D，Moncol J，et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. Int J Biochem Cell B，2006，39（1）：44-84.

[31] Zou SP，Wang YF，Zhou Q，et al. Protective effect of kinsenoside on acute alcohol-induced liver injury in mice [J]. Rev Bras Farmacogn，2019，29（5）：637-643.

（收稿日期：2024-02-05；修回日期：2024-05-06）

霍山石斛内生真菌 *Trichoderma* sp. 次生代谢产物研究

孙露萍[1]，王举涛[2, 3*]，程耀堂[1]（1. 上海中医药大学附属曙光医院安徽医院，合肥 230031；2. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；3. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室，合肥 230012）

摘要：目的 研究霍山石斛内生真菌 *Trichoderma* sp. 的次生代谢产物。**方法** 采用正相硅胶、葡聚糖凝胶、反相 C-18 及制备液相结合二极管阵列检测器等多种色谱技术分离纯化，所获得的化合物经紫外光谱、核磁共振波谱和质谱数据鉴定。**结果** 从霍山石斛内生真菌 *Trichoderma* sp. 中定向分离并鉴定了 1 个新化合物及 8 个色原酮和蒽醌类化合物，分别为 trichphenoid（**1**），2，3-dialkylchromone（**2**），5-hydroxy-2，3-dimethyl-7-methoxychromone（**3**），7-hydroxy-2-（2'-hydroxypropyl）-5-methylchromone（**4**），2，5-二甲基-7-羟基色酮（**5**），1，7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9，10-anthraquinone（**6**），1-hydroxy-3-hydroxymethyl-9，10-anthraquinone（**7**），pachybasin（**8**），大黄酚（**9**）。**结论** 所有化合物均为首次从霍山石斛内生真菌 *Trichoderma* sp. 中分离得到，化合物 **1** 为新化合物。

关键词：霍山石斛；*Trichoderma* sp.；内生真菌；HPLC-DAD；色原酮；蒽醌
中图分类号：R284.1，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2914-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.013

Secondary metabolites of endophytic fungus *Trichoderma* sp. in *Dendrobium huoshanense*

SUN Lu-ping[1], WANG Ju-tao[2, 3*], CHENG Yao-tang[1] (1. *Anhui Hospital of Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230031; 2. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 3. *Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the secondary metabolites of endophytic fungus *Trichoderma* sp. in *Dendrobium huoshanense*. **Methods** The compounds were separated and purified by a variety of chromatographic techniques such as silica gel, sephadex, octadecylsilyl and preparation HPLC combined with photo-diode array, and the obtained compounds were identified by UV-visible spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry data. **Results** One new compound and eight compounds were isolated and their structures were identified as trichphenoid (**1**), 2, 3-dialkylchromone (**2**), 5-hydroxy-2, 3-dimethyl-7-methoxychromone (**3**), 7-hydroxy-2-(2'-hydroxypropyl)-5-methylchromone (**4**), 2, 5-dimethyl-7-hydroxychromone (**5**), 1, 7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9, 10-anthraquinone (**6**), 1-hydroxy-3-hydroxymethyl-9, 10-anthraquinone (**7**), pachybasin (**8**), and chrysophanol (**9**). **Conclusion** All the compounds have been isolated from endophytic fungus *Trichoderma* sp. in *Dendrobium huoshanense* for the first time and the compound **1** is new.

Key words: *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; *Trichoderma* sp.; endophytic fungus; HPLC-DAD; chromone; anthraquinone

木霉（*Trichoderma* sp.）是一类自然界广泛存在于土壤中的真菌类群，属于半知菌门（Deuteromycotina）丝孢目（Moniliales）木霉属（*Trichoderma* sp.）[1]。木霉内生真菌次生代谢产物结构类型丰富，主要包

基金项目：安徽省 2020 年度中医药传承创新项目（No.2020zcyb08）；安徽省高等学校自然科学基金重点项目（No.KJ2021A0597）。
作者简介：孙露萍，女，主管中药师，主要从事中药化学研究，email：583225004@qq.com *通信作者：王举涛，男，教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物化学及中药药效物质基础研究，email：wjt591@ahtcm.edu.cn

括聚酮类、蒽醌类、多肽类、萜类、甾体类等化合物[2-6]，其中大部分具有良好的生物活性，如促进植物生长、抗菌、抗病毒、抗植物病原真菌等生物活性[7-8]，在植物生物防治方面展现出巨大潜力。

学者们前期一直致力于内生真菌次生代谢产物和生物活性发掘研究，目前已从霍山石斛、白芍和凤丹等中药资源内生真菌中分离得到数十个结构新颖的化合物，并在抗菌和抗炎活性筛选中展现出较好的应用价值[9-14]。为了进一步发掘结构多样且生物活性丰富的内生真菌次生代谢产物，本研究从霍山石斛内生真菌木霉中分离得到 9 个特征性化合物，其中化合物 **1** 为新的苯丙素类化合物，**2** ～ **5** 为色原酮类化合物，**6** ～ **9** 为蒽醌类化合物（见图 1），同时，活性实验表明，部分化合物具有抗炎作用，现报道如下。

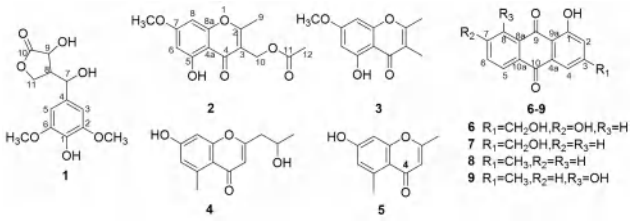


图 1 化合物 **1** ～ **9** 结构式

Fig 1 Structures of compounds **1** ～ **9**

1 材料

ESI-MS 由 UPLC-IT-TOF 色谱质谱联用仪或 Agilent UPLC/Q-TOF 液质联用仪上测定（美国 Agilent 公司）。HR-ESI-MS 在 UPLC-IT-TOF 色谱质谱联用仪测定。1D-NMR 和 2D-NMR 由 Bruker AVANCEⅢ 400 MHz，500 MHz 或 AV-600 MHz 核磁共振仪测定 [德国 Bruker BioSpin GmbH 公司，内标为三甲基硅烷（TMS）]。Waters 1525 HPLC 系统的分析型液相色谱仪、Waters Xbridge 系列 C18 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）或 Waters Sunfire 系列 C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）、Waters 1525 制备型高效液相色谱仪、Waters Sunfire（250 mm×19 mm，5 μm）制备柱（美国 Waters 公司）。正相柱层析硅胶（200 ～ 300 目）（青岛海洋化工厂）；反相 C-18 柱 [日本富士化工有限公司的 RP-18（45 ～ 70 μm）]；Sephadex LH-20（美国 GE Healthcare 公司）；MCI 柱层析硅胶 [日本三菱化工的 MCI gel CHP-20P（75 ～ 150 μm）]。

内生真菌菌株从霍山石斛新鲜茎中分离获得并通过分子学手段比对鉴定为 *Trichoderma* sp.（GenBank accession No. MK871155.1，纯度：99.83%），储存在安徽中医药大学中药与天然药物化学系，4 ℃ 保存。小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7（武汉普诺赛生命科技有限公司）。

2 菌株发酵、提取及分离

将保存在斜面试管中的木霉菌株接种到灭菌后的 PDA 培养基（马铃薯浸粉 3 g • L^{-1}、葡萄糖 20 g • L^{-1}、琼脂 14.0 g • L^{-1}）上，于 28 ℃恒温培养箱中培养，活化 5 ～ 7 d，用灭菌后的 5 mm 打孔器打孔，取其菌饼，将菌饼置于灭菌后的大米固体培养基（100 g 大米和 110 mL 蒸馏水置于 1 L 的锥形瓶中，121 ℃高压灭菌 20 min）中，于 28 ℃恒温发酵 25 d，共发酵 30 瓶。25 d 后停止发酵，在每个锥形瓶中加入 500 mL 甲醇进行提取，连续减压回流 4 次后得到待分离浸膏，甲醇提取物（1010 g）采用硅胶柱层析（200 ～ 300 目），石油醚 - 乙酸乙酯（100∶0 ～ 0∶100）梯度和 100% 甲醇洗脱，共得到 7 个组分（Fr.1 ～ Fr.7）。对每个组分进行初步液相分析（MeOH-H_2O，10∶90 → 90∶10，30 min），发现 Fr.3 ～ Fr.5 在 254 和 285 nm 紫外吸收较为明显，故选取该组分进行分离纯化。

Fr.3（10.5 g）采用硅胶柱层析（石油醚 - 丙酮，30∶1 → 0∶1）梯度洗脱，得到 4 个亚组分 Fr.3-1 ～ Fr.3-4。Fr.3-3（0.7 g）经 Sephadex LH-20 柱（100%）处理再经过制备高效液相色谱（20 min）分离得到化合物 **5**（7.7 mg，t = 15 min）。

Fr.4（9.8 g）经 MCI（MeOH-H_2O，1∶1 → 0∶1）和 RP-C18 柱（MeOH-H_2O，30∶70 → 100∶0）洗脱，得到 Fr.4-1 ～ Fr.4-5 的 5 个亚组分。继而再用 Sephadex LH-20 柱（$CHCl_3$-MeOH，1∶1）细分得 Fr.4-2（0.5 g），最后再由制备高效液相色谱（MeCN-H_2O，60∶40，20 min）纯化得化合物 **2**（1.7 mg，t = 15 min）和化合物 **3**（3.2 mg，t = 18 min）。Fr.4-4 先用 RP-C18 柱（MeOH-H_2O，10∶90 → 100∶0）梯度洗脱，再经过 Sephadex LH-2 柱（MeOH，100%）细分，最后使用制备高效液相色谱柱（MeOH-H_2O，60∶40，25 min）纯化，得到化合物 **6**（4.6 mg，t = 12 min）、化合物 **4**（6.2 mg，t = 16 min）和化合物 **9**（4.1 mg，t = 22 min）。

Fr.5（13.5 g）用 RP-C18 柱（MeOH-H_2O，10∶90 → 100∶0）梯度洗脱，得到 7 个亚组分 Fr.5-1 ～ Fr.5-7。Fr.5-7（5 g）经 Sephadex LH-2 柱（MeOH，100%）洗脱，再由制备高效液相色谱（MeOH-H_2O，60∶40，t = 25 min）纯化得到化合物 **7**（4.7 mg，t = 18 min）和化合物 **8**（11 mg，t = 20 min）。

Fr.6（3.5 g）用 RP-C18 柱（MeOH-H_2O，30∶70 → 100∶0）梯度洗脱，得到 4 个亚组分 Fr.6-1 ～ Fr.6-4。Fr.6-4（0.7 g）经 Sephadex LH-2 柱（MeOH，100%）洗脱，再由制备高效液相色谱

（MeOH-H_2O，50∶50，t = 25 min）纯化得到化合物 **1**（3.5 mg，t = 19 min）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：黄色无定形粉末，易溶于甲醇。HR-ESI-MS 数据显示分子离子峰 [M-H]⁻ 为 *m/z*：283.0822（calcd for $C_{13}H_{15}O_7$ 283.0823），结合 ^{13}C-NMR 数据，确定分子量为 284，对应分子式为 $C_{13}H_{16}O_7$，经计算有 6 个不饱和度。^{1}H-NMR 数据显示，δ_H 在 6.69（s）处存在 2 个芳环质子；在 5.18（d）、4.60（d）、3.78（dd）和 3.62（dd）处存在连氧碳上的氢，3.85（s）处有 2 个苯环上的甲氧基；2.37（tt）存在脂肪氢信号。^{13}C-NMR 和 DEPT 谱显示 13 个碳信号，分别为 5 个季碳信号，包括 3 个双键季碳（δ_C 178.6，149.4，129.4）和 2 个连氧季碳（δ_C 57.4，57.4）；4 个叔碳包括 2 个烯烃叔碳（δ_C 105.3，105.3），2 个连氧叔碳（δ_C 80.8，69.7）；2 个连氧甲基（δ_C 56.8，56.8）；2 个亚甲基信号（δ_C 55.9，57.6）。H-8/H-7/H-9/H-10 之间的 ^{1}H-^{1}H COSY 相关、H-11/C-10 之间的 HMBC 相关提示形成了一个含氧五元环；HMBC 光谱揭示了 H-3/5 和 C-4 和 C-1 之间的相关性，提示形成了紫丁香醇类似物，从而确定该化合物的平面结构，但通过 ROESY 光谱和计算碳谱数据无法准确判定相对构型，而且经过多次尝试单晶培养，无法形成有效晶体，故而该化合物绝对构型未定。该化合物主要 ^{1}H-^{1}H COSY 和 HMBC 相关详见图 2。检索发现该结构尚未由 Sci Finder 收录，故命名为 trichphenoid。化合物 **1**，比旋光值 $[\alpha]_{20}^{D}$ = − 16.00，紫外吸收 UV（CH_3OH）λ_{max}（logε）：208（3.89）、231（3.28）和 279（2.85）nm；^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 数据见表 1。

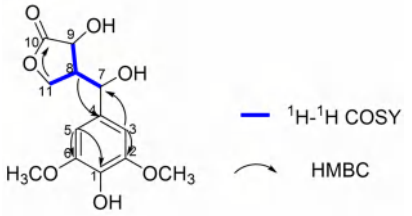


图 2 化合物 **1** 的主要 ^{1}H-^{1}H COSY 和 HMBC 相关

Fig 2 ^{1}H-^{1}H COSY and HMBC correlations of compound **1**

化合物 **2**：黄色油状物；分子式 $C_{14}H_{14}O_6$，比旋光值 $[\alpha]_{21}^{D}$ − 10.69（*c* 1.1，CH_3OH）；紫外吸收 UV（CH_3OH）λ_{max}（logε）：232.6（4.22），251.4（4.28），255.4（4.28），291.2（3.80）及 313.6（3.64）nm；核磁数据 ^{1}H（500 MHz）和 ^{13}C（125 MHz）NMR（CD_3OD）见表 2；高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 301.0681 [M + Na]$^+$（calcd. for $C_{14}H_{14}O_6Na$ 301.0683）。化合物 **2** 的氢谱、碳谱及高分辨质谱数据与文献 [15] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 2，3-dialkylchromone。

表 1 化合物 1 的 ^{1}H 和 ^{13}C NMR 数据（^{1}H 为 500 MHz，^{13}C NMR 为 125 MHz，在氘代甲醇中测量）

Tab 1 ^{1}H and ^{13}C NMR data for compound 1 (500 MHz for ^{1}H and 125 MHz for ^{13}C NMR measured in CD_3OD)

No.	δ_H	δ_C
1		137.3，C
2，6		149.4，C
3，5	6.69（s）	105.3，CH
4		129.4，C
7	5.18（d，J = 10.1 Hz）	80.8，CH
8	2.37（tt，J = 10.6，3.2 Hz）	55.9，CH
9	4.60（d，J = 10.9 Hz）	69.7，CH
10		178.6，C
11	3.78（dd，J = 11.8，3.5 Hz）	57.6，CH_2
	3.62（dd，J = 11.8，3.5 Hz）	
2，6-OCH_3	3.85（s）	56.8

表 2 化合物 2 的 ^{1}H 和 ^{13}C NMR 数据（^{1}H 为 500 MHz，^{13}C NMR 为 125 MHz，在氘代甲醇中测量）

Tab 2 ^{1}H and ^{13}C NMR data for compound 2 (500 MHz for ^{1}H and 125 MHz for ^{13}C NMR measured in CD_3OD)

No.	δ_H	δ_C
2		169.8，C
3		115.6，C
4		182.2，C
4a		105.5，C
5		163.1，C
6	6.32（d，2.0）	99.2，CH
7		167.4，C
7-OCH_3	3.86（s）	56.5，CH_3
8	6.47（d，2.2）	93.3，CH
8a		159.1，C
9	2.50（s）	18.4，CH_3
10	5.05（s）	57.5，CH_2
11		172.7，C
12	2.04（s）	20.7，CH_3

化合物 **3**：棕色油状物；分子式 $C_{12}H_{12}O_4$，^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：6.28（1H，d，J = 2.1 Hz，H-8），6.15（1H，d，J = 2.1 Hz，H-6），3.74（3H，s，7-OMe），2.28（3H，s，H-9），1.85（3H，s，H-10）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：162.8（C-2），115.9（C-3），183.2（C-4），105.4（C-4a），164.8（C-5），98.6（C-6），166.8（C-7），92.6（C-8），159.1（C-8a），18.4（C-9），9.1（C-10），56.3（C-11）。高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 221.0815 [M + H]$^+$（calcd. for $C_{12}H_{13}O_4$ 221.0812）。化合物 **3** 的氢谱和碳谱数据与文献 [16] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 5-hydroxy-2，3-dimethyl-7-methoxychromone。

化合物 **4**：棕色油状物；分子式为 $C_{13}H_{14}O_4$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.63（1H，d，J =

2.5 Hz，H-8），6.60（1H，d，J = 2.4 Hz，H-6），6.04（1H，s，H-3），4.18（1H，q，J = 6.3 Hz，H-2'），2.71（3H，s，CH3），2.66（1H，d，J = 4.8 Hz，H-1'），1.26（3H，d，J = 6.4 Hz，CH3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：161.4（C-2），118.2（C-3），182.1（C-4），115.8（C-4a），143.7（C-5），112.5（C-6），162.9（C-7），101.8（C-8），167.2（C-8a），44.2（C-1'），66.5（C-2'），23.5（C-3'），23.1（5-CH_3）。高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 235.0881 $[M + H]^+$（calcd. for $C_{13}H_{15}O_4$ 235.0892）。化合物 **4** 的氢谱和碳谱数据与文献[17]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 7-hydroxy-2-（2'-hydroxypropyl）-5-methylchromone。

化合物 **5**：棕色油状物；分子式为 $C_{11}H_{10}O_3$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.64（1H，m，H-8），6.60（1H，s，H-6），2.71（3H，s，5-CH_3），2.32（3H，s，2-CH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：166.6（C-2），111.4（C-3），182.0（C-4），115.6（C-4a），143.6（C-5），117.9（C-6），163.1（C-7），101.6（C-8），161.5（C-8a），19.8（2-CH_3），23.1（5-CH_3）。高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 191.0715 $[M + H]^+$（calcd. for $C_{11}H_{11}O_3$ 191.0709）。化合物 **5** 的氢谱和碳谱数据与文献[18]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 2，5- 二甲基 -7- 羟基色酮。

化合物 **6**：黄色油状物；分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：8.53（1H，s，OH），8.12（1H，d，J = 8.5 Hz，H-5），7.74（1H，d，J = 1.7 Hz，H-4），7.59（1H，d，J = 2.5 Hz，H-8），7.26（1H，d，J = 1.4 Hz，H-2），7.18（1H，dd，J = 8.5，2.6 Hz，H-6），4.72（2H，s，H-11）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：163.9（C-1），121.3（C-2），153.6（C-3），118.0（C-4），135.1（C-4a），131.2（C-5），122.8（C-6），163.9（C-7），113.4（C-8），127.0（C-8a），182.7（C-9），116.3（C-9a），189.7（C-10），136.9（C-10a），64.2（C-11）。高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 271.0618 $[M + H]^+$（calcd. for $C_{15}H_{11}O_5$ 271.0607）。化合物 **6** 的氢谱和碳谱数据与文献[19]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 1，7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9，10-anthraquinone。

化合物 **7**：黄色粉末；分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：8.32（1H，m，H-8），8.26（1H，m，H-5），7.88（2H，m，H-6/7），7.79（1H，s，H-4），7.32（1H，s，H-2），4.71（3H，s，H-11）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：164.0（C-1），121.9（C-2），153.7（C-3），118.2（C-4），134.9（C-4a），128.2（C-5），135.9（C-6），135.5（C-7），127.8（C-8），134.7（C-8a），189.5（C-9），116.2（C-9a），183.6（C-10），134.9（C-10a），64.2（C-11）。高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 255.0660 $[M + H]^+$（calcd. for $C_{15}H_{11}O_4$ 255.0655）。化合物 **7** 的氢谱和碳谱数据与文献[20]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 1-hydroxy-3-hydroxymethyl-9，10-anthraquinone。

化合物 **8**：黄色粉末；分子式为 $C_{15}H_{10}O_3$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：12.59（1H，s，OH），8.30（2H，m，H-5/8），7.81（2H，m，H-6/7），7.66（1H，d，J = 1.6 Hz，H-4），7.12（1H，dd，J = 1.7，0.9 Hz，H-2），2.47（3H，s，H-11）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：162.8（C-1），124.2（C-2），148.7（C-3），120.9（C-4），133.7（C-4a），127.4（C-5），134.5（C-5a），134.2（C-6），126.8（C-7），133.2（C-8），188.1（C-8a），114.1（C-9），182.8（C-9a），133.4（C-10），22.3（C-11）。高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 239.0715 $[M + H]^+$（calcd. for $C_{15}H_{11}O_3$ 239.0709）。化合物 **8** 的氢谱和碳谱数据与文献[21]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 pachybasin。

化合物 **9**：黄色油状物；分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$，^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：12.14（1H，s，8-OH），12.03（1H，s，1-OH），7.83（1H，dd，J = 7.5，1.1 Hz，H-5），7.68（2H，m，H-4/6），7.30（1H，dd，J = 8.4，1.1 Hz，H-7），7.11（1H，dd，J = 1.8，0.9 Hz，H-2），2.47（3H，s，H-11）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：162.8（C-1），124.4（C-2），149.4（C-3），121.4（C-4），133.7（C-4a），119.9（C-5），137.0（C-5a），124.6（C-6），162.5（C-7），115.9（C-8），192.6（C-8a），113.8（C-9），182.1（C-9a），133.7（C-10），22.3（C-11）。高分辨质谱 HR-ESI-MS *m/z* 255.0652 $[M + H]^+$（calcd. for $C_{11}H_{11}O_3$ 255.0658）。化合物 **9** 的氢谱和碳谱数据与文献[22]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为大黄酚。

4 化合物一氧化氮（NO）抑制活性实验

将 RAW264.7 细胞接种至 96 孔板，用 1 μg•mL^{-1} 脂多糖（LPS）（白鲨生物）进行诱导刺激，同时加入待测化合物 **1** ～ **9**（终浓度 50 μmol • L^{-1}）处理，设置不含药物组和 L-NMMA（白鲨生物）阳性药物组作对照。细胞过夜培养后取培养基检测 NO 生成，在 570 nm 处测定吸光度值（*OD*）。在剩余培养基中加入 MTS 进行细胞存活率检测，排除化合物对细胞的毒性影响。NO 生成抑制率（%）=（$OD_{非药物处理组} - OD_{样品组}$）/$OD_{非药物处理组}$ ×100%。

IC_{50} 按 Reed & Muench 法计算。结果显示化合物 **6** 和 **9** 表现出较弱的 NO 抑制活性，结果见表 3，IC_{50} 值为 49.7 和 51.5 μmol • L^{-1}（阳性对照 L-NMMA，IC_{50} = 40.2 μmol • L^{-1}）。

表 3 50 μmol·L^{-1} 化合物对 RAW264.7 细胞中 NO 生成抑制率的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of 50 μmol·L^{-1} compounds on the inhibition rate of NO production activity in RAW264.7 cell ($\bar{x}\pm s$)

化合物	NO 生成抑制率 /%	化合物	NO 生成抑制率 /%
1	11.06±0.69	**6**	50.07±0.50
2	3.71±0.36	**7**	16.62±0.38
3	9.97±0.77	**8**	14.41±0.59
4	13.27±0.6	**9**	49.14±0.56
5	11.91±0.4		

5 讨论

本文在前期研究中药内生真菌次生代谢产物的基础上，继续发掘内生真菌新颖结构，上述化合物均为第一次从该菌种中分离得到，并从中发现了新的苯丙素类化合物 **1**。同时对分离得到的化合物进行抗炎活性筛选，发现极少数化合物有很弱的抗炎活性。化合物 **2** 是第二次从木霉属中分离得到（前一次是从哈茨木霉中获得的），其具有化学诱捕和杀虫潜能 [15]。

本研究进一步丰富了该属内生真菌次生代谢产物类型和种类，为该菌属的开发利用提供了实验依据。

参考文献

[1] 杨曦亮，任梦瑶，刘倩，等 . 近十年海洋来源木霉属真菌次生代谢产物研究进展 [J]. 广西科学，2021，28（5）：440-450.

[2] Zhao DL，Zhang XF，Huang RH，et al. Antifungal nafuredin and epithiodiketopiperazine derivatives from the mangrove-derived fungus *Trichoderma harzianum* D13 [J]. Front Microbiol，2020，11：1495.

[3] Shi T，Shao CL，Liu Y，et al. Terpenoids from the coral-derived fungus *Trichoderma harzianum*（XS-20090075）induced by chemical epigenetic manipulation [J]. Front Microbiol，2020，11：572.

[4] Deng CM，Huang CH，Wu QL，et al. A new sesquiterpene derivative from the mangrove endophytic fungus *Trichoderma harzianum*（Strain No. R1）[J]. Chem Nat Compd，2021，57（2）：312-314.

[5] Liang XR，Ma XY，Ji NY. Trichosordarin A，a norditerpene glycoside from the marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* R5 [J]. Nat Prod Res，2020，34（14）：2037-2042.

[6] Panizel I，Yarden O，Ilan M，et al. Eight new peptaibols from sponge-associated *Trichoderma atroviride* [J]. Mar Drugs，2013，11（12）：4937-4960.

[7] Li JS，Chen K，Yang HT，et al. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* Species [J]. Agrochemicals，2010，49（10）：713-716.

[8] Degenkolb T，Dieckmann R，Nielsen KF，et al. The *Trichoderma* brevicompactum clade：a separate lineage with new species，new peptaibiotics，and mycotoxins [J]. Mycol Prog，2008，7（3）：177-219.

[9] Wang JT，Li HY，Rao R，et al.（±）-stagonosporopsin A，stagonosporopsin B and stagonosporopsin C，antibacterial metabolites produced by endophytic fungus *Stagonosporopsis oculihominis* [J]. Phytochemistry Lett，2021，45：157-160.

[10] Wang JT，Zhang PL，Liu JS，et al. Aspergilates A to E，second metabolites from *Aspergillus sp*. isolated from *Paeonia ostia* [J]. Fitoterapia，2018，131：204-208.

[11] Wang JT，Ma ZH，Wang GK. et al. Four meroterpenoids from *Alternaria alternata* isolated from *Paeonia lactiflora* [J]. Phytochemistry Lett，2019，31：1-4.

[12] Wang JT，Ma ZH，Wang GK. et al. Chemical constituents from plant endophytic fungus *Alternaria alternata* [J]. Nat Prod Res，2021，35（7）：1199-1206.

[13] 李慧媛，岳婧怡，王举涛，等 . 植物内生真菌 *Fusarium guttiforme* 次生代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发，2022，34（7）：1143-1147.

[14] 王举涛，马宗慧，王国凯，等 . 白芍中一种内生真菌 *Penicillium mariaecrucis* 的次生代谢产物研究 [J]. 有机化学，2019，39（4）：1136-1141.

[15] Wang XY，Xu TT，Sun LJ，et al. The chemical diversity，the attractant，anti-acetylcholinesterase，and antifungal activities of metabolites from biocontrol *Trichoderma harzianum* uncovered by OSMAC strategy [J]. Bioorg Chem，2021，114：105148.

[16] Tanahashi T，Takenaka Y，Nagakura N，et al. 2，3-dialkylchromones from mycobiont cultures of the lichen graphis scripta [J]. Heterocycles，2000，53（7）：1589-1593.

[17] Hu L，Chen NN，Hu Q，et al. An unusual piceatannol dimer from *Rheum austral* D. Don with antioxidant activity [J]. Molecules，2014，19（8）：11453-11464.

[18] Phaopongthai J，Wiyakrutta S，Meksuriyen D，et al. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin，a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz [J]. J Microbiol，2013，51（6）：821-828.

[19] Borges WD，Pupo MT. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*，an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia*（Asteraceae）[J]. J Brazil Chem Soc，2006，17（5）：929-934.

[20] Sun P，Huo J，Kurtán T，et al. Structural and stereochemical studies of hydroxyanthraquinone derivatives from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp [J]. Chirality，2012，25（2）：141-148.

[21] Khamthong N，Rukachaisirikul V，Tadpetch K，et al. Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 [J]. Arch Pharm Res，2012，35（3）：461-468.

[22] Phaopongthai J，Wiyakrutta S，Meksuriyen D，et al. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin，a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz [J]. J Microbiol，2013，51（6）：821-828.

（收稿日期：2024-03-28；修回日期：2024-05-28）

辛伐他汀对阿霉素诱导的心脏毒性大鼠的保护机制研究

李凤梅，白春强，郝长来*，王丽红*（承德医学院附属医院，河北 承德 067000）

摘要：目的 探讨辛伐他汀对阿霉素诱导的心脏毒性大鼠的保护作用及可能机制。**方法** 将 32 只 Wistar 雄性大鼠随机均分为对照组（Con）、辛伐他汀组（Sim）、阿霉素组（Dox）、联合用药组（Dox ＋ Sim）。通过大鼠的一般状态、彩超、ELISA 法、HE 染色、Masson 染色评估辛伐他汀的心脏保护情况；通过 Western blot 法和 qRT-PCR 法研究辛伐他汀作用的机制。**结果** 辛伐他汀能够显著降低 Dox 诱导的心脏毒性，改善心功能；减轻心肌纤维排列紊乱，抑制胶原过度增生；降低纤维化相关因子 MMP2、MMP9 和 Collagen Ⅰ的表达，增加 TIMP1 表达；抑制信号通路相关因子 TGF-β 和 Smad2/3 的表达。**结论** 辛伐他汀可降低阿霉素相关心脏毒性，其作用机制可能与抑制 TGF-β/Smad/MMPs 信号通路活性，减少心肌纤维化有关。

关键词：辛伐他汀；阿霉素；心肌纤维化；TGF-β/Smad/MMPs 信号通路
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2919-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.014

Protective mechanism of simvastatin on cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats

LI Feng-mei, BAI Chun-qiang, HAO Chang-lai*, WANG Li-hong* (*Affiliated Hospital of Chengde Medical College*, *Chengde Hebei* 067000)

Abstract: Objective To determine the protective effect of simvastatin (Sim) on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats and its possible mechanism. **Methods** Totally 32 male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: a control group (Con), a simvastatin group (Sim), a doxorubicin group (Dox) and a combination group (Dox ＋ Sim). The general state of rats, color Doppler ultrasound, ELISA, HE staining and Masson staining were used to evaluate the cardiac protection of simvastatin. Western blot and qRT-PCR were used to determine the mechanism of simvastatin. **Results** Simvastatin greatly reduced Dox-induced cardiac injury and improved cardiac function; alleviated the disorder of myocardial fiber arrangement and inhibited the excessive proliferation of collagen. The expression of MMP-2, MMP-9 and Collagen Ⅰ were decreased, while the expression of TIMP1 was increased. Simvastatin also inhibited the expression of TGF-β and Smad2/3. **Conclusion** Simvastatin can reduce doxorubicin-related cardiotoxicity, whose mechanism may be related to inhibiting TGF-β/Smad/MMPs signaling pathway and reducing myocardial fibrosis.

Key words: simvastatin; doxorubicin; myocardial fiber; TGF-β/Smad/MMPs signaling pathway

近年来，肿瘤发生率逐年升高，蒽环类药物被广泛用于治疗各种肿瘤，可显著改善肿瘤患者的 5 年生存期（87%）。但是，严重的心脏毒性大大制约了其临床应用，可导致 1/3 的患者死亡，其中阿霉素（doxorubicin，Dox）是最具有代表性的蒽环类药物[1]。心肌纤维化是心脏毒性重要的病理生理基础，有待更深入的研究[2]。研究发现 TGF-β/Smad/MMPs 通路可导致胶原过度沉积而导致心肌纤维化，从而影响心脏毒性[3-6]。辛伐他汀（simvastatin，Sim）是一种羟甲基戊二酰辅

基金项目：2018 年度河北省医学科学研究重点课题计划（No.20181154）。
作者简介：李凤梅，女，硕士，主要从事蒽环类药物心脏毒性方面的研究，email：17853306602@163.com *通信作者：郝长来，男，教授，主任医师，博士研究生导师，主要从事蒽环类药物心脏毒性方面的研究，email：17303148060@163.com；王丽红，女，副教授，主任医师，硕士研究生导师，主要从事蒽环类药物心脏毒性方面的研究，email：wanglihong0535@163.com

酶 A（hydroxy methylglutaryl coenzyme A，HMG-CoA）还原酶抑制剂，能有效降低血脂，缓解动脉硬化，主要用于治疗高胆固醇血症[7]。目前研究发现他汀类药物具有抗纤维化、抗肿瘤、抗炎和抗氧化等多效性，是最有潜力的心脏保护剂[8-9]。本研究以 Wistar 大鼠为研究对象，阿霉素为模型化疗药物，辛伐他汀为保护药，探讨辛伐他汀对大鼠阿霉素相关心脏毒性的保护作用，并以 TGF-β/Smad/MMPs 通路为切入点研究其潜在机制，以期为辛伐他汀在临床阿霉素相关心脏毒性的应用提供更多实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

6 周龄雄性 Wistar 大鼠 [北京华阜康生物科技股份有限公司，SCXK（京）2019-0008] 32 只，体重（250±20）g，饲养于承德医学院附属医院实验动物中心（SPF 级）。在温度控制（25±2）℃的温控房间内进行 12 h 的光照 / 黑暗循环，并自由获取水和食物，并在实验前一周适应环境。

1.2 试药

阿霉素（浙江瀚晖制药有限公司）；辛伐他汀（浙江京新药业股份有限公司）；MMP2、MMP9、TGF-β、Smad2/3、GAPDH（英国 Abcam 公司）；Collagen Ⅰ（江苏 Affinity 公司）；TIMP1（北京 Bioss 公司）；Goat anti-Rabbit IgG 二抗（河北 Report 公司）；SDS-PAGE 凝胶（北京 Solarbio 公司）；SDS-PAGE 电泳液（10×）、20xWestern 超快转膜缓冲液（北京 ZOMANBIO 公司）；DAB 显色（北京普利莱公司）；三色蛋白 Marker、cDNA 合成试剂盒、第三代 ZAPA SYBR Green qPCR 预混液（天津中实同创公司）；RNA 酶和核酸清除剂（南京诺唯赞公司）；TRIzol 试剂（美国 Invitrogen 公司）；4% 多聚甲醛 / 通用型组织固定液（河北本元生物科技公司）；大鼠 BNP 酶联免疫试剂盒（北京 CUSABIO 公司）。

1.3 仪器

小动物麻醉机（深圳沃瑞德公司，型号：R550IP）；EPIQ7C 彩超机、s8-3 探头（上海飞利浦公司）；酶标仪（美国 Thermo Fisher 公司）；化学发光检测系统（美国 Azure biosystems 公司）；组织研磨低温均质仪（北京 TIANGEN 公司）；PCR 仪 Cobas 480（瑞士 Roche 公司）。

2 方法

2.1 分组、模型制备与给药

将 32 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组（n = 8），对照组（Con）（0.9%NaCl，1 mL • kg^{-1}，隔日灌胃）；辛伐他汀组（Sim）（3 mg • kg^{-1}，隔日灌胃）；阿霉素组（Dox）（2.5 mg•kg^{-1}，每周尾静脉注射）；联合用药组（Dox + Sim）（Sim 3 mg • kg^{-1} + Dox 2.5 mg • kg^{-1}，辛伐他汀提前连续 7 d 给药干预）。阿霉素给药 8 周后，在异氟烷麻醉下对所有大鼠进行超声心动图和内眦静脉采血，之后实施安乐死，迅速切除心脏，并修剪血管残端等多余组织，用预冷的 0.9% 氯化钠溶液冲洗后用滤纸吸干水分。最后 1/3 心脏组织固定在 4% 多聚甲醛溶液中 48 h 进行脱水、蜡块包埋后放－ 20 ℃冰箱用于病理学检查，2/3 心脏放于液氮速冻用于 Western blot 和 qRT-PCR 实验。本动物模型构建由课题组前期摸索成熟，并通过影像学、组织学、循环生化标志物等来评估大鼠成模情况[10]。

2.2 超声影像系统测量大鼠的心功能

最后一次给药后 12 h 内，使用彩色超声诊断系统对大鼠心脏进行超声检测。提前使用剃毛器于大鼠上腹部进行脱毛处理，以异氟烷浓度 3%、氧流量 1 L • min^{-1} 于密闭麻醉诱导盒进行诱导麻醉，待大鼠失去意识不再活动后稳定 1 min 取出，仰卧位固定于解剖板上，以异氟烷浓度 2%、氧流量 1 L • min^{-1} 维持麻醉，之后由不知情的专业人员通过彩色超声诊断系统（EPIQ-7C）对大鼠心脏进行心功能的检测。涂抹适量超声耦合剂，使用 s8-3 探头于胸骨旁左心室长轴切面进行检测，以不少于 3 个心动周期采集 M 型超声心动图，测量各组大鼠左心室射血分数（EF）、左心室短轴缩短率（FS）、心率等，控制大鼠平均心率 400 次 • min^{-1} 左右。

2.3 ELISA 试剂盒检测大鼠血浆中 BNP 表达水平

于第 4、6、8 周对大鼠进行内眦静脉采血，转入 1 mL 肝素预处理的 EP 管内静置 0.5 h，3000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液 400 μL 分装于新的 EP 管内，放入－ 80 ℃冰箱保存。按照 ELISA 说明书检测 BNP 的表达情况。

2.4 HE 染色观察大鼠心脏组织心肌纤维改变

对各组大鼠心脏蜡块进行切片，每片厚度为 5 μm，60 ℃烤片 2 h、脱蜡、脱二甲苯后进行 HE 染色，最后透明封片，显微镜下观察心肌纤维病理改变。

2.5 Masson 染色观察大鼠心脏组织中胶原增生情况

对各组大鼠心脏蜡块进行切片，每片厚度为 4 μm，烤片。之后切片常规脱蜡至水，用配制好的 Weigert 铁苏木素染色液染色 8 min，分化、返蓝，丽春红酸性品红染色后磷钼酸溶液洗 1 ～ 2

min，苯胺蓝染色 1 min 后脱水透明，中性树胶封固，显微镜下观察心脏胶原增生情况。

2.6 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测大鼠心脏组织中基因的表达

取黄豆粒大小的组织放入匀浆管中，加入 700 μL TRIzol 试剂从大鼠心脏组织中提取总 RNA，取 5 μL 上机测量浓度之后使用逆转录试剂盒反转录为 cDNA。最后使用试剂盒对 cDNA 进行定量扩增和 qRT-PCR。用于扩增的正向和反向引物序列见表 1。结果相对于 *GAPDH* 基因的表达，通过 Delta-Delta Ct 方法呈现。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab 1 Real-time fluorescent quantitative PCR primer sequence

基因	正向	反向
TGF-β	5'-GCTTCAGTGCT-CACTGCTCT-3'	5'-ATGTCATGGATGGT-GCCCAG-3'
Smad2	5'-CTTCCAGGCTC-TTTGTGCCA-3'	5'-ACCTGTGCACGTTT-GAGACA-3'
GAPDH	5'-GGCTCATGACCA-CAGTCCAT-3'	5'-ACATTGGGGGTAG-GAACACG-3'

2.7 Western blot 法检测大鼠心脏组织中蛋白的表达

取心肌组织用剪刀剪碎，经含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液匀浆后裂解，冰上静置 30 min，4 ℃、12 000 r • min $^{-1}$ 离心 30 min 后取上清液，BCA 法进行蛋白定量。上样缓冲液与适量蛋白匀浆混匀后，置于 95 ℃金属浴中加热 10 min，冰上渐冷，放于－20 ℃保存。总共使用 30 μg 的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转膜，1×TBST 洗膜 5 min×6 次，5% 脱脂奶粉 37 ℃下放置 1 h。1×TBST 洗膜 5 min，加入稀释的相应一抗：Collagen Ⅰ（1∶600）、MMP2（1∶5000）、TIMP1（1∶1000）、TGF-*β*（1∶5000）、Smad2/3（1∶5000）、GAPDH（1∶5000），过夜，1×TBST 洗膜 5 min×6 次。加入二抗（1∶10 000）室温摇床 1 h，1×TBST 洗膜 5 min×6 次，结束后 DAB 显色，用 Image J 软件分析条带灰度值，并以目标条带与内参条带灰度的比值反映目标蛋白的表达情况。

2.8 统计学方法

使用 GraphPad Prism 软件（GraphPad Software Inc，CA，USA）进行统计分析和作图。先进行正态性检验和方差齐性检验，满足条件的使用单因素方差分析进行多组间比较，使用 *t* 检验进行两两比较，数据表示为 $\bar{x}\pm s$，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 辛伐他汀对阿霉素大鼠一般状态的影响

3.1.1 对阿霉素大鼠一般表现的影响 Con 组和 Sim 组大鼠毛色光泽，毛发茂密，精神状态良好，行动敏捷，饮食良好，可随意触碰，无烂尾、腹泻、腹水等情况；Dox 组大鼠毛色粗糙、无光泽，毛发稀疏，精神不稳定、萎靡，行动迟缓，拒食，拒绝触碰，烂尾、腹泻、腹水情况严重；Dox ＋ Sim 组大鼠较 Dox 组毛色暗淡，精神稍好，行动中等，饮食一般，可触碰，烂尾、腹泻、腹水情况稍好（见图 1）。

图 1 辛伐他汀对阿霉素大鼠一般状态的影响

Fig 1 Effect of simvastatin on general state of doxorubicin rats

3.1.2 对阿霉素大鼠每周体重的影响 Con 组和 Sim 组大鼠体重稳定增加；Dox 组大鼠的体重前 3 周稳定增长之后逐渐降低，与 Con 组相比，体重明显降低（$P<0.05$）；Dox ＋ Sim 组大鼠体重缓慢增长直到第 7 周和第 8 周，与 Dox 组相比，体重明显增加（$P<0.05$）（见图 2）。

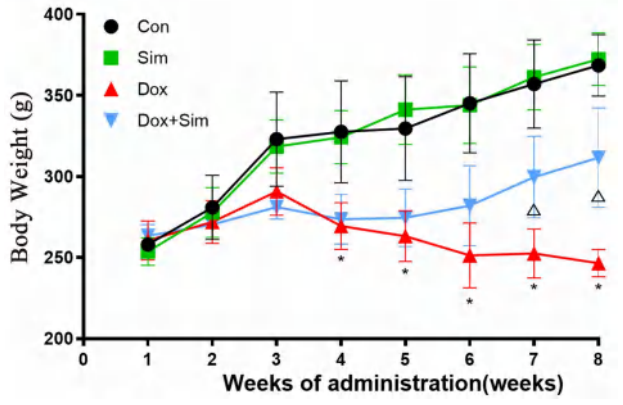


图 2 辛伐他汀对阿霉素大鼠体重的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Fig 2 Effect of simvastatin on the body weight of doxorubicin rats（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

注（Note）：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与 Dox 组比较，$^{\triangle}P<0.05$（*vs* Con group，$^{*}P<0.05$；*vs* Dox group，$^{\triangle}P<0.05$）。

3.2 辛伐他汀对阿霉素大鼠的病理生理改变的影响

3.2.1 对阿霉素大鼠血浆中 BNP 水平的影响 与 Con 组和 Sim 组相比，Dox 组大鼠血浆 BNP 表达增加；与 Dox 组相比，Dox ＋ Sim 组大鼠血浆 BNP 表达减少，但第 4 周和第 6 周结果差异均无统计学意义（$P>0.05$）；第 8 周结果差异有统计

学意义（$P < 0.05$）（见图 3）。

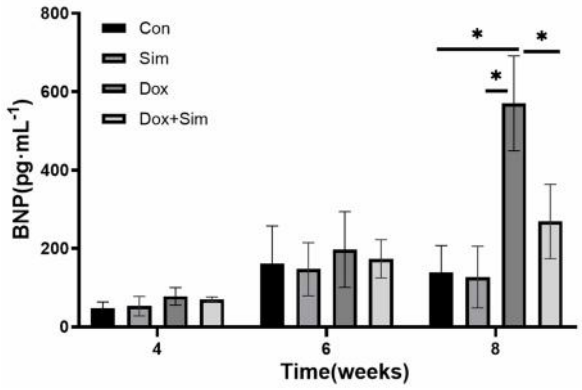


图 3 辛伐他汀对阿霉素大鼠血浆中 BNP 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 5$，$^{*}P < 0.05$）

Fig 3 Effect of simvastatin on the plasma BNP level in doxorubicin rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 5$，$^{*}P < 0.05$）

3.2.2 对阿霉素大鼠心功能的影响 与 Con 组和 Sim 组相比，Dox 组大鼠的心功能指标 EF 和 FS 明显降低（$P < 0.05$）；与 Dox 组相比，Dox ＋ Sim 组大鼠 EF 和 FS 明显增加（$P < 0.05$）（见图 4）。

3.2.3 对阿霉素大鼠心脏组织中心肌纤维的影响 Con 组和 Sim 组大鼠心肌细胞完好，心肌纤维排列整齐，无水肿等。Dox 组大鼠的心脏组织中心肌细胞排列疏松，心肌纤维结构扭曲，断裂溶解等。与 Dox 组相比，Dox ＋ Sim 组明显减少心肌细胞异常形态（见图 5）。

3.2.4 对阿霉素大鼠心脏组织中胶原纤维的影响 与 Con 组和 Sim 组相比，Dox 组大鼠心脏组织中胶原明显增生；与 Dox 组相比，Dox ＋ Sim 组大鼠心脏组织中胶原增生明显减少（见图 6）。

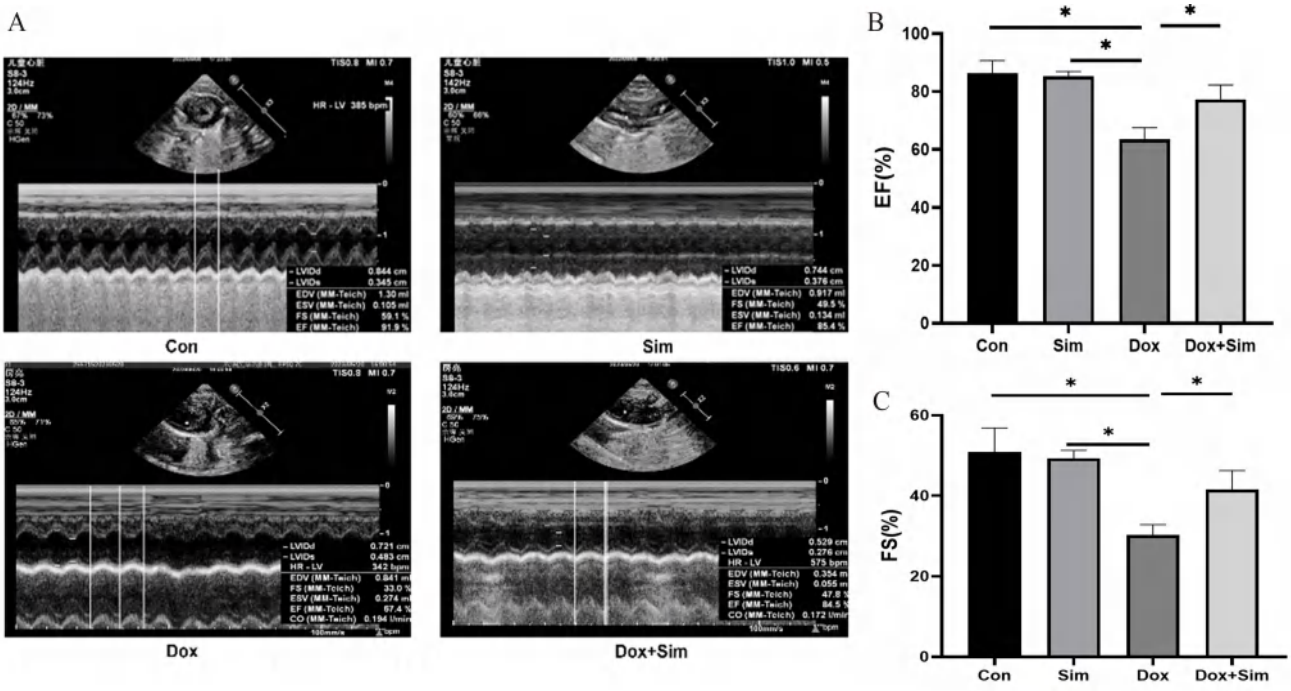


图 4 辛伐他汀对阿霉素大鼠心功能的影响（EF、FS）（$\bar{x}\pm s$，$n = 5$，$^{*}P < 0.05$）

Fig 4 Effect of simvastatin on cardiac function of doxorubicin rats（EF and FS）（$\bar{x}\pm s$，$n = 5$，$^{*}P < 0.05$）

以上结果表明，辛伐他汀可以减少阿霉素导致的心脏病理生理改变。

3.3 辛伐他汀对阿霉素大鼠心脏组织中纤维化相关因子 Collagen Ⅰ、MMP2、MMP9 和 TIMP1 蛋白表达的影响

如图 7 所示，与 Con 组和 Sim 组相比，Dox 组大鼠中 MMP2、MMP9 和 Collagen Ⅰ蛋白表达明显增加（$P < 0.05$），TIMP1 蛋白表达明显减少（$P < 0.05$）；与 Dox 组相比，Dox ＋ Sim 组大鼠 MMP2、MMP9 和 Collagen Ⅰ蛋白表达明显减少（$P < 0.05$），TIMP1 蛋白表达明显增加（$P < 0.05$）。以上结果提示，辛伐他汀可以改善 Dox 大鼠心肌纤维化的情况。

3.4 辛伐他汀对阿霉素大鼠心脏组织中 TGF-β/Smad 信号通路的影响

如图 8 所示，与 Con 组和 Sim 组相比，Dox 组 TGF-β 和 Smad2/3 表达明显增加（$P < 0.05$）；与 Dox 组相比，Dox ＋ Sim 组中 TGF-β 和 Smad2/3 表达明显减少（$P < 0.05$）。提示辛伐他汀抑制与 Dox 相关的 TGF-β/Smad 信号通路相关因子的表达。

4 讨论

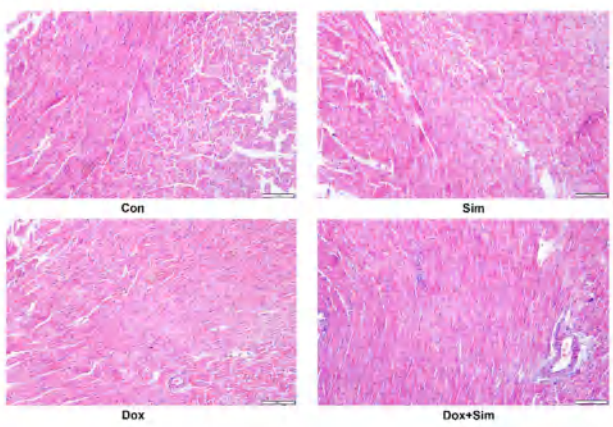


图 5　辛伐他汀对阿霉素大鼠心脏组织中心肌纤维的影响（HE 染色，×200）

Fig 5　Effect of simvastatin on the myocardial fibers in heart tissue of doxorubicin rats（HE staining，×200）

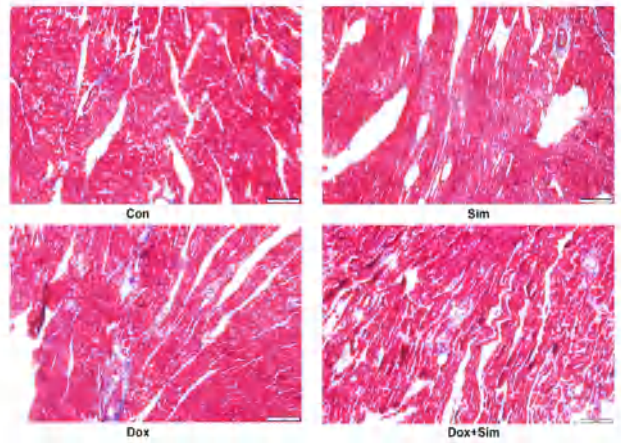


图 6　辛伐他汀对阿霉素大鼠心脏组织中胶原纤维的影响（Masson 染色，×200）

Fig 6　Effect of simvastatin on collagen fibers in heart tissue of doxorubicin rats（Masson staining，×200）

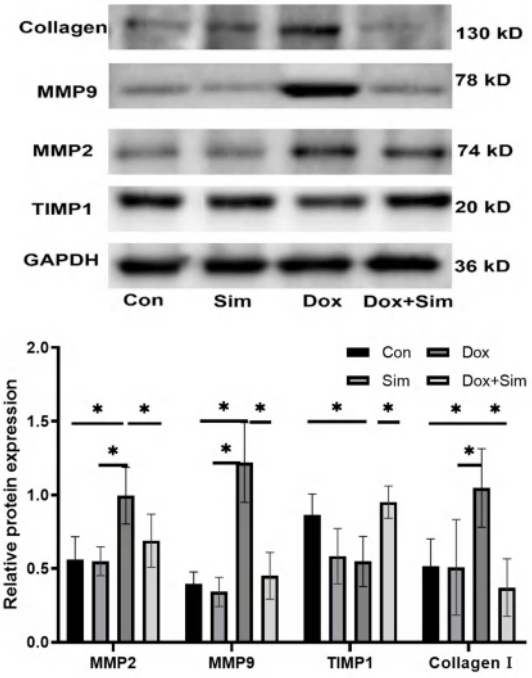


图 7　辛伐他汀对阿霉素大鼠心脏组织纤维化相关蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，$^{*}P<0.05$）

Fig 7　Effect of simvastatin on the expression of fibrosis-related proteins in heart tissue of doxorubicin rats（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，$^{*}P<0.05$）

心脏毒性是阿霉素最常见的毒副作用，主要表现为各种类型的心律失常、心肌炎、充血性心力衰竭甚至死亡，严重影响癌症化疗患者的生存质量[1]。因此开展其保护药物和发生机制的研究具有重要价值。研究显示，阿霉素可通过纳米颗粒药物递送或开发脂质体阿霉素更直接安全地靶向肿瘤，但临床上尚未实现阿霉素疗效和毒性之间的最佳平衡[11-12]；右丙亚胺是美国食品药品管理局（FDA）唯一批准用于阿霉素相关心脏毒性的保护药，可减少蒽环类药物 - 铁复合物的形成，从而发挥抗氧化、清除自由基的作用，但是存在骨髓抑制和致畸等毒副作用[13]。而 ACEI/ARB[14]、β 受体阻滞剂[15]、他汀类药物[16]及中药（白藜芦醇[17]），虽然不是专门针对阿霉素相关心脏毒性开发的保护药，但在临床前模型和临床研究中都显示出一定的疗效。本研究采用临床相似给药方式进行建模（尾静脉注射阿霉素），之后观察到大鼠一般状态差，体重前期增长缓慢后期减轻，8 周末测量心功能差，血浆检测 BNP 的表达增加，心肌纤维紊乱和胶原增生，证明阿霉素相关心脏毒性

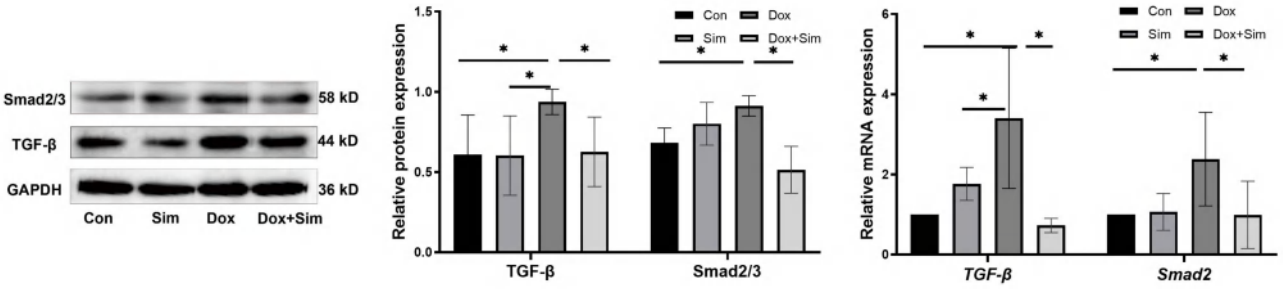


图 8　辛伐他汀对阿霉素大鼠心脏组织 TGF-β/Smad 信号通路相关蛋白和基因表达水平（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，$^{*}P<0.05$）

Fig 8　Effect of simvastatin on the expression of TGF-β/Smad signal pathway related proteins and genes in heart tissue of doxorubicin rats（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，$^{*}P<0.05$）

大鼠模型构建成功。

心肌纤维化是阿霉素相关心脏毒性的重要病理基础，以成纤维细胞增殖和胶原沉积为特征[18]。成纤维细胞被阿霉素激活后发生转化并分泌多种因子，包括转化生长因子-β（TGF-β）、基质金属蛋白酶（MMPs）和组织金属蛋白酶抑制剂（TIMPs）等[5]。其中，TGF-β1 是一种强促纤维化因子，被阿霉素激活后与细胞膜表面的 TGF-β受体 2（TGF-βR2）相结合形成异源二聚体复合物，再招募 TGFβR1，导致 Smad2/3 表达增加同时磷酸化，激活的 Smad2/3 复合物转移到细胞核内，启动与纤维化相关的转录因子的表达直接诱导胶原生成[19-20]。研究表明，阿霉素可以增强 TGF-β/Smad 信号通路[21]，抑制后可以减弱纤维化过程，最终减轻阿霉素相关心脏毒性[4]。此外，TGF-β1 被阿霉素激活后诱导心脏成纤维细胞转化并分泌过多 MMPs（尤其是 MMP2 和 MMP9，主要用于降解胶原蛋白），而 MMPs 受 TIMPs 的严格管控，MMPs/TIMPs 失衡则导致胶原蛋白降解异常，间接导致纤维化的发生发展[6，22-24]。本研究结果显示，阿霉素大鼠心脏组织中 TGF-β、Smad2/3、MMP2、MMP9 和 Collagen Ⅰ因子表达显著增加，TIMP1 因子表达显著减少，表明 TGF-β/Smad/MMPs 信号通路参与阿霉素相关心脏毒性的过程。

辛伐他汀是一种强效且安全的降脂药，具有抗纤维化、抗肿瘤和抗炎等多效性[8，25]。据报道，辛伐他汀具有潜在的心脏保护作用[26]，能够抑制多种纤维化，包括肝纤维化、皮下纤维化和心脏纤维化[27-29]。此外，一项研究发现辛伐他汀可以通过抑制 TGF-β/Smad 信号传导减轻心肌纤维化，改善心功能[9]。故本研究将辛伐他汀与阿霉素联合，以心肌纤维化为切入点，探究辛伐他汀对阿霉素相关心脏毒性的影响及潜在机制。本研究结果表明两药联合大鼠的一般状态好，每周体重缓慢增长，8 周末心功能明显改善，血浆 BNP 表达明显减少，心肌纤维紊乱情况明显减少，胶原增生情况明显减少，TGF-β、Smad2/3、MMP2、MMP9 和 Collagen Ⅰ因子表达显著减少，TIMP1 因子表达显著增加，在一定程度上体现了辛伐他汀对阿霉素相关心脏毒性大鼠的保护作用。另外，本研究采用辛伐他汀 3 mg·kg^{-1} 进行给药，假设人的体重为 60 kg，根据单位体重的剂量计算，大鼠的等效剂量相当于人的 6.3 倍，根据换算公式得成人临床剂量＝3 mg·kg^{-1}/6.3×60 kg ＝ 28.6 mg。此外，辛伐他汀的说明书中推荐冠心病患者推荐剂量 20 mg 为起始剂量。因此，本研究中的辛伐他汀减轻阿霉素相关心脏毒性时的人类剂量符合临床用药规范，具有一定的临床指导价值。

综上所述，本研究阐明辛伐他汀可明显减轻阿霉素相关心脏毒性，其机制可能与抑制 TGF-β/Smad/MMPs 信号通路、减少心肌纤维化相关。然而，本研究未能采用多个剂量的辛伐他汀体现量效关系，未能设计阻断该通路来进一步验证是通过本通路起的作用，且使用辛伐他汀之后是否还有其他不良反应仍有待解决，本课题组后续将进行更深入全面的探索。

参考文献

[1] Dempke WCM，Zielinski R，Winkler C，et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity-are we about to clear this hurdle? [J]. Eur J Cancer，2023，185：94-104.

[2] Fecht D，Chadeau-Hyam M，Owen R，et al. Exposure to elevated nitrogen dioxide concentrations and cardiac remodeling in patients with dilated cardiomyopathy [J]. J Card Fail，2022，28（6）：924-934.

[3] Saadat S，Noureddini M，Mahjoubin-Tehran M，et al. Pivotal role of TGF-β/smad signaling in cardiac fibrosis：non-coding RNAs as effectual players [J]. Front Cardiovasc Med，2021，7：588347.

[4] Tsai TH，Lin CJ，Hang CL，et al. Calcitriol attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction and inhibits endothelial-to-mesenchymal transition in mice [J]. Cells，2019，8（8）：865.

[5] Dong XL，Yuan BH，Yu SZ，et al. Adriamycin induces cardiac fibrosis in mice via PRMT5-mediated cardiac fibroblast activation [J]. Acta Pharmacol Sin，2023，44（3）：573-583.

[6] Fan D，Kassiri Z. Modulation of cardiac fibrosis in and beyond cells [J]. Front Mol Biosci，2021，8：750626.

[7] Balasubramanian R，Maideen NMP. HMG-CoA reductase inhibitors（statins）and their drug interactions involving CYP enzymes，P-glycoprotein and OATP transporters-an overview [J]. Curr Drug Metab，2021，22（5）：328-341.

[8] Tursunova NV，Klinnikova MG，Babenko OA，et al. Molecular mechanisms of the cardiotoxic action of anthracycline antibiotics and statin-induced cytoprotective reactions of cardiomyocytes [J]. Biomed Khim，2020，66（5）：357-371.

[9] Marunouchi T，Matsumura K，Fuji E，et al. Simvastatin attenuates cardiac fibrosis under pathophysiological conditions of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by inhibiting TGF-β signaling [J]. Pharmacology，2024，109（1）：43-51.

[10] 王碗 . 辛伐他汀对蒽环类药物性心脏毒性的保护意义及相关机制研究 [D]. 承德：承德医学院，2022.

[11] Alam KS，Jawaid AM. Structural modification and strate-

gies for the enhanced doxorubicin drug delivery [J]. Bioorg Chem，2022，120：105599.
[12] Aloss K，Hamar P. Recent preclinical and clinical progress in liposomal doxorubicin [J]. Pharmaceutics，2023，15（3）：893.
[13] Benjamin RS，Minotti G. Doxorubicin-dexrazoxane from day 1 for soft-tissue sarcomas：the road to cardioprotection [J]. Clin Cancer Res，2021，27（14）：3809-3811.
[14] Lin H，Liang GX，Wu YX，et al. Protective effects of ACEI/ARB on left ventricular function in anthracycline-induced chronic cardiotoxicity：a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Cardiology，2021，146（4）：469-480.
[15] Kheiri B，Abdalla A，Osman M，et al. Meta-analysis of carvedilol for the prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. Am J Cardiol，2018，122（11）：1959-1964.
[16] Yulian ED，Siregar NC，Bajuadji. Combination of simvastatin and FAC improves response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer [J]. Cancer Res Treat，2021，53（4）：1072-1083.
[17] Hu LF，Lan HR，Li XM，et al. A systematic review of the potential chemoprotective effects of resveratrol on doxorubicin-induced cardiotoxicity：focus on the antioxidant，antiapoptotic，and anti-inflammatory activities [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：2951697.
[18] Yao H，He QM，Huang C，et al. Panaxatriol saponin ameliorates myocardial infarction-induced cardiac fibrosis by targeting Keap1/Nrf2 to regulate oxidative stress and inhibit cardiac-fibroblast activation and proliferation [J]. Free Radic Biol Med，2022，190：264-275.
[19] Chen L，Yan KP，Liu XC，et al. Valsartan regulates TGF-β/Smads and TGF-β/p38 pathways through lncRNA CHRF to improve doxorubicin-induced heart failure [J]. Arch Pharm Res，2018，41（1）：101-109.
[20] Li CJ，Meng XX，Wang LN，et al. Mechanism of action of non-coding RNAs and traditional Chinese medicine in myocardial fibrosis：focus on the TGF-β/Smad signaling pathway [J]. Front Pharmacol，2023，14：1092148.
[21] Cobb MS，Tao S，Shortt K，et al. Smad3 promotes adverse cardiovascular remodeling and dysfunction in doxorubicin-treated hearts [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2022，323（6）：H1091-H1107.
[22] Lohanathan BP，Rathinasamy B，Huang CY，et al. Neferine attenuates doxorubicin-induced fibrosis and hypertrophy in H9c2 cells [J]. J Biochem Mol Toxicol，2022，36（7）：e23054.
[23] Sandeep B，Ding WH，Huang X，et al. Mechanism and prevention of atrial remodeling and their related genes in cardiovascular disorders [J]. Curr Probl Cardiol，2023，48（1）：101414.
[24] Kremastiotis G，Handa I，Jackson C，et al. Disparate effects of MMP and TIMP modulation on coronary atherosclerosis and associated myocardial fibrosis [J]. Sci Rep，2021，11（1）：23081.
[25] Ahmadi M，Amiri S，Pecic S，et al. Pleiotropic effects of statins：a focus on cancer [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2020，1866（12）：165968.
[26] Pecoraro M，Marzocco S，Belvedere R，et al. Simvastatin reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity：effects beyond its antioxidant activity [J]. Int J Mol Sci，2023，24（8）：7573.
[27] Kang SH，Yim HJ，Hwang JW，et al. Improved anti-fibrotic effects by combined treatments of simvastatin and NS-398 in experimental liver fibrosis models [J]. Korean J Intern Med，2022，37（4）：745-756.
[28] Chang CH，Lin CP，Chen YK，et al. Simvastatin attenuates areca nut extract-induced subdermal fibrosis in mice by targeting TGF-β signaling pathways [J]. Curr Issues Mol Biol，2023，45（11）：8622-8632.
[29] Li HD，Wang YF，Liu JW，et al. Endothelial Klf2-Foxp1-TGFβ signal mediates the inhibitory effects of simvastatin on maladaptive cardiac remodeling [J]. Theranostics，2021，11（4）：1609-1625.

（收稿日期：2024-03-28；修回日期：2024-05-28）

槲皮素固体分散体的制备及其用于治疗 2 型糖尿病的研究

陈敏，窦志华*（南通大学附属南通第三医院药学部，南通市第三人民医院药学部，江苏 南通 226006）

摘要：目的 制备槲皮素固体分散体并考察其稳定性，观察其降糖效果并阐述其抗 2 型糖尿病的机制。**方法** 采用溶剂挥发法制备槲皮素固体分散体，应用粉末衍射、傅里叶 - 红外色谱对其进行固体表征，并进一步研究其体外溶出及稳定性；使用糖尿病小鼠模型来考察其降糖效果；并通过小鼠的生化指标变化及肝脏组织切片研究其降糖机制。**结果** 在槲皮素固体分散体中，FT-IR 及 PXRD 结果表明槲皮素以无定形的形式存在；体外溶出实验显示槲皮素制备成固体分散体后溶出明显高于原料药；稳定性数据显示固体分散体室温下放置 6 个月未发生转晶，表明其稳定性良好；药效学实验表明，槲皮素固体分散体可以显著降低 2 型糖尿病小鼠的空腹血糖，调节血液中的血脂指标，例如降低总胆固醇、三酰甘油以及提高高密度脂蛋白水平等，也可以有效逆转由糖尿病所导致的肝损伤。**结论** 制备的槲皮素固体分散体具有良好的稳定性和降糖效果，并可能通过调节氧化应激反应来发挥降糖作用。

关键词：槲皮素；固体分散体；2 型糖尿病；氧化应激
中图分类号：R944，R965 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2926-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.015

Preparation of quercetin solid dispersion and its application in type 2 diabetes mellitus

CHEN Min, DOU Zhi-hua* (*Department of Pharmacy*, *Nantong Third People's Hospital*, *Affiliated Third Nantong Hospital of Nantong University*, *Nantong Jiangsu* 226006)

Abstract: Objective To prepare stable quercetin solid dispersion (QUE-SOL) to improve therapeutic effect of quercetin and explain its antidiabetic mechanism. **Methods** QUE-SOL was prepared by solvent evaporation and characterized by powder diffraction and Fourier transform infrared chromatography. Subsequently, the in vitro dissolution and stability were measured. The antidiabetic effect of QUE-SOL was determined in diabetic mice. The antidiabetic mechanism in mice was elucidated by analyzing the changes of biochemical indexes and the liver tissue slices. **Results** In the solid dispersion, quercetin was in an amorphous form, and its dissolution in vitro was significantly improved than that of the crude drug. The drug was stable up to 6 months in room temperature. In vivo experiment showed that QUE-SOL significantly reduced the fasting blood glucose, regulated total cholesterol and triglyceride, increased high-density lipoprotein in type 2 diabetes mellitus mice, and reversed the liver injury induced by diabetes. **Conclusion** QUE-SOL has fair stability and antidiabetic effect, which may be attributed to alleviating oxidative stress in type 2 diabetes mellitus mice.

Key words: quercetin; solid dispersion; type 2 diabetes mellitus; oxidative stress

人口老龄化已成为一种全球趋势，伴随着的是老年疾病发病率增加，其中糖尿病的发病率也表现出显著增加的趋势。糖尿病的发病主要是由于人体内胰岛素分泌缺陷导致，其主要特征表现为糖代谢紊乱伴随着高血糖，是一种内分泌疾病，通常可以分为 1 型糖尿病（type 1 diabetes mellitus，T1DM）和 2 型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM），其中以 T2DM 居多[1]。严重的 T2DM 会伴发一系列的并发症，例如脂肪肝、糖尿病肾病、糖尿病足以及高血压等，极大地威胁了人类的生

基金项目：南通市卫健委科研项目（No.MSZ2022034）。
作者简介：陈敏，女，副主任药师，主要从事临床药学、药事管理及中药质量评价研究，email：creamin0916@163.com *通信作者：窦志华，男，主任中药师，副教授，主要从事中药药效物质及质量评价研究，email：zhihuadou@163.com

命健康[2]。现阶段临床上治疗 T2DM 的药物包括双胍类药物、α- 葡萄糖苷酶抑制剂以及各种长效、速效胰岛素等。近年来，许多中药活性成分也被证实在治疗 T2DM 方面具有良好的效果，包括人参皂苷、枸杞多糖、葛根素以及小檗碱等[3-5]。

槲皮素（quercetin，QUE）为黄酮类化合物，具有抗氧化、清除自由基、抗炎以及降血糖的作用。但 QUE 在临床上应用较少，因为 QUE 在水中溶解度较差，限制了其在体内的吸收，导致生物利用度也较低，难以发挥其效用[6]。因此，开发一种提高 QUE 溶解度的制剂对其临床使用具有重要价值。固体分散体（solid dispersion，SD）是将药物分散在适宜的载体材料中所形成的一种固态物质，即药物与载体以特定的制备方式混合均匀并能以固体形式存在，此时药物通常以无定形分散于载体当中，该方法可以降低药物的晶格能，使药物溶解所需的能量降低，提高药物溶解度，从而增加药物的生物利用度[7]。SD 具有制备简单、稳定性好等优点，已展现出良好的市场潜力和前景。

聚乙烯己内酰胺 - 聚醋酸乙烯酯 - 聚乙二醇接枝共聚物（soluplus，SOL）是一种非离子型表面活性剂，可以制备成固体分散体、纳米粒、胶束以及自乳化等递药系统，在制剂研发中具有重要价值。此外，大量研究表明，在药物制备过程中加入 SOL，可以显著提高药物的溶解度，加入 SOL 所制备的 SD 也具有良好的稳定性。因此本研究拟使用 SOL 为载体制备 QUE-SOL 固体分散体（后文简称 QUE-SOL），并以二甲双胍（metformin，MEL）为阳性对照，对比 QUE-SOL 固体分散体与 MEL 在糖尿病小鼠中的降糖效果，考察小鼠的生化指标变化及组织切片情况，以期提高 QUE 的体外溶解度和体内治疗效果。

1 材料

1.1 试药

QUE（纯度＞ 98%，天津万象恒远科技有限公司）；MEL（纯度＞ 99%，大连美仑生物科技有限公司）；Soluplus（巴斯夫有限责任公司）；DMEM 培养基（南京凯基生物科技发展有限公司）；甲醇（分析纯，上海阿拉丁试剂有限公司）；链脲菌素（纯度＞ 98%，南京都莱生物技术有限公司）；苏木精伊红染色液（西安齐岳生物科技有限公司）；高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）检测试剂盒（货号：A112-1-1）、三酰甘油（TG）检测试剂盒（货号：A110-1-1）、总胆固醇（TC）检测试剂盒（货号：A111-1-1）、谷丙转氨酶（ALT）检测试剂盒（货号：C009-2-1）、谷草转氨酶（AST）检测试剂盒（货号：C010-2-1）、超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（货号：A001-3）、微量还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（货号：A006-2-1）、丙二醛（MDA）检测试剂盒（货号：A003-1-2）（南京建成生物工程研究所）。

1.2 仪器

D8 Advance X 射线衍射仪（德国布鲁克分析仪器公司）；Nicolet 6700 傅里叶红外光谱仪（美国赛默飞世尔科技公司）；UV-1800 紫外可见分光光度计（日本岛津）；数显气浴恒温振荡仪（常州市金坛高科仪器厂）；QL-861 型涡旋振荡仪（合肥艾本森科学仪器有限公司）；DHG-9246A 电热恒温鼓风干燥箱（甘易仪器设备上海有限公司）；BXS-250I 可扩展试验箱（上海博迅医疗生物仪器股份有限公司）。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠，6 ～ 8 周龄，体重 18 ～ 20 g [扬州大学比较医学中心，生产证许可号：SCXK（苏）2022-0009]。

2 方法

2.1 QUE-SOL 的制备

分别精密称取 100 mg QUE 和 300 mg SOL，加入适量甲醇，充分溶解后，在 50 ℃减压除去溶剂，随后将容器连带样品放入真空干燥器中过夜，待完全干燥后，将样品用刮刀取出，将所得产物研细过 100 目筛，即得到目标产物 QUE-SOL，密封储存于 4 ℃备用[8]。

2.2 物理混合物的制备

分别精密称取 100 mg QUE 和 300 mg SOL，将其置于研钵中研细，混匀并过 100 目筛，即得到物理混合物 QUE ＋ SOL，密封储存于 4 ℃备用。

2.3 固态表征

2.3.1 粉末 X 射线衍射法（PXRD） 分别取适量 QUE、SOL、QUE ＋ SOL 与 QUE-SOL，利用 D8 Advance X 射线衍射仪 Cu-Kα 靶测定，设置管流为 40 mA，2θ 范围为 5° ～ 30°，观察药物衍射峰及其强度的变化[9]。

2.3.2 傅里叶变换红外光谱（FT-IR） 分别取适量 QUE、SOL、QUE ＋ SOL、QUE-SOL 与 KBr 压片，设置扫描参数为 4000 ～ 400 cm^{-1}，数据经 Nicolet Omnic 红外光谱软件进行处理[10]。

2.4 饱和溶解度测定

精密称取 QUE 原料药、QUE ＋ SOL 以及 QUE-SOL 各 50 mg（按 QUE 计算），加 10 mL 水或者 PBS 后超声 15 min 后得到过饱和溶液，将过饱和溶液置于恒温振荡仪中，37 ℃下以 80 $r \cdot min^{-1}$ 振荡 24 h，取样后使用微孔滤膜进行过滤，并用紫外分光光度计（UV）进行分析，计算各组别中 QUE 的饱和溶解度[11]。

2.5 体外溶出试验

精密称取原料药 QUE 和 QUE-SOL（QUE 质量为 10 mg），按溶出度测定方法（2020 年版《中国药典》通则 0931 第三法进行），溶出介质为 250 mL 含 0.5%SDS 的水溶液。转速为 50 r • min^{-1}，温度为 37 ℃。分别于 15、30、45、60 和 120 min 进行取样，并同时补加同温度等量的溶出介质，随后将取出的样品过 0.45 μm 的微孔滤膜，将取出的样品用 UV 分析，计算其浓度，并绘制溶出曲线 [12]。

2.6 QUE-SD 治疗 T2DM 的药效学评价

药效学实验使用的 C57BL/6 雄性小鼠均购自扬州大学动物中心。将小鼠进行为期 4 周的高脂饲料进食，并按照 100 mg • kg^{-1} 的剂量腹腔注射链脲菌素，造模结束后检测各组小鼠血糖，当小鼠空腹血糖值高于 8 mmol • L^{-1} 即证明造模成功 [13]。将造模成功的小鼠随机分成 4 组，每组 6 只，分别为分别为模型组（Model）、QUE 组、QUE ＋ SOL 组、QUE-SOL 组和 MEL 组。其中 QUE 组和 QUE-SOL 组按照 30 mg • kg^{-1} 的剂量口服灌胃给药 [14-15]，MEL 组按照质量浓度为 200 mg • kg^{-1} 的剂量口服灌胃给药 [16]，模型组给予等体积溶媒。选取同期未造模的小鼠为对照组（Control）。每周使用血糖测定仪测定小鼠血糖。实验结束后处死各组小鼠，收集各组小鼠血浆，处理后测定各组小鼠体内的胰岛素浓度、HDL、TC、TG、AST 和 ALT 值 [17]，取出各组小鼠肝脏，将其用 PBS 清洗后，取 0.1 g 肝脏组织加入适量生理盐水在低温下研磨，随后取匀浆，并将其离心后收集上清液，测定其中的 SOD、GSH 和 MDA 等生化指标 [18]。剩余肝脏置于甲醛溶液中进行苏木精 - 伊红染色 [19]。

2.7 稳定性测试

将 QUE-SOL 置于常温的干燥器内，分别于 1、2、3、4、6 个月取样；将 QUE-SOL 置于高温 60 ℃和 4500 lx 光照条件下，分别于第 10 日取样，按照 “2.3.1” 项下方法进行表征，与 0 时对比。

2.8 统计学方法

用 SPSS 26.0 统计学软件进行处理。计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 QUE-SOL 的固态表征

3.1.1 X 射线衍射 QUE、SOL、QUE ＋ SOL 以及 QUE-SOL 的 X 射线衍射图谱如图 1 所示，QUE 在 10.9°、12.6°、15.9° 以及 27.3° 等位置具有明显的衍射峰，与文献报道相类似 [20]。在 SOL 的 X 射线衍射图中并未观察到明显的衍射峰形，QUE ＋ SOL 物理混合物组中的衍射峰位置与原料槲皮素的峰位置相近，特征峰仅为 QUE 和 SOL 特征峰简单叠加，说明物理混合物组中的 QUE 仍以晶体的形式存在，而在 QUE-SOL 组中所有衍射峰均已消失，提示 QUE 以无定形的形式存在于固体分散体中。

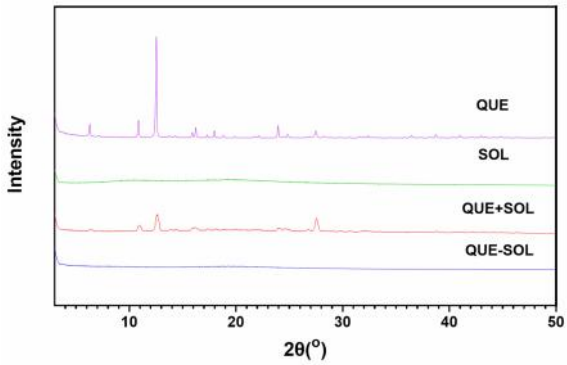


图 1 各样品粉末 X 射线衍射图

Fig 1 XRPD spectrograms of different samples

3.1.2 傅里叶 - 红外扫描光谱 QUE、SOL、QUE ＋ SOL 以及 QUE-SOL 的 FT-IR 图谱如图 2 所示，QUE 在 3405.9 cm^{-1} 处有特征峰，该峰为 QUE 中羟基的振动峰，1611.5 cm^{-1} 处为羰基振动峰，与文献报道类似 [21]。在 QUE ＋ SOL 组中，其峰形为 QUE 与 SOL 的物理叠加，说明 QUE 与 SOL 之间未发生相互作用。而在 QUE-SOL 组中，上述特征峰的位置和峰形都发生了一些变化，主要表现在羟基峰位置的移动，由 3405.9 cm^{-1} 移动至 3423.6 cm^{-1} 处，且其峰形变得更加平缓，此外，羰基的特征峰同样发生了位移并且变得平缓，提示 QUE 与 SOL 之间可能发生了氢键的相互作用，提示固体分散体制备成功 [22]。

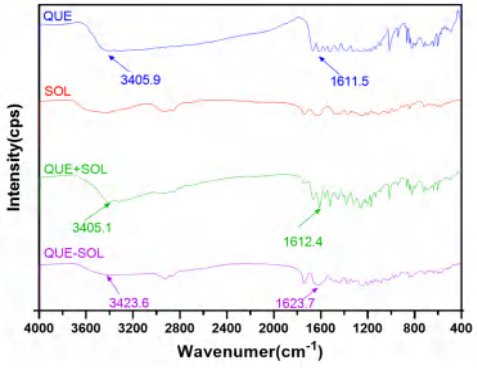


图 2 各样品粉末的傅里叶 - 红外扫描图谱

Fig 2 FT-IR spectrograms of different samples

3.2 饱和溶解度

QUE、QUE ＋ SOL 和 QUE-SOL 的饱和溶解度如表 1 所示，QUE 在水的溶解度为 12.34 μg•mL^{-1}，在 PBS 中的溶解度为 9.97 μg • mL^{-1}，表明 QUE 在水和 PBS 中的溶解度较低；而在 QUE ＋ SOL 组中，QUE 在水和 PBS 中的溶解度显著增高，其原

因可能与 SOL 的增溶效果相关。在 QUE-SOL 组中，QUE 的溶解度大幅度提高，在水中和 PBS 中的饱和溶解度分别达到 193.53 μg • mL^{-1} 和 211.25 μg • mL^{-1}，主要原因是无定形状态使药物的晶格能降低，可以显著提高难溶性药物的溶解度。

表 1　各样品在水和 PBS 中的饱和溶解度
(25 ℃，μg • mL^{-1}，n = 3)

Tab 1　Saturation solubility of different samples in water and PBS solution (25 ℃，μg • mL^{-1}，n = 3)

样品	水	PBS
QUE	12.34±1.08	9.97±0.78
QUE ＋ SOL	23.12±1.46*	16.16±1.73*
QUE-SOL	193.53±8.67**	211.25±9.53**
F	1184.937	1496.989
P	＜ 0.001	＜ 0.001

注：与 QUE 组相比，$^{*}P$ ＜ 0.05，$^{**}P$ ＜ 0.001。

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

3.3　体外溶出结果

QUE 和 QUE-SOL 的溶出情况如图 3 所示，QUE 的溶出速度较慢，180 min 后的溶出度仅有 12% 左右，与其在介质中的溶解度较低有关；而在 QUE-SOL 组中，QUE 的溶出度显著升高，30 min 后的溶出度即将近 40%，180 min 后的溶出度达到 50%，与无定形药物的溶解度较高有关。

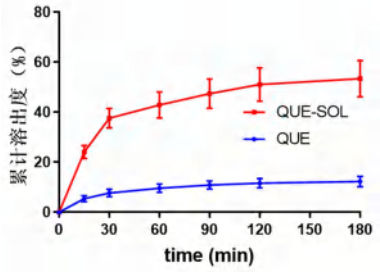


图 3　QUE 和 QUE-SOL 的体外溶出曲线（n = 3）

Fig 3　Dissolution curves of QUE and QUE-SOL（n = 3）

3.4　固体分散体稳定性考察

QUE-SOL 的稳定性考察如图 4 所示，QUE-SOL 在长达 6 个月的常温储存时间内和高温及光照 10 d 下，未发现转晶情况，表明 QUE-SOL 的稳定性良好。

3.5　体内药效评估

不同组别小鼠的血糖变化如表 2 和图 5A 所示，除对照组外，其他组别在给药前的血糖浓度约为 18 mmol • L^{-1}，表明糖尿病小鼠模型建立成功。给药初期，小鼠血糖略有下降，与模型组相比，QUE 组与 QUE ＋ SOL 组小鼠的血糖有降低趋势。而 QUE-SOL 组和 MEL 组降血糖效果较为明显。在持续给药 3 周后，不同给药组小鼠的空腹血糖变化趋势具有较为明显的区别。此外，各组小鼠在治疗期间的血

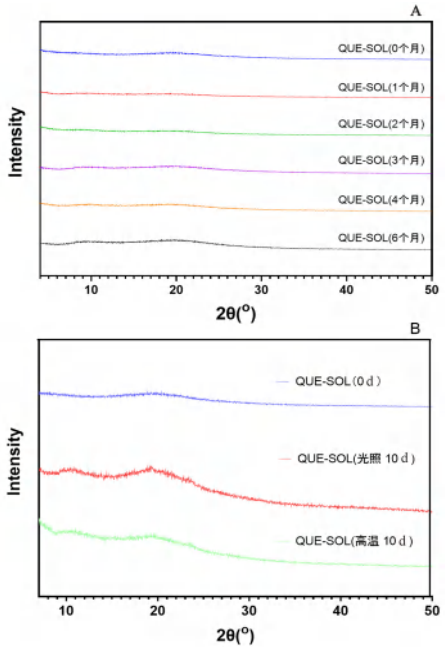


图 4　QUE-SOL 固体分散体在常温（A）和高温光照（60 ℃、4500 lx，B）储存不同时间的 X 射线图

Fig 4　PXRD spectrograms of QUE-SOL under the normal temperature（A）and the high temperature and light environment（B）

浆胰岛素浓度如图 5B 所示，与对照组相比，模型组小鼠的胰岛素浓度显著升高，其原因与机体对抗高血糖的抵抗功能相关；给药组中的胰岛素浓度均有不同程度的下降，提示给药各组在糖尿病小鼠模型中均可以缓解高血糖产生的胰岛素抵抗，其中 QUE-SOL 和 MEL 组呈现显著性变化，提示 QUE-SOL 和 MEL 具有较好的降血糖效果。治疗结束后，各组小鼠的 HDL、TC 和 TG 值如图 5C ～ 5E 所示，与对照组相比，模型组 HDL 显著降低的同时伴随着 TC 和 TG 值显著升高，与文献报道相一致[23]，其中 QUE-SOL 和 MEL 组能显著提高 HDL 并降低 TC 和 TG，显示良好的治疗效果。

3.6　给药组别改善糖尿病小鼠氧化应激的机制研究

在治疗结束后的各组小鼠肝脏 HE 切片如图 6 所示。对照组小鼠的肝脏细胞状态较为正常。模型组小鼠的肝脏呈现较为明显的脂肪粒，伴有炎细胞的浸润以及肝实质细胞核不明显，出现较为严重的组织损伤。给药组中的肝脏状态有所恢复，主要表现为脂肪粒和炎性细胞浸润的减少，QUE 组和 QUE ＋ SOL 组中仍能观察到少数的脂肪粒以及炎细胞浸润，而 QUE-SOL 组与 MEL 组在视野下偶见脂肪粒，说明 QUE-SOL 可以有效地逆转糖尿病小鼠并发的肝损伤。

给药结束后，对各组肝脏 ALT 和 AST 进行检测，结果如表 3 所示。与对照组相比，模型组的 ALT 和 AST 指标显著升高，表明糖尿病小鼠在造模过程中，血糖异常的情况下肝脏也受到损

表 2 各组小鼠在治疗期间的血糖变化情况（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab 2 Blood glucose changes of mice in different groups（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	血糖 /（mmol·L^{-1}）			
	给药前	第 7 日	第 14 日	第 21 日
Control	6.31±1.01	6.43±1.12	6.13±1.21	6.02±1.17
Model	18.32±2.41*	20.12±2.67*	21.87±2.98*	23.41±3.13*
QUE	18.18±2.37	17.47±3.73	15.34±3.97	16.32±4.21$^{\#}$
QUE ＋ SOL	18.73±3.92	18.03±3.84	14.32±3.25$^{\#}$	13.39±3.29$^{\#\#}$
QUE-SOL	18.41±2.51	15.38±4.36$^{\#}$	13.21±3.74$^{\#\#}$	11.35±3.28$^{\#\#}$
MEL	18.52±2.61	13.21±3.96$^{\#}$	10.65±4.37$^{\#\#}$	8.72±2.31$^{\#\#}$

注：与 Control 组相比，$^{*}P<0.05$；与 Model 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.001$。

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

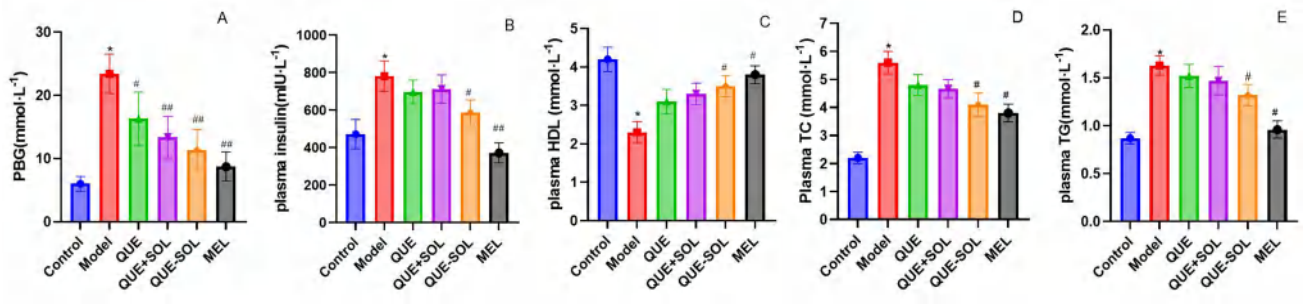


图 5 各组小鼠的血液生化指标影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 5 Changes of blood indexes of mice in different groups（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

注：与 Control 组相比，$^{*}P<0.05$；与 Model 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.001$。

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

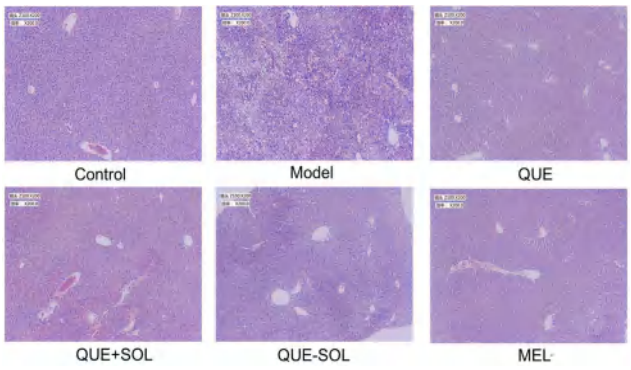


图 6 各组小鼠的肝脏 HE 染色（×200）

Fig 6 HE staining of liver in mice in different groups（×200）

伤；在给药组中，各组小鼠的 ALT 与 AST 均发生不同程度的下降，其中 QUE-SOL 组与 MEL 组的下降趋势较高，提示 QUE-SOL 可以缓解小鼠的肝损伤。小鼠肝脏中的各氧化物质指标，如 SOD、GSH 以及 MDA 的含量如图 7 所示。与对照组相比，模型组的 SOD 以及 GSH 等抗氧化物质含量显著降低，氧化产物 MDA 的含量显著升高，表明小鼠在造模成功后处于氧化应激状态。治疗后，各组小鼠的 SOD 以及 GSH 含量有所升高且 MDA 的含量有所降低，其中 QUE-SOL 组与 MEL 组的效果最为明显，提示 QUE-SOL 在调节氧化应激方面具有重要作用，并可能通过调节氧化应激来改善糖尿病小鼠肝损伤以及降低血糖。

表 3 各组小鼠中转氨酶水平变化（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab 3 AST and ALT level in mice in different groups（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	ALT/（U·L^{-1}）	AST/（U·L^{-1}）
Control	3.6±0.6	4.9±0.7
Model	7.8±0.9*	8.6±0.8*
QUE	6.1±0.8$^{\#\#}$	6.7±0.6$^{\#\#}$
QUE ＋ SOL	6.4±0.6$^{\#}$	7.1±0.5$^{\#\#}$
QUE-SOL	5.2±0.5$^{\#\#}$	5.8±0.6$^{\#\#}$
MEL	4.7±0.6$^{\#\#}$	5.4±0.5$^{\#\#}$

注：与 Control 组相比，$^{*}P<0.05$；与 Model 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.001$。

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

4 讨论

槲皮素是一类药理活性较强的黄酮类药物，在治疗疾病中具有广泛的应用和价值，但存在水溶性低、生物利用度差等问题。本研究利用 SOL 为载体制备槲皮素固体分散体，利用 X 射线衍射和 FT-IR 进行表征，表明 QUE 以无定形的形式分散于载体中，同时证明固体分散体制备成功。饱和溶解度实验证明 QUE-SOL 固体分散体在水和 PBS 中的溶解度显著提高，并且体外溶出实验也证明 QUE 具有更高的溶出度，其原因可能与 QUE 的晶格能被破坏有关。稳定性实验表明本固体分散体在室温下可以长期储存且不会出现转晶情况。

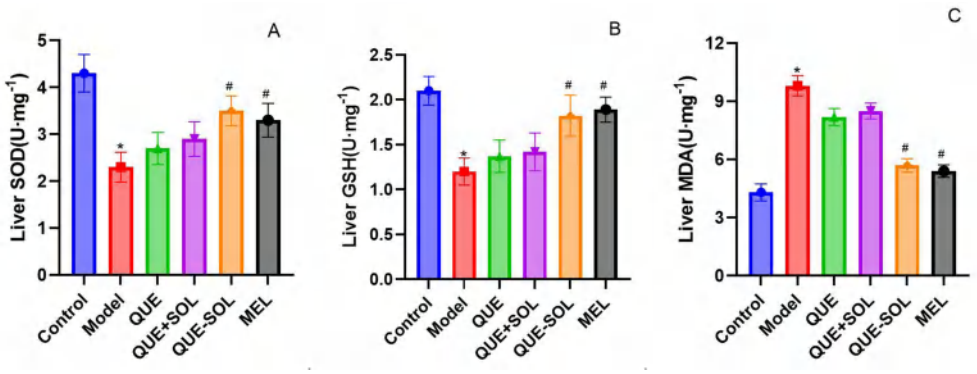


图 7　各组小鼠肝脏生化指标结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 7　Hepatic biomarker levels in mice in different groups（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

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

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

体内药效学实验证明，与 QUE 相比，QUE-SOL 可以有效降低 T2DM 模型小鼠的体内血糖和胰岛素含量，并且可以有效逆转由糖尿病所导致的肝脏的脂肪堆积。此外小鼠在给药后，肝功能指标 ALT 和 AST 显著下降，证实了 QUE-SOL 对肝脏的保护作用。现阶段研究表明氧化应激在 T2DM 发病进程中起着重要作用，本研究表明模型组小鼠肝脏内的 MDA 显著升高，同时伴有 GSH 和 SOD 的降低，说明模型组小鼠发生葡萄糖自氧化而产生的氧化自由基，导致 GSH 和 SOD 等抗氧化成分的降低，而 QUE-SOL 可以显著提高 GSH 和 SOD 的含量，并且降低 MDA 水平[24]，说明 QUE-SOL 可以清除氧化自由基，改善体内氧化应激，从而达到治疗 T2DM 的效果。

综上所述，本研究制备的 QUE-SOL 具有制备简单、稳定性高且治疗效果强等优点，虽然本品的研发距离成果转化以及临床应用还有一定距离（包括本品安全性，动物与人体相关性等诸多问题需要解决），但该研究可为 QUE 的临床使用提供实验依据。

参考文献

[1] 章常华，魏悦，操映倩，等 . 黄芩黄连药对改善 2 型糖尿病 KK-ay 小鼠肝组织炎症作用与 TRAF6、IL1α、NF-κB2、RSK1、RSK2 蛋白表达下调相关 [J]. 时珍国医国药，2021，32（1）：61-63.

[2] Lee SR，Choi J，Choi EK，et al. Early rhythm control on diabetes-related complications and mortality in patients with type 2 diabetes mellitus and atrial fibrillation [J]. Diabetes Res Clin Pract，2023，206：111020.

[3] Zhao YJ，Liu Y，Deng JJ，et al. Ginsenoside F4 alleviates skeletal muscle insulin resistance by regulating PTP1B intype Ⅱ diabetes mellitus [J]. J Agric Food Chem，2023，71（39）：14263-14275.

[4] Sun DD，Zou YF，Song L，et al. A cyclodextrin-based nanoformulation achieves co-delivery of ginsenoside Rg_3 and quercetin for chemo-immunotherapy in colorectal cancer [J]. Acta Pharm Sin B，2022，12（1）：378-393.

[5] Zhou J，Chang SY，Zhang QX，et al. Five natural active ingredients achieve anti-fatigue function by synergistic antioxidation and regulating the structure of intestinal flora [J]. J Food Nutr Res，2022，10（10）：655-663.

[6] 孙楚钧，刘磊，李梦豪，等 . 基于静电喷雾技术的槲皮素肠溶纳米粒的制备与评价 [J]. 中国新药杂志，2023，32（5）：540-546.

[7] Khater A，Samah AH，Syed M，et al. Strategies to improve the stability of amorphous solid dispersions in view of the hot melt extrusion（HME）method [J]. Int J Pharm，2023，647：123536.

[8] 武倩，常金花，薛禾菲，等 . 复合载体齐墩果酸固体分散体的制备及评价 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（4）：385-390.

[9] 李君霞，曹亚蕊，王金涛，等 . 延胡索乙素磷脂复合物及其固体分散体、油制剂、纳米混悬剂的制备及药动学研究 [J]. 中草药，2022，53（14）：4307-4316.

[10] 仝萌 . 热熔挤出技术制备黄芩素固体分散体及其体内外评价研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2021.

[11] 王雪，张宝喜，胡堃，等 . 伊马替尼 - 槲皮素共无定型纳米制剂的制备与表征 [J]. 医药导报，2020，39（8）：1117-1120.

[12] 胡菲，沈成英，申宝德，等 . 不同稳定剂对槲皮素纳米晶体外溶出及大鼠体内口服药动学的影响 [J]. 中草药，2021，52（21）：6485-6492.

[13] 童帅，尹明星，马永贵，等 . 小檗碱磷脂固体分散体改善氧化应激治疗 2 型糖尿病 [J]. 中国药学杂志，2022，57（5）：363-372.

[14] Roslan J，Giribabu N，Karim K，et al. Quercetin ameliorates oxidative stress，inflammation and apoptosis in the heart of streptozotocin-nicotinamide-induced adult male diabetic rats [J]. Biomed Pharmacother，2017，86：570-582.

[15] 黄继汉，黄晓晖，陈志扬，等 . 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2004，9（9）：1069-1072.

[16] Liu ZQ，Song XM，Chen QT，et al. Effect of metformin

on global gene expression in liver of KKAy mice [J]. Pharmacol Rep，2016，68（6）：1332-1338.
[17] Li L，Wan ZZ，Geng TT，et al. Associations of healthy dietary patterns with mortality among people with prediabetes [J]. Eur J Nutr，2023，62（3）：1377-1387.
[18] Zhao XQ，Huang P，Yuan J. Influence of glimepiride plus sitagliptin on treatment outcome，blood glucose，and oxidative stress in diabetic patients [J]. Am J Transl Res，2022，14（10）：7459-7466.
[19] Kang ZQ，Hu JL，Chen MY，et al. Effects of capsaicin on the hypoglycemic regulation of metformin and gut microbiota profiles in type 2 diabetic rats [J]. Am J Chin Med，2022，50（3）：839-861.
[20] Alhajj N，O'Reilly NJ，Cathcart H. Development and characterization of a spray-dried inhalable ciprofloxacin-quercetin co-amorphous system [J]. Int J Pharm，2022，618：121657.
[21] Yan L，Wang RR，Wang HM，et al. Formulation and characterization of chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan encapsulated quercetin nanoparticles for controlled applications in foods system and simulated gastrointestinal condition [J]. Food Hydrocolloid，2018，84：450-457.
[22] 汪涛，冯菊红，张朵朵，等 . 依鲁替尼无定形固体分散体的制备及体外溶出度研究 [J]. 化学与生物工程，2023，40（3）：25-29.
[23] 许宜琪，吴茜，刘书，等 . 雷公藤多苷治疗糖尿病肾脏病的临床疗效及抗炎抗纤维化分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2023，28（9）：1034-1042.
[24] Gilani SJ，Bin-Jumah MN，Al-Abbasi FA，et al. Fustin ameliorates elevated levels of leptin，adiponectin，serum TNF-α，and intracellular oxidative free radicals in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. ACS omega，2021，6（40）：26098-26107.

（收稿日期：2024-04-05；修回日期：2024-06-09）

源内裂解 HPLC-MS/MS 法快速测定造血干细胞移植患儿微量血浆中泊沙康唑和苯妥英浓度

姜锡娟[1]，冯璇[2]，秦亚彬[1]，赵宜乐[1*]（1. 河北省儿童医院 药学部，石家庄 050031；2. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院，辽宁 本溪 117004）

摘要：目的 建立一种源内裂解辅助调整线性范围的高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS/MS）法快速测定造血干细胞移植（HSCT）患儿微量血浆中泊沙康唑和苯妥英的浓度。**方法** 10 μL 血浆经甲醇沉淀蛋白，上清液经水稀释进样分析，内标分别为泊沙康唑 -D4 和苯妥英 -D10；采用 Kinetex EVO C18 柱（30 mm×2.1 mm，2.6 μm）分离，以水（A）和乙腈（B）为流动相，均含 0.1% 甲酸和 2 mmol·L^{-1} 乙酸铵，梯度洗脱，流速 0.5 mL·min^{-1}，柱温 40 ℃，进样量 2 μL，运行时间 2 min。电喷雾离子源正离子扫描下，采用多反应监测模式进行质谱分析。考察该方法的选择性、最低定量限和标准曲线、准确度和精密度、回收率、基质效应、稳定性、高脂效应和溶血效应。并用本法测定了我院 10 例 HSCT 患儿的泊沙康唑和苯妥英血药浓度。**结果** 泊沙康唑、苯妥英及内标泊沙康唑 -D4、苯妥英 -D10 的保留时间分别为 1.05、0.98、1.05、0.97 min。泊沙康唑在 0.1 ～ 12.8 μg·mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系，最低定量限为 0.1 μg·mL^{-1}；苯妥英在 0.4 ～ 51.2 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，最低定量限为 0.4 μg·mL^{-1}；批内、批间准确度为 92.65% ～ 109.03%，批内、批间精密度的 *RSD* 均≤ 11.0%。两种药物的平均提取回收率均在 86.21% ～ 104.82%；内标归一化基质因子的 *RSD* ≤ 6.2%；高脂和 2% 溶血均不影响两种抗菌药物测定结果。样品的稳定性在试验条件下均良好。该法成功用于我院 10 例造血干细胞移植患儿血浆样本分析。**结论** 本方法所需样本量小，简单快速、准确灵敏，可应用于泊沙康唑和苯妥英联合用药研究及治疗药物监测。

关键词：泊沙康唑；苯妥英；液相色谱 - 质谱联用；源内裂解；造血干细胞移植；治疗药物监测
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2932-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.016

基金项目：河北省医学科学研究课题计划（No. 20200658）；河北省政府资助临床医学优秀人才培养计划（No. ZF2023205）。
作者简介：姜锡娟，女，主管药师，主要从事药物分析及治疗药物监测研究，email：jiang_309639729@126.com *通信作者：赵宜乐，男，副主任药师，主要从事医院药学及治疗药物监测研究，email：yile_zhao@yeah.net

Rapid determination of posaconazole and phenytoin in trace plasma of children with hematopoietic stem cell transplantation by HPLC-MS/MS with in-source collision-induced dissociation

JIANG Xi-juan[1], FENG Xuan[2], QIN Ya-bin[1], ZHAO Yi-le[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Hebei Children's Hospital*, *Shijiazhuang* 050031; 2. *School of Life Sciences and Biopharmaceutics*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Benxi Liaoning* 117004)

Abstract: Objective To determine posaconazole and phenytoin in trace plasma of children with hematopoietic stem cell transplantation by a rapid high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with linear range adjusted by in-source collision-induced dissociation. **Methods** The plasma samples (10 μL) were precipitated by methanol, and then the supernatant was diluted with water for detection. The internal standard was posaconazole-D4 and phenytoin-D10. The chromatographic separation was performed with gradient elution on a Kinetex EVO C18 column (30 mm×2.1 mm, 2.6 μm). Water (A) and acetonitrile (B), all containing 0.1% formic acid and 2 mmol • L^{-1} ammonium acetate were used as the mobile phase. The flow rate was 0.5 mL • min^{-1} and the column temperature was 40 ℃. The injection volume was 2 μL and the total running time was 2 min. For mass spectrometry, electrospray ionization source was chosen, and positive ion monitoring was used with multi-reaction monitoring (MRM) mode. The selectivity, LLOQ & calibration curve, accuracy & precision, recovery, matrix effect, stability, evaluation of hyperlipidemic and hemolytic effect were determined. This method was used to determine the concentrations of posaconazole and phenytoin in 10 children with HSCT in our hospital. **Results** The retention time of posaconazole, phenytoin, internal standard posaconazole-D4 and phenytoin-D10 was 1.05, 0.98, 1.05, and 0.97 min, respectively. The linearity at 0.1 ～ 12.8 μg • mL^{-1} and 0.4 ～ 51.2 μg • mL^{-1}, and the lower limits of quantification of 0.1 μg • mL^{-1} and 0.4 μg • mL^{-1}, respectively. The intra-run and inter-run accuracy rate of both drugs was 92.65% ～ 109.03%. The intra-run and inter-run precision (*RSD*) was both less than 11.0%. The average extraction recovery of both drugs was 86.21% ～ 104.82%. The *RSD* of IS-normalized matrix effect was no more than 6.21%. The hyperlipidemic effect and hemolytic effect did not affect the drug quantitation. The stability of the samples was good under test conditions. This method successfully analyzed the plasma samples from 10 pediatric patients with hematopoietic stem cell transplantation in our hospital. **Conclusion** The method is sample-saving, rapid, simple, accurate and sensitive, which can be used for the therapeutic drug monitoring of combination of posaconazole and phenytoin.

Key words: posaconazole; phenytoin; HPLC-MS/MS; in-source collision-induced dissociation; hematopoietic stem cell transplantation; therapeutic drug monitoring

泊沙康唑（posaconazole，POS）是一种全身性的三唑类广谱抗真菌药物，对曲霉、念珠菌等具有良好的抗真菌活性，常用于造血干细胞移植（HSCT）患者预防和治疗侵袭性真菌感染[1]，其药代动力学受多种因素影响，血药浓度变异性大，临床上推荐对泊沙康唑行常规治疗药物监测（TDM）[2]。苯妥英（phenytoin，PHT）作为一种经典抗癫痫药物，常作为预防用药应用于经白消安预处理的 HSCT 方案中[3]，但苯妥英口服吸收速度慢且个体差异大，治疗过程中需进行 TDM[4]。有研究表明，联用苯妥英是影响泊沙康唑血药浓度的独立因素之一[5]。因此，建立同时检测两种药物浓度的方法对 HSCT 患者的用药监护具有重要意义。目前有关泊沙康唑或苯妥英的检测方法[6-8]存在所需样本量大、耗时，且仅针对单一正常基质等问题，对儿童不友好，不能满足临床快速精准的检测需求；并且，两种药物质谱灵敏度和治疗范围差异大，对建立同时测定两种药物的方法形成挑战。因此，本研究利用源内裂解技术建立一种快速同时测定儿童微量血浆中泊沙康唑和苯妥英浓度的高效液相色谱串联质谱法（HPLC-MS/MS），为临床监测其血药浓度提供技术支持。

1 材料

1.1 试药

泊沙康唑对照品（上海源叶生物有限公司，批号：K24J10M91205，纯度：99.9%），苯妥英钠对照品（中国食品药品检定研究院，批号：100210-

202104，纯度：99.0%），泊沙康唑 -D4（POS-D4）对照品（泊沙康唑内标，批号：12-MRS-161-1，纯度：98%），苯妥英 -D10（PHT-D10）对照品（苯妥英内标，批号：52-GHZ-64-1，纯度：98%）（Toronto Research Chemicals 公司）。乙腈、甲醇、甲酸、乙酸铵为色谱纯；水为超纯水。

1.2 仪器

Triple Quad 4500MD 液相色谱串联质谱检测系统，配有 Jesper 20ADxr 高效液相色谱仪（美国 AB SCIEX）；BY-R20 型高速冷冻离心机（北京白洋医疗器械有限公司）；Explorer EX125DZH 准微量天平（精度十万分之一，美国 Ohaus）。

1.3 血液样品

空白血浆及空白全血由河北省儿童医院输血科提供；患者血浆采集自我院血液科住院患者，所有参与研究患者均签署知情同意书。本研究经河北省儿童医院医学伦理委员会批准，伦理批件号：医研伦审第 202312 号。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Kinetex EVO C18 色谱柱（30 mm×2.1 mm，2.6 μm），以水（A）和乙腈（B）为流动相，均含 0.1% 甲酸和 2 mmol·L^{-1} 乙酸铵，流速 0.5 mL·min^{-1}；梯度洗脱：0 ～ 0.20 min，90%A；0.20 ～ 0.60 min，90% ～ 5%A；0.60 ～ 1.30 min，5%A；1.30 ～ 1.31 min，5% ～ 90%A；1.31 ～ 2.00 min，90%A；柱温 40 ℃，进样器温度 5 ℃，进样量 2 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源，多反应离子监测正离子模式扫描，离子喷雾电压：5500 V；离子源温度：550 ℃；雾化气：344.7 kPa；气帘气：137.9 kPa；加热气：379.2 kPa。泊沙康唑、苯妥英、POS-D4 和 PHT-D10 的监测离子对分别为：*m/z* 701.4 → 546.3、*m/z* 253.1 → 182.1、*m/z* 705.2 → 687.4、*m/z* 263.1 → 192.2；四者解簇电压分别为 180、115、100、70 V，碰撞能量为 54、27、48、22 V。

2.3 溶液配制

称取泊沙康唑对照品 2.0 mg，置于 2 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解定容即得质量浓度为 1.0 mg·mL^{-1} 的标准储备液；称取苯妥英钠对照品 11.0 mg（相当于苯妥英 10.0 mg），置于 2 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解定容即得相当于苯妥英质量浓度为 5.0 mg·mL^{-1} 的标准储备液；取 POS-D4 和 PHT-D10 对照品适量，分别加甲醇超声溶解并定容，配制成质量浓度为 0.5 mg·mL^{-1} 的内标储备液。将上述溶液分装成若干份，密封，置于 − 80 ℃冰箱中冷冻备用，临用前分别用甲醇精密稀释成含泊沙康唑 256 μg·mL^{-1} 和苯妥英 1024 μg·mL^{-1} 的混合标准工作液及含 POS-D4 0.1 μg·mL^{-1} 和 PHT-D10 0.6 μg·mL^{-1} 的蛋白沉淀剂。

2.4 校正标样和质控样品配制

精密吸取空白血浆 950 μL 于 1.5 mL 离心管中，精密加入混合标准工作液 50 μL，混匀，用空白血浆逐级稀释，得到泊沙康唑质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 μg·mL^{-1} 和苯妥英质量浓度分别为 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 μg·mL^{-1} 的系列校正标样。另精密吸取空白血浆适量，精密加入标准工作液，混匀，分别配制成泊沙康唑质量浓度为 0.3、2.4、9.6 μg·mL^{-1} 和苯妥英质量浓度为 1.2、9.6、38.4 μg·mL^{-1} 的低、中、高 3 个质量浓度的血浆质控样品。

2.5 高脂血浆和溶血血浆制备

高脂血浆制备方法：将 20% 中 / 长链脂肪乳注射液与空白人血浆按 1∶9（*V*/*V*）的比例混匀，即得模拟三酰甘油＞ 300 mg·dL^{-1} 的高脂血浆。溶血血浆制备方法：取空白全血适量于 − 20 ℃冷冻 1 h，解冻后涡旋 30 s，即得溶血全血；将溶血全血按 2∶98 的体积比加入正常空白血浆中，混匀即得溶血程度为 2% 的模拟溶血血浆。溶血和高脂质控样品按 “2.4” 项下方法处理，供方法学验证用。

2.6 样品处理

取血浆样品 10 μL，加入蛋白沉淀剂 30 μL，涡旋 1 min，离心 12 min（12 000 r·min^{-1}，4 ℃），取上清液 25 μL，加水 25 μL，涡旋混匀，离心 5 min（12 000 r·min^{-1}，4 ℃），取上清液进样分析。

2.7 方法学考察

2.7.1 选择性 取不同来源的空白血浆 6 份，其中包括正常空白血浆、高脂血浆和溶血血浆，均按 “2.6” 项下方法处理后进样分析，记录色谱图。结果空白血浆无干扰，典型色谱图见图 1。

2.7.2 标准曲线、最低定量限（LLOQ） 将系列校正标样依照 “2.6” 项下方法处理，进样检测。以待测物与内标峰面积比值为纵坐标（*y*），待测物的质量浓度为横坐标（*x*），用最小二乘法进行回归分析，权重为 $1/\chi^2$。结果泊沙康唑在 0.1 ～ 12.8 μg·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，回归方程为 $y = 0.9007x + 0.0134$，$r = 0.9989$，LLOQ 为 0.1 μg·mL^{-1}；苯妥英在 0.4 ～ 51.2 μg·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，回归方程为 $y = 0.1622x - 6.34\times10^{-3}$，$r = 0.9959$，LLOQ 为 0.4 μg·$mL^{-1}$。

2.7.3 准确度和精密度 取一个分析批的 LLOQ 以及低、中、高 3 个质量浓度的质控样品，每个质量浓度平行 5 份，按 “2.6” 项下方法处理，进样检测，考察批内准确度和精密度；重复测定 3 批，考察批间准确度和精密度。结果批内和批间的准确度和精密度均符合要求，见表 1。

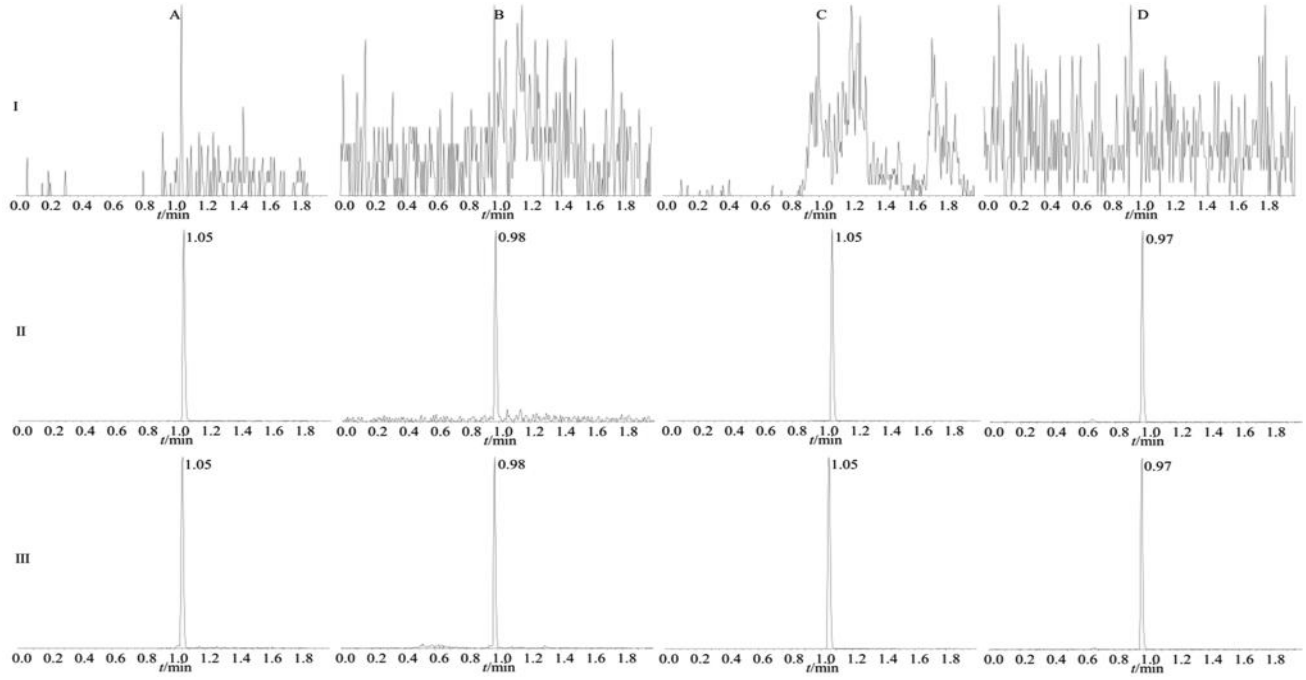


图 1　泊沙康唑、苯妥英及其内标的典型色谱图

Fig 1　Representative chromatograms of posaconazole，phenytoin and their ISs

Ⅰ. 空白血浆（blank plasma）；Ⅱ. 最低定量限（LLOQ）；Ⅲ. 临床样本（clinical sample）；A. 泊沙康唑（posaconazole）；B. 苯妥英（phenytoin）；C. 泊沙康唑 -D4（posaconazole-D4）；D. 苯妥英 -D10（phenytoin-D10）

表 1　准确度、精密度和回收率结果

Tab 1　Summary of accuracy，precision and recovery

分析物	理论浓度 /（μg・mL^{-1}）	批内（n = 5）			批间（n = 15）			回收率 /%	*RSD*
		实测浓度 /（μg・mL^{-1}）	*RSD*/%	*RE*/%	实测浓度 /（μg・mL^{-1}）	*RSD*/%	*RE* /%		
泊沙康唑	0.1	0.10±0.00	3.8	－0.76	0.11±0.01	6.4	－5.8	－	
	0.3	0.30±0.01	3.9	1.3	0.32±0.02	4.9	5.5	97.43	2.2
	2.4	2.50±0.05	2.0	4.1	2.55±0.10	3.8	6.4	93.60	3.2
	9.6	9.44±0.21	2.2	－1.7	9.28±0.46	4.9	－3.4	100.66	2.8
苯妥英	0.4	0.43±0.04	9.6	6.6	0.44±0.05	11.0	9.0	－	
	1.2	1.13±0.07	6.6	－6.1	1.11±0.06	5.7	－7.3	88.30	6.0
	9.6	9.13±0.70	7.7	－4.9	8.92±0.85	9.5	－7.1	86.21	7.4
	38.4	40.73±3.36	8.3	6.1	39.54±3.45	8.7	3.0	104.82	7.1

2.7.4　基质效应　分别取 6 个不同来源的空白血浆 10 μL（包括 2% 溶血血浆和高脂血浆），加入甲醇 30 μL，其余按 “2.6” 项下方法处理，上清液即为沉淀后的基质。分别用空白溶剂和沉淀后的基质配制低、高质量浓度的质控样品并加入混合内标溶液，用分析物的基质效应除以相应内标的基质因子即得内标归一化的基质因子。结果泊沙康唑低、高质量浓度水平下内标归一化基质因子的 *RSD* 分别为 3.0%、0.69%；苯妥英低、高质量浓度水平下内标归一化基质因子的 *RSD* 分别为 5.8%、6.2%，符合规定。

2.7.5　回收率　配制低、中、高 3 个质量浓度的质控样品，每个浓度平行 5 份，按 “2.6” 项下方法处理并检测，记录峰面积 *A*；另取空白血浆，除不加内标按 “2.6” 项下方法操作，向获得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，记录峰面积 *B*；回收率（%）= *A*/*B*×100%。结果见表 1。

2.7.6　稳定性　制备低、高质量浓度质控样品，各平行 4 份，分别考察冻融 3 次（－ 80 ℃至室温）、室温下放置 8 h、4 ℃下放置 72 h，处理后进样器 5 ℃下放置 6 h 和－ 80 ℃放置 28 d 的稳定性。样品在各考察条件下稳定性符合要求，结果见表 2。

2.7.7　高脂效应和溶血效应　参照以往研究 [9]，分别用高脂血浆和 2% 溶血血浆配制的 LLOQ、低、中、高 4 个质量浓度的质控品，每个质量浓度平行 5 份，按 “2.6” 项下方法处理，随行正常空白血浆制备的校正标样检测，考察高脂效应和溶血效应。结果苯妥英在高脂血浆、2% 溶血血浆中准确度为 94.12% ～ 114.73%，*RSD* 为 3.8% ～ 9.6%；泊沙康

表 2 血浆稳定性考察结果 (%)

Tab 2 Summary of stability tests (%)

分析物	理论浓度 /（μg • mL^{-1}）	冻融 3 次	室温 8 h	冷藏 4 ℃，72 h	进样器 5 ℃，6 h	－ 80 ℃，28 d
泊沙康唑	0.3	104.06±1.24	92.96±3.14	95.76±1.82	97.74±2.55	85.95±1.67
	9.6	102.30±3.09	89.80±5.15	94.92±2.50	100.60±4.88	88.54±3.50
苯妥英	1.2	106.52±2.27	100.59±13.11	105.60±6.72	103.45±10.20	98.22±9.39
	38.4	99.89±1.96	94.04±5.08	95.84±7.64	99.34±4.33	92.36±2.59

唑在高脂血浆、2% 溶血血浆中准确度为 92.66% ～ 113.87%，*RSD* 为 2.3% ～ 4.8%。说明高脂血浆和 2% 溶血血浆均不干扰药物的测定。

2.8 *方法学应用*

选择 2023 年 1 月至 2024 年 2 月我院接受 HSCT 患儿 10 例，测定两种药物的血药浓度，结果 10 例患儿中使用泊沙康唑的有 8 例，使用苯妥英的有 4 例，其中联合用药 2 例。泊沙康唑的平均质量浓度为 0.81 μg • mL^{-1}，范围在 0.12 ～ 2.34 μg • mL^{-1}；苯妥英的平均质量浓度为 1.01 μg • mL^{-1}，范围在 0.51 ～ 1.47 μg • mL^{-1}。

3 讨论

笔者在方法建立过程中发现，苯妥英灵敏度远高于泊沙康唑，且两者的治疗有效浓度范围相差较大，若要在各自的线性范围内获得适宜的质谱响应，需对两种药物的前处理过程分别进行改进，如使用不同的蛋白沉淀剂体积或增加进样前稀释倍数等。Ishii 等 [10-11] 研究表明，源内裂解技术可用于不同质谱条件下同时定量生物基质中具有不同灵敏度的化合物，并成功应用于多种药物的 TDM 中。因此，本研究将苯妥英的解簇电压由 80 V 增大至 115 V，增强其母离子的源内裂解，降低灵敏度，以达到调整线性范围的目的，从而实现了泊沙康唑和苯妥英的同时测定。

据文献报道，泊沙康唑谷浓度不低于 0.7 μg•mL^{-1}[12]，苯妥英的参考范围为 10 ～ 20 μg•mL^{-1}[4]。根据测定结果，泊沙康唑浓度有 50%（4/8）符合参考范围，而苯妥英浓度无一符合参考范围。虽然本研究受特殊病种影响，本研究纳入病例数稀少，研究过程中未能收集到更多的血浆样本，但测定的结果仍能说明 TDM 对指导泊沙康唑和苯妥英的合理应用具有重要意义。

本方法前处理采用蛋白沉淀法，简便快速易推广，且仅需 10 μL 血浆，对儿童友好；本法可同时对泊沙康唑和苯妥英的血药浓度进行测定，单针运行时间仅 2 min，远短于文献报道的分析时长 [6-8]，通量高，能更高效地为临床 TDM 服务。鉴于 HSCT 患儿特殊的生理病理特点，参考以往的研究 [9]，本法对高脂血浆和溶血血浆的准确度、精密度进行了考察，结果表明，该法可应用于多种异常基质的检测。但受临床实际影响，本研究暂未收集到更多的 HSCT 患儿样本。虽然样本数量有限，但所建方法已成功应用于泊沙康唑和苯妥英的血药浓度测定，能够为临床个性化精准用药和药物相互作用研究提供技术依据。

参考文献

[1] 中国医药教育学会真菌病专业委员会，中华医学会血液学分会 . 造血干细胞移植后侵袭性真菌病中国专家共识（2023 年版）[J]. 中华血液学杂志，2023，44（2）：92-97.

[2] John J，Loo A，Mazur S，et al. Therapeutic drug monitoring of systemic antifungal agents：a pragmatic approach for adult and pediatric patients [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol，2019，15（11）：881-895.

[3] 舒鹤，王哲，刘洋，等 . 苯妥英钠预防白消安致癫痫发作失败病例分析 [J]. 西北药学杂志，2016，31（4）：414-417.

[4] 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.

[5] 董琳，束一朔，董中华，等 . 泊沙康唑口服混悬液在 HSCT 患者中的剂量校正浓度及其影响因素分析 [J]. 中国药房，2023，34（24）：3025-3029.

[6] 张胜男，周宇雪，王丹姝，等 . 二维液相色谱法测定人血浆中泊沙康唑药物浓度及其在儿科临床的应用 [J]. 中南药学，2023，21（1）：249-252.

[7] 林冠丽，杨佳彬，尹威，等 . 高效液相色谱串联质谱法快速检测肾移植患者泊沙康唑血药浓度 [J]. 中国药业，2022，31（23）：40-44.

[8] 吴灵洁，陈少芳，储楠楠，等 . 超高效液相色谱串联质谱法监测血清苯妥英浓度及室间质量评价 [J]. 中国临床药学杂志，2019，28（3）：192-196.

[9] Jiang XJ，Qin YB，Lei R，et al. A rapid and simple HPLC-MS/MS method for the therapeutic drug monitoring of six special-grade antimicrobials in pediatric patients [J]. Heliyon，2024，10（1）：e24198.

[10] Ishii H，Yamaguchi H，Mano N. Expanding the versatility of a quantitative determination range adjustment technique using in-source CID in LC/MS/MS [J]. Chromatography，2017，38（2）：59-63.

[11] Ishii H，Shimada M，Yamaguchi H，et al. A simultaneous determination method for 5-fluorouracil and its metabolites in human plasma with linear range adjusted by in-source collision-induced dissociation using hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr，2016，30（11）：1882-1886.

[12] 张飞雨，张瑞霞，宋学武，等 . 影响泊沙康唑血药浓度相关因素的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（9）：971-976.

（收稿日期：2024-07-22；修回日期：2024-09-04）

甜梦口服液对利培酮所致糖脂代谢及内分泌紊乱的作用与机制研究

刘恺[1, 2, 3, 4, 5]，夏清荣[2, 3, 4, 5]，梁俊[2, 3, 4, 5]，邓逸芸[2, 3, 4, 5]，单锋[2, 3, 4, 5]，王金亮[2, 3, 4, 5]，汪电雷[1*]
（1. 安徽中医药大学药学院，合肥　230012；2. 安徽医科大学附属心理医院，合肥　230022；3. 安徽省合肥市第四人民医院药剂科，合肥　230022；4. 安徽省精神卫生中心精神药理研究室，合肥　230022；5. 安徽省精神心理疾病临床医学研究中心，合肥　230022）

摘要：目的　探究联用甜梦口服液对利培酮所致糖脂代谢及内分泌紊乱的作用与机制。**方法**　选取 2022—2023 年某精神科三甲医院收治的女性精神分裂症住院患者临床资料共 112 份，分析利培酮单用以及利培酮与甜梦口服液联用后糖脂代谢、甲状腺功能以及性激素指标的变化，并通过动物实验探究甜梦口服液的作用机制。**结果**　与利培酮单用组相比，利培酮与甜梦口服液联用组患者三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）、空腹血糖（FBG）及高密度脂蛋白（HDL-C）水平变化差异无统计学意义，但促甲状腺激素（TSH）、三碘甲腺原氨酸（T3）、甲状腺激素（T4）、游离三碘甲状腺原氨酸（FT3）、游离甲状腺素（FT4）水平均有显著变化（$P < 0.05$）。此外，联用甜梦口服液还可以降低利培酮用药患者的血清催乳素（PRL）水平（$P < 0.01$）。大鼠实验的结果与临床数据基本一致，大鼠垂体的转录组学结果则表明甜梦口服液对利培酮所致激素代谢紊乱的改善作用可能与抑制垂体信号传递通路的表达有关。**结论**　联用甜梦口服液可以在一定程度上改善利培酮所致的糖脂代谢及内分泌紊乱，这一作用可能与抑制垂体信号传递通路有关。

关键词：利培酮；甜梦口服液；糖脂代谢；内分泌紊乱
中图分类号：R749.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-2937-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.017

Effect and mechanism of Tianmeng oral liquid on glucose and lipid metabolism and endocrine disorders induced by risperidone

LIU Kai[1, 2, 3, 4, 5], XIA Qing-rong[2, 3, 4, 5], LIANG Jun[2, 3, 4, 5], DENG Yi-yun[2, 3, 4, 5], SHAN Feng[2, 3, 4, 5], WANG Jin-liang[2, 3, 4, 5], WANG Dian-lei[1*] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Medical University Affiliated Psychological Hospital*, *Hefei* 230022; 3. *Department of Pharmacy*, *Hefei Fourth People's Hospital*, *Hefei* 230022; 4. *Psychopharmacology Research Laboratory*, *Anhui Mental Health Center*, *Hefei* 230022; 5. *Anhui Clinical Research Center for Mental Disorders*, *Hefei* 230022)

Abstract: Objective　To determine the effect and mechanism of Tianmeng oral liquid on glucose and lipid metabolism and endocrine disorders induced by risperidone. **Methods**　Totally 112 clinical reports of female schizophrenia inpatients admitted to a psychiatric hospital from 2022 to 2023 were selected. The changes in glucose and lipid metabolism, thyroid function, and sex hormone indexes after treatment with risperidone alone and combined with Tianmeng oral liquid were analyzed. The mechanism of action of Tianmeng oral liquid was determined with animal experiments. **Results**　Compared with the risperidone alone group, no significant difference was found in the levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), fasting blood glucose (FBG), and high-density lipoprotein (HDL-C) in risperidone combined with Tianmeng oral liquid group, but the levels of triiodothyronine (T3), thyroid hormone (T4), free triiodothyronine (FT3) and free thyroxine (FT4) were up-regulated ($P < 0.05$). In addition, combination of Tianmeng oral liquid also reduced the serum prolactin (PRL) level in patients treated

基金项目：合肥市第七周期重点专科资助项目（合卫医秘 [2023]72 号）；合肥市卫生健康委应用医学研究项目（No.HWK20232d013）。
作者简介：刘恺，男，主管药师，主要从事精神药理学研究，email：821595938@qq.com　*通信作者：汪电雷，男，教授，博士研究生导师，主要从事药物代谢动力学研究，email：dlwang@ahtcm.edu.cn

with risperidone ($P < 0.01$). Results of rat experiments were consistent with the clinical data. The transcriptome results of rat pituitary showed that the improvement of Tianmeng oral liquid on hormone metabolism disorder induced by risperidone might be related to the inhibition of the expression of pituitary signaling pathways. **Conclusion** Combination of Tianmeng oral liquid and risperidone can improve glucose and lipid metabolism and endocrine disorders caused by risperidone to a certain extent, which may be related to the inhibition of the pituitary signaling pathways.

Key words: risperidone; Tianmeng oral liquid; glycolipid metabolism; endocrine disorder

精神分裂症为临床常见的精神疾病，临床多表现为思维障碍，意志行为、情感、精神活动异常，严重者甚至会逐步丧失社会功能，极大地影响了患者的生存质量[1]。利培酮为二代抗精神病药物，目前在临床应用极为广泛，是精神分裂症患者治疗的首选用药之一。但有研究表明，利培酮常会导致患者出现如甲状腺功能指标三碘甲腺原氨酸（triiodothyronine，T3）、游离三碘甲状腺原氨酸（free triiothyrogenine，FT3）、甲状腺激素（thyroxine，T4）、游离甲状腺素（free thyroxine，FT4）水平异常等内分泌紊乱的现象[2]，在女性患者中还会引发如糖脂代谢指标空腹血糖（FBG）、三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）水平升高，月经失常，泌乳，骨质疏松等不良反应[3]，这些不良反应会降低患者的服药依从性，影响精神疾病的治疗。因此，对利培酮治疗精神分裂症患者所引发的不良反应进行有效防治已成为临床应用中迫切需要解决的问题。甜梦口服液由刺五加、黄精、蚕蛾、桑椹、党参、黄芪、砂仁、枸杞子、山楂、熟地黄、淫羊藿（制）、陈皮、茯苓、马钱子（制）、法半夏、泽泻、山药共 17 味中药组成[4]，其临床适应证主要包括头晕、耳鸣、失眠、健忘、食欲不振等，在临床上常与抗精神分裂和抗抑郁类药物合用，可以改善患者的焦虑与失眠[5]。本研究分别以服用利培酮的女性精神分裂症患者和实验动物为研究对象，探讨甜梦口服液对利培酮所致的内分泌及糖脂代谢紊乱的缓解作用与机制，为临床上更好地应用利培酮提供参考。

1 仪器与试药

利培酮口服液（西安杨森制药有限公司，批号：NEB4M00，规格：30 mg/30 mL）；甜梦口服液（荣昌制药有限公司，批号：231150，规格：10 mL/ 支）；促黄体生成激素（LH）、尿促卵泡素（FSH）、雌二醇（E2）、孕酮（Pg）、催乳素（PRL）、促甲状腺激素（TSH）、T3、FT3、T4、FT4 ELISA 试剂盒（武汉基因美生物科技有限公司）。高速组织研磨仪（武汉 Servicebio 生物，KZ-III-F），酶标仪（BioTeK，Epoch），全自动生化分析仪（深圳雷杜生命科技，Chemray 800）。

2 方法与结果

2.1 临床研究

2.1.1 资料收集 选取 2022 年 1 月—2023 年 12 月某精神科三甲医院收治的精神分裂症住院患者 112 例，其中单用利培酮患者 60 例（即单用组），利培酮联用甜梦口服液患者 52 例（即联用组）。纳入标准：① 符合国际疾病分类第 10 版（ICD-10）中的精神分裂症诊断标准；② 性别为女性，年龄 18 ～ 60 岁；③ 阳性与阴性症状量表（PANSS）总分≥ 60 分；④ 住院 4 周以上；⑤ 使用利培酮片（齐鲁制药有限公司，批号：3J0384D02）治疗，未合用其他抗精神病药物。排除标准：① 合并其他基础疾病如高血压、糖尿病等；② 有内分泌功能紊乱病史；③ 妊娠与哺乳期孕妇；④ 有药物滥用史。通过电子病历系统查阅并收集患者一般资料、利培酮日剂量、血糖血脂指标及激素水平等相关资料，患者的基本资料如表 1 所示。

表 1 患者基本资料 ($n = 112$)

Tab 1 Basic information of patients ($n = 112$)

项目	数据
年龄 / 岁	18 ～ 60
性别	女
体重 /kg	38 ～ 89
BMI/（$kg \cdot m^{-2}$）	15 ～ 36
日剂量 /mg	2 ～ 6
住院周期 / 周	4 ～ 8

2.1.2 甜梦口服液对患者糖脂代谢指标的影响 两组患者糖脂代谢水平基线值的差异无统计学意义，具有可比性。治疗后，相较于利培酮单用组，甜梦口服液联用组患者 TG、TC 及 FBG 的水平略低，而 HDL-C 的水平略高，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），结果如表 2 所示。

2.1.3 甜梦口服液对患者甲状腺相关激素水平的影响 两组间甲状腺相关激素水平基线值的差异无统计学意义。在治疗后，相较于单用组，联用组患者 TSH 水平较低（$P < 0.05$），而 TT3、TT4、FT3 及 FT4 的水平较高（$P < 0.01$）。结果如表 3 所示。

2.1.4 甜梦口服液对患者性激素水平的影响 两组间性激素水平基线值的差异无统计学意义。经

表 2 两组患者糖脂代谢指标比较

Tab 2 Glucose and lipid metabolism indexes between the two groups of patients

	组别	TG/（mmol·L^{-1}）	TC/（mmol·L^{-1}）	HDL-C/（mmol·L^{-1}）	FBG/（mmol·L^{-1}）
基线数据	单用组	1.411±0.817	4.175±0.788	1.423±0.396	4.981±1.002
	联用组	1.404±0.782	4.095±0.817	1.405±0.371	4.736±0.974
治疗后数据	单用组	1.701±1.123	4.519±0.937	1.152±0.237	5.178±1.114
	联用组	1.497±0.925	4.205±0.882	1.251±0.211	4.802±0.719

表 3 两组患者甲状腺相关激素水平比较

Tab 3 Thyroid-related hormone levels between the two groups of patients

	组别	TSH/（mU·L^{-1}）	T3/（nmol·L^{-1}）	T4/（nmol·L^{-1}）	FT3/（pmol·L^{-1}）	FT4/（pmol·L^{-1}）
基线数据	单用组	2.34±1.92	1.85±0.36	134.19±41.05	5.39±1.45	16.71±6.03
	联用组	2.36±1.83	1.92±0.49	129.77±37.84	5.50±1.49	16.59±5.45
治疗后数据	单用组	4.01±2.87	1.39±0.41	62.39±57.42	3.88±1.12	7.01±6.95
	联用组	2.83±2.01*	1.79±0.59**	102.87±41.91**	4.93±1.28**	14.27±6.99**

注：与单用组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：Compared with the single group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

治疗后，相较于单用组，联用组患者体内 LH 水平较低，E2 与 Pg 水平较高，但差异并无统计学意义（$P>0.05$），而联用组患者的 FSH 及 PRL 明显低于单用组（$P<0.01$），结果如表 4 所示。

表 4 两组患者性激素水平比较

Tab 4 Sex hormone levels between the two groups of patients

	组别	FSH/（mIU·L^{-1}）	LH/（mIU·L^{-1}）	E2/（pmol·L^{-1}）	Pg/（nmol·L^{-1}）	PRL/（mIU·L^{-1}）
基线数据	单用组	9.97±17.25	5.78±6.57	123.49±75.96	0.79±0.68	84.39±55.21
	联用组	10.52±19.93	6.45±7.46	126.06±75.48	0.75±0.51	79.30±51.03
治疗后数据	单用组	28.03±27.15	9.56±8.85	95.73±69.66	0.67±0.56	899.41±905.33
	联用组	13.74±25.49**	6.51±8.07	101.56±98.47	0.79±1.94	180.39±140.96**

注：与单用组比较，$^{**}P<0.01$。

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

2.1.5 甜梦口服液对患者利培酮血药浓度的影响

在患者用药后的次日清晨测定利培酮血药浓度，单用组患者血药浓度为（8.11±8.02）mg·L^{-1}，联用组患者血药浓度为（7.93±8.46）mg·L^{-1}，两组患者的血药浓度没有明显差异。

2.2 *动物实验*

2.2.1 动物分组及给药 取 24 只 6 ～ 8 月龄雌性、性成熟、动情周期规律的 SPF 级 SD 大鼠 [许可证号：SCXK（豫）2020-0005，河南斯克贝斯生物科技股份有限公司]。所有大鼠在（24±2）℃、12 h 光 /12 h 暗循环的环境中适应性饲养 1 周，自由获取水和食物。将 24 只大鼠随机分为空白组、模型组（单用利培酮，0.1 mg·kg^{-1}）[6]、治疗组（利培酮 0.1 mg·kg^{-1} ＋甜梦口服液 4 mL·kg^{-1}），每组 8 只。对照组给予同体积超纯水，均采用灌胃给药，每日一次，持续 4 周。给药结束后通过眼眶取血并制备血清。实验已通过安徽中医药大学动物伦理委员会审查（批件号：AHUCM-rats-2023041）。

2.2.2 糖脂代谢指标测定 通过全自动生化分析仪测定各组大鼠血清中的 FBG、TG、TC、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）及低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）等指标，结果如图 1 所示。与对照组相比，模型组大鼠的 TG、TC、LDL-C 与 FBG 的水平较高，HDL-C 水平较低（$P<0.05$）。联用甜梦口服液后，所有指标都有改善的趋势，且除 HDL-C 外差异都具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2.3 酶联免疫吸附法（ELISA）测定大鼠血清激素水平 通过 ELISA 法检测大鼠血清性激素水平（FSH、LH、E2、Pg、PRL）及甲状腺相关激素水平（TSH、T3、T4、FT3、FT4）。严格按照 ELISA 试剂盒中的操作说明进行实验。甲状腺激素水平检测结果如图 2 所示，模型组大鼠相较于对照组 TSH 水平显著上升（$P<0.05$），而 TT3、TT4、FT3 及 FT4 都显著下降（$P<0.05$）。治疗组 TSH、TT3、TT4、FT3 及 FT4 的水平向对照组显著回调（$P<0.05$）。性激素水平检测结果如图 3 所示，与对照组相比，模型组大鼠血清中 PRL、FSH、LH 水平显著升高，E2 及 Pg 显著降低（$P<0.05$）。而与模型组相比，治疗组大鼠血清中 PRL、FSH、LH 水平都降低（$P<0.05$），E2 及 Pg 则上调（$P<0.05$）。

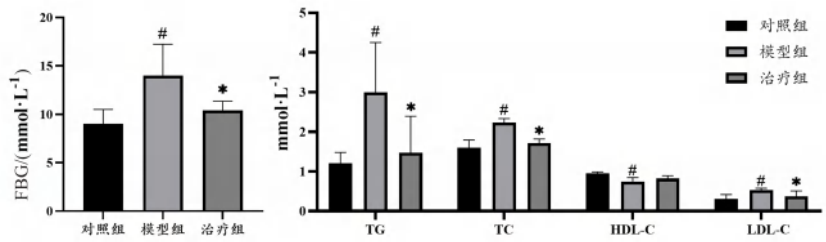


图 1 甜梦口服液对模型大鼠糖脂代谢指标的影响

Fig 1 Effect of Tianmeng oral liquid on glucose and lipid metabolism indexes in model rats

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

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

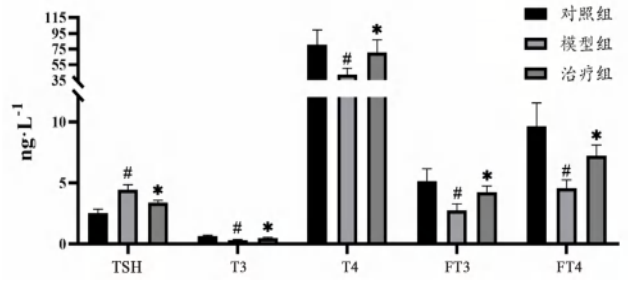


图 2 甜梦口服液对模型大鼠甲状腺激素水平的影响

Fig 2 Effect of Tianmeng oral liquid on thyroid hormone level in model rats

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

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

2.2.4 转录组学测序 在模型组与治疗组中每组随机取 3 只大鼠的垂体组织，提取总 RNA 后构建 CDNA 文库并进行质检，按照 BGISEQ-500 测序平台的操作说明制备上机样本，进行测序。以 |log2 foldchange| ＞ 1.5 与校正后的 $P < 0.05$，作为显著差异表达的阈值，筛选出差异基因表达。结果显示，模型组与治疗组之间共发现 1169 个差异表达基因（DEGs），其中 349 个基因上调，282 个下调；各组差异基因热图见图 4。

2.2.5 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析 根据 DEGs 结果进一步进行 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析结果如图 5 所示，甜梦口服液可能作用于神经元细胞、细胞器与细胞突触等处，影响分子结合、酶催化活性与细胞功能调节等分子功能，通过调节细胞过程、生物调节与代谢等生物进程，从而发挥作用。KEGG 通路富集分析结果显示，甜梦口服液上调的 DEGs 可被富集于 TLR 信号通路与 TNF 信号通路等信号通路，而下调的 DEGs 可被富集于谷氨酸能突触信号通路与钙信号通路等信号传递系统通路。

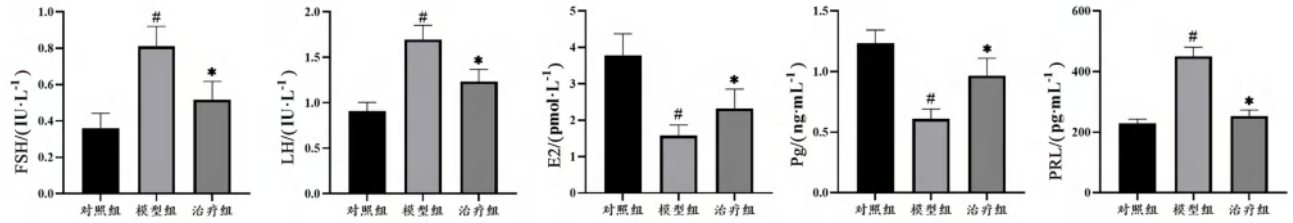


图 3 甜梦口服液对大鼠性激素水平的影响

Fig 3 Effect of Tianmeng oral liquid on sex hormone levels in rats

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

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

2.3 数据分析

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析，以 $\bar{x} \pm s$ 的形式来表示实验数据。多组间分析首先采用单因素方差分析（one-way ANOVA），进一步做两两比较时，采用独立样本 t 检验；多组实验组与同一对照组比较时，采用 Dunnett-t 检验。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

精神分裂症是一种精神疾病，大约每三百人中就会出现一个患者，严重影响人们的生命安全与生存质量。精神病患者常需要终身服用抗精神病药物，其用药安全尤为重要[7-8]。利培酮是临床上最常用的抗精神分裂症药物之一，其能作用于多巴胺受体、5-羟色胺受体、组胺 H_1 受体和 α_1 肾上腺素受体，能经前额叶皮层边缘通路和中脑边缘通路起到抗精神病作用[9]，但其可能会影响垂体的激素分泌进而导致内分泌及糖脂代谢紊乱[10-11]。目前很多研究报道了利培酮可能会引起患者的内分泌及糖脂代谢紊乱[12]，其中高催乳素血症是最为突出表

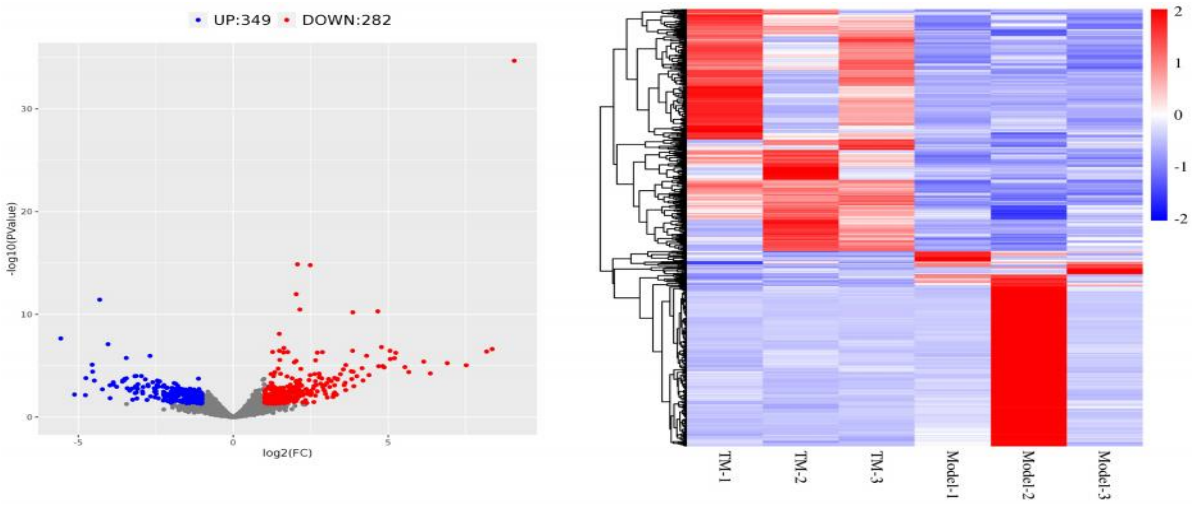


图 4　两组差异基因表达分析

Fig 4　Differential gene expression analysis between two groups

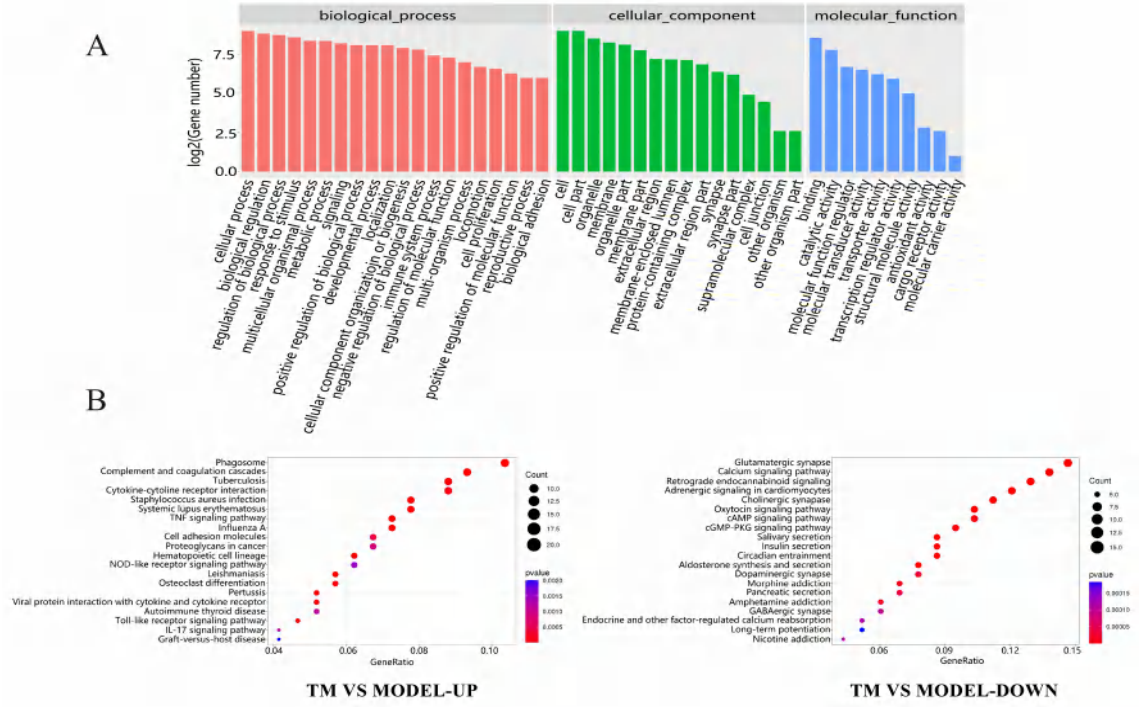


图 5　GO 功能（A）与 KEGG 富集通路（B）分析

Fig 5　GO function（A）and KEGG enrichment pathway（B）analysis

现，特别对于女性患者而言，这种不良反应尤为常见[13]。女性催乳素分泌过多会降低促性腺激素水平，导致患者出现月经不调、乳汁分泌、闭经、多毛、性欲低下等，严重影响患者的生活质量和服药依从性[14-16]。

甜梦口服液能够调节颅内外血管的舒张和收缩功能，使自主神经功能稳定，减轻精神疾病患者症状，是精神科常用的一种中药合剂[17]。有研究已经报道甜梦口服液除了本身的功效外，还可以改善抗精神病药物导致的内分泌代谢紊乱[18]，但现有研究仅简单描述了这一临床发现，并未对具体作用机制进行研究。此外，目前在临床的实际应用中，利培酮与甜梦口服液的联用例数较少，甜梦口服液对于利培酮引起的内分泌代谢紊乱的作用与机制都未被探究。

本研究通过对临床数据的分析发现甜梦口服液可以改善利培酮引起的女性患者甲状腺功能减退及高催乳素水平，且患者的利培酮血药浓度测定结果证明这种效应并不源于甜梦口服液对利培酮血药浓度的影响。为了深入研究这一现象可能的机制，课题组通过大鼠灌胃利培酮复制模型对其进行了进一步确证。在大鼠实验中，利培酮长

期给药引起了雌性大鼠的糖脂代谢紊乱，血糖、TG、TC 及 LDL 水平都有不同程度升高。此外，利培酮还引起了雌性大鼠的甲状腺功能减退及高催乳素现象。而在联用甜梦口服液后，大鼠的甲状腺功能显著恢复，高催乳素现象也有显著改善。脑垂体是 PRL 与甲状腺激素水平的重要调节器官，为了探明甜梦口服液治疗利培酮所致激素代谢紊乱的可能机制，课题组对大鼠的脑垂体进行了转录组学测序及 GO 功能富集与 KEGG 分析。分析认为甜梦口服液发挥药效主要与下调垂体内的信号传递通路有关，如谷氨酸能突触信号通路与钙信号通路。谷氨酸是脑中重要的兴奋性递质，下丘脑通过神经体液调节垂体中的激素分泌，所以谷氨酸能突触信号通路过度激活可能是利培酮所致 PRL 与 TSH 水平异常的原因之一。此外钙信号通路也是重要的信号传递系统，已有研究发现高剂量的钙可以影响下丘脑 - 垂体 - 性腺轴，促进大鼠性早熟 [18]。所以，甜梦口服液对垂体内谷氨酸能突触信号通路与钙信号通路的下调可能是其改善利培酮引起的激素代谢紊乱的重要机制。

综上所述，本研究发现并且证实了联用甜梦口服液可以在一定程度上改善利培酮所致的糖脂代谢及内分泌紊乱，并探究了这一机制可能与抑制垂体信号传递通路有关，其结果为临床药物联用提供了新的参考。但本研究依然存在一定的局限性。首先，样本数据相对局限，研究结果需要样本量大的多中心和纵向研究来进一步验证；其次，考虑到患者疾病的特殊性，研究未结合精神分裂症患者疗效进行进一步分析。后期仍需进一步研究。

参考文献

[1] 蒋长勇，仇玉莹，高营，等 . 精神分裂症未用药者的暴力行为与甲状腺激素、C 反应蛋白的相关性研究 [J]. 神经疾病与精神卫生，2022，28（6）：59-62.

[2] 寇泽刚 . 阿立哌唑、喹硫平和利培酮对精神分裂症患者甲状腺素水平的影响 [J]. 蚌埠医学院学报，2015，40（9）：1184-1185，1188.

[3] 蒋秀兰，戴福强，秦淑国，等 . 利培酮联合小剂量阿立哌唑对精神分裂症患者血清神经递质、糖脂代谢及 BMI 的影响 [J]. 现代生物医学进展，2020，20（7）：1373-1376，1392.

[4] 甜梦口服液（胶囊）临床应用建议专家组 . 甜梦口服液（胶囊）临床应用专家建议 [J]. 精神医学杂志，2019，32（3）：294-298.

[5] 刘佩佩，刘小娟，黄质诚，等 . 甜梦口服液联合舍曲林对改善脑功能减退患者认知功能、焦虑情绪及睡眠障碍的临床研究 [J]. 中草药，2022，53（21）：6805-6809.

[6] 王雪龙，李艳嫣，孟昆 . 逍遥丸对利培酮所致雌鼠高催乳素血症抑制作用的机制研究 [J]. 精神医学杂志，2021，34（4）：300-303.

[7] Smesny S，Gussew A，Biesel NJ，et al. Glutamatergic dysfunction linked to energy and membrane lipid metabolism in frontal and anterior cingulate cortices of never treated first-episode schizophrenia patients [J]. Schizophr Res，2015，168（1-2）：322-329.

[8] 高景娜，崔利军，崔伟，等 . 奥氮平、利培酮及喹硫平对老年精神分裂症患者糖脂代谢及性激素水平的影响 [J]. 中国老年学杂志，2019，39（24）：6046-6048.

[9] 张凤林 . 新型非典型抗精神病药——索乐（利培酮片）[J]. 中南药学，2006，4（3）：237-239.

[10] 范北方，李泽辉，杨硕，等 . 帕利哌酮与利培酮治疗对精神分裂症患者血脂及 Hcy 代谢、内分泌激素影响的差异 [J]. 海南医学院学报，2017，23（21）：3036-3038，3042.

[11] 黄玲，王凤玲，陈力，等 . 基于美国 FAERS 数据库的利培酮不良事件信号挖掘与分析 [J]. 中国药房，2023，34（3）：350-354.

[12] 韩玉娥 . 探讨四种非典型抗精神病药物对精神分裂症患者内分泌激素水平的影响 [J]. 中国处方药，2021，18（5）：79-80.

[13] 谷丽，赵碧香 . 利培酮对女性患者内分泌的副作用及生活质量的影响分析 [J]. 中国医药指南，2012，10（26）：532-533.

[14] 韩玉娥 . 探讨四种非典型抗精神病药物对精神分裂症患者内分泌激素水平的影响 [J]. 中国处方药，2021，18（5）：79-80.

[15] 林虹，于志峰，陈红昊，等 . 甜梦口服液治疗利培酮所致女性精神分裂症患者高催乳素血症的临床研究 [J]. 中草药，2018，49（22）：5373-5377.

[16] 朱月莉，林梅，徐美英，等 . 利培酮所致女性精神分裂症患者乳房不适的原因分析及护理对策 [J]. 护士进修杂志，2017，32（17）：1602-1604.

[17] 王倩，白录东，张明，等 . 甜梦口服液联合非典型抗精神药物治疗对精神分裂症患者血清催乳素和性激素水平的影响 [J]. 中国医药，2018，13（6）：870-874.

[18] 王旭，朱子阳，石星 . 钙对大鼠下丘脑 - 垂体 - 性腺轴功能的影响 [J]. 江苏医药，2012，38（24）：2920-2922.

（收稿日期：2024-03-29；修回日期：2024-06-18）

两种糖尿病肾病大鼠模型的特点及差异研究

郑晓春，邢瀚文，印艳萍，张硕峰*，方芳*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 对比两种造模方法诱导的糖尿病肾病大鼠模型的特点和差异。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组 10 只（正常组），高糖高脂饮食联合单次链脲佐菌素（STZ）诱导组 15 只（联合诱导组，STZ 剂量：30 mg • kg^{-1}），单次大剂量 STZ 诱导组 15 只（STZ 诱导组，STZ 剂量：60 mg • kg^{-1}），检测并对比两种造模方法诱导的糖尿病肾病大鼠在血糖、体重、24 h 尿液量、饮食量、饮水量、尿微量白蛋白、尿总蛋白、尿肌酐、尿微量白蛋白 / 尿肌酐比值（UACR）、血清中血肌酐、尿素氮和内生肌酐清除率等指标及肾脏病理上的差异。**结果** 造模结束后联合诱导组大鼠和 STZ 诱导组大鼠均出现体重降低、血糖升高、饮食饮水量增加、尿蛋白和尿微量白蛋白含量增加、尿肌酐含量降低、尿素氮含量增加、肾功能受损的情况；两模型组比较，STZ 诱导组大鼠饮食饮水量、尿微量白蛋白和尿肌酐含量高于联合诱导组，肾脏病理改变较联合诱导组更为严重。**结论** 两种糖尿病肾病大鼠模型在体重、血糖、肾功能、肾脏病理改变中均有差异，且 STZ 诱导组大鼠肾脏损伤强度高于联合诱导组大鼠。

关键词：糖尿病肾病；动物模型；高糖高脂饮食；链脲佐菌素；差异研究
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2943-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.018

Characterization and differences of two rat models of diabetic nephropathy

ZHENG Xiao-chun, XING Han-wen, YIN Yan-ping, ZHANG Shuo-feng*, FANG Fang* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To compare the characterzation and differences of two rat models of diabetic nephropathy. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into a normal group (10 rats), a high-sugar and high-fat diet combined with a single Streptozotocin (STZ)-induced group (co-induction group, 15 rats, STZ dose: 30 mg • kg^{-1}), and 15 rats in a single high-dose Streptozotocin-induced group (STZ-induced group, STZ dose: 60 mg • kg^{-1}). The differences in blood glucose, body weight, 24 h urine volume, dietary intake, water intake, urinary microalbumin, urinary total protein, urine creatinine, urinary albumin to creatinine ratio (UACR), serum blood creatinine, urea nitrogen, creatinine clearance and renal pathology of diabetic nephropathy rats induced by both modeling methods were detected and compared. **Results** At the end of the modeling, compared with the normal rats, the body weight and urine creatinine content of the rats in the co-induction group and STZ-induced group were decreased, while the blood glucose, diet and water intake, urinary total protein content, urinary microalbumin content, and urea nitrogen content were all increased. The renal function of the rats in co-induction group and STZ-induced group was impaired. Compared with the co-induction group, diet and water intake, urinary microalbumin content and urinary creatinine content were increased in the rats of STZ-induced group, and the renal pathological changes were more severe than those in the co-induction group. **Conclusion** The two rat models of diabetic nephropathy differ in body weight, blood glucose, renal function, and renal pathological changes, and the intensity of renal injury is higher in STZ-induced rats than in the co-induction rats in the same model.

Key words: diabetic nephropathy; animal model; high-sugar and high-fat diet; streptozotocin; differentiation study

作者简介：郑晓春，女，硕士，主要从事中药药理作用与机制研究，email：zxczzzxc@qq.com *通信作者：张硕峰，男，教授，主要从事中医药防治心脑血管疾病研究，email：shuofengzhang@sina.com；方芳，女，副教授，主要从事中药神经药理研究，email：fangf@bucm.edu.cn

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是常见的糖尿病（diabetes mellitus，DM）并发症之一，属于慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD），与心血管疾病有紧密的联系，严重时可导致终末期肾衰竭，致死率较高，临床表现主要是“三多一少”症状、持续性高血糖、蛋白尿、高血压、渐进性肾功能损伤等，其中蛋白尿是 DN 临床主要标志物，DN 病理表现集中在肾小球弥漫性或结节性系膜扩张、足细胞融合或消失、肾小管上皮细胞坏死、肾小管萎缩、间质炎症和纤维化等[1]。临床标准治疗方法为降低血糖、控制血压，西医治疗使用钠 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂、血管紧张素转换酶抑制剂、胰高血糖素样肽 -1 受体激动剂、肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统抑制剂等[2]，但是不可避免地会带来一些不良反应[3]。动物模型能提供 DN 发生发展的一些信息，DN 的动物模型应表现为进行性蛋白尿和肾功能下降，以及在人类 DN 病例中观察到的肾小球和肾小管间质病变的特征性组织学变化[4]。DN 是由多种因素共同作用导致的[5]，且不同阶段病理变化不一样，DM 并发症动物模型联盟为动物模型的开发制订了各种验证标准，这些模型复制了 DM 的基本并发症，然而，目前尚没有动物模型符合 DM 并发症动物模型规定的所有标准[6]。本次研究使用两种方法复制 DN 模型，比较两者在一般指标、血糖、肾功能以及肾脏病理改变上的差异，有助于开发更强大的模拟人类 DN 的动物模型。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，约 180 g [斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010]。饲养在北京中医药大学动物房，温度为（23±2）℃，相对湿度为 40% ～ 60%，12 h 明暗交替，适应性饲养一周后进行实验，其间给予自由饮食与饮水。本次实验符合北京中医药大学动物实验伦理要求，伦理审查编号为 BUCM-4-2023030101-1016。

1.2 试药

高糖高脂饲料配比为：67% 大小鼠维持饲料＋ 10% 猪油＋ 20% 蔗糖＋ 2.5% 胆固醇＋ 0.5% 胆酸钠 [斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2019-0010]。

链脲佐菌素（STZ，美国 Sigma 公司）；无水柠檬酸（北京索莱宝科技有限公司，批号：A20220321）；柠檬酸三钠二水（北京酷来搏科技有限公司，批号：CT29171530）；微量白蛋白检测试剂盒（江苏科特生物科技有限公司，批号：202201）；尿总蛋白检测试剂盒、尿素氮检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

1.3 仪器

卓越精采型（血糖仪）、血糖试纸（罗氏血糖健康医护公司）；酶标仪（赛默飞世尔科技有限公司，型号：MuttiSkan Mk3）；电热恒温培养箱（德国美而特有限公司，型号 TY2017005739）；空气浴振荡器（哈尔滨东明医疗仪器厂，型号：HZQ-C）；组织脱水机（DIAPATH，型号：Donatello）；组织包埋机（武汉俊杰电子有限公司，型号：JB-P5）；病理切片机（上海徕卡仪器有限公司，型号：RM2016）。

2 方法

2.1 实验动物分组及模型建立

40 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 3 组：正常组 10 只（正常组），高糖高脂饮食联合单次 STZ 诱导组 15 只（联合诱导组，STZ 剂量：30 mg • kg^{-1}），单次大剂量 STZ 诱导组 15 只（STZ 诱导组，STZ 剂量：60 mg • kg^{-1}）。联合诱导组大鼠饲喂高糖高脂饲料 4 周后，隔夜禁食不禁水 12 h，根据体重单次注射 30 mg • kg^{-1} 的 1%STZ 溶液；STZ 诱导组大鼠适应性饲养后，隔夜禁食不禁水 12 h，根据体重一次性注射 60 mg • kg^{-1} 的 1%STZ 溶液；正常组大鼠注射等体积缓冲溶液。大鼠注射 STZ 溶液 72 h 后尾静脉采血，检测随机血糖 ≥ 16.7 mmol • L^{-1} 即为 DM 造模成功[7]。两组大鼠 DM 造模成功后继续喂养 7 周。整个实验期间联合诱导组一直以高糖高脂饲料喂养；正常组和 STZ 诱导组大鼠以普通维持饲料喂养。在 DM 造模成功 2 周后，每周测量一次大鼠体重和禁食 12 h 空腹血糖。

2.2 大鼠饮食饮水量测定

各组大鼠 DM 造模成功 2 周后，每日固定时间称量每笼加入饲料总量和测量加入饮用水的总体积，在第二日同一时间测量该笼剩余饲料总量和剩余饮用水总体积，计算每组平均每只鼠的饮食量和饮水量，每 7 日相加并求平均值，得到最终每组平均每只鼠每日饮食量和饮水量。

2.3 肾功能指标检测

在 DM 造模成功 3 周、5 周、7 周时，大鼠用代谢笼收集 24 h 尿液，用量筒测量总体积，取 10 mL 尿液，3000 r • min^{-1}、4 ℃条件下离心 10 min 并取上清液；生化法检测尿液中尿蛋白和尿肌酐含量；ELISA 法检测 7 周尿液中的尿微量白蛋白含量，计算尿微量白蛋白 / 尿肌酐比值（UACR）。

用 1.5% 的戊巴比妥钠以 3 mL • kg^{-1} 的剂量使大鼠处于深度麻醉状态，剪开大鼠腹腔，腹主动脉取血，静置 2 ～ 4 h 后，4 ℃、3500 r • min^{-1} 离心 10 min，取上层血清后，生化法检测血清中血肌酐和尿素氮含量，计算内生肌酐清除率（Ccr，单位：mL • h^{-1}）＝尿肌酐（mmol • L^{-1}）× 尿液体积（mL）/ 血肌酐（mmol • L^{-1}）/24（h）。

2.4　组织病理学变化检测

取大鼠新鲜肾组织固定在多聚甲醛溶液中，固定好后用手术刀将组织修剪成所需大小，置于包埋盒中用大量流水冲洗，随后置于脱水机中用梯度乙醇脱水，二甲苯透明，用石蜡进行包埋，切片机切片，厚度为 4 mm。分别进行 HE 染色和 PAS 糖原染色，进行组织病理学检查，观察各组大鼠肾组织病理变化。HE 染色根据肾小管坏死情况和炎细胞浸润进行组织学评分，PAS 染色根据肾小球系膜增殖和肾小管基底膜增厚情况进行评分，标准为正常（0 分）、轻微（1 分）、轻度（2 分）、中度（3 分）、重度（4 分）。

2.5　统计学方法

各数据均用平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，运用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行分析，组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），$P < 0.05$ 表示数据有统计学意义，采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行作图。

3　结果

3.1　各组大鼠一般状态观察

正常组大鼠比较活泼，皮毛干净；联合诱导组大鼠状态一般，腹腔血液中出现乳糜血情况，DM 模型组 7 周后死亡率为 73.33%；STZ 诱导组大鼠状态较差，皮毛有污染，背部拱起，脊柱突出，DM 模型组 7 周后死亡率为 53.33%。

3.2　各组大鼠体重变化

在 DM 造模成功 2 周之后，STZ 诱导组大鼠体重显著低于正常组、联合诱导组（$P < 0.01$）；造模成功 3 周和 7 周时，联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠体重显著低于正常组（$P < 0.01$），STZ 诱导组体重显著低于联合诱导组（$P < 0.01$）。结果见图 1。

3.3　各组大鼠血糖值

联合诱导组大鼠在造模成功 2 周后血糖即达到了一定的高度，随后几周血糖值变化不大；STZ 诱导组大鼠血糖值在 DM 造模成功后 4 周内呈上升趋势，直到第 4 周才达到一定的高度；在造模成功 2 周和 3 周时，STZ 诱导组大鼠血糖值明显低于联合诱导组（$P < 0.01$），结果见图 2。

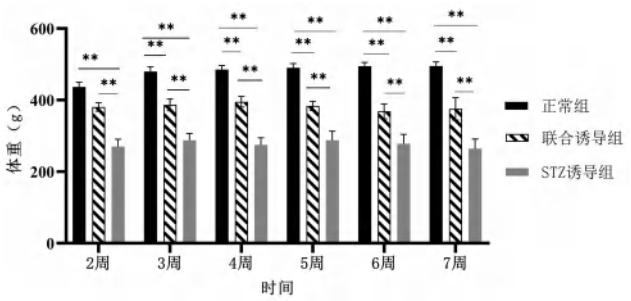


图 1　各组大鼠造模成功后体重变化（$^{**}P < 0.01$）

Fig 1　Changes in weight after successful modeling in each group of rats（$^{**}P < 0.01$）

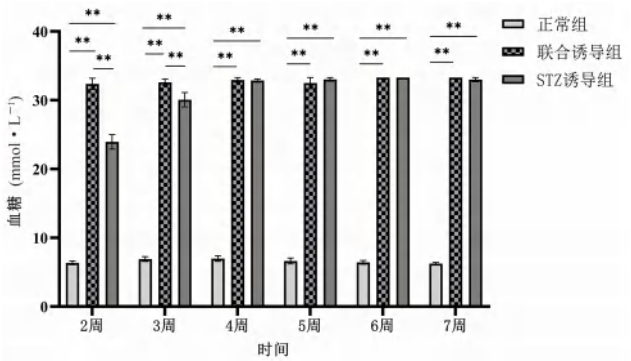


图 2　各组大鼠血糖值变化（$^{**}P < 0.01$）

Fig 2　Changes in blood glucose of rats in various groups（$^{**}P < 0.01$）

3.4　各组大鼠饮食变化比较

与正常组大鼠比较，STZ 诱导组大鼠从造模 3 周开始饮食量明显增加（$P < 0.01$），联合诱导组大鼠从造模 4 周开始饮食量明显增加（$P < 0.01$）；造模后 3、5、6 周，STZ 诱导组大鼠饮食量明显高于联合诱导组（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。结果见图 3。

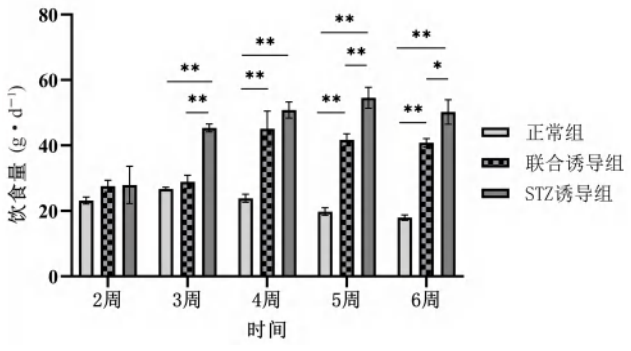


图 3　各组大鼠饮食量变化（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 3　Changes in the amount of diet of rats in each group（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

3.5　饮水变化比较

与正常组大鼠比较，STZ 诱导组大鼠从造模 2 周开始饮水量明显增加（$P < 0.01$），联合诱导组大鼠从造模 3 周开始饮水量均明显增加（$P < 0.01$）；造模后 2、3、5 和 6 周，STZ 诱导组大鼠饮水量明显高于联合诱导组（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。结果见

图 4。

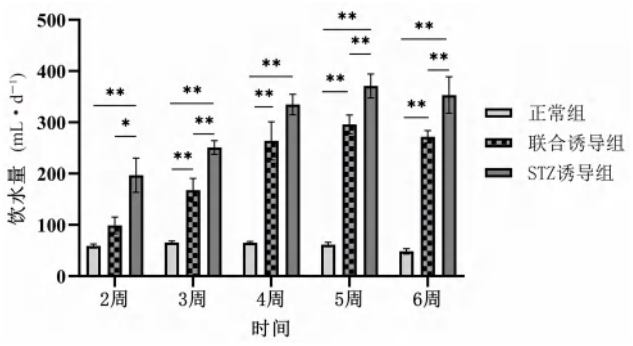


图 4 各组大鼠饮水量变化（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 4 Changes in water intake of rats in each group（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

3.6 造模 3 周和 5 周时各组大鼠 24 h 尿液总体积、尿蛋白、尿肌酐含量

造模 3、5 周时，与正常组大鼠比较，联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠 24 h 尿液总体积明显增加（$P < 0.01$）、尿肌酐明显降低（$P < 0.01$），联合诱导组大鼠尿蛋白含量明显增加（$P < 0.05$），STZ 诱导组大鼠尿蛋白含量在 3 周有增加趋势，在 5 周时明显增加（$P < 0.01$）；联合诱导组与 STZ 诱导组大鼠的尿液总体积、尿蛋白和尿肌酐含量差异无统计学意义。结果见图 5。

3.7 造模 7 周时各组大鼠 24 h 尿液总体积、尿蛋白、尿肌酐和尿微量白蛋白含量以及 UACR 值

与正常组大鼠比较，联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠 24 h 尿液总体积和尿微量白蛋白含量明显增加（$P < 0.01$）、尿肌酐含量明显减少（$P < 0.01$），STZ 诱导组大鼠尿蛋白、UACR 比值明显增加（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；STZ 诱导组大鼠尿微量白蛋白含量较联合诱导组大鼠明显增加（$P < 0.05$）。结果见图 6。

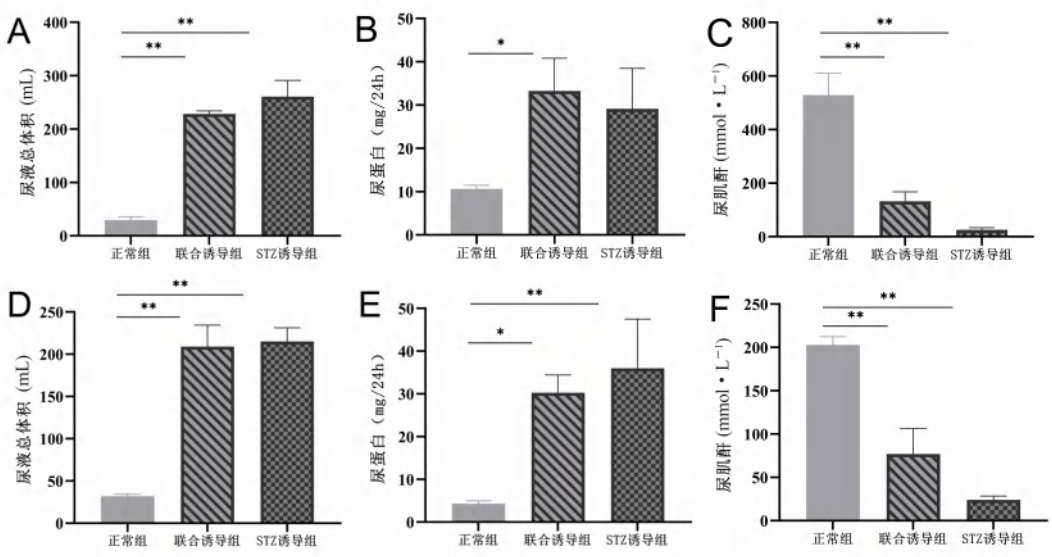


图 5 造模 3 周（A ～ C）和 5 周（D ～ F）时大鼠 24 h 尿液总体积、尿蛋白和尿肌酐含量（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 5 Total 24 h urine volume，urinary protein and urinary creatinine content of rats at 3 weeks（A ～ C）and 5 weeks（D ～ F）after modeling（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

3.8 血清中血肌酐、尿素氮含量和内生肌酐清除率

与正常组大鼠比较，联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠血清中尿素氮含量明显增加（$P < 0.01$），血肌酐含量有增加趋势但差异无统计学意义，内生肌酐清除率有降低趋势但差异无统计学意义；联合诱导组大鼠和 STZ 诱导组大鼠血清中血肌酐、尿素氮含量和内生肌酐清除率差异无统计学意义。结果见图 7。

3.9 病理结果

HE 染色结果显示，正常组大鼠肾脏结构完整，近曲小管和远曲小管以及透明管结构完整，肾小球及鲍曼囊未见明显异常，集合管 / 肾乳头未见明显异常；联合诱导组大鼠管腔间质增宽，系膜扩张；STZ 诱导组大鼠肾小管上皮坏死，上皮结构消失，细胞质消失，出现炎细胞浸润（见图 8）。病理评分结果显示，与正常组大鼠比较，联合诱导组及 STZ 诱导组大鼠评分增加明显（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；STZ 诱导组大鼠病理评分显著高于联合诱导组（$P < 0.05$）。结果见图 9。

PAS 染色结果显示，正常组大鼠肾小球肾小管结构清晰，未见明显异常；联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠均可见肾小球系膜区扩张，系膜细胞增殖，肾小管基底膜增厚。病理评分结果显示，

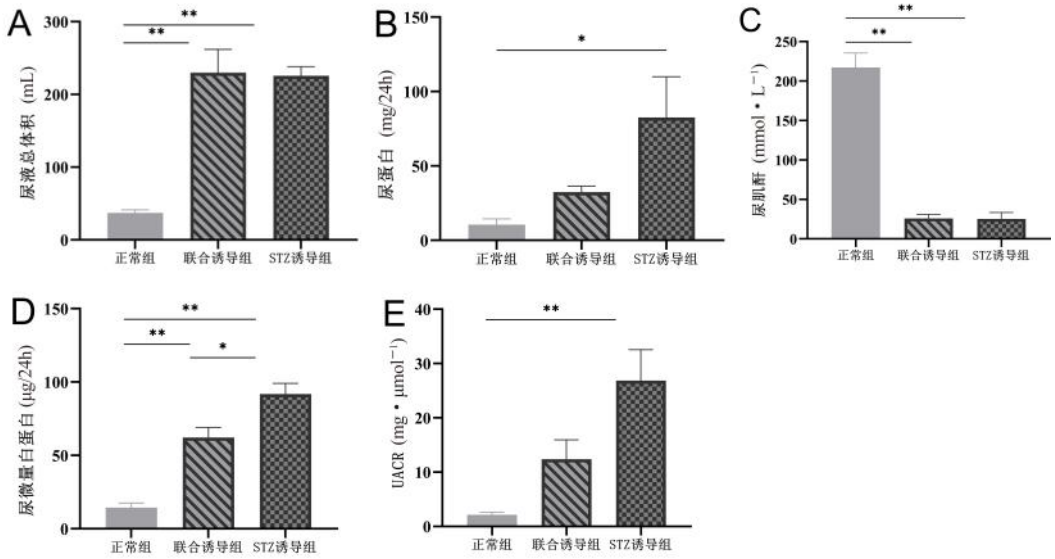


图 6　大鼠 24 h 尿液总体积、尿蛋白、尿肌酐、尿微量白蛋白含量以及 UACR 值（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 6　Total urine volume at 24 h，urine protein，urine creatinine，urine microalbumin content and UACR ratio in rats（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

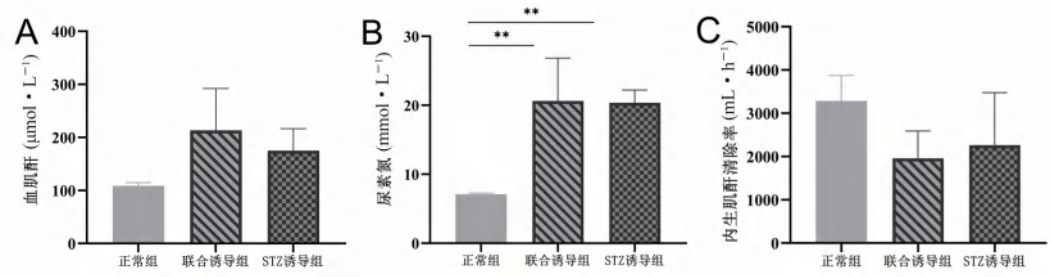


图 7　大鼠血清中血肌酐、尿素氮含量和内生肌酐清除率（$^{**}P < 0.01$）

Fig 7　Levels of serum creatinine and urea nitrogen and endogenous creatinine clearance rate in the rats（$^{**}P < 0.01$）

联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠病理评分均显著高于正常组（$P < 0.01$），两组间病理评分差异无统计学意义。结果见图 9。

4　讨论

4.1　两种 DN 大鼠模型在模型类别中的特点及差异

DN 是由 DM 进展而来，长期的高血糖状态会导致糖脂代谢紊乱，对肾脏产生毒性，从而损伤肾小球和肾小管。从广义上讲，DM 主要分为 1 型 DM 和 2 型 DM。1 型 DM 病理学特征是胰岛 β 细胞数量减少或者消失所导致的胰岛素分泌减少或消失；2 型 DM 的病理学特征是胰岛素抵抗伴随胰岛 β 细胞功能缺陷所导致的胰岛素分泌较少 [7-8]。1 型 DN 模型的建立方法大致分为三类，即识别自发发展的 1 型 DM 菌株，通过基因转移技术创造糖尿病易感物种，以及通过化学或手术手段强制破坏胰岛细胞；2 型 DN 模型的建立方法主要有高糖高脂饮食联合化学药物诱导模型、自发性 DN 模型、转基因模型或敲基因模型等 [9]，然而后三种模型经济成本较高，且 ob/ob 小鼠和 db/db 小鼠两种模型虽然都表现出类似于人类 DN 早期阶段的典型特征（包括高胰岛素血症、白蛋白尿和高血糖），然而，模型没有出现进行性肾功能障碍，因此无法表现出 DN 的晚期特征 [10]。本研究中直接注射 STZ 溶液诱导 DN 更符合 1 型 DN 的特点，通过长时间高糖高脂饮食诱导胰岛素抵抗，再注射 STZ 溶液诱导更符合 2 型 DN 的发病特点。

4.2　两种 DN 大鼠模型在饮食、饮水量和尿液体积中的特点及差异

DM 典型症状“三多一少”：多饮、多食，多尿和体重减少，本研究中，联合诱导组大鼠和 STZ 诱导组大鼠在造模成功 2 周后均出现摄食量增加、饮水量增加、尿液增加、体重减轻的情况，且 STZ 诱导组大鼠的摄食量和饮水量明显高于联合诱导组。基因易感性以及环境暴露在疾病进展中起着重要作用 [11]。联合诱导组大鼠在上代谢笼时由于温度的差异，造成了大鼠不必要的死亡，排除这个因素之后，联合诱导组大鼠死亡率与 STZ 诱导组大鼠相当，在后续研究中也应注意温度对大鼠状态的影响。

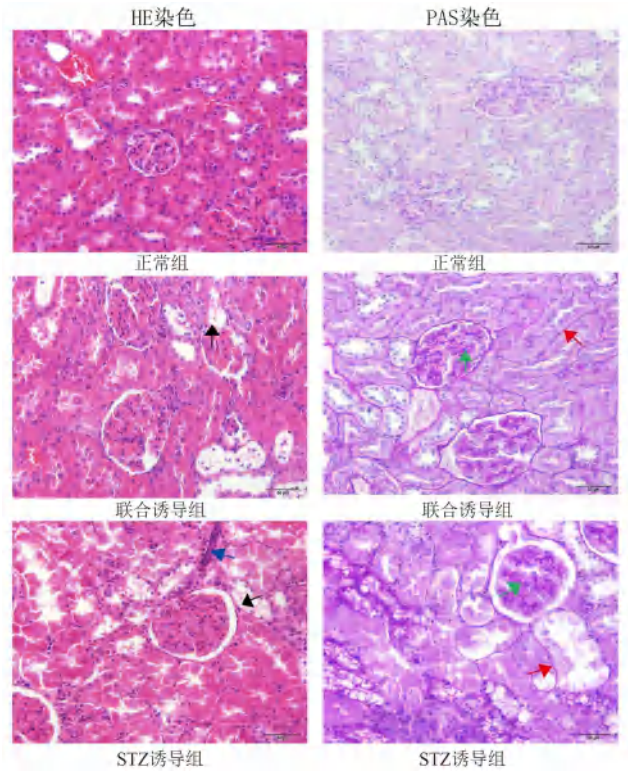


图 8 各组大鼠肾组织病理学检查结果（×400）

Fig 8 Histopathological examination of rat kidney in each group（×400）

注（Note）：黑色箭头 . 肾小管上皮坏死；蓝色箭头 . 炎细胞浸润；绿色箭头 . 系膜区扩张；红色箭头 . 肾小管基底膜增厚（black arrows. tubular epithelial necrosis；blue arrows. inflammatory cell infiltration；green arrows. mesangial zone dilation；red arrows. tubular basement membrane thickening）。

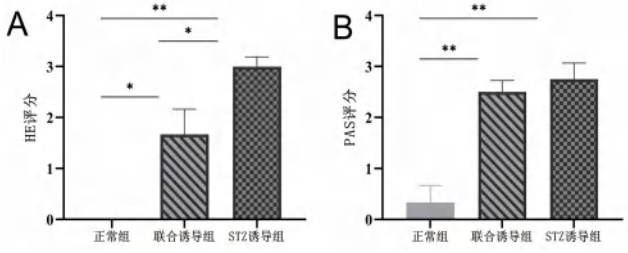


图 9 各组大鼠肾组织病理学 HE 和 PAS 染色评分（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

Fig 9 HE and PAS staining scores of rat renal histopathology in each group（$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）

4.3 两种 DN 大鼠模型在肾功能和肾脏病理改变上的特点及差异

中国 2 型糖尿病防治指南中推荐 24 h 尿蛋白定量和血清肌酐等作为肾病诊断标准[12]。黄湘宁等[13]通过检索近 10 年国内外文献发现，在肾功能指标的选择上，血肌酐或血尿素氮使用最为频繁，且 DN 成模标准的选择主要为 24 h 尿蛋白定量、24 h 尿微量白蛋白定量和尿白蛋白排泄率。本次实验选择尿蛋白、尿肌酐、尿微量白蛋白、UACR、血肌酐、尿素氮、内生肌酐清除率作为判断大鼠肾功能指标，并用组织病理学染色来观察大鼠肾脏损伤情况。结果显示，造模 3 ～ 7 周时，联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠尿液体积无明显变化；联合诱导组大鼠尿蛋白含量无明显变化，STZ 诱导组尿蛋白含量呈现逐渐增加的趋势，在造模 7 周时，STZ 诱导组大鼠尿蛋白平均值约为正常组的 7.8 倍，约为联合诱导组的 2.5 倍；联合诱导组大鼠的尿肌酐逐渐降低，由 STZ 诱导组大鼠的 5 倍逐渐降至与 STZ 诱导组平行，STZ 诱导组大鼠尿肌酐无明显变化。造模 7 周时，联合诱导组大鼠和 STZ 诱导组大鼠的尿微量白蛋白含量较正常组明显增加，但 STZ 诱导组大鼠尿微量白蛋白含量明显高于联合诱导组；联合诱导组大鼠和 STZ 诱导组大鼠的血尿素氮含量显著高于正常组，血肌酐与正常组无显著差异，STZ 诱导组大鼠 UACR 明显高于正常组，联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠的血肌酐、尿素氮、UACR 和内生肌酐清除率无显著差异。HE 染色结果显示，两组大鼠均出现肾小管上皮坏死的情况，但 STZ 诱导组大鼠肾小管细胞坏死较联合诱导组大鼠更为严重，STZ 诱导组大鼠病理评分较联合诱导组有显著增加。PAS 染色结果显示，两组大鼠均出现肾小球系膜扩张，肾小管基底膜增厚，且两组大鼠肾小管基底膜增厚的病理评分差异无统计学意义。DN 临床诊断标准为若尿蛋白＞ 30 mg/24 h 即可诊断为 DN[14]，由此判断造模 3 周时联合诱导组和 STZ 诱导组大鼠已进展为 DN。根据《中国糖尿病肾脏病防治指南（2021 年版）》[15]，使用 UACR 反映尿白蛋白排泄情况，UACR 0.003 mg • $mmol^{-1}$ 为正常（a1 期），UACR 0.003 ～ 0.029 mg • $mmol^{-1}$ 为微量白蛋白尿（a2 期），UACR ≥ 0.3 mg • $mmol^{-1}$ 为大量白蛋白尿（a3 期）；根据肾脏病理改变将肾小球损伤分为 4 级，Ⅰ级为单纯肾小球基底膜增厚，Ⅱa 级为轻度系膜基质增宽，Ⅱb 级为重度系膜基质增宽，Ⅲ级为结节状硬化，Ⅳ级为晚期糖尿病肾小球硬化。根据本实验结果，造模 7 周时，两组大鼠均进入大量白蛋白尿时期，联合诱导组肾脏损伤更符合Ⅱa 级，STZ 诱导组肾脏损伤更符合Ⅱb 级。这表明同样的时间，直接单次注射大剂量的 STZ 诱导的 DN 模型比高糖高脂饮食联合小剂量 STZ 诱导的 DN 模型肾损伤更为严重。若想复制符合人类 DN 晚期的模型可适当延长时间，但应注意延长时间也会造成动物死亡率的增加。

4.4 两种 DN 大鼠模型在血脂中的特点及差异

血脂代谢紊乱是 DN 发病机制之一，血脂代谢紊乱会直接或间接地损伤肾小球毛细血管、肾小管细胞和肾小球系膜细胞等[16]，被认为是 2 型 DM 合并 DN 的独立危险因素[17]。当肝脏合成过多脂蛋白而体内清除脂质发生障碍时，DN 会并发高脂血症[18]。高脂血症患者体内运输脂蛋白的乳糜颗粒会增加，血液中含有大量的脂肪，从而存在乳糜血。本研究中，联合诱导组大鼠出现血浆的颜色为乳白色的情况，STZ 诱导组大鼠未见此情况。研究显示，高脂血症患者出现乳糜血情况时对血常规指标的检测有影响[19]，如果研究时需要避免高脂血症或者血常规指标要求更高时，可以选择 STZ 诱导组大鼠造模方法或者适当减少高糖高脂饲料饲喂时间。

5 结论

综上所述，两种方法建立的 DN 肾病大鼠模型在体重、血糖、饮食饮水量、肾功能以及病理改变上各有其特点和差异，研究时可根据所需模型的类型、是否合并高血脂血症、肾脏功能损伤程度选择相应的模型。

参考文献

[1] Qi CY，Mao X，Zhang ZG，et al. Classification and differential diagnosis of diabetic nephropathy [J]. J Diabetes Res，2017，2017：8637138.

[2] Samsu N. Diabetic nephropathy：challenges in pathogenesis，diagnosis，and treatment [J]. Biomed Res Int，2021，2021：1497449.

[3] 谭莹，李楠，严倩华，等 . 含雷公藤甲素的 3 种中成药治疗糖尿病肾病的机制及临床应用进展 [J]. 中成药，2023，45（12）：4049-4056.

[4] Kitada M，Ogura Y，Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy：their utility and limitations [J]. Int J Nephrol Renovasc Dis，2016，9：279-290.

[5] 孟继娴，刘蕾，甄紫伊，等 .2 型糖尿病患者糖尿病肾病发生风险预测模型的研究进展 [J]. 沈阳医学院学报，2023，25（5）：525-528.

[6] Talukdar A，Basumatary M. Rodent models to study type 1 and type 2 diabetes induced human diabetic nephropathy [J]. Mol Biol Rep，2023，50（9）：7759-7782.

[7] 晏玲，牛晓静，张利芳 . 糖肾煎通过促进 SIRT1 介导的自噬对糖尿病肾病大鼠的治疗作用 [J]. 山西医科大学学报，2022，53（2）：209-214.

[8] 中华医学会糖尿病学分会 . 中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）（上）[J]. 中国实用内科杂志，2021，41（8）：668-695.

[9] 王倩茹，侯久文，梅其炳 . 人类肾脏疾病动物模型研究进展 [J]. 神经药理学报，2023，13（4）：29-35.

[10] Liang JQ，Liu YH. Animal models of kidney disease：challenges and perspectives [J]. Kidney360，2023，4（10）：1479-1493.

[11] Abu SN，Othman SH. Recent progress in genetics and epigenetics research on diabetic nephropathy in Malaysia [J]. J Diabetes Res，2023，2023：9053580.

[12] 中华医学会糖尿病学分会 . 中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）（下）[J]. 中国实用内科杂志，2021，41（9）：757-784.

[13] 黄湘宁，王屹菲，俞赟丰，等 . 基于文献的糖尿病肾病动物模型应用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29（13）：188-196.

[14] 吴畏 . 糖尿病肾病的治疗进展 [J]. 中国城乡企业卫生，2022，37（4）：51-54.

[15] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组 . 中国糖尿病肾脏病防治指南（2021 年版）[J]. 中华糖尿病杂志，2021，13（8）：762-784.

[16] 刘睿，刘扬，符庆瑛，等 . 糖尿病肾脏病与血脂异常相关性研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志，2019，20（4）：321-323.

[17] 张晓苹，曾屏，李春娣，等 . 脂代谢异常与糖尿病肾脏疾病关系与机制研究进展 [J]. 世界临床药物，2022，43（7）：927-931.

[18] 张琳 . 血脂康胶囊联合盐酸二甲双胍片治疗早期糖尿病肾病合并高脂血症疗效观察 [J]. 实用中医药杂志，2023，39（11）：2169-2171.

[19] 苏金花 . 高脂血症患者乳糜血对于血常规检测结果的影响 [J]. 深圳中西医结合杂志，2018，28（7）：65-66.

（收稿日期：2024-02-26；修回日期：2024-04-26）

苦瓜提取物改善柴油尾气颗粒暴露诱导的小鼠糖脂代谢紊乱

唐翎[1, 2]，张婷[1]，肖玲芳[1]，魏伟[3*]（1. 中南大学湘雅医院药学部，长沙 410008；2. 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心，长沙 410008；3.中南大学湘雅医院普外科，长沙 410008）

摘要：目的 探讨苦瓜提取物对柴油尾气颗粒（DEP）诱导糖脂代谢异常的影响及作用机制。**方法** 建立小鼠 DEP 暴露诱导的代谢紊乱动物模型，给予苦瓜提取物 500 mg/（kg·d）灌胃处理 12 周。观察小鼠的体重、空腹血糖水平、胰岛素敏感性等糖代谢指标；小鼠总胆固醇、三酰甘油等脂肪代谢指标；并对胰腺和肝脏进行组织学检测，分析胰岛的面积和数量、肝脏的质地、组织学变化和脂质含量等指标。**结果** 与 DEP 组相比，苦瓜提取物处理组小鼠体重增长较快，小鼠葡萄糖耐量（IPGTT）和空腹胰岛素水平显著改善，脂肪代谢指标也有改善。组织学分析结果显示，苦瓜提取物可减少 DEP 引起的胰腺胰岛面积增加，改善胰岛密度，降低肝脏脂质沉积。**结论** 苦瓜提取物能够有效延缓由 DEP 滴注诱导的小鼠代谢紊乱，降低动物血糖水平，增加胰岛素敏感性，改善脂肪代谢指标。

关键词：苦瓜提取物；柴油尾气颗粒；糖脂代谢紊乱；代谢性疾病
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2950-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.019

Effect of *Momordica charantia* (Bitter melon) extract on glucose and lipid metabolism disorder induced by diesel exhaust particles in mice

TANG Ling[1, 2], ZHANG Ting[1], XIAO Ling-fang[1], WEI Wei[3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 2. *National Research Center for Geriatric Disorders*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008; 3. *Department of General Surgery*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008)

Abstract: Objective To determine the effect of Bitter melon (BM) extract on glucose and lipid metabolism disorder induced by diesel exhaust particle (DEP) and its mechanism. **Methods** Mouse models of metabolic diseases was induced by DEP exposure. Then, the mice were administered with BM extract at 500 mg/(kg • d) for 12 weeks. Some glucose metabolism indicators such as weight, fasting blood glucose level, and insulin sensitivity, and some lipid metabolism indicators such as total cholesterol and triglyceride were carefully recorded and compared. In addition, we also histologically examined the pancreas and the liver, and analyzed some important parameters such as the area and number of islets, texture of the liver, histological changes and lipid content. **Results** Compared with the DEP group, the mice treated with BM extract gained weight more quickly, and their intraperitoneal glucose tolerance tests, fasting insulin levels, and lipid metabolism indicators were obviously improved. Histological analysis showed that the BM extract reduced DEP-induced increase in islet area, improved islet density and decreased lipid deposition in the liver. **Conclusion** BM extract can effectively alleviate metabolic disorders induced by DEP in mice, decrease blood glucose level, increase insulin sensitivity, and improve lipid metabolism indexes.

Key words: *Momordica charantia* extract; diesel exhaust particle; glucose and lipid metabolism disorders; metabolic disease

基金项目：湖南省自然科学基金科药联合基金（No.2021JJ80085）。
作者简介：唐翎，女，副主任药师，主要从事内分泌代谢性疾病的临床与基础研究，email：tangling82@126.com *通信作者：魏伟，男，副主任医师，主要从事胰腺疾病临床与基础研究，email：weiweidoctor@126.com

糖尿病是主要的慢性疾病之一，据国际糖尿病联盟 2021 年统计 [1]，全球有 5.37 亿成年人患糖尿病，其中中国有约 1.41 亿，约占全球的 1/4。我国 2017 年数据显示糖尿病患病率达 11.2%[2]，其中，90% 以上是 2 型糖尿病，且年轻患者发病率显著增加 [3]。同时，由于能量代谢紊乱，饮食构成变化，我国高脂血症的发病率也呈快速增长趋势 [4]。以上疾病均可引发心血管、神经系统等多器官并发症，对经济与医疗造成极大的负担。了解疾病的致病因素及机制是有效控制代谢性疾病的前提和基础。除饮食习惯改变、肥胖、缺乏运动等个人因素外，近几十年变化的环境因素在糖尿病等代谢性疾病的发生发展过程中的作用也日益引起重视。Li 等 [5] 对 69 210 例无糖尿病史的成年人进行横断面研究，结果显示 $PM_{2.5}$ 的 3 年平均浓度与糖尿病成正相关；Lv 等 [6] 对中国 13 省的 113 159 例患者的研究发现，暴露于 $PM_{2.5}$ 与高血压患病率显著相关；Zheng 等 [7] 对广东省 6628 例患者进行了慢性病危险因素监测的调查，结果显示高三酰甘油和空腹血糖与 $PM_{2.5}$ 水平相关。大量流行病学研究显示，$PM_{2.5}$ 暴露显著增加糖尿病、高血压、高血脂等代谢性疾病的发病率 [8-10]。毒理学研究也提示 $PM_{2.5}$ 暴露可引起代谢综合征 [11]。研究显示，$PM_{2.5}$ 暴露引起小鼠内脏脂肪堆积、脂肪组织炎症、胰岛素抵抗等糖代谢和脂代谢相关症状 [12-13]，在大鼠模型中 $PM_{2.5}$ 也显著增加高脂饮食引起的肥胖和胰岛素抵抗症状 [14]。这些研究结果均表明，$PM_{2.5}$ 暴露是 2 型糖尿病与高脂血症的一个重要危险因素，$PM_{2.5}$ 导致的代谢性疾病如何治疗值得关注。$PM_{2.5}$ 的一个重要来源为柴油车尾气，通过柴油尾气颗粒（diesel exhaust particle，DEP）经鼻腔滴注可模拟 $PM_{2.5}$ 对机体的影响，是研究空气污染导致代谢性疾病的常用动物模型 [15-17]。

苦瓜提取物来源于苦瓜，在传统中医药中用于消渴症（糖尿病）。苦瓜提取物可改善 2 型糖尿病患者空腹血糖水平，增加胰岛素敏感性，减轻患者口渴多饮等糖尿病症状 [18]。苦瓜在四氧嘧啶及链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）诱导的糖尿病小鼠中提示均可改善胰岛素抵抗，提高胰岛素水平 [19-20]。研究也表明苦瓜提取物在相关动物模型中有降血脂的作用 [21-22]。目前的研究均未考虑环境因素，因此，苦瓜提取物可否改善空气污染引起的高血糖和高脂血症，是一个值得研究的问题。本文通过苦瓜提取物处理 DEP 诱导的小鼠代谢紊乱模型，探讨其对糖代谢和脂肪代谢的影响及机制，以期为预防和治疗代谢相关性疾病开拓新思路。

1 材料

1.1 动物

6 ～ 7 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 40 只 [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物许可证号：SCXK（湘）2019-0004]，遵守国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》和卫健委发布的《医学实验动物管理实施细则》，在温度 22 ℃、环境湿度 40% ～ 60% 的环境内饲养，12 h 白天 /12 h 夜晚 / 周期，自由摄取水和饮食。

1.2 试药

苦瓜提取物（西安晋恒化工有限公司，批号 JH20221019，规格：1000 g/ 袋）；柴油颗粒物标准品（NIST，SRM 2975）；β-actin（Proteintech 公司）；总 AKT 抗体、磷酸化 AKT1（p-AKT1）抗体（abcam 公司）；IRS-1 抗体、磷酸化 IRS-1（p-IRS-1）（Ser307）抗体、ApoE 兔克隆单抗、PPARγ 兔克隆单抗（Cell Signaling Technology 公司）；小鼠胰岛素（INS）ELISA 试剂盒、三酰甘油（TG）、高密度脂蛋白（HDL）、总胆固醇（TC）ELISA 试剂盒（上海瑞番生物科技有限公司）。

2 方法

2.1 DEP 滴注

柴油颗粒物标准品 400 μg 混悬于 1 mL PBS 中，在每次使用前超声处理 20 min 作为药物备用（此后均称 DEP）。DEP 滴注操作程序参考文献 [15-16]。小鼠用乙醚麻醉后，50 μL DEP 溶液（20 μg/50 μL）注射入气管插管中，随后注入 150 μL 空气以保证溶液存留在气道内。小鼠随后移除气管插管，保持垂直位置约 1 min 以保证无气管反流。DEP 处理为每星期 3 次，持续 12 周。此剂量相当于 $PM_{2.5}$ 暴露值为 150[23]。对照组采用等剂量 PBS 滴注。

2.2 苦瓜提取物处理

苦瓜提取物按 10 g • dL^{-1} 溶于 PBS 中，灌胃剂量 500 mg/（kg • d）[20，24-25]。对照组采用同等体积 PBS 灌胃。共分为以下四组：PBS 对照组（PBS 组）、DEP 模型组（DEP 组）、PBS 苦瓜提取物处理组（PBS-BM 组）、DEP 苦瓜提取物处理组（DEP-BM 组），共连续处理 12 周（鼠龄为 9 ～ 20 周，每组 10 只小鼠）。

2.3 小鼠糖代谢指标检测

2.3.1 空腹血糖测定及糖耐量实验 小鼠禁食过夜后，于早晨开始尾静脉采血测空腹血糖。随即

对小鼠腹腔注射 20% 葡萄糖（2 g·kg^{-1}），于注射后 15、30、60 和 120 min 时采尾端血检测血糖。

2.3.2 胰岛素耐受实验 小鼠禁食 4 h 后，采尾端血测血糖值。随后小鼠腹腔注射胰岛素，于注射后 15、30、60 和 120 min 时采尾端血检测血糖。

2.3.3 胰岛素水平检测 采集小鼠空腹静脉血，常温分离血清，采用高敏感度小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒测胰岛素浓度。

2.4 小鼠组织学检测

12 周实验结束后，小鼠麻醉处死，心脏取血留取血液样品，分离胰腺与肝脏，胰腺取胰头，肝脏取右叶边缘部位用 37% 甲醛溶液固定，其余标本置液氮冷冻，－ 80 ℃保存。组织进行 HE 和油红染色。在胰腺中，每个小鼠随机选取 10 个视野，统计平均胰腺个数和平均胰腺面积（Image J）。

2.5 Western blot 检测

以上标本取 200 μg 低温 RIPA 裂解液处理提取总蛋白，BSA 法测定蛋白浓度后 SDS-PAGE 电泳分离蛋白，转膜封闭，加入 p-AKT（抗体浓度 1∶1000），总 AKT（抗体浓度 1∶1000），p-IRS-1（抗体浓度 1∶1000），IRS-1（抗体浓度 1∶1000），*β*-actin（抗体浓度 1∶1000）一抗 4 ℃过夜后加入相应二抗（抗体浓度 1∶5000），ECL 显影并留存影像资料。

2.6 数据分析与处理

实验数据由 $\bar{x}\pm s$ 表示，影像学实验数据通过 Image J 进行灰度分析。组间差异采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验分析。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 苦瓜提取物对空气污染暴露小鼠体重增长的影响

苦瓜提取物和 DEP 滴注的处理过程（见图 1A），小鼠体重结果显示（见图 1B），PBS 组增长正常；与 PBS 组比较，DEP 组增长较缓；在持续暴露 12 周后，与 PBS 组比较，PBS-BM 组体重增长差异无统计学意义；与 DEP 组比较，DEP-BM 组小鼠在灌胃 4 周后差异有统计学意义（$P < 0.05$），DEP-BM 组体重增长 8.37%（$P < 0.01$）。

3.2 苦瓜提取物对空气污染暴露小鼠糖代谢的影响

空腹血糖实验结果表明，PBS、DEP、PBS-BM 和 DEP-BM 组间差异无统计学意义。经腹腔注射 20% 葡萄糖 30 min 后，血糖分别为 PBS 组 179.09 mg·dL^{-1}，DEP 组 316.60 mg·dL^{-1}，PBS-BM 组 215.16 mg·dL^{-1}，DEP-BM 组 275.01 mg·dL^{-1}。

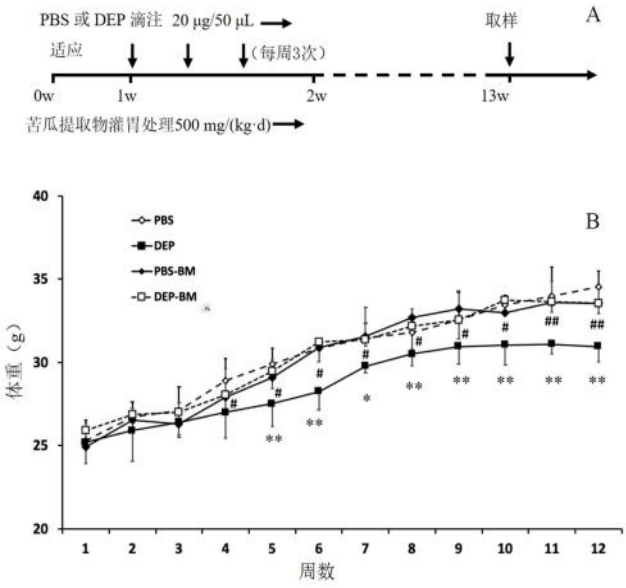


图 1 苦瓜提取物和 DEP 滴注的处理过程（A）及小鼠的体重改变（B）（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

Fig 1 Treatment process of BM extract and DEP infusion（A）and weight change in mice（B）（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

注：与 PBS 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DEP 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

小鼠葡萄糖耐量结果显示（见图 2A），与 PBS 组比较，DEP 组小鼠血糖升高（$P < 0.05$）；与 DEP 组比较，DEP-BM 组小鼠在 30 min 与 60 min 时的血糖值分别降低 13% 与 12%（$P < 0.05$）；与 PBS 组比较，PBS-BM 组差异无统计学意义。基于以上结果，对各组小鼠进行胰岛素耐受实验（见图 2B）。结果与 DEP 组比较，DEP-BM 组在 30 min 与 60 min 时的血糖值降低约 25%（$P < 0.05$），提示苦瓜提取物可改善 DEP 滴注引起的胰岛素抵抗。

3.3 苦瓜提取物对空气污染暴露小鼠胰岛功能与形态的影响

小鼠的空腹胰岛素水平结果显示（见图 3A），与 PBS 组比较，DEP 组胰岛素分泌升高约 58%（$P < 0.005$）；与 PBS-BM 组比较，DEP-BM 组胰岛素分泌仅升高约 25%（$P < 0.05$）；与 PBS 组比较，PBS-BM 组的胰岛素分泌差异无统计学意义；与 DEP 组比较，DEP-BM 组可显著降低胰岛素分泌水平（$P < 0.05$）。为进一步分析 DEP 引起的胰岛功能改变，对小鼠胰腺进行形态学分析（见图 3B，×100）。结果四组小鼠胰腺结构基本无差异，未发现明显胰岛萎缩，胰腺炎症细胞浸润等表现。而进一步分析表明（见图 3C），与 PBS 组比较，DEP 组小鼠的胰腺总面积增大 50%

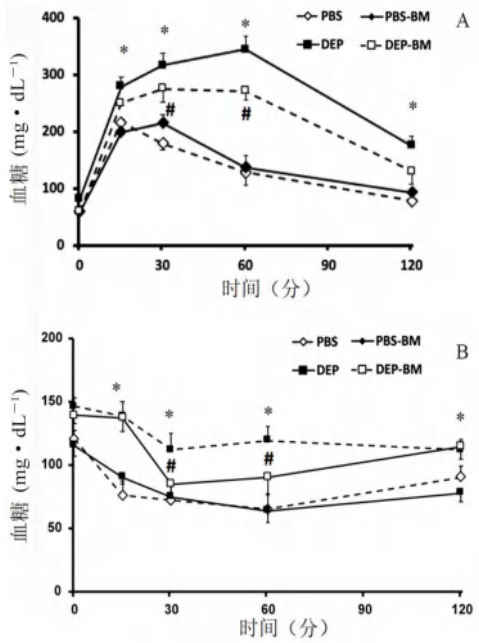


图 2　苦瓜提取物对 DEP 暴露小鼠葡萄糖耐量（A）和胰岛素耐受实验（B）的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig 2　Effect of BM extract on mouse intraperitoneal glucose tolerance test（A）and insulin tolerance test（B）in DEP exposed mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

注：与 PBS 组比较，$^{*}P<0.05$；与 DEP 组比较，$^{\#}P<0.05$。

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

（$P<0.01$），而苦瓜提取物的处理可一定程度逆转此现象。统计小鼠 HE 染色的胰岛数目（见图 3D），DEP 组中胰岛数目为（1.2 ～ 1.5）个 / 视野，DEP-BM 组提高胰岛的数目约 40%，达到（2.5 ～ 2.6）个 / 视野（$P<0.05$）。

3.4　苦瓜提取物对空气污染暴露小鼠肝脏糖代谢通路的影响

与 PBS 组肝脏比较，DEP 组的肝脏质地偏硬，色泽呈黑灰色；苦瓜提取物处理的小鼠中，其肝脏质地相对较柔软，且肝脏色泽较健康。HE 染色显示，DEP 组中肝脏有密集空泡形成（红色箭头：肝细胞空泡），肝细胞排列较紊乱，有少数肝坏死细胞存在；与 PBS 组比较，PBS-BM 组的肝脏无明显差异。在 DEP-BM 组中，肝脏空泡明显降低，肝脏细胞形态基本正常（见图 4A，×40）。

在肝脏的胰岛素调节中，AKT 和 IRS 是其关键通路，检测肝脏对胰岛素诱导的 AKT 磷酸化的影响（见图 4B、4C）。DEP 组显著降低 AKT 磷酸化，苦瓜提取物可减轻肝脏对胰岛素的低敏感性。在磷酸化 IRS-1 的调节中，DEP 组可减少 p-IRS-1 的表达程度，此现象在苦瓜提取物处理后基本消失。

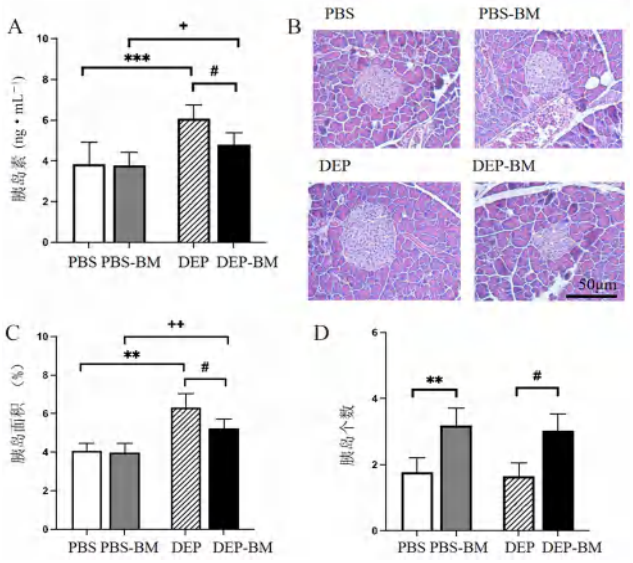


图 3　苦瓜提取物对 DEP 暴露小鼠胰岛功能（A）与形态（B、C、D）的影响

Fig 3　Effect of BM extract on islet function（A）and pancreas morphology（B，C，and D）in DEP exposed mice

注：与 PBS 组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.005$；与 DEP 组比较，$^{\#}P<0.05$；与 PBS-BM 组比较，$^{+}P<0.05$，$^{++}P<0.01$。

Note：Compared with the PBS group，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.005$；compared with the DEP group，$^{\#}P<0.05$；compared with the PBS-BM group，$^{+}P<0.05$，$^{++}P<0.01$.

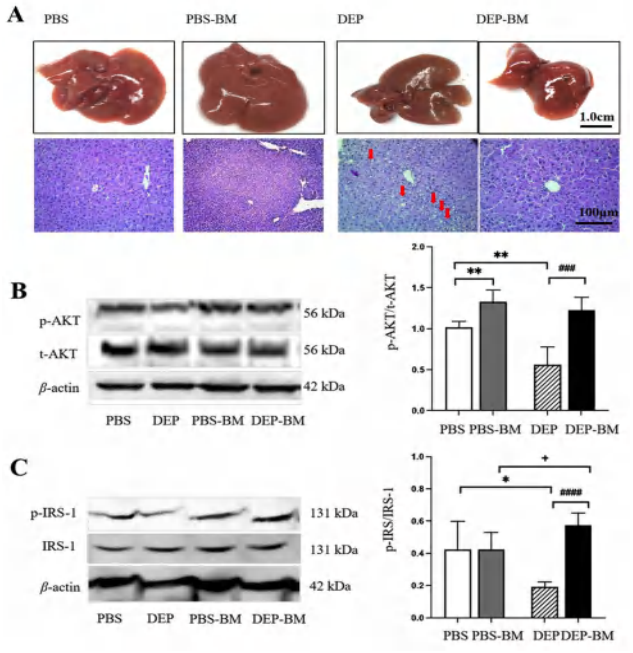


图 4　苦瓜提取物对 DEP 暴露小鼠肝脏外观（×40）、HE 染色（A）和肝脏糖代谢通路的影响（B、C）

Fig 4　Effect of BM extract on liver appearance（×40），HE staining（A）and liver glucose metabolism pathway in DEP exposed mice（B and C）

注：与 PBS 组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 DEP 组比较，$^{\#\#\#}P<0.005$，$^{\#\#\#\#}P<0.001$；与 PBS-BM 组比较，$^{+}P<0.05$。

Note：Compared with the PBS group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the DEP group，$^{\#\#\#}P<0.005$，$^{\#\#\#\#}P<0.001$；compared with the PBS-BM group，$^{+}P<0.05$.

3.5 苦瓜提取物对空气污染暴露小鼠肝脏脂肪代谢通路的影响

本研究在 12 周苦瓜提取物处理结束后，检测了各组小鼠的 TG、TC 与 HDL 指标（见图 5A），与 DEP 组比较，DEP-BM 组 TG、TC 与 HDL 的水平降低（$P < 0.05$）；与 PBS 组比较，PBS-BM 组 TG、TC 与 HDL 的水平也降低（$P < 0.05$，$P < 0.005$），提示苦瓜提取物在正常血脂小鼠中，也有一定降血脂作用。然后对肝脏组织进行油红染色（黄色箭头：红色颗粒为肝脏脂肪颗粒），观察肝脏脂肪浸润情况，油红染色结果表明（见图 5B，×40），DEP 组的肝脏中油红脂肪颗粒显著增加；苦瓜提取物对于 PBS 组无影响；与 DEP 组比较，DEP-BM 组可有效减低油红染色的程度。在肝脏的脂肪调节中，检测了 ApoE 和 PPARγ 关键通路的影响（见图 5C）。与 PBS 组比较，DEP 组的 ApoE 和 PPARγ 的表达显著升高（$P < 0.01$）；与 DEP 组比较，DEP-BM 组的 ApoE 和 PPARγ 的表达显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

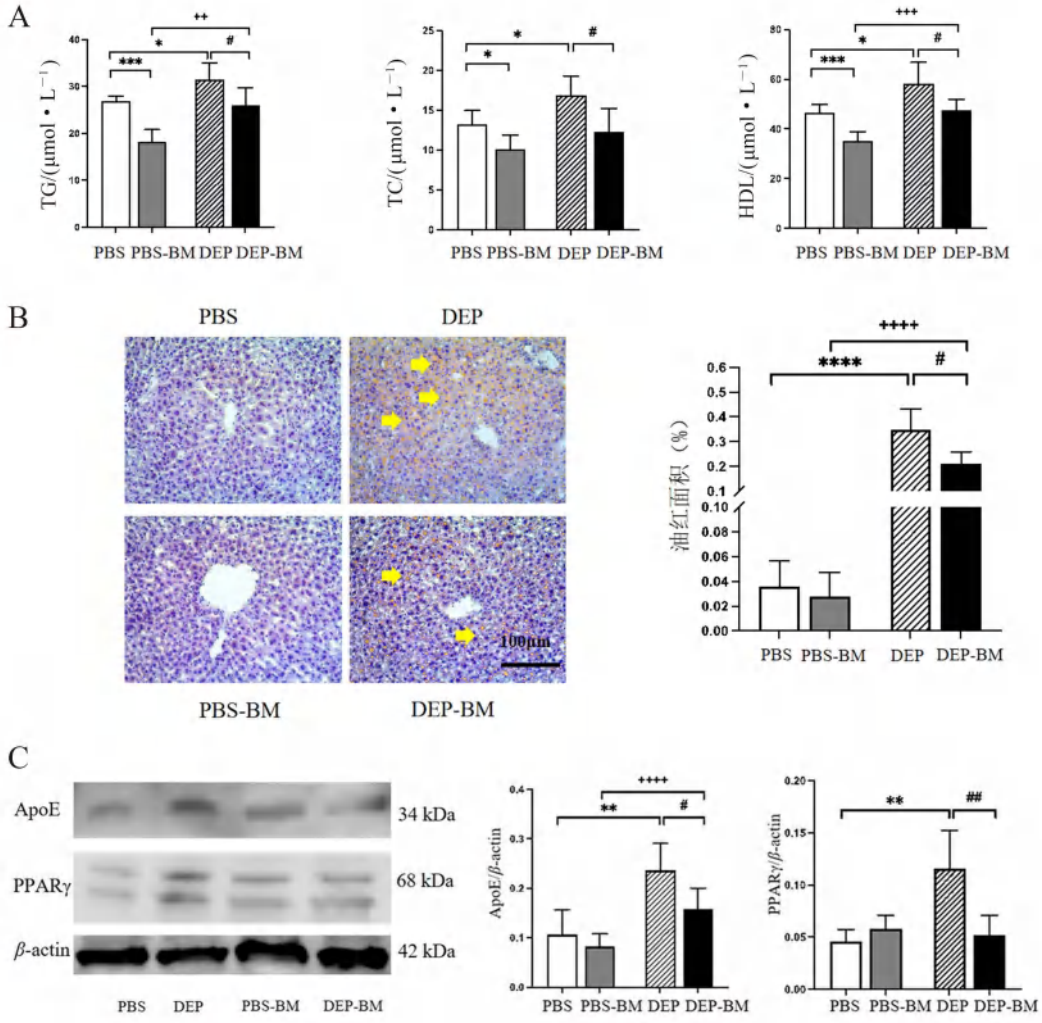


图 5 苦瓜提取物对 DEP 暴露小鼠肝脏脂质指标（A）、脂肪浸润（B）（×40）和脂肪代谢通路的影响（C）

Fig 5 Effect of BM extract on lipid indexes (A), fat infiltration (B) (×40) and lipid metabolism pathway (C) in the liver of DEP exposed mice

注：与 PBS 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.005$，$^{****}P < 0.001$；与 DEP 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与 PBS-BM 组比较，$^{++}P < 0.01$，$^{+++}P < 0.005$，$^{++++}P < 0.001$。

Note：Compared with the PBS group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.005$，$^{****}P < 0.001$；compared with the DEP group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the PBS-BM group，$^{++}P < 0.01$，$^{+++}P < 0.005$，$^{++++}P < 0.001$.

4 讨论

苦瓜作为重要的药物和饮食治疗糖尿病被广泛关注，研究表明苦瓜提取物有较好的降血糖和降血脂的作用。本研究首次将空气污染和苦瓜提取物的治疗相联系，在阐明 DEP 滴注引起的小鼠代谢性改变的基础上，探索在环境因素影响下，采用传统中医药治疗代谢性疾病的新思路。

在本实验模型中，DEP 持续滴注 12 周可导致显著的代谢性紊乱的改变，表现为糖耐量异常、对胰岛素敏感性降低和体重减轻，不同于常用的

高脂或高糖饮食诱发的体重增加的模型。苦瓜提取物可改善小鼠体重，并在一定程度上改善糖尿病的糖脂代谢情况，这一实验结果与既往研究报道相符[19-22]。在 2 型糖尿病的发病机制中，胰岛素抵抗是发病的最初表现之一，DEP 滴注的小鼠除糖代谢指标有变化外，同时伴随胰岛素增高，相应的胰岛面积增加，提示胰岛功能病理性改变，而苦瓜提取物可改善以上情况，提示苦瓜提取物可能的作用为改善外周的胰岛素敏感性，减轻胰岛负担。实验结果表明苦瓜提取物可增加 PBS 与 DEP 滴注小鼠的胰岛数量，因此，苦瓜是否能直接促进新生胰腺的形成，值得进一步研究。

肝脏作为能量代谢的重要器官，在血糖的调节中也发挥着至关重要的作用。在本研究中，DEP 导致 AKT 磷酸化水平下降，而苦瓜提取物可提高胰岛素增高导致的 AKT 与 IRS 磷酸化水平。这一研究结果和其他研究相符，提示苦瓜提取物的作用途径为提高肝脏对胰岛素的敏感性[21-22]。糖尿病患者常伴有高脂血症，在本动物模型中，持续 12 周 DEP 滴注可诱导出小鼠的高脂血症，表现为 TG、TC、HDL 等的升高，以及肝脏脂肪沉积、肝脏脂肪代谢关键蛋白的改变。苦瓜提取物可改善各项血脂指标，并有效改善肝脏的脂代谢[26-27]。本实验表明，虽然小鼠的糖耐量和胰岛素敏感性都有改善，但在实验结束的 12 周时，DEP-BM 组和 PBS/PBS-BM 组仍有明显差距，说明苦瓜提取物的作用为改善症状。糖尿病的治疗通常需要多种药物的协同使用，因此，是否可与其他常用的 2 型糖尿病的治疗药物（如二甲双胍、胰岛素等）联合使用，还需进一步探索。本研究主要证实了苦瓜提取物可改善由 DEP 滴注诱导的糖脂代谢改变。相关文献报道显示，苦瓜提取物亦可有效降低高脂饮食诱发全身炎症，达到调节血脂的目的，这为后续研究指明了新思路[28-29]。肝脏脂代谢涉及的调控通路广泛，有文献表明，苦瓜提取物主要通过 AMPK 和 PPAR[α/γ] 通路重新平衡脂质和葡萄糖代谢，并减轻代谢异常[21]。本研究仅检测了 ApoE 和 PPARγ 通路介导的脂代谢，下一步将对其他相应脂代谢靶点进行研究。在空气污染引起的肝脏脂肪代谢改变中，目前通过代谢组学可得到较为全面细致的代谢变化[30-31]。同时，RNA-seq 可以进一步展现肝脏脂代谢基因水平的调节[32-33]，后续可以结合代谢组学和 RNA-seq 开展相应研究，得到较为完整的空气污染导致的脂肪调节通路的变化，以进一步阐述苦瓜提取物调节脂代谢的机制。

苦瓜提取物调节糖代谢和脂代谢，已在食物诱导的动物模型中得到肯定。本研究为首次在环境因素影响下导致的糖脂代谢异常的动物模型中验证苦瓜提取物的作用，为代谢性疾病的治疗提供了新思路。

参考文献

[1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 2021-10th edition [EB/OL].（2021-12-6）[2024-3-28]. https：//www. diabetesatlas. org.

[2] 中华医学会糖尿病学分会 . 中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）[J]. 中国实用内科杂志，2021，41（8）：668-784.

[3] Zhang L，Sun F，Li Y，et al. Multimorbidity in community-dwelling older adults in Beijing：prevalence and trends [J]. J Nutr Health Aging，2021，25（1）：116-119.

[4] Li YQ，Gui JF，Liu HY，et al. Predicting metabolic syndrome by obesity-and lipid-related indices in mid-aged and elderly Chinese：a population-based cross-sectional study [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2023，14：1201132.

[5] Li SC，Guo B，Jiang Y，et al. Long-term exposure to ambient $PM_{2.5}$ and its components associated with diabetes：evidence from a large population-based cohort from China [J]. Diabetes Care，2023，46（1）：111-119.

[6] Lv SY，Li ZW，Li HB，et al. Long-term effects of $PM_{2.5}$ components onhypertension：a national analysis in China [J]. Environ Res，2023（222）：115323.

[7] Zheng XY，Tang SL，Liu T，et al. Effects of long-term $PM_{2.5}$ exposure on metabolic syndrome among adults and elderly in Guangdong，China [J]. Environmental Health，2022，21（1）：84-84.

[8] Chen JC，Schwartz J. Metabolic syndrome and inflammatory responses to long-term particulate air pollutants [J]. Environ Health Perspect，2008，116（5）：612-617.

[9] Dijkema MBA，Mallant SF，Gehring U，et al. Long-term exposure to traffic-related air pollution and type 2 diabetes prevalence in a cross-sectional screening-study in the Netherlands [J]. Environ Health，2011，10（1）：76.

[10] He D，Wu SW，Zhao HP，et al. Association between particulate matter 2.5 and diabetes mellitus：a meta-analysis of cohort studies [J]. J Diabetes Investig，2017，8（5）：687-696.

[11] Eze IC，Hemkens LG，Bucher HC，et al. Association between ambient air pollution and diabetes mellitus in Europe and North America：systematic review and meta-analysis [J]. Environ Health Perspect，2015，123（5）：381-389.

[12] Sun QH，Yue PB，Deiuliis JA，et al. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity [J]. Circulation，2009，119（4）：538-546.

[13] Xu XH，Yavar ZB，Verdin M，et al. Effect of early par-

ticulate air pollution exposure on obesity in mice：role of p47phox [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2010，30（12）：2518-2527.

[14] Yan YH，Chou CC，Lee CT，et al. Enhanced insulin resistance in diet-induced obese rats exposed to fine particles by instillation [J]. Inhal Toxicol，2011，23（9）：507-519.

[15] Chen MJ，Liang S，Qin XB，et al. Prenatal exposure to diesel exhaust $PM_{2.5}$ causes offspring β cell dysfunction in adulthood [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2018，315（1）：E72-E80.

[16] Chen SF，Chen MJ，Wei W，et al. Glucose homeostasis following diesel exhaust particulate matter exposure in a lung epithelial cell-specific IKK_2-deficient mouse model [J]. Environ Health Perspect，2019，127（5）：057009.

[17] Bosch AJT，Rohm TV，AlAsfoor S，et al. Lung versus gut exposure to air pollution particles differentially affect metabolic health in mice [J]. Part Fibre Toxicol，2023，20（1）：7.

[18] Kim SK，Jung J，Jung JH，et al. Hypoglycemic efficacy and safety of *Momordica charantia*（Bitter melon）in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Complement Ther Med，2020，52：102524.

[19] Hussain F，Hafeez J，Khalifa AS，et al. In vitro and in vivo study of inhibitory potentials of α-glucosidase and acetylcholinesterase and biochemical profiling of *M. charantia* in alloxan-induced diabetic rat models [J]. Am J Transl Res，2022，14（6）：3824-3839.

[20] Wang Q，Wu XY，Shi FL，et al. Comparison of antidiabetic effects of saponins and polysaccharides from *Momordica charantia* L. in STZ-induced type 2 diabetic mice [J]. Biomedicine Pharmacotherapy，2019，109：744-750.

[21] Reed D，Kumar D，Kumar S，et al. Transcriptome and metabolome changes induced by Bitter melon（*Momordica charantia*）-intake in a high-fat diet induced obesity model [J]. J Tradit Complement Med，2021，12（3）：287-301.

[22] Yoon NA，Park J，Jeong JY，et al. Anti-obesity activity of ethanol extract from Bitter melon in mice fed high-fat diet [J]. Dev Reprod，2019，23（2）：129-138.

[23] Feng SL，Gao D，Liao F，et al. The health effects of ambient $PM_{2.5}$ and potential mechanisms [J]. Ecotoxicol Environ Saf，2016，128：67-74.

[24] 陈明之 . 苦瓜提取物对营养性肥胖小鼠的减肥作用 [J]. 食品研究与开发，2009，30（10）：44-46.

[25] 石雪萍，姚惠源 . 苦瓜水溶性粗多糖提取及降血糖功能研究 [J]. 中国野生植物资源，2008，27（3）：49-57.

[26] Lee HJ，Cui RH，Choi SE，et al. Bitter melon extract ameliorates palmitate-induced apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress in HepG2 cells and high-fat/high-fructose-diet-induced fatty liver [J]. Food Nutr Res，2018，62（1）：1-10.

[27] Fuller S，Yu YM，Allerton TD，et al. Adaptive fat oxidation is coupled with increased lipid storage in adipose tissue of female mice fed high dietary fat and sucrose [J]. Nutrients，2020，12（8）：2233.

[28] Zeng YM，Guan MP，Li CZ，et al. Bitter melon（*Momordica charantia*）attenuates atherosclerosis in apo-E knockout mice possibly through reducing triglyceride and anti-inflammation [J]. Lipids Health Dis，2018，17（1）：251.

[29] Chou MC，Lee YJ，Wang YT，et al. Cytotoxic and antiinflammatory triterpenoids in the vines and leaves of *Momordica charantia* [J]. Int J Mol Sci，2022，23（3）：1071.

[30] Yan ZP，Li SY，Chen R，et al. Effects of differential regional $PM_{2.5}$ induced hepatic steatosis and underlying mechanism [J]. Environ Pollut，2023，323：121220.

[31] Zhang CX，Ma TF，Liu C，et al. $PM_{2.5}$ induced liver lipid metabolic disorders in C57BL/6J mice [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2023，14：1212291.

[32] Li BH，Li YZ，Zhou HJ，et al. Multiomics identifies metabolic subtypes based on fatty acid degradation allocating personalized treatment in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology，2024，79（2）：289-306.

[33] Le YF，Guo JN，Liu ZJ，et al. Calenduloside E ameliorates non-alcoholic fatty liver disease via modulating a pyroptosis-dependent pathway [J]. J Ethnopharmacol，2024，319（Pt 2）：117239.

（收稿日期：2024-06-05；修回日期：2024-08-15）

阿莫西林克拉维酸钾不同配比不同剂型的药代动力学研究

万妮莎[1, 3]，张志儒[2]，石禹阳[2]，刘宏生[1*]，王淼[2*]（1. 辽宁大学药学院，沈阳 110036；2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院，沈阳 110016；3. 沈阳医学院附属中心医院，沈阳 110024）

摘要：目的 通过探究不同配比、不同剂型阿莫西林克拉维酸钾在健康大鼠体内的药代动力学情况，对比生物利用度、半衰期、最大血药浓度等参数，为阿莫西林克拉维酸钾最优配比和剂型选择提供依据以及评价标准。**方法** 利用 LC-MS 法测定大鼠分别灌胃阿莫西林克拉维酸钾颗粒（4∶1、7∶1）、阿莫西林克拉维酸钾分散片（4∶1、7∶1）和阿莫西林克拉维酸钾干混悬剂（4∶1、7∶1 和 14∶1）后 24 h 内阿莫西林血药浓度，用 DAS 2.0 计算药代动力学参数。**结果** 阿莫西林克拉维酸钾配比相同时，干混悬剂和颗粒剂药代动力学参数相近，均优于分散片；剂型相同时，阿莫西林克拉维酸钾配比 7∶1 时的最大血药浓度和生物利用度优于 4∶1。**结论** 阿莫西林克拉维酸钾配比为 7∶1 时，剂型为干混悬剂和颗粒剂时，药代动力学参数表现更好。

关键词：阿莫西林克拉维酸钾；不同配比；不同剂型；药代动力学；LC-MS
中图分类号：R963 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2957-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.020

Pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanate potassium at different proportions and dosage forms

WAN Ni-sha[1, 3], ZHANG Zhi-ru[2], SHI Yu-yang[2], LIU Hong-sheng[1*], WANG Miao[2*] (1. *College of Pharmacy*, *Liaoning University*, *Shenyang* 110036; 2. *School of Life Science and Biopharmaceutical*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 3. *Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College*, *Shenyang* 110024)

Abstract: Objective To determine the pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanate potassium with different proportions and dosage forms in healthy rats by comparing the bioavailability, half-life and maximum blood concentration, to provide evidence and evaluation criteria for the optimal proportion and dosage form of amoxicillin and clavulanate potassium. **Methods** The plasma concentrations of amoxicillin in rats within 24 h after the intragastric administration of amoxicillin clavulanate potassium granules (4∶1; 7∶1), amoxicillin and clavulanate potassium dispersible tablets (4∶1; 7∶1), amoxicillin and clavulanate potassium dry suspension (4∶1; 7∶1 and 14∶1) were detected by LC-MS. The pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 2.0 software. **Results** At the same ratio of amoxicillin and clavulanate potassium, the pharmacokinetic parameters of dry suspension and granule were similar, and both had better than dispersive tablets. With the same dosage form, the maximum blood concentration and bioavailability of amoxicillin and clavulanate potassium ratio of 7∶1 was better than 4∶1. **Conclusion** The pharmacokinetic parameters are more favorable with amoxicillin to clavulanate potassium at 7∶1 in the form of dry suspension and granules.

Key words: amoxicillin and clavulanate potassium; different proportion; different dosage form; pharmacokinetics; LC-MS

作者简介：万妮莎，女，硕士研究生，主要从事微生物和代谢组学研究，email：36219730@qq.com *通信作者：刘宏生，男，博士研究生导师，主要从事生物制药及计算机辅助药物设计及分子模拟研究，email：liuhongsheng@lnu.edu.cn；王淼，女，硕士研究生导师，主要从事代谢组学研究，email：wangmiao_77111@hotmail.com

阿莫西林克拉维酸钾是由阿莫西林和克拉维酸钾组成的口服复方抗菌药物[1]，主要用于治疗由产酶耐药菌引起的泌尿系统及呼吸系统的感染，如下呼吸系统感染、耳炎、皮肤及皮肤软组织感染、尿路感染等；治疗各种重度感染，如败血症、脑膜炎、血液病或恶性肿瘤患者的合并感染以及监护病房患者的特殊问题（如烧伤感染）等。

阿莫西林抗菌作用强，口服吸收好，但易被β-内酰胺酶水解，克拉维酸钾可以通过阻断β-内酰胺酶的活性位点抑制阿莫西林的水解，从而提高阿莫西林的抗菌活性[2-3]。市面上常见的剂型有颗粒剂、分散片和干混悬剂等，常见的比例有 4∶1、7∶1、14∶1 等。阿莫西林 - 克拉维酸钾组合的第一个比例由 Beecham 药剂师设定为 4∶1，由于克拉维酸钾对β-内酰胺酶的亲和力高，因此需要相对较少的克拉维酸钾来抑制它们[3]。后来，引入了 7∶1 的比例，主要是为了避免克拉维酸钾相关的毒性，某些药物比例高达 14∶1。加用克拉维酸钾会显著限制口服阿莫西林的最大日剂量[4-5]。

阿莫西林克拉维酸钾复合制剂引起的肝损伤主要归因于其中的克拉维酸钾。主要与克拉维酸钾的用量及疗程有关，临床使用时需注意各规格的用量限制[6-7]。不应一味加大克拉维酸钾剂量，否则不仅不能实现疗效最大化，反而增大了药物毒性。控制克拉维酸钾在处方中的比例，有可能降低药物肝毒性的发生率。另外，由于克拉维酸钾的生产成本较高，降低克拉维酸钾的用量意味着降低药物的成本。控制克拉维酸钾的用量，有利于控制药物成本和不良反应的发生率，保持复方制剂的有效性[8]。

目前，针对阿莫西林克拉维酸钾的配比和剂型未见有系统研究，本研究的目的是探究不同配比、不同剂型阿莫西林克拉维酸钾在健康大鼠体内的药代动力学特征，通过对比生物利用度、半衰期、最大血药浓度和达峰时间等参数，为阿莫西林克拉维酸钾最优配比和剂型的选择提供比较依据与评价标准。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

Agilent 6470 三重四极杆质谱（美国 Agilent 公司）；TGL-16G 型离心机（上海安亭科学仪器厂）；XW-80A 微型涡旋混合仪（上海沪西分析仪器厂有限公司）；ZiGui 干式氮吹仪（上海梓桂仪器有限公司）；Masslynx 4.1 数据采集软件（美国 Waters 公司）。

1.2 试药

乙腈（色谱纯，美国 Fisher 公司）；乙酸铵（色谱纯，美国 ACS 恩科化学公司）；纯净水（杭州娃哈哈集团）；阿莫西林（批号：wkp23051112，HPLC ≥ 98%，四川省维克奇生物科技有限公司）；头孢羟氨苄（批号：RH442638，HPLC ≥ 99%，海易恩化学技术有限公司）。阿莫西林克拉维酸钾颗粒 [4∶1（批号：386221002，简称 A），7∶1（批号：230102，简称 B）]，阿莫西林克拉维酸钾分散片 [4∶1（批号：20220603，简称 C），7∶1（批号：51220703，简称 D）]，阿莫西林克拉维酸钾干混悬剂 [4∶1（批号：2220903，简称 E），7∶1（批号：34056211，简称 F），14∶1（批号：220411，简称 G）]，均购自线下药店。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠 42 只（8 周龄，动物合格证号：210726231101678572），SPF 级，体重 180 ～ 220 g [辽宁长生生物技术股份有限公司]。

2 方法与结果

2.1 动物分组与给药

SD 大鼠正常饮食，适应性喂养 1 周，随机分为 7 组，依次是阿莫西林克拉维酸钾 A、B、C、D、E、F、G 组。通过人与大鼠给药剂量换算公式计算给药剂量，保证每只大鼠阿莫西林的给药量一致，根据药品辅料配比计算得出每只大鼠的给药量。A、C、E 组给予的阿莫西林剂量为 26 mg • kg^{-1}，克拉维酸钾的剂量为 6.5 mg • kg^{-1}；B、D、F 组给予的阿莫西林剂量为 42 mg • kg^{-1}，克拉维酸钾的剂量为 6 mg • kg^{-1}；G 组给予的阿莫西林剂量为 85 mg • kg^{-1}，克拉维酸钾的剂量为 6 mg • kg^{-1}。

给药前禁食 12 h，自由饮水。在给药后 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24 h 从大鼠眼眶静脉取血约 0.3 mL，置于涂有肝素钠的 EP 管中，4000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液置于－ 80 ℃保存。

2.2 色谱条件与质谱条件

2.2.1 色谱条件　色谱柱：Ultimate XB-C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，3.0 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 乙酸铵水（B）（*V/V*）；梯度洗脱（0 ～ 3 min，5%A，3 ～ 5 min，5% ～ 10%A，5 ～ 7 min，10% ～ 30%A）；检测波长：254 nm；流速：0.2 mL • min^{-1}；柱温：35 ℃；进样量：2 μL。

2.2.2 质谱条件　离子源：电喷雾离子源；监测方式：负离子模式；雾化器和干燥气：氮气；扫

描方式：多反应扫描（MRM）。质谱参数：气体温度：300 ℃；气体流速：8 L • min $^{-1}$；雾化器电压：30 psi；脱溶剂气温：350 ℃；脱溶剂气体流速：11 L • min $^{-1}$；毛细管电压：3500 V；喷嘴电压：1500 V；MRM 参数：[M ＋ H] $^{-}$模式；离子跃迁范围：364.1 ＞ 223.3；锥电压：1 V；碰撞能量：4 eV。

2.3　溶液的制备

2.3.1　对照品溶液的配制　取阿莫西林、头孢羟氨苄适量，精密称定，加入甲醇溶解并稀释，制成质量浓度均为 10 μg • mL $^{-1}$ 的混合对照品储备液。精密量取上述混合对照品储备液 1 mL 置 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，即得混合对照品溶液。

2.3.2　内标溶液的配制　取头孢羟氨苄适量，精密称定，加入甲醇溶解并稀释，制成质量浓度为 2 μg • mL $^{-1}$ 的溶液，即得。

2.4　样品前处理

取 100 μL 血浆样品，加入 10 μL 内标溶液、10 μL 甲醇、380 μL 乙腈，涡旋 1 min，13 000 r • min $^{-1}$ 离心 10 min，取上清液 35 ℃氮气流下吹干，残渣用 100 μL 甲醇复溶，涡旋 1 min，13 000 r • min $^{-1}$ 离心两次，每次 10 min。

2.5　方法学验证

2.5.1　专属性　取来自 6 只大鼠空白血浆混合，除用等体积甲醇代替内标外，均按照“2.4”项下方法处理，进行分析，得空白血浆样品色谱图；将空白血浆中加入浓度在定量下限处的阿莫西林溶液，以及灌胃阿莫西林克拉维酸钾 1 h 的血浆样品，均同法处理，结果见图 1。头孢羟氨苄、阿莫西林的保留时间分别为 1.85、2.37 min。结果显示，血浆中的内源性物质不干扰分析，待测物之间无交叉干扰。

2.5.2　线性和定量下限　取空白血浆 100 μL 7 份，加入系列混合对照品溶液 10 μL，除不加甲醇外，均按照“2.4”项下方法处理，制成相当于含阿莫西林（2、10、100、500、1000、2000、5000 ng•mL $^{-1}$）的血浆样品，每个样品双样本分析，进样量 2 μL；以血浆中待测物浓度为横坐标（X），以待测物与内标的峰面积比值为纵坐标（Y），用加权最小二乘法进行线性回归，$1/\chi^2$ 为加权系数，所得方程即为回归方程 $Y = 0.1173X + 0.05$（$r = 0.999$）。结果表明阿莫西林在 2 ～ 5000 ng • mL $^{-1}$ 内与峰面积比值线性关系良好；阿莫西林在血浆中的定量下限为 2 ng • L $^{-1}$。

2.5.3　精密度和准确度　取空白血浆 100 μL，按照“2.4”项下方法处理，制成低、中、高 3 个浓度的质控（QC）样品（相当于阿莫西林 2.40、2500.00 和 4000.00 ng • mL $^{-1}$），每个浓度平行制备 6 份，连续测定 3 d，以随行标准曲线计算 QC 样品浓度，并计算方法的精密度与准确度，结果日内和日间精密度 *RSD* 分别不超过 3.1% 和 5.3%，准确度在 4.9% ～ 8.8%，均符合生物样品测定要求。

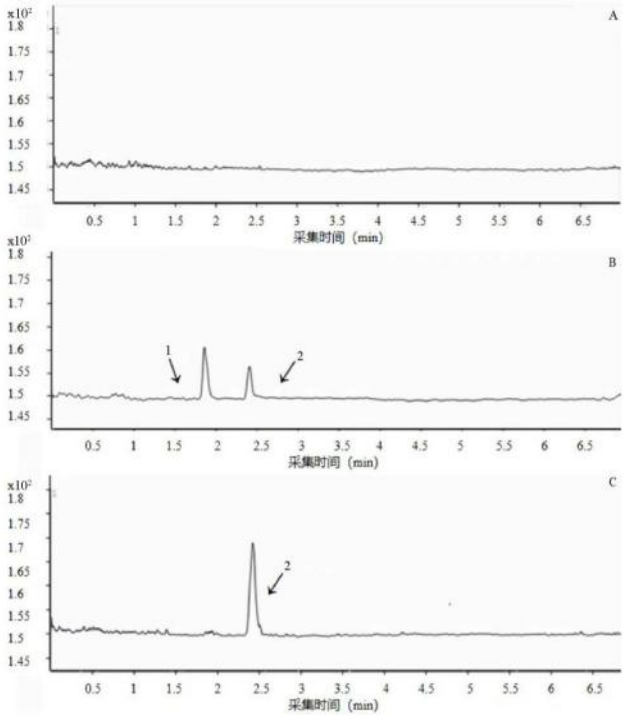


图 1　阿莫西林克拉维酸钾的专属性考察

Fig 1　Exclusive investigation of amoxicillin and clavulanate potassium

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆中加入阿莫西林和头孢羟氨苄（blank plasma with amoxicillin and cefadroxil）；C. 口服阿莫西林后的血浆样本（plasma sample after the oral administration of amoxicillin）；1. 头孢羟氨苄（cefadroxil）；2. 阿莫西林（amoxicillin）

2.5.4　提取回收率和基质效应　取 100 μL 空白血浆，按“2.4”项下方法处理，制备低、中、高 3 个浓度的质控（QC）样品（相当于阿莫西林 2.40、2500.00 和 4000.00 ng • mL $^{-1}$），每个浓度 6 样本分析。另取 100 μL 空白血浆，除不加系列标准溶液和内标溶液外，均按“2.4”项下方法处理至取出上清液后，向得到的上清液中加入内标溶液和相应浓度的混合标准溶液各 10 μL，涡旋 1 min，35 ℃氮气流下吹干，残渣用 100 μL 甲醇复溶，涡旋 1 min，13 000 r • min $^{-1}$ 离心两次，每次 10 min，取上清液进样分析，记录峰面积。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率，结果见表 1，提取回收率为 83.9% ～ 92.8%。阿莫西林的提取回收率符合生物样品测定的要求。

取 100 μL 空白血浆，除不加混合标准溶液和

内标溶液外，均按“2.4”项下方法处理，向得到的上清液中加入低、中、高3个浓度（相当于阿莫西林2.40、2500.00和4000.00 ng • mL^{-1}）的混合标准溶液10 μL和内标溶液10 μL，涡旋1 min，35 ℃氮气流下吹干，残渣用100 μL甲醇复溶，涡旋1 min，13 000 r • min^{-1}离心两次，每次10 min，取上清液进样分析，记录峰面积，每个浓度6样本分析。另取10 μL相应浓度的混合对照品溶液和10 μL内标溶液，涡旋1 min，35 ℃氮气流下吹干，残渣用100 μL甲醇复溶，涡旋1 min，13 000 r • min^{-1}离心两次，每次10 min，取上清液进样分析，记录峰面积。待测物基质效应在94.2% ～ 95.5%，不存在明显的基质效应，结果见表1。

表1 精密度、准确度、提取回收率及基质效应（n = 6）

Tab 1 Precision，accuracy，extraction recovery and matrix effect (n = 6)

质量浓度/（ng • mL^{-1}）	日间精密度 *RSD*/%	日内精密度 *RSD*/%	准确度（*RE*）/%	提取回收率/%	基质效应/%
2.4	3.1	5.3	4.9	86.5±2.3	95.5±2.6
2500	2.4	3.9	6.2	83.9±5.6	94.2±5.5
4000	2.8	4.0	8.8	92.8±2.2	95.3±3.6

2.5.5 稳定性 取空白血浆100 μL，按照“2.4”项下方法处理，制成低、中、高3个浓度（相当于阿莫西林2.40、2500.00和4000.00 ng • mL^{-1}）的质控QC样品，每个浓度制备3份，进样分析。考察3种不同浓度的血浆样品在几种不同的储存条件下的稳定性：室温放置24 h，三次冻融循环（－20 ℃至室温），样品处理后4 ℃放置24 h及－20 ℃下放置15 d。结果表明，样品在上述条件下稳定性良好，*RE*值均处于－13.1% ～ 7.8%，证明样品在储存、处理和测定过程中均保持稳定，符合生物样品测定的要求。

2.6 血药浓度测定结果

将各组大鼠血浆按照“2.4”项下方法处理后，进样分析。以待测物峰面积与内标峰面积的比值代入随行标准曲线计算各血浆样品中的血药浓度，各组大鼠血药浓度测定结果如图2所示，采用DAS 2.0计算药代动力学参数，见表2。

结果显示A、E组达峰时间、达峰浓度、生物利用度和半衰期优于C组（P < 0.05），表明阿莫西林克拉维酸钾配比相同时，颗粒剂型或干混悬剂型优于分散片剂型。剂型相同的情况下，B组的达峰时间、达峰浓度和生物利用度优于A组（P < 0.05），说明阿莫西林克拉维酸钾配比7∶1优于4∶1。

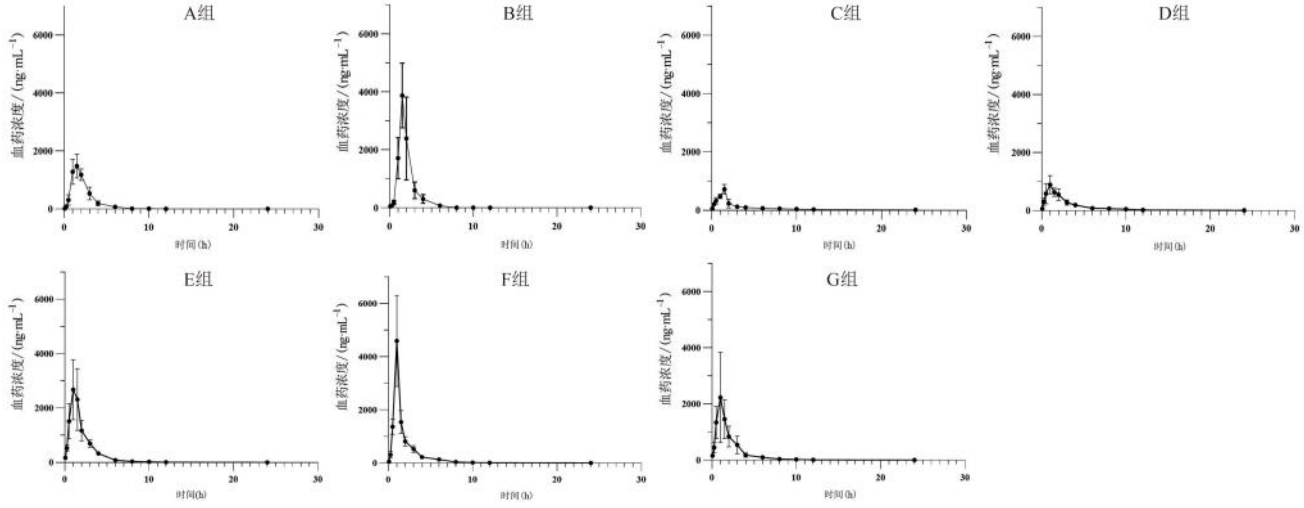


图2 各组平均药物浓度-时间曲线

Fig 2 Mean concentration-time curves in each groups

3 讨论

本文采用LC-MS法测定阿莫西林克拉维酸钾不同比例不同剂型在大鼠体内的阿莫西林的血药浓度，采用配对t检验对相同剂型不同配比、相同配比不同剂型的阿莫西林克拉维酸钾药代动力学参数进行统计分析。研究了添加0.1%乙酸铵加入流动相（水和乙腈），发现当在流动相中加入0.1%乙酸铵时分析物分子离子具有最高响应，同时能与内源性物质分离[9-12]。

在此条件下，优化毛细管和锥孔电压，源温度和去溶剂化气体温度和流速，以提高分析物分子离子的特异性和灵敏度。选择头孢羟氨苄作为内标，响应高，峰形良好，且没有观察到明显的干扰。

本试验首次同时测定了7种不同比例以及不同配比的阿莫西林克拉维酸钾的阿莫西林血药浓度，以非房室模型对7种药物的药代动力学进行

表 2　口服阿莫西林后药动学参数（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab 2　Pharmacokinetic parameters after oral amoxicillin（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

分组	C_{max}/（ng・mL^{-1}）	t_{max}/h	$t_{1/2}$/h	$AUC_{0\sim 24\,h}$/[ng/（h・mL）]	$AUC_{0\sim inf}$/[ng/（h・mL）]
A	1669.25±264.19*	1.33±0.40*	3.34±2.50*	3511.62±555.98*	3523.34±556.85*
B	4063.11±1209.90#	1.58±0.20#	2.25±1.24	5883.84±1577.38#	5890.20±1579.11#
C	729.45±152.94	1.58±0.20	8.28±0.68	1893.26±160.27	2073.77±205.93
D	1066.56±228.10	1.08±0.40	5.91±1.50	2714.28±295.07	2825.44±292.36
E	2913.38±956.30*	1.17±0.20*	4.48±2.10*	5638.49±1237.50*	5663.79±1237.30*
F	4592.47±1714.74	1.00±0.00	3.71±1.80	5571.56±1351.63	5592.99±1357.50
G	2392.79±1544.23	1.08±0.20	3.79±1.98	4276.09±1723.84	4301.51±1721.72

注：与 C 组比较，*$P<0.05$；与 A 组比较，#$P<0.05$。

Note：Compared with the C group，*$P<0.05$；compared with the A group，#$P<0.05$.

初步研究，大鼠灌胃不同比例以及不同配比的药代动力学参数显示，配比相同时，干混悬剂和颗粒剂相近，均优于分散片。剂型相同时，配比 7∶1 优于 4∶1 和 14∶1。阿莫西林在临床应用时需借助最低杀菌浓度和最低抑菌浓度来辅助用药，具体的抗菌效果与最小抑菌浓度（*MIC*）有关。本课题先前测得结果表明，阿莫西林克拉维酸钾 4∶1、7∶1 对大肠埃希菌的抑制作用优于阿莫西林克拉维酸钾 14∶1，阿莫西林克拉维酸钾对金黄色葡萄球菌的抑制作用随克拉维酸钾比例增多而增加（相关内容待发表）。

参考文献

[1] Sharland MR，Pulcini C，Harbarth S，et al. Classifying antibiotics in the WHO Essential Medicines List for optimal use—be AWaRe [J]. Lancet Infect Dis，2018，18（1）：18-20.

[2] 何解生，章静 . 阿莫西林 / 克拉维酸钾的临床应用 [J]. 海峡药学，2006，18（2）：136.

[3] Reading C，Cole M. Clavulanic acid：a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus* [J]. Antimicrob Agents Chemother，1977，11（5）：852-857.

[4] Huttner A，Bielicki J，Clements MN，et al. Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid：properties，indications and usage [J]. Clin Microbiol Infect，2020，26（7）：871-879.

[5] Salvo F，Polimeni G，Moretti U，et al. Adverse drug reactions related to amoxicillin alone and in association with clavulanic acid：data from spontaneous reporting in Italy [J]. J Antimicrob Chemother，2007，60（1）：121-126.

[6] Petrov PD，Soluyanova P，Sánchez-Campos S，et al. Molecular mechanisms of hepatotoxic cholestasis by clavulanic acid：role of NRF2 and FXR pathways [J]. Food Chem Toxicol，2021，158：112664.

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

[8] 王晨，胡昌勤，许明哲 . 阿莫西林克拉维酸钾不同配比制剂中克拉维酸钾的生物利用度研究 [J]. 中国新药杂志，2019，28（18）：2213-2216.

[9] Zarowny D，Ogilvie R，Tamblyn D，et al. Pharmacokinetics of amoxicillin [J]. Clin Pharmacol Ther，1974，16（6）：1045-1051.

[10] Arancibia A，Guttmann J，Gonzalez G，et al. Absorption and disposition kinetics of amoxicillin in normal human subjects [J]. Antimicrobial Agents Chemother，1980，17（2）：199-202.

[11] Spyker DA，Rugloski RJ，Vann RL，et al. Pharmacokinetics of amoxicillin：dose dependence after intravenous，oral，and intramuscular administration [J]. Antimicrob Agents Chemother，1977，11（1）：132-141.

[12] Todd PA，Benfield P. Amoxicillin/clavulanic acid：an update of its antibacterial activity，pharmacokinetic properties and therapeutic use [J]. Drugs，1990，39：264-307.

（收稿日期：2024-01-26；修回日期：2024-07-18）

蒙药传统汤散剂剂型改良研究专题

【编者按】

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

【主持人简介】

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

蒙药闹羊花配方颗粒指纹图谱及含量测定研究

胡恒[1]，王阳[1]，李佳慧[1]，田闵元[1]，谢超[1]，关雪峰[2]，张纯刚[1, 3, 4*]（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116620；2. 沈阳药科大学，沈阳 110016；3. 长治医学院药学系，山西 长治 046000；4. 祈蒙股份有限公司，内蒙古 赤峰 024330）

摘要：目的 建立 15 批蒙药闹羊花配方颗粒的指纹图谱及其中金丝桃苷等 5 种黄酮类成分的含量测定方法，以评价闹羊花配方颗粒的质量。**方法** 采用 HPLC 法，以 COSMOSIL C_{18} 为色谱柱，以乙腈（A）-0.2% 磷酸水（B）为流动相，梯度洗脱，检测波长为 255 nm，柱温为 40 ℃，流速为 1.0 mL • min^{-1}；采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》建立 15 批闹羊花配方颗粒的指纹图谱并评价相似度；使用软件 SPSS 27.0、SIMCA14.1 进行化学模式识别，分析并筛选影响闹羊花配方颗粒质量的标志物；测定闹羊花配方颗粒中金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚 5 种成分的含量。**结果** 15 批闹羊花配方颗粒指纹图谱中有 15 个共有峰被标定，有 5 种成分 [金丝桃苷（峰 7）、槲皮苷（峰 9）、阿福豆苷（峰 11）、槲皮素（峰 13）、山柰酚（峰 15）] 被指认，相似度均＞ 0.940；化学模式识别结果显示，S1 ～ S7、S15 号样品为一类，S8 ～ S14 号样品为一类，峰 1、2、6、9 ～ 15 的 VIP 值＞ 1；15 批闹羊花配方颗粒中金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚的含量分别为 0.007% ～ 0.013%、0.067% ～ 0.121%、0.007% ～ 0.010%、0.040% ～ 0.085%、0.001% ～ 0.002%。**结论** 该研究建立的指纹图谱及含量测定方法可行、稳定、简便，可用于评价闹羊花配方颗粒的质量。

关键词：闹羊花；配方颗粒；高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定；化学模式识别

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2962-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.021

基金项目：内蒙古自治区科技重大专项（No.2021ZD0017）；国家重点研发计划（No.2018YFC1706903）；辽宁省科技计划联合计划基金（No. 2023JH2/101700206）；辽宁中医药大学校级重点项目（No.2021LZY047）。

作者简介：胡恒，女，硕士研究生，主要从事中药新剂型、新技术研究，email：2182249022@qq.com *通信作者：张纯刚，男，硕士研究生导师，副教授，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究和保健食品开发研究，email：gaogaoii123@163.com

Fingerprint and content determination of Mongolian medicine Rhododendri Mollis Flos formula granules

HU Heng[1], WANG Yang[1], LI Jia-hui[1], TIAN Min-yuan[1], XIE Chao[1], GUAN Xue-feng[2], ZHANG Chun-gang[1, 3, 4*] (1. *College of Pharmacy*, *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116620; 2. *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 3. *Department of Pharmacy*, *Changzhi Medical College*, *Changzhi Shanxi* 046000; 4. *Qimeng Co.*, *Ltd.*, *Chifeng Inner Mongolia* 024330)

Abstract: Objective To establish the fingerprint of 15 batches of Mongolian medicine Rhododendri Mollis Flos formula granules and determine the content of 5 flavonoids to evaluate their quality. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) was performed on COSMOSIL C_{18} column with acetonitrile (A)-0.2% phosphoric acid water (B) as the mobile phase by gradient elution. The detection wavelength was 255 nm, the column temperature was 40 ℃ , and the flow rate was 1.0 mL • min^{-1}. The fingerprint of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules was established and the similarity was evaluated by Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint (2012 Edition). SPSS 27.0 and SIMCA14.1 software were used to conduct chemical pattern recognition and screen the markers affecting the quality of Rhododendri Mollis Flos formula granules. The content of 5 components (hypericin, quercitrin, afzelin, quercetin and kaempferol) in Rhododendri Mollis Flos formula granules was determined. **Results** In the fingerprint of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules, 15 common peaks were identified, and the 5 components [hypericin (peak 7), quercitrin (peak 9), afzelin (peak 11), quercetin (peak 13), and kaempferol (peak 15)] were respectively identified, with similarity being all greater than 0.940. The chemical pattern recognition showed that samples S1 ～ S7 and S15 belonged to one category, and samples S8 ～ S14 belonged to the other category. The VIP values of peaks 1, 2, 6, and 9 ～ 15 were greater than 1. The content of hypericin, quercitrin, afzelin, quercetin and kaempferol in 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules ranged 0.007% ～ 0.013%, 0.067% ～ 0.121%, 0.007% ～ 0.010%, 0.040% ～ 0.085%, and 0.001% ～ 0.002%, respectively. **Conclusion** The fingerprint and content determination method are feasible, stable and simple, which can be used to control the quality of Rhododendri Mollis Flos formula granules.

Key words: Rhododendri Mollis Flos; formula granule; HPLC; fingerprint; content determination; chemical pattern recognition

闹羊花系蒙古民族常用药材，为杜鹃花科羊踯躅 *Rhododendron molle* G.Don 的干燥花，蒙药名为“宝日 - 巴沙嘎”[1]，多生于灌木丛、山坡、石缝中，在我国广泛分布。闹羊花始载于《神农本草经》，具有活血、止痛、祛风、除湿等功效，常用于治疗肠胃痧、血热性刺痛、“宝如”病等[1-2]。文献报道闹羊花中含有黄酮类[3-5]、二萜类[5-7]、三萜类[8-9]及香豆素类[8]等化合物，其中黄酮类成分的含量较多，是闹羊花主要的有效成分，具有抗氧化、祛痰、抗炎等药理活性，可用于治疗心血管疾病，如心律失常、高血压等[10]。

蒙医药具有鲜明的民族特色，是蒙古民族集体智慧的结晶。但目前蒙药制剂发展较为落后，应用时仍以散剂、丸剂为主，存在不便携带、服用量大等问题。本课题以闹羊花药材原粉入药，添加适宜辅料和润湿剂制成闹羊花配方颗粒，不仅可以保留蒙医药特色，还克服了传统丸散剂适口性差等问题，而且能够更加精准地控制药量，对蒙药开发新剂型具有一定的参考价值。

由于生态环境、气候条件、采收期等因素的影响使不同来源闹羊花中的有效物质发生了改变，药材内在质量与临床治疗效果存在差异。

2020 年版《中国药典》和《内蒙古蒙药饮片炮制规范》仅简单建立了闹羊花的质量标准，无闹羊花的含量测定及指纹图谱研究项，文献也多侧重于研究闹羊花中的二萜类成分[5-7]，对黄酮类成分研究相对较少。基于此，本研究采用 HPLC 法建立 15 批闹羊花配方颗粒的指纹图谱，并对其进行化学模式识别分析，筛选影响闹羊花配方颗粒质量的标志物，同时测定 15 批样品中金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚 5 种黄酮类成分的含量，以期为评价蒙药闹羊花配方颗粒的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

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

1.2 试药

对照品山柰酚（纯度≥ 98%，批号：wkq 20042613，四川省维克奇生物科技有限公司）；金丝桃苷（纯度≥ 98%，批号：CRN0087）、槲皮苷（纯度≥ 98%，批号：CRN0353）、阿福豆苷（纯度≥ 98%，批号：CRN0007）、槲皮素（纯度≥ 98%，批号：CRN1117）（湖北翠园生物科技股份有限公司）。乙腈（瑞典欧森巴克化学公司，色谱纯），甲醇（天津市科密欧化学试剂有限公司，分析纯），磷酸（上海润捷化学试剂有限公司，分析纯），纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司），闹羊花药材细粉（批号：NYH1 ～ NYH15，祈蒙股份有限公司）。

2 方法与结果

2.1 闹羊花配方颗粒的制备

分别取 15 批闹羊花药材细粉（过 100 目筛）各 200.0 g，加入适宜辅料和润湿剂混合均匀，制成“手握成团，轻压即散”的软材，使用摇摆制粒机制粒，将所得闹羊花颗粒于 60 ℃下烘干、整粒、包装，得到 15 批闹羊花配方颗粒（NYHPFKL-1 ～ NYHPFKL-15，编号：S1 ～ S15）。

2.2 色谱条件

以 COSMOSIL 5C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，以乙腈（A）-0.2% 磷酸（B）为流动相梯度洗脱（0 ～ 25 min，14%A；25 ～ 29 min，14% ～ 18%A；29 ～ 34 min，18% ～ 20%A；34 ～ 60 min，20% ～ 46%A）；检测波长为 255 nm；柱温为 40 ℃；流速为 1.0 mL·min^{-1}；进样量为 10 μL。

2.3 供试品溶液的制备

取蒙药闹羊花配方颗粒样品适量，研细，精密称定 0.600 g，置于 10 mL 量瓶中，加适量甲醇溶解，超声（100 W，40 kHz）60 min，冷却至室温后，用甲醇定容至刻度，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.4 对照品溶液的制备

分别取金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚对照品适量，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，加适量甲醇，超声溶解，放冷后定容至刻度，配制成质量浓度分别为 100、250、88、292、119 μg·mL^{-1} 的单一对照品储备液。精密移取上述各对照品储备液适量，加甲醇稀释，制成金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚质量浓度分别为 5、50、4.4、29.2、0.595 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.5 指纹图谱研究

2.5.1 精密度试验 取同一份供试品溶液（批号：NYHPFKL-1），按“2.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录色谱图。以槲皮素（13 号峰）为参照峰，计算 15 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值。结果显示，各共有峰相对保留时间 *RSD* 值≤ 0.51%，相对峰面积 *RSD* 值≤ 1.2%，表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批闹羊花配方颗粒（批号：NYHPFKL-1），共 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以槲皮素（13 号峰）为参照峰，计算 15 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 *RSD* 值。结果显示，各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值≤ 0.41%，相对峰面积 *RSD* 值≤ 2.3%，表明该方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液（批号：NYHPFKL-1），按“2.2”项下色谱条件，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录色谱图。以槲皮素（13 号峰）为参照峰，计算 15 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 *RSD* 值。结果显示，各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值≤ 0.70%，相对峰面积 *RSD* 值≤ 3.1%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 指纹图谱的生成及相似度评价 取 15 批闹

羊花配方颗粒样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件测定，将所得色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》软件进行分析，以 S4 为参照图谱，采用中位数法生成对照图谱 R，设置时间窗宽度为 0.2 min，经多点校正后匹配，得到 15 批闹羊花配方颗粒的 HPLC 叠加指纹图谱。结果显示，15 批闹羊花配方颗粒的 HPLC 叠加指纹图谱中均有 15 个共有峰，详见图 1。以对照图谱 R 为参照，15 批样品的相似度均＞ 0.940，表明不同批次闹羊花配方颗粒中化学成分种类相差较小，相似度评价结果见表 1。

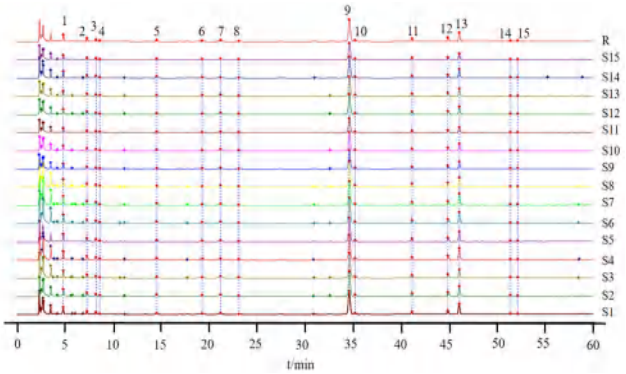


图 1　15 批闹羊花配方颗粒的 HPLC 叠加指纹图谱（S1 ～ S15）和对照图谱（R）

Fig 1　HPLC superimposed fingerprint（S1 ～ S15）and control spectrum（R）of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules

表 1　15 批闹羊花配方颗粒的相似度评价结果

Tab 1　Similarity of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules

批号	相似度	批号	相似度
NYHPFKL-1	0.998	NYHPFKL-9	0.998
NYHPFKL-2	0.998	NYHPFKL-10	0.999
NYHPFKL-3	0.997	NYHPFKL-11	0.997
NYHPFKL-4	0.987	NYHPFKL-12	0.998
NYHPFKL-5	0.994	NYHPFKL-13	0.997
NYHPFKL-6	0.985	NYHPFKL-14	0.999
NYHPFKL-7	0.999	NYHPFKL-15	0.941
NYHPFKL-8	0.998	对照图谱	1.000

2.5.5　共有峰指认　经与混合对照品的色谱图比对，共指认出 5 个色谱峰，其中 7 号峰为金丝桃苷，9 号峰为槲皮苷，11 号峰为阿福豆苷，13 号峰为槲皮素（参照峰），15 号峰为山柰酚，结果见图 2。

2.6　化学模式识别分析

2.6.1　聚类分析（CA）　将 15 批闹羊花配方颗粒共有峰峰面积导入 SPSS 27.0 软件，采用组间联接法，以平方欧氏距离为区间进行 CA[11]，结果如图 3 所示。当平方欧氏距离为 15 时，15 批闹羊花配方颗粒样品被聚为两类，其中样品

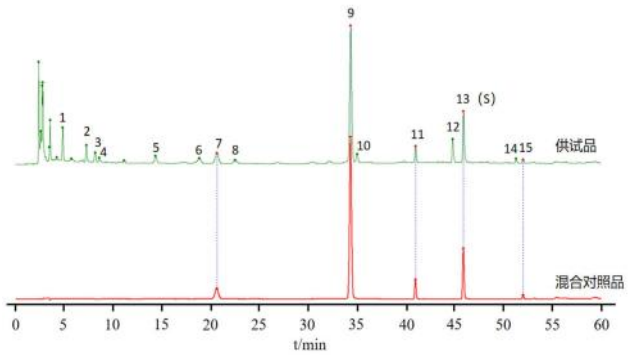


图 2　混合对照品溶液和供试品溶液的叠加 HPLC 图

Fig 2　Superposition HPLC diagram of mixed control solution and test solution

7. 金丝桃苷（hypericin）；9. 槲皮苷（quercitrin）；11. 阿福豆苷（afzelin）；13. 槲皮素（quercetin）；15. 山柰酚（kaempferol）

S1 ～ S7、S15 被聚为第 1 类，样品 S8 ～ S14 被聚为第 2 类，说明不同批次闹羊花配方颗粒样品之间的差异较大。

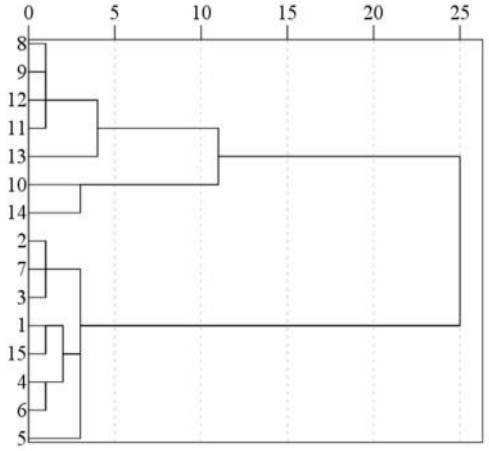


图 3　15 批闹羊花配方颗粒的聚类分析图

Fig 3　Cluster analysis diagram of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules

2.6.2　主成分分析（PCA）　将 15 批闹羊花配方颗粒共有峰的峰面积导入软件 SIMCA 14.1 中建立 PCA 模型[12]，累计贡献率为 0.95，表明模型可较好地解释原始变量，得分见图 4。根据 PCA 结果可将 15 批闹羊花配方颗粒样品划分为两类：S1 ～ S7、S15 为第 1 类，S8 ～ S14 为第 2 类，与 CA 结果一致。

2.6.3　正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）[13]

将 15 批闹羊花配方颗粒样品的 15 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件，建立 OPLS-DA 模型（见图 5），得到模型解释参数 $R^2X = 0.949$，$R^2Y = 0.846$，模型预测能力参数 $Q^2 = 0.719$ 均大于 0.5，表明该模型具有良好的解释和预测能力。15 批闹羊花配方颗粒样品分为两类，与 CA、PCA 结果一

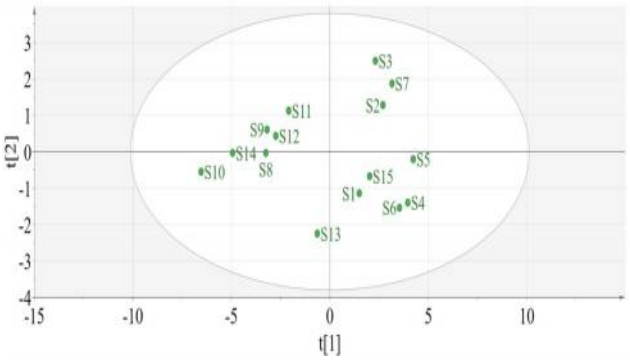


图 4 15 批闹羊花配方颗粒的 PCA 得分图

Fig 4 PCA scores diagram of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules

致，说明 OPLS-DA 结果可靠。200 次置换检验显示该模型不存在过拟合（见图 6）。以 VIP ＞ 1 为标准筛选影响闹羊花配方颗粒质量的标志物，由 VIP 图（见图 7）可知，贡献值较大的差异化合物有 10 个，依次为 10、9、12、2、15、14、11、6、1、13 号峰，其中 9 号峰为槲皮苷，11 号峰为阿福豆苷、13 号峰为槲皮素，15 号峰为山柰酚，这些化合物是闹羊花配方颗粒各批次样品间产生差异的主要标志性成分。

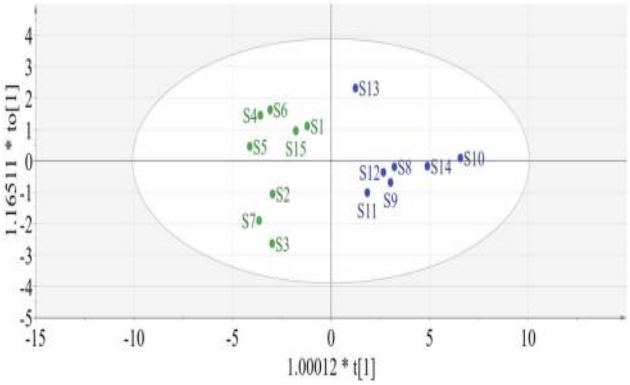


图 5 15 批闹羊花配方颗粒的 OPLS-DA 得分图

Fig 5 OPLS-DA scores of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules

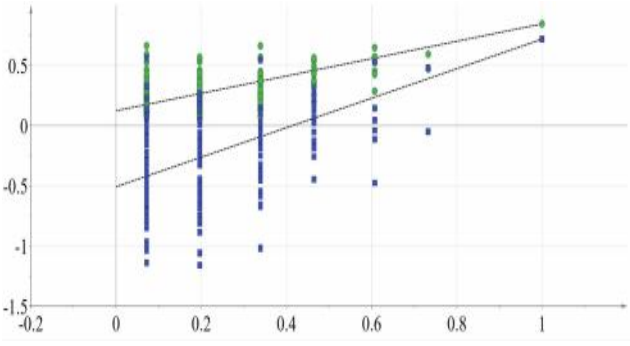


图 6 15 批闹羊花配方颗粒的 OPLS-DA 模型置换检验

Fig 6 Permutation test of OPLS-DA model for 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules

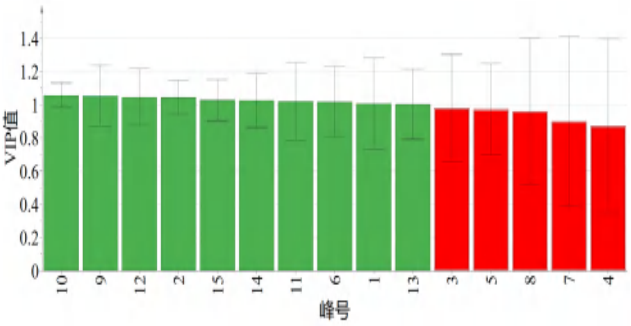


图 7 15 批闹羊花配方颗粒 OPLS-DA VIP 值图

Fig 7 OPLS-DA VIP value of 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules

2.7 闹羊花配方颗粒有效成分的含量测定

2.7.1 专属性试验 取空白溶剂（甲醇）、混合对照品溶液、闹羊花配方颗粒供试品溶液（批号：NYHPFKL-1）适量，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，见图 8。空白溶剂无干扰，且混合对照品溶液与闹羊花配方颗粒供试品溶液在相同保留时间处有相同色谱峰，表明该方法专属性良好。

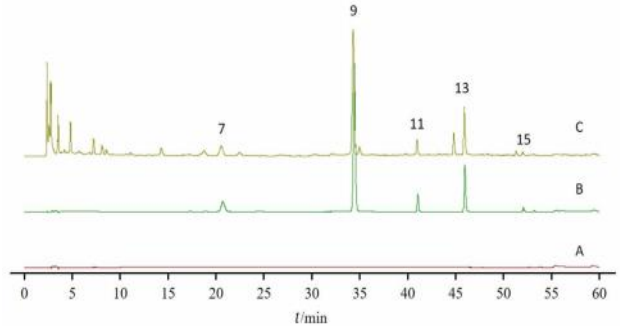


图 8 空白溶剂（A）、混合对照品溶液（B）、闹羊花配方颗粒供试品溶液（C）的 HPLC 色谱图

Fig 8 HPLC chromatogram of blank solvent（A），mixed reference solution（B）and Rhododendri Mollis Flos formula granules test solution（C）

7. 金丝桃苷（hypericin）；9. 槲皮苷（quercitrin）；11. 阿福豆苷（afzelin）；13. 槲皮素（quercetin）；15. 山柰酚（kaempferol）

2.7.2 精密度试验 取同一份闹羊花配方颗粒供试品溶液（批号：NYHPFKL-1），按“2.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚的峰面积。结果显示上述 5 种成分峰面积的 *RSD* 值分别为 0.61%、0.98%、0.63%、0.97%、0.77%，表明仪器精密度良好。

2.7.3 重复性试验 取同一批闹羊花配方颗粒（批号：NYHPFKL-1），共 6 份，按“2.3”项下方法制成供试品溶液后进样测定，计算金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚平均含量分别为 0.009%、0.106%、0.009%、0.071%、0.001%，

RSD 值分别为 1.7%、1.7%、1.3%、1.9%、1.2%，表明该方法重复性良好。

2.7.4　稳定性试验　取同一份闹羊花配方颗粒供试品溶液（批号：NYHPFKL-1），按“2.2”项下色谱条件，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚的峰面积，结果 *RSD* 值分别为 0.81%、2.0%、1.8%、1.8%、1.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.5　线性关系考察　精密吸取“2.4”项下各单一对照品储备液适量，用甲醇逐级稀释并定容摇匀制成质量浓度分别为金丝桃苷 10.00、8.00、6.40、5.12、4.10、3.28、2.62 μg·mL^{-1}，槲皮苷 100.00、80.00、64.00、51.20、40.96、32.77、26.21 μg·mL^{-1}，阿福豆苷 8.80、7.04、5.63、4.51、3.60、2.88、2.31 μg·mL^{-1}，槲皮素 58.40、46.72、37.38、29.90、23.92、19.14、15.31 μg·mL^{-1}，山柰酚 1.19、0.95、0.76、0.61、0.49、0.39、0.31 μg·mL^{-1} 的系列混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，再分别以各对照品的峰面积为纵坐标（*Y*），质量浓度（μg·mL^{-1}）为横坐标（*X*），绘制回归曲线，得到回归方程，见表 2。

表 2　各成分线性关系考察结果

Tab 2　Linear relation of each component

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg·mL^{-1}）
金丝桃苷	$Y = 33.155X - 0.8496$	0.9995	2.62 ～ 10.00
槲皮苷	$Y = 28.636X + 23$	0.9993	26.21 ～ 100.00
阿福豆苷	$Y = 26.382X + 2.6194$	0.9994	2.31 ～ 8.80
槲皮素	$Y = 11.054X + 0.6193$	0.9995	15.31 ～ 58.40
山柰酚	$Y = 40.264X - 0.3814$	0.9995	0.31 ～ 1.19

2.7.6　加样回收试验[14-15]　精密称取已知含量的闹羊花配方颗粒（批号：NYHPFKL-1），共 6 份，按照对照品加入量与样品中指标成分量之比为 1∶1 的原则，分别于每份闹羊花配方颗粒样品中加入适量金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚对照品。按“2.3”项下方法处理后进样测定，计算加样回收率，结果显示，金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚的平均加样回收率分别为 100.57%、102.39%、101.64%、98.63%、101.17%，*RSD* 值均≤ 1.9%，表明该方法回收率良好。

2.7.7　样品含量测定　取 15 批闹羊花配方颗粒，按“2.3”项下方法制备闹羊花配方颗粒供试品溶液，于“2.2”项下色谱条件进样测定，分别计算金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚的含量，结果见表 3，表明不同批次样品间各成分的含量有一定差异。

表 3　15 批闹羊花配方颗粒中 5 种成分的含量测定结果 (%)

Tab 3　Content of 5 components in 15 batches of Rhododendri Mollis Flos formula granules (%)

批号	金丝桃苷	槲皮苷	阿福豆苷	槲皮素	山柰酚
NYHPFKL-1	0.008	0.110	0.009	0.078	0.001
NYHPFKL-2	0.012	0.118	0.010	0.073	0.002
NYHPFKL-3	0.013	0.116	0.010	0.061	0.001
NYHPFKL-4	0.010	0.115	0.009	0.084	0.002
NYHPFKL-5	0.010	0.121	0.010	0.083	0.002
NYHPFKL-6	0.009	0.112	0.009	0.085	0.002
NYHPFKL-7	0.013	0.121	0.010	0.068	0.001
NYHPFKL-8	0.008	0.088	0.007	0.053	0.001
NYHPFKL-9	0.009	0.087	0.008	0.051	0.001
NYHPFKL-10	0.007	0.067	0.007	0.040	0.001
NYHPFKL-11	0.010	0.095	0.009	0.054	0.001
NYHPFKL-12	0.008	0.091	0.008	0.054	0.001
NYHPFKL-13	0.007	0.099	0.008	0.064	0.001
NYHPFKL-14	0.008	0.077	0.007	0.046	0.001
NYHPFKL-15	0.009	0.112	0.009	0.074	0.001

3　讨论

3.1　供试品溶液制备方法的选择

本试验以金丝桃苷等 5 个成分色谱峰峰面积大小、分离度及色谱峰数量、峰形等作为指标，考察不同提取溶剂（100% 甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇），不同提取时间（30、60、90 min），不同料液比（3∶100、3∶50、9∶100）的提取效果，最终确定选用 100% 甲醇溶液为提取溶剂，超声 60 min，提取料液比为 3∶50 的提取条件。

3.2　色谱条件的选择

本试验前期分别对不同流动相系统（乙腈 -0.05% 乙酸水、乙腈 -0.05% 磷酸水、乙腈 -0.1% 磷酸水、乙腈 -0.2% 磷酸水）进行考察，发现采用乙腈 -0.2% 磷酸水作为流动相时色谱峰峰形、分离度较好，基线平稳，故选用乙腈 -0.2% 磷酸水为流动相。同时，对不同柱温（30、35、40 ℃），不同检测波长（245、255、265 nm）等条件进行考察，结果 30、35 ℃条件下出峰时间较长，且部分色谱峰分离度不够，故选择 40 ℃为柱温。检测波长为 255 nm 时，金丝桃苷等 5 个成分的色谱峰峰面积较大，色谱峰数量较多，溶剂峰影响较小，分离度好，故选择 255 nm 为检测波长。

3.3　指纹图谱及化学模式识别分析

本试验以不同批次的闹羊花配方颗粒为研究对象建立了闹羊花配方颗粒的指纹图谱，并结合化学模式识别分析全面评价闹羊花配方颗粒的质

量。结果显示，15 批闹羊花配方颗粒指纹图谱中共有 15 个共有峰，与对照指纹图谱的相似度均＞0.940，说明各批次样品成分种类基本一致。CA、PCA 的结果均显示，15 批闹羊花配方颗粒大致可聚为两类，其中样品 S1 ～ S7、S15 为一类，样品 S8 ～ S14 为一类。OPLS-DA 结果显示，色谱峰 10、9（槲皮苷）、12、2、15（山柰酚）、14、11（阿福豆苷）、6、1、13（槲皮素）的 VIP 值＞1，说明这 10 个色谱峰对应的成分可作为评价闹羊花配方颗粒质量的标志物。

3.4 含量测定结果分析

黄酮类化合物金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚是闹羊花中的有效成分，具有抗炎、降压、抗菌、抗氧化等活性，与闹羊花药材活血止痛、抗高血压等功效相关[6]，本研究通过对闹羊花配方颗粒样品中金丝桃苷等 5 种成分进行含量测定，发现 15 批样品中金丝桃苷、槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山柰酚的含量分别为 0.007% ～ 0.013%、0.067% ～ 0.121%、0.007% ～ 0.010%、0.040% ～ 0.085%、0.001% ～ 0.002%，表明不同批次闹羊花配方颗粒中各成分含量存在差异，其原因可能与采收期、药材产地、制剂的制备工艺等因素有关。

综上，本试验建立的指纹图谱和含量测定方法高效、简便、重现性好，结合化学模式识别可用于评价蒙药闹羊花配方颗粒的质量；槲皮苷、山柰酚、阿福豆苷、槲皮素等 10 种成分可能是影响闹羊花配方颗粒质量的差异性成分。

参考文献

[1] 那生桑 . 内蒙古蒙药饮片炮制规范：2020 年版 [M]. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，2021.

[2] 崔国静，贺蔷，江肖肖 . 祛风除湿的闹羊花 [J]. 首都食品与医药，2017，24（15）：53.

[3] 刘有强，孔令义 . 闹羊花中黄酮类成分研究 [J]. 中草药，2009，40（2）：199-201.

[4] 王素娟，杨永春，石建功 . 羊踯躅花蕾中的二氢查耳酮 [J]. 中草药，2005，36（1）：21-23.

[5] 冯靖雯 . 闹羊花质量标准提升研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2021.

[6] 冯靖雯，郭小红，李丹，等 . HPLC-CAD 法测定不同产地和花期闹羊花中闹羊花毒素Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ[J]. 中草药，2021，52（24）：7624-7629.

[7] 陈琪琪，房鑫，薛秋雯，等 . 基于 HPLC 测定闹羊花毒素Ⅲ、Ⅵ含量的羊踯躅不同药用部位质量研究 [J]. 上海中医药大学学报，2020，34（6）：75-80.

[8] 张枝润 . 两种杜鹃花属植物化学成分及质量标准研究 [D]. 昆明：昆明理工大学，2012.

[9] Wang X，Hu YW，Yuan D，et al. Chemical constituents from the flowers of *Rhododendron molle* G. Don [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences，2014，23（2）：94-98.

[10] 李阳，焦扬，牛洁 . 红花中的黄酮类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 环球中医药，2024，17（1）：137-143.

[11] 刘梦，韩子璇，杨立茹，等 . 蒙药文冠木配方颗粒指纹图谱及含量测定研究 [J]. 中南药学，2024，22（2）：286-290.

[12] 王夏茵，岳宝森，张炜华，等 . 不同产地天麻 HPLC 指纹图谱、含量测定及化学模式识别研究 [J]. 中南药学，2023，21（5）：1358-1362.

[13] 王淑，张翠翠，郭凤丹，等 . 基于 UPLC 多指标含量测定和指纹图谱的不同种质金银花药材质量评价研究 [J]. 中草药，2024，55（3）：947-955.

[14] 杨立茹，刘梦，韩子璇，等 . 蒙药高灵脂配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱及含量测定研究 [J]. 中南药学，2023，21（12）：3130-3134.

[15] 韩子璇，刘梦，杨立茹，等 . 蒙药角茴香配方颗粒指纹图谱及含量测定研究 [J]. 中南药学，2024，22（2）：291-295.

（收稿日期：2024-04-17；修回日期：2024-05-09）

基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定结合化学计量学的蒙药山柰配方颗粒质量评价研究

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

摘要：目的 建立蒙药山柰配方颗粒指纹图谱及多成分含量测定方法，并结合化学计量学对不同批次的山柰配方颗粒进行质量评价。**方法** 采用 HPLC 法，色谱柱为 COSMOSIL 5C_{18}-AR-Ⅱ（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为甲醇 -0.1% 乙酸水溶液，流速为 1.0 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃，检测波长 250 nm。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）》进行指纹图谱相似度评价，SPSS 25.0 软件进行聚类分析（CA），SIMCA 14.1 进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）。**结果** 15 批山柰配方颗粒指纹图谱相似度均＞ 0.90，共标定 12 个共有峰，并指认出 5 种成分，绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷和对甲氧基肉桂酸乙酯含量分别为 0.074 ～ 0.088、0.023 ～ 0.031、0.017 ～ 0.033、0.102 ～ 0.132、31.014 ～ 40.729 mg • g^{-1}。CA、PCA、OPLS-DA 结果显示，15 批山柰配方颗粒可分为两类，5 个已知成分中，绿原酸等 3 个成分 VIP 值＞ 1。**结论** 建立的山柰配方颗粒指纹图谱及多成分含量测定方法准确、稳定、重复性好，化学计量学方法能够较好地筛选出标志性成分，可为山柰配方颗粒质量标准提供参考。

关键词：山柰；蒙药配方颗粒；HPLC 指纹图谱；含量测定；化学计量学
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2969-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.022

Quality evaluation of Mongolian traditional medicine Kaempferia formula granules based on HPLC fingerprint and multi-component content determination combined with chemometrics

TIAN Min-yuan[1], LIU Meng[1], HAN Zi-xuan[1], YANG Li-ru[1], LI Jia[1], KANG Ting-guo[1*], ZHANG Chun-gang[1, 2, 3*] (1. *College of Pharmacy*, *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116620; 2. *Department of Pharmacy*, *Changzhi Medical College*, *Changzhi Shanxi* 046000; 3. *Qimeng Co.*, *Ltd.*, *Chifeng Inner Mongolia* 024330)

Abstract: Objective To establish a fingerprint and multi-component content determination method for Mongolian traditional medicine Kaempferia formula granules, and to evaluate their quality by chemometrics. **Methods** The chromatography was performed on COSMOSIL 5C_{18}-AR-Ⅱ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of methanol-0.1% acetic acid water at the flow rate of 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 40 ℃ and the detection wavelength was 250 nm. The Fingerprint Similarity Evaluation System of Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint (2012 Edition) was used to evaluate the fingerprint similarity, and SPSS 25.0 software was used for clustering analysis. SIMCA 14.1 was used in principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. **Results** The similarity of fingerprint of 15 batches of Kaempferia formula granules was greater than 0.90, a total of 12 common peaks were calibrated, and 5 components were

基金项目：内蒙古自治区科技重大专项（No.2021ZD0017）；辽宁省科技计划联合计划基金（No.2023JH2/101700206）；辽宁中医药大学校级重点项目（No.2021LZY047）。
作者简介：田闵元，男，硕士研究生，主要从事中药新剂型、新技术研究，email：tian010401@126.com *__通信作者__：康廷国，男，博士研究生导师，教授，主要从事中药鉴定研究工作，email：kangtg@lnutcm.edu.cn；张纯刚，男，硕士研究生导师，副教授，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究和保健食品开发研究，email：gaogaoii123@163.com

identified. The content of chlorogenic acid, vanillic acid, ferulic acid, isorhamnein-3-*O*-*β*-D-glucoside and ethyl *p*-methoxycinnamate ranged from 0.074 ～ 0.088 mg • g^{-1}, 0.023 ～ 0.031 mg • g^{-1}, 0.017 ～ 0.033 mg • g^{-1}, 0.102 ～ 0.132 mg • g^{-1}, and 31.014 ～ 40.729 mg • g^{-1}. The above three analyses showed that 15 batches of Kaempferia formula granules were divided into 2 groups. Among the 5 known components, 3 components such as chlorogenic acid had values greater than 1. **Conclusion** The established fingerprint and multi-component content determination method is accurate, stable and reproducible. The chemometrics method can screen out the iconic components well, providing reference for the quality standard control of Kaempferia formula granules.

Key words: Kaempferia; Mongolian traditional medicine formula granule; HPLC fingerprint; content determination; chemometrics

山柰为姜科植物山柰 *Kaempferia galanga* L. 的干燥根茎，其性辛、温，归胃经，功效行气温中，消食，止痛，用于胸膈胀满，脘腹冷痛，饮食不消 [1]。山柰不仅是重要的中药材，也是蒙医临床上的常用药，可祛“巴达干 - 赫依”（类似于中医上的寒凝气滞等证），活血化瘀，常用于治疗消化不良、胃痛恶心、月经不调、血瘀、血痞等症 [2]。现代研究表明，山柰含有挥发油、黄酮、酚酸类和苯丙素类等成分 [3]，具有调节心血管系统、抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗炎等药理作用 [4-5]。传统的中药（蒙药）饮片需煎服，服用方式复杂，已逐渐不适于当下快节奏的生活需求，具有“三小、三效、五方便”等优点的中药（蒙药）配方颗粒应运而生 [6-7]。但由于目前蒙药的发展较为缓慢 [8]，山柰配方颗粒仍是国家及地方药品标准的暂缺品种。

《中国药典》中关于山柰药材的质量控制方法只有单一成分的含量测定，无法全面地评价药材的质量，且在现有的国内研究中，暂无关于山柰 HPLC 指纹图谱的报道。本研究通过 HPLC 法建立山柰配方颗粒的指纹图谱及多成分含量测定方法，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）》和化学计量学进行相似度评价和成分分析 [9-11]，对 15 批山柰配方颗粒进行系统分析，以期为建立山柰配方颗粒的质量标准提供依据。

1 材料

1.1 仪器

SHIMADZU LC-2010AHT 岛津高效液相色谱仪（日本岛津公司，包括四元泵，UV 紫外检测器，Lab Solution 工作站）；CP225D 十万分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；SG3300H 超声波清洗器（上海冠特超声仪器有限公司）；Y-2 摇摆制粒机（上海天和制药机械有限公司）；WGL-230B 电热鼓风干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）。

1.2 试药

绿原酸（批号：110753-202119，纯度：96.1%）、对甲氧基肉桂酸乙酯（批号：110835-202005，纯度：99.4%）（中国食品药品检定研究院），香草酸（批号：CRN0806，纯度：98.0%，湖北萃园生物科技有限公司），阿魏酸（批号：221102，纯度：98.0%，成都植标化纯生物技术有限公司），异鼠李素 -3-*O*-*β*-D-葡萄糖苷（批号 PS011411，纯度：98.5%，成都普思生物科技股份有限公司）；甲醇（瑞典欧森巴克化学公司，色谱纯）；甲醇（天津市科密欧化学试剂有限公司，分析纯）；醋酸（无锡市佳妮化工有限公司，分析纯）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。15 批山柰配方颗粒（编号 S1 ～ S15，由实验室自制，15 批原料药材由内蒙古祈蒙股份有限公司提供）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 COSMOSIL 5C_{18}-AR-Ⅱ（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：以甲醇为流动相 A，以 0.1% 乙酸水溶液为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 15 min，20% ～ 25%A；15 ～ 20 min，25% ～ 32%A；20 ～ 25 min，32% ～ 33%A；25 ～ 30 min，33% ～ 47%A；30 ～ 45 min，47% ～ 55%A；45 ～ 50 min，55% ～ 64%A；50 ～ 60 min，64% ～ 66%A），柱温 40 ℃；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测波长：250 nm；进样量：10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取各成分对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，配制成质量浓度为绿原酸 132 μg•mL^{-1}、香草酸 109 μg•mL^{-1}、阿魏酸 100 μg • mL^{-1}、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷 177 μg • mL^{-1}、对甲氧基肉桂酸乙酯 699 μg • mL^{-1} 的单一对照品储备液。取各成分储备液适量并混合，稀释一定倍数后配成含绿原酸 7.92 μg • mL^{-1}、香草酸 4.36 μg • mL^{-1}、阿魏酸 4.00 μg•mL^{-1}、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷 5.31

μg·mL^{-1}、对甲氧基肉桂酸乙酯 66.9 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液的制备

取山柰配方颗粒适量，研磨成细粉，精密称取细粉 0.50 g 置于具塞锥形瓶中，加入 50 mL 甲醇，称重，超声提取 30 min，冷却至室温后再次称重，用甲醇补足失重，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液稀释 2 倍即得。

2.4　指纹图谱方法学考察

2.4.1　精密度考察　取山柰配方颗粒（S1），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，连续测定 6 次，记录色谱图。结果显示，以 8 号峰为参照峰，12 个共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均＜ 0.11%，相对峰面积 *RSD* 值均＜ 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.2　重复性考察　取山柰配方颗粒（S1），精密称取 6 份，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果显示，以 8 号峰为参照峰，12 个共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均＜ 0.21%，相对峰面积 *RSD* 值均＜ 2.8%，表明方法重复性良好。

2.4.3　稳定性考察　取山柰配方颗粒（S1），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、16、24 h 按照“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果显示，以 8 号峰为参照峰，12 个共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均＜ 0.60%，相对峰面积 *RSD* 值均＜ 2.5%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5　山柰配方颗粒指纹图谱的建立及相似度评价

取 15 批山柰配方颗粒（S1 ～ S15），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，得到山柰配方颗粒 HPLC 色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）》进行共有峰匹配和相似度评价，以 S1 为参照图谱，采用中位数法和多点校正，得到 15 批山柰配方颗粒指纹图谱叠加图（见图 1）及对照图谱（见图 2A）。共标定 12 个共有峰，通过与混合对照品色谱图（见图 2B）的对比，指认了其中 5 个峰，分别为 1 号峰（绿原酸）、2 号峰（香草酸）、3 号峰（阿魏酸）、7 号峰（异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷）、12 号峰（对甲氧基肉桂酸乙酯）。以对照图谱为参照，对 15 批山柰配方颗粒指纹图谱进行相似度评价，结果见表 1。15 批供试品的相似度均＞ 0.90，表明 15 批供试品间的化学成分差异较小，建立的指纹图谱具有代表性，可以用于山柰配方颗粒的质量控制。

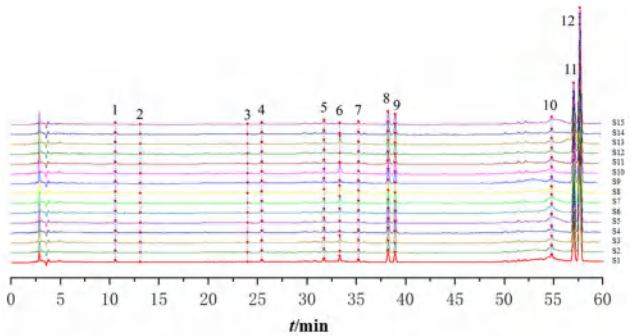


图 1　15 批山柰配方颗粒 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig 1　Superimposed HPLC fingerprint of 15 batches of Kaempferia formula granules

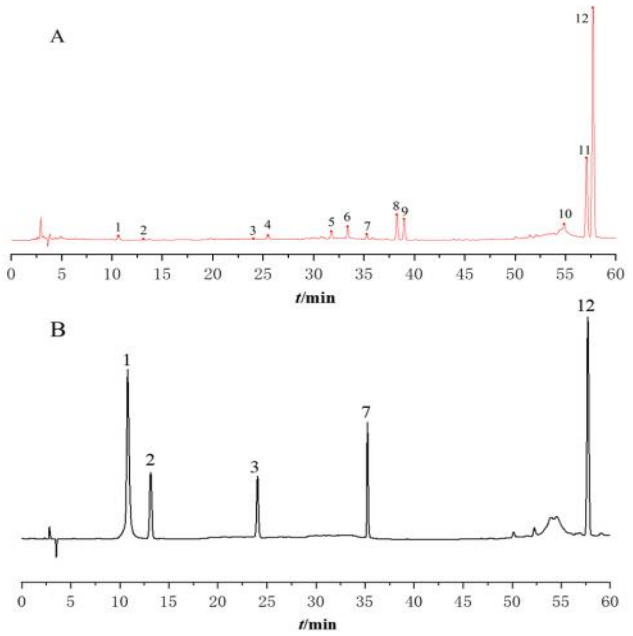


图 2　山柰配方颗粒 HPLC 对照指纹图谱（A）及混合对照品图谱（B）

Fig 2　HPLC control fingerprint（A）and mixed reference（B）of Kaempferia formula granules

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 香草酸（vanillic acid）；3. 阿魏酸（ferulic acid）；7. 异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷（isorhamnein-3-*O*-*β*-D-glucoside）；12. 对甲氧基肉桂酸乙酯（ethyl *p*-methoxycinnamate）

表 1　15 批山柰配方颗粒指纹图谱相似度评价结果

Tab 1　Fingerprint similarity evaluation of 15 batches of Kaempferia formula granules

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.995	S9	1.000
S2	0.998	S10	0.997
S3	0.999	S11	0.999
S4	0.999	S12	0.999
S5	0.998	S13	0.998
S6	0.993	S14	0.997
S7	1.000	S15	0.999
S8	1.000		

2.6　化学计量学分析

2.6.1　聚类分析（CA）　将 15 批山柰配方颗粒的 12 个共有峰面积导入 SPSS 25.0 软件中[11-12]，以最远邻元素为 CA，平方欧氏距离为测量区间进

行聚类分析，结果见图 3。当距离刻度为 15 时，S1、S2、S7、S11、S14、S15 聚为一类，S3 ～ S6、S8 ～ S10、S12、S13 聚为一类，表明不同批次的供试品在化学成分含量上可能存在差异。结合含量测定结果可知，这两类的配方颗粒中绿原酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯 3 种成分含量相差明显，这 3 个成分可能是导致不同批次供试品间质量差异的原因。

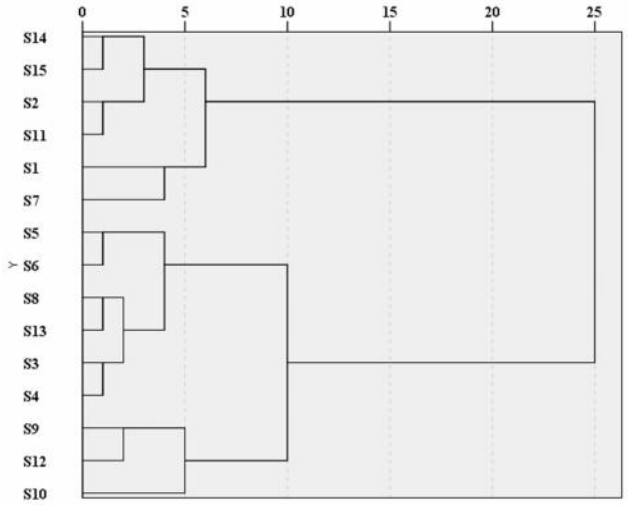


图 3 15 批山柰配方颗粒聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis of 15 batches of Kaempferia formula granules

2.6.2 主成分分析（PCA） 对 15 批供试品的 12 个共有峰面积进行 Z 标准化处理，以标准化后的 12 个共有峰面积为变量，采用 KMO 检验和 Bartlett 球形检验，以方差贡献率大于 80% 为标准，进行 PCA。结果显示，KMO 检验统计量为 0.698 ＞ 0.6，Bartlett 球形检验显著性＜ 0.01，表明适合进行 PCA；碎石图显示组件号在 2 ～ 3 时下降趋势变缓，表明适合选取 2 ～ 3 个主成分（见图 4）；总方差结果显示前 3 个成分的方差累计贡献率达到了 82.566%，表明选取 3 个主成分就足以表明样品中大部分的特征信息。

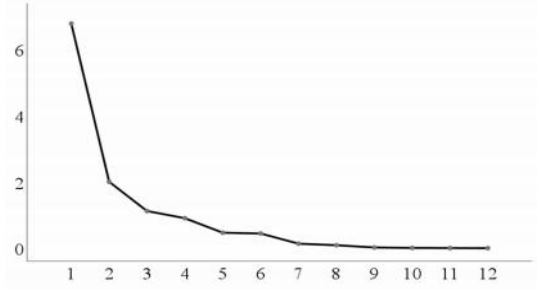


图 4 SPSS 主成分分析碎石图

Fig 4 SPSS principal component analysis lithotripsy

成分矩阵（见表 2）显示第一主成分主要反映了 1 号峰（绿原酸）、2 号峰（香草酸）、4 号峰、8 号峰、9 号峰、11 号峰、12 号峰（对甲氧基肉桂酸乙酯）的信息，第二主成分主要反映了 5 号峰、6 号峰、7 号峰（异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷）的信息，第三主成分主要反映了 3 号峰、10 号峰的信息。

表 2 SPSS 主成分分析成分矩阵

Tab 2 Component matrix of SPSS principal component analysis

峰	成分 1	成分 2	成分 3
1 号峰	0.952	0.133	－ 0.062
2 号峰	0.918	－ 0.038	0.253
3 号峰	0.338	－ 0.657	0.440
4 号峰	0.950	0.125	－ 0.003
5 号峰	0.081	0.874	－ 0.221
6 号峰	0.189	0.538	0.200
7 号峰	0.373	0.695	0.218
8 号峰	0.961	0.146	0.057
9 号峰	0.958	0.184	0.052
10 号峰	－ 0.026	0.026	0.939
11 号峰	0.896	0.094	0.003
12 号峰	0.968	0.148	0.066

采用 SIMCA 14.1 软件生成 PCA 得分图，见图 5。15 批样品大致分为两类，S3 ～ S6、S8 ～ S10、S12 ～ S13 聚为一类，S1、S2、S7、S11、S14、S15 聚为一类，与 CA 结果基本一致。

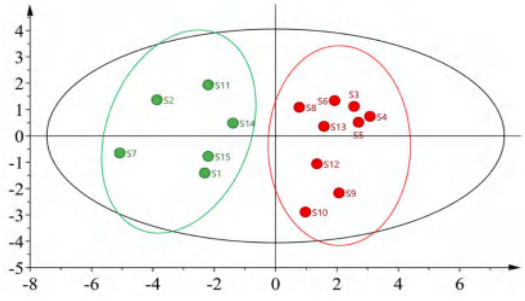


图 5 15 批山柰配方颗粒的 PCA 得分图

Fig 5 PCA scores of 15 batches of Kaempferia formula granules

2.6.3 正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA） 在 PCA 的基础上，进行有监督模式的 OPLS-DA，可进一步寻找出引起不同批次样品间差异的变量 [13]。以 12 个共有峰的峰面积为变量，采用 SIMCA 14.1 软件生成 OPLS-DA 得分图，见图 6。15 批供试品大致被分为两类，结果与 CA、PCA 基本一致。得到的 OPLS-DA 模型 $R^2X = 0.793$，$R^2X = 0.910$，均＞ 0.50 表明模型稳定性良好，$Q^2 = 0.776 > 0.50$，表明模型的预测性良好。为了确保所构建的模型不会出现过度拟合，而影响结果的准确性，我们利用 200 次置换检验对模型进行内部验证，结果见图 7。斜率为正值，且 Q^2 的回归线与 y 轴（左侧坐标轴）的相交点在 0 以下，说明所建立的模型可靠，未出现过度拟合。

此外，采用变量重要性投影（VIP）来筛选出引起不同批次供试品质量差异的成分，结果见图

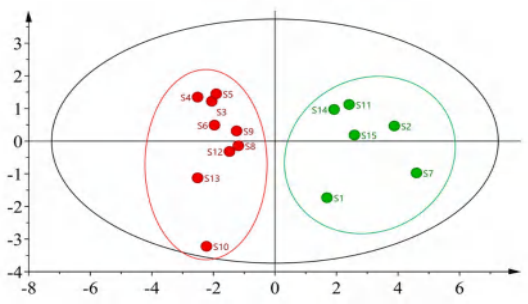


图 6　15 批山柰配方颗粒 OPLS-DA 得分图

Fig 6　OPLS-DA score of 15 batches of Kaempferia formula granules

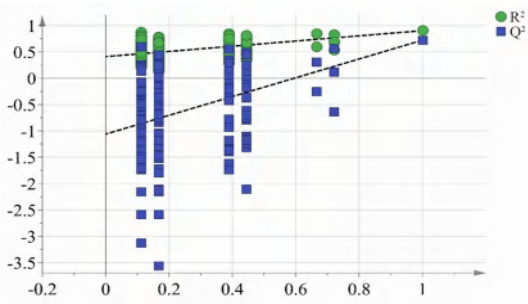


图 7　15 批山柰配方颗粒 OPLS-DA 模型置换检验

Fig 7　Replacement test of OPLS-DA model for 15 batches of Kaempferia formula granules

8。以 VIP 值＞1 为标准，12 号峰（VIP＝1.20285）、4 号峰（VIP ＝ 1.19346）、9 号峰（VIP ＝ 1.17813）、8 号峰（VIP＝1.17049）、11 号峰（VIP ＝ 1.15312）、2 号峰（VIP ＝ 1.14460）、1 号峰（VIP ＝ 1.14358）可作为质量差异标志物。其中，12 号峰为对甲氧基肉桂酸乙酯，2 号峰为香草酸，1 号峰为绿原酸。

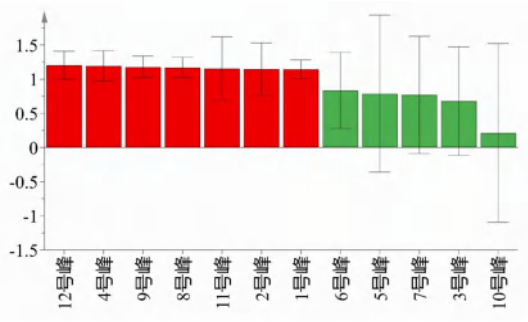


图 8　15 批山柰配方颗粒 VIP 图

Fig 8　VIP chart of 15 batches of Kaempferia formula granules

2.7　多成分含量测定

2.7.1　专属性考察　取山柰配方颗粒（S1），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，同时取“2.2”项下混合对照品溶液、空白溶液（甲醇），按照“2.1”项下方法进样分析，结果见图 9。空白溶剂对测定结果无影响，表明该方法专属性良好。

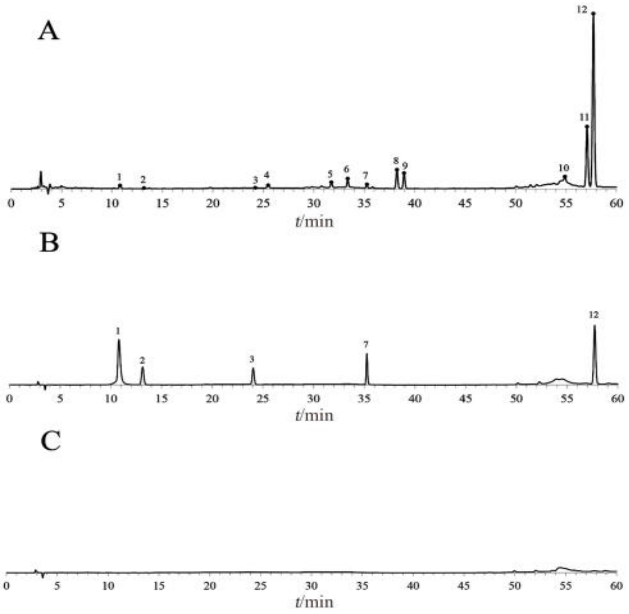


图 9　供试品（A）、混合对照品（B）、空白溶液（C）的 HPLC 色谱图

Fig 9　HPLC chromatogram of test sample（A），mixed control sample（B）and blank solution（C）

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 香草酸（vanillic acid）；3. 阿魏酸（ferulic acid）；7. 异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷（isorhamnein-3-*O*-*β*-D-glucoside）；12. 对甲氧基肉桂酸乙酯（ethyl *p*-methoxycinnamate）

2.7.2　线性关系考察　取“2.2”项下各成分对照品储备液适量，混匀后定容，得到混合对照品母液，再逐级稀释成不同浓度溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，记录绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯的峰面积。以峰面积为纵坐标（*Y*），对照品浓度为横坐标（*X*）进行回归，得到各成分的线性方程，将最低浓度的混合对照品溶液逐级稀释，以信噪比（*S*/*N*）为 3∶1 时为检测限（LOD），以 *S*/*N* 为 10∶1 时为定量限（LOQ），进样检测，结果见表 3。

表 3　山柰配方颗粒线性考察结果（μg・mL^{-1}）

Tab 3　Linearity of Kaempferia formula granules（μg・mL^{-1}）

成分	线性方程	r^2	范围	LOD	LOQ
绿原酸	$Y=5.249\times10^4X-6.565\times10^3$	0.9991	0.333 ～ 1.015	0.013	0.042
香草酸	$Y=2.467\times10^4X+3.206\times10^2$	0.9994	0.079 ～ 0.242	0.018	0.060
阿魏酸	$Y=2.788\times10^4X-1.056\times10^2$	0.9992	0.061 ～ 0.185	0.018	0.059
异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷	$Y=2.283\times10^4X-3.182\times10^2$	0.9992	0.229 ～ 0.697	0.012	0.042
对甲氧基肉桂酸乙酯	$Y=4.537\times10^3X+3.137\times10^4$	0.9994	98.056 ～ 299.244	0.083	0.276

2.7.3　精密度考察　取山柰配方颗粒（S1）适量，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，连续进样 6 次，记录绿原酸等 5 个成分的峰面积，计算 *RSD* 值。结果显

示，绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯的 *RSD* 值分别为 0.71%、0.87%、0.96%、0.83%、0.38%，表明仪器精密度良好。

2.7.4 重复性考察 取 6 份山柰配方颗粒（S1），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，记录绿原酸等 5 个成分的峰面积，计算各个成分的含量及 *RSD* 值。结果显示，绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯的 *RSD* 值分别为 0.48%、1.5%、1.6%、0.83%、0.69%，表明该方法重复性良好。

2.7.5 稳定性考察 取山柰配方颗粒（S1），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样分析，记录绿原酸等 5 个成分的峰面积，计算各个成分的含量及 *RSD* 值。结果显示，绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯的 *RSD* 值分别为 1.2%、1.8%、1.1%、1.5%、0.90%，表明供试品溶液在 24 h 时内稳定性良好。

2.7.6 加样回收试验 取 6 份已知含量的山柰配方颗粒（S1），按供试品中指标成分量与加入对照品量之比 1∶1 原则，分别在每份样品颗粒中加入适量的绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯对照品，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，记录 5 种成分的峰面积，计算各成分的加样回收率及 *RSD* 值。结果绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯的平均加样回收率分别为 104.89%、101.84%、102.58%、98.66%、100.77%，*RSD* 值分别为 2.4%、2.0%、2.8%、1.8%、1.4%，表明该方法准确度良好。

2.7.7 15 批样品含量测定 取 15 批山柰配方颗粒（S1 ～ S15），按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，记录 5 个成分的峰面积，计算各个成分的含量，结果见表 4。15 批山柰配方颗粒中绿原酸含量为 0.074 ～ 0.088 mg·g^{-1}，香草酸含量为 0.023 ～ 0.031 mg·g^{-1}，阿魏酸含量为 0.017 ～ 0.033 mg·g^{-1}，异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷含量为 0.102 ～ 0.132 mg·g^{-1}，对甲氧基肉桂酸乙酯含量为 31.014 ～ 40.729 mg·g^{-1}。

表 4 15 批山柰配方颗粒多成分含量测定 (mg·g^{-1})

Tab 4 Multi-component content determination of 15 batches of Kaempferia formula granules (mg·g^{-1})

批次	绿原酸	香草酸	阿魏酸	异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷	对甲氧基肉桂酸乙酯
S1	0.078	0.026	0.024	0.132	33.185
S2	0.076	0.026	0.024	0.102	32.534
S3	0.088	0.031	0.033	0.121	38.736
S4	0.086	0.030	0.030	0.129	40.729
S5	0.087	0.030	0.026	0.126	39.196
S6	0.083	0.030	0.030	0.127	38.846
S7	0.074	0.023	0.025	0.126	31.014
S8	0.083	0.030	0.032	0.122	37.896
S9	0.088	0.029	0.024	0.131	38.870
S10	0.082	0.029	0.017	0.127	37.768
S11	0.078	0.027	0.031	0.112	34.558
S12	0.084	0.027	0.022	0.130	39.759
S13	0.085	0.030	0.026	0.119	37.999
S14	0.083	0.028	0.025	0.117	35.179
S15	0.080	0.026	0.025	0.115	34.015

3 讨论

3.1 关于含量测定成分的选择

关于山柰化学成分的研究较少，已知山柰中含有对甲氧基肉桂酸乙酯、对羟基苯甲酸等苯甲酸及其酯类化合物；阿魏酸等肉桂酸及其酯类化合物；香草酸等香草醛类化合物；山柰酚、木犀草素、槲皮素等苯丙素类；单棕榈酸甘油、柠檬酸三甲酯等其他有机酸类化合物；此外还含有黄酮苷、挥发油等成分 [3-4]。根据现有药理学研究，选出具有显著药理活性的成分，再基于实验室现有条件，最终筛选出绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯、山柰酚、槲皮素、木犀草素 8 个成分。此外，试验前期的探索中发现，山柰酚、槲皮素、木犀草素 3 个成分未检测出，之后尝试加稀盐酸水解的方式 [14-15]，但测得的峰面积较小，考虑此法相对烦琐，加上盐酸对其他成分的测定也有一定的影响，因此将这 3 种成分排除，最终选定绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯作为指标性成分并进行含量测定。其中，绿原酸具有降脂降糖、抗肿瘤、保护心血管等作用 [16]；香草酸具有抗氧化、抗炎、抗菌和抗肿瘤等作用 [17]；阿魏酸具有增强前列腺素活性、镇痛、缓解血管痉挛等作用 [18-19]；异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、保护心血管、改善记忆力等作用；对甲氧基肉桂酸乙酯具有抗炎、抗菌和免疫调节作用，也是《中国药典》所规定的用于山柰含量测定的成分。

3.2 色谱条件的选择

试验前期对绿原酸等 5 个成分进行了紫外全波长扫描，发现波长在 250 nm 和 270 nm 时，对于绿原酸、香草酸、阿魏酸、异鼠李素 -3-*O*-*β*-D- 葡萄糖苷、对甲氧基肉桂酸乙酯都有较好的吸收，250

nm 色谱图相比 270 nm 杂峰少、分离度好，因此选择 250 nm 作为检测波长。试验对比了甲醇 - 乙酸水、甲醇 - 磷酸水、乙腈 - 磷酸水、乙腈 - 乙酸水等流动相体系，发现磷酸水会导致基线向上倾斜，乙腈 - 乙酸水基线不稳，最终选择甲醇 -0.1% 乙酸水。此外，在试验中发现柱温低于 35 ℃时，阿魏酸会分裂为两个相同高度的峰。综上，最终确定色谱条件为柱温 40 ℃，流动相甲醇 -0.1% 乙酸，检测波长 250 nm，流速 1.0 mL • min^{-1}。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

本试验比较了不同提取溶剂（40% 甲醇、60% 甲醇、80% 甲醇、100% 甲醇），不同料液比（1∶25、1∶50、1∶100、1∶150），不同提取时间（15、30、45、60 min），以 5 个成分色谱峰面积大小和各成分色谱峰数量及分离度为考察指标，最终确定 100% 甲醇提取，料液比为 1∶100、提取时间 30 min 为最佳提取条件。

3.4 指纹图谱及化学计量学分析

本试验通过建立 15 批山柰配方颗粒指纹图谱并进行相似度评价，结果显示，15 批供试品指纹图谱相似度均＞ 0.90，表明山柰配方颗粒整体质量稳定。通过 CA、PCA、OPLS-DA、VIP 等化学计量学方法发现 15 批山柰配方颗粒可分为两类，12 个共有峰中，1、2、4、8、9、11、12 号峰的 VIP 值＞ 1，对山柰配方颗粒的质量稳定贡献较大。其中，1 号峰（绿原酸）、2 号峰（香草酸）、12 号峰（对甲氧基肉桂酸乙酯）为已知成分，4 号峰、8 号峰、9 号峰、11 号峰在今后的探索研究值得关注。在含量测定中发现，山柰中主要化学成分为对甲氧基肉桂酸乙酯，其峰面积可达总峰面积的 40% 以上。采用指纹图谱和多成分含量测定，并结合化学计量学的方法，可在评价药品质量一致性的同时，筛选出具有整体性、专属性强的指标，建立更为科学、合理、全面的质量评价标准。

4 结论

本研究建立的蒙药山柰配方颗粒指纹图谱及多成分含量测定方法重复性好、准确性高，可用于蒙药山柰配方颗粒的质量控制。15 批山柰配方颗粒的质量整体相对稳定，化学成分种类差异较小，但在含量上存在一定差异。通过化学计量学筛选出 7 个质量差异标志性成分，其中 3 个为已知成分，可为进一步完善山柰药材及相关制剂的质量标准提供一定参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：30-31.

[2] 内蒙古蒙药材炮制规范 2017 年版 [S]. 2017：36.

[3] 乔蕊，刘俊豪，皮慧芳，等 . 山柰根茎化学成分的研究 [J]. 中国民族民间医药，2022，31（16）：53-56.

[4] 项昭保，平雪丽，屠大伟 . 山柰的活性成分及在食品工业中应用的研究进展 [J]. 食品工业科技，2021，42（17）：448-458.

[5] 钟文良，熊雨，王贤文，等 . 山柰酚抗肿瘤效应与机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（20）：219-226.

[6] 杨立茹，刘梦，韩子璇，等 . 蒙药高灵脂配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱及含量测定研究 [J]. 中南药学，2023，21（12）：3130-3134.

[7] 李佳，陶晓倩，韩子璇，等 . 蒙药制剂研究进展 [J]. 中南药学，2023，21（12）：3122-3129.

[8] 徐嘉璠，韩子璇，陶晓倩，等 . 蒙药材质量标准及质量控制方法的研究进展 [J]. 中南药学，2024，22（2）：279-285.

[9] 张兰，王云，郑颖豪，等 . 基于 HPLC 指纹图谱与多成分含量测定结合化学计量学的傣肾宁颗粒质量评价研究 [J]. 中华中医药杂志，2022，37（12）：7418-7422.

[10] 朱志坤，郭媛媛，王飘，等 . 丹参粉 HPLC 指纹图谱的建立及化学计量学方法评价 [J]. 中华中医药杂志，2023，38（2）：857-861.

[11] 刘梦，韩子璇，杨立茹，等 . 蒙药文冠木配方颗粒指纹图谱及含量测定研究 [J]. 中南药学，2024，22（2）：286-290.

[12] 沈丹萍，姜鹏，詹常森 . 基于 UPLC 指纹图谱和多成分测定的天王补心丸质量控制研究 [J]. 中国中药杂志，2024，49（5）：1240-1248.

[13] 王婷格，罗陆遥，薛瑞，等 . 基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定结合化学计量学的盐杜仲质量评价研究 [J]. 中国中药杂志，2024，49（1）：141-150.

[14] 封传华，李刚，张静，等 . 高效液相色谱法同时测定山柰中槲皮素和山柰素含量 [J]. 中国中医药信息杂志，2016，23（6）：77-79.

[15] 李刚，封传华，张静，等 . HPLC 法测定山柰药材中山柰素的含量 [J]. 中国药房，2016，27（18）：2558-2559.

[16] 王玲娜，姚佳欢，马超美 . 绿原酸的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报，2017，36（11）：1121-1130.

[17] 马铭研，陈维，俞松林 . 腹水草 HPLC 指纹图谱研究及香草酸等 6 种成分的含量测定 [J]. 药物分析杂志，2017，37（5）：763-770.

[18] 张欣，高增平 . 阿魏酸的研究进展 [J]. 中国现代中药，2020，22（1）：138-147.

[19] 陈良胜 . 正交试验优选当归药材中阿魏酸提取工艺 [J]. 中国药业，2021，30（22）：71-73.

（收稿日期：2024-02-20；修回日期：2024-04-20）

药品说明书适老化研究专题

【编者按】

药品说明书是指导临床用药的法定文件，也是医务人员及患者安全、合理用药的指南，可指导临床合理用药和传递产品知识。药品说明书的真实准确、规范程度和全面关系到药物的有效性与安全性。由于老年人的用药特殊性，药品说明书中有关老年人用药项目的表述内容正确完整与否，直接关系到老年患者的健康甚至生命安全。大量的研究显示，我国药品说明书中老年用药信息存在一定缺失，且有些说明书字体太小，用语太专业，老年患者无法看清和看懂，无法正确用药。我国先后出台了一些关于规范说明书的法规性要求和规定，但目前存在的问题还比较多，且随着我国社会老龄化进程加速发展，问题日益突出。为此，我们在全国范围内开展了药品说明书适老化研究，分析了我国老年患者药品说明书使用现状和存在的问题，同时借鉴国外药品说明书设计方法和经验，提出了我国药品说明书适老化改革的政策建议和实施路径。本专题对药品说明书适老化研究成果进行报道。

【主持人简介】

赵志刚，主任药师 / 教授，博士研究生导师，现任北京天坛医院药学部主任、首都医科大学药学院临床药学系主任、北京市医院管理中心总药师。现兼任国家药典委员会第十一届委员、中国健康促进基金会医药知识管理专项基金专家委员会主任委员、紫禁城国际药师论坛执行主席、中国医药新闻信息协会儿童安全用药分会会长、中日医学科技交流协会药学专业委员会主任委员等。同时担任《药品评价》（医院药学版）主编 、《中南药学》副主编、《中国药学杂志》等期刊编委。发表各类学术文章 300 余篇，SCI 论文 70 余篇。主编和参加学术著作编写 80 多部，其中主编 20 多部，主审 2 部，主译 1 部，副主编 3 部，编委 30 多部。

北京地区 737 例老年患者药品说明书阅读问题调研及适老化探讨

鲁秀玲[1]，闫阔[2]，樊栓成[3]，赵志刚[4*]（1. 朝阳区三间房社区卫生服务中心，北京 100024；2. 北京市垂杨柳医院，北京 100022；3. 北京迎诚医学研究院，北京 100076；4. 首都医科大学附属北京天坛医院，北京 100070）

摘要：目的 分析老年患者阅读药品说明书存在的问题，探讨其改进的必要性，提出符合老年人需求的改进建议。**方法** 基于对北京地区老年患者的调研，了解患者对说明书的理解程度，分析患者阅读说明书时存在的问题，收集患者对说明书的改进建议。**结果** 问卷将患者理解药品说明书的程度分为不看说明书、基本不能看懂、部分能看懂、能看懂，除了患者的性别与理解说明书的程度无关外，患者的年龄、受教育程度、同住情况都与基本不能看懂说明书的人数有关（$P < 0.05$）。在阅读药品说明书时，62.55% 的人认为用词太专业、63.09% 的人指出内容太多、88.06% 的人提出字太小，但都与患者的性别、年龄、受教育程度、同住情况无关（$P > 0.05$）。**结论** 被调查的老年群体一致认为，药品说明书的内容应该及时更新、不断改进。为适合老年人的需求，药品说明书在内容、格式、字体大小等方面应该进行修改和完善，以充分发挥其指导作用。

关键词：药品说明书；存在问题；适老化；调研；理解程度

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2976-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.023

基金项目：中国药品监督管理研究会立项课题（No.2023-018）。

作者简介：鲁秀玲，女，副主任药师，主要从事药事管理与药学服务工作，email：lxlhgl@163.com *通信作者：赵志刚，男，主任药师，主要从事医院药学与药事管理工作，email：1022zzg@sina.com

Survey of problem in reading drug instructions in elderly patients and age-friendly modifications

LU Xiu-ling[1], YAN Kuo[2], FAN Shuan-cheng[3], ZHAO Zhi-gang[4*] (1. *Department of Pharmacy*, *Beijing Sanjianfang Community Health Centre*, *Beijing* 100024; 2. *Department of Pharmacy*, *Beijing Chuiyangliu Hospital*, *Beijing* 100022; 3. *Beijing Sincere Medical Research Institute*, *Beijing* 100076; 4. *Department of Pharmacy*, *Beijing Tiantan Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100070)

Abstract: Objective To determine the problems in reading drug instructions among elderly patients, and suggest age-friendly modifications. **Methods** Based on a survey of elderly patients in Beijing area, we aimed to understand the level of patients comprehension regarding drug instructions, analyze the problems and collect suggestions for improvement. **Results** The questionnaire divided the patients' ability to understand drug instructions into four levels: ignore the instruction, basically unable to understand, the instruction partial understanding of the instruction, and understand the instruction. Except for the patient's gender, which was unrelated to the comprehension level, factors such as age, education level, and co-living situation were all related to the number of people who could not understand the instructions; there was a statistically significant difference ($P < 0.05$). When reading drug instructions, 62.55% believed that too many jargons were used, 63.09% pointed out that the content was too much, and 88.06% complained about too small font size. But all these were irrelevant to the patient's gender, age, education level, and co-living situations ($P > 0.05$). **Conclusion** Medication instructions should be timely updated and continuously improved. To suitable to the needs of the elderly, medication instructions should be modified and from content, format, font size, and other aspects, fully leveraging their guiding role for other elderly.

Key words: drug instruction; existing problem; age-friendly design; survey; comprehension degree

在 60 岁及以上老年人中，以 10 岁为一个年龄组，显现出随着年龄的增加，老年人患多种慢性病的比例增加的特点。数据显示，70 ～ 79 岁年龄组患多种慢性病的比例最大[1]。在慢性病成为主要疾病负担的大背景下，老年人成为我国的主要健康风险人群，也是医疗卫生服务体系需要关注的重点人群。按照国际社会惯用标准，2021 年 65 岁及以上人口在总人口中占比达到 14.2%，标志着中国正式进入到老龄社会。中国老年人口规模的持续增长，将导致我国健康需求迎来快速增长。2022 年 3 月，国家卫生健康委等 15 部门联合发布《"十四五" 健康老龄化规划》，进一步提出推动老年健康服务高质量发展，增量与提质并重的要求，并提出了一系列新任务[2]。其中任务之一就是普及合理用药等老年健康知识，不断提高老年人健康核心信息知晓率和健康素养水平。药品说明书的适老化改进是推进老年人合理用药进程中的重要一环。药品说明书是载明药品重要信息的法定文件，是医师开具处方选用药品的法定指南，是患者了解药品信息的主要途径[3]。目前英文数据库中鲜有针对我国老年患者处方或药品标签误解率及相关影响因素的调查研究。我国药监部门目前尚未对药品说明书中老年用药信息标注情况进行具体规定[4]。本文基于北京地区 737 例老年患者药品说明书阅读问题调研，探讨药品说明书适老化改进的必要性，并对药品说明书的改进提出了建议。

1 资料与方法

1.1 纳入标准与排除标准

纳入标准：① ≥ 60 岁且有高血压、糖尿病、高血脂或冠心病等至少两种慢性病史的患者，或服药≥ 5 种（一种通用名算一种药品）的患者；② 经患者本人或者家属同意参加调研者；③ 没有接受过居家药学服务的患者。排除标准：① 合并严重精神障碍等疾病者；② 意识障碍或昏迷者。

1.2 调查方法

在知情同意下，采取药师入户调研的方式，采用纸质问卷或者手机、平板电脑等电子工具录入调研结果的形式相结合。要求入户问卷记录时间不能少于 0.5 h（1800 s），纸质问卷录入电脑的时间不少于 10 min（600 s）。

1.3 研究对象

766 份问卷调研数据来自北京市 15 个区（怀柔区除外），90 家单位，包括 9 家医院、72 家社区卫生服务中心、9 家社区卫生服务站。删除问卷中年龄＜ 60 岁以及未填年龄的患者，收集符合入组标准

的患者信息 737 例，男性占 42.61%，女性占 57.39%；年龄 60 ～ 95 岁，平均年龄（69.99±7.56）岁；学历：本科及以上占 8.82%，大专 / 中专 13.43%，高中占 25.64%，初中占 35.96%，小学及以下占 16.01%，其他占 0.14%；目前工作状态：退休在家占 89.28%，返聘在岗占 2.71%，务农或在城市打工占 6.79%，其他占 1.22%；居住现状：独居（包括住养老院）占 8.68%，与老伴或保姆同住占 52.65%，与子女同住或祖孙三代、四代同住占 38.67%；有高血压、高血脂、糖尿病、高尿酸血症等慢性病史和胃炎、骨关节炎等常见病史。

1.4 统计学方法

现主要从性别、年龄、受教育程度、同住情况四个维度分析与老年患者对药品说明书理解程度、药品说明书存在的问题的相关性。针对药品说明书的改进建议，统计患者的需求，采用 Excel 2013 录入数据，应用 SPSS21.0 软件对数据进行统计分析，连续性正态分布资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，计数资料以例表示，采用 χ^2 检验及 Fisher 精确概率检验进行统计学分析，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药品说明书的理解程度与老年患者性别、年龄、受教育程度、同住情况的相关性分析

用药前仔细阅读药品说明书是老年患者合理用药的重要保障。参与调查的 737 例老年患者中，6.51% 的患者不看说明书，8.14% 的患者不能 / 基本不能看懂说明书，57.94% 的患者部分能看懂说明书，27.41% 的患者能看懂说明书。分析结果显示，患者对说明书的理解程度与性别无关。本文对参与调研的老年患者按 60 ～ 69 岁、70 ～ 79 岁、80 岁以上三个年龄段分组统计分析。不看说明书的患者、不能 / 基本不能看懂说明书的患者人数随着年龄的增大而显著增多（$P < 0.05$）。部分能看懂、能看懂说明书的老年患者与年龄无关，可能因老年患者视力、记忆力或接受新知识的能力下降故难以理解药品说明书 [5]。

老年患者随着受教育程度的降低，不看说明书、不能 / 基本不能看懂说明书、部分能看懂说明书的人数呈增多的趋势，能看懂说明书的人数呈减少趋势。说明老年患者对药品说明书的理解程度与受教育的程度有关。

近年来，独居空巢老人持续增加，对医疗健康服务的提高带来影响 [6]。老年患者同住情况与不能 / 基本不能看懂说明书以及部分看懂说明书的人数有关。独居（包括住养老院）的老年人看不懂药品说明书的人数较多，与老伴、保姆或者子女、孙辈等同住的老年人能部分读懂说明书内容的较多，这可能与同住人能够帮助阅读或解释说明书的内容有关。不看说明书、能看懂说明书的老年患者的人数与同住情况无关，详见表 1。

总之，老年患者年龄越大、受教育程度越低、同住人数越少，不能 / 基本不能看懂说明书的人数越多。可见老年人，尤其是受教育程度低、独居的老年人用药安全应该成为关注的重点。

表 1 不同性别、年龄段、文化程度、同住情况患者理解药品说明书程度的比较

Tab 1 Degree of understanding of drug instructions among patients of different genders，age groups，education levels，and co-living situations

因素	项目	例数（n）	不看说明书		不能 / 基本不能看懂		部分能看懂		能看懂	
			例数 [n（%）]	P	例数 [n（%）]	P	例数 [n（%）]	P	例数 [n（%）]	P
性别	男	314	19（6.05）	0.661	21（6.69）	0.214	183（58.28）	0.871	91（28.98）	0.410
	女	423	29（6.86）		39（9.22）		244（57.68）		111（26.24）	0.410
年龄	60 ～ 69 岁	406	17（4.19）	0.009	24（5.91）	0.045	244（60.10）	0.098	121（29.80）	0.087
	70 ～ 79 岁	239	20（3.35）		27（11.30）		139（58.16）		53（22.18）	
	≥ 80 岁	92	11（11.96）		9（9.78）		44（47.83）		28（30.43）	
受教育程度	本科及以上	65	2（3.08）	0.039	0（0.00）	0.001#	29（44.62）	0.007	34（52.31）	＜ 0.001
	大专 / 中专	99	5（5.05）		8（8.08）		46（46.46）		40（40.40）	
	高中	189	7（3.70）		12（6.35）		118（62.43）		52（27.51）	
	初中	265	20（7.55）		19（7.17）		166（62.64）		60（22.64）	
	小学及以下	118	14（11.86）		20（16.95）		68（57.63）		16（13.56）	
	未知	1								
同住情况	独居 / 养老院	64	5（7.81）	0.773	13（20.31）	0.001	27（42.19）	0.017	19（29.69）	0.829
	与老伴 / 保姆同住	388	23（5.93）		25（6.44）		237（61.08）		103（26.55）	
	与子女同住	285	20（7.02）		22（7.72）		163（57.19）		80（28.07）	

注（Note）：#Fisher 精确检验（Fisher's exact test）。

2.2 阅读药品说明书存在的问题与老年患者性别、年龄段、文化程度、同住情况相关性探讨

老年人随年龄增长，人类的生理从外到内发生着不同程度的变化。从老年群体的感知能力考虑：首先，是视力的下降，对字体的辨别能力下降，国际印刷的标准字体对老年人来说不易分辨；其次，是记忆力的下降，忘记事情变得越来越普遍，大大影响生活质量 [5]。在阅读药品说明书时，62.55% 的人认为用词太专业、63.09% 的人指出内容太多、88.06% 的人提出字太小。阅读药品说明书时存在的

问题与老年患者的年龄、性别、受教育程度、同住情况无关（$P > 0.05$），见表 2。说明阅读药品说明书存在的问题是广大老年患者的共识问题，应该高度重视。

表 2　阅读药品说明书存在问题与患者性别、年龄段、受教育程度、同住情况相关性

Tab 2　Correlation between problems in reading drug instructions and patients' gender，age，education level，and co-living situation

因素	项目	例数（n）	用词太专业读不懂		内容太多不知道看哪里		字太小看不清		其他问题	
			例数 [n（%）]	P	例数 [n（%）]	P	例数 [n（%）]	P	例数 [n（%）]	P
性别	男	314	197（62.74）	0.928	195（62.10）	0.631	274（87.26）	0.565	3（0.96）	1.000#
	女	423	264（62.41）		270（63.83）		375（88.65）		5（1.18）	
年龄	60 ～ 69 岁	406	242（59.61）	0.168	245（60.34）	0.231	356（87.68）	0.929	3（0.74）	0.334#
	70 ～ 79 岁	239	160（66.95）		159（66.53）		212（88.70）		3（1.26）	
	≥ 80 岁	92	59（64.13）		61（66.30）		81（88.04）		2（2.17）	
受教育程度	本科及以上	65	36（55.38）	0.364	37（56.92）	0.842	59（90.77）	0.810	1（1.54）	0.178#
	大专 / 中专	99	56（56.57）		64（64.65）		89（89.90）		0（0.00）	
	高中	189	119（62.96）		118（62.43）		168（88.89）		3（1.59）	
	初中	265	175（66.04）		170（64.15）		230（86.79）		1（0.38）	
	小学及以下	118	74（62.71）		76（64.41）		102（86.44）		3（2.54）	
	未知	1								
同住情况	独居 / 养老院	64	40（62.50）	0.962	41（64.06）	0.982	55（85.94）	0.353	0（0.00）	0.130#
	与老伴 / 保姆同住	388	241（62.11）		245（63.14）		348（89.69）		2（0.52）	
	与子女同住	285	180（63.16）		179（62.81）		246（86.32）		6（2.11）	

注（Note）：#Fisher 精确检验（Fisher's exact test）。

调研反馈的其他问题包括：患者不识字、受教育程度低、缺乏用药安全知识、自主服药；患者认为药品说明书中的药品不良反应太吓人、英文和化学式看不懂；有些药品说明书存在动物实验太多、抗菌药物适应证太多、服药时间餐前餐后不明确等诸多问题。

2.3　*老年患者针对阅读药品说明书存在的问题提出的修改建议分析*

针对药品说明书存在的问题，93.76% 的患者建议增大字体，80.33% 的患者建议用通俗易懂的语言表达，77.34% 的患者建议精简内容，37.86% 的患者建议用画图的形式展示。0.54% 的患者提出了其他改进建议，包括药品说明书应分专业版和普通版，专业版供医务专业人员使用，精简内容后的普通版供患者使用；药盒上印上二维码，手机一扫就能显示或者讲解药品的用法用量、注意事项，观看特殊装置给药方式的视频介绍；药盒用法用量、注意事项有醒目标识等。药品说明书修改建议分析见表 3。

表 3　药品说明书修改建议

Tab 3　Suggestions for drug instruction modifications

建议	例数（n）	占比 /%
增大字体	691	93.76
通俗易懂的语言表达	592	80.33
精简内容	570	77.34
用画图的形式展示	279	37.86
其他建议	4	0.54

3　讨论

随着中国人口老龄化速度的加快和高龄化程度的加深，老年人用药特殊需求将成为我国积极应对人口老龄化国家战略和健康中国战略两大战略成功实施的关键点。

3.1　*老年患者对药品说明书的理解程度与性别、年龄、同住情况、受教育程度的相关性*

本次问卷调研结果显示，年龄越大的、受教育程度越低的人不看说明书的越多，与性别无关，而读懂说明书的程度与受教育程度有关，这些结论均与文献报道 [7] 的结论一致。但文献提出读懂说明书的程度与年龄有关的结论与本文的结论不一致。原因可能是文献 [7] 是对 18 ～ 44 岁、45 ～ 59 岁、60 岁以上的三个年龄组的患者进行分析，本文是对 60 岁以上的老年人分三个年龄组分析，老年人不同年龄段在读懂说明书的程度上没有明显差异。慕媛等 [8] 对 18 ～ 59 岁与 60 岁以上两个年龄组的患者理解说明书的程度进行分析，少部分能理解药品说明书的患者与年龄有关，60 岁以上的老年患者少部分能理解的人数较多，与本文不能 / 基本不能看懂说明书的患者与年龄有关的结论比较吻合。张志伟 [9] 指出患者对药品说明书理解程度的高低与患者文化水平有关。文化程度越高，患者对药品说明书的理解程度越高，与本文的分析结果一致。陈细兰等 [10] 从患者对药品说明书的认可度进行分析，67.7% 的老年人对药品说明书的内容比较重视，认为药品说明书内容对正确、安全用药有较大帮助。

3.2　*阅读药品说明书存在的问题*

3.2.1　药品说明书内容存在的问题　由于老年人的用药特殊性，药品说明书中有关老年人用药项

目的表述内容正确完整与否，直接关系到老年患者的健康甚至生命安全[11]。针对药品说明书内容存在的问题，熊斯等[3]指出部分药品说明书存在老年人注意事项内容缺失的问题。老年患者由于组织器官和生理功能减退，其对药物的吸收和代谢等作用均有明显退变，但说明书关于药动学方面的数据多来自健康成年人群，很少有涉及老年人的研究数据[12]。老年人对药物耐受性相应较差，应注明该药品在药理、毒理或药物动力学方面与成年人的差异，并写明可否应用该药品及用药注意事项[13]。老年患者对各种致病因素的抵抗力及环境的适应力均减弱，用药后对药物的敏感度降低，需要根据药品的特点进行剂量调整。否则药物浓度过高，容易产生不良反应；药物浓度过低，无法达到治疗的效果[14]。有的药品说明书在老年用药项下，有“尚无系统临床研究资料”“由于老年人机能减退，建议在医师指导下酌情减少用量”等不利于安全用药的描述[15]。聂永娴等[16]调查发现部分说明书未提及老年患者服用药品的具体剂量，老年人记忆力衰退，很有可能超量服用药物，故标明药品剂量对老年人正确服用药物至关重要。调查还发现，不少说明书存在服用剂量标注不清现象：如剂量换算单位不明，用药量容易算错。服用时间标注不明：未明确最佳服用时间，如定时服药改为随时服药，从而影响疗效等[17]。老年人常患多种慢性疾病且用药周期长，约有 25% 的老年人同时服用 4 ～ 6 种药物，因此说明书中应明确标注药物的相互作用，警示联合用药安全风险[18]。孙雪林等[19]调研的 100 份药品说明书中，中成药说明书缺项较多，缺项主要为老年用药，占 85.7%；化学药品说明书各项较中成药齐全，老年用药缺项占 2.8%。王惠霞等[20]指出药品说明书更新不及时，常常跟不上医学的发展速度。

3.2.2 药品说明书的用纸大小和字体存在的问题

药品说明书印刷用纸大小相差几十倍。说明书用字大小不一，大的太大，如四号、小四号字，太占用纸张面积；小的太小，如八号及八号以下的字，不利于参阅。尤其对老年患者来说，看这么小字的说明书很困难，不利于安全用药[21]。本文分析数据显示，认为字体太小的患者多于内容太多、用词太专业的患者，与段蓉[22]报道的“字体太小的患者少于用词太专业、内容太多的患者”的结论不一致。段蓉[22]报道的受访者年龄大多 18 ～ 60 岁，≥ 60 岁的仅 4 人。本文恰恰体现了老年患者的不同需求。

3.3 药品说明书阅读问题研究的意义和局限性

在从多个维度分析影响老年患者读懂说明书程度的相关性因素中，从同住情况角度分析的文献不多。调研老年患者药品说明书阅读问题可为推动我国药品说明书的适老化提供参考。本研究仅限于对北京地区患者的分析，不是全国性的数据，存在一定局限性。而且样本量不够大，没完全覆盖北京所有的区。不同地区经济发展、生活习惯、地理环境、历史文化不同，分析的结果未必一致。故本文不能反映所有老年患者的需求、问题和难点。而且问卷调研的过程和录入数据的过程都会一定程度地受人为因素的影响，准确性和真实性难免偏颇。本文分析的角度还不够全面，还可以探讨从服药频率、药品说明书阅读意愿等角度分析。

3.4 药品说明书改进建议

相对于其他人群，老年人用药最为频繁，其用药安全风险也最为突出。促进药品说明书老年人用药信息的完善，为老年患者提供科学、合理的用药指导，需要药品生产企业、药品监管部门以及医疗机构的共同努力。

药监部门应进一步加强对药品说明书、标签、包装等方面的监管力度，完善药品审批机制，严格审批程序。各级药监部门应对药品说明书的内容、格式和要求进行定期检查，并根据药品使用的安全情况、不良反应报告等适时进行调整、更新内容，制订出符合临床治疗实际的用药标准，使老年患者用药更安全、合理、有效[23]。

药品生产企业应强化法制观念，增强对老年患者用药安全性的关注，及时完善安全性信息。药品生产企业应对说明书内容的真实性、准确性和完整性负责，通过适当开展临床试验等途径进一步实现药品说明书标注的完整性。此外，生产企业在药品上市后应加强与医疗单位的沟通与交流，建立信息沟通平台，定期对药品说明书的内容进行修订和更新，以保证说明书的准确性[24]。同时药品生产企业编写药品说明书的内容时应遵循“科学、易懂，便于消费者自行判断、选择和使用”的原则，避免使用医学术语、化学药品专业术语和中医药术语[25]。总之，说明书中应该有针对老年人用药的标注，明确老年人用药的用法、用量、用药的禁忌、注意事项、不良反应等[26]。药品规格与临床应用应统一，规范药品规格管理，对药品规格进行再评价，实行淘汰制，确保临床合理用药[27]。生产企业应按照说明书的内容设计合理版面、字体、字号，将其印刷在合理的纸张上，从而使患者方便阅读并获得正确、完整的药品信息[3]。

医疗机构是药品的主要使用方，医疗机构中的医师和药师是指导患者临床用药的主导群体，需加强针对老年人的用药指导[28]；还需通过工作经验发现药品说明书中存在的问题，并应及时将药品不良反应、说明书标注问题等进行反馈，督促生产企业及时修订完善药品说明书。

唐菀晨等[29]提出的构建药品说明书共建共治体系可为解决相关问题提供新思路，药品监管部门可引导持有人落实主体责任，持有人应履行及时公开和更新药品说明书的责任，各方共同助力促进我国合理用药水平的提升。闫盈盈等[30]采用生成式人工智能大模型和结构式提示语策略，构建患者药品说明书框架的思路，为药品说明书的适老化改进提供了新视角。

综上所述，药品说明书的适老化改进已得到全社会的关注，在药品生产企业、药品监管部门以及医疗机构共同努力下，通过构建新思路、引进前沿技术，共同加速药品说明书老年人用药信息的完善及可读性改进，为老年患者提供科学用药指导[31]。

参考文献

[1] 冯园园 . 人口老龄化对我国医疗卫生费用的影响研究 [D]. 长春：吉林大学，2022.

[2] 老龄健康司 . 关于印发“十四五”健康老龄化规划的通知 [EB/OL].（2022-3-1）[2024-3-5]. http：//www. nhc. gov. cn/lljks/pqt/202203/c51403dce9f24f5882abe13962732919. shtml.

[3] 熊斯，丁露，黄莹，等 . 基于循证医学证据的眼科超说明书用药情况调查与分析 [J]. 眼科学报，2023，38（1）：25-35.

[4] 李茜茜，陆浩，武明芬，等 . 基于 Web of Science 的药品说明书适老化研究文献计量学分析 [J]. 中国药房，2024，35（2）：231-236.

[5] 段胜男 . OTC 药品包装的适老化设计研究 [D]. 上海：上海工程技术大学，2020.

[6] 党俊武 .《中国城乡老年人生活状况调查报告》[M]. 北京：社会科学文献出版社，2018：25.

[7] 胡银环 . 城市居民自我药疗行为研究 [D]. 武汉：华中科技大学，2007.

[8] 慕媛，陈媛媛，陈卫军 . 208 名内科患者使用药品说明书情况问卷调查与对策研究 [J]. 武警后勤学院学报（医学版），2017，26（2）：148-151.

[9] 张志伟 . 基层医院门诊患者对药品说明书认知度的调查分析 [J]. 药学实践杂志，2017，35（1）：87-89.

[10] 陈细兰，曾英彤，詹陆川，等 . 门诊患者对药品说明书认知度的问卷调查分析 [J]. 今日药学，2010，20（2）：48-50.

[11] 张雅婷，唐佳，杨佳卉，等 . 我国药品说明书老年用药标示情况研究 [J]. 中国药物评价，2016，33（5）：440-442.

[12] 蒋正立，朱萍，朱娇娇 . 药品说明书中老年人用药信息缺陷情况调研 [J]. 中国药师，2012，15（4）：587-589.

[13] 刘晓慧，易爱纯，刘世坤，等 . 187 份抗菌药物说明书对特殊人群用药说明的分析 [J]. 中南药学，2009，7（12）：954-956.

[14] 何彩婷，杨樱，王玉紫 . 486 份药品说明书的调查与分析 [J]. 中国处方药，2016，14（10）：17-18.

[15] 王尉 . 473 份药品说明书特殊人群安全用药调查分析 [J]. 现代养生，2016，7：33-34.

[16] 聂永娴，高翔，元刚摊，等 . 常用口服药品说明书中老年人用药说明的调查分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2013，13（10）：905-907.

[17] 张静，陈元成 . 口服抗高血压药说明书中老年人用药信息的调查分析 [J]. 中国药房，2015，26（29）：4153-4155.

[18] 蒋正立，朱萍，朱娇娇 . 药品说明书中老年人用药信息缺陷情况调研 [J]. 中国药师，2012，15（4）：587-589.

[19] 孙雪林，穆林，谭玲，等 . 我院老年患者常用药品说明书缺项调查分析 [J]. 中国药房，2015，26（33）：4623-4625.

[20] 王惠霞，欧阳玉龙，张谊，等 . 我院肾内科超说明书用药情况分析 [J]. 中南药学，2020，18（2）：310-313.

[21] 李立安，曾玲，盛应根 . 525 种药品说明书调查分析 [J]. 医药导报，2007，26（1）：104-105.

[22] 段蓉，李正翔 . 我国 29 个省市 155 个地区居民对药品说明书的认知情况调查分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2021，21（1）：113-116.

[23] 杨冬梅，蒋磊，张雪芹 . 药品说明书中特殊人群用药标注情况统计分析 [J]. 中国药房，2010，21（17）：1630-1632.

[24] 朱勤，孙云龙，徐进，等 . 62 份药品说明书中有关儿童用药的调查分析 [J]. 中国药事，2014，28（4）：427-431.

[25] 于美玲，徐建国，于欣，等 . 消费者对药品说明书及合理用药认知度的调查 [J]. 中国药房，2011，22（36）：3376-3379.

[26] 范燕，夏东胜 . 我国药品说明书老年人用药标示的问题与对策 [J]. 中国药物警戒，2016，13（6）：341-343.

[27] 任晓东，张龙，魏友霞，等 . 药品说明书的歧义现象及解决对策 [J]. 中国药房，2015，26（22）：3150-3152.

[28] 范燕，夏东胜 . 我国药品说明书老年人用药标示的问题与对策 [J]. 中国药物警戒，2016，13（6）：341-343，363.

[29] 唐菀晨，由玉伟，陆颖，等 . 通过共建共治方式解决药品说明书信息公开、更新和应用问题研究 [J]. 中国药事，2023，37（8）：890-896.

[30] 闫盈盈，何娜，张志玲，等 . 生成式人工智能构建患者药品说明书的方法研究 [J]. 临床药物治疗杂志，2024，22（5）：1-6.

[31] 张雅婷，唐佳，杨佳卉，等 . 我国药品说明书老年用药标示情况研究 [J]. 中国药物评价，2016，33（5）：440-442.

（收稿日期：2024-03-14；修回日期：2024-06-18）

北京地区老年慢性病患者家庭药箱现状及居家药学服务需求调查

国警月[1]，金伟[2]，郭晨阳[3]，赵志刚[4]，武明芬[4*]（1. 北京市丰台区马家堡社区卫生服务中心药剂科，北京 100068；2. 海淀区上庄镇社区卫生服务中心药剂科，北京 100094；3. 丰台区蒲黄榆社区卫生服务中心药剂科，北京 100075；4. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部，北京 100070）

摘要：目的 旨在深入探讨北京地区老年慢性病患者家庭药箱的管理现状及其药学服务需求，以期为优化居家药学服务模式提供实证依据。**方法** 设计统一调查问卷，针对 60 岁及以上的慢性病患者进行调查。药师亲自上门，对每位受访者的家庭药箱进行细致整理，并实时记录调查数据。**结果** 成功回收有效问卷 766 份，女性受访者占比 57.44%。除慢性病治疗药物外，感冒发热类（90.47%）、止咳化痰类（68.93%）和抗感染类（56.53%）药品位列家庭储备前三。家庭药品储备中位数为 12 种，但超过半数家庭（54.96%）存在过期药品，近 27.55% 存在变质药品。值得警惕的是，29.89% 的家庭未能定期清理药箱，68.80% 的家庭选择将过期药品随生活垃圾丢弃。月收入、医疗支付方式和个人服药数量是影响家庭药品储备的关键因素（$P < 0.05$）。高达 98.69% 的受访者表示急需药学服务，期望通过用药科普（65.14%）、药师门诊（62.35%）和药师入户指导（55.74%）等多种方式获得药学支持。**结论** 北京地区老年慢性病患者家庭药箱管理亟待加强，存在诸多安全隐患。未来，居家药学服务应聚焦于优化家庭药箱管理，提高患者用药安全意识，为患者提供更为精准、有效的药学服务。

关键词：老年患者；慢性病；家庭药箱；药品储备；药学服务需求
中图分类号：R95，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2982-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.024

Survey of current home medicine cabinets and pharmaceutical service needs among elderly patients with chronic diseases in Beijing

GUO Jing-yue[1], JIN Wei[2], GUO Chen-yang[3], ZHAO Zhi-gang[4], WU Ming-fen[4*] (1. *Department of Pharmacy*, *Majiapu Community Health Service Center in Fengtai District*, *Beijing* 100068; 2. *Department of Pharmacy*, *Shangzhuang Community Health Service Center in Haidian District*, *Beijing* 100094; 3. *Department of Pharmacy*, *Puhuangyu Community Health Service Center in Fengtai District*, *Beijing* 100075; 4. *Department of Pharmacy*, *Beijing Tiantan Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100070)

Abstract: Objective To explore the current management status of family medicine cabinets among elderly patients with chronic diseases in Beijing and their demand for pharmaceutical service, providing empirical evidence to optimize home-based pharmaceutical service models. **Methods** A unified questionnaire was designed for patients aged 60 and above with chronic diseases. Pharmacists visited each respondent's home, carefully organized their family medicine cabinets, and recorded real-time survey data. **Results** Totally 766 valid questionnaires were collected, with female respondents accounting for 57.44%. In addition to medications for chronic diseases, cold and fever medications (90.47%), cough relief and expectorant medications (68.93%), and anti-infection medications (56.53%) ranked as the top three household medications. The median number of household medication storage was 12, but more than half of the families (54.96%) had expired medications, and 27.55% had deteriorated medications. Alarmingly, 29.89% of the families failed to sort out the medicine cabinets regularly, and 68.80% disposed expired medications as household waste. Monthly income, way of medical payments,

基金项目：国家卫生健康委药具管理中心药品使用说明书适老化研究项目（No.ZDC-2022-001）。
作者简介：国警月，女，主任药师，主要从事居家药学服务与社区药学研究，email：25771837@qq.com *通信作者：武明芬，女，副主任药师，主要从事慢病药物治疗管理与脑血管病合理用药研究，email：wmfling@163.com

and number of medications to be taken by patients were key factors for household medication storage ($P < 0.05$). Up to 98.69% of the respondents expressed an urgent need for pharmaceutical service, expecting to receive pharmaceutical support through various means such as medication education (65.14%), pharmacist consultations (62.35%), and home visits of pharmacist for guidance (55.74%). **Conclusion** The management of family medicine cabinets for elderly patients with chronic diseases in Beijing urgently needs to be strengthened, as there are numerous safety hazards. In the future, home-based pharmaceutical service should focus on optimizing family medicine cabinet management, raising patient awareness of medication safety, and providing effective pharmaceutical services.

Key words: elderly patient; chronic disease; family medicine cabinet; medication reserve; need of pharmaceutical service

随着我国人口老龄化的加剧，慢性病（以下简称慢病）患者数量呈现持续增长趋势。《中国健康管理与健康产业发展报告 2022》[1] 指出，我国慢病患病人数已超过 3 亿，预计至 2024 年将超过 5 亿人。研究显示，我国约 75% 的 60 岁及以上老年人患有一种或多种慢病，43% 的患者多病共存（两种及以上慢病）[2]。老年慢病患者作为社会中的特殊群体，其用药安全和健康管理问题日益受到社会各界的关注。然而，现实生活中，许多患者家庭在药品管理方面存在诸多问题，如存在过期或变质药品、药品储存不适宜以及过度囤药等现象 [3-4]，这些问题不仅会导致药品资源的浪费，还对患者的健康构成潜在威胁 [5]。为深入了解北京地区老年慢病患者家庭药箱管理的现状及药学服务需求，我们开展了一项调查，旨在揭示慢病患者家庭药箱管理方面存在的问题，为优化居家药学服务模式提供实证依据。

1　资料

1.1　调查对象

本研究采用方便抽样的方法，调研的时间范围为 2023 年 2 月至 7 月。

纳入与排除标准：纳入 60 岁及以上、城镇居住、患有一种及以上常见慢病（高血压、糖尿病、高脂血症、冠心病、哮喘、脑卒中、高尿酸血症、胃食管反流、肿瘤、房颤、其他）、服用两种及以上慢病治疗药物、同意药师入户家访的患者。排除患有精神疾病、认知障碍、交流困难、行动不便的患者。本研究经过北京天坛医院伦理委员会批准（No.KY2022-228-01）。

1.2　问卷设计

调查问卷由项目组统一制订，通过“问卷星”平台制作成电子问卷，调查内容：患者人口学信息（年龄、性别、身高、体重、月收入、受教育程度、家庭成员组成、吸烟饮酒史、疾病史、药品不良反应史），家庭药箱储备药品（品种、存放条件、过期或变质药品、药学服务需求等）。

2　方法与结果

2.1　调研方法

在北京市 15 个区县的 193 个社区开展调研，参与研究的药师经过统一培训。在取得患者知情同意后，药师入户为患者整理家庭药箱并完成问卷调查，调查问卷由药师填写。

2.2　统计方法

将调研结果导入 Excel 表，采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。分类变量以频率 n（%）表示，采用描述性统计；连续变量若服从正态分布则采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，若不遵循正态分布则采用中位数和四分位间距（IQR）描述。采用线性回归分析探究影响患者家庭储备药物的主要因素，结果以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.3　患者的基本特征

共计调研患者 787 例，回收有效问卷 766 份，有效回收率为 97.33%。女性患者占比 57.44%，患者年龄中位数为 69 岁，其中 60 ～ 70 岁的患者占比 62.53%。大部分患者同时患有多种慢病，其中合并“三高”（高血压、糖尿病、高脂血症）的患者居多。50% 的患者长期服用 3 ～ 5 种药物，28.59% 的患者服用 6 ～ 10 种药物，还有少部分患者（5.48%）同时服用 10 种以上药物。患者的性别、年龄、体质量指数（BMI）、受教育程度、吸烟、饮酒、家庭人口数、工作状态、居住状态、月收入及医保支付方式等基本特征见表 1。

2.4　影响患者家庭药品储备的关键因素分析

将患者家庭药品储备种类作为因变量，性别、年龄受教育水平、月收入等作为自变量，采用线性回归分析探究影响家庭药品储备的关键因

表 1 调研患者的基本特征

Tab 1 Basic characteristics of the patients under investigation

基本特征	分组	结果	基本特征	分组	结果
性别 [*n*（%）]	男	326（42.56）	饮酒情况 [*n*（%）]	饮酒	143（18.67）
	女	440（57.44）		不饮酒	582（75.98）
年龄 [median（IQR）]		69（64 ～ 75）		已戒酒	41（5.35）
年龄分组 / 岁 [*n*（%）]	60 ～ 70	479（62.53）	工作状态 [*n*（%）]	退休在家	683（89.16）
	71 ～ 80	211（27.55）		返聘在岗	26（3.39）
	81 ～ 90	63（8.22）		自由职业或打工	57（7.44）
	＞ 90	13（1.70）	居住状态 [*n*（%）]	独居	76（9.92）
BMI/（kg・m^{-2}）[$\bar{x}\pm s$]		25.67±4.57		与子女同住	219（28.59）
BMI 分组 [*n*（%）]	＜ 18.5	9（1.17）		老伴	471（61.49）
	18.5 ≤ BMI ＜ 24	264（34.46）	月收入水平 / 元 [*n*（%）]	＜ 1000	60（7.83）
	24 ≤ BMI ＜ 28	346（45.17）		1000 ～ 3000	153（19.97）
	≥ 28	147（19.19）		3000 ～ 5000	329（42.95）
受教育程度 [*n*（%）]	文盲	19（2.48）		5000 ～ 10000	199（25.98）
	小学	101（13.19）		＞ 10 000	25（3.26）
	初中	277（36.16）	患病情况 [*n*（%）]	高血压	575（75.07）
	高中	194（25.33）		糖尿病	329（42.95）
	大专或中专	104（13.58）		高脂血症	335（43.73）
	本科及以上	71（9.27）		冠心病	213（27.81）
吸烟情况 [*n*（%）]	吸烟	111（14.49）	发生过药物不良反应 [*n*（%）]	是，过程能描述清楚	152（19.84）
	不吸烟	579（75.59）		是，过程描述不清楚	166（21.67）
	已戒烟	76（9.92）		否	448（58.48）
家庭人口数 [median（IQR）]*		3（2 ～ 5）	医疗支付方式 [*n*（%）]	医疗保险或公费医疗	578（75.46）
服药数量 / 种 [median（IQR）]*		5（3 ～ 11）		新农村合作医疗	158（20.63）
服药数量分组 [*n*（%）]	＝ 2 种	122（15.93）		自费	30（3.92）
	3 ～ 5 种	383（50.00）	是否知道疾病控制指标 [*n*（%）]	很清楚	281（36.68）
	6 ～ 10 种	219（28.59）		知道一些	417（54.44）
	＞ 10 种	42（5.48）		不清楚	68（8.88）

素。结果显示，个人服药数量、月收入和医疗支付方式对家庭药品储备有显著影响（P ＜ 0.05）。个人服药数量越多，家庭储备药物也越多。与月收入＜ 1000 元的患者相比，月收入 1000 ～ 3000 元、3000 ～ 5000 元和 5000 ～ 10 000 元的患者会储备更多的药物。医保支付方式为“新农合”的患者与“医疗保险或公费医疗”的患者相比储备的药物更多（见表 2）。

2.5 家庭药箱整理结果

2.5.1 家庭储备药物类别及用量 766 例患者家庭中均储备了多种类别的药物，除慢病治疗药物外（本研究纳入人群为服用 2 种及以上药物治疗的慢病患者），家庭储备药物前三位为感冒发热类（90.47%）、止咳化痰类（68.93%）和抗感染类（56.53%）。家庭储备药物详见图 1。

本研究结果显示，近 80% 的家庭储备药量在 1 个月以上，其中储备药物用量 1 ～ 3 个月、4 ～ 6 个月和半年以上的家庭占比分别为 58.75%、11.62% 和 8.09%。

2.5.2 家庭药箱中的过期和变质药品 本研究发现，北京地区慢病患者居家用药存在多种潜在的

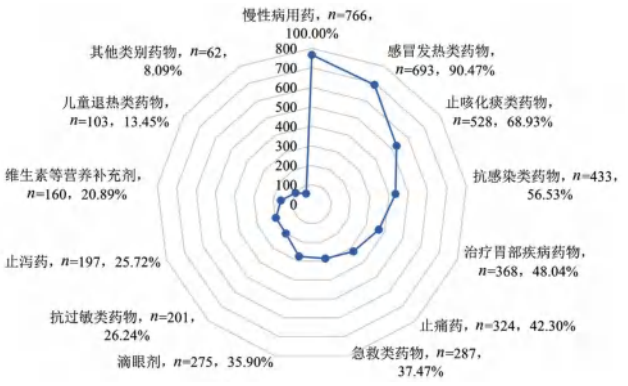


图 1 老年慢病患者家庭储备药物类别

Fig 1 Categories of household medicine storage for elderly patients with chronic diseases

风险。大部分家庭储备多种药物，储备药物种类中位数为 12 种，储备药物种类最多的高达 65 种；54.96% 的家庭药箱中存有过期药品，过期药种物类和数量最多的分别为 30 种和 64 盒；27.55% 的家庭药箱中存在变质药品，变质药品种类和数量最多的分别为 12 种和 16 盒。过期与变质药品统计详情见表 3。

2.5.3 药品存放适宜性分析 调查发现，688 例（89.82%）家庭药箱中的药物储存是适宜的，但还

表 2　影响患者家庭药品储备的因素分析

Tab 2　Factors for patients' household medication storage

	未标准化系数		标准化系数	*t*	*P* 值	95.0% 置信区间	
	B	标准错误	Beta			下限	上限
年龄 / 岁	－ 0.052	0.050	－ 0.043	－ 1.055	0.292	－ 0.149	0.045
性别＝女	0.414	0.807	0.021	0.513	0.608	－ 1.170	1.998
受教育程度	－ 0.260	0.924	－ 0.033	－ 0.282	0.778	－ 2.077	1.556
家庭成员人数	0.283	0.287	0.044	0.987	0.324	－ 0.280	0.847
个人服药数量 / 种	0.554	0.105	0.196	5.278	＜ 0.001	0.348	0.760
服用保健品数量 / 种	0.612	0.311	0.071	1.966	0.050	0.001	1.224
同谁居住＝与子女同住	2.484	1.470	0.122	1.690	0.092	-0.403	5.372
同谁居住＝与老伴同住	1.898	1.292	0.095	1.470	0.142	－ 0.638	4.434
工作状态＝返聘在岗	－ 2.601	1.956	－ 0.048	－ 1.330	0.184	－ 6.442	1.240
工作状态＝打工或自由职业	－ 2.189	1.595	－ 0.056	－ 1.372	0.170	－ 5.321	0.944
月收入＝ 1000 ～ 3000 元	3.600	1.632	0.147	2.206	0.028	0.395	6.806
月收入＝ 3000 ～ 5000 元	3.945	1.721	0.196	2.293	0.022	0.566	7.325
月收入＝ 5000 ～ 10 000 元	5.154	1.884	0.228	2.736	0.006	1.455	8.853
月收入＞ 10 000 元	2.896	2.716	0.052	1.066	0.287	－ 2.439	8.230
医疗支付方式＝新农合	2.555	1.115	0.104	2.291	0.022	0.365	4.745
医疗支付方式＝自费	－ 0.616	2.786	－ 0.008	－ 0.221	0.825	－ 6.086	4.854

表 3　调研患者家庭药箱中过期与变质药品统计

Tab 3　Expired and deteriorated medications in patients' home medicine cabinets being surveyed

问题类型	结果	最小值	最大值
家庭储备药物种类 [median（IQR）]	12（8 ～ 20）	2	65
存在过期药物的家庭 [*n*（%）]	421（54.96）	/	/
过期药物种类 [median（IQR）]	2（0 ～ 3）	1	30
过期药品数量 / 盒 [median（IQR）]	4（2 ～ 7）	1	64
存在变质药物的家庭 [*n*（%）]	211（27.55）	/	/
变质药物种类 [median（IQR）]	1（0 ～ 3）	1	12
变质药物数量 / 盒 [median（IQR）]	2（1 ～ 3.50）	1	16

注：药品的种类以通用名统计，相同通用名药品计为 1 种；/ 表示不适用。

Note：The types of medications are counted by generic names, with the same generic name medications counted as 1 type; / indicates not applicable.

存在一些药物存放不适宜的情况，如未保留药物外包装及说明书、老人用药与儿童用药未分开存放、中药与西药未分类存放等。此外，患者家庭药物管理还存在一些问题，一部分家庭（29.89%）没有定期清理药箱、绝大多数家庭（68.80%）将过期药物随垃圾一起丢弃、大部分患者（69.06%）不知道有过期药物回收箱。详见表 4。

2.6　患者对药学服务的需求

对于药师提供的家庭药箱管理和 / 或居家用药指导服务，仅 117 例（15.27%）患者表示听说过或了解过，441 例（57.57%）患者表示从来没有听说过。在对居家药学服务的需求方面，所有的患者（766 例，100%）均表示愿意接受药师提供的药学服务，绝大多数患者（98.69%）表示对居家药学服务具有迫切需求。对于居家药学服务提供的形式，用药科普宣教（65.14%）、药师门诊（62.35%）、药师入户用药指导（55.74%）需求排名前三，还有一部分患者希望通过社区义诊（54.83%）、电视健康讲堂或视频的形式（43.73%）进行用药指导。

3　讨论

3.1　老年慢病患者家庭药箱储备药物分析

北京地区慢病患者家庭储备药品种类和数量较多，家庭药品管理仍存在许多问题和潜在的用药风险。感冒发热类药物（90.47%）是北京地区家庭中最常储备的药物类别，这与 Huang 等 [6] 对中国 6 省份的调查结果相似，他们发现感冒药（86.1%）是中国家庭中最常见的药物类别。而 Tieu 等 [7] 的研究表明，镇痛剂是越南家庭中最常见的储存药物类别（80.8%）。考虑到各国疾病谱系和流行病学特征的差异，导致不同领域使用多种药物，家庭储备药物类别也存在差异。这提示中国居民可能在家中储存的药物多于所需，特别是一些常见类别的药物，如感冒药、止咳化痰类药物、抗感染类药物等。大量储存药物可能使患者面临药品不良反应和用药错误的风险。

研究显示，世界上大多数家庭都会储备一些药物，用于急性病和慢病治疗 [8]，我国超半数家庭存在储备药 [9]，北京 90.0% 的家庭有药品储备 [10]。然而，不适当的家庭药物储存会导致药物浪费和不必要的危害 [7]。在大多数发展中国家，

表 4 患者家庭药品储存适宜性分析

Tab 4 Appropriateness of household medication storage of patients

调查问题及选项	例数	构成比 /%
药品储存条件适宜性（包括地点、温度、湿度等）		
适宜	688	89.82
不适宜	78	10.18
是否保留药品外包装（药盒）		
保留	413	53.92
部分保留	225	29.37
不保留	128	16.71
是否保留药品说明书		
保留	400	52.22
部分保留	171	22.32
不保留	195	25.46
药品放在儿童不能触及的地方		
是	580	75.72
否	186	24.28
患者自己与他人的药品分开存		
分开	411	53.66
不分开	293	38.25
没有其他人用药	62	8.09
老人和儿童的药品分开存放		
分开	344	44.91
不分开	138	18.02
没有儿童药品	284	37.08
中药与西药分开存放		
分开	131	17.10
不分开	631	82.38
只有中药或只有西药	4	0.52
家里的药品多久清理一次		
从不清理	118	15.40
不规律清理	111	14.49
不超过 3 个月	140	18.28
半年	221	28.85
一年	176	22.98
过期药品如何处理		
放到药品回收箱	196	25.59
随垃圾一起丢掉	527	68.80
继续使用	43	5.61
是否知道药店、居委会或社区有过期药品回收箱		
知道	237	30.94
不知道	529	69.06

患者对家庭中常见药物储存安全的认识有限，往往会导致不合理用药[7]。本研究显示，大多数家庭储备了 1 ～ 3 个月的药物用量，这有助于慢病患者在需要时及时使用药物，提高治疗效果。然而，药物储备过多可能增加用药错误、药物相互作用和药物滥用的风险，例如家中常备药物居民的自我药疗发生率是没有储备的 2.997 倍[11]。因此，家庭药师应教育患者根据病情及家庭人口情况储备适量药物，不要盲目囤药，重点加强对服药数量多、月收入在 1000 ～ 10 000 元和医疗支付方式为新农合的患者进行指导和教育。

慢病患者多重用药现象比较常见，本次调查显示有一半的患者服用 3 ～ 5 种药物，还有超过三分之一的患者服用 6 种以上的药物。既往研究显示，北京地区老年慢病患者多重用药率达到了 70.8%，患者每日平均服用药物（8.6±3.2）种[12]。老年慢病患者多重用药增加了许多储存问题，如在家中储存过期药物和在不合适的储存条件下（即储存环境、位置等）[13]，其直接后果是，居家服药的患者可能会受到药物储存不当和治疗失败的不良影响，甚至会发生药品不良反应。因此，药师在指导患者管理这些药物时，需要特别注意强调药物的正确使用、存储和处置，以确保患者的用药安全和有效性。

3.2 居家药学服务需要关注的重点内容

本研究发现，北京地区超过半数（54.96%）的家庭存在过期药品，而部分家庭（27.55%）还存有变质药品。这可能是患者对药品有效期的认知不足或家庭药箱整理不及时所致。这种情况可能导致患者在需要时无法获得有效药物，同时过期和变质药品的存在增加了用药风险，可能对患者的健康造成潜在危害，特别是对长期服药的慢病患者来说，可能导致药效降低、药物不良反应或病情加重。例如，服用过期的抗菌药物可能会导致感染扩散，甚至形成脓肿或败血症；高血压患者服用过期的降压药，或者糖尿病患者服用过期的降糖药，可能会导致血压或血糖增高；过期的四环素可能引起毒性并影响肝肾功能。因此，家中存放过期或变质药物对健康和安全构成严重威胁。然而，我们的调查结果显示，约 70% 的受访者不知道过期药物是有害垃圾，也不知道有过期药物回收箱，从未获得有关药物适当处置的信息。这与先前的研究结果一致[6]，表明中国的药品回收机制尚不完善，过期药物回收宣传亟须加强。未来居家药学服务应重点关注患者家庭药品有效期的管理和正确储存，以减少药品浪费和降低用药风险，促进患者居家合理用药水平的提升。药师可以通过加强用药指导，帮助患者建立正确的用药观念和行为习惯，从而提高他们对安全用药的认知。这包括适量储备药物、正确存放药物、定期清理家庭药箱、避免使用过期和变质药物等。增强患者对药物有效期、保存条件等方面的了解，有助于降低用药风险。

3.3 患者对居家药学服务的需求分析

在患者对居家药学服务的需求方面，本研究表明大多数患者愿意接受药师提供的居家用药管理服务，显示了他们对药学服务的高度认可。患者期望通过药学科普宣教、药师门诊、药师入户指导等多种形式获取居家药学服务，体现了他们对个性化、全方位用药指导的需求。在药学服务的内容方面，多数患者表示需要药师指导药品的用法用量、家庭常备药品的选择、药品的正确储存、药品不良反应监测及服药注意事项；部分患者表示服药太多，需要精简用药；还有患者需要药师指导哪些药物可以一起吃，哪些需要分开吃。药师在提供用药管理服务中扮演着关键角色，有助于患者更安全、合理地使用药物，提高用药依从性和治疗效果。加强家庭药师的专业培训和服务水平，满足患者对用药管理的需求，将有助于提升患者的居家用药安全性和健康管理水平。研究表明，远程药学干预模式可以显著提高老年慢病患者的居家用药依从性和安全性，同时提高患者的自我管理能力和生活质量[14]。智能辅助监测系统和家庭药师的介入可确保居家老年患者的用药安全和合理性[15]。因此，未来的居家药学服务应结合患者需求，采用多种服务形式相结合、智能辅助系统监测，提高居家药学服务的覆盖面和可及性，保障患者居家用药安全，提高治疗效果。未来的药学服务应重点加强患者的居家用药安全意识教育、定期清理家庭药箱，并提供多样化的居家药学服务。这些举措有助于改善患者家庭药物管理现状，提高用药安全水平。

3.4 研究的局限性与展望

本研究还存在一定的局限性。首先，研究仅调查了城镇地区的慢病患者家庭，未包含农村地区患者，可能影响研究结果的普适性和推广性。其次，研究未调查药品属性（非处方药、处方药）、药品来源（药店、医院）等信息，这些因素可能影响患者对药物的选择、储备和使用，需要在研究中加以考虑。此外，家庭药物管理受到家庭经济水平、医疗资源分布等外部环境因素的影响。未来的研究可以考虑采用更多样化的研究设计和数据来源，更深入地探讨外部环境因素对家庭药物管理的影响，以完善对该领域的研究认识。

参考文献

[1] 武留信. 中国健康管理与健康产业发展报告 No.5（2022）[M]. 北京：社会科学文献出版社，2023：432.

[2] 王丽敏，陈志华，张梅，等. 中国老年人群慢性病患病状况和疾病负担研究 [J]. 中华流行病学杂志，2019，40（3）：277-283.

[3] 张雅鑫，冀召帅，王新，等. 北京天通苑北社区家庭药师服务开展迫切性问卷调查 [J]. 中国药业，2023，32（20）：5-8.

[4] 廖海金. 过期药品管理亟待加强 [J]. 半月谈，2016（13）：83.

[5] 尹畅，宋洪杰，于锋，等. 我国过期药品处置方式及有效期延长策略的探讨 [J]. 中国药房，2023，34（7）：780-783.

[6] Huang Y，Wang LJ，Zhong CQ，et al. Factors influencing the attention to home storage of medicines in China [J]. BMC Public Health，2019，19（1）：833.

[7] Tieu MDT，Nguyen QN，Le TT，et al. Prevalence and determinants of household medicine storage in vietnam：a community-based cross-sectional study [J]. SAGE Open Med，2024，12：362889109.

[8] Birt L，Dalgarno L，Poland F，et al. What happens when pharmacist independent prescribers lead on medicine management in older people’s care homes：a qualitative study [J]. BMJ Open，2023，13（10）：e068678.

[9] 钱水莲，徐欢，刘文夏，等. 基于问卷调查的我国家庭储备药现况分析 [J]. 中国药学（英文版），2023，32（1）：64-67.

[10] 王晓辉，张铭，曹瑾，等. 北京、成都、兰州居民家庭药品可及性入户调查 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（13）：1650-1655.

[11] 王芳，刘惠娟，王红娟，等. 基于格林模式对甘肃省居民家庭自我药疗行为的调查研究 [J]. 中国药房，2020，31（11）：1377-1381.

[12] 沈晨，侯惠如，杨庭树，等. 居家老年共病患者多重用药现况调查及其影响因素分析 [J]. 中华保健医学杂志，2021，23（6）：586-588.

[13] Dijkstra NE，Sino C，Schuurmans MJ，et al. Medication self-management：considerations and decisions by older people living at home [J]. Res Social Adm Pharm，2022，18（3）：2410-2423.

[14] 王振苗，孙伯玉，胡洋洋. 特殊背景下远程药学干预模式在老年慢性病患者居家用药中的效果 [J]. 中国老年学杂志，2022，42（15）：3842-3845.

[15] 张晋萍，黄琼，杜洁，等. 居家老年患者合理用药管理研究进展 [J]. 中国药业，2023，32（1）：128-133.

（收稿日期：2024-04-23；修回日期：2024-05-19）

中药资源开发与利用

大黄的本草考证

郭权[1]，王艳[1]，徐世博[1]，高静[1]，成世强[2]，颜永刚[1]，张岗[1]，李依民[1*]（1. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心，西安 712046；2. 镇巴县科学技术局，陕西 汉中 723600）

摘要：目的 对大黄进行本草学研究，以正本清源。**方法** 通过查阅历代本草著作，从名称、基原、产地变迁、品质评价四个方面对正品大黄进行本草考证。**结果** 大黄历代名称各异，除大黄外还有将军或牛舌大黄等；各古籍对大黄形态描述简单明了，与现代药典所规定的正品基原描述类似；其产地因时因地有所变迁，主要分布于青海、甘肃和陕西等地；古籍中认为西北及四川等地产的大黄品质佳，与今基本一致。**结论** 通过古籍追本溯源梳理清了大黄的本草学证据，为其道地性研究、规范化种植及资源可持续保护与开发提供科学指导。

关键词：大黄；本草考证；基原；品质评价
中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2988-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.025

Decipherment of ancient literatures about rhubarb

GUO Quan[1], WANG Yan[1], XU Shi-bo[1], GAO Jing[1], CHENG Shi-qiang[2], YAN Yong-gang[1], ZHANG Gang[1], LI Yi-min[1*] (1. *College of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xi'an* 712046; 2. *Science and Technology Bureau of Zhenba County*, *Hanzhong Shaanxi* 723600)

Abstract: Objective To determine the botanical aspects of rhubarb to clarify its origins and authenticity. **Methods** Through consulting the ancient herbology works, this paper ecaluated the authenticity of rhubarb from four aspects: name, origin, habitat change, and quality evaluation. **Results** Besides Dahuang, rhubarb had different names such as Jiangjun and Niushe Dahuang, etc.. The descriptions of rhubarb plant penophytes in ancient books were simple and clear, which were similar to those of authentic source in modern pharmacopoeia. Its habitat changed with time and places, mainly found in Qinghai, Gansu, and Shaanxi. Rhubarb produced in the northwest of China, and Sichuan, described in different ancient books, had relatively good quality, similar to that of current status. **Conclusion** Through tracing the source of ancient books and documents, this paper sorts out acient evidence of rhubarb from a herbalism view, providing scientific guidance for further research into rhubarb's authenticity, standardized cultivation, and sustainable resource protection and development.

Key words: rhubarb; decipherment of ancient literature; origin; quality evaluation

中药大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎，味苦，性寒，具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄的功效[1]。大黄主要化学成分为蒽醌、有机酸、酚类等[2]，临床主要用于治疗实热积滞便秘、血热吐衄、目赤咽肿、痈肿疔疮等症[3]。随着野生资源的减少，目前正品大黄药材以栽培为主，

基金项目：国家自然科学基金（No.82104334，No.81973430）；陕西中医药大学科技创新团队项目（No.2019-QN01）；咸阳市创新科技领军人才项目（No.L2022CXNLRC009）；陕西省重点产业创新链资助项目（No.2021ZDLSF04-01）。

作者简介：郭权，男，硕士，主要从事中药资源与分子生药学研究，email：1914520370@qq.com *通信作者：李依民，女，副教授，主要从事中药资源与分子生药学研究，email：2051058@sntcm.edu.cn

主流产区有青海、甘肃、陕西等地。此外，大黄属其他多种近缘种如华北大黄、藏边大黄、河套大黄等也多有栽培，常作为大黄混品使用。因此，厘清大黄正品与混品历史沿革，正确利用大黄属植物资源成为亟待解决的问题。

为充分开发大黄资源，有必要进行大黄本草学研究。已有研究者对甘肃主产的掌叶大黄和唐古特大黄进行了初步的本草学研究，为甘肃大黄产业发展提供了参考[4]。本文通过系统查阅古籍文献，从大黄名称、基原、产地变迁、品质评价等方面展开详细考证分析，为大黄道地性研究、规范化种植及资源可持续保护与开发提供科学指导。

1 名称考证

大黄始载于《神农本草经》[5]，后古籍皆以此为名。现对大黄命名方法按功效、形态、产地等方面进行分类考证。

1.1 以功效命名的名称

因其泻下功效强而命名“将军”。《本草经集注》[6]、《新修本草》[7]、《证类本草》[8]、《重修政和经史证类备用本草》[9]均描述为：“将军之号，当取其骏快矣。”《本草蒙筌》[10]：“因有峻烈威风，特加将军名号。”《本草崇原》[11]：“行泄大迅，下瘀破积，故别名将军，而列于下品。”《本草纲目》[12]：“将军之号，当取其骏块也。血秘实热等症。用此皆能推陈致新。定乱致治。故昔人云有将军之号。”《本草思辨录》[13]、《本经疏证》[14]：“此所以行君令戡祸乱拓土地而有将军之号也。”

1.2 以形态命名的名称

大黄按形态命名的名称有“羊蹄大黄”“牛舌大黄”等。《图经本草》[15]：“又鼎州出一种羊蹄大黄……初生苗叶似羊蹄，累年长大，叶似商陆而狭尖。”《本草乘雅半偈》[16]亦有：“二月卷生黄赤，放叶时，四四相当，宛似羊蹄叶，粗长而浓。”《本草纲目》及《本草蒙筌》中记载：“竖片如牛舌形，谓之牛舌大黄。”《图经本草》中记载：“蜀大黄乃作紧片，如牛舌形，谓之牛舌大黄。”

1.3 不同产地命名的名称

大黄因其产地而形成的命名有“土蕃大黄”“土大黄”“曲玛孜”等。《图经本草》：“秦陇来者，谓之土蕃大黄”“江淮出者曰土大黄”。《药征》[17]：“大黄汉土产，有两品……本邦近者有称汉种大黄者也。”《晶珠本草》[18]中将大黄称之为君扎、班玛札仁、西卜相、冬木纳合卡曲、赛尔保奥丹、札卜相、萨奥加保赛尔多合、曲笨巴、曲居木、肖邦巴、肖赤那保、若交尔、曲玛孜等。

1.4 因颜色而命名的名称

《证类本草》引陶弘景曰：“大黄，其色也。”《新修本草》根茎呈黄棕色作大黄。《图经本草》：“结实如荞麦而轻小，五月熟即黄色，亦呼为金荞麦。”《吴普本草》[19]记述：“大黄，一名黄良，一名火参，一名肤如。”

2 基原考证

古文献中对大黄的形态学描述比较简单。魏•吴普《吴普本草》：“二月花生，生黄赤叶，四四相当，黄茎高三尺许，三月华黄，五月实黑。”

唐•苏敬《新修本草》：“叶、子、茎并似羊蹄，但粗长而厚，其根细者，亦似宿羊蹄，大者乃如碗，长二尺。”

宋•苏颂《图经本草》载有：“正月内生青叶，似蓖麻，大者如扇。根如芋，大者如碗，长一二尺，傍生细根如牛蒡小者亦如芋。四月开黄花，亦有青红似荞麦花者。茎青紫色，形如竹……江淮出者曰土大黄，二月开黄花，结细实。又鼎州出一种羊蹄大黄，疗疥瘙甚效。初生苗叶如羊蹄，累年长大，即叶似商陆而狭尖。四月内于押条上出穗，五、七茎相合，花叶同色，结实如荞麦而轻小，五月熟即黄色。”

宋•唐慎微《证类本草》《重修政和经史证类备用本草》、清•吴其濬《植物名实图考长编》[20]均沿用《图经本草》中对其形态描述。明•刘文泰《本草品汇精要》[21]对其描述也与《图经本草》描述相符。

明•李时珍《本草纲目》：“宋祁益州方物图言蜀大山中多有之，赤茎大叶，根巨若碗。”

明•卢之颐《本草乘雅半偈》：“二月卷生黄赤，放叶时，四四相当，宛似羊蹄叶，粗长而浓。茎高三尺许，味酸而脆，颇堪啖也。三月花黄，五月实黑，根形亦似羊蹄根，大者如碗，长二尺许。”

清•周岩《本草思辨录》：“邹氏以大黄黄中通理，状如锦纹，质色深紫。”

清•汪讱庵《本草易读》[22]、邹澍《本经疏证》[14]皆有：“正月生青叶，似蓖麻，大者如扇。根如芋，大者如碗，长一二尺，其细根如牛蒡。四月黄花，亦有青红似荞麦花者。茎青紫色，形如竹。黄色中贯赤纹。切之有黄汁。”

纵观历代本草对大黄原植物的形态描述，有以下几个特点：

① 根：“根如芋，细者似羊蹄，大者如碗”“长一二尺”“傍生细根”；② 茎、叶：“叶、茎并似羊蹄”“茎青紫色，形如竹”“茎高三尺许”“叶大者如扇”“叶粗长而厚”“放叶时，四四相当”“叶似蓖麻”；③ 花、实：“花黄”“实黑”“结实如荞麦”。

临摹典籍中大黄的详图如图 1A（《图经本草》）、图 1B（《本草纲目》和图 1C（《植物名实图考》[23]）所示，发现对于大黄原植物的植物图刻画得都较为简单，仅可见叶柄长，叶缘有不同程度的缺刻和掌状分裂，《证类本草》与图 1A 的大黄图所附大黄图一

致，故结合更加形象明朗的现代正品大黄图片加以分析。由图 1D（《全国中草药汇编》[24]）和图 1G《中华本草》[25]）可以看出来药用大黄基生叶大型，叶片近圆形或宽卵圆形，叶腋具花序分枝；大型圆锥花序，分枝开展，花成簇互生；花梗细长，果实长圆状椭圆形等特点。从图 1E（《全国中草药汇编》）和图 1 H（《中华本草》）可以看出掌叶大黄具有基生叶大，宽卵形，掌状深裂，裂片 3 ～ 5，裂片有的会再次羽裂；圆锥花序大型，花小；瘦果具 3 棱，有翅等特点。由图 1F（《全国中草药汇编》）和图 1I（《中华本草》）可以看出唐古特大黄和掌叶大黄相似，但唐古特大黄叶片叶裂程度更深，裂片通常窄长，呈三角状披针形或窄线形，与鸡爪的形状很相似。

图 1 不同古籍中大黄临摹图

Fig 1 Different ancient books rhubarb plants' pictures by freehand drawing

注：A.《图经本草》；B.《本草纲目》；C.《植物名实图考》；D ～ F.《全国中草药汇编》；G ～ I.《中华本草》。

Note：A. *Medica*；B. *Compendium of Material Medical*；C. *Illustrated Book of Plants*；D ～ F. *National Herbal Medicine Compilatio*；G ～ I. *Chinese Materia Medica.*

大黄近缘种较多，对现代书籍中大黄属植物形态进行比对（见表 1），以三基原正品大黄形态为依据，心叶大黄、天山大黄根有差异；喜马拉雅大黄、波叶大黄、条裂大黄（细裂大黄）基生叶有差异；河套大黄果实有差异；塔黄、藏边大黄、华北大黄茎有差异 [26-27]。

3 产地变迁

根据本草考证的结果来看，大黄的产区因时因地有所改变，主要产区为四川和甘肃。《药物出产辨》[28] 载：大黄，川（四川）、山（山西）、陕（陕西）、甘（甘肃）各省均有出，同时云南也产。即四川的汶县、灌县、雅安、南川；陕西的兴安、汉中；山西的五台山、岐州、源浑州、大同；甘肃礼县等地。又《本草经考注》载："舶来有数品，新舶不及古舶者。今城州、和州传彼种多栽培，药肆谓之真大黄，形状于诸家所说合。"由此可见道地药材大黄自古就有"一地生产，供应全国"的特点，但因其质量和产量很难保证，于是便开始进行种植。由此追溯，大黄栽培品清朝就已崭露头角。本草典籍对大黄的产地出处记载详见表 2。

4 品质评价

查阅古籍中对大黄品质评价方面的详细描述，到梁《本草经集注》才有记录："好者犹作紫地锦色，味甚苦涩，色至浓黑。西川阴干者胜。"唐《新修本草》："幽、并以北渐细，气力不如蜀中者。"宋《图经本草》："以蜀川锦文者佳，其次秦陇来者。"《重修政和经史证类备用本草》《证类本草》："廓州马蹄峡中者次。"明《本草乘雅半偈》："出河西山谷，及陇西者为胜。益州北部汶山、西山者次之。"《本草崇原》："古时以出河西、陇西者为胜，..... 以川中锦纹者为佳。"《本草纲目》："今出宕州、凉州、西羌、蜀地者皆佳。幽并以北者渐细，气力不及蜀中者，..... 今人以庄浪出者为最，庄浪即古泾原陇西地。"《本草品汇精要》："根锦纹者为佳。"清《本草逢原》[36]："产川中者色如锦纹而润者良。"《药征》："大黄汉土产，有两品，黄色而润实者为良，所谓锦纹大黄也。"《植物名实图考长编》："今以产四川者良。"

《新修本草》云：大黄，用之当分别其力。若取和厚深沉，能攻病者，可用蜀中似牛舌片紧硬者；若取泻泄骏快，推陈去热，当取河西绵纹者。凡有蒸、有生、有熟，不得一概用之。而近代人们将掌叶大黄和唐古特大黄称为北大黄，药用大黄称为南大黄。大黄是一种典型的多基原中药，现代研究表明，其具有特定的疗效倾向。其中结合蒽醌、蒽酮类主要具有泻下作用 [37]，游离蒽醌类主要具有清热作用 [38]，鞣质类化合物与活血化瘀和通经的功效密切相关 [39]。对大黄三基原化学成分进一步研究发现，唐古特大黄的结合型蒽醌类化合物含量最高，药用大黄的游离蒽醌类化合物含量最高。掌叶大黄二蒽酮类化合物含量最高 [40]。李丹丹等 [41] 建立的大黄指纹图谱定量测定方法，区分三种不同来源以及野生与栽培大黄，这为鉴别不同基原的大黄提供了一种简便、准确的方法。

综上可知：梁·陶弘景认为西北所产大黄优于四川所产，唐·苏颂则认为四川西部产的锦纹大黄最好，而明·卢之颐认为甘肃质量佳。由此可知梁以前大黄道地产区是西北，唐之后道地产区多为四

表 1 大黄及其近缘种

Tab 1 Rhubarb plants and its related species

品种	拉丁名	根	茎	叶	花	果实和种子	产地	株高
掌叶大黄[26]	*R. palmatum* L.	根粗壮	茎直立，光滑无毛，中空	基生叶大，叶片宽心形或近圆形，掌状深裂，裂片全缘或有齿，或浅裂，基部略呈心形；茎生叶较小，互生	圆锥花序大形，花小，幼时呈紫红色，花期 6 ～ 7月	瘦果三角形，有翅，端微凹，基部略呈心形，果期 7 ～ 8月	分布四川、甘肃、青海、西藏等地，生于山地林缘半阴湿的地方，海拔 1500 ～ 4400 m	2 m左右
唐古特大黄[26]	*R. tanguticum* Maxim. ex Balf	—	茎无毛或有毛	基生叶略呈圆形或宽心形，掌状深裂，裂片狭长，常再作羽状浅裂，先端锐尖，基部心形；茎生叶较小，柄亦较短	圆锥花序大形，花小，花期 6 ～ 7月	瘦果三角形，有翅，顶端圆或微凹，基部心形，果期 7 ～ 9月	分布青海、甘肃、四川、西藏等地，生于山地林缘较阴湿的地方，海拔 1600 ～ 3000 m	2 m左右
药用大黄[26]	*R. officinale* Baill	根及根状茎粗壮	茎直立，疏被短柔毛，节处较密	基生叶有长柄，叶片圆形至卵圆形，掌状浅裂，或仅有缺刻及粗锯齿，先端锐尖，基部心形；茎生叶较小，柄亦短	圆锥花序，大形，淡绿色或黄白色，花期 6 ～ 7月	瘦果三角形，有翅，顶端下凹，果期 6 ～ 7月	分布陕西、湖北、四川、云南、贵州等地，多生长于排水良好的山地，海拔 1200 ～ 4000 m	1.5 m左右
条裂大黄（细裂大黄）[26]	*R. laciniatum* Prain	—	—	具茎生叶。基生叶大，叶片近卵形，掌状 5 深裂到近全裂，每裂片又具 1 ～ 2 次不整齐羽状极深裂；茎生叶较小叶柄较短	大型圆锥花序，呈三角状；花被黄白或绿白色，花被片略呈倒卵状椭圆形或宽椭圆形，内稍宽大		产四川北部，生于海拔约 3000 m 山沟中	约 1 m
华北大黄[26]	*R. franzenbach-ii* Munt	根状茎肥厚	茎粗壮，直立，不分枝，无毛	基生叶有长柄，叶片卵形或宽卵形，顶端圆钝，基部近心形，边缘波状；茎生叶较小，有短柄或近无柄	花序圆锥状，顶生，花白色，较小	瘦果有 3 棱，沿稜生翅，顶端略下凹，基部心形	分布于河北、山西和内蒙古，生于山坡向阳，海拔 1000 m 的地方	40 ～ 100 cm
天山大黄[26]	*R. wittrockii* Lundstr.	具黑棕色细长根状茎	茎中空，光滑或近节部被乳突状短毛	基生叶，叶片卵形到三角状卵形或卵心形，顶端钝急尖，基部心形，边缘具弱皱波，茎生叶叶片较小长明显大于宽，叶柄亦较短	大型圆锥花序分枝较疏；花被白绿色，花期 6 ～ 7月	果实宽大于长，圆形或矩圆形，两端心形到深心形，翅幼时红色，种子卵形，果期 8 ～ 9月	多分布于天山北麓，生于海拔 1200 ～ 2600 m 山坡草地、林下或沟谷	50 ～ 100 cm
波叶大黄[26]	*R. undulatum* L.		茎粗壮，中空，光滑无毛	基生叶大，叶片三角状卵形或近卵形，顶端钝尖或钝急尖，常扭向一侧，基部心形，边缘具强皱波	大型圆锥花序，花白绿色，花期 6月	果实三角状卵形到近卵，顶端钝，基部心形，翅较窄；种子卵形，棕褐色，稍具光泽，果期 7 月以后	产黑龙江西部、吉林及内蒙古锡东郭勒盟东部，生于海拔 1000 m 左右山地	1 ～ 1.5 m
河套大黄[26]	*R. hotaoense* C. Y. Cheng et Kao	根状茎及根粗大，棕黄色	茎挺直，下部直径光滑无毛，近节处粗糙	基生叶大，叶片卵状心形或宽卵形，顶端钝急尖，基部心形，边缘具弱皱波，茎生叶较小，叶片卵形或卵状三角形	大型圆锥花序，花较大，花梗细长，花被片中部浅绿色，边缘白色，花期 5 ～ 7月	果实圆形或近圆形，顶端略微凹，稀稍近截形基部圆或略心形，有翅，种子宽卵形，果期 7 ～ 9月	产甘肃、陕西及山西等省，生于海拔 1000 ～ 1800 m 山坡或沟中	80 ～ 150 cm
心叶大黄[27]	*R. acuminatum* Hook. f. et Thoms. ex HK	根较细长	茎直立，中空，基部有时在花期前具疏短毛	基生叶心形或宽心形，顶端渐尖，基部深心形，边缘全缘，纸质；茎生叶较小	花序圆锥状，花被片椭圆形，紫红色	果连翅呈卵状长圆形，顶端微凹，基部心形，翅紫红色	分布于云南，喜马拉雅山区，其他地方也有，海拔 3200 ～ 4000 m	50 ～ 120 cm
塔黄[27]	*R. nobile* Hook. f et Thoms.	根状茎及根长而粗壮	茎直立，粗壮，不分枝	基生叶卵圆形或近圆形，顶端圆钝，基部浅心形，革质；具多数茎生叶及大型苞片	花序圆锥状，分枝密集；花被片椭圆形，淡绿色；花梗中下部具关节	瘦果连翅呈宽卵形	产米林、朗县，生山坡草地，海拔 3900 ～ 4600 m	1 ～ 2 m

续表 1

品种	拉丁名	根	茎	叶	花	果实和种子	产地	株高
藏边大黄[27]	*R. australe* D. Don	根状茎驻根粗壮	茎直立，粗壮，无毛	基生叶宽卵形，顶端圆钝，基部心形，纸质，边缘具弱皱波，有长叶柄；茎生叶小	花序圆锥状，大型，花被片椭圆形，紫红色	瘦果连翅呈宽椭圆形或卵状椭圆形，顶端微凹，基部心形	产察隅、波密、朗县、吉隆，生山坡灌丛，海拔 3200 ～ 4300 m	70 ～ 100 cm
喜马拉雅大黄[27]	*R. webbianum* Royle	—	茎直立，粗壮，中空，光滑	基生叶宽卵形或肾状心形，顶端圆钝或尖，基部心形，边缘皱波状，近革质	花序圆锥状，大型，花被片椭圆形，淡绿色	瘦果连翅呈宽椭圆形或近圆形，顶端微凹，基部心形；翅黄褐色	产米林、拉萨、南木林、日喀则，生山坡草地，海拔 3500 ～ 4400 m	60 ～ 120 cm

表 2 大黄产地变迁

Tab 2 Changes in the origin of rhubarb

年代	原文记载	现代产地	出处
魏	蜀郡北部	四川雅安市西	《吴普本草》
	陇西	甘肃省定西市临洮县	
南北朝	河西	甘肃省河西走廊一带	《名医别录》[29]
	陇西	甘肃省定西市临洮县	
	益州北部汶山	四川茂汶羌族自治县	《本草经集注》
	西山	岷山、邛崃山、鹧鸪山等	
	益州	云南省西北部益州	
	西川	四川省、重庆市全境和陕西省南部	
唐代	幽	河北北部及辽宁一带	《新修本草》
	并	山西省	
	宕州	甘肃宕昌南阳	
	凉州	甘肃省武威市	
	西羌	甘肃省永靖西北	
	河西山谷及陇西	甘肃省各地	《千金翼方》[30]
五代	廊州	山西省大同市浑源县	《日华子本草》[31]
北宋	秦陇	陕西甘肃之地	《图经本草》
	河东	山西省	
元代	蜀中	四川省	《食物本草》[32]
明代	益州	四川省、重庆市全境和陕西省南部，云南省西北部	《本草乘雅半遏》
	汶山	四川省汶川县	
	西山	四川省南充市	《本草纲目》
	泾原	甘肃省泾川县北	
	陇西	甘肃省，宁夏回族自治区六盘山以东，浦河以西	
	陕西凉州	陕西省陇县	《本草品汇精要》
清代	河西山谷及陇西	甘肃省各地	《本草经考注》[33]《本经疏证》《本草易读》
	河东道隰，陇右道廓州州	山西省隰县，青海省贵德县	《千金翼方·药出州土》
	川中	四川省遂宁市	《本经逢源》[34]
	四川	四川省	《植物名实图考》
近代	四川汶县	四川省汶川县	《药物出产辨》
	灌县	四川省都江堰市	
	陕西兴安	陕西省安康市	
	汉中	陕西省汉中市	
		陕西、甘肃东南部、青海、四川西部、云南西北部及西藏东部	《中国道地药材》[35]

川，明清之后道地产区又再次转移至甘肃。而通过对大黄三基原化学成分分析结合产地变迁与品质评价相关内容，推测前人只从大黄单一功效评价大黄品质优劣，未考虑大黄三基原的功效偏向性，从而导致文献记载大黄道地产区不断变迁。

5 讨论和结论

本草古籍对药用植物基原，产地以及品质等均有记载，分析比对古籍描述，为药用植物正确运用提供理论来源。通过查阅不同的古籍，以功效、形态、产地、颜色不同大黄别名有：将军、黄良、肤如、羊蹄大黄等，历代本草中均以大黄作为正名。1953 年版《中国药典》[42] 延续古籍中对大黄的统称即本品为蓼科植物大黄 *R. officinale* Baillon. 或其变种的干燥根茎。自 1963 年版《中国药典》[43] 开始就将大黄正品列为三种即本品为蓼科 Polygonaceae 植物掌叶大黄 *R. palmatum* L. 或其变种唐古特大黄 *R. palmatum* var. *tangutieum* Maxim. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥地下根状茎。1977 年版《中国药典》将唐古特大黄的拉丁名改为 *R. tangutioum* Maxim. ex Balf.，并确定用药部位为干燥根及根茎[44]。自此后，大黄均以掌叶、唐古特和药用大黄为正品。对于大黄形态，首次在《图经本草》中

详细叙述，后世根据花色推测其开黄花者为药用大黄，青红似荞麦花者为掌叶大黄和唐古特大黄。同时也有研究表明，《图经本草》《证类本草》《本草纲目》和《植物名实图考》中所绘大黄图为大黄属掌叶组植物，再结合其地理分布以及对大黄形态的描述，可能为掌叶大黄、药用大黄以及鸡爪大黄，可见正品大黄很早之前就有三基原之说。1963 年版《中国药典》对于大黄的质量给出了明确的规定："以质坚实、断面锦纹明显，红棕色、有油性、气清香、味苦而不涩、嚼之发黏者为佳。质较松、断面锦纹不明显、色棕黄、气微、味苦微涩者质次。"这与古籍中记载的：紫地锦色而润，味甚苦涩，色至浓黑基本上是一致的。因野生资源稀缺，大黄属植物在甘肃、四川、陕西、青海等地均有栽培，与古籍中所述大致吻合。大黄作为中国的传统药材，不仅拥有悠久的药用历史，而且因其资源丰富，在中医药领域中占有重要地位。本研究对大黄的名称、起源等进行深入的本草考证，对于全面理解其药用价值、历史演变以及现代应用具有重要意义。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：24-25.
[2] 李欢，张娜，李依民，等 . 利用转录组测序挖掘掌叶大黄蒽醌类生物合成相关基因 [J]. 药学学报，2018，53（11）：1908-1917.
[3] 郑俊华，果德安 . 大黄的现代研究 [M]. 北京：北京大学医学出版社，2007.
[4] 李成义，马艳茹，魏学明，等 . 甘肃道地药材大黄的本草学研究 [J]. 甘肃中医学院学报，2011，28（4）：52-56.
[5] 孙星衍，孙冯翼辑 .《神农本草经》[M]. 北京：人民卫生出版社，1982.
[6] 陶弘景著 . 尚志钧，尚元藤辑校 .《本草经集注辑校本》[M]. 北京：人民卫生出版社，1994.
[7] 苏敬著 . 何清湖点校 .《新修本草》[M]. 太原：山西科学技术出版社，2012.
[8] 唐慎微 .《证类本草》[M]. 北京：中国医药科技出版社，2011.
[9] 唐慎微 .《重修政和经史证类备用本草》[M]. 北京：人民卫生出版社，1982.
[10] 陈嘉谟著 . 张印生，韩学杰等校注 .《本草蒙筌》[M]. 北京：人民卫生出版社，1988.
[11] 张志聪 .《本草崇原》[M]. 北京：学苑出版社，2008：1157.
[12] 李时珍 . 柳长华，柳璇校注 .《本草纲目》[M]. 北京：中国医药科技出版社，2011.
[13] 周岩 .《本草思辨录》[M]. 北京：人民卫生出版社，1982.
[14] 邹澍 .《本经疏证》[M]. 上海：上海科学技术出版社，1959.
[15] 苏颂 .《图经本草录》[M]. 安徽：安徽科学技术出版社，1994.
[16] 卢之颐著 . 张永鹏校 .《本草乘雅半偈》[M]. 北京：中国医药科技出版社，2014.
[17] 吉益为则 .《药征》[M]. 北京：中国中医出版社，2016.
[18] 帝玛尔·丹增彭措 .《晶珠本草》[M]. 上海：上海科学技术出版社，2012.
[19] 吴普著，尚志钧辑 .《吴普本草》[M]. 北京：人民卫生出版社，1987.
[20] 吴其濬 .《植物名实图考长编》[M]. 北京：商务印书馆出版，1959.
[21] 刘文泰 .《本草品汇精要》[M]. 北京：人民卫生出版社，1982.
[22] 汪讱庵著，吕广振 .《本草易读》[M]. 北京：人民卫生出版社，1987.
[23] 吴其浚 .《植物名实图考》[M]. 北京：商务印书馆，1957.
[24] 王国强 .《全国中草药汇编》（卷一）[M]. 北京：人民卫生出版社，2014.
[25] 国家中医药管理局 .《中华本草》（上册）[M]. 北京：科学技术出版社，1996.
[26] 中国科学院《中国植物志》编委会 .《中国植物志》. 第 25（1）卷 [M]. 北京：科学出版社，1998.
[27] 吴征镒 .《西藏植物志》（卷一）[M]. 北京：科学出版社，1983：595.
[28] 陈仁山著 . 蒋森，陈思敏等整理《药物出产辨》[M]. 广州：广州中医药专门学校，1930.
[29] 陶弘景，尚志钧 .《名医别录》[M]. 北京：人民卫生出版社，1986.
[30] 孙思邈 .《千金翼方》[M]. 北京：人民卫生出版社，1955.
[31] 日华子 .《日华子本草》[M]. 合肥：安徽科学技术出版社，2005.
[32] 李杲，郑金生 .《食物本草》[M]. 北京：中国医药科技出版社，1990.
[33] 森之立著 . 孙屏校点 .《本草经考注》[M]. 北京：学苑出版社，2009.
[34] 张璐纂 .《本经逢源》[M]. 上海：上海卫生出版社，1957.
[35] 胡世林 .《中国道地药材》[M]. 黑龙江科学技术出版社，1989：451-455.
[36] 张璐 .《本草逢原》[M]. 上海：上海科学技术出版社，1959.
[37] 谭鹏，王伽伯，张定堃，等 . 效应成分指数在中药大黄质量评价中的应用研究 [J]. 药学学报，2019，54（12）：2141-2148.
[38] 刘钊，杨鸿，李雪丽 . 大黄素甲醚通过影响 AKT 信号通路抑制 LPS 诱导人巨噬细胞的炎症反应 [J]. 时珍国医国药，2021，32（3）：566-569.
[39] 邓瑞雪，黄玉阳，张玉秀，等 . 掌叶大黄鞣质类化学成分研究 [J]. 中草药，2020，51（4）：908-911.
[40] 赵江怡，唐进程，陈欣欣，等 . 基于拟靶向代谢组学的 3 种基原大黄的差异成分研究 [J]. 中国中药杂志，2024，49（9）：2393-2401.
[41] 李丹丹，裴文菡，郭泰麟，等 . 不同道地来源大黄药材的多指标成分测定、指纹图谱研究及一致性评价 [J]. 中南药学，2020，18（4）：641-647.
[42] 中国药典 1953 年版 . 一部 [S]. 1953：16.
[43] 中国药典 1963 年版 . 一部 [S]. 1963：15.
[44] 中国药典 1977 年版 . 一部 [S]. 1977：34.

（收稿日期：2024-03-08；修回日期：2024-05-08）

药物分析与检验

炙黄芪多糖的酶解产物指纹图谱构建与化学模式识别分析

李亚栋，赵颖，尚奥丽，杨若泓，陈君*（中国药科大学中药学院，南京 210009）

摘要：目的 构建炙黄芪多糖酶解产物指纹图谱，推动其质量标准的提升。**方法** 采用水提醇沉法制备炙黄芪多糖，然后用β-D-半乳糖苷酶进行水解，采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS）对水解产物进行鉴定，并运用亲水色谱-高效液相色谱-蒸发光散射检测器（HILIC-HPLC-ELSD）构建水解产物指纹图谱，结合相似度评价、聚类分析（HCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）比较生黄芪、炙黄芪的差异。**结果** 炙黄芪多糖水解产物经鉴定主要为葡萄糖（Glc）和聚合度（DP）为 2 ～ 8 的六碳糖寡糖片段，炙黄芪多糖中不存在游离的β-D-半乳糖基，还原端存在与半乳糖以β-D-糖苷键连接的游离葡萄糖基；炙黄芪样品的相似度为 0.939 ～ 0.995，而生黄芪样品与炙黄芪多糖的相似度为 0.855 ～ 0.923，HCA 和 OPLS-DA 模型可将生黄芪、炙黄芪明显区分，Glc、DP2 和 DP3 是两者水解产物的主要差异糖片段。**结论** 本研究建立的炙黄芪多糖酶解产物指纹图谱，体现了多糖结构特征且专属性良好，可为炙黄芪的质量控制提供参考。

关键词：黄芪多糖；炙黄芪；酶解；指纹图谱；质量评价
中图分类号：R283.6，R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-2994-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.026

Fingerprints and chemical pattern recognition of enzyme hydrolysates of honey-processed Astragali Radix polysaccharides

LI Ya-dong, ZHAO Ying, SHANG Ao-li, YANG Ruo-hong, CHEN Jun* (*School of Traditional Chinese Medicine*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Objective To establish the fingerprints of enzyme hydrolysates of saccharide mapping of honey-processed Astragali Radix (HAR) to improve the standard of HAR. **Methods** β-D-galactosidase was used to hydrolyze HAR polysaccharides (HAPS), and ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to identify the HAPS hydrolysates. Hydrophilic interaction-high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector (HILIC-HPLC-ELSD) was used to establish the fingerprints of HAPS hydrolysates. The similarity was evaluated, hierarchical cluster analysis (HCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were conducted compare the differences between HAR and Astragali Radix (AR). **Results** The hydrolysates were mainly composed of glucose (Glc) and oligosaccharides with degree of polymerization (DP) of 2 ～ 8. No free β-D-galactose was found in HAPS, and there was free glucose connected with galactose by β-D-glycosidic bond in the reducing end. The similarities of HAPS samples ranged from 0.939 to 0.995, while the similarities of HAPS samples and *Astragalus* polysaccharides (APS) samples ranged from 0.855 to 0.923. HCA and the established OPLS-DA model could distinguish HAPS samples from APS. Glc, DP2 and DP3 were the main sugar fragments in the hydrolysates of

基金项目：国家重点研发计划（No.2022YFC3501604）。
作者简介：李亚栋，男，硕士研究生，主要从事中药质量评价研究，email：lyd9818@163.com *通信作者：陈君，女，博士研究生导师，主要从事中药鉴定及质量标准研究，email：chenj2002cpu@126.com

HAPS and APS. **Conclusion** The fingerprints of enzymatic hydrolysates of HAPS established in this study reflect the structural characteristics of polysaccharides with good specificity, which provides reference for the quality control of HAR.

Key words: Astragali Radix polysaccharide; honey-processed Astragali Radix; enzymatic hydrolysis; fingerprint; quality evaluation

黄芪是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. 的干燥根，具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌的功效，蜜炙后药性由微温转为温，功效以益气补中为主[1]。研究表明，黄芪多糖具有免疫调节[2-4]、抗炎[5-6]、抗氧化[7-9]和抗肿瘤[3，10]等药理作用，是黄芪重要的功效物质基础，对其开展质量评价研究具有重要意义。但多糖分子量大、结构复杂、无紫外吸收，传统的总多糖含量检测方法只能提供多糖含量信息，无法提供多糖结构信息，选择性差，准确度低，对其质量评价相对较困难。近年来多采用酸水解或酶水解，将中药多糖大分子水解成单糖或寡糖，对其水解后单糖或寡糖的组成进行分析并建立多糖色谱指纹图谱（简称糖谱），为中药多糖的质量控制提供了新的思路[11-12]。目前针对炙黄芪多糖的研究较少，其质量评价标准仍有待研究完善。*β*-D- 半乳糖苷键是黄芪多糖中糖残基间的重要连接方式[13-15]，本研究采用*β*-D- 半乳糖苷酶对炙黄芪多糖进行水解，采用超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS）对酶解产物进行鉴定，利用亲水色谱 - 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法（HILIC-HPLC-ELSD）建立炙黄芪多糖酶解产物指纹图谱，与生黄芪样品进行相似度评价，进一步结合正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）模型筛选差异糖片段，以期为炙黄芪的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

BT-25S 型电子分析天平（十万分之一，德国 Satarious 公司）；LDO-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海龙跃仪器设备有限公司）；D1524R 型高速冷冻离心机（北京大龙兴创实验仪器股份公司）；Milli-Q 超纯水仪（美国 Millipore 公司）。甲酸（色谱纯，上海麦克林生物科技股份有限公司）；乙腈（色谱纯，美国 TEDIA 公司）；其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.2 试药

无水葡萄糖（纯度：99.61%，批号：MUST-22030214，成都曼思特生物科技有限公司）。*β*-D- 半乳糖苷酶（纯度：150 000 U·g^{-1}，批号：E2315476，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。洋槐蜂蜜（上海冠生园蜂制品有限公司）。10 批蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao] 饮片（编号 S1 ～ S10，山西省大同市丽珠芪源药材有限公司，经中国药科大学陈君教授鉴定）。将黄芪饮片加炼蜜炮制后得到 10 批自制的蜜炙蒙古黄芪饮片（编号 Z1 ～ Z10）。6 批市售蜜炙蒙古黄芪饮片（编号 Z11 ～ Z16，安徽亳州药材交易市场）经中国药科大学陈君教授鉴定。

2 方法

2.1 炙黄芪的制备

炼蜜的制备参照文献[16]方法并进行了微调，准确称量 100 g 洋槐蜂蜜置锅内，加水 5 mL，加热至徐徐沸腾后，改用文火保持微沸 10 min，至起淡黄色鱼眼泡，冷却至室温后以手试之黏性较生蜜略强且颜色稍深，即得炼蜜。参照《中国药典》2020 年版通则 0213“蜜炙”项下的方法，先将 25 g 炼蜜加适量沸水稀释后，加入生黄芪 100 g 拌匀，闷透，置炒制容器内，用文火炒至深黄色、不黏手时取出放凉，即得炙黄芪饮片。

2.2 多糖的提取

将饮片粉碎，过 60 目筛，称取适量粉末，分别用 70% 乙醇和 90% 乙醇（料液比 1∶30）于 80 ℃水浴加热回流提取 2 次，每次 1 h，过滤，弃去滤液，将过滤后的药渣于 60 ℃烘干 1 h。精密称取 8 g 干燥药渣，置于 250 mL 圆底烧瓶中，加入纯水（料液比 1∶30），于 90 ℃水浴加热 2.5 h，抽滤并收集滤液，减压浓缩，加无水乙醇至终浓度为 90%（*V/V*），于 4 ℃过夜沉淀。离心 10 min（4500 r·min^{-1}），弃去上清液，沉淀水浴蒸干，即得黄芪多糖粉末。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取多糖粉末 5 mg，加入 1 mL 50 U·mL^{-1}

β-D- 半乳糖苷酶，混匀，在 pH 5.5、50 ℃下水解 10 h，置于 80 ℃下灭活糖苷酶 20 min，待稍冷却后，减压蒸干，再加入少量甲醇继续减压蒸干，重复操作 4 次，以除去多余的缓冲盐，然后加入 0.5 mL 乙腈 - 水（1∶1，*V/V*）溶液复溶，离心 10 min（12 000 r • min^{-1}），取上清液，即得供试品溶液。

2.4 液质联用分析条件

采用超高效液相色谱仪 Agilent 1290 串联 Agilent 6500 四极杆飞行时间质谱（Q-TOF MS）对多糖的酶解产物进行定性分析，色谱柱：Waters XBridge BEH Amide 柱（2.1 mm×100 mm，3.5 μm），流动相 A：0.1% 甲酸水溶液，流动相 B：0.1% 甲酸乙腈溶液；梯度洗脱程序如下（0 ～ 10 min，94%B；10 ～ 16 min，94% ～ 82%B；16 ～ 58 min，82% ～ 54%B；58 ～ 60 min，54%B）。流速：0.3 mL • min^{-1}，柱温：35 ℃，进样量：5 μL。质量扫描范围：50 ～ 2000 *m/z*，鞘气流速：12 L • min^{-1}，鞘气温度：350 ℃，干燥器流速：10 L • min^{-1}，干燥气温度：275 ℃，雾化器压力：45 psi，毛细管电压：负离子模式 3500 V，裂解电压：120 V，锥孔电压：65 V，碰撞能量：10、20、40、50 eV。

2.5 色谱条件

采用高效液相色谱仪 Thermo U3000 高效液相色谱串联 Allchrom Model 6000 蒸发光散射检测器（ELSD）。色谱柱：Waters XBridge BEH Amide 柱（2.1 mm×100 mm，3.5 μm），流动相 A：超纯水，流动相 B：乙腈。梯度洗脱程序、流速和柱温同 “2.4” 项下。漂移管温度：50 ℃，N_2 流速：2.5 L • min^{-1}，增益值：4。

2.6 数据处理

将 16 批炙黄芪的色谱图信息导入 “中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012”，以中位数法生成对照图谱，建立炙黄芪多糖酶解产物指纹图谱，进行相似度评价，并与生黄芪进行比较。将炙黄芪和生黄芪样品的共有峰信息导入 SIMCA 14.1 软件中，建立 OPLS-DA 模型，筛选两者酶解产物中的差异糖片段。

3 结果与分析

3.1 炙黄芪多糖酶解产物的鉴定

炙黄芪多糖酶解产物在负离子模式下的总离子流图如图 1 所示，采集主要酶解产物的质谱信息，结合准分子离子的质荷比、二级质谱碎片信息和裂解规律，对色谱峰进行鉴定 [17]，结果如表 1 所示。

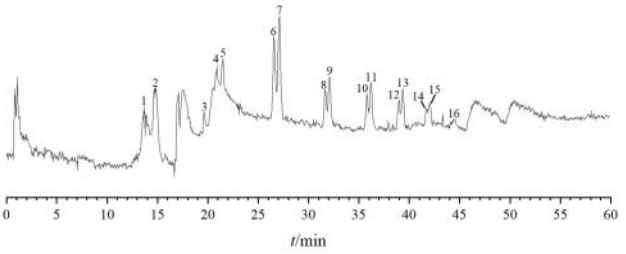


图 1 炙黄芪多糖酶解产物在负离子模式下的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of HAPS enzyme hydrolysates in negative mode

由表 1 可知，炙黄芪多糖经 β-D- 半乳糖苷酶水解后，产生了六碳糖单糖和聚合度为 2 ～ 8 的六碳糖寡糖片段（DP2 ～ 8），经与对照品比对，色谱峰 1 和 2 鉴定为葡萄糖（glucose，Glc）。糖类化合物存在变旋现象，在酸性环境中糖的两种相对构型（即 α 和 β 构型）通过开链式结构相互转化，并最终达到动态平衡，在色谱图上表现为分叉峰。炙黄芪多糖能被 β-D- 半乳糖苷酶水解，表明多糖链状结构中存在 β-D- 半乳糖基，但酶解产物中除 Glc 外未检测到其他单糖，表明 β-D- 半乳糖基不处于游离状态，且还原端存在与半乳糖以 β-D- 糖苷键连接的游离葡萄糖基。

表 1 炙黄芪多糖的 β-D- 半乳糖苷酶水解产物鉴定

Tab 1 Identification of β-D-galactosidase hydrolysates of HAPS

峰号	t_R/min	[M-H]$^-$	分子式	水解产物
1	13.821	179.0567	$C_6H_{12}O_6$	Glc
2	14.759	179.0561	$C_6H_{12}O_6$	Glc
3	19.608	341.1089	$C_{12}H_{22}O_{11}$	DP2
4	20.893	341.1088	$C_{12}H_{22}O_{11}$	DP2
5	21.486	341.1091	$C_{12}H_{22}O_{11}$	DP2
6	26.572	503.1617	$C_{18}H_{32}O_{16}$	DP3
7	27.116	503.1677	$C_{18}H_{32}O_{16}$	DP3
8	31.660	665.2146	$C_{24}H_{42}O_{21}$	DP4
9	32.105	665.2146	$C_{24}H_{42}O_{21}$	DP4
10	35.809	827.2666	$C_{30}H_{52}O_{26}$	DP5
11	36.205	827.2673	$C_{30}H_{52}O_{26}$	DP5
12	38.971	989.3204	$C_{36}H_{62}O_{31}$	DP6
13	39.317	989.3202	$C_{36}H_{62}O_{31}$	DP6
14	41.688	1151.3738	$C_{42}H_{72}O_{36}$	DP7
15	42.034	1151.3728	$C_{42}H_{72}O_{36}$	DP7
16	44.454	1313.4252	$C_{48}H_{82}O_{41}$	DP8

3.2 指纹图谱方法学考察

3.2.1 精密度考察 取 Z1 样品，按 “2.3” 项下方法制备供试品溶液，按 “2.5” 项下色谱条件连续进样 6 次，以 7 号色谱峰为参照峰，记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，计算 *RSD* 值。结果显示，各共有峰相对保留时间的 *RSD* 值均小于 0.090%，相对峰面积的 *RSD* 值在 2.5% ～ 4.6%，

表明仪器精密度良好。

3.2.2　重复性考察　取 Z1 样品，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.5”项下色谱条件进样检测，以 7 号色谱峰为参照峰，记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，计算 *RSD* 值。结果显示，各共有峰相对保留时间的 *RSD* 值均小于 0.34%，相对峰面积的 *RSD* 值在 1.8% ～ 4.1%，表明该方法重复性良好。

3.2.3　稳定性考察　取 Z1 样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.5”项下色谱条件在第 0、4、8、12、16 和 24 h 进样检测，以 7 号色谱峰为参照峰，记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，计算 *RSD* 值。结果显示，各共有峰相对保留时间的 *RSD* 值均小于 0.19%，相对峰面积的 *RSD* 值在 0.41% ～ 3.8%，表明炙黄芪多糖供试品在 24 h 内具有良好的稳定性。

3.3　炙黄芪多糖酶解产物指纹图谱的建立

如图 2 所示，16 批炙黄芪样品的多糖酶解产物色谱图共匹配得到 16 个共有峰。将建立的指纹图谱与生黄芪样品进行比较，进行相似度评价，结果如表 2 所示，炙黄芪样品间的相似度在 0.939 ～ 0.995，自制炙黄芪与市售炙黄芪的多糖组分不存在显著差异；炙黄芪与生黄芪样品的相似度在 0.855 ～ 0.923，表明炙黄芪与生黄芪的多糖组分差异较大。

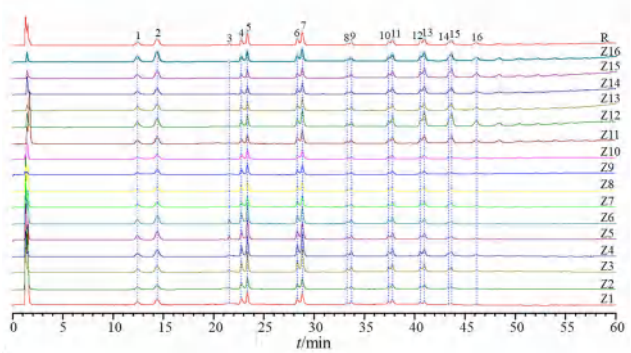


图 2　炙黄芪多糖酶解产物指纹图谱

Fig 2　Fingerprints of HAPS enzyme hydrolysates

生黄芪、炙黄芪多糖酶解产物的 HILIC-HPLC-ELSD 图如图 3 所示，将色谱峰面积作归一化处理，然后进行比较，发现炙黄芪多糖经 *β*-D- 半乳糖苷酶水解后释放出的 Glc 和 DP2 明显少于生黄芪，但 DP5 ～ DP8 寡糖片段含量均高于生黄芪，可见黄芪多糖在蜜炙过程中结构发生了明显变化，且这种变化在蜜炙过程中是稳定发生的。推测可能存在以下两个原因：一是由于蜜炙过程的高温处理使得炼蜜中的单糖和寡糖与黄芪多糖发生缩合 [5]，导致炙黄芪多糖的支链的糖残基数量增加；二是在蜜炙过程中存在两种转化，即半乳糖醛酸向半乳糖的转化和 *α* 构型向 *β* 构型的转化 [13]，使得 *β*-D- 半乳糖苷酶的作用位点增加，进而表现为酶解产物中寡糖片段更加丰富。

表 2　炙黄芪多糖酶解产物相似度评价结果

Tab 2　Similarity of HAPS enzyme hydrolysates

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
Z1	0.972	Z10	0.979	S3	0.889
Z2	0.974	Z11	0.983	S4	0.896
Z3	0.959	Z12	0.942	S5	0.885
Z4	0.968	Z13	0.976	S6	0.881
Z5	0.971	Z14	0.981	S7	0.878
Z6	0.969	Z15	0.939	S8	0.876
Z7	0.995	Z16	0.967	S9	0.859
Z8	0.994	S1	0.923	S10	0.855
Z9	0.984	S2	0.914		

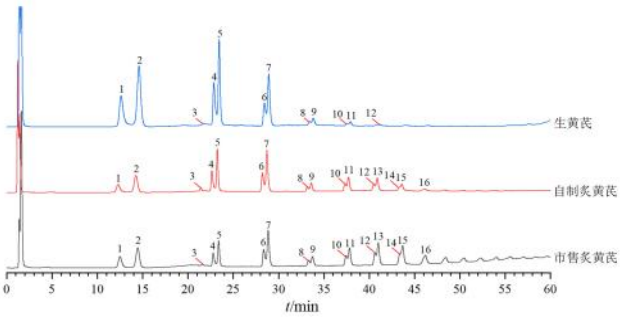


图 3　生黄芪多糖、炙黄芪多糖酶解产物 HILIC-HPLC-ELSD 图

Fig 3　HILIC-HPLC-ELSD chromatograms of APS and HAPS enzyme hydrolysates

自制炙黄芪与市售炙黄芪的多糖酶解产物图谱也存在一定差异，推测一方面可能是由于炮制时采用不同产地的黄芪饮片所致，另一方面蜜炙过程中条件和操作的差别也可能造成多糖结构发生不同程度的变化。但结合相似度来看，不同批次炙黄芪间的差异明显小于生黄芪与炙黄芪间的差异。

3.4　聚类分析（HCA）

依据多糖的主要酶解产物峰面积对样品进行聚类分析，将炙黄芪与生黄芪多糖酶解产物中 Glc 及 DP2 ～ 6 寡糖片段峰面积整合成 26×6 的数据矩阵，导入 SPSS 23.0 软件中，以组间联接法进行层次聚类分析，结果如图 4 所示。在平方欧氏距离为 15 时，26 批样品明显聚为两类，即炙黄芪（Z1 ～ Z16）聚为一类，生黄芪（S1 ～ 10）聚为另一类，表明炙黄芪多糖的酶解产物含量与生黄芪存在显著差异。

3.5　OPLS-DA

为进一步筛选炙黄芪与其生品多糖酶解产物

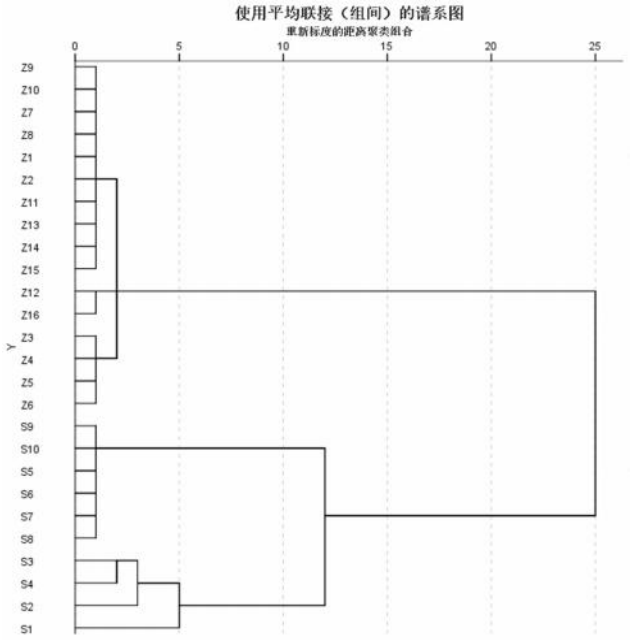


图 4 26 批样品的 HCA 图

Fig 4 HCA plot of 26 batches of samples

中的差异糖片段，将炙黄芪和生黄芪共有糖片段的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中建立 OPLS-DA 模型，所建模型的 R^2X（cum）= 0.998，R^2Y（cum）= 0.967，Q^2（cum）= 0.951，均趋近于 1；200 次置换检验结果为 R^2 = 0.069，Q^2 = − 0.656，表明所建模型准确性高，预测能力好。在该模型下绘制得分图，结果如图 5 所示，炙黄芪能与生黄芪明显区分开。变量重要性投影（VIP）能够体现自变量对样本间的差异贡献度，以 VIP ＞ 1 为指标筛选差异糖片段，结果如图 6 所示。Glc、DP2 和 DP3 的 VIP ＞ 1，表明这 3 个组分是炙黄芪和生黄芪多糖酶解产物中的主要差异糖片段。

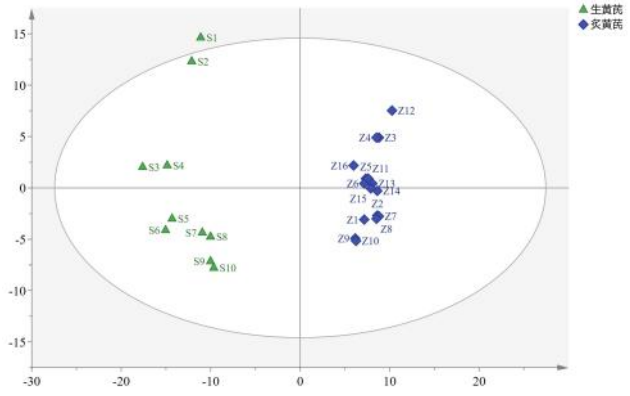


图 5 26 批样品 OPLS-DA 得分图

Fig 5 OPLS-DA score plot of 26 batches of samples

4 讨论

4.1 多糖酶解条件的确定

构建多糖糖谱的关键在于稳定获取特异性的

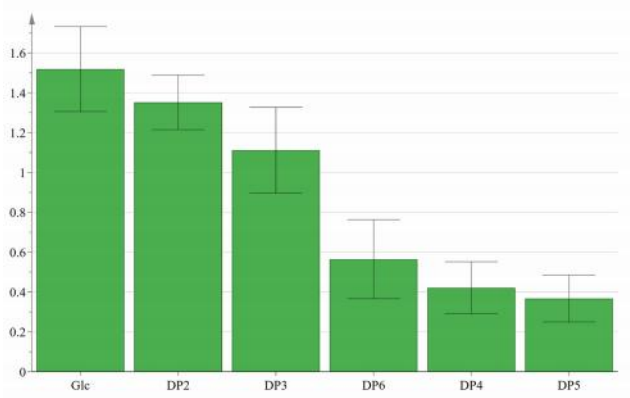


图 6 26 批样品共有糖片段的 VIP 得分图

Fig 6 VIP plot of common saccharide fragments in 26 batches of samples

糖片段，相较于酸水解法，糖苷酶能够断裂特定的糖苷键，实现多糖的定向降解，同时不会破坏或改变多糖原有的其他结构，在分析多糖结构特征和构建糖谱等方面具有优势。但酶解条件会对酶解产物组成和含量造成较大影响，适宜的酶解条件应当保证多糖被完全降解且不被过度降解。本研究前期选择了对酶解过程影响较大的因素（温度、时间、pH、酶用量），在单因素实验的基础上，通过设计四因素三水平的正交实验，即对温度（40、50、60 ℃）、时间（8、10、12 h）、pH（4.5、5.0、5.5）、酶用量（6、8、10 U • mg^{-1}）的交互组合进行考察，以各组分峰面积的 $\log_{10}$ 函数值之和（$\Sigma\log_{10Ai}$，A 为峰面积，i 为共有糖片段）为指标，对酶解工艺进行了优化。结果表明，温度 50 ℃、水解时间 10 h、pH 5.5、酶用量 10 U • mg^{-1} 为最佳酶解条件。在该条件下，炙黄芪多糖可稳定产生丰富的糖片段，为其糖谱的构建奠定了基础。

4.2 液质联用及色谱条件的确定

综合考虑多糖酶解产物各组分的分离度、峰形、峰面积和分析时间，参考文献方法 [18-19] 并进行优化，确定了本研究所使用的液质联用条件和指纹图谱条件。经方法学考察，所建方法的重复性、精密度、稳定性均良好，可用于生黄芪、炙黄芪多糖的分析检测。

4.3 小结与展望

现行《中国药典》（2020 年版）炙黄芪的质量标准的含量测定项仅对黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷进行了限度规定，缺乏与多糖相关的分析方法和质量控制指标。目前已有文献对黄芪蜜炙前后多糖的相对分子量和单糖组成变化进行了报道 [15, 20]，本研究在此基础上，利用 β-D- 半乳糖苷酶将炙黄

芪多糖定向降解为单糖和特征寡糖片段，建立基于酶解产物的炙黄芪多糖糖谱，获得了与多糖组成和结构联系更加密切的独特指纹信息，可为基于多糖的炙黄芪的鉴定和质量评价提供参考。本研究虽然结合化学模式识别分析筛选出了差异糖片段，但并未将其与药效相关联，后续进一步结合生黄芪、炙黄芪多糖的差异探索其生物效应差异的物质基础，为科学制订炙黄芪多糖质量标准提供依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：316.

[2] Li CX，Liu Y，Zhang YZ，et al. *Astragalus* polysaccharide：a review of its immunomodulatory effect [J]. Arch Pharm Res，2022，45（6）：367-389.

[3] Li R，Chen WC，Wang WP，et al. Extraction，characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer [J]. Carbohydr Polym，2009，78（4）：738-742.

[4] Wang ZX，Liu ZJ，Zhou LJ，et al. Immunomodulatory effect of APS and PSP is mediated by Ca^{2+}-cAMP and TLR4/NF-κB signaling pathway in macrophage [J]. Int J Biol Macromol，2017，94（Pt A）：283-289.

[5] Liao JZ，Li CY，Huang J，et al. Structure characterization of honey-processed *Astragalus* polysaccharides and its anti-inflammatory activity in vitro [J]. Molecules，2018，23（1）：168.

[6] Long HJ，Lin HY，Zheng P，et al. WTAP mediates the anti-inflammatory effect of *Astragalus mongholicus* polysaccharide on THP-1 macrophages [J]. Front Pharmacol，2022，13：1023878.

[7] 王丹妮 . 基于网络药理学和液质联用技术研究生黄芪和炙黄芪抗衰老作用及其机制 [D]. 西安：陕西科技大学，2021.

[8] Yan H，Xie YP，Sun SG，et al. Chemical analysis of *Astragalus mongholicus* polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides [J]. Carbohydr Polym，2010，82（3）：636-640.

[9] Chen RZ，Tan L，Jin CG，et al. Extraction，isolation，characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus* [J]. Ind Crops Prod，2015，77：434-443.

[10] Li WF，Song KD，Wang SP，et al. Anti-tumor potential of *Astragalus* polysaccharides on breast cancer cell line mediated by macrophage activation [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl，2019，98：685-695.

[11] 李萍，李卫燕，曹蔚 . 酶解技术在多糖结构和活性研究中的应用进展 [J]. 西北药学杂志，2015，30（4）：433-436.

[12] 李绍平，吴定涛，赵静 . 糖谱及其在中药多糖质量控制中的应用 [J]. 中国中药杂志，2015，40（17）：3505-3513.

[13] 李晓霞，王迪，王桂臻，等 . 基于内切 -1，4-β- 半乳聚糖酶水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪的鉴别 [J]. 中药材，2018，41（6）：1306-1311.

[14] 范信晖，李科，杨一丹，等 . 黄芪多糖的结构表征研究进展 [J]. 山西中医药大学学报，2022，23（3）：260-267.

[15] 吴嘉彩 . 蜜炙黄芪多糖的分离纯化、结构表征及对 4 种益生菌的影响 [D]. 广州：广东药科大学，2022.

[16] 刘小鸣，曹文文，王瑞生，等 . 中药炮制辅料炼蜜制备工艺及质量标准研究 [J]. 中医学报，2024，39（3）：631-637.

[17] Xia YG，Yu SM，Liang J，et al. Chemical fingerprinting techniques for the differentiation of polysaccharides from genus *Astragalus* [J]. J Pharm Biomed Anal，2020，178：112898.

[18] Bai RB，Wang YP，Cao YY，et al. Discrimination of three varieties of Codonopsis Radix based on fingerprint profiles of oligosaccharides by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector combined with multivariate analysis [J]. J Chromatogr A，2022，1685：463642.

[19] Zhang YL，Wu MQ，Xi JR，et al. Multiple-fingerprint analysis of *Poria cocos* polysaccharide by HPLC combined with chemometrics methods [J]. J Pharm Biomed Anal，2021，198：114012.

[20] 赵婷婷，裴科，于子涵，等 . 黄芪和蜜炙黄芪中糖类组分和非糖类组分的差异性研究 [J]. 中草药，2023，54（5）：1586-1596.

（收稿日期：2024-04-09；修回日期：2024-05-21）

UPLC-MS/MS 法测定半夏中根茎膨大剂的残留

徐丹洋，张金星，姚奕然，黄赛燕，朱琳，刘欢欢*（南通市食品药品监督检验中心，江苏 南通 226014）

摘要：目的 了解半夏药材种植过程中根茎类膨大剂的使用现状，并筛选出可能会在半夏药材中残留的根茎类膨大剂。**方法** 采用 QuEChERS 法对不同批次半夏药材及饮片进行提取，采用 Phenomenex F5（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）色谱柱，以甲醇和 0.1% 甲酸水溶液为流动相，梯度洗脱，流量为 0.3 mL·min^{-1}，采用分时间窗口多反应监测模式对 29 种根茎类膨大剂化合物进行定性和定量检测。**结果** 29 种植物生长调节剂的质量浓度均在一定范围内与对应峰面积呈线性关系，检测限为 0.4 ～ 2.0 μg·kg^{-1}；在所添加的 3 个水平浓度下，方法回收率在 80.2% ～ 114.5%，*RSD* 均在 2.3% ～ 8.8%。38 批半夏样品的根茎除野外自采批次，其余均检出不同程度的根茎类膨大剂。其中氯化胆碱普遍应用于半夏栽培过程中，半夏人工种植过程中涉及的根茎类膨大剂多达 10 余种，主要集中在人工合成外源性生长素（吲哚丁酸、2，4-二氯苯氧乙酸），细胞分裂素（玉米素、烯腺嘌呤、6-氨基腺嘌呤），含氮杂环类（多效唑、环丙嘧啶醇、烯效唑），季铵盐类（矮壮素），还有部分其他类的生长调节剂。**结论** 该方法操作方便简易，准确可靠，可同时快速筛查半夏药材中 29 种根茎类膨大剂的残留。

关键词：半夏；根茎膨大剂；HPLC-MS/MS；QuEChERS 法
中图分类号：R927，R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3000-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.027

UPLC-MS/MS determination of rhizome expanders residues in *Pinellia sinensis*

XU Dan-yang, ZHANG Jin-xing, YAO Yi-ran, HUANG Sai-yan, ZHU Lin, LIU Huan-huan* (*Nantong Center for Food and Drug Control*, *Nantong Jiangsu* 226014)

Abstract: Objective To determine the use of rhizome expanders in the planting of *Pinellia sinensis*, and to screen possible rhizome expander residues in *Pinellia sinensis*. **Methods** Different batches of *Pinellia sinensis* were extracted by QuEChERS. Phenomenex F5 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column was used with methanol and 0.1% formic acid as the mobile phase in gradient elution with the flow rate of 0.3 mL·min^{-1}. Time window multiple reaction monitoring model was used to detect 29 rhizome expanders qualitatively and quantitatively. **Results** The mass concentration of 29 rhizome expanders was linearly correlated with the corresponding peak area within a certain range, and the detection limit was 0.4 ～ 2.0 μg·kg^{-1}. The recoveries ranged 80.2% ～ 114.5%, and the *RSD* ranged 2.3% ～ 8.8%. In the 38 batches of *Pinellia sinensis* samples used for analysis, different degrees of rhizome expanders were detected. Choline chloride was widely used in the cultivation of *Pinellia sinensis*. More than 10 rhizome expanders were involved in the artificial cultivation of *Pinellia sinensis*, mainly in the artificial synthesis of exogenous growth hormone (indolebutyric acid, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid), cytokinin (zein, enadenine, and 6-amino-adenine), nitrogen-containing heterocyclic compounds (polybulobulozole, cyclopropylpyrimidinol, and enlobulozole), quaternary ammonium salts (macrosomin), and some other growth regulators. **Conclusion** The method is simple, convenient, accurate and reliable, and can quickly screen 29 rhizome expanders in *Pinellia sinensis*.

Key words: *Pinellia sinensis*; rhizome expander; HPLC-MS/MS; QuEChERS method

基金项目：南通市科技项目（No.JC22022065）。

作者简介：徐丹洋，女，硕士，副主任药师，主要从事药品检验与质量研究，email：407224341@ qq.com *通信作者：刘欢欢，女，硕士，主管药师，主要从事药品质量分析与控制研究，email：huanhuanliuyc@ 126.com

近年来，随着中药材野生资源急剧匮乏，中药材栽培及养殖等人工技术不断发展，植物生长调节剂作为提高植物生产力的技术手段，已被广泛应用于中药材的种植栽培过程中，但不合理地使用甚至滥用，可导致中药品质发生显著变化[1-2]。根茎膨大剂，为一类植物生长调节剂，能够有效促进药材根茎生长发育，显著增加根茎类药材的产量，但过量及不规范使用，会对环境造成不可逆的伤害，也会对人类的生命健康造成威胁。文献表明，虽然大部分的植物生长调节剂的毒性较低，但长期食用仍可能引起骨质疏松、性早熟、过敏，甚至有致畸、致癌的风险[3-4]。同时，过量的根茎膨大剂可能导致中药材有效成分发生变化，影响药材的安全性及有效性[5-8]。半夏为常用的大宗药材，多用于化痰、燥湿健脾、降逆止呕作用的中成药及方剂中，特别是新冠疫情以来，出现了明显的供不应求的趋势。研究表明半夏在人工栽培过程中也存在使用外源性植物生长激素的现象[9]。本试验通过液质色谱联用技术，建立半夏中根茎膨大剂残留量检查方法，并了解半夏药材种植过程中植物生长调节剂的使用现状，现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-30AD 液相色谱仪（日本岛津）；Qtrap 4500 三重四极杆质谱检测仪（德国 AB Sciex 公司）；VORTEX 4 digital 圆周振荡器、打粉机（德国 IKA）；CPA225D 型电子分析天平（德国赛多利斯）；Milli-Q 超纯水机（美国 Millipore 公司）。

1.2 试药

29 种植物生长调节剂对照品，信息详见表 1。甲醇、乙腈（色谱纯，德国默克）；甲酸（色谱纯，美国 ACS 恩科化学公司）；乙酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；QuEChERS 提取包：（6.0 g 无水硫酸镁＋ 1.5 g 乙酸钠，AOAC），（6.0 g 无水硫酸镁＋ 2.0 g 氯化钠，通用）及（6.0 g 无水硫酸镁＋ 2.0 g 氯化钠＋ 0.5 g 柠檬酸钠，EN）（上海楚定分析仪器有限公司）；水为超纯水。

38 批半夏药材及饮片样品来源于全国范围的产地及药材市场，具有一定的代表性，由南通市食品药品监督检验中心副主任中药师张金星鉴定，均为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata*（Thunb.）Breit. 的干燥块茎及其炮制加工品。具体样品信息见表 2。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱：Phenomenex F5（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）- 甲醇（B），梯度洗脱（0 ～ 1.0 min，98%A；1.0 ～ 4.0 min，98% ～ 50%A；4.0 ～ 8.0 min，50% ～ 20%A；8.0 ～ 10.0 min，20% ～ 5%A；10.0 ～ 12.5 min，5%A；12.5 ～ 12.6 min，5% ～ 98%A；12.6 ～ 15.0 min，98%A）；流速 0.3 mL·min^{-1}；柱温 40 ℃；进样量 2 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子（ESI）源，分时间窗口多反应监测（Schedule MRM）模式。正（ESI$^+$）离子模式：离子源电压 5500 V，负（ESI$^-$）离子模式：离子源电压－ 4500 V；离子源温度 500 ℃；气帘气（CUR）压力 35 psi；雾化气（GAS1）50 psi；辅助气（GAS2）50 psi。其他质谱参数见表 3。

表 1 植物生长调节剂对照品信息

Tab 1 Reference substance of plant growth regulator

编号	中文名	批号	纯度 /%	品牌
1	1，3- 二苯基脲	BWJ4329-2016	99.2	伟业计量
2	萘乙酰胺	A086862	≥ 98	阿尔法
3	3- 吲哚丁酸	B25546	≥ 99	源叶
4	环丙嘧啶醇	B25343	≥ 99	源叶
5	吲熟酯	B67387	≥ 99	源叶
6	增产胺	S25274	≥ 98	源叶
7	抗倒胺	T23189	≥ 98	源叶
8	稻瘟灵	B60737	≥ 98	源叶
9	烯腺嘌呤	XK1080	≥ 99	信康
10	多效唑	B25641	≥ 95	源叶
11	玉米素	LM1003	≥ 99	LMAI Bio
12	三唑酮	wkq-02392	≥ 98	维克奇
13	抑芽唑	CD112836	≥ 98	可道
14	抗倒酯	B65876	≥ 98	源叶
15	烯效唑	B27456	≥ 98	源叶
16	6- 苄氨基嘌呤	B24213	≥ 98	源叶
17	氯吡脲	F810007	≥ 98	麦克林
18	矮壮素	C805426	≥ 98	麦克林
19	氯化胆碱	S30169	≥ 98	源叶
20	丁酰肼	B65580	≥ 99	源叶
21	缩节胺	B67204	≥ 98	源叶
22	调环酸	P953650	≥ 95	麦克林
23	2，3，5- 三碘苯甲酸	T819112	≥ 98	麦克林
24	2，4- 二氯苯氧乙酸	D806765	≥ 97	麦克林
25	5- 硝基邻甲氧基苯酚钠	S30883	≥ 98	源叶
26	2- 萘氧乙酸	S18174	≥ 98	源叶
27	调果酸	S60093	≥ 98	源叶
28	赤霉素	G810402	≥ 98	麦克林
29	4- 溴苯氧乙酸	B8380304	≥ 95	麦克林

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取对照品适量，精密称定，置棕色量瓶中，用乙腈溶解配制成 1 mg·mL^{-1} 的对照品储备液（－ 30 ℃保存）。再用乙腈 -0.1% 乙酸水混合溶液（50∶50，*V/V*）稀

表 2 半夏收样情况信息

Tab 2 Information of *Pinellia sinensis* samples

编号	样品	来源	编号	样品	来源
1	半夏	河北	20	姜半夏	四川
2	半夏	甘肃	21	法半夏	四川
3	半夏	河北省安国市白庄乡	22	姜半夏	甘肃陇南
4	半夏	甘肃西和县避风乡	23	半夏	甘肃陇南
5	半夏	湖北省荆门市	24	法半夏	甘肃陇南
6	半夏	湖北省荆门市	25	姜半夏	江苏东台
7	半夏	湖北省荆门市	26	半夏	江苏东台
8	半夏	河北安国	27	半夏	甘肃西和
9	姜半夏	湖北	28	半夏	云南邵通
10	半夏	湖北	29	半夏	山西新绛
11	法半夏	湖北	30	半夏	四川达州
12	半夏	湖北赤壁	31	半夏	河北保定
13	半夏	贵州毕节	32	半夏	甘肃西和
14	半夏	海安李堡	33	姜半夏	湖南邵阳
15	半夏	河北安国	34	半夏	河北安国
16	半夏	河北保定	35	半夏	甘肃天水
17	半夏	甘肃西和	36	姜半夏	贵州毕节
18	半夏	南通海门（自挖）	37	清半夏	甘肃陇西
19	法半夏	四川	38	法半夏	甘肃陇西

释配制成 10 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液（4 ℃保存），临用前配制成约含各组分 1、2、5、10、20、50、100 μg • L^{-1} 的系列浓度标准曲线溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品粉末（过四号筛）3 g，置 50 mL 离心管中，精密加入 0.1% 乙酸水溶液 15 mL，涡旋混匀，静置 30 min，再精密加入 15 mL 乙腈，涡旋混匀；于离心管中加入 QuEChERS 提取包（无水硫酸镁 6.0 g，氯化钠 2.0 g，柠檬酸钠 0.5 g，EN），冰浴中立即摇散，涡旋混匀 1 min，置冰浴中 10 min，离心 5 min（4000 r•min^{-1}），取上清液 5 mL，冰浴氮吹浓缩至 1 mL 以下，加入乙腈补足体积至 1 mL，混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜。

2.3 *方法学考察*

2.3.1 基质效应及专属性 将 18 号样品按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液，按照“2.1”项下色谱与质谱条件对 29 种根茎膨大剂进行检测，结果显示均未检出。基质效应（matrix effect，ME）值是常用来评价基质效应的指标，当其在 85% ～ 115% 内时基质效应较弱，对分析结果准确度影响较小，可忽略。ME 值为同浓度水平基质匹配标准溶液和标准溶液中目标物峰面积的百分比[10]。本试验中，用 18 号样品作为空白基质，通过加入适量对照品储备液，制成等同于表 4 中标准曲线浓度 1 的基质标曲溶液，与以空白溶液制成表 4 中标准曲线浓度 1 的工作标曲溶液，按照“2.1”项下条件测定，结果显示有 23 种化合物的 ME 值不在 85% ～ 115% 内，说明本试验应采用基质标曲进行测定。

2.3.2 线性关系、检测限及定量限 取“2.2.1”项下 10 μg•mL^{-1} 的混合对照品溶液，用乙腈 -0.1% 乙酸水混合溶液（50∶50，*V/V*）稀释配制成 0.1 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。精密称取本品粉末（过四号筛）3 g，分别加入上述 0.1 μg • mL^{-1} 混合对照品溶液 30、60、150、300、600、1500、3000 μL，按“2.2.2”项下方法制备供试品，制成“2.2.1”项下的系列标准溶液工作曲线。按“2.1”项下色谱与质谱条件进样，记录各组分的定量离子峰面积，以各组分的定量离子峰面积为纵坐标（*y*），质量浓度为横坐标（*x*），分别绘制标准曲线，计算回归方程。精密称取本品粉末（过四号筛）3 g，分别加入 0.1 μg • mL^{-1} 混合对照品溶液适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品，分别以各组分定量离子对峰的信噪比接近 3∶1 和 10∶1 定为各组分的检测限和定量限，结果见表 4。

2.3.3 精密度与加样回收率 取标准曲线最高浓度的混合对照品溶液连续进样 6 次，结果各组分定量离子峰面积 *RSD* 均小于 9.2%，表明精密度良好。取“2.2.1”项下 10 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，用乙腈 -0.1% 乙酸水混合溶液（50∶50，*V/V*）稀释成 1 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，按照试验方法分别向 18 号空白样品加入 1 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液 30、120、300 μL，进行低、中、高 3 个浓度水平（5、20、50 μg • L^{-1}）的加样回收试验，每个浓度水平各平行测定 3 次，计算 3 个浓度水平得回收率均在 80.2% ～ 114.5%，*RSD* 均在 2.3% ～ 8.8%。

2.4 *样品测定*

38 批半夏样品中，共检出 15 种外源性生长调节剂，其中氯化胆碱（检出率 97%），残留量范围为 12.9 ～ 179.9 μg • kg^{-1}；5- 硝基邻甲氧基苯酚钠（检出率 63%），残留量为 13.6 ～ 42.0 μg • kg^{-1}；烯腺嘌呤（检出率 55%），残留量为 10.9 ～ 66.0 μg • kg^{-1}；烯效唑（检出率 53%），2，4- 二氯苯氧乙酸及稻瘟灵（检出率 29%），残留量分别为 10.1 ～ 40.2 μg • kg^{-1}、10.5 ～ 38.9 μg • kg^{-1}；增产胺（检出率 24%），3- 吲哚丁酸、多效唑及环丙嘧啶醇（检出率 21%），残留量分别为 10.9 ～ 18.0 μg • kg^{-1}、13.1 ～ 33.5 μg • kg^{-1}、12.0 ～ 94.7 μg•kg^{-1}；4- 溴苯氧乙酸及玉米素（检出率 11%），残留量分别为 13.5 ～ 30.0 μg•kg^{-1}、24.7 ～ 62.5 μg • kg^{-1}。还有 4 种外源性生长调节剂检出率偏低，且检出的含量明显较低，可能是土壤种植其他作物时的农药残留物。研究表明，半夏在种植栽培过程中存在多种外源性生长调节剂混合使用的情况，且在半夏药材及饮片中仍能普遍检出根茎类膨大剂残留物。通过绘制半夏根

表 3 29 种植物生长调节剂的质谱参数

Tab 3 MS parameters of 29 kinds of plant growth regulator

化合物	电离模式	保留时间 /min	质荷比（*m/z*）		DP/V	CE/V
			母离子	子离子		
1，3- 二苯基脲	ESI^+	7.7	213.1	94.0	85	30
			213.1	77.0	85	35
萘乙酰胺	ESI^+	6.9	186.1	141.1	94	28
			186.1	115.1	94	45
3- 吲哚丁酸	ESI^+	7.4	204.1	186.1	90	22
			204.1	130.0	90	35
环丙嘧啶醇	ESI^+	7.0	257.2	81.2	118	39
			257.2	135.0	118	34
吲熟酯	ESI^+	8.2	239.1	165.0	84	25
			239.1	135.0	84	30
增产胺	ESI^+	5.9	262.1	100.1	110	29
			262.1	58.1	110	55
抗倒胺	ESI^+	8.5	339.1	321.1	80	20
			339.1	80.1	80	40
稻瘟灵	ESI^+	9.0	291.1	231.0	65	30
			291.1	188.9	65	16
			291.1	145.0	65	45
			291.1	173.0	65	25
烯腺嘌呤	ESI^+	5.6	204.1	136.0	90	24
			204.1	148.1	90	19
			204.1	118.9	90	45
多效唑	ESI^+	8.8	294.2	70.1	85	60
			294.2	125.1	85	50
			294.2	165.1	85	35
玉米素	ESI^+	4.2	220.2	136.2	95	25
			220.2	148.2	95	20
			220.2	185.1	95	25
			220.2	119.0	95	50
三唑酮	ESI^+	8.9	294.2	197.2	90	25
			294.2	225.1	90	20
抑芽唑	ESI^+	9.5	264.3	70.1	115	55
			264.3	109.2	115	30
抗倒酯	ESI^+	7.9	253.1	207.1	95	20
			253.1	69.1	95	35
烯效唑	ESI^+	9.5	292.1	70.0	100	50
			292.1	43.0	100	55
6- 苄氨基嘌呤	ESI^+	5.6	226.1	91.1	100	34
			226.1	148.1	100	26
			226.1	65.0	100	37
氯吡脲	ESI^+	7.9	248.1	129.1	80	29
			248.1	155.0	80	25
			248.1	93.0	80	50
矮壮素	ESI^+	1.5	122.1	58.0	58	40
			122.1	63.1	58	25
氯化胆碱	ESI^+	1.4	104.2	60.3	80	15
			104.2	58.3	80	35
缩节胺	ESI^+	1.8	114.2	98.2	85	34
			114.2	58.0	85	30
丁酰肼	ESI^+	4.4	161.1	143.1	70	8
			161.1	61.2	70	10
调环酸	ESI^-	4.9	211.0	167.0	−86	−20
			211.0	123.1	−86	−19
			211.0	193.0	−86	−21
2，3，5- 三碘苯甲酸	ESI^-	9.2	498.7	454.7	−45	−15
			498.7	127.1	−45	−28
2，4- 二氯苯氧乙酸	ESI^-	5.3	218.9	160.9	−90	−23
			218.9	162.9	−90	−23
5- 硝基邻甲氧基苯酚钠	ESI^-	7.4	168.0	153.0	−60	−17
			168.0	123.0	−60	−27
			168.0	95.0	−60	−32
			168.0	46.0	−60	−60
2- 萘氧乙酸	ESI^-	7.6	201.0	143.0	−55	−26
			201.0	115.1	−55	−50
调果酸	ESI^-	7.7	198.9	127.0	−60	−21
			200.9	129.0	−60	−22
赤霉素	ESI^-	5.6	345.1	143.0	−100	−25
			345.1	239.1	−100	−22
			345.1	221.1	−100	−35
4- 溴苯氧乙酸	ESI^-	7.5	228.9	171.0	−70	−20
			228.9	78.9	−70	−46

注：每个组分第一行为定量离子对；从第二行开始均为定性离子对。

Note：The first line of each component is quantitative ion pairs；from the second line of each component are qualitative ion pairs.

茎类膨大剂含量堆叠图发现，一般栽培半夏都会使用到 3 ～ 5 种外源性生长调节剂，药材及饮片中残留的总量较高，见图 1。

3 结果与讨论

3.1 *方法的优化*

目前，已有不少关于植物生长调节剂测定方法的研究，但针对半夏植物生长调节剂残留量测定方法尚未有文献记载。褚悟男等 [11] 在对白芷植物生长调节剂的研究中采用高速匀浆进行快速提取，由于半夏中含有大量的蛋白质及有机酸类成分导致该方法不适用。刘志荣等 [12] 在对党参、当归生长调节剂的研究中采用 QuEChERS 提取法，因考虑该文献中提及的提取包试剂加入过程的放热反应，会使 3- 吲哚丁酸、2- 萘氧乙酸等的稳定性降低，部分化合物加样回收率降低；同时，考虑到少量水相残留会使矮壮素与缩节胺等季铵盐类水溶性化合物回收率较差等因素，本试验对半夏中植物生长调节剂的提取进行优化。

本次试验同时考察了 QuEChERS 提取包（6.0 g 无水硫酸镁＋1.5 g 乙酸钠，AOAC），(6.0 g 无水硫酸镁＋ 2.0 g 氯化钠，通用）及（6.0 g 无水硫酸镁＋ 2.0 g 氯化钠＋ 0.5 g 柠檬酸钠，EN）在提取

表 4 线性范围、检出限及定量限

Tab 4 Liner relationships，LOD and LOQ

化合物	标准曲线	线性范围 /（μg·L^{-1}）	检测限 /（μg·kg^{-1}）	定量限 /（μg·kg^{-1}）
1，3- 二苯基脲	$y = 5.098\times10^{4}x + 7.008\times10^{3}$	1.02 ～ 102	0.6	1.8
萘乙酰胺	$y = 1.304\times10^{4}x + 3.402\times10^{3}$	2.16 ～ 108	1.1	3.3
3- 吲哚丁酸	$y = 4.534\times10^{3}x + 6.548\times10^{3}$	5.55 ～ 111	2.0	6.0
环丙嘧啶醇	$y = 9.077\times10^{4}x + 6.098\times10^{3}$	1.03 ～ 103	0.5	1.5
吲熟酯	$y = 2.034\times10^{3}x + 1.021\times10^{3}$	5.25 ～ 105	3.2	9.2
增产胺	$y = 1.529\times10^{4}x + 4.903\times10^{2}$	2.08 ～ 104	1.0	3.0
抗倒胺	$y = 5.548\times10^{4}x + 1.024\times10^{3}$	1.09 ～ 109	0.5	1.5
稻瘟灵	$y = 1.871\times10^{4}x + 3.506\times10^{3}$	2.30 ～ 115	1.0	3.0
烯腺嘌呤	$y = 6.710\times10^{4}x + 6.087\times10^{3}$	1.12 ～ 112	0.5	1.5
多效唑	$y = 6.801\times10^{4}x + 3.410\times10^{3}$	1.14 ～ 114	0.5	1.5
玉米素	$y = 5.865\times10^{4}x + 5.466\times10^{3}$	1.04 ～ 104	0.5	1.5
三唑酮	$y = 7.094\times10^{4}x + 4.904\times10^{3}$	1.06 ～ 106	0.4	1.2
抑芽唑	$y = 5.096\times10^{4}x + 9.80\times10^{2}$	1.10 ～ 110	0.5	1.5
抗倒酯	$y = 1.027\times10^{4}x + 4.504\times10^{3}$	2.26 ～ 113	1.2	3.6
烯效唑	$y = 1.246\times10^{4}x + 6.04\times10^{2}$	2.30 ～ 115	1.2	3.6
6- 苄氨基嘌呤	$y = 8.543\times10^{3}x + 4.975\times10^{3}$	5.25 ～ 105	1.8	5.4
氯吡脲	$y = 1.937\times10^{4}x + 4.023\times10^{3}$	2.04 ～ 102	1.0	3.0
矮壮素	$y = 8.093\times10^{4}x + 7.021\times10^{3}$	5.15 ～ 103	0.2	0.6
氯化胆碱	$y = 9.017\times10^{4}x + 4.864\times10^{3}$	1.12 ～ 112	0.5	1.5
缩节胺	$y = 7.623\times10^{4}x + 1.802\times10^{3}$	1.11 ～ 111	0.5	1.5
丁酰肼	$y = 6.020\times10^{4}x + 5.098\times10^{3}$	2.06 ～ 103	0.8	2.4
调环酸	$y = 5.439\times10^{4}x + 3.597\times10^{3}$	2.14 ～ 107	1.1	3.3
2，3，5- 三碘苯甲酸	$y = 9.553\times10^{3}x + 3.786\times10^{3}$	2.06 ～ 103	1.0	3.0
2，4- 二氯苯氧乙酸	$y = 3.564\times10^{4}x + 1.232\times10^{3}$	1.09 ～ 109	0.5	1.5
5- 硝基邻甲氧基苯酚钠	$y = 2.457\times10^{4}x + 6.710\times10^{3}$	1.11 ～ 111	0.5	1.5
2- 萘氧乙酸	$y = 5.877\times10^{4}x + 8.654\times10^{3}$	1.01 ～ 101	0.5	1.5
调果酸	$y = 6.089\times10^{4}x + 3.409\times10^{3}$	2.14 ～ 107	1.1	3.3
赤霉素	$y = 5.479\times10^{3}x + 1.043\times10^{3}$	5.40 ～ 108	1.5	4.5
4- 溴苯氧乙酸	$y = 2.136\times10^{4}x + 2.341\times10^{3}$	1.16 ～ 116	0.5	1.5

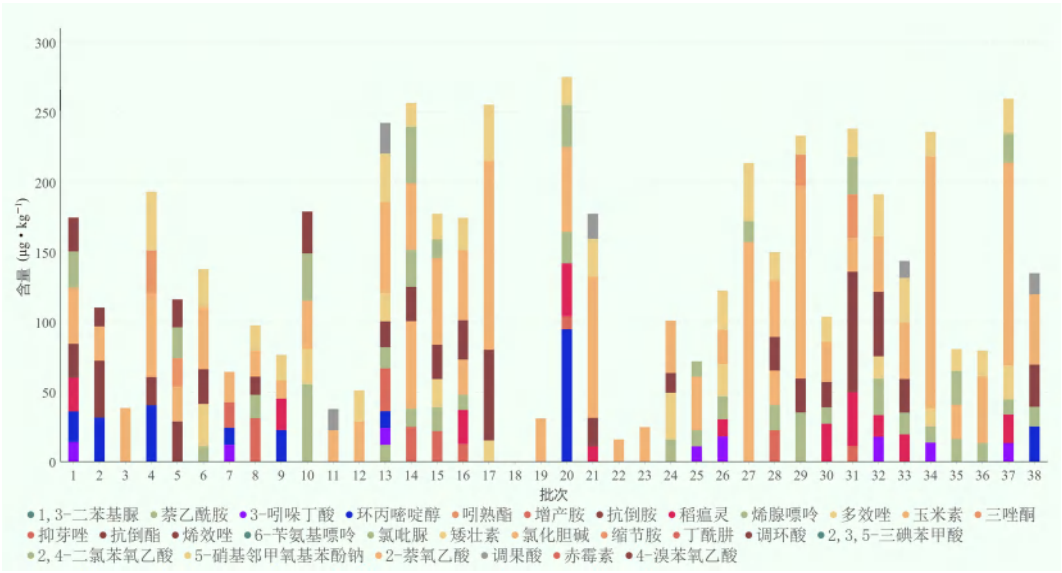


图 1 半夏药材及饮片根茎类膨大剂含量堆叠图

Fig 1 Stacking diagram of the contents of rhizome expanders in *Pinellia sinensis*

过程中的影响，盐和缓冲试剂可以促进两相分离，其中缓冲盐还可以稳定住遇酸碱容易变化的目标待测物，使抗倒胺、缩节胺、增产胺、3- 吲哚丁酸、调果酸、2- 萘氧乙酸、氯化胆碱等酸碱化合物的加样回收试验能满足要求，故本次试验采用 QuEChERS 提取包（6.0 g 无水硫酸镁＋ 2.0 g 氯化钠＋ 0.5 g 柠檬酸钠，EN）。考虑到 QuEChERS 净化管中的石墨化炭黑（GCB）、*N*- 丙基乙二胺

（PSA）等会对植物生长素产生不同程度的吸附，所以未采用净化管对供试品溶液进一步处理。

此外，本试验中将样品于冰水浴中加入 QuEChERS 提取包混匀，涡旋摇匀后又快速置冰浴中冷却 10 min，有效降低放热反应对样品溶液的影响，同时加大 QuEChERS 提取包中无机盐的比重，有效降低水相的残留，各化合物加样回收率均得到有效地提高。

3.2 流动相的优化

文献报道乙腈作为有机相，在植物生长调节剂的液质检查方法中能显著提高目标待测物的响应强度 [13]，本试验考察发现甲醇作为有机相流动相时，能够有效降低基质对定性离子对分离度的影响，响应强度能够满足对本试验中 29 种目标待测物的监测。同时考查了文献中推荐的作为水相的水、0.1% 甲酸水溶液、含 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵的 0.05% 甲酸溶液，以水 - 甲醇体系的色谱条件进样测定，部分峰形出现严重的变宽和拖尾现象，含 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵的 0.05% 甲酸溶液 - 甲醇体系有明显的基质增强作用，故选择 0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇的梯度洗脱程序作为流动相体系。

3.3 结论

目前，由于植物生长调节剂存在食品安全隐患，食品相关标准对其已有限度规定，但中药材栽培过程中过量使用植物生长调节剂对中药材及中药饮片品质影响的研究目前还较少开展。本试验通过液质联用方法，快速了解到当前半夏栽培过程根茎类膨大剂的使用情况，并得出根茎类膨大剂的残留数据。根据试验结果，我们可以知道氯化胆碱目前是半夏栽培过程中使用率最高的植物生长调节剂。氯化胆碱是一种季胺碱，进入植物体后转化为磷脂酰胆碱，从而对膜系统具有修复作用。氯化胆碱通过降低膜脂过氧化、抑制叶绿素的分解，以增加脯氨酸和甜菜碱积累来缓解盐胁迫对植物生长过程的损害 [14]。氯化胆碱作为植物生长调节剂对人体的危害暂未有报道。但仍检出了对人体健康存在威胁的植物生长调节剂，5- 硝基邻甲氧基苯酚钠为单硝化愈创木酚钠盐植物细胞赋活剂，对植物生长和发根速度均有不同程度的促进作用，但具有致畸、致癌、致突变毒性。多效唑在半夏栽培过程中也有使用，具有增强植物抗逆性、提高产量等作用，但在土壤中很难自行分解，残留时间较长且有一定的生殖毒性 [15-16]。

综上，本试验可以为半夏中相关残留物标准的设立及风险监测提供参考。同时针对半夏中部分检出率较高的调节剂进行后续研究，为建立兼顾半夏药材安全性与有效性的植物生长调节剂相关使用标准提供理论依据。

参考文献

[1] 孙成新，孙佩，刘莎 . 根茎膨大剂对党参药材和种子产量及质量的影响 [J]. 中药材，2021，44（7）：1573-1576.

[2] 马琳，郜玉钢，臧埔，等 . 植物生长调节剂对药用植物次生代谢物积累的影响 [J]. 中南药学，2016，14（8）：834-837.

[3] Wang XX，Hao WD. Reproductive and developmental toxicity of plant growth regulators in humans and animals [J]. Pestic Biochem Physiol，2023，196：105640.

[4] Gutta S，Gunasekaran K，Jose A. Mepiquat poisoning-report of a patient with mepiquat poisoning presenting with bradycardia and hypoglycemia [J]. Indian J Forensic Med Toxicol，2021，15（3）：4385-4389.

[5] Guzmán Y，Pugliese B，González CV，et al. Spray with plant growth regulators at full bloom may improve quality for storage of ‘Superior Seedless’ table grapes by modifying the vascular system of the bunch [J]. Postharvest Biol Tec，2021，176：111522.

[6] 彭韵洁，陈丽娜，杨明，等 . QuEChERS-UPLC-MS/MS 测定人参中 19 种植物生长调节剂残留及膳食暴露评估 [J]. 食品研究与开发，2021，42（24）：161-169.

[7] 俞磊明，张娜，李琦，等 . UPLC-MS/MS 法快速测定多效唑在麦冬中的残留及其对麦冬化学成分的影响 [J]. 中南药学，2022，20（7）：1569-1573.

[8] 韩佳，罗祖良，马小军，等 . 矮壮素对黄芪 13 种有效成分含量的影响研究 [J]. 时珍国医国药，2023，34（4）：987-991.

[9] 杜禹珊，孙莹莹，罗睿 . 5 种植物生长调节物质对半夏经济产量的影响 [J]. 贵州农业科学，2014，42（8）：44-47.

[10] 魏赫，金红宇，王莹，等 . 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定中药材中 23 种植物生长调节剂残留量 [J]. 中草药，2017，48（8）：1653-1660.

[11] 褚悟男，李翔，韩玲玲，等 . UHPLC-MS/MS 同时测定白芷中 34 种植物生长调节剂残留量 [J]. 中国现代应用药学，2023，40（6）：783-791.

[12] 刘志荣，张明童，马潇，等 . 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定党参和当归中 23 种植物生长调节剂的残留量 [J]. 理化分析 - 化学分册，2023，59（11）：1303-1309.

[13] 孙莹莹，杜禹珊，罗睿，等 . 不同植物生长调节剂对半夏珠芽产量及发育的影响 [J]. 贵州农业科学，2015，43（8）：1653-1660.

[14] Salama KHA，Mansour MMF，Hassan NS. Choline priming improves salt tolerance in wheat（*Triticum aestivum* L.）[J]. Aust J Basic Appl Sci，2011，5（11）：126-132.

[15] Bao YY，Zhang XY，Shao JL，et al. Dynamics of the residue and degradation of paclobutrazol in tomato and soil [J]. Ecol Envir Sci，2014，23（5）：864-869.

[16] Chen RT，Deng YY，Chen XY，et al. Study on the two-generation reproductive toxicity of paclobutrazol in SD rats [J]. J Toxicol，2008（3）：195-196.

（收稿日期：2024-03-25；修回日期：2024-05-07）

基于超高效液相色谱 - 质谱指纹图谱及多指标成分含量测定的芦笋质量评价研究

窦传浩[1, 2]，张秋红[3*]，张会敏[2*]（1. 山东中医药大学，济南 250355；2. 山东省中医药研究院，国家中医药管理局中药分析高水平重点学科，济南 250014；3. 济南市食品药品检验检测中心，济南 250102）

摘要：目的 建立不同产地芦笋药材的超高效液相色谱 - 质谱联用（UPLC-MS）指纹图谱，同时测定芦笋中 8 种成分的含量，结合化学模式识别法评价不同批次芦笋的质量。**方法** 利用 UPLC-MS 技术并结合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》建立芦笋指纹图谱，进行相似度评价和共有峰确认，结合层次聚类分析（HCA）、主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）等化学模式识别方法对不同批次的芦笋进行质量分析。并采用超高效液相色谱 - 三重四极杆串联质谱（UPLC-MS/MS）同时测定芦笋中原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷 8 种成分的含量。**结果** 建立的芦笋药材的 UPLC-MS 指纹图谱有 20 个共有峰；指纹图谱相似度在 0.625 ～ 0.951；HCA 将 43 批芦笋样品分为 4 类；PCA 得到 6 个主成分；OPLS-DA 筛选出原薯蓣皂苷、香草酸、芦丁、原儿茶酸、橙皮苷、峰 11、峰 6 等 7 种差异成分。43 批芦笋中原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷 8 种成分含量分别为 0.0838 ～ 3.1222、0.8462 ～ 11.0452、0.4529 ～ 29.6468、0.0054 ～ 527.1102、0.0809 ～ 17.3159、0.0439 ～ 320.8445、6.9906 ～ 84.8560、0.1934 ～ 2384.4689 μg·g^{-1}。**结论** 本文建立了芦笋药材 UPLC-MS 指纹图谱并同时测定其中 8 种成分含量的 UPLC-MS/MS 方法，可为芦笋的质量控制、综合评价及进一步开发利用提供参考。

关键词：芦笋；UPLC-MS；指纹图谱；化学模式识别；定量分析
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3006-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.028

Quality evaluation of asparagus by UPLC-MS fingerprints and multi-component content determination

DOU Chuan-hao[1, 2], ZHANG Qiu-hong[3*], ZHANG Hui-min[2*] (1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250355; 2. *Shandong Academy of Chinese Medicine, High-Level Key Discipline of Traditional Chinese Medicine Analysis, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250014; 3. *Jinan Supervision and Inspection Center for Food and Drug Control, Jinan* 250102)

Abstract: Objective To establish UPLC-MS fingerprints to determine the content of 8 components, and evaluate the quality of asparagus from different habitats combined with chemical pattern recognition method. **Methods** The fingerprints of asparagus were established by UPLC-MS and "Chinese Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System". The similarity was evaluated and the shared peaks were identified. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the quality of fingerprints. An UPLC-MS/MS method was developed to determine protocatechuic acid,

基金项目：山东省重点研发计划（重大创新工程）项目（No.2021SFGC1205）；国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目（No.zyyzdxk-2023121）；甘肃省科技计划项目（技术创新引导计划：No.22CX8NA024）；山东省中医药科技项目（No.M-2022173）；山东省食品药品监督管理局山东省中药材及饮片标准研究（No.2020-211）。

作者简介：窦传浩，男，硕士，主要从事中药资源质量控制与研究，email：1638243642@qq.com *通信作者：张秋红，女，主任中药师，主要从事中药资源质量控制与研究，email：zhangqh9886@163.com；张会敏，女，研究员，主要从事中药分析研究，email：huiminzhang@163.com

vanillic acid, ferulic acid, rutin, naringin, hesperidin, cinnamic acid, and protodioscin in asparagus. **Results** The UPLC-MS fingerprints of asparagus matched 20 shared peaks; the similarity of the fingerprints ranged from 0.625 to 0.951; 43 batches of asparagus were divided into 4 categories by HCA; 6 principal components were obtained by PCA. OPLS-DA indicated that protodioscin, vanillic acid, rutin, protocatechuic acid, naringin, peak 11 and peak 6 might be the differential markers for the quality of asparagus. The content of protocatechuic acid, vanillic acid, ferulic acid, rutin, naringin, hesperidin, cinnamic acid, and protodioscin in the 43 samples ranged 0.0838 ～ 3.1222, 0.8462 ～ 11.0452, 0.4529 ～ 29.6468, 0.0054 ～ 527.1102, 0.0809 ～ 17.3159, 0.0439 ～ 320.8445, 6.9906 ～ 84.8560, and 0.1934 ～ 2384.4689 μg • g^{-1}, respectively. **Conclusion** UPLC-MS fingerprints of asparagus from different habitats are established and the content of 8 components is determined, which combines with chemical pattern recognition and provides a scientific basis for quality control, comprehensive evaluation for further development of asparagus.

Key words: *Asparagus officinalis* L.; UPLC-MS; fingerprinting; chemical pattern recognition; quantitative analysis

芦笋为百合科植物石刁柏 *Asparagus officinalis* L. 的新鲜或干燥嫩茎，是一种药食两用的资源，根据种植方式的不同，生长过程中未出土呈白色的称为白芦笋，出土后呈绿色的称为绿芦笋，主要含多糖、黄酮类、甾体皂苷、挥发油等化学成分，具有清热利湿、活血散结的功效，原产于地中海东岸与小亚细亚地区，其栽培品种于 19 世纪末传入我国 [1-5]。芦笋药用历史悠久，常被用于治疗肾疼和肾盂肾炎、风湿、痛风、关节疼痛等病症 [6-8]，现代药理研究表明，芦笋还具有抗肿瘤、降血糖、降血脂、降血压、改善记忆力、抗疲劳等作用 [9-16]。

近年来，我国芦笋产业发展迅速，种植已经遍及山东、河南、云南等地，由于其栽培技术不同、生长环境气候不一，不同产地、不同种植方式的芦笋质量上存在较大差异，现行芦笋质量标准中仅收载性状、薄层鉴别、水分、灰分、浸出物、含氮量检查项目，文献报道对芦笋的栽培、产业发展及药理活性研究居多，难以全面反映芦笋的整体质量情况，严重制约了芦笋药用的发展，因此有必要对芦笋建立多成分综合评价方法。指纹图谱结合化学模式识别的方法，可以有效评价不同产地间药材的质量差异，进一步控制中药材的质量 [17-21]；与高效液相色谱法相比，UPLC-MS/MS 方法具有分析范围广、分离能力强、定性分析结果可靠、检测限低等优点，现已被广泛地应用于中药成分的含量测定 [22-23]。本文收集 43 批芦笋样品，建立芦笋的指纹图谱，并结合层次聚类分析（HCA）、主成分分析（PCA）及正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）等方法，对不同批次的芦笋质量进行客观评价，分析引起质量差异的主要成分；并同时测定其中 8 种成分的含量，为芦笋药材整体质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD XR 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；Triple Quad 4500 型质谱仪（美国 SCIEX 公司）；MS204TS 型电子天平、MS205DU 型电子天平（瑞士梅特勒 - 托利多仪器公司）；KQ-600GD 型超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

原儿茶酸（批号：110809-201906，纯度：97.7%）、香草酸（批号：110776-200402，纯度：100%）、阿魏酸（批号：110773-201614，纯度：99.0%）、芦丁（批号：100080-201811，纯度：91.7%）、柚皮苷（批号：110722-201714，纯度：93.4%）、橙皮苷（批号：110721-202220，纯度：97.2%）、肉桂酸（批号：110786-201604，纯度：98.8%）、原薯蓣皂苷（批号：111937-202102，纯度：94.8%）（中国食品药品检定研究院）；甲醇、乙腈（质谱级，德国默克公司）；水为屈臣氏饮用水。

1.3 药材

芦笋药材均从产区市场购买，经济南食品药品检验检测中心张秋红主任中药师鉴定为百合科植物石刁柏 *Asparagus officinalis* L. 的新鲜嫩茎，经切制、干燥等处理后得到芦笋药材与饮片共 43 批。具体信息见表 1。

表 1 芦笋药材来源信息

Tab 1 Asparagus sample information

饮片编号	药材编号	品种	采集时间	产地	经度 E/°	纬度 N/°
S1	Y1	白芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱小楼村	115.81	34.73
S2	Y2	白芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇车庄村	115.81	34.74
S3	Y3	白芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱牌坊村	115.81	34.72
S4	Y4	白芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇赵双楼村	115.82	34.72
S5	Y5	白芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱老家村	115.82	34.74
S6	Y6	白芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县苏集镇祝楼村	115.86	34.79
S7	—	白芦笋	2021 年 5 月	山东省潍坊市坊子区前曹村	119.30	36.57
S8	—	白芦笋	2021 年 5 月	山东省潍坊市坊子区西曹村	119.30	36.58
S9	—	白芦笋	2021 年 5 月	山东省潍坊市坊子区东曹村	119.31	36.58
S10	—	白芦笋	2021 年 6 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱老家村	115.82	34.74
S11	—	白芦笋	2021 年 6 月	山东省菏泽市曹县苏集镇祝楼村	115.86	34.79
S12	Y7	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱小楼村	115.81	34.73
S13	Y8	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇车庄村	115.81	34.74
S14	Y9	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱牌坊村	115.81	34.72
S15	Y10	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇赵双楼村	115.82	34.72
S16	Y11	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱老家村	115.82	34.74
S17	Y12	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省菏泽市曹县苏集镇祝楼村	115.86	34.79
S18	—	绿芦笋	2021 年 5 月	山东省潍坊市坊子区西曹村	119.30	36.58
S19	—	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省日照市莒县小店镇东心河村	118.78	35.44
S20	—	绿芦笋	2022 年 5 月	山东省日照市莒县小店镇何家庄子村	118.79	35.46
S21	—	绿芦笋	2021 年 6 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱老家村	115.82	34.74
S22	—	绿芦笋	2021 年 6 月	江苏省徐州市丰县孙楼街道下辖村	116.60	34.66
S23	—	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱老家村	115.82	34.74
S24	—	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省济南市	116.75	36.55
—	Y13	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省潍坊市坊子区西曹村	119.30	36.58
—	Y14	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省日照市莒县小店镇东心河村	118.78	35.44
—	Y15	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省济南市	116.75	36.55
—	Y16	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省菏泽市曹县青堌集镇朱老家村	115.82	34.74
—	Y17	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省日照市莒县小店镇何家庄子村	118.79	35.46
—	Y18	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省济南市	116.75	36.55
—	Y19	绿芦笋	2021 年 9 月	山东省菏泽市曹县苏集镇祝楼村	115.86	34.79

注：S1 ～ S24 为芦笋饮片；Y1 ～ Y19 为芦笋药材。

Note：S1 ～ S24 are asparagus slices；Y1 ～ Y19 are asparagus herbs.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱；流动相 A 为甲醇 - 乙腈（1∶10），流动相 B 为 0.05% 乙酸水溶液；梯度洗脱（0 ～ 4 min，5% ～ 10%A；4 ～ 8 min，10% ～ 20%A；8 ～ 13 min，20% ～ 22%A；13 ～ 20 min：22% ～ 55%A；20 ～ 25 min：55% ～ 90%A；25 ～ 30 min：90%A）；流速为 0.4 mL • min^{-1}；柱温为 40 ℃；进样量为 2 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源（ESI）；电离模式为负离子模式；扫描模式为全扫描；扫描范围：*m/z* 100 ～ 1100；离子化电压（IS）－ 4500 V，离子化温度（TEM）550 ℃，喷雾器（Gas1）55 L • min^{-1}，气帘气（CUR）30 L • min^{-1}，喷撞气（CAD）7 L • min^{-1}，辅助加热气（Gas2）55 L • min^{-1}。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷对照品适量，用 50% 甲醇溶解，分别制成质量浓度为 102.68、102.30、106.82、94.73、91.16、103.00、106.41、97.70 μg • mL^{-1} 的单一对照品储备液，分别取适量对照品储备液，分别制成质量浓度为 0.51、0.51、0.53、12.31、0.27、8.24、1.06、39.08 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取样品粉末（过二号筛）约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，密塞，称定重量，超声处理（100 kHz，30 ℃）30 min，放置室温，再称定重量，用甲醇补足减少的重量，摇匀，过滤，滤液过 0.22 μm 滤膜，即得。

2.5 指纹图谱的建立及分析

2.5.1 精密度试验 取 S3 样品粉末，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，连续测定 6 次，测得各共有峰相对保留时间的 *RSD* 在 0.12% ～ 1.6%，

各共有峰相对峰面积的 *RSD* 在 0.36% ～ 2.2%，表明仪器精密度良好。

2.5.2　重复性试验　取 S3 样品粉末，按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，测得各共有峰相对保留时间的 *RSD* 在 0.18% ～ 1.4%，各共有峰相对峰面积的 *RSD* 在 0.83% ～ 3.0%，表明该方法重复性良好。

2.5.3　稳定性试验　取 S3 样品粉末，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12 和 24 h 进样测定，测得各共有峰相对保留时间的 *RSD* 在 0.33% ～ 1.3%，各共有峰相对峰面积的 *RSD* 在 0.91% ～ 2.8%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6　指纹图谱的建立

2.6.1　芦笋药材指纹图谱　取 43 批芦笋药材，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，进样测定，得到 43 批芦笋药材的 UPLC-MS 色谱峰，将色谱峰以 txt 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012.1 版本），以 S3 为参照图谱，以平均数法生成对照图谱，时间窗宽度设置为 0.1 min，经多点校正后进行色谱峰匹配，共标定 20 个共有峰。对照图谱及 43 批芦笋药材的 UPLC-MS 指纹图谱见图 1。

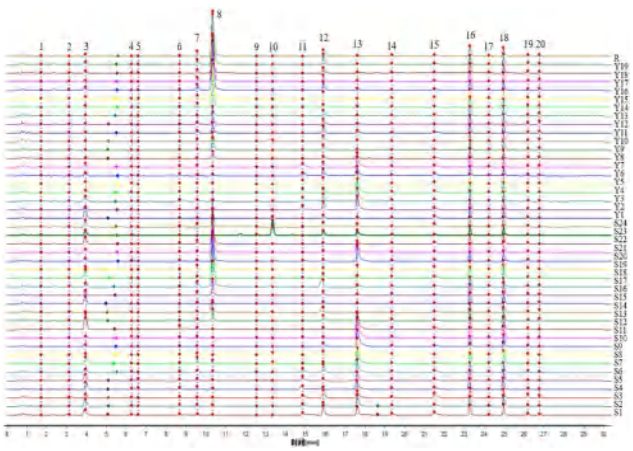


图 1　43 批样品指纹图谱及对照图谱

Fig 1　Fingerprint and control map of 43 batches of samples

2.6.2　共有峰的指认　通过质谱给出的碎片信息及与对照品的比较分析，共确定出 8 种成分，分别为 2 号峰（原儿茶酸）、4 号峰（香草酸）、7 号峰（阿魏酸）、8 号峰（芦丁）、9 号峰（柚皮苷）、10 号峰（橙皮苷）、12 号峰（肉桂酸）、13 号峰（原薯蓣皂苷），其中 12 号峰（肉桂酸）的峰面积稳定，分离度较好，保留时间适中，因此选择该峰为参照峰（S 峰）。

2.6.3　相似度评价　采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012.1 版本）测定 43 批芦笋药材相似度，结果见表 2。43 批芦笋药材相似度在 0.625 ～ 0.951。

表 2　43 批芦笋药材相似度

Tab 2　**Similarity of medicinal materials of 43 batches of asparagus**

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.825	S12	0.925	S23	0.951	Y10	0.905
S2	0.834	S13	0.848	S24	0.767	Y11	0.927
S3	0.798	S14	0.806	Y1	0.803	Y12	0.893
S4	0.820	S15	0.935	Y2	0.798	Y13	0.824
S5	0.806	S16	0.948	Y3	0.797	Y14	0.857
S6	0.810	S17	0.949	Y4	0.784	Y15	0.802
S7	0.771	S18	0.758	Y5	0.821	Y16	0.802
S8	0.849	S19	0.908	Y6	0.776	Y17	0.850
S9	0.842	S20	0.884	Y7	0.893	Y18	0.795
S10	0.749	S21	0.875	Y8	0.928	Y19	0.811
S11	0.736	S22	0.625	Y9	0.914		

2.7　化学模式识别分析

2.7.1　HCA　以 43 批芦笋药材 20 个共有峰的峰面积为变量，导入 SPSS 21.0 软件，聚类方法采用组间连接，以平方欧氏距离为测度进行 HCA 分析并绘制树状图 [24]，结果见图 2。树状图显示，当分类距离为 10 时，43 批芦笋药材可聚为 4 类，其中 S18、Y15、Y16、Y18、Y19 聚为一类；S16、S19、S20、S21、S23、Y13、Y14、Y17 聚为一类；S22 单独聚为一类；其余样品聚为一类，说明 43 批样品间质量上存在差异。

2.7.2　PCA　将 43 批芦笋药材 20 个共有峰的峰面积导入 SPSS 21.0 软件，将共有峰峰面积标准化，计算方差贡献率，以特征值＞ 1.0 为条件筛选主成分，提取的 6 个主成分方差贡献率依次为 28.494%、15.070%、12.892%、9.591%、6.621%、5.880%，累计方差贡献率为 78.548%，可以代表芦笋指纹图谱中 20 个共有峰的大部分信息。

2.7.3　OPLS-DA　基于 PCA 结果，将 43 批芦笋药材 20 个共有峰峰面积的标准化结果导入 SIMCA 14.1 软件，进行 OPLS-DA 分析，模型稳定性（R^2Y）为 0.857，预测力（Q^2）为 0.774，均大于 0.5，且两者的差值小于 0.2，表明 OPLS-DA 模型具有较好的稳定性和预测率 [24-26]。R^2 拟合直线和 Q^2 拟合直线在 Y 坐标轴的截距分别为 0.209 和－ 0.392，说明建立的模型可靠，不存在过度拟合现象，可以用于分析 43 批芦笋药材的组间差异。OPLS-DA 将 43 批芦笋药材大致分为两类，白芦笋被归为一类，绿芦笋被归为一类，结果与 HCA 结果基本一致，得分图见图 3。OPLS-DA 模型中，变量重要投影（VIP）值表明该变量对于分类的贡献率，VIP 值越大，对分类的贡献越大，通常以 VIP 值大于 1 的成分作为 43 批芦笋药材的差异性标志物 [27]。模型共筛选出 7 种成分作为样品间的差异性成分，VIP 大小排列顺序

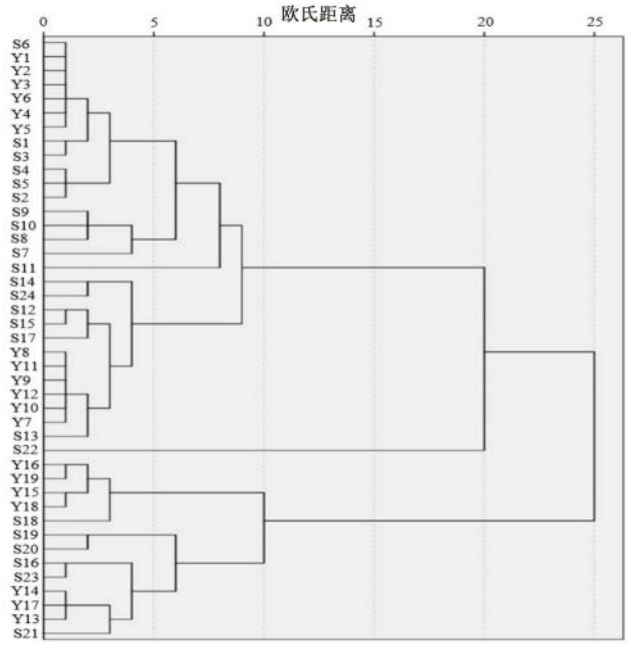


图 2 43 批芦笋层次聚类分析图

Fig 2 Hierarchical cluster analysis diagram of 43 batches of asparagus

为峰 11（1.810）＞峰 13（1.686）＞峰 4（1.601）＞峰 8（1.364）＞峰 2（1.335）＞峰 6（1.308）＞峰 10（1.230），其中峰 13 为原薯蓣皂苷，峰 4 为香草酸，峰 8 为芦丁，峰 2 为原儿茶酸，峰 10 为橙皮苷，峰 11、6 为未知峰。

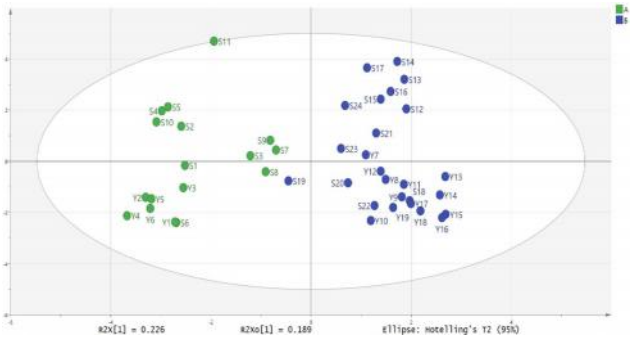


图 3 43 批芦笋 OPLS-DA 得分图

Fig 3 OPLS-DA score for 43 batches of asparagus

2.8 芦笋中 8 种成分含量测定

2.8.1 质谱条件 离子源为电喷雾离子源（ESI）；电离模式为负离子模式；多反应检测模式（MRM）；离子化电压（IS）－ 4500 V，离子化温度（TEM）550 ℃，喷雾器（Gas1）55 L • min^{-1}，气帘气（CUR）30 L • min^{-1}，喷撞气（CAD）7 L • min^{-1}，辅助加热气（Gas2）55 L • min^{-1}。优化条件参数见表 3。

2.8.2 专属性试验 取“2.3”项下混合对照品溶液和“2.4”项下供试品溶液，按“2.1”和“2.8.1”项下条件进样分析，结果各组分峰形良好，无干扰成分，方法的专属性良好。各待测组分的

表 3 芦笋药材中 8 种成分的质谱参数

Tab 3 Mass spectrum parameters of 8 components of asparagus

成分	保留时间 /min	MRM 参数			
		母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	碰撞能量 /eV	去簇电压 /V
原儿茶酸	3.18	152.9	108.9	－ 20	－ 50
香草酸	6.34	166.7	108.0	－ 27	－ 60
阿魏酸	9.66	192.9	133.9	－ 21	－ 60
芦丁	10.42	609.1	300.8	－ 50	－ 150
柚皮苷	12.60	579.1	271.1	－ 45	－ 190
橙皮苷	13.42	609.1	300.8	－ 35	－ 150
肉桂酸	16.09	146.9	103.0	－ 16	－ 40
原薯蓣皂苷	17.65	1047.4	901.5	－ 60	－ 180

MRM 图谱见图 4。

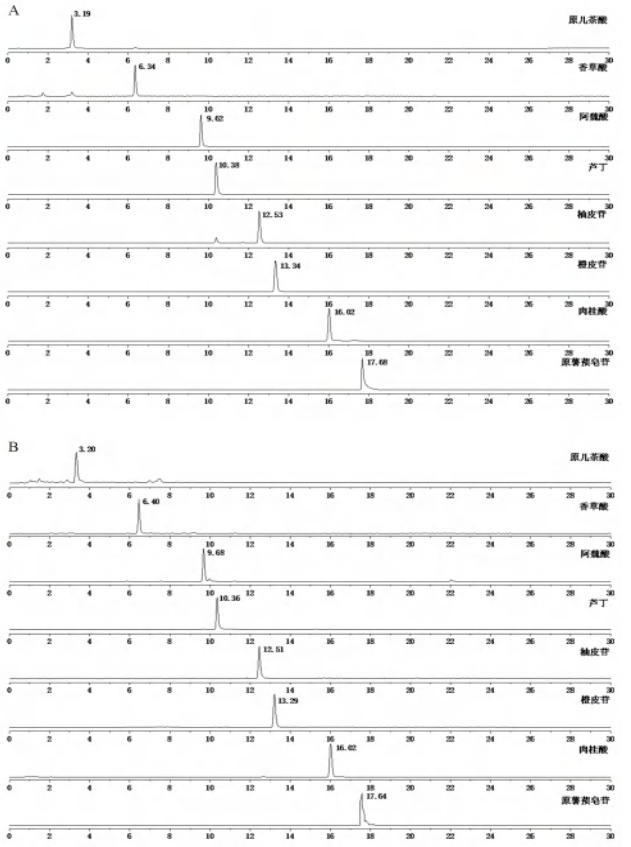


图 4 对照品（A）和供试品（B）的 MRM 色谱图

Fig 4 Multiple reaction monitoring（MRM）chromatogram of the standards（A）and sample（B）

2.8.3 线性关系考察 取“2.3”项下混合对照品溶液，以 50% 甲醇逐级稀释成系列质量浓度，按“2.1”和“2.8.1”项下条件进样测定，以对照品质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行回归分析，并计算回归方程与相关系数，各成分在相应范围内与峰面积线性关系良好，相关系数（*r*）在 0.9993 以上。详见表 4。

2.8.4 精密度试验 取“2.3”项下混合对照品溶

表 4 芦笋药材中 8 种成分的线性方程

Tab 4 Linear equation of 8 components in asparagus

成分	回归方程	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	*r*
原儿茶酸	$Y = 2.56\times10^4X + 8.65\times10^4$	2.0537 ～ 513.4135	0.9998
香草酸	$Y = 1.37\times10^4X + 2.17\times10^4$	2.0460 ～ 511.5000	0.9999
阿魏酸	$Y = 4.03\times10^4X + 2.33\times10^5$	2.1364 ～ 534.1050	0.9994
芦丁	$Y = 1.28\times10^4X + 6.74\times10^4$	12.3100 ～ 12 310.0000	0.9996
柚皮苷	$Y = 8.09\times10^3X + 6.22\times10^4$	1.0939 ～ 273.4752	0.9999
橙皮苷	$Y = 1.34\times10^4X + 5.96\times10^5$	8.2400 ～ 8240.0000	0.9996
肉桂酸	$Y = 2.90\times10^4X + 4.04\times10^5$	4.2563 ～ 1064.0760	0.9993
原薯蓣皂苷	$Y = 1.68\times10^3X + 1.50\times10^6$	390.8000 ～ 39 080.0000	0.9996

液，按“2.1”和“2.8.1”项下条件连续进样 6 次，测定峰面积，计算原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷峰面积的 *RSD* 分别为 1.4%、1.2%、2.8%、2.8%、1.6%、1.8%、0.66%、1.4%，表明仪器精密度良好。

2.8.5 稳定性试验 取 S3 样品粉末，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”和“2.8.1”项下条件分别在 0、2、4、8、12 和 24 h 进样测定，计算原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷峰面积的 *RSD* 分别为 1.2%、1.4%、1.7%、0.54%、1.9%、2.4%、2.6%、0.68%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8.6 重复性试验 取 S3 样品粉末，按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”和“2.8.1”项下条件进样测定，计算得原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷的平均含量分别为 1.9644、6.4386、3.3797、2.3397、0.2585、0.3441、52.2118、715.3371 μg•g^{-1}，*RSD* 分别为 3.5%、1.3%、1.8%、2.2%、3.8%、9.1%、1.9%、0.69%，表明该方法重复性良好。

2.8.7 加标回收试验 精密称取已知含量样品 S3 约 0.25 g，分别加入适量各单一对照储备液，按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”和“2.8.1”项下条件进样测定，计算得原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷的平均加样回收率为 119.35%、86.58%、80.23%、106.36%、101.88%、85.11%、84.34%、101.88%，*RSD* 分别为 0.36%、2.1%、1.7%、0.83%、3.3%、1.7%、0.66%、1.4%，表明方法回收率良好。

2.8.8 样品含量测定 取 43 批芦笋药材各 3 份，分别按“2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”和“2.8.1”项下条件进样测定，计算原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷的含量，结果见表 5。

3 讨论

3.1 样品前处理考察

试验前期分别对提取溶剂（30% 甲醇、60% 甲醇、甲醇、30% 乙醇、60% 乙醇、乙醇），提取方法（超声提取、加热回流提取），超声提取时间（15、30、45 min）进行考察，以色谱峰信息的多少、分离度、共有峰面积、峰形为考察指标，最终选择以甲醇为提取溶剂，超声提取 30 min 作为供试品的提取条件。

3.2 流动相选择

试验分别以甲醇 -0.05% 乙酸水、乙腈 -0.05% 乙酸水、甲醇 - 乙腈（1∶10）-0.05% 乙酸水、甲醇 - 乙腈（1∶10）-0.1% 甲酸水作为流动相，考察不同流动相体系下色谱图，结果显示以甲醇 - 乙腈（1∶10）-0.05% 乙酸水为流动相时，得到的谱图各色谱峰峰形与分离度较好，基线平稳，故选择该流动相作为试验分析条件。

3.3 指纹图谱与样品质量分析

芦笋指纹图谱相似度结果显示，除样品 S22 相似度结果为 0.625 外，其余 42 批样品相似度结果在 0.736 ～ 0.951，说明不同批次的样品间具有较高的一致性，建立的指纹图谱能够表征其绝大部分成分，具有专属性意义。

HCA 结果显示，当分类距离为 9 左右时，所有白芦笋聚为一类；绿芦笋聚为三类，白芦笋与绿芦笋之间、不同储存期限的绿芦笋间差异明显，即种植方式与储存期限是造成芦笋质量差异的原因。对绿芦笋的分类中，当分类距离减小时，S19、S20 可归于一类；S22 可归为一类；Y15、Y18 可归于一类，说明不同产地也是造成芦笋质量差异的原因，但由于来自江苏省的样本量极少，不具有代表性，因此不同省份的产地对芦笋质量差异的影响程度还有待于下一步证明。结合分类距离及分类结果，芦笋的种植方式、存储期限、产地是造成芦笋质量差异的原因，且种植方式的不同是造成芦笋质量差异的主要原因。PCA 和 OPLS-DA 结果从化学成分上进一步阐明了样品间质量差异的原因。PCA 筛选出 6 个主成分，说明引起样品间质量差异的原因并非单一成分，而是多种成分协同作用的结果；OPLS-DA 筛选出 7 种差异性成分，其中已知成分为原薯蓣皂苷、

表 5 43 批芦笋药材中 8 种成分含量测定结果 (μg·g^{-1}，n = 3)

Tab 5 Content of 8 components in 43 batches of asparagus (μg·g^{-1}，n = 3)

批号	原儿茶酸	香草酸	阿魏酸	芦丁	柚皮苷	橙皮苷	肉桂酸	原薯蓣皂苷
S1	1.8117	5.7822	5.0540	1.8706	0.9774	0.1750	60.2648	630.4710
S2	0.5751	5.8654	9.1195	7.9915	0.3903	1.1375	24.2789	995.9215
S3	1.9664	6.4386	3.3797	2.3397	0.2585	0.3441	52.2118	715.3371
S4	0.3778	5.7383	10.7433	5.3283	0.3718	0.9007	15.2644	899.1623
S5	0.4250	5.8063	8.5345	2.8746	0.2343	0.1935	12.4216	820.0472
S6	0.5673	2.0439	29.6468	23.2163	3.3402	28.6463	9.5182	1646.1620
S7	0.5355	1.4706	10.1371	0.0572	7.0509	46.3827	27.2666	1752.6674
S8	0.2545	0.9088	3.2642	3.7123	5.0461	2.7803	23.8978	2113.7087
S9	0.4723	11.0452	6.1872	0.0054	4.6971	2.0088	6.9906	2384.4689
S10	0.6041	4.0991	8.4125	0.0127	0.9084	0.1812	14.7740	1811.7015
S11	2.6829	2.5793	7.8092	93.7895	0.0842	22.0983	38.5717	71.0284
S12	2.1154	5.4341	4.3829	32.5138	0.3404	9.8573	34.3439	157.3368
S13	0.0872	2.7086	5.4615	26.0507	0.2119	6.9588	15.0972	0.5949
S14	0.2644	2.1571	15.4599	116.4134	0.5058	31.9620	23.6600	59.4973
S15	0.8009	2.7731	15.1933	210.2726	0.8009	60.4195	47.1065	87.6884
S16	0.8495	2.1438	6.6448	137.3707	1.7048	37.0947	34.2769	178.8782
S17	0.9415	1.3417	21.6540	527.1102	10.4682	245.5533	84.8560	310.9533
S18	1.5104	2.7195	3.8417	259.2580	1.6067	84.7056	11.2573	1306.0062
S19	1.6282	1.9434	5.4273	323.7747	12.2365	119.5324	12.0690	894.2574
S20	1.6784	2.6529	15.3017	292.6407	2.0294	99.8059	7.5383	193.5779
S21	1.2530	2.3928	0.4529	0.8873	17.3159	320.8445	34.7054	367.2034
S22	1.8450	2.9802	15.1496	220.1816	1.5558	63.5502	34.0390	313.4595
S23	0.3483	2.3070	1.4935	5.9307	4.4276	34.9777	23.6289	48.9483
S24	0.5706	2.0734	29.1991	23.0722	3.2721	28.4264	9.4388	1657.4530
Y1	0.5083	4.5774	6.3767	6.0915	0.1052	0.6228	58.2016	1265.5394
Y2	0.2733	4.8304	5.5576	10.4346	0.0809	1.2896	51.1997	1536.2732
Y3	0.2411	4.9712	3.3306	0.7472	0.3836	0.0439	30.8863	1303.2551
Y4	0.3156	6.9355	3.5923	6.8957	0.4286	0.3391	45.6848	1273.8628
Y5	0.0838	4.5002	3.4868	12.2598	0.2752	1.6239	51.6165	941.1241
Y6	0.2277	5.7673	6.2120	2.4225	0.2928	0.0881	33.1250	1392.4709
Y7	0.5399	1.5294	0.7646	49.5895	0.2355	10.6131	18.7146	114.8800
Y8	0.9273	1.5354	3.4634	104.1333	0.6051	23.5758	34.2819	30.2145
Y9	2.8973	2.7992	11.2118	62.3223	3.8890	45.8685	39.9021	9.7827
Y10	2.1531	1.9442	11.9717	77.4610	0.1808	18.6376	54.6151	115.0950
Y11	2.0801	2.6864	10.2995	93.5768	0.2037	20.9937	36.7171	42.4428
Y12	0.2712	2.2690	3.3727	65.4913	2.3666	26.9962	38.1501	0.1934
Y13	2.3963	0.8462	16.9152	357.9990	3.0162	132.8492	22.6370	46.0758
Y14	3.1222	1.0638	14.3409	319.4756	3.0990	116.2913	54.0776	14.5745
Y15	2.6540	1.1013	22.6668	471.1956	8.0036	205.2750	63.2778	124.6526
Y16	2.8206	1.3785	15.7665	431.4648	6.6947	178.6359	47.3534	42.3536
Y17	2.3763	1.3491	13.9144	331.4724	4.7193	118.0079	39.8470	7.2844
Y18	1.6654	1.1179	17.5097	500.2578	9.8014	216.4806	76.3322	29.8898
Y19	1.3513	1.1735	17.6893	415.9200	7.5298	167.7267	43.4411	17.5683

香草酸、芦丁、原儿茶酸、橙皮苷，未知峰 6、11 还有待进一步研究指认。

含量测定结果显示，芦丁、柚皮苷、橙皮苷 3 种黄酮类成分在白芦笋中的平均含量分别为 10.5911、1.4662、6.4033 μg·g^{-1}；在绿芦笋中平均含量分别为 209.8398、4.1085、93.2938 μg·g^{-1}；芦丁与橙皮苷在绿芦笋中的含量明显高于白芦笋，可能是因为绿芦笋在种植过程中受到光照的影响，更容易促进黄酮类成分的合成 [28]。原薯蓣皂苷在白芦笋中的平均含量为 1267.8354 μg·g^{-1}、在绿芦笋中平均含量为 237.3408 μg·g^{-1}，造成差异的原因可能是未出土生长的白芦笋需要分泌更多的皂苷来保护自己免受土壤中微生物、病原体、细菌和真菌的侵害 [29]。这说明芦丁、柚皮苷、原薯蓣皂苷在芦笋中的积累与种植方式相关，为不同种植方式芦笋中的主要差异性成分，与化学模式识别结果基本一致。

4 结论

本文建立了芦笋的 UPLC-MS 指纹图谱，并同时测定了原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、芦丁、柚皮苷、橙皮苷、肉桂酸、原薯蓣皂苷 8 种成分的含量，并结合化学模式识别分析，推测原薯蓣皂

苷、香草酸、芦丁、原儿茶酸、橙皮苷及两种未知成分为不同批次芦笋的差异性成分。所建方法快速、准确、可靠，可以用于芦笋的质量评价。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会 . 中华本草 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：71-73.

[2] 李紫珊，卫瑞，李震宇 . 芦笋茎皮喷雾干燥工艺优化及化学成分的超高效液相色谱 - 串联质谱分析 [J]. 天津农业科学，2022，28（12）：61-68.

[3] 黄家莉，唐红梅，凡彩凤，等 . 芦笋的营养保健作用及其加工研究进展 [J]. 食品安全导刊，2022（23）：122-125.

[4] 鞠玉栋 . 芦笋的化学成分及其药理作用 [J]. 中国园艺文摘，2011，27（2）：125-126.

[5] 贺超兴 . 中国芦笋产业发展现状与前景展望 [J]. 蔬菜，2022（5）：33-39.

[6] Bencheikh N，Elachouri M，Subhash CM. Ethnobotanical，pharmacological，phytochemical，and clinical investigations on Moroccan medicinal plants traditionally used for the management of renal dysfunctions [J]. J Ethnopharmacology，2022，292：115178.

[7] El beyrouthy M，Arnold N，Delelis-dusollier A，et al. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon [J]. J Ethnopharmacology，2008，123（3）：315-334.

[8] Kumar k，Sharma PY，Manhas R，et al. Ethnomedicinal plants of shankaracharya hill，srinagar，JK，India [J]. J Ethnopharmacology，2015，170：255-274.

[9] Paganelli F，Chiarini F，Palmieri A，et al. The combination of AHCC and ETAS decreases migration of colorectal cancer cells，and eeduces the expression of LGR5 and notch1 genes in cancer etem cells：a novel potential approach for integrative medicine [J]. Pharmaceuticals，2021，14（12）：1325.

[10] Romani A，Casciano F，Stevanin C，et al. Anticancer activity of aqueous extracts from *Asparagus officinalis* L. by product on breast cancer cells [J]. Molecules，2021，26（21）：6369.

[11] Zhang F，Ni ZJ，Ye L，et al. Asparanin A inhibits cell migration and invasion in human endometrial cancer via Ras/ERK/MAPK pathway [J]. Food Chem Toxicol，2021，150：112036.

[12] Zhu XL，Zhang W，Pang XF，et al. Hypolipidemic effect of *n*-butanol extract from *Asparagus officinalis* L. in mice fed a high-fat diet [J]. Phytother Res，2011，25（8）：1119-1124.

[13] Hafizur RM，Kabir N，Chishti S. Asparagus officinalis extract controls blood glucose by improving insulin secretion and *β*-cell function in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats [J]. Brit J Nutr，2012，108（9）：1586-1595.

[14] Zhao JJ，Zhang W，Zhu XL，et al. The aqueous extract of *Asparagus officinalis* L. by-product exerts hypoglycaemic activity in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Sci Food Agric，2011，91（11）：2095-2099.

[15] Sui ZF，Qi C，Huang YX，et al. Aqueous extracts from asparagus stems prevent memory impairments in scopolamine-treated mice [J]. Food Funct，2017，8（4）：1460-1467.

[16] 郑立新，蔡祥焜，吴玉平，等 . 芦笋提取物稳定性和缓解体力疲劳功能研究 [J]. 食品研究与开发，2021，42（1）：37-42.

[17] 高静云，段丽颖，赵胜男，等 . 基于 HPLC 指纹图谱评价不同产地山楂叶质量 [J]. 湖北民族大学学报（医学版），2023，40（3）：62-67，72.

[18] Tang ZN，Zhou KN，Wang PY，et al. Quality control and evaluation of Xiaozhong Zhitong tincture by multi-wavelength fingerprint combined with electrochemical fingerprint [J]. J Pharm Biomed Anal，2023，236：115712.

[19] 于密密，王安琪，杜小伟，等 . 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的痢泻灵片质量评价 [J]. 中成药，2023，45（9）：2846-2852.

[20] 曾维艳，陈肖，王洋，等 . 基于指纹图谱及非挥发性成分定量结合化学模式识别法评价不同产地艾叶质量 [J]. 中草药，2023，54（18）：6084-6091.

[21] 孙礼堂，刘明川，曹健，等 . 基于多指标定量指纹图谱和化学计量学的淫羊藿质量标准提高研究 [J]. 化学试剂，2023，45（11）：117-125.

[22] Li GT，Wang XR，Luo LF，et al. Identification of chemical constituents of Qingjin Yiqi granules and comparative study on pharmacokinetics of 23 main bioactive components in normal and Lung-Qi deficiency rats by UPLC-MS/MS method [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2023，1226：123802.

[23] 金林，周祖英，周家华，等 . UPLC-MS/MS 法同时测定透骨香中 6 种成分的含量 [J]. 中成药，2024，46（1）：22-28.

[24] 刘东升，姚世霞，朱旭江，等 . 四消丸 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（22）：2340-2345.

[25] 冯淼，王超纯，凌伟红，等 . 基于指纹图谱和化学模式识别评价杜仲叶质量 [J]. 中草药，2023，54（9）：2931-2939.

[26] 童欢，张明伟，张炳武，等 . 基于指纹图谱、含量测定和化学模式识别的五子衍宗丸质量评价研究 [J]. 药物分析杂志，2023，43（1）：103-112.

[27] 覃柳莹，梁丽金，胡懿，等 . 基于 UPLC 指纹图谱和网络药理学的当归炮制前后差异质量标志物研究 [J]. 中草药，2023，54（18）：5892-5903.

[28] Neugart S，Krumbein A，Zrenner R. Influence of light and temperature on gene expression leading to accumulation of specific flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives in kale（*Brassica oleracea* var. *sabellica*）[J]. Front Plant Sci，2016，7：32.

[29] You Y，Stephane L，Biao Y. Chemical synthesis of saponins [J]. Adv Carbohydr Chem Biochem，2014，71：137-226.

（收稿日期：2024-03-22；修回日期：2024-05-23）

基于标准汤剂的麸木香配方颗粒质量标准研究

吴美兰，包世寅，黄红霞，孙立恩*（浙江景岳堂药业有限公司，浙江 绍兴 312025）

摘要：目的 建立基于标准汤剂的麸木香配方颗粒质量标准。**方法** 以标准汤剂的出膏率、特征图谱、木香烃内酯和去氢木香内酯总含量为依据，制订麸木香配方颗粒的质量标准。对 15 批标准汤剂与 4 批配方颗粒进行相似度评价与化学模式识别。**结果** 15 批麸木香标准汤剂出膏率平均值为 54.4%；特征图谱含 11 个特征峰；木香烃内酯和去氢木香内酯总含量平均值为 1.50 mg • g^{-1}。控制麸木香配方颗粒出膏率在 40% ～ 65%，设定木香烃内酯和去氢木香内酯总含量限度为 0.40 ～ 1.52 mg • g^{-1}。麸木香配方颗粒特征图谱与标准汤剂对照特征图谱相似度均大于 0.95；主成分分析、热图聚类分析与偏最小二乘 - 辨别分析可有效区分不同产地标准汤剂，标准汤剂与同批次配方颗粒聚集性较好。**结论** 该研究可为配方颗粒质量标准的制订提供过程参考。

关键词：麸木香；标准汤剂；配方颗粒；质量标准；特征图谱；化学模式识别
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3014-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.029

Quality standard of bran *Radix Aucklandiae* formula granules based on standard decoction

WU Mei-lan, BAO Shi-yin, HUANG Hong-xia, SUN Li-en* (*Zhejiang Jingyuetang Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing Zhejiang* 312025)

Abstract: Objective To establish quality standard for bran *Radix Aucklandiae* formula granules based on standard decoction. **Methods** Based on the paste yield rate, characteristic spectra, costunolide and dehydrocostuslactone content in the standard decoction, the quality standard for bran *Radix Aucklandiae* formula granules was established. The similarity of 15 batches of standard decoctions and 4 batches of formula granules was evaluated and chemical patterns recognized. **Results** The average paste yield rate of the 15 batches of bran *Radix Aucklandiae* standard decoction was 54.4%, and 11 feature peaks were detected in the characteristic spectra. The average total content of costunolide and dehydrocostuslactone was 1.50 mg • g^{-1}. The yield rate of bran *Radix Aucklandiae* formula granules was controlled at 40% ～ 65%, and the total content limit of costunolide and dehydrocostuslactone was set at 0.40 ～ 1.52 mg • g^{-1}. Similarity between the characteristic spectra of bran *Radix Aucklandiae* formula granules and control characteristic spectra of standard decoction was greater than 0.95. By principal component analysis, heat-map clustering analysis, and partial least squares discriminant analysis, the standard decoctions from different origins were effectively distinguished. Fine aggregation was achieved in the standard decoction and formula granules in the same batch. **Conclusion** This study provides reference for the quality standard of formula granules.

Key words: bran *Radix Aucklandiae*; standard decoction; formula granule; quality standard; characteristic spectrum; chemical pattern recognition

基金项目：浙江省中医药管理局中药配方颗粒科研专项 [浙中医药〔2015〕25 号]。
作者简介：吴美兰，女，硕士，工程师，主要从事中药配方颗粒质量标准研究，email：863477429@qq.com *通信作者：孙立恩，男，副主任中药师，主要从事中药工艺与质量研究，email：sxadrsun@163.com

木香为 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根，经麸炒炮制后为麸木香，具有行气止痛、健脾消食功效，常用于治疗胸胁、脘腹胀痛、泻痢后重、食积不消、不思饮食[1]。现代药理学研究已从木香中分离到倍半萜类、单萜类、三萜类、糖苷类、蒽醌、黄酮等多种成分，具有调节胃肠功能、抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗过敏等作用[2-4]。为满足临床用药有效性、一致性需求，中药配方颗粒等现代中药剂型不断出新，但不同中药剂型间存在质量标准不明确、质量不均一、剂量不统一等问题[5]。中药饮片标准汤剂是以中医理论为指导、临床应用为基础，经标准化煎煮，固液分离，以及适当浓缩或适宜方法干燥制得。通过出膏率、含量、特征图谱、活性等指标来表征配方颗粒等中药制剂是否与传统汤剂一致[6-7]。

本研究以麸木香标准汤剂的出膏率、特征图谱、木香烃内酯和去氢木香内酯总含量为依据，制订基于标准汤剂的麸木香配方颗粒质量标准。利用相似度评价和主成分分析、热图聚类分析与偏最小二乘 - 辨别分析对多批次标准汤剂与配方颗粒进行一致性评价。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪（赛默飞，UltiMate 3000；岛津）；BT-125D 十万分之一电子天平（赛多利斯）；AE200 万分之一电子天平（梅特勒托利多）；JM-B5003 电子天平（宁波市纪铭称重设备有限公司）；30B2 煎药壶（康雅顺电器有限公司）；RE-52CS-1 旋转蒸发仪（上海亚荣仪器有限公司）；LGJ-10C 冷冻干燥机（北京四环科学仪器厂有限公司）；DL-480E 超声波清洗器（苏州江东精密仪器有限公司）；HHS-21-8 电热恒温水浴锅（上海添时科学仪器有限公司）。

1.2 试药

15 批木香药材经浙江景岳堂药业有限公司孙立恩副主任中药师鉴定为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根，经麸炒工艺炮制成麸木香饮片，4 批麸木香配方颗粒由本公司经水提、浓缩、干燥、制粒而得，详见表 1。木香对照药材（批号：120921-202010）、紫丁香苷（批号：111574-202106，含量：94.3%）、4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸（批号：111894-202205，含量：94.9%）、木香烃内酯（批号：111524-201911，含量：99.9%）、去氢木香内酯（批号：111525-201912，含量：99.5%）（中国食品药品检定研究院）。甲醇、乙腈（色谱纯，TEDIA）；其他所需试剂为分析纯。

表 1 木香药材、麸木香饮片及麸木香配方颗粒来源

Tab 1 Source of *Radix Aucklandiae* medicinal materials，bran *Radix Aucklandiae* slices and bran *Radix Aucklandiae* formula granules

编号	药材批号	饮片批号	颗粒批号	产地
S1	MXYC-01	MXYP-01	FMXKL-01	云南玉龙
S2	MXYC-02	MXYP-02	FMXKL-02	云南玉龙
S3	MXYC-03	MXYP-03	FMXKL-03	云南玉龙
S4	MXYC-04	MXYP-04	FMXKL-04	云南玉龙
S5	MXYC-05	MXYP-05		云南玉龙
S6	MXYC-06	MXYP-06		重庆南坪
S7	MXYC-07	MXYP-07		重庆南坪
S8	MXYC-08	MXYP-08		重庆南坪
S9	MXYC-09	MXYP-09		重庆南坪
S10	MXYC-10	MXYP-10		重庆南坪
S11	MXYC-11	MXYP-11		云南维西
S12	MXYC-12	MXYP-12		云南维西
S13	MXYC-13	MXYP-13		云南维西
S14	MXYC-14	MXYP-14		云南维西
S15	MXYC-15	MXYP-15		云南维西

2 方法与结果

2.1 麸木香配方颗粒特征图谱测定的研究

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Ultimate AQ C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；以乙腈为流动相 A，以 0.1% 磷酸为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 20 min，5% ～ 20%A；20 ～ 60 min，20% ～ 90%A；60 ～ 65 min，90% ～ 5%A）；流速 1.0 mL•min^{-1}；柱温 35 ℃；检测波长 225 nm，进样量 10 μL。

2.1.2 溶液的制备 ① 取木香对照药材 0.5 g，加水 25 mL，回流 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加 70% 甲醇 15 mL，超声处理 30 min，放冷，摇匀，滤过，滤液作为对照药材参照物溶液。② 取紫丁香苷、4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸、木香烃内酯、去氢木香内酯对照品适量，精密称定，加 70% 甲醇制成每 1 mL 依次含 21.86、27.13、21.37、22.10 μg 的混合溶液，作为对照品参照物溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取麸木香配方颗粒适量，研细，取约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 25 mL，称定重量，超声处理 30 min，放冷，再称定重量，用 70% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.4 方法学考察 所用供试品均为麸木香配方颗粒，批号为 FMXKL-01。

① 特征峰确认与归属：精密吸取供试品溶液、对照药材参照物溶液与对照品参照物溶液各 10 μL 注入色谱仪，记录色谱图，见图 1。供试品色谱图与麸木香对照药材色谱图基本一致，含 11 个特征峰，其中峰 2 为紫丁香苷，峰 6 为 4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸，峰 8 为木香烃内酯，峰 9 为去氢木香内酯，以峰 6 作为 S 峰。

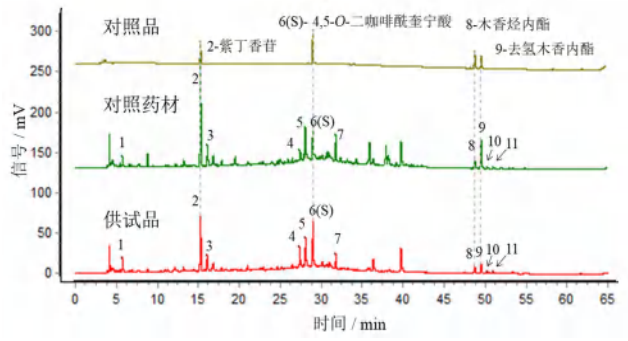


图 1 供试品、对照药材与对照品色谱图

Fig 1 Chromatogram of test substance, reference medicinal material and reference substance

② 进样精密度：精密吸取供试品溶液 10 μL，注入色谱仪，连续重复 6 次，计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间与相对峰面积，见表 2。各特征峰的相对保留时间 *RSD* 值＜ 1.6%，相对峰面积 *RSD* 值＜ 1.5%。

③ 稳定性：精密吸取供试品溶液 10 μL，分别于 0、3、6、9、12、18、24 h 依次进样测定，结果见表 2。各特征峰的相对保留时间 *RSD* 值＜ 1.7%，相对峰面积 *RSD* 值＜ 2.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

④ 重复性：精密称取同一批麸木香配方颗粒 6 份，制备供试品溶液，依法测定，结果见表 2。各特征峰的相对保留时间 *RSD* 值＜ 0.16%，相对峰面积 *RSD* 值＜ 2.3%，表明该方法重复性良好。

⑤ 中间精密度：由不同人员、不同日期、不同仪器检测同一批麸木香配方颗粒，结果见表 2。各特征峰的相对保留时间 *RSD* 值＜ 5.5%，相对峰面积 *RSD* 值＜ 5.1%，表明中间精密度结果良好。

表 2 麸木香配方颗粒特征图谱方法学结果

Tab 2 Methodological data for characteristic spectrum of bran *Radix Aucklandiae* formula granules

峰号	进样精密度（$n=6$）		稳定性（$n=7$）		重复性（$n=6$）		中间精密度（$n=3$）	
	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积
1	0.202	0.315	0.203	0.313	0.203	0.317	0.201	0.312
2	0.543	1.818	0.547	1.817	0.551	1.821	0.543	1.810
3	0.567	0.534	0.568	0.543	0.562	0.537	0.566	0.531
4	0.946	0.623	0.945	0.627	0.948	0.618	0.943	0.620
5	0.973	0.856	0.975	0.845	0.970	0.853	0.975	0.848
6（S）	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	1.095	0.349	1.096	0.350	1.093	0.355	1.094	0.351
8	1.670	0.318	1.675	0.314	1.670	0.317	1.669	0.307
9	1.695	0.409	1.697	0.413	1.694	0.415	1.694	0.406
10	1.723	0.088	1.722	0.086	1.720	0.086	1.723	0.088
11	1.745	0.081	1.741	0.080	1.743	0.081	1.747	0.079

2.1.5 测定方法 分别精密吸取对照药材参照物溶液、对照品参照物溶液与供试品溶液各 10 μL，注入色谱仪测定。

2.2 麸木香配方颗粒木香烃内酯和去氢木香内酯总含量测定的研究

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项下条件，理论板数按木香烃内酯峰计算应不低于 3000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取木香烃内酯、去氢木香内酯对照品适量，精密称定，加 70% 甲醇制成每 1 mL 分别含 21.37、22.10 μg 的混合对照品溶液，即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 同“2.1.3”项下方法。

2.2.4 方法学研究 所用供试品均为麸木香配方颗粒，批号为 FMXKL-01。

① 专属性：精密称取麦芽糊精 0.5 g，制成阴性供试品溶液，分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性供试品溶液注入色谱仪，记录色谱图，见图 2。结果表明木香烃内酯、去氢木香内酯色谱峰分离度良好，辅料对含量测定无影响。

② 进样精密度：精密吸取对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，测定峰面积。木香烃内酯峰面积的平均值为 6.3415，*RSD* 值为 2.5%；去氢木香内酯面积的平均值为 4.3444，*RSD* 值为 2.6%。

③ 线性与范围：配制质量浓度为 2.137、10.69、21.37、32.06、42.74 μg·mL^{-1} 的木香烃内酯对照品溶液，质量浓度为 2.210、11.05、22.10、33.14、44.19 μg·mL^{-1} 的去氢木香内酯对照品溶液，测定峰面积。结果木香烃内酯线性方程 $Y=0.2998X+0.0257$，$r=0.9999$，在 2.137 ～ 42.74 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好；去氢木香内酯线性方程 $Y=0.2044X-0.0145$，$r=0.9998$，在 2.210 ～ 44.19 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

④ 稳定性：精密吸取供试品溶液 10 μL，分别于 0、3、6、9、12、18、24 h 依次测定。木香烃内酯峰面积的平均值为 1.3490，*RSD* 值为 1.6%；去氢木香内酯峰面积的平均值为 1.8336，*RSD* 值为 3.1%。

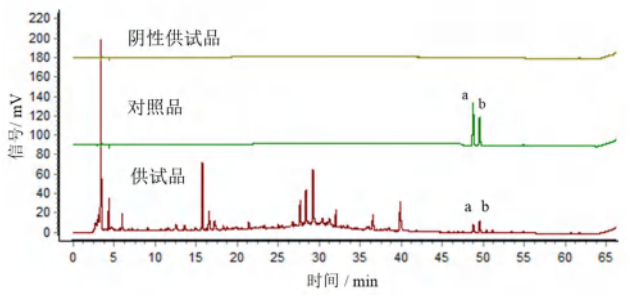


图 2　供试品、对照品与阴性供试品色谱图

Fig 2　Chromatogram of test substance, reference substance and negative test substance

a. 木香烃内酯（costunolide）；b. 去氢木香内酯（dehydrocostuslactone）

⑤ 重复性：取同一批麸木香配方颗粒 6 份，精密称取 0.5 g，制成供试品溶液，进样测定。结果木香烃内酯和去氢木香内酯总含量的平均值为 0.69 mg • g^{-1}，*RSD* 值为 1.2%。

⑥ 回收率：取木香烃内酯对照品溶液（53.43 μg•mL^{-1}）、去氢木香内酯溶液（110.48 μg•mL^{-1}）各 1.0 mL 加入锥形瓶中，挥干。再精密称取麸木香配方颗粒（木香烃内酯含量 0.24 mg • g^{-1}，去氢木香内酯含量 0.45 mg • g^{-1}）约 0.25 g，置上述锥形瓶中，依法制成供试品溶液，测定峰面积。重复操作 6 次。木香烃内酯回收率的平均值为 99.0%，*RSD* 值为 2.0%；去氢木香内酯回收率的平均值为 98.30%，*RSD* 值为 1.4%。

⑦ 中间精密度试验：由不同人员、不同日期、不同仪器检测同一批麸木香配方颗粒木香烃内酯和去氢木香内酯总含量。3 次测定结果分别为 0.69、0.66、0.68 mg • g^{-1}，*RSD* 值为 2.3%，表明该方法中间精密度结果良好。

2.3　麸木香标准汤剂的制备

依据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》、国家中医药管理局《医疗机构中药煎药室管理规范》《中药饮片标准汤剂》，结合麸木香药性、药用部位、吸水性，对煎煮时间、加水倍数进行单因素考察，每组平行两次，实验设计与结果见表 3。加水倍数固定，随着煎煮时间增加，木香烃内酯和去氢木香内酯总含量明显降低，组 3 较组 1 下降率为 20.8%；出膏率则缓慢增加，组 3 较组 1 上升率为 5.3%。煎煮时间固定，第一次加 12 倍量水，第二次加 10 倍量水时，出膏率、成分总含量均较高。确定麸木香标准汤剂制备方法如下：采用煎药壶模拟传统煎煮方法，取麸木香饮片 100 g，加水煎煮两次，第一次加 12 倍量水，浸泡 30 min，煎煮 30 min，第二次加 10 倍量水，煎煮 20 min。趁热过滤，合并两次滤液，60 ℃减压浓缩至约 100 g。取适量浓缩液冷冻干燥成标准汤剂冻干粉。

表 3　不同工艺制备的麸木香标准汤剂出膏率和成分总含量

Tab 3　Paste rate and total content of bran *Radix Aucklandiae* standard decoction obtained by different processes

工艺编号	提取时间 /min		加水倍数 / 倍		出膏率 /%	总含量 /（mg • g^{-1}）
	第一次	第二次	第一次	第二次		
1	30	20	8	6	54.4	1.01
2	60	30	8	6	56.4	0.92
3	90	60	8	6	57.3	0.80
4	30	20	10	8	55.3	1.25
5	30	20	12	10	56.6	1.38

2.4　麸木香标准汤剂质量属性的研究

2.4.1　麸木香标准汤剂的出膏率与指标成分含量

按照“2.3”项下确定的麸木香标准汤剂制备工艺，将 15 批麸木香饮片依次制备成 15 批次的麸木香标准汤剂，每组平行两次，并计算出膏率。参照麸木香配方颗粒含量测定、特征图谱方法测定标准汤剂中木香烃内酯和去氢木香内酯总含量，见表 4。15 批标准汤剂出膏率平均值为 54.4%，木香烃内酯和去氢木香内酯总含量平均值为 1.50 mg • g^{-1}。

表 4　麸木香标准汤剂的出膏率与指标成分含量结果

Tab 4　Paste rate and index component content of bran *Radix Aucklandiae* standard decoction

编号	标准汤剂批号	出膏率 /%	总含量 /（mg • g^{-1}）
S1	MXBZTJ-01	49.7	1.83
S2	MXBZTJ-02	59.0	1.10
S3	MXBZTJ-03	59.7	1.08
S4	MXBZTJ-04	59.9	1.15
S5	MXBZTJ-05	55.2	1.95
S6	MXBZTJ-06	58.4	1.51
S7	MXBZTJ-07	48.6	1.25
S8	MXBZTJ-08	57.9	1.67
S9	MXBZTJ-09	58.6	1.75
S10	MXBZTJ-10	50.9	1.47
S11	MXBZTJ-11	54.8	1.76
S12	MXBZTJ-12	53.2	1.25
S13	MXBZTJ-13	54.6	1.44
S14	MXBZTJ-14	46.6	1.50
S15	MXBZTJ-15	48.6	1.44
平均值		54.4±4.6	1.50±0.27
RSD/%		8.37	18.58

15 批麸木香标准汤剂出膏率 $\bar{x}\pm3SD$ 为 40.7% ～ 68.0%，为保证制备的配方颗粒中辅料加入量不超过药粉的 100%，出膏率范围内控为 40% ～ 65%，添加饮片量 15% ～ 40% 辅料，换算取整后确定工艺为 1200 g 饮片制成 1000 g 配方颗粒。假设将 15 批麸木香饮片分别制备成 1000 g 配方颗粒，依据干浸膏量和辅料量，计算颗粒中木香烃内酯和去氢木香内酯总含量，见表 5。15 批麸木香配方颗粒中成分总含量平均值为 0.96 mg • g^{-1}，70% ～ 130% 平均值为 0.67 ～ 1.25 mg • g^{-1}，$\bar{x}\pm3SD$ 为 0.40 ～ 1.52

mg • g^{-1}。由于实际生产中浓缩时间长，木香烃内酯、去氢木香内酯热稳定性差，因此选择范围更广的 0.40 ～ 1.52 mg • g^{-1} 作为含量限度。

表 5 麸木香饮片制备成配方颗粒的理论数据

Tab 5 Theoretical data on preparation of formula granules from bran *Radix Aucklandiae* slices

编号	干浸膏量 / g	辅料量 / g	总含量 /（mg • g^{-1}）
FMXBT-01	596.4	403.6	1.09
FMXBT-02	708.0	292.0	0.78
FMXBT-03	716.4	283.6	0.77
FMXBT-04	718.8	281.2	0.83
FMXBT-05	662.4	337.6	1.29
FMXBT-06	700.8	299.2	1.06
FMXBT-07	583.2	416.8	0.73
FMXBT-08	694.8	305.2	1.16
FMXBT-09	703.2	296.8	1.23
FMXBT-10	610.8	389.2	0.90
FMXBT-11	657.6	342.4	1.16
FMXBT-12	638.4	361.6	0.80
FMXBT-13	655.2	344.8	0.94
FMXBT-14	559.2	440.8	0.84
FMXBT-15	583.2	416.8	0.84
平均值	652.6	347.4	0.96
SD 值 /%	54.63	54.63	0.19

2.4.2 麸木香标准汤剂的特征图谱 15 批图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版，见图 3A，自动匹配生成标准汤剂对照谱图，见图 3B。依据标准汤剂数据，规定麸木香配方颗粒特征图谱各特征峰相对保留时间应为：0.207（峰 1）、0.541（峰 2）、0.573（峰 3）、0.948（峰 4）、0.972（峰 5）、1.000（峰 6）、1.091（峰 7）、1.665（峰 8）、1.692（峰 9）、1.719（峰 10）、1.744（峰 11），见图 3C。

2.5 麸木香配方颗粒质量属性的研究

2.5.1 麸木香配方颗粒的含量测定 取 4 批次麸木香配方颗粒依法测定木香烃内酯和去氢木香内酯总含量，结果依次为 0.69、0.56、0.54、0.54 mg • g^{-1}，符合 0.40 ～ 1.52 mg • g^{-1} 的规定。

2.5.2 麸木香配方颗粒的特征图谱测定 取 4 批次麸木香配方颗粒依法测定特征图谱，结果见图 3C 与表 6。4 批样品各特征峰相对保留时间均在规定值 ±10% 范围内，1 ～ 11 号特征峰的平均相对保留时间分别为 0.204、0.539、0.567、0.947、0.971、1.000、1.095、1.668、1.695、1.723、1.748。

2.6 麸木香配方颗粒与标准汤剂一致性研究

2.6.1 相似度评价 15 批麸木香标准汤剂特征图谱与对照特征图谱相似度依次为 0.988、0.994、0.993、0.994、0.998、0.966、0.932、0.957、0.959、0.935、0.997、0.975、0.985、0.979、0.997。4 批麸木香配方颗粒与标准汤剂对照特征图谱相似度依次为 0.969、0.958、0.958、0.953，均大于 0.95。说明不同产地麸木香标准汤剂的一致性较好，麸木香配方颗粒的特征信息也与标准汤剂较为一致。

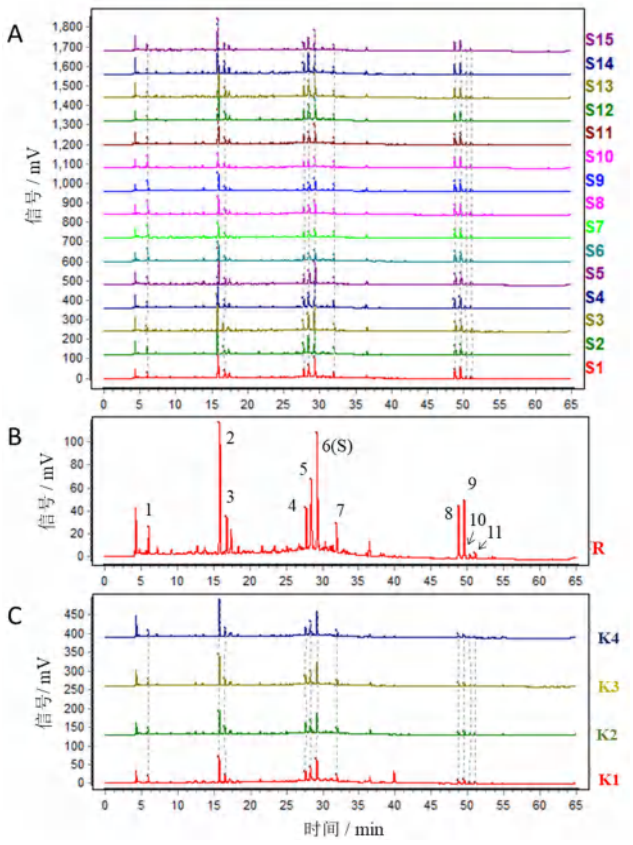


图 3 麸木香标准汤剂特征图谱（A）、对照特征图谱（B）与配方颗粒（C）特征图谱

Fig 3 Standard decoctions（A），control（B），and formula granules（C）characteristic spectrum of bran *Radix Aucklandiae*

2.6.2 主成分分析（PCA） 以 15 批麸木香标准汤剂和 4 批配方颗粒为样本，以特征图谱 11 个色谱峰的相对峰面积为变量，通过 SIMCA 13.0 软件进行 PCA。模型累计占比 R^2X 为 0.932，累计预测率 Q^2 为 0.742。结果见图 4，S1 ～ S5、S11、S15、K1 ～ K4 聚为第一类，S6 ～ S10 聚为第二类，S12 ～ S14 聚为第三类。说明 PCA 基本能区分出重庆和云南的产地区别，配方颗粒与相对应标准汤剂聚集性较好。

2.6.3 热图聚类分析（HP-CA） 通过微生信可视化软件，对数据进行 Z-score 转化，以 Ward 为聚类方法，以欧氏距离方法，进行 HP-CA，见图 5。样本聚类结果显示 S1 ～ S5、S11、S15、K1 ～ K4 聚为第一类，S6 ～ S10 聚为第二类，S12 ～ S14 聚为第三类，与 PCA 结果一致。特征峰聚类结果显示 2 号峰颜色为深红色，单独聚为

表 6　麸木香配方颗粒特征图谱的相对峰面积

Tab 6　Relative peak area of characteristic spectrum of bran *Radix Aucklandiae* formula granules

编号	峰号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
K1	0.317	1.815	0.537	0.629	0.856	1.000	0.350	0.314	0.400	0.089	0.080
K2	0.294	1.538	0.490	0.559	0.779	1.000	0.283	0.237	0.298	0.074	0.061
K3	0.305	1.880	0.443	0.522	0.725	1.000	0.228	0.252	0.245	0.048	0.043
K4	0.256	2.030	0.447	0.391	0.740	1.000	0.235	0.239	0.213	0.027	0.030
平均值	0.293	1.816	0.479	0.525	0.775	1.000	0.274	0.261	0.289	0.059	0.053
RSD/%	8.94	11.33	9.22	19.03	7.53	0.00	20.60	13.95	28.27	45.77	40.59

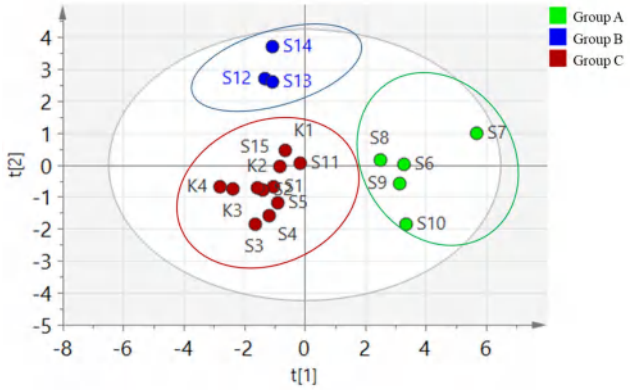


图 4　麸木香标准汤剂与配方颗粒的主成分分析

Fig 4　PCA of standard decoctions，formula granules of bran *Radix Aucklandiae*

一类，说明对样本的区分具有重要贡献。5、6、8、9 号峰聚为一类，其中样本聚为同一类的该处颜色深浅较一致，说明该类特征峰大小对样本的分类具有较大价值。剩余的 1、3、4、7、10、11 号峰聚为一类。

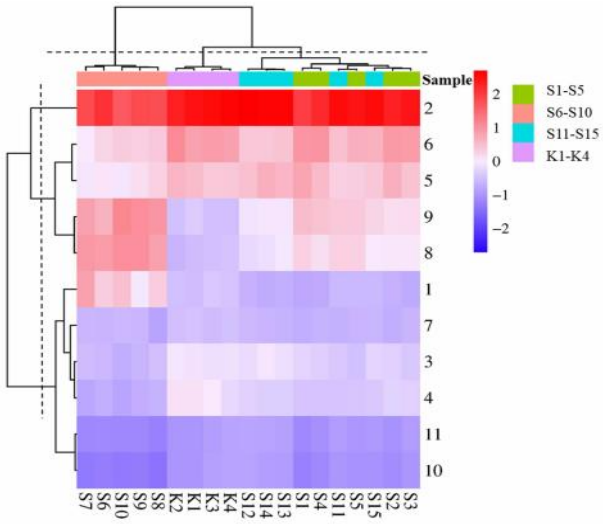


图 5　麸木香标准汤剂与配方颗粒的热图聚类分析

Fig 5　HP-CA of standard decoctions and formula granules of bran *Radix Aucklandiae*

2.6.4　偏最小二乘 - 辨别分析评价（PLS-DA）　通过 SIMCA 13.0 软件建立 PLS-DA 模型，R^2X 为 0.935，Q^2 为 0.789，略优于 PCA 模型。PLS-DA 模型的 PCA

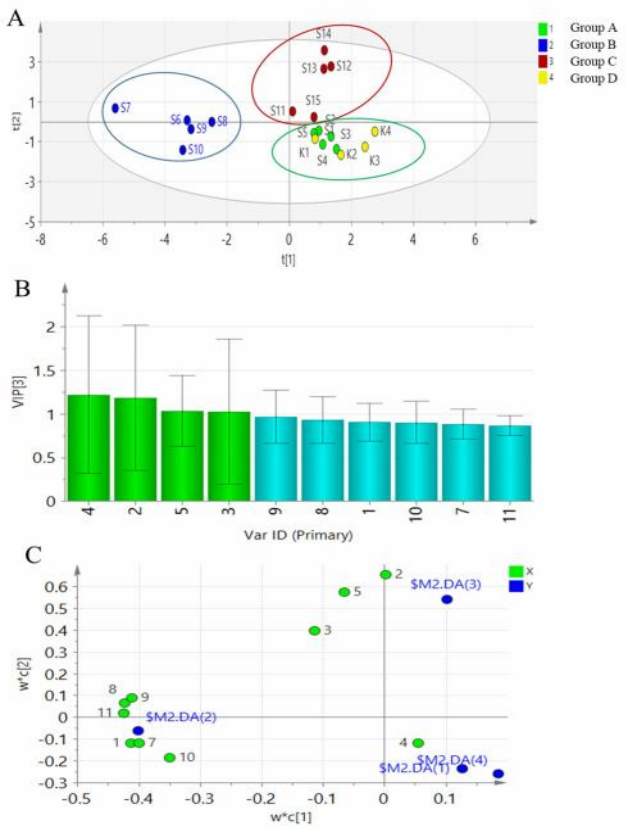


图 6　麸木香标准汤剂与配方颗粒的偏最小二乘 - 辨别分析

Fig 6　PLS-DA of standard decoctions and formula granules of bran *Radix Aucklandiae*

A. 主成分分析（PCA）；B. VIP 参数分析（VIP parameter analysis）；C. 载荷图（loading plot）

见图 6A，S1 ～ S5 聚为第一类，S6 ～ S10 聚为第二类，S11 ～ S15 聚为第三类。PLS-DA 能准确区分麸木香标准汤剂产地，S11 与 S15 能划分正确，优于 PCA 结果。K1 ～ K4 配方颗粒与相对应标准汤剂聚为一类，说明配方颗粒提取、浓缩、干燥、制粒工艺可行，各特征峰所代表物质基础与标准汤剂一致。

PLS-DA 模型的投影 VIP 参数分析见图 6B，以变量的 VIP ＞ 1 为评价标准，2 ～ 5 号峰是形成差异的标志性成分，是影响麸木香质量的主要潜在标志物。PLS-DA 模型载荷图见图 6C，对主成分 1 影响最大的是特征峰 1、7、8、9、11。结

合上述的分析可以发现云南麸木香标准汤剂峰 1、7、8、9、11 的相对峰面积明显大于重庆麸木香标准汤剂。

3 讨论

3.1 标准汤剂工艺对配方颗粒制备的指导

中药标准汤剂的制备工艺应符合中医药理论，先煎、后下、包煎、单煎、烊化等制备方式的选择应与饮片功能主治、性味归经、部位、性质等相匹配。滋补类饮片煎煮时间可增加；气味芳香解表类饮片煎煮时间应降低；种子类或质地坚硬饮片可适当破碎等 [8-9]。麸木香属于气味芳香解表类饮片，含有萜类成分，优化所得标准汤剂制备工艺的两次煎煮时间为 30 min、20 min，出膏率和木香烃内酯和去氢木香内酯总含量基本稳定。配方颗粒制备工艺应按照标准汤剂质量进行优化，使出膏率、指标成分含量接近标准汤剂主要指标范围 [10]。

3.2 标准汤剂对配方颗粒质量标准制订的指导

制订配方颗粒含量指标首先选择具有代表性的指标成分，既能体现配方颗粒有效性，又能满足含量测定可行性。然后根据不同批次标准汤剂情况，选择含量 $\bar{x}\pm3SD$ 或 70% ～ 130% 平均值作为标准汤剂含量范围。最后根据配方颗粒制备工艺制订配方颗粒含量范围。倍半萜类内酯化合物木香烃内酯和去氢木香内酯是木香主要活性成分，两者总含量也是《中国药典》2020 年版中木香含量测定项，可作为麸木香配方颗粒含量测定指标 [11-12]。研究过程中发现这两个成分水溶性较差，且长时间受热易分解，故选择范围更广的 $\bar{x}\pm3SD$ 范围。后期可加入对 4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸以及紫丁香苷的研究，这两种成分水溶解性较好，且也具有抗炎、护肝等药理作用 [13]。

3.3 配方颗粒与标准汤剂一致性的评价

配方颗粒与标准汤剂一致性主要体现在出膏率、指标成分含量、特征图谱等方面，可通过范围比较、相似度评价、化学模式识别描述两者间的一致性程度。现有文献多数是对多批次标准汤剂进行化学模式识别，本研究对 15 批麸木香标准汤剂与 4 批配方颗粒的特征图谱一起进行了 PCA、HP-CA 与 PLS-DA[14-15]。结果显示化学模式识别可有效区分不同产地标准汤剂，并进一步说明所制备的麸木香配方颗粒在物质基础与标准汤剂具有较好一致性。

4 小结

本研究通过麸木香标准汤剂出膏率、特征图谱、木香烃内酯和去氢木香内酯总含量一致性，详细阐明了如何基于标准汤剂建立麸木香配方颗粒质量标准的研究过程。并结合化学模式识别从多维度衡量配方颗粒与标准汤剂的一致性，为配方颗粒质量控制与标准制订提供参考依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：63.

[2] 郑加梅，尚明越，王嘉乐，等 . 木香的化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测 [J]. 中草药，2022，53（13）：4198-4213.

[3] Li XR，Ma JY，Xu XM，et al. Sesquiterpene lactones-rich fraction from *Aucklandia lappa* Decne. alleviates dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis through co-regulating MAPK and Nrf2/Hmox-1 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol，2022，24（295）：115401.

[4] Cai XW，Yang CP，Qin GW，et al. Antimicrobial effects and active compounds of the root of *Aucklandia Lappa* Decne（Radix Aucklandiae）[J]. Front Chem，2022，10：872480.

[5] 郭明星，吴诚，童卫杭 . 中药配方颗粒和中药汤剂等效性研究进展 [J]. 中国现代中药，2016，18（9）：1107-1110.

[6] 陈士林，刘安，李琦，等 . 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志，2016，41（8）：1367-1375.

[7] 任晶，刘俊潼，鄢必新，等 . 槐米药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究及量值传递分析 [J]. 中南药学，2024，22（1）：129-133.

[8] 毛明强，翟艳敏，封亮，等 . 基于汤剂煎煮特征的中药配方颗粒制备技术发展与应用 [J]. 世界中医药，2020，15（15）：2228-2233.

[9] 王龙，高鑫，闫信豪，等 . 中药配方颗粒研发生产中若干关键问题研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（9）：2008-2014.

[10] 钟文峰，张兰兰，胡懿，等 . 甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱相关性研究 [J]. 中南药学，2022，20（9）：2123-2128.

[11] 王阳，范潇晓，杨军，等 . 木香的萜类成分与药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（24）：5917-5928.

[12] 安劼，牛辰瑾，曲佳，等 . HPLC 法测定越鞠保和丸中苍术素、木香烃内酯和去氢木香内酯的含量 [J]. 天津药学，2023，35（1）：17-21.

[13] 王晨虹，商烨，周蕊，等 . 超高效液相色谱法同时测定川木香中紫丁香苷、木香烃内酯和去氢木香内酯含量 [J]. 天津中医药，2022，39（12）：1589-1594.

[14] 曹桂云，宁波，秦金淼，等 . 基于标准汤剂的秦皮（白蜡树）配方颗粒质量标准分析 [J]. 中国实验方剂学志，2023，29（13）：122-129.

[15] 曹桂云，宁波，庄雪松，等 . 基于标准汤剂的蔓荆子配方颗粒质量标准研究 [J]. 中成药，2023，45（8）：2484-2493.

（收稿日期：2024-01-02；修回日期：2024-03-10）

UPLC-MS/MS 法检测定量干血斑中三种抗真菌药物

厉圣斌[1, 3]，刘博宇[2]，姚婉清[1]，罗盼超[1]，谢义政[1]，黄欣欣[1]，袁晶华[1]，蔡增轩[3*]，陈启[1*]（1. 浙江树人学院，杭州 310015；2. 北京大学人民医院，北京 100044；3. 浙江省疾病预防控制中心，杭州 310051）

摘要：目的 建立一种基于液相色谱串联四极杆质谱联用法同时检测定量干血斑中伏立康唑、泊沙康唑、艾沙康唑的方法。**方法** 将含有 10 μL 末梢血的干血斑完整转移至试管中，经含有同位素内标的 70% 乙腈水溶液萃取，采用 C18 反相色谱柱作为固定相，含 0.1% 甲酸的超纯水和甲醇作为流动相进行色谱分离，采用电喷雾正离子电离，在多反应监测模式下进行检测。**结果** 伏立康唑、泊沙康唑在 0.050 ～ 2.5 μg • mL^{-1} 内，艾沙康唑在 0.10 ～ 5.0 μg • mL^{-1} 内与测定值线性关系良好，线性相关系数（r）均大于 0.99；各浓度的批内与批间精密度 *RSD* ＜ 5.3%，提取回收率为 92.1% ～ 104.3%；伏立康唑和泊沙康唑的检测限均为 0.050 μg • mL^{-1}，艾沙康唑的检测限为 0.10 μg • mL^{-1}；在 45 ℃极端环境保存 7 d 的条件下稳定。**结论** 该方法可同时对三种抗真菌药物进行准确、精密的定量检测；干血斑样本稳定性好，能够在非温控条件下采用普通快递进行运输，适用于远程医疗中的样本采集和运输，有效降低医疗成本，提高药学服务的可及性。

关键词：定量干血斑；液相色谱串联质谱法；治疗药物浓度监测；伏立康唑；泊沙康唑；艾沙康唑
中图分类号：R927，R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3021-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.030

Quantification of three antifungal drugs in dry blood spots by UPLC-MS/MS

LI Sheng-bin[1, 3], LIU Bo-yu[2], YAO Wan-qing[1], LUO Pan-chao[1], XIE Yi-zheng[1], HUANG Xin-xin[1], YUAN Jing-hua[1], CAI Zeng-xuan[3*], CHEN Qi[1*] (1. *Zhejiang Shuren University*, *Hangzhou* 310015; 2. *Peking University People's Hospital*, *Beijing* 100044; 3. *Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention*, *Hangzhou* 310051)

Abstract: Objective To simultaneously quantify voriconazole, posaconazole, and isavuconazole in dry blood spots with liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Dry blood spots of 10 μL capillary blood were transferred intactly to tubes and extracted with 70% acetonitrile water solution containing isotopic internal standards. Chromatographic separation conducted on C18 reversed-phase column with 0.1% formic acid in water and methanol as the mobile phase. Performed with positive electrospray ionization in multiple reaction monitoring mode was used in the detection. **Results** Voriconazole and posaconazole at 0.050 ～ 2.5 μg • mL^{-1}, and isavuconazole at 0.10 ～ 5.0 μg • mL^{-1} showed good linearity (correlation coefficients r ＞ 0.99). The intra-batch and inter-batch precision *RSD* at all concentrations ＜ 5.3%, and spiked recoveries ranged from 92.1% to 104.3%. The limits of detection were all 0.050 μg • mL^{-1} for voriconazole and posaconazole, and 0.10 μg • mL^{-1} for isavuconazole. The analytes were stable under extreme conditions at 45 ℃ for 7 days. **Conclusion** The three antifungal drugs are quantified with high accuracy and precision with the present method. Dry blood spot samples are stable, allowing for fast transportation without temperature-controlled. It is feasible for remote sample collection and transportation, this reducing healthcare cost and improving the accessibility of pharmaceutical service.
Key words: quantitation of dry spot; UPLC-MS/MS; therapeutic drug monitoring; voriconazole; posaconazole; isavuconazole

基金项目：浙江省基础公益研究计划（No. LTGC23H200001）；浙江省大学生科技创新活动计划（No. 2022R421A032）。
作者简介：厉圣斌，男，主要从事医学检验技术研究，email：shengbinli@foxmail.com *通信作者：陈启，男，副教授，主要从事治疗药物浓度监测技术研究，email：chenqi@zjsru.edu.cn；蔡增轩，男，副研究员，主要从事质谱检测技术研究，email：zxcai@cdc.zj.cn

伏立康唑、泊沙康唑、艾沙康唑是目前临床常用的三种抗真菌药物。它们不仅用于侵袭性真菌病的治疗[1]，还可用于真菌病的预防[2]。其中，伏立康唑是最广泛使用的抗真菌药物[3]，然而，由于其非线性药代动力学特性[4]，可能导致治疗效果不佳[5]或毒性反应[6]，且易与其他药物产生相互作用，因此需要在治疗药物浓度监测（therapeutic drug monitoring，TDM）指导下进行用药调整。泊沙康唑和艾沙康唑为新一代的抗真菌药物，尽管它们在药物安全性方面有所提升，但仍需要根据 TDM 指导合理用药[7]。

由于缺乏商品化抗体，目前尚无针对上述三种抗真菌药物的免疫学检测方法。临床抗真菌药物多采用液相色谱法[8]和液质联用法[9-11]进行 TDM，其中液质联用法是我国目前主要的一种检测方法[12]。然而，液质联用法的仪器价格昂贵、对人员素质要求高，仅能在大型三甲医院的高水平实验室中使用。其他医院需要借助专业冷链物流对血液样本进行转运，增加了成本，且检测结果反馈滞后，不能及时调整给药剂量。

定量干血斑技术（quantitative dried blood spots，qDBS）是一种新型的 TDM 技术[13]。该技术继承了干血斑技术的化学稳定性和低生物安全风险的优点，可以通过邮政、快递等非专业医疗冷链物流传递样本；此外，该技术通过毛细管定量采集（10±0.5）μL 末梢血，转移至滤纸上形成血斑，预处理时对完整血斑进行萃取，可以保证样本体积的准确性，足以满足 TDM 在定量检测方面的需求。该技术不仅解决了医院间样本传递的问题，也为患者提供了便利的居家采集方式。该技术已经成功地应用于他克莫司、霉酚酸等与器官移植术后用药相关的领域[14]，但在抗真菌药物领域尚无深入研究。

因此，本研究拟开发并验证一种适合于定量干血斑的伏立康唑、艾沙康唑、泊沙康唑的检测方法，重点优化仪器条件和萃取方法，以保证能同时检测具有各种不同理化性质的药物。此外，为验证在常规物流条件下的样本稳定性，本研究模拟极端环境下的运输条件开展了稳定性试验。本研究将为抗真菌药物的临床精准用药提供一种快速简便、准确可靠的检测手段，能够提高临床药学服务的可及性。

1 材料

1.1 仪器

Xevo TQXS 型液相色谱串联三重四极杆质谱联用仪（美国沃特世公司）；BSA124S 型电子天平（d = 0.1 mg，德国赛多利斯公司）；5424R 型高速冷冻离心机（德国艾本德公司）；VM-500S 型涡旋仪（浙江群安科学仪器有限公司）；DRP-9272 型电热恒温培养箱（上海森信实验仪器有限公司）；Milli-Q 纯水机（美国密理博公司）；WB410 型定量干血斑采集卡（杭州谱胜检测科技有限责任公司）。

1.2 试药

对照品：伏立康唑（批号：100862-201903，纯度：99.8%，中国食品药品检定研究院）；泊沙康唑（批号：D1019A，纯度：99%，上海博飞美科化学科技有限公司）；艾沙康唑（批号：C16159159，纯度：98%，上海麦克林生化科技股份有限公司）；同位素内标 $^{2}H_{3}$-伏立康唑、$^{2}H_{4}$-泊沙康唑和 $^{2}H_{4}$-艾沙康唑 [曼哈格（上海）生物科技有限公司]；空白全血由北京大学人民医院提供；色谱纯甲醇、乙腈、甲酸（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。超纯水由 Milli-Q 纯水机制备。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制与加标干血斑的制备

将伏立康唑、泊沙康唑、艾沙康唑、$^{2}H_{3}$-伏立康唑、$^{2}H_{4}$-泊沙康唑和 $^{2}H_{4}$-艾沙康唑用甲醇溶解后，均配制成 1 mg·mL^{-1} 的储备液。分别取 $^{2}H_{3}$-伏立康唑、$^{2}H_{4}$-泊沙康唑和 $^{2}H_{4}$-艾沙康唑内标储备液各 32、32 和 64 μL 于 EP 管中，加入 872 μL 甲醇，配制成内标混合储备液；随后取 10 μL 内标混合储备液，加入 9990 μL 乙腈 - 水溶液（70∶30，*V/V*），即配制成含量为 32、32 和 64 ng·mL^{-1} 的内标工作液。

取伏立康唑、泊沙康唑和艾沙康唑对照品储备液各 25、25 和 50 μL 于 EP 管中，加入 900 μL 甲醇 - 水溶液（50∶50，*V/V*），配制成质量浓度分别为 25、25、50 μg·mL^{-1} 混合储备液。

按照表 1 所述方法将混合储备液与空白全血混合，制备成加标全血。按照定量干血斑采集卡说明书的要求，定量吸取 10 μL 加标全血，转移至滤纸上后置于阴凉通风处干燥。

表 1 校准、质控品的制备与药物浓度

Tab 1 Preparation and concentration of calibrators and controls

浓度等级		加标方法 /μL		加标样品的浓度 /（μg·mL^{-1}）		
		混合储备液	全血	伏立康唑	艾沙康唑	泊沙康唑
校准品	C1	2	998	0.05	0.1	0.05
	C2	10	990	0.25	0.5	0.25
	C3	20	980	0.5	1	0.5
	C4	40	960	1	2	1
	C5	60	940	1.5	3	1.5
	C6	80	920	2	4	2
	C7	100	900	2.5	5	2.5
质控品	LLOQ	2	998	0.05	0.1	0.05
	Q1	25	975	0.625	1.25	0.625
	Q2	50	950	1.25	2.5	1.25
	Q3	75	925	1.875	3.75	1.875

2.2　测定条件

2.2.1　色谱参数　色谱柱为 ProChrom C_{18}（2.1 mm×100 mm，3 μm，杭州谱胜检测科技有限责任公司），柱温 45 ℃；样品温度 10 ℃；进样体积 1 μL；流速 0.3 mL·min^{-1}；流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液；B 为甲醇，梯度洗脱（0.0 ～ 3.0 min，70% ～ 100%B；3.0 ～ 3.9 min，100%B；3.9 ～ 4.0 min，100% ～ 70%B；4.0 ～ 6.0 min；70% B）；总运行时间 6.0 min。

2.2.2　质谱参数　离子化模式采用电喷雾正离子模式（ESI^+），毛细管电压 3.0 kV；脱溶剂温度 500 ℃；脱溶剂气流量 800 L·h^{-1}；锥孔反吹气流速 150 L·h^{-1}；离子源温度 150 ℃，多反应监测（MRM）参数详见表 2。三种抗真菌药物的质谱扫描图见图 2。

表 2　三种抗真菌药物的 MRM 参数

Tab 2　Multiple reaction monitoring parameters for three antifungal drugs

名称	母离子（*m/z*）	锥孔电压 /V	子离子（*m/z*）	碰撞能量 /eV
伏立康唑	350.0	20	281.0	15
$^2H_3$- 伏立康唑	353.0	20	284.0	15
艾沙康唑	438.1	20	224.0	20
$^2H_4$- 艾沙康唑	442.1	20	224.0	20
泊沙康唑	701.3	20	614.3	35
$^2H_4$- 泊沙康唑	705.3	20	618.3	35

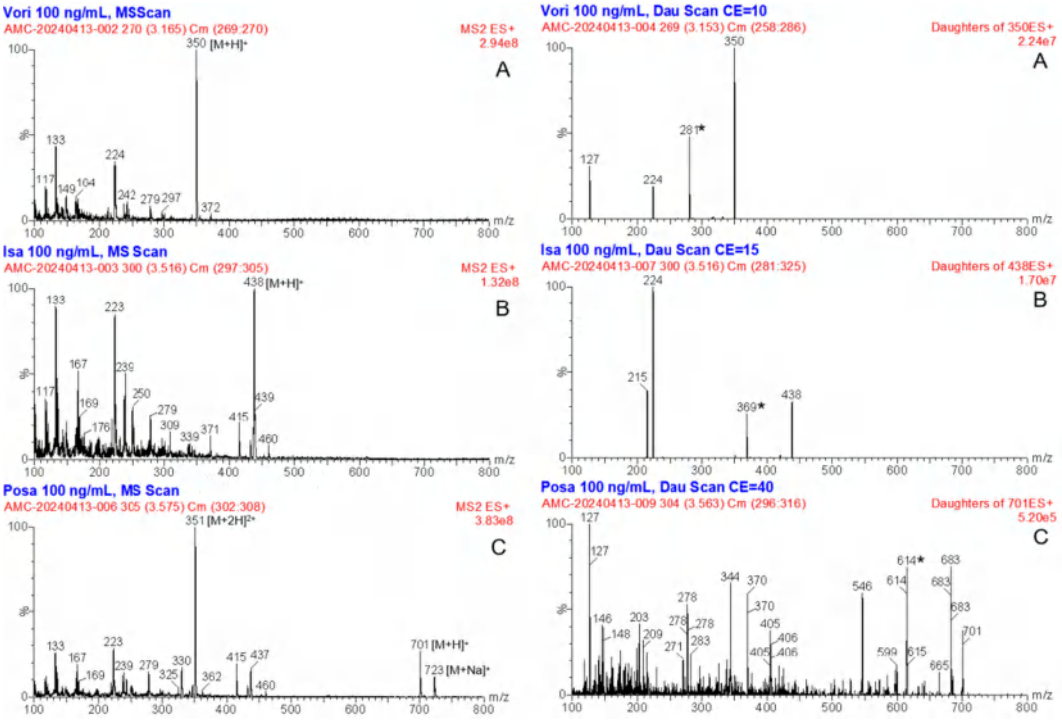


图 2　伏立康唑（A）、艾沙康唑（B）、泊沙康唑（C）的质谱图

Fig 2　Mass spectrometry of voriconazole（A），isavuconazole（B），and posaconazole（C）

注：左 . 母离子扫描图；右 . 子离子扫描图，* 为定量子离子。

Note：Left. spectrum of parent ion scan；right. spectrum of daughter ion scan，* is quantitative ion.

2.3　预处理条件的优化和建立

C1 ～ C7 的加标干血斑样本，切下转移至 EP 管中，加入 300 μL 的不同浓度的甲醇水溶液和乙腈水溶液后，涡旋 5 s，静置 5 min。取 200 μL 提取溶液加入 600 μL 甲醇或乙腈后，10 000 *g* 离心 10 min。最后，取 100 μL 上清液和 100 μL 内标工作液混合均匀后进样检测。另配制对照品和内标的混合溶液，其浓度与上述样本进样溶液的理论浓度相同，将该样品的峰面积比定义为 100% 绝对回收率，计算干血斑样本在各个提取溶液的绝对回收率，结果见表 3。本研究最终选择了 70% 的乙腈水溶液作为最优提取溶液。后续的方法学验证和稳定性试验采用以下预处理操作：将干血斑完整切下转移至 EP 管中，加入 300 μL 内标工作液，其溶剂为 70% 乙腈水溶液，涡旋 5 s，静置 5 min 以上；在 10 000 *g* 的离心力下离心 10 min，取 50 μL 上清液于进样瓶内衬管中，加入 150 μL 50% 甲醇水稀释，待进样。

2.4　方法学验证

本研究按照 2020 年版《中国药典》9012《生物样品定量分析方法验证指导原则》的要求，采用表 1 配制的加标样本，对关键方法学参数进行验证，主要包括线性、基质效应、定量下限、加标回收率、批内和批间精密度。其中，线性拟合采用 1/*x* 权重进行；基质效应采用 Q1、Q3 两个浓度等级在 6 个不同来源的干血斑基质中完成；准确度和精密度验证通过 3 批次样品完成，每批次样品 7 平行 7

表 3 不同有机相比例下伏立康唑、艾沙康唑、泊沙康唑的绝对回收率 (%，n = 3)

Tab 3 Absolute recovery of voriconazole，isavuconazole，and posaconazole under different organic phase ratios (%，n = 3)

有机相	伏立康唑		艾沙康唑		泊沙康唑	
比例 /%	甲醇	乙腈	甲醇	乙腈	甲醇	乙腈
0	87	87	83	83	20	20
10	91	100	86	95	33	41
20	96	91	96	91	46	75
30	91	90	94	93	64	89
40	92	92	98	100	82	93
50	86	92	93	99	84	100
60	85	90	92	100	85	96
70	89	89	96	98	88	95
80	90	91	99	98	87	93
90	85	92	93	59	74	37
100	86	1	97	2	51	1

次。结果见表 4 ～ 6。典型性色谱图见图 3。

表 4 三种抗真菌药物的线性关系考察结果

Tab 4 Linearity of three antifungal drugs

药物	线性范围 /（μg・mL^{-1}）	回归方程	r
伏立康唑	0.05 ～ 2.5	$y = 0.5721x + 0.0053$	0.9973
艾沙康唑	0.1 ～ 5.0	$y = 0.3161x + 0.0036$	0.9974
泊沙康唑	0.05 ～ 2.5	$y = 2.7654x + 0.0099$	0.9970

表 5 三种抗真菌药物的基质效应考察结果

Tab 5 Matrix effect of three antifungal drugs

药物	浓度等级	加标浓度 /（μg・mL^{-1}）	平均内标归一化的基质因子	变异系数 /%
伏立康唑	Q1	0.625	1.03	2.14
	Q3	1.875	0.98	3.12
艾沙康唑	Q1	1.25	1.08	2.37
	Q3	3.75	1.01	3.34
泊沙康唑	Q1	0.625	1.01	4.48
	Q3	1.875	0.98	7.53

表 6 三种抗真菌药物的回收率和精密度考察结果

Tab 6 Recovery and precision of three antifungal drugs

药物	浓度等级	加标浓度 /（μg・mL^{-1}）	回收率 /%	批内精密度 *RSD*/%（n = 7）	批间精密度 *RSD*/%（n = 21）
伏立康唑	LLOQ	0.05	89.0	1.5	0.8
	Q1	0.625	98.6	2.1	3.2
	Q2	1.25	100.8	1.0	2.6
	Q3	1.875	93.0	1.9	3.4
艾沙康唑	LLOQ	0.10	87.2	0.5	2.7
	Q1	1.25	97.8	1.3	2.7
	Q2	2.50	100.3	1.2	2.4
	Q3	3.75	93.1	0.9	2.3
泊沙康唑	LLOQ	0.05	85.1	4.3	6.1
	Q1	0.625	102.7	2.6	5.0
	Q2	1.25	104.2	1.4	5.7
	Q3	1.875	95.2	2.5	5.3

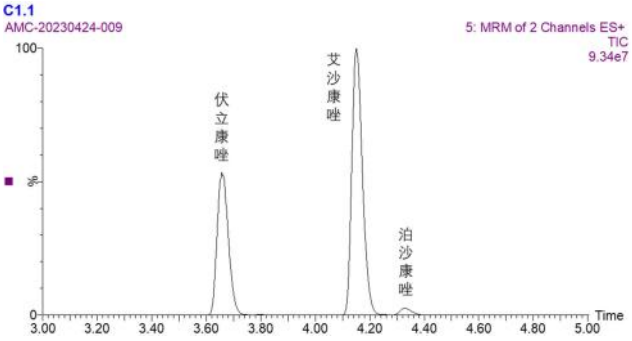


图 3 三唑类抗真菌药总离子流色谱图

Fig 3 Total ion chromatogram of triazole antifungals

方法学验证结果表明，三种抗真菌药物在各自的浓度范围内均具有良好的线性（r > 0.99），三个浓度等级的加标回收率在 93.0% ～ 104.2%，批内精密度和批间精密度 *RSD* 均小于 5.7%。在检测限附近，回收率在 85.1% ～ 89.0%，批内精密度和批间精密度均小于 6.1%，符合临床需求。

2.5 运输稳定性试验

针对干血斑样本在运输方面的特殊要求，本研究对样本运输稳定性进行考察。制备浓度等级为 Q2 的样本，在 45 ℃的烘箱中孵育 1 ～ 7 d 后暂存在低于－ 18 ℃环境中直至检测。以制备后直接储存在低于－ 18 ℃环境中的样本作为 100% 回收率，计算得伏立康唑、艾沙康唑和泊沙康唑在 45 ℃环境中存放 7 d 的回收率分别为（101.0± 2.5）%、（103.7± 0.5）% 和（98.1±5.6）%，未见明显下降趋势。

3 讨论

三唑类抗真菌药物虽然都能够产生相似的抗真菌作用，但是在化学结构上有较大差异。其中泊沙康唑的结构式与艾沙康唑、伏立康唑存在较大差异，导致其质谱离子化效率较低，质谱响应较其他两个药物低一个数量级。因此，本研究在优化三个药物的 MRM 参数后，着重在全局质谱参数方面针对泊沙康唑进行优化，优化内容主要包括毛细管电压、脱溶剂条件和源温度等。优化结果显示，三种抗真菌药物能够同时进行检测，且各浓度等级均在质谱的动态范围内。因此，本研究能够避免针对不同物质的稀释操作，减少进样时间，提高了样本检测时间和样本周转效率。

在样本萃取溶液优化中，本研究选择了与反相色谱流动相友好的甲醇水溶液和乙腈水溶液作为提取试剂，能够避免后续的溶剂转换操作，降低操作复杂度。在试验中发现，50% 以下的乙腈水溶液和 60% 以下的甲醇水溶液萃取后的溶液呈红色，推测为溶解的血红蛋白，直接进样会堵塞色谱柱。且在研究过程中向萃取液中加入甲醇、

乙腈以沉淀蛋白质。

在样本萃取溶液优化中，内标的加入时机在萃取后，内标仅参与校正质谱离子化效率，因此能够获得各个药物在萃取过程中的绝对回收率。通过对比各个萃取溶剂的绝对回收率发现，伏立康唑在 10% ～ 100% 甲醇水溶液中和 90% 乙腈水溶液中具有良好的绝对回收率。艾沙康唑在 20% 以下的甲醇水溶液中和 10% 以下的乙腈水溶液中的绝对回收率略低，随着有机相比例增加，绝对回收率立即提高至近 100%。然而，提取液中乙腈过高（≥ 90%）会导致提取效率的显著下降。泊沙康唑的化学结构式与其他两者有较大差异，因此展现出截然不同的化学性质，其回收率随着有机溶剂比例增加而增加，在大约 40% ～ 80% 的有机相中，它的回收率达到平台期，随后又显著性下降。

本研究最终选择了 70% 的乙腈溶液作为萃取试剂，能够保证三种药物均能达到最大提取效率。在此提取条件下，干血斑样本中的蛋白质无法提取出来，因此无需进行后续的蛋白质沉淀操作，仅需将提取液进行稀释即可完成检测，降低了操作的复杂程度。

为了考察干血斑样本使用常温物流进行样本传递的可能性，本研究使用 45 ℃烘箱模拟了运输车厢在夏天极端高温下的条件。考虑到我国快递的常规周转效率，选择了 7 d 作为最长时间，开展了模拟运输稳定性的研究。结果显示，三种抗真菌药物在此环境中至少稳定 7 d。三种抗真菌药物本身化学稳定性较高，在干血斑斑点中能够进一步降低化学反应的速率，因此能够使样本在高温环境中依然保持较长时间的稳定性。

4 结论

本研究建立了一种同时检测三种三唑类抗真菌药物的检测方法。该方法预处理操作简单、检测方便、效率高，符合临床在样本周转时间方面的需求。方法学验证证实该方法准确、可靠，符合临床需求。本研究发现干血斑样本中的三唑类药物具有高度稳定性，证实了在非温控条件下采用普通快递进行样本转运的可能性，能够降低医疗成本，极大地提升医疗服务的可及性，使大型三甲医院的高质量药学服务触及基层医院甚至患者家庭。

参考文献

[1] Arendrup MC，Friberg N，Mares M，et al. How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v.10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing（EUCAST）[J]. Clin Microbiol Infect，2020，26（11）：1464-1472.

[2] McCreary EK，Davis MR，Narayanan N，et al. Utility of triazole antifungal therapeutic drug monitoring：insights from the society of infectious diseases pharmacists：endorsed by the mycoses study group education and research consortium [J]. Pharmacotherapy，2023，43（10）：1043-1050.

[3] Bethesda（MD）：National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. LiverTox：clinical and research information on drug-induced liver injury [M]. 2017.

[4] Schulz J，Kluwe F，Mikus G，et al. Novel insights into the complex pharmacokinetics of voriconazole：a review of its metabolism [J]. Drug Metab Rev，2019，51（3）：247-265.

[5] 张丹，王超，裴广辉，等 . 肾移植患者中伏立康唑对他克莫司药代动力学的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2024，40（4）：594-597.

[6] Choi JY，Cho SG，Jang KS，et al. Voriconazole-induced severe hyperkalemia precipitated by multiple drug interactions [J]. Electrolyte Blood Press，2020，18（1）：10-15.

[7] Boyer J，Hoenigl M，Kriegl L. Therapeutic drug monitoring of antifungal therapies：do we really need it and what are the best practices? [J]. Expert Rev Clin Pharmacol，2024，17（4）：309-321.

[8] Buckner SL，Ceesay MM，Pagliuca A，et al. Measurement of posaconazole，itraconazole，and hydroxyitraconazole in plasma/serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detectiond [J]. Ther Drug Monit，2011，33（6）：735-741.

[9] Xu RA，Gu EM，Liu TH，et al. The effects of cytochrome P450 2C19 polymorphism on the metabolism of voriconazole in vitro [J]. Infect Drug Resist，2018，11：2129-2135.

[10] Wadsworth JM，Milan AM，Anson J，et al. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous measurement of voriconazole，posaconazole and itraconazole [J]. Ann Clin Biochem，2017，54（6）：686-695.

[11] Smith A，Dowis J，French D. Quantification of serum voriconazole，isavuconazole，and posaconazole by liquid chromatography tandem mass spectrometry（LC-MS/MS）[J]. Curr Protoc Toxicol，2018，76（1）：e47.

[12] 刘筱雪，周伟燕，黄晨蓉，等 . 全国医疗及相关机构治疗药物监测项目开展情况调查 [J]. 医药导报，2022，41（11）：1699-1710.

[13] 蔡田恬，杜益，颜星星，等 . UPLC-MS/MS 法测定干血斑中环孢素的含量 [J]. 中国临床药学杂志，2020，29（6）：428-431.

[14] Zwart TC，Gokoel SRM，van der Boog PJM，et al. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid in outpatient renal transplant recipients using a volumetric dried blood spot sampling device [J]. Br J Clin Pharmacol，2018，84（12）：2889-2902.

（收稿日期：2024-03-18；修回日期：2024-05-15）

抗菌消炎片（胶囊）的 HPLC-DAD-CAD 指纹图谱研究

贾银芝[1, 2]，吴琦[2*]，杜月莹[1, 2]，许柯[1, 2]，张水红[2]（1. 江苏省食品药品监督检验研究院连云港检验室，江苏 连云港 222006；2. 连云港市食品药品检验检测中心，江苏 连云港 222006）

摘要：目的 建立抗菌消炎片（胶囊）的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱。**方法** 采用 CAPCELL PAK C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以 0.1% 甲酸乙腈溶液 -0.1% 甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱，流速为 1.0 mL • min^{-1}，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL，DAD 检测器采集波长为 254 nm，CAD 检测器雾化温度为 50 ℃，建立抗菌消炎片（胶囊）的 HPLC-DAD-CAD 指纹图谱，并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 版）计算 11 批样品的相似度。**结果** 11 批次抗菌消炎片（胶囊）的 DAD（254 nm）指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.900 ～ 0.992，CAD 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.831 ～ 0.985，在 DAD（254 nm）和 CAD 下分别标定了 34 个和 21 个共有峰，通过对照品比对法指认了其中 12 个共有峰，分别为绿原酸、芒果苷、木犀草苷、3，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸、4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸、黄芩苷、槲皮素、黄芩素、大黄酸、汉黄芩素、大黄素和知母皂苷 BⅡ。**结论** 建立的 HPLC-DAD-CAD 指纹图谱分析方法为更加全面、快捷、准确地评价抗菌消炎片（胶囊）的质量提供了强有力的工具。

关键词：抗菌消炎片（胶囊）；指纹图谱；高效液相色谱 - 二极管阵列检测器 - 电喷雾检测器
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3026-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.031

HPLC-DAD-CAD fingerprints of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules)

JIA Yin-zhi[1, 2], WU Qi[2*], DU Yue-ying[1, 2], XU Ke[1, 2], ZHANG Shui-hong[2] (1. *Lianyungang Laboratory of Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Lianyungang Jiangsu* 222006; 2. *Lianyungang Food and Drug Inspection Center*, *Lianyungang Jiangsu* 222006)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules). **Methods** HPLC fingerprints were established on CAPCELL PAK C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) chromatographic column with 0.1% formic acid acetonitrile solution-0.1% formic acid solution as the mobile phase in a gradient elution manner. The flow rate was 1.0 mL•min^{-1}, the column temperature was 30 ℃, the injection volume was 10 μL, the detection wavelength of DAD was 254 nm and the atomization temperature of CAD was 50 ℃. The HPLC-DAD-CAD fingerprints of the 11 batches of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules) were established, and their similarity was calculated by the “Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system” (2012 Edition). **Results** The similarity of DAD (254 nm) fingerprints of the 11 batches of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules) ranges from 0.900 to 0.992, and the similarity of CAD fingerprints of the 11 batches of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules) ranged from 0.831 to 0.985. Totally 34 and 21 common peaks were labeled under DAD (254 nm) and CAD, respectively. Totally 12 common peaks were identified by comparing with reference materials, including chlorogenic acid, mangiferin, luteolin-7-*O*-glucoside, 3, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid, baicalin, quercetin, baicalein, rhein, wogonin, emodin and timosaponin BⅡ. **Conclusion** The HPLC-DAD-CAD fingerprint can be used to evaluate the quality of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules).

Key words: Kangjun Xiaoyan tablet (capsule); fingerprint; HPLC-DAD-CAD

作者简介：贾银芝，女，副主任中药师，主要从事药品质量研究，email：yinzhizhi.hi@163.com *通信作者：吴琦，男，主管药师，主要从事药品质量研究，email：583649395@qq.com

抗菌消炎片（胶囊）是临床常用中成药，处方由金银花、黄芩、知母、大黄、大青叶、百部和金钱草 7 味中药组成，具有清热、泻火、解毒之功效，用于风热感冒、咽喉肿痛、实火牙痛。抗菌消炎片现行质量标准主要为卫健委部颁标准第七册（WS3-B-1339-93），抗菌消炎胶囊的现行质量标准主要为国家市场监督管理总局的单页标准，生产厂家不同标准也不相同。目前对抗菌消炎片（胶囊）质量控制的研究，主要是利用高效液相色谱法（HPLC）- 紫外检测器（UV）测定指标成分的含量，如绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、槲皮素和山柰素等 [1-2]，未见指纹图谱相关研究报道。中药复方制剂具有组成多样性的特点，建立指纹图谱从宏观上系统反映中药的成分，对其全面质量控制十分必要。

抗菌消炎片（胶囊）处方中知母的指标成分知母皂苷 BⅡ 紫外吸收为末端吸收，不适宜采用 UV 或二极管阵列检测器（DAD）检测。电喷雾检测器（CAD）作为一种通用型检测器，适用范围广、灵敏度高、稳定性强，相对于 UV 和 DAD，其检测不依赖于分析物的分子结构，只与被测物质的进样量有关 [3-6]，被广泛应用于皂苷类、糖类、生物碱类等 [7-13] 无紫外吸收或弱紫外吸收成分的分析和中药材的质量评价 [14-15]。为全面评价抗菌消炎片（胶囊）中各种不同性质的成分，本研究采用 HPLC-DAD-CAD 法建立抗菌消炎片（胶囊）的指纹图谱，为其质量控制提供新的策略，现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Vanquish 型高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技有限公司）；XPR2 型百万分之一电子天平（瑞士梅特勒托利多公司）；Sartorius BP211D 型十万分之一电子天平（德国赛多利斯公司）；IQ 7000 纯水机（美国密理博公司）；F-100SD 型超声波清洗器（深圳福洋科技集团有限公司）。

1.2 试药

绿原酸（批号：110753-202018，纯度：96.1%）、芒果苷（批号：111607-201704，纯度：98.1%）、木犀草苷（批号：111720-202111，纯度：96.6%）、3，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸（批号：111782-202208，纯度：95.9%）、4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸（批号：111894-202104，纯度：95.1%）、黄芩苷（批号：110715-202223，纯度：97.2%）、知母皂苷 BⅡ（批号：111839-202107，纯度：95.4%）、槲皮素（批号：100081-201610，纯度：99.1%）、黄芩素（批号：111595-201808，纯度：97.9%）、大黄酸（批号：110757-201607，纯度：99.3%）、汉黄芩素（批号：111514-202207）和大黄素（批号：110756-201913，纯度：96.0%）（中国食品药品检定研究院）；乙腈、甲醇（色谱纯，Merck）；甲酸（色谱纯，阿拉丁）；11 批抗菌消炎片（胶囊）收集自 6 家生产企业（S1、S6 ～ S9 为片剂，其余为胶囊），详细信息见表 1。

表 1 抗菌消炎片 (胶囊) 信息

Tab 1 Information of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules)

编号	批号	生产企业
S1	20210401	中山市恒生药业有限公司
S2	2011004	山东宏济堂制药集团股份有限公司
S3	2104007	山东宏济堂制药集团股份有限公司
S4	200803	广西鸿博原生制药有限公司
S5	201002	广西鸿博原生制药有限公司
S6	201202	邛崃天银制药有限公司
S7	201208	邛崃天银制药有限公司
S8	201202	四川依科制药有限公司
S9	210202	四川依科制药有限公司
S10	210205	山东岳草堂药业有限公司
S11	210902	山东岳草堂药业有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 CAPCELL PAK C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；柱温为 30 ℃；进样量为 10 μL；流速为 1.0 mL•min^{-1}；流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液（A）-0.1% 甲酸溶液（B）；梯度洗脱（0 ～ 12 min，10%A；12 ～ 18 min，10% → 16%A；18 ～ 43 min，16% → 20%A；43 ～ 57 min，20% → 26%A；57 ～ 63 min，26%A；63 ～ 87 min，26% → 55%A；87 ～ 92 min，55% → 100%A；92 ～ 100 min，100%A）；DAD 检测波长为 254 nm；CAD 雾化温度为 50 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液

① 抗菌消炎胶囊：取本品 10 粒，精密称定总重，倾出内容物，精密称定胶囊壳重，计算平均装量，将内容物研细，取约相当于 1.5 g 原药材的细粉（根据标示规格换算），精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇 25 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 600 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用 80% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

② 抗菌消炎片：取本品 10 片，精密称定总重，计算平均片重，研细，取约相当于 1.5 g 原药材的细粉（根据标示规格换算），精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇 25 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 600 W，频率 40 kHz）30

min，放冷，再称定重量，用 80% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取绿原酸、芒果苷、木犀草苷、3，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸、4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸、黄芩苷、知母皂苷 BⅡ、槲皮素、黄芩素、大黄酸、汉黄芩素和大黄素约 5 mg，分别置 50 mL 量瓶内，加入甲醇适量，超声溶解后，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度试验 取样品 S9 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，进样测定 6 次，以 20 号峰为参照峰，计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积，结果 DAD 图谱共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.37%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%；CAD 图谱共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.53%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.3%。结果表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取样品 S9 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，以 20 号峰为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积，结果 DAD 图谱共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.49%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.1%；CAD 图谱共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.58%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.5%。表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取样品 S9 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，以 20 号峰为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积，结果 DAD 图谱共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.42%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.3%；CAD 图谱共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.54%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.4%。表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 DAD 指纹图谱的建立 按“2.1”项下色谱条件对 11 批样品进行测定，将各批样品的 254 nm 色谱峰分别进行积分，导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2012 版），以 S9 样品色谱图作为参照图谱，剪切溶剂峰，选择中位数法，时间窗设定为 0.2 min，采用多点校正法建立指纹图谱，生成对照图谱（见图 1），根据匹配结果共标定 34 个共有峰。各共有峰保留时间的 *RSD* 为 0.016% ～ 0.29%，峰面积的 *RSD* 为 13.4% ～ 97.6%，表明共有峰的出峰时间较为稳定，但各批次抗菌消炎片（胶囊）中同一成分的含量波动较大。计算各批次样品与对照图谱的相似度，结果分别为 0.992、0.985、0.988、0.900、0.937、0.977、0.987、0.929、0.931、0.959 和 0.964，各批次样品与对照图谱的相似度均大于 0.9，表明不同厂家不同批次抗菌消炎片（胶囊）的相似性较好。

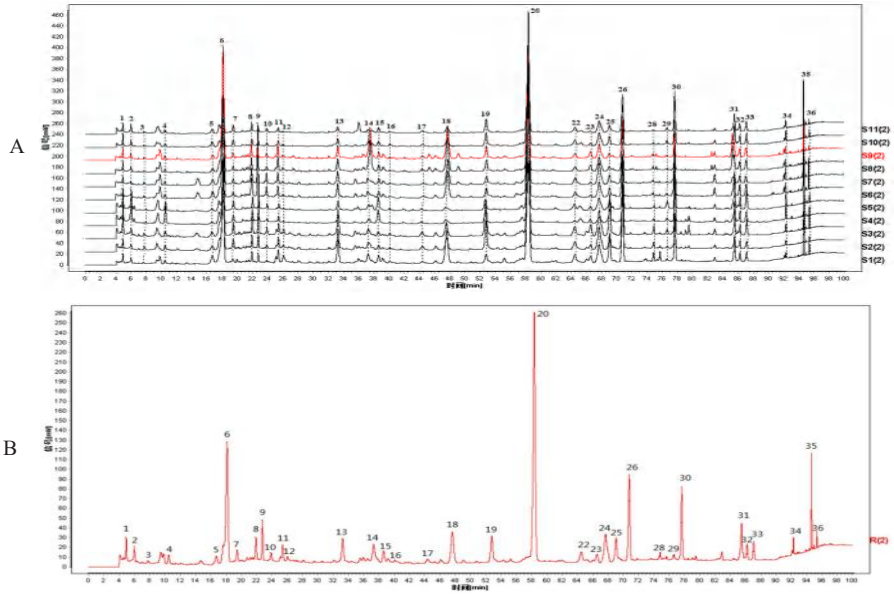


图 1 抗菌消炎片（胶囊）的 HPLC-DAD（254 nm）指纹图谱（A）及对照指纹图谱（B）

Fig 1 HPLC-DAD (254 nm) fingerprints (A) and control fingerprint (B) of Kangjun Xiaoyan tablets (capsules)

2.4.2 CAD 指纹图谱的建立 按“2.4.1”项下指纹图谱软件处理参数建立 CAD 指纹图谱及生成对照谱图（见图 2）。共标定 21 个共有峰，其中 21、27、37、38 号峰只在 CAD 指纹图谱中检出，其余 17 个共有峰均与 DAD（254 nm）指纹图谱中标定的共有峰相对应（用相同编号标记）。11 批抗菌消炎片（胶囊）中各共有峰保留时间的 *RSD* 为 0.010% ～ 0.45%，共有峰峰面积的 *RSD* 为 18.0% ～ 70.0%，表明共有峰的

出峰时间较为稳定，但各批次样品中同一成分的含量波动较大。计算各批次样品与对照图谱的相似度，结果分别为 0.985、0.981、0.962、0.923、0.967、0.965、0.831、0.940、0.938、0.961、0.965，除 S7（0.831）外，其余样品的相似度均大于 0.9，表明不同厂家不同批次抗菌消炎片（胶囊）的相似性较好。

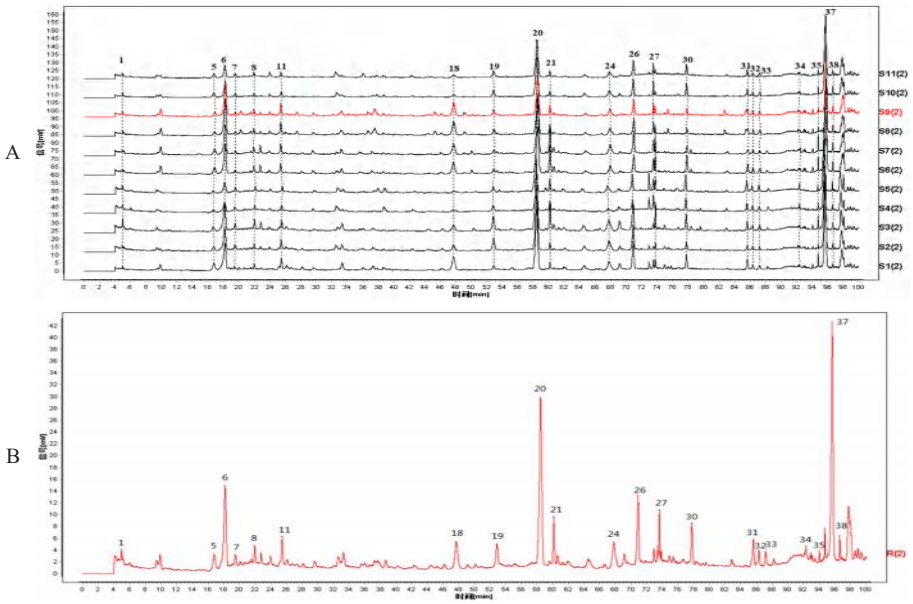


图 2　抗菌消炎片（胶囊）的 CAD 指纹图谱（A）及对照指纹图谱（B）

Fig 2　CAD fingerprints（A）and control fingerprint（B）of Kangjun Xiaoyan tablets（capsules）

2.5　共有峰的定性分析

利用“2.2.2”项下各对照品溶液，通过对照品比对法指认色谱峰。DAD（254 nm）色谱图中（见图 3），鉴定出 6 号峰为绿原酸、9 号峰为芒果苷、15 号峰为木犀草苷、18 号峰为 3，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸、19 号峰为 4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸、20 号峰为黄芩苷、25 号峰为槲皮素、30 号峰为黄芩素、31 号峰为大黄酸和汉黄芩素重叠形成、34 号峰为大黄素。CAD 色谱图中（见图 4），除 21 号峰鉴定为知母皂苷 BⅡ外，其他峰鉴定结果与 DAD（254 nm）色谱图一致。

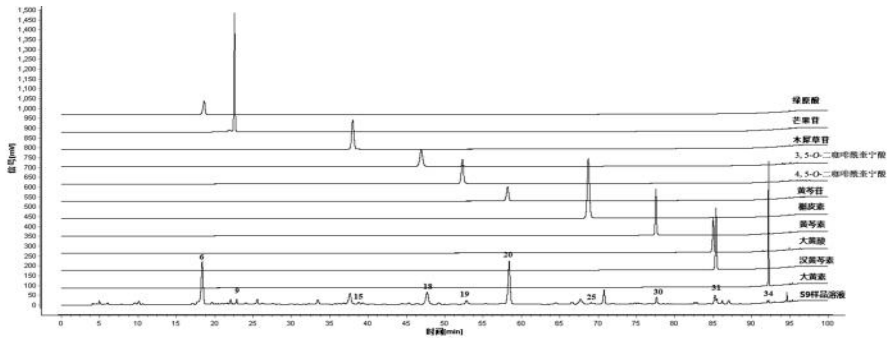


图 3　对照品溶液与抗菌消炎片（胶囊）的 HPLC-DAD（254 nm）色谱图

Fig 3　HPLC-DAD（254 nm）chromatograms of reference solution and Kangjun Xiaoyan tablets（capsules）

6. 绿原酸（chlorogenic acid）；9. 芒果苷（mangiferin）；15. 木犀草苷（luteolin-7-*O*-glucoside）；18. 3，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸（3，5-*O*-dicaffeoylquinic acid）；19. 4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸（4，5-*O*-dicaffeoylquinic acid）；20. 黄芩苷（baicalin）；25. 槲皮素（quercetin）；30. 黄芩素（baicalein）；31. 大黄酸和汉黄芩素（rhein and wogonin）；34. 大黄素（emodin）

3　讨论

3.1　试验条件的选择

3.1.1　供试品溶液制备　研究考察了提取溶剂（60% 乙醇、80% 乙醇、纯甲醇、60% 甲醇、80% 甲醇）和提取时间（20、30、40 min）的影响，发现提取时间对成分提取影响较小，提取溶剂影响较大，80% 甲醇提取 30 min 时的色谱峰较多，故选择 80% 甲醇超声提取 30 min 作为供试品溶液制备条件。

3.1.2　色谱条件　考察了乙腈 - 水、甲醇 - 水、乙腈 -0.1% 甲酸溶液、0.1% 甲酸乙腈溶液 -0.1% 甲酸溶液 4 种流动相，结果显示，以 0.1%甲酸乙腈溶液 -0.1% 甲酸溶液为本试验的流动相时，各成分的峰形和分离效果较好。考察了温度（30、35、40 ℃）和流速（0.8、1.0、1.2 mL·min^{-1}）对色谱峰的影响，结果显示，柱温为 30 ℃、流速为 1.0 mL·min^{-1} 时能使基线平稳、分离度和峰形达到

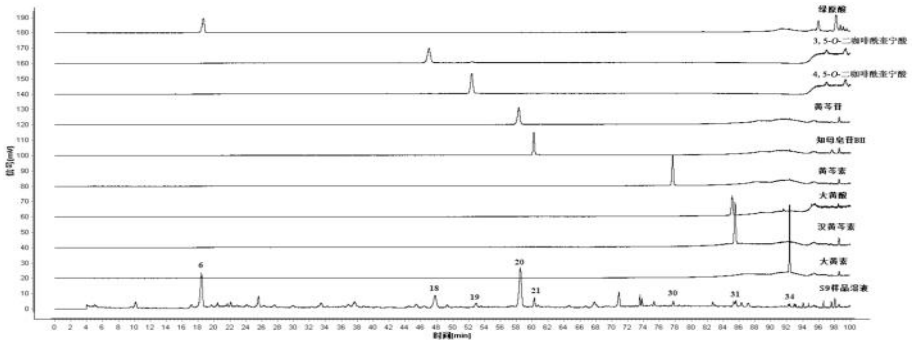


图 4 对照品溶液与抗菌消炎片（胶囊）样品溶液的 HPLC-CAD 色谱图

Fig 4 HPLC-CAD chromatograms of reference solution and Kangjun Xiaoyan tablet (capsule) sample solution

6. 绿原酸（chlorogenic acid）；18. 3，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸（3，5-*O*-dicaffeoylquinic acid）；19. 4，5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸（4，5-*O*-dicaffeoylquinic acid）；20. 黄芩苷（baicalin）；21. 知母皂苷 BⅡ（timosaponin BⅡ）；30. 黄芩素（baicalein）；31. 大黄酸和汉黄芩素（rhein and wogonin）；34. 大黄素（emodin）

较好的效果。同时采用 DAD 进行紫外全波长扫描，在 254 nm 波长下色谱图基线噪声较低，峰数目多，分离度较好，且基线稳定，故选择 254 nm 为检测波长。对 CAD 雾化温度（35、50、75 ℃）进行考察，结果显示，雾化温度为 50 ℃时，CAD 检测器基线稳定，成分响应较好。

3.2 小结

本研究将 DAD 与 CAD 串联，首次建立了抗菌消炎片（胶囊）的 HPLC-DAD-CAD 指纹图谱，在 DAD 和 CAD 下分别标定了 34 个和 21 个共有峰，通过对照品比对法指认了其中 12 个共有峰。DAD 检测到的成分比 CAD 多，有 4 个共有峰只在 CAD 指纹图谱中检出，其中知母的主要指标成分知母皂苷 BⅡ在 DAD（254 nm）指纹图谱中未被检测到，在 CAD 指纹图谱中响应较好。因此，只用单一检测器在成分复杂的中药复方制剂的质量评价中存在一定片面性。串联不同的检测器，有利于分析不同维度的质量特征，能更加完整、全面地反映制剂的整体质量。

指纹图谱相似度结果显示，来自 6 个厂家的 11 批抗菌消炎片（胶囊）的相似性较好，成分的含量存在显著差异，表明市售抗菌消炎片（胶囊）的质量相对均一、稳定，但由于厂家投料药材的质量差异及生产过程成分转移率不同，导致最终制剂中各成分含量存在一定差异性。因此建立全面系统的、可操作性强的抗菌消炎片（胶囊）的指纹图谱方法，对于识别制剂关键质量属性，研究量质传递，评价中药制剂质量的均一性、稳定性，提高中药制剂整体质量控制水平，确保临床用药的疗效及安全性具有重要意义。

参考文献

[1] 许丽丽，王玉团，徐丽华，等 . RP-HPLC 法同时测定抗菌消炎片中 7 种成分的含量 [J]. 中国药房，2017，28（21）：2981-2984.

[2] 陈健 . HPLC 法测定抗菌消炎胶囊中槲皮素和山柰素的含量 [J]. 西北药学杂志，2016，31（4）：383-385.

[3] 谭菊英，吴明珍，邓鸣，等 . 电喷雾检测器在化学药物分析中的应用进展 [J]. 中国药师，2022，25（7）：1249-1254.

[4] 刘菁，吴燕 . 新型通用型检测器 - 电喷雾检测器在药物分析中的应用进展 [J]. 天津药学，2022，34（3）：61-66.

[5] 邬伟魁，严倩茹，宋伟 . 液相色谱检测器联用技术在中药分析中的应用进展 [J]. 中国药事，2022，36（5）：569-577.

[6] 刘芫汐，王莹，金红宇，等 . 中药分析中电雾式检测器应用现状 [J]. 中国药业，2022，31（6）：128-131.

[7] 徐双双，吴思佳，卢文旭，等 . HPLC-CAD 法同时测定铁皮石斛中单糖和寡糖类成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2023，43（8）：1302-1311.

[8] 雷蓉，刘亚茹，苏建，等 . 基于 HPLC-CAD 的参麦颗粒中糖含量与色度值的相关性分析及糖摄入量评估 [J]. 药学研究，2023，42（8）：574-578.

[9] 龙书可，赵勇 . HPLC-CAD 法测定银杏叶片中萜类内酯的含量 [J]. 中南药学，2020，18（1）：105-107.

[10] 郭润芳，李瑞燕，李建伟 . 高效液相色谱串联电喷雾检测器一测多评法同时测定当归丸中 5 种皂苷类成分 [J]. 山西中医药大学学报，2023，24（6）：631-635.

[11] 陈晶，王京辉，傅欣彤，等 . HPLC-CAD 法测定玉竹中果糖、葡萄糖和蔗糖的含量 [J]. 中国药品标准，2022，23（6）：629-632.

[12] 刘益庆，吴琦，赵猛，等 . 银翘解毒片中掺伪山银花成分监测 [J]. 药学与临床研究，2023，31（3）：234-237.

[13] 朱艳平，李敏营，吴雪松 . HPLC-CAD 法测定小柴胡片中琥珀酸、盐酸麻黄碱、黄芩苷、汉黄芩苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、甘草酸、甘草次酸和棕榈酸 [J]. 现代药物与临床，2022，37（12）：2741-2745.

[14] 周丽娟，杨晓宁，王雅芝，等 . 基于 HPLC-CAD 指纹图谱结合化学计量学方法分析不同产地北柴胡药材质量 [J]. 中南药学，2022，20（10）：2253-2258.

[15] 陈淑娜，冯冰薇，成秋香，等 . HPLC-UV-CAD 串联指纹图谱应用于黄芪的质量评价 [J]. 中南药学，2023，21（1）：105-109.

（收稿日期：2024-03-20；修回日期：2024-06-21）

HPLC 法同时测定盐酸丙卡特罗口服溶液中主成分及 3 种抑菌剂的含量

蔡琴[1, 3]，高秀容[2]，程智[3]，胡桃敏[2]，徐源[2]，常艳波[3*]（1. 重庆市大足区中医院，重庆　402360；2. 成都医学院，成都　610500；3. 四川省药品检验研究院/国家药品监督管理局药物制剂体内外相关性技术研究重点实验室，成都　611731）

摘要：目的　建立 HPLC 法同时测定盐酸丙卡特罗口服溶液中主成分盐酸丙卡特罗以及 3 种抑菌剂（苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯）的含量。**方法**　采用 CAPCELL PAK MG Ⅱ C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以 0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠溶液（用磷酸调节 pH 至 3.0）为流动相 A，以乙腈为流动相 B，柱温为 30 ℃，检测波长为 259 nm，进样量为 100 μL。**结果**　主成分盐酸丙卡特罗及 3 种抑菌剂均得到较好的分离，盐酸丙卡特罗在 0.0503 ～ 0.7548 μg • mL^{-1} 内线性关系良好（r = 1.000），A 厂家回收率范围为 98.92% ～ 101.00%（*RSD* = 0.63%），B 厂家回收率范围为 101.09% ～ 102.45%（*RSD* = 0.51%）；苯甲酸钠在 20.4684 ～ 307.0262 μg • mL^{-1} 内线性关系良好（r = 0.9996），A 厂家回收率范围为 100.11% ～ 101.33%（*RSD* = 0.50%），B 厂家回收率范围为 101.45% ～ 102.24%（*RSD* = 0.32%）；羟苯乙酯在 0.5091 ～ 7.6364 μg • mL^{-1} 内线性关系良好（r = 0.9999），A 厂家回收率范围为 99.68% ～ 100.70%（*RSD* = 0.33%）；羟苯丁酯在 0.2648 ～ 3.9720 μg • mL^{-1} 内线性关系良好（r = 1.000），A 厂家回收率范围为 99.24% ～ 100.38%（*RSD* = 0.44%）。**结论**　本法简便，快速，能同时准确测定盐酸丙卡特罗口服溶液中主成分与 3 种抑菌剂的含量。

关键词：盐酸丙卡特罗口服溶液；抑菌剂；高效液相色谱；含量测定
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-3031-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.032

Simultaneous determination of the main components and three preservatives in procaterol hydrochloride oral solution by HPLC

CAI Qin[1, 3], GAO Xiu-rong[2], CHENG Zhi[3], HU Tao-min[2], XU Yuan[2], CHANG Yan-bo[3*] (1. *Traditional Chinese Medical Hospital of Dazu District*, *Chongqing*　402360; 2. *Chengdu Medical College*, *Chengdu*　610500; 3. *Sichuan Institute for Drug Control*, *NMPA Key Laboratory for Technical Research on Drug Products In Vitro and In Vivo Correlation*, *Chengdu*　611731)

Abstract: Objective　To establish an HPLC method for the simultaneous determination of the main components and three preservatives (sodium benzonate, ethylparaben and butyl-*p*-hydroxybenzoate), in procaterol hydrochloride oral solution. **Methods**　A CAPCELL PAK MG Ⅱ C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used in gradient elution with the mobile phase A of 0.02 mol • L^{-1} sodium dihydrogen phosphate solution (pH was adjusted to 3.0 with phosphoric acid) and the mobile phase B of acetonitrile. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was 259 nm. The injection volume was 100 μL. **Results**　The main components in procaterol hydrochloride and the three preservatives were well separated. Procaterol hydrochloride had a good linear relationship within 0.0503 ～ 0.7548 μg • mL^{-1} (r = 1.000), with manufacturer A's recovery within 98.92% ～ 101.00% (*RSD* = 0.63%), while manufacturer B's recovery within 101.09% ～ 102.45% (*RSD* = 0.51%). Sodium benzoate had a good linear relationship within 20.4684 ～ 307.0262 μg • mL^{-1} (r = 0.9996), with manufacturer

基金项目：国家药典委员会国家药品标准提高课题（No. 2021H029）。
作者简介：蔡琴，女，硕士，主要从事药物分析方面的研究，email：caiqin517@163.com　*通信作者：常艳波，女，主任药师，主要从事药品质量方面的研究，email：chang_yanbo@hotmail.com

A's recovery within 100.11% ～ 101.33% (*RSD* = 0.50%), and manufacturer B's recovery within 101.45% ～ 102.24% (*RSD* = 0.32%). Ethylparaben had a good linear relationship within 0.5091 ～ 7.6364 μg • mL^{-1} (*r* = 0.9999), with manufacturer A's recovery within 99.68% ～ 100.70% (*RSD* = 0.33%). The linear relationship of butyl-*p*-hydroxybenzoate within 0.2648 ～ 3.9720 μg • mL^{-1} was good (*r* = 1.000), with manufacturer A's recovery within 99.24% ～ 100.38% (*RSD* = 0.44%). **Conclusion** The method is simple and accurate, and can be used for the quantification of main components and three preservatives in procaterol hydrochloride oral solution.

Key words: procaterol hydrochloride oral solution; preservative; HPLC; content determination

盐酸丙卡特罗（procaterol hydrochloride）为选择性β_2受体激动剂类支气管扩张药[1]，可以舒张支气管平滑肌且能促进呼吸道纤毛运动，增强呼吸道的防御功能，起到止咳平喘的作用[2-4]，其支气管扩张作用强而持久[5-6]。盐酸丙卡特罗口服溶液在临床上用于治疗支气管哮喘、喘息性支气管炎等肺部疾病，且常用于儿科[7]。

盐酸丙卡特罗口服溶液属于水性液体制剂，容易霉变，因此需要加入抑菌剂，多为苯甲酸钠和羟苯酯类。抑菌剂对防止药物被微生物污染，保证药品的质量有着重要作用。抑菌剂使用量不足，会增加微生物污染的风险；抑菌剂使用量过多，会产生毒性影响临床使用安全[8]。抑菌剂的合理使用和质量控制是保证药物安全性、有效性的关键[9-10]。盐酸丙卡特罗口服溶液作为小儿肺炎的一线治疗药物，其安全性至关重要。准确、可靠的抑菌剂含量测定方法，并制定合理的限度，可以确保抑菌剂添加量既安全又有效，对于保障药品质量和儿童用药安全极为重要。

《中国药典》2020 年版尚未收载盐酸丙卡特罗口服溶液质量标准，药品的质量控制主要依赖于药品的注册标准，该标准在含量测定方面存在一些不足，供试液的前处理需要加入内标物，操作繁杂耗时长，且使用了对人体有害的有机溶剂三氯甲烷和乙醚。目前暂无文献报道对盐酸丙卡特罗口服溶液的含量测定方法进行优化，尤其是能够同时测定主成分及 3 种抑菌剂含量的方法。为此，本研究参考相关文献[11]，建立了一种简单、高效的液相色谱法，旨在同时测定盐酸丙卡特罗口服溶液中的药物主成分及苯甲酸钠、羟苯乙酯和羟苯丁酯 3 种抑菌剂的含量。

1 仪器与试药

1.1 仪器

NexeraXR 系列高效液相色谱仪，包括 SPD-20A 紫外可见检测器、SPD-M20A 二极管阵列检测器（日本岛津公司）；XSE205DU 十万分之一电子天平（德国赛多利斯科学仪器有限公司）。

1.2 试药

盐酸丙卡特罗对照品（批号：100275-202104，含量：96.9%）、苯甲酸钠对照品（批号：100433-202103，含量：99.8%）、羟苯乙酯对照品（批号：100847-22105，含量：100.0%）、羟苯丁酯对照品（批号：110792-200503，含量：100.0%）（中国食品药品检定研究院）。乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。盐酸丙卡特罗口服溶液均为市售，规格均为 0.0005%（5 μg•L^{-1}），涉及 2 个厂家 5 个批次（A 厂家：C21D0702、C21B0904；B 厂家：2004153、2012303、2106154）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：CAPCELL PAK MG Ⅱ C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 A：0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠溶液（用磷酸调节 pH 值至 3.0），流动相 B：乙腈，按表 1 进行梯度洗脱，流速：1.0 mL•min^{-1}；柱温：30 ℃；检测波长：259 nm；进样量：100 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	89	11
8	89	11
12	40	60
20	40	60
21	89	11
27	89	11

2.2 溶液的配制

2.2.1 溶剂 0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠溶液（用磷酸调节 pH 至 3.0）- 乙腈（89∶11）。

2.2.2 混合对照品储备液 精密称取盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯对照品适量，加乙腈溶解并用溶剂稀释成含盐酸丙卡特罗、苯

甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯质量浓度分别为 2、800、20 和 10 μg • mL^{-1} 的溶液。

2.2.3　混合对照品溶液　精密量取“2.2.2”项下 5 mL 对照品储备液，置于 20 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度制成含盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯质量浓度分别为 0.5、200、5 和 2.5 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.4　供试品溶液　精密量取供试品 2 mL，置于 20 mL 量瓶中，加溶剂稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

2.2.5　阴性样品溶液　取各辅料按照处方制成不含主成分与抑菌剂的阴性样品，精密量取 2 mL，置 20 mL 量瓶中，加溶剂稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3　专属性试验

分别精密量取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液和溶剂各 100 μL 注入高效液相色谱仪，记录色谱图，见图 1。由图 1 可见，盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯均完全分离（分离度＞ 1.5），理论板数均不低于 5000。溶剂和空白辅料均不干扰主成分和抑菌剂的测定。

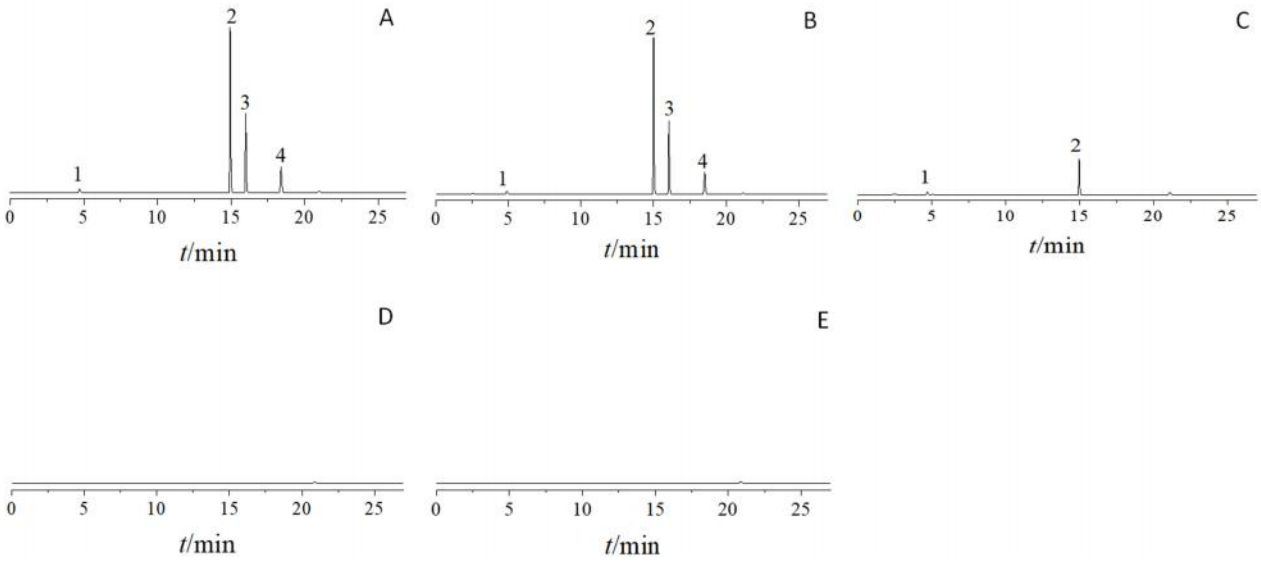


图 1　盐酸丙卡特罗口服溶液的典型 HPLC 色图谱

Fig 1　Typical HPLC chromatograms of procaterol hydrochloride oral solution

A. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；B. A 厂家供试品溶液（test solution of manufacturer A）；C. B 厂家供试品溶液（test solution of manufacturer B）；D. 阴性样品溶液（negative sample solution）；E. 溶剂（solvent）；1. 盐酸丙卡特罗（procaterol hydrochloride）；2. 苯甲酸钠（sodium benzoate）；3. 羟苯乙酯（ethylparaben）；4. 羟苯丁酯（butyl-*p*-hydroxybenzoate）

2.4　线性关系考察

精密移取“2.2.2”项下混合对照品储备液适量，加溶剂稀释制成系列浓度溶液，浓度范围至少覆盖 A 与 B 两厂家产品中盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯含量范围的 50% ～ 150%。精密量取 100 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。以峰面积（*A*）为纵坐标，质量浓度（*C*，μg • mL^{-1}）为横坐标，进行线性回归，结果见表 2。结果表明，主成分与 3 种抑菌剂在各自浓度范围内与峰面积有良好的线性关系。

2.5　定量限与检测限

精密移取“2.2.2”项下混合对照品储备液适量，逐级稀释，精密量取 100 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。当信噪比（*S/N*）约为 3 时计算其检测限，*S/N* 约为 10 时计算其定量限。结果表明，盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯检测限分别为 0.179、2.794、0.166、0.219 ng • mL^{-1}，定量限分别为 0.786、7.529、0.822、0.639 ng • mL^{-1}，检测灵敏度符合要求。

2.6　重复性试验

分别取 A 厂家样品（批号：C21B0904）、B 厂家样品（批号：2106154），按“2.2.4”项下方法平行配制 6 份供试品溶液，精密量取 100 μL 注入液相色谱仪，记录峰面积并计算平均含量及 *RSD* 值。A 厂家盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯的平均含量分别为 4.93、1998.46、48.22、23.44 μg • mL^{-1}，B 厂家盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠的平均含量分别为 4.79、494.55 μg • mL^{-1}，上述各组分含量 *RSD* 在 0.17% ～ 0.47%。结果表明，该方法的重复性良好。

2.7　回收试验

A 厂家样品（批号：C21B0904）回收率溶液：分

表 2 各成分线性关系

Tab 2 Linearity of various constituents

化合物	线性方程	相关系数	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
盐酸丙卡特罗	$A = 4.18\times10^{5}C + 3.43\times10^{2}$	1.000	0.0503 ～ 0.7548
苯甲酸钠	$A = 2.60\times10^{4}C + 1.12\times10^{5}$	0.9996	20.4684 ～ 307.0262
羟苯乙酯	$A = 5.65\times10^{5}C + 2.31\times10^{4}$	0.9999	0.5091 ～ 7.6364
羟苯丁酯	$A = 5.04\times10^{5}C + 3.98\times10^{3}$	1.000	0.2648 ～ 3.9720

别精密量取混合对照品储备液 2、2.5、3.0 mL 各 3 份，分别置 10 mL 量瓶中，加空白辅料溶液溶解并稀释至刻度，配制成相对浓度为 80%、100% 和 120% 的 3 个水平的加样溶液。精密量取 100 μL 分别注入液相色谱仪，记录峰面积并计算回收率及 *RSD* 值。低、中、高浓度的盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯的回收率分别为 98.92% ～ 101.00%、100.11% ～ 101.33%、99.68% ～ 100.70%、99.24% ～ 100.38%，*RSD* 在 0.33% ～ 0.63%。

B 厂家样品（批号：2106154）回收率溶液：分别精密量取含盐酸丙卡特罗 5.03 μg • mL^{-1} 和苯甲酸钠 566.30 μg • mL^{-1} 的对照品溶液各 1 mL，B 企业样品 1 mL，置于同一 20 mL 量瓶中，加“2.2.1”项下溶剂稀释并定容，摇匀，即得相对浓度为 100% 的加样溶液，平行制备 6 份。精密量取 100 μL 分别注入液相色谱仪，记录峰面积并计算回收率及 *RSD* 值。盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠的回收率范围分别为 101.09% ～ 102.45%、101.45% ～ 102.24%，*RSD* 值分别为 0.51%、0.32%。结果表明，该方法准确度良好。

2.8 稳定性试验

按“2.2.4”项下方法制备供试品稳定性溶液，室温放置 0、4、8、12、16、20、24 h 后分别进样，盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯峰面积的 *RSD* 分别为 0.40%、0.090%、0.10%、0.13%。结果表明，供试品溶液主成分与 3 种抑菌剂室温放置 24 h 稳定。

2.9 耐用性考察试验

分别以 CAPCELL PAKMG Ⅱ C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）和 ZORBAX SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）的色谱柱进行试验，发现各色谱峰峰形良好，对结果无影响。对流动相 A 的 pH 值耐用范围进行考察，结果 pH 值为 3.4 以上将会造成丙卡特罗峰分叉，因此确定最优 pH 值为 3.0，耐用范围为 ±0.2。柱温（30±5）℃与流速（1.0±0.1）mL • min^{-1} 内各组分能够完全分离，峰形良好，对测定结果无影响。

2.10 样品含量测定

按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液进行测定，采用外标法计算。对各个厂家的主成分含量以及添加的抑菌剂种类和含量进行比较，见表 3。参考药品注册标准中的主成分与抑菌剂限度要求，盐酸丙卡特罗含量应为标示量的 90.0% ～ 110.0%（4.50 ～ 5.50 μg • mL^{-1}），A 厂家苯甲酸钠含量应为 1600 ～ 2400 μg • mL^{-1}，羟苯乙酯含量应为 40 ～ 60 μg • mL^{-1}，羟苯丁酯含量应为 20 ～ 30 μg • mL^{-1}，B 厂家苯甲酸钠含量应为 400 ～ 600 μg • mL^{-1}，结果表明，2 个厂家 5 个批次样品盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯含量均符合要求。

表 3 A、B 厂家盐酸丙卡特罗口服溶液中主成分及 3 种抑菌剂含量（μg • mL^{-1}）

Tab 3 Contents of main components and three preservatives in procaterol hydrochloride oral solution from manufacturers A and B (μg • mL^{-1})

厂家	批号	盐酸丙卡特罗	苯甲酸钠	羟苯乙酯	羟苯丁酯
A	C21D0702	4.98	1999.00	48.32	23.48
	C21B0904	4.93	1998.46	48.22	23.44
B	2004153	4.82	497.90	/	/
	2012303	4.85	493.45	/	/
	2106154	4.79	494.55	/	/

注（Note）：“/”表示未检出（Means not detected）。

3 讨论

3.1 抑菌剂的选择依据

《中国药典》2020 年版没有明确口服溶液抑菌剂的控制要求，欧盟药品审评局（EMEA）和人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）建议在药品质量标准中应建立抑菌剂的定性和限量检查。企业应参考最低抑菌浓度，选择合适的抑菌剂的种类，在保证抑菌效力的前提下，最大限度地减少抑菌剂可能带来的安全性风险 [12]。

3.2 检测波长的选择

采用 PDA（二极管阵列检测器）分别将对照品溶液在 190 ～ 400 nm 波长内进行紫外光谱扫描。盐酸丙卡特罗、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯分别在 259、228、255、255 nm 波长处的吸收值最大。由于盐酸丙卡特罗口服溶液中仅含 5

μg • mL^{-1} 盐酸丙卡特罗，3 种抑菌剂的浓度都远高于盐酸丙卡特罗，为保证盐酸丙卡特罗检测灵敏度，选择 259 nm 作为检测波长。

3.3 供试液浓度的选择

盐酸丙卡特罗口服溶液中含大量的辅料蔗糖，供试品溶液浓度高会造成苯甲酸钠的回收率偏低且损伤色谱柱，浓度低则会造成主成分不能准确定量。为了在同一色谱系统中避免辅料干扰，准确定量主成分及 3 种抑菌剂，确保方法线性范围覆盖各成分的浓度，最终确定将本品稀释 10 倍（盐酸丙卡特罗质量浓度 0.5 μg • mL^{-1}）后作为供试品溶液，保证了方法的精密度和准确度。

3.4 流动相的选择

分别考察了 0.02 mol•L^{-1} 磷酸二氢钾 - 乙腈、0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠 - 乙腈、0.02 mol • L^{-1} 甲酸铵 - 乙腈、0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠 - 乙腈溶液系统梯度洗脱，综合考虑基线、峰形及分离度，采用 0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠 - 乙腈作为流动相时，优于其他流动相体系。

3.5 小结

本研究简化了样品前处理步骤，利用 HPLC 法同时测定盐酸丙卡特罗口服溶液中的主成分以及 3 种抑菌剂（苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丁酯），显著提升了分析工作的效率，同时减少了有害有机溶剂的使用。通过全面的方法学验证，确保了这一方法的准确性和可靠性，该方法适用于国内不同生产厂家的盐酸丙卡特罗口服溶液，具有较强的实用性，对提高药品质量控制水平起到了积极作用。

参考文献

[1] 阳志军，杨雅兰 . 盐酸丙卡特罗口服液加速试验样品的含量测定方法 [J]. 现代食品与药品杂志，2007（4）：64-66.

[2] 赵想，杨亚楠，许杨，等 . UPLC-MS/MS 法测定人血浆中丙卡特罗的浓度 [J]. 中南药学，2023，21（1）：68-74.

[3] Nojiri M，Mizuno S，Nishiki K，et al. ADRB2 gene polymorphism and emphysema heterogeneity can modulate bronchodilator response in patients with emphysema [J]. Pulm Pharmacol Ther，2018，48：80-87.

[4] 胡玲，林秋玉，黎小年，等 . 丙卡特罗口服溶液联合孟鲁司特片治疗儿童支气管哮喘的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（11）：1437-1439.

[5] 白臣生，袁洪雨，张志华，等 . HPLC 法测定盐酸丙卡特罗口服溶液的含量 [J]. 药学研究，2013，32（6）：338-339.

[6] 庄敏，袁橙，刘鸿达，等 . 盐酸丙卡特罗舌下口腔速溶膜剂含量测定及溶出度的考察 [J]. 中国卫生产业，2018，15（18）：62-64.

[7] 程智，刘峰，谢华，等 . 基于国家评价性抽检的盐酸丙卡特罗片质量分析与研究 [J]. 中国药事，2021，35（7）：735-744.

[8] 杨晓莉，贺聪莹，绳金房 . 硫酸软骨素滴眼液抑菌剂筛选与抑菌效力研究 [J]. 药物分析杂志，2016，36（4）：678-684.

[9] Shehab N，Lewis CL，Streetman DD，et al. Exposure to the pharmaceutical excipients benzyl alcohol and propylene glycol among critically ill neonates [J]. Pediatr Crit Care Me，2009，10（2）：256-259.

[10] 雷翔霄，王洋，张贾亮，等 . 分析注射剂和滴眼剂中抑菌剂和抗氧剂的添加及检测 [J]. 当代化工研究，2017（4）：143-144.

[11] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：1068.

[12] 唐溱，赵晓霞，关宏峰，等 . 关于药物中抑菌剂使用相关问题的思考 [J]. 中国新药杂志，2021，30（21）：1944-1948.

（收稿日期：2023-10-10；修回日期：2024-08-01）

固肾定喘丸气相色谱指纹图谱及多成分含量测定研究

程宏辉，江涛*，陈丽斯，温德源，苏锐辉，曾晨，汤迎湛，李高捷（广州白云山敬修堂药业股份有限公司，广州 510130）

摘要：目的 建立固肾定喘丸气相色谱（GC）指纹图谱，并测定 α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯和丹皮酚的含量。**方法** 采用 Agilent HP-5 色谱柱（30 m×0.32 mm，0.25 μm）；进样口温度为 230 ℃；程序升温；分流比为 10∶1。**结果** 建立了 16 批固肾定喘丸指纹图谱，相似度均大于 0.98，共标定了 16 个共有峰，对其中 7 个成分（α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯、丹皮酚）进行含量测定，质量浓度分别在 16.96 ～ 169.64、12.75 ～ 127.45、267.89 ～ 2678.94、75.60 ～ 755.96、273.92 ～ 2739.24、142.99 ～ 1429.92、608.88 ～ 6088.80 μg·mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系（$r \geq 0.9998$）；7 个成分平均回收率（$n = 6$）在 98.37% ～ 99.79%，*RSD* 均小于 1.5%。**结论** 建立的气相色谱指纹图谱及多成分含量测定方法专属性强、精密度高、稳定、准确，可全面对固肾定喘丸进行质量控制，为其质量评价和标准建立提供科学依据。

关键词： 固肾定喘丸；指纹图谱；多成分含量测定；质量控制
中图分类号： R917 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2024)11-3036-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.033

Gas chromatography fingerprint and multi-component content determination of Gushen Dingchuan pills

CHENG Hong-hui, JIANG Tao*, CHEN Li-si, WEN De-yuan, SU Rui-hui, ZENG Chen, TANG Ying-zhan, LI Gao-jie (*Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Company Limited*, *Guangzhou* 510130)

Abstract: Objective To establish the gas chromatography fingerprint of Gushen Dingchuan pills and to determine the content of α-pinene, linalool, camphor, borneol, cinnamaldehyde, bornyl acetate and paeonol. **Methods** Agilent HP-5 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm) was used; the temperature of the injection port was 230 ℃; the column temperature was programmed to increase and the partition ratio was 10 : 1. **Results** The fingerprints of 16 batches of Gushen Dingchuan pills were established, with similarities all greater than 0.98. Totally 16 common peaks were calibrated, and the content of the 7 components (α-pinene, linalool, camphor, borneol, cinnamaldehyde, bornyl acetate, and paeonol) was determined. There was a good linear relationship between the concentration and the peak area at 16.96 ～ 169.64 μg·mL^{-1}, 12.75 ～ 127.45 μg·mL^{-1}, 267.89 ～ 2678.94 μg·mL^{-1}, 75.60 ～ 755.96 μg·mL^{-1}, 273.92 ～ 2739.24 μg·mL^{-1}, 142.99 ～ 1429.92 μg·mL^{-1}, and 608.88 ～ 6088.80 μg·mL^{-1} ($r \geq 0.9998$). The average recoveries of the 7 components ($n = 6$) ranged from 98.37% to 99.79% with *RSD* less than 1.5%. **Conclusion** The established gas chromatography fingerprints and multi-component content determination method are highly specific, precise, stable and accurate, which can be used for the quality control and standard establishment of Gushen Dingchuan pills.

Key words: Gushen Dingchuan pill; fingerprint; multi-component content determination; quality control

基金项目： 广东省科技创新战略专项资金项目（省市联动项目）（No.2020A1111350002）。
作者简介： 程宏辉，男，制药高级工程师，主要从事中药制剂及质量控制研究，email：jxtyjs1790@163.com *通信作者：江涛，男，制药正高级工程师，主要从事中药学研究，email：jiangtao1609@163.com

固肾定喘丸处方来源于《嵩崖尊生书》古方，原名“脾肾丸”收载于《中国医学大辞典》，由肉桂、熟地黄、车前子、盐补骨脂、附片、盐益智仁等 13 味中药饮片加工而成，具有温肾纳气、健脾化痰的功效，临床用于治疗肺脾气虚、肾不纳气所致的咳嗽、气喘；慢性支气管炎、肺气肿、支气管哮喘见上述证候者。相关临床研究数据[1-9]也表明，固肾定喘丸可改善慢性阻塞性肺疾病患者的肺功能，有助于呼吸肌功能的恢复，改善临床症状，减轻炎症，增强患者活力，提高生活质量。固肾定喘丸药品质量标准收载于《中国药典》2020 年版一部，以补骨脂素和异补骨脂素的总含量为指标控制其质量[10]。现有固肾定喘丸的质量控制研究主要是采用高效液相色谱（HPLC）法测定丹皮酚[11]、补骨脂素[12]、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、毛蕊花糖苷[13]等成分的含量，仅靠其质量标准及现有文献报道对其中一种或几种成分进行液相定量分析，不能体现出药物的整体特征，无法全面反映固肾定喘丸的物质基础和化学成分群的整体性和复杂性，难以全面监测固肾定喘丸的内在质量。固肾定喘丸处方药材组成多，挥发性成分丰富，化学成分复杂。肉桂温肾补火，助膀胱气化，是固肾定喘丸的臣药，其主要挥发性成分为桂皮醛和龙脑，具有抗病毒、抑菌、抗炎、增强机体免疫机能等功效[14]。牡丹皮寒凉清泄，为固肾定喘丸的佐药，其主要挥发性成分为丹皮酚，具有抗菌、抗炎、抗氧化、降血压等作用[15]。盐补骨脂补肾助阴，砂仁行气化湿，是固肾定喘丸的使药，其中盐补骨脂的主要挥发性成分为 α- 蒎烯和芳樟醇，目前大量的体内及体外实验研究表明补骨脂具有广泛的药理作用，包括抗菌、抗病毒、抗氧化及增强机体免疫功能等作用[16]。砂仁的主要药效成分为挥发油，其中樟脑、龙脑及乙酸龙脑酯的含量较高[17]，具有抗氧化、抑菌、镇痛消炎、免疫调节等作用[18]。上述诸药合用，能增强固肾定喘丸温肾纳气、健脾化痰之功效。为全面评估固肾定喘丸的质量，有必要建立产品的 GC 指纹图谱，完成对产品中挥发性成分的质量分析，全面有效地监测固肾定喘丸的内在质量。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 6890N 型气相色谱仪和 Agilent technologies 色谱工作站（美国 Agilent 公司）；ME204T 型电子分析天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]；Micra 纯水仪（广州市翁迪仪器有限责任公司）。

1.2 试药

对照品 α- 蒎烯（批号：110897-202204，含量：98.40%）、芳樟醇（批号：111503-202004，含量：98.80%）、樟脑（批号：110747-201810，含量：99.00%）、龙脑（批号：110881-201709，含量：99.60%）、桂皮醛（批号：110710-202022，含量：99.50%）、乙酸龙脑酯（批号：110759-202007，含量：99.30%）、丹皮酚（批号：110708-201908，含量：99.80%）（中国食品药品检定研究院）。16 批固肾定喘丸（水蜜丸，35 g/ 瓶，国药准字 Z44020906）样品为广州白云山敬修堂药业股份有限公司生产，批号依次为 R03001、R03002、R03003、R03004、R03005、R03006、K10024、K10025、K10026、K10027、K10028、K10029、K10030、K12031、K12032、K12033，编号分别为 S1 ～ S16。乙酸乙酯为市售分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent HP-5（30 m×0.32 mm，0.25 μm）；进样口温度为 230 ℃；进样量为 1 μL；载气为高纯氮气，载气纯度≥ 99.999%；载气流速为 1.80 mL·min^{-1}；进样方式为分流进样，分流比为 10∶1；升温程序：初始温度为 45 ℃，保持 5 min，以 3 ℃·min^{-1} 的速率升温至 78 ℃；以 2 ℃·min^{-1} 的速率升温至 102 ℃；以 1 ℃·min^{-1} 的速率升温至 111 ℃，保持 4 min；以 1 ℃·min^{-1} 的速率升温至 120 ℃，保持 5 min；以 3 ℃·min^{-1} 的速率升温至 140 ℃，保持 3 min。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑、桂皮醛、丹皮酚、α- 蒎烯、芳樟醇对照品各适量，加乙酸乙酯溶解并制成每 1 mL 分别含乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑、桂皮醛、丹皮酚、α- 蒎烯、芳樟醇 500 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 参照挥发油测定法（《中国药典》2020 年版四部通则 2204 甲法），精密称取固肾定喘丸粉末 25 g，置 500 mL 圆底烧瓶中，加水 350 mL 与玻璃珠数粒，自测定器上端加水使充满刻度部分，并溢流入烧瓶为止，再加乙酸乙酯 2 mL，连接回流冷凝管，加热至沸，并保持微沸约 5 h，至测定器中油量不再增加，停止加热，放冷，分取乙酸乙酯液，作为供试品溶液。

2.3 指纹图谱

2.3.1 精密度试验 取固肾定喘丸（批号：R03001）样品 1 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，连续进样 6 次，记

录色谱图，以 9 号峰为参照峰，计算指纹图谱中规定的共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示，16 个共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.090%（n = 6），相对峰面积的 *RSD* 均小于 1.0%（n = 6），表明仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取固肾定喘丸（批号：R03001）样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于室温放置 0、3、6、9、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算指纹图谱中规定的共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示，以 9 号峰为参照峰，16 个共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.070%（n = 6），相对峰面积的 *RSD* 均小于 1.0%（n = 6），表明待测样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取固肾定喘丸（批号：R03001）样品 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以 9 号峰为参照峰，计算指纹图谱中规定的共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示，16 个共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.13%（n = 6），相对峰面积的 *RSD* 均小于 1.2%（n = 6），表明本测定方法的重复性良好，准确度较高。

2.3.4 固肾定喘丸 GC 指纹图谱的建立 精密称取 16 批固肾定喘丸样品适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液（S1 ～ S16），按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，将待测样品的气相色谱图谱数据导入国家药典委员会发布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件中，用多点校正后进行自动匹配（时间窗为 0.1 min），用平均数法生成待测样品的气相指纹图谱和固肾定喘丸的标准气相指纹图谱，共标识出 16 个共有峰；根据混合对照品溶液气相指纹图谱进行保留时间、紫外吸收光谱比对，共指认出 7 种成分，分别为 3 号峰 α- 蒎烯，4 号峰芳樟醇，5 号峰樟脑，6 号峰龙脑，8 号峰桂皮醛，9 号峰乙酸龙脑酯，12 号峰丹皮酚。其中乙酸龙脑酯峰面积较大，保留时间适中，峰形稳定，并且在所有样品中均存在，故选择其为参照峰（S），具体图谱见图 1 ～ 3。

2.3.5 指纹图谱相似度评价 将 16 批固肾定喘丸待测样品的气相指纹图谱与相同指纹图谱检测条件下获得的固肾定喘丸标准气相指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件进行相似度比较，计算相似度。结果显示，16 批固肾定喘丸指纹图谱的相似度均在 0.98 以上，说明不同批次的固肾定喘丸相似度较高，整体质量较为稳定，见表 1。

2.4 含量测定

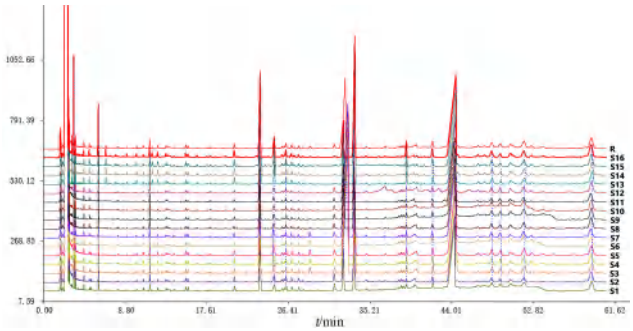


图 1 16 批固肾定喘丸的叠加 GC 指纹图谱

Fig 1 GC fingerprints of 16 batches of Gushen Dingchuan pills

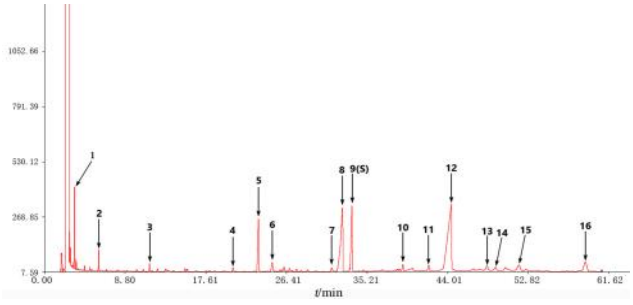


图 2 固肾定喘丸标准 GC 指纹图谱

Fig 2 GC fingerprints of Gushen Dingchuan pills

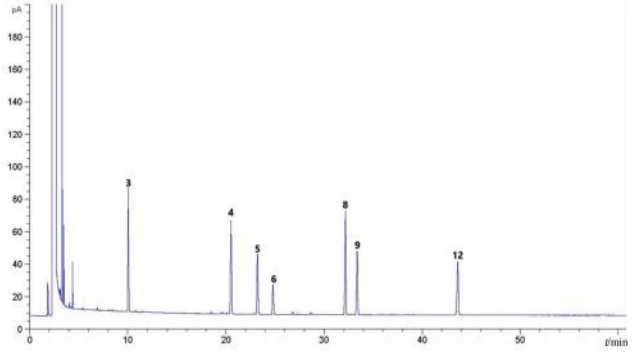


图 3 混合对照品溶液的 GC 图谱

Fig 3 GC chromatogram of mixed control solution

3. α- 蒎烯（α-pinene）；4. 芳樟醇（linalool）；5. 樟脑（camphor）；6. 龙脑（borneol）；8. 桂皮醛（cinnamaldehyde）；9. 乙酸龙脑酯（bornyl acetate）；12. 丹皮酚（paeonol）

表 1 16 批固肾定喘丸相似度评价结果

Tab 1 Similarity of 16 batches of Gushen Dingchuan pills

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.995	S9	0.989
S2	0.996	S10	0.992
S3	0.991	S11	0.995
S4	0.985	S12	0.995
S5	0.990	S13	0.991
S6	0.993	S14	0.987
S7	0.997	S15	0.990
S8	0.993	S16	0.998

2.4.1 系统适用性及专属性试验 取“2.2”项下各溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。结果显示供试品、对照品溶液色谱图中各成分的

色谱峰保留时间一致，各成分峰完全分离，理论塔板数均在 8000 以上。

2.4.2 线性关系 取“2.2.1”项下混合对照品溶液，用乙酸乙酯稀释成系列质量浓度，分别进样测定。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）作线性回归，结果见表 2。

表 2 线性范围结果

Tab 2 Linearity

成分	回归方程	线性范围 /（μg・mL^{-1}）	r
α- 蒎烯	$Y = 1.4128X - 1.1026$	16.96 ～ 169.64	0.9998
芳樟醇	$Y = 5.6999X + 1.6952$	12.75 ～ 127.45	0.9999
樟脑	$Y = 1.8343X + 3.7376$	267.89 ～ 2678.94	0.9999
龙脑	$Y = 1.5472X - 1.6735$	75.60 ～ 755.96	0.9998
桂皮醛	$Y = 1.7361X + 2.4457$	273.92 ～ 2739.24	0.9999
乙酸龙脑酯	$Y = 6.6693X - 3.2136$	142.99 ～ 1429.92	0.9999
丹皮酚	$Y = 1.0191X + 2.3264$	608.88 ～ 6088.80	0.9999

2.4.3 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，结果 α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯、丹皮酚峰面积的 *RSD*（$n = 6$）分别为 1.2%、0.91%、0.54%、0.92%、1.2%、0.53%、0.96%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样检测，结果 α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯、丹皮酚峰面积的 *RSD*（$n = 6$）分别为 0.94%、1.1%、1.1%、1.1%、0.95%、0.60%、0.70%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取固肾定喘丸（批号：R03001）样品 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，结果 α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯、丹皮酚的平均含量依次为 4.04、3.02、84.70、18.18、65.72、34.04、193.27 μg•g^{-1}，*RSD*（$n = 6$）分别为 0.87%、0.95%、0.96%、0.68%、0.53%、0.70%、0.85%，表明本方法重复性良好。

2.4.6 加样回收试验 取各成分已知含量的固肾定喘丸（批号:R03001）6 份，每份 12.5 g，精密称定，分别精密加入相当于该样品中指标成分量 100% 的 α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯和丹皮酚对照品储备液适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别进样测定，计算得 α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯和丹皮酚的平均加样回收率分别为 98.62%、98.71%、98.37%、99.02%、99.79%、99.14%、98.76%，*RSD*（$n = 6$）分别为 1.2%、0.96%、1.4%、1.1%、1.0%、0.92%、1.0%，均小于 1.5%，符合方法学要求。

2.4.7 样品含量测定 取 16 批固肾定喘丸，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别进样测定，外标法计算各成分含量，结果见表 3。

表 3 16 批固肾定喘丸样品含量测定结果 (μg・g^{-1})

Tab 3 Content of 16 batches of Gushen Dingchuan pills (μg・g^{-1})

样品	α- 蒎烯	芳樟醇	樟脑	龙脑	桂皮醛	乙酸龙脑酯	丹皮酚
S1	4.04	3.02	84.70	18.18	65.72	34.04	193.27
S2	4.11	3.04	60.02	15.86	64.35	34.75	196.08
S3	4.24	2.89	79.69	13.91	67.26	29.85	198.84
S4	3.99	2.87	58.52	14.98	66.77	31.30	198.53
S5	3.95	3.13	48.21	13.36	62.64	31.12	195.07
S6	4.28	3.15	63.63	14.25	62.82	33.96	194.47
S7	3.93	3.15	49.53	14.35	66.67	29.53	198.08
S8	4.19	2.99	50.28	16.63	68.58	33.50	196.70
S9	4.22	3.05	62.78	15.91	64.75	34.88	197.84
S10	4.11	3.09	61.48	15.13	67.67	32.98	193.83
S11	4.01	2.94	61.42	13.58	66.79	35.29	198.72
S12	3.85	3.02	66.80	16.58	63.58	32.98	194.35
S13	3.95	3.02	64.63	17.91	66.64	35.10	198.43
S14	4.02	3.01	81.47	15.34	62.97	34.36	197.48
S15	3.90	3.04	71.30	17.78	64.95	32.88	193.14
S16	4.11	3.10	66.02	15.76	67.51	34.43	197.99

3 讨论

本试验建立了固肾定喘丸的 GC 指纹图谱，标定了 16 个共有峰，通过文献资料查阅，并结合中国食品药品检定研究院现有的对照品比对法指认了其中 7 个共有峰。指纹图谱相似度结果表明，16 批固肾定喘丸样品的相似性较好，但成分的含量存在显著差异，可能为生产所用药材批次质量不同所致。

中药指纹图谱具有整体、宏观、模糊分析等特点，根据中药多组分、多靶点的整体综合作用的特点，从“全成分”的角度出发，通过对中药整体特征的描述，可披露出常规检验难以发现的质量问题，是现代一种重要的质量控制方法，对非单一成分药物的质量控制更加全面 [19]。中药质量控制检测作为中药市场可持续发展的基础，将指纹图谱检测方式运用在中药质量控制检测中，对中药质量控制发展有重要作用 [20-21]。固肾定喘丸组方药材较多，挥发性成分丰富。本研究建立了固肾定喘丸 GC 指纹图谱，并同时测定其中 7 种指标成分 α- 蒎烯、芳樟醇、樟脑、龙脑、桂皮醛、乙酸龙脑酯和丹皮酚的含量，结果表明该含量测定方法线性范围广，准确度高，重复性、精确度良好，供试品中各指标成分含量较高，相较单一检测法能更全面地反映制剂的指纹图谱特征和质量，为固肾定喘丸的质量控制及标准完善提供参考依据。

参考文献

[1] 杨勋，胡红玲，赵苏，等 . 固肾定喘丸对慢性阻塞性肺疾病患者稳定期肺功能及生活质量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（22）：283-286.

[2] 韩泽璐，王建新，韩静，等 . 固肾定喘丸治疗慢性阻塞性肺疾病的有效性和安全性的系统评价 [J]. 中国中医急症，2021，30（1）：32-36.

[3] 桂坤，杨俊，龙启忠，等 . 固肾定喘丸对稳定期肺肾气虚证慢性阻塞性肺疾病患者的康复观察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（8）：89-94.

[4] 孙皇举 . 固肾定喘丸辅助孟鲁司特钠对 COPD 急性期患者血清学指标和肺功能的影响 [J]. 临床研究，2020，28（2）：119-120.

[5] 任元吉 . 固肾定喘丸联合沙美特罗替卡松治疗慢性持续期支气管哮喘的疗效及对肺功能的影响 [J]. 齐齐哈尔医学院学报，2020，41（21）：2690-2692.

[6] 师永社 . 苏子降气汤联合固肾定喘丸对慢阻肺稳定期患者肺功能及生活质量的影响 [J]. 临床医学研究与实践，2019，4（27）：149-151.

[7] 杨娟 . 固肾定喘丸对稳定期慢性阻塞性肺疾病的调理作用 [J]. 中国实用乡村医生杂志，2022，29（3）：30-32.

[8] 杨秀青，孙维旭 . 固肾定喘丸联合西药治疗肺肾气虚型支气管哮喘的疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志，2022，17（6）：1252-1254.

[9] 邓明玲，巴燕，温奕超 . 稳定期辨证用药对慢性阻塞性肺疾病频繁急性加重表型的获益评价 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（16）：182-187.

[10] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：1140-1141.

[11] 周月玲 . HPLC 测定固肾定喘丸中丹皮酚的含量 [J]. 药物与人，2014，27（4）：59.

[12] 邝晓霞，彭红英 . HPLC 法测定固肾定喘丸中补骨脂素的含量 [J]. 中药材，2002，25（5）：354-355.

[13] 张颖，李志平，高雨秋，等 . 固肾定喘丸多指标成分一测多评法的建立及质量评价 [J]. 中国药房，2022，33（18）：2230-2234.

[14] 陈锋，罗金荣，邓聿胤，等 . 肉桂不同部位挥发油 3 种成分的含量测定及其体外透皮特性研究 [J]. 中南药学，2024，22（7）：1757-1761.

[15] 王彩虹，邱智东，王永春，等 . 牡丹皮的现代研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中药材，2023，46（9）：2361-2369.

[16] 范冰冰，仲人中，马壮，等 . 补骨脂的药理学研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2024，42（4）：84-87.

[17] 陈树东，邓婕，陈智安，等 . 气相色谱 - 质谱联用法比较分析不同产地砂仁挥发油成分 [J]. 上海中医药杂志，2022，56（8）：96-101.

[18] 陆山红，赵荣华，幺晨，等 . 砂仁的化学及药理研究进展 [J]. 中药药理与临床，2016，32（1）：227-230.

[19] 孙国祥，闫波，侯志飞，等 . 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展 [J]. 中南药学，2015，13（7）：673-681.

[20] 张畅然 . 指纹图谱在中药质量控制中的应用探讨 [J]. 内蒙古中医药，2022，41（6）：124-125.

[21] 马思文，车宏伟，孟雅，等 . 疏清颗粒高效液相色谱指纹图谱的建立及相关性研究 [J]. 中南药学，2023，21（11）：3014-3019.

（收稿日期：2024-07-22；修回日期：2024-09-04）

综述

天然有机硫化物蒜氨酸抗动脉粥样硬化研究进展

尤强[1, 2]，唐媛媛[1*]（1. 成都中医药大学附属医院，成都 610072；2. 海南医科大学第二附属医院，海口 570100）

摘要：动脉粥样硬化病变给人们的生命健康安全带来了巨大的危害，近年来，有关研究表明天然有机硫化物蒜氨酸在抗动脉粥样硬化病变中具有重要作用。本综述主要从蒜氨酸抑制活性氧（ROS）生成，抑制 PCSK9 活性，激活 AMPK/SREBP-1c/SREBP-2 信号通路和抑制 ApoB-100 蛋白的表达等方面介绍蒜氨酸在防治动脉粥样硬化病变中起到的保护作用。

关键词：动脉粥样硬化；天然有机硫化物；蒜氨酸；研究进展

中图分类号：R283，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3041-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.034

Research progress in anti-atherosclerosis property of natural organic sulfide alliin

YOU Qiang[1, 2], TANG Yuan-yuan[1*] (1. *Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*, *Chengdu* 610072; 2. *The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University*, *Haikou* 570100)

Abstract: Atherosclerotic lesions bring great harm to people's lives. In recent years, many studies have shown that natural organic sulfide alliin plays an important role in anti-atherosclerotic lesions. This review mainly introduced the effect of alliin on the prevention and treatment of atherosclerotic lesions via inhibiting reactive oxygen species (ROS) production and PCSK9 activity, activating AMPK/SREBP-1c/SREBP-2 signaling pathway and inhibiting the expression of ApoB-100 protein.

Key words: atherosclerosis; natural organic sulfide; alliin; research progress

动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）的发病机制复杂且多样，包含了脂质代谢紊乱、慢性炎症、内皮损伤和脂质泡沫形成等多种因素[1-3]。其中，脂质代谢紊乱约占 AS 发病机制的 1/3[4-5]。人体脂质代谢的主要场所在肝脏，涉及脂肪的产生和分解以及血清脂蛋白的摄入和分泌等过程。血清脂蛋白主要包含低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）、中密度脂蛋白（intermediate density lipoprotein，IDL）和高密度脂蛋白（high density lipoprotein，HDL）。诺贝尔奖获得者 Goldstein 和 Brown 提出 LDL 通过低密度脂蛋白受体（low density lipoprotein receptor，LDLR）介导的内吞作用降低循环中 LDL-胆固醇（LDL-C）含量[6-7]。研究显示，*LDLR* 基因缺失家族后代患 AS 风险较 *LDLR* 基因未缺失者明显上升[8-9]。因此，LDL 受体在调节脂质代谢抗 AS 形成中具有重要意义。

野蒜是石蒜科的野生植物。野蒜广泛分布于亚洲和欧洲，被称为熊蒜、熊韭菜和木蒜，该植物的浓郁风味使其成为生活在亚洲和欧洲的人的流行调味品和常规饮食成分。野蒜瓣冻干物中富含多种天然有机硫化物，其中蒜氨酸（alliin）存在于未被切开的野蒜瓣细胞质中，当蒜瓣被切开时 alliin 便在蒜氨酸酶的作用下产生具有刺鼻气味的大蒜素[10]。

我国古代便有生吃大蒜防治 AS 的传统。目前市面上治疗 AS 的药物主要为他汀类药物，但

基金项目：海南省自然科学基金面上项目（No.823MS148）；海南省卫生健康委员会项目（No.22A200257）；海南省教育厅项目（No.Hnky2023-25）。

作者简介：尤强，男，副主任药师，主要从事中药化学研究，email：369727720@qq.com *通信作者：唐媛媛，女，主管药师，主要从事心血管药理学研究，email：282273213@qq.com

仍有部分患者不耐受，长期使用他汀类药物甚至出现了严重的肝肾损伤。Alliin 具有抗氧化、降脂、抗炎等多种和抗 AS 相关的药理学作用[11]。川北医学院药物研究所利用蛋白组学法就 alliin 对氧化低密度脂蛋白（ox-LDL）诱导损伤的人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）的保护作用进行了研究，KEGG 通路富集发现 alliin 通过调节胆固醇代谢通路，过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路和类固醇生物合成信号通路等发挥抗 AS 作用[12]。本文在 PubMed 和 Web of Science 数据库中对近年来有关 alliin 抗 AS 的相关文献进行检索，并综述了 alliin 抗 AS 的相关作用机制。

1 Alliin 与活性氧（reactive oxygen species，ROS）

1.1 ROS 的产生

ROS 由血管系统中的多种酶系统产生，其中包括 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶和内皮型一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）[13]。这些酶通过将电子从各自的底物转移到 O_2^- 催化氧的还原。ROS 的过量产生使机体处于氧化应激状态，会导致机体炎症反应，内皮功能障碍和脂质代谢紊乱，是导致 AS 发生和发展的危险因素。

1.2 ROS 与 LDL 的氧化修饰

LDL 氧化修饰可由 NADPH 氧化酶或未偶联的 eNOS 产生的 ROS 介导。ROS 与 LDL 氧化反应形成 ox-LDL，具有损伤血管内皮细胞，促进单核细胞黏附，诱导巨噬细胞分化为泡沫细胞，进而促进 AS 斑块形成等重要作用。LDL 在早期被认为是与 AS 联系最密切的蛋白，后来直到泡沫细胞的发现让人们明白 ox-LDL 才是致 AS 的关键因子[14]。

1.3 Alliin 对 ROS 生成的抑制作用

研究显示，alliin（0 ～ 100 μg • mL^{-1}）对血管壁细胞 ROS 的生成呈浓度依赖型抑制作用，这种抑制作用主要通过下调 NADPH 氧化酶表达来实现[15]。在早期，alliin 通过下调 NADPH 氧化酶的表达抑制细胞衰老而被用作骨质疏松的潜在治疗剂[16]。Chen 团队[17]以大蒜粉（alliin 含量 10%）治疗 AS 患者发现，患者血管壁 AS 斑块面积明显减小，并在 AS 斑块中检测到了 NADPH 氧化酶亚型 NOX-1 的表达减少。Alliin 对 NOX-1 表达的抑制作用还被用于清除 ROS 从而减少 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞氧化损伤[18]。研究表明，alliin 还可通过激活 Nrf2/ARE 通路，增加对自由基 DPPH 的清除能力和铁离子的螯合能力发挥抗氧化作用。

2 Alliin 与 PCSK9

2.1 PCSK9 与 LDLR 的降解

前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 kexin9（proprotein convertase subtilisin kexin 9，PCSK9）于 2000 年初期被发现，因其具有降解 LDLR 和清除循环中的 LDL-C 的能力被称为调节 LDL-C 代谢的“关键因子”。PCSK9 降解 LDLR 的机制涉及细胞外和细胞内两种途径[19]。第一种途径：细胞外的 PCSK9 可以作为伴随蛋白，与细胞表面的 LDLR 结合，形成 PCSK9-LDLR 复合物并将复合物引导至溶酶体中降解。第二种途径：细胞内的 PCSK9 还可以直接与高尔基体中的 LDLR 结合，诱导 LDLR 的降解。

2.2 Alliin 对 PCSK9 活性的抑制作用

血脂异常，尤其是 LDL-C 含量升高，是致 AS 发生和发展的首要因素[20]。人体内 LDL-C 水平主要由肝脏 LDLR 的数量及 PCSK9 的活性来决定，当 PCSK9 活性增加时便会促进 LDLR 降解从而增加循环 LDL-C 水平[21]。欧洲一项研究表明，使用他汀类药物的患者只有 43% 达到了降低 LDL-C 的目的[22]。因此，PCSK9 抑制剂作为降低高胆固醇血症患者 LDL-C 水平的新靶点，近年来一直被广泛研究。

Ben 等[23]通过对 PCSK9-OSCs（前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 kexin 9- 大蒜衍生有机硫化物）成分计算分析发现，alliin 是 PCSK9 活性的最佳抑制剂。PCSK9 具有溶解 LDLR 的能力，因此 alliin 对 PCSK9 活性的抑制作用的发现预示着 alliin 具有降低循环 LDL-C 水平的潜力。这对于某些他汀类药物不耐受和联合使用依折麦布治疗仍未充分降脂的患者而言具有重要意义。

3 Alliin 与 AMPK/SREBP-1c/SREBP-2 信号通路

3.1 AMPK 与 AS

腺苷酸活化蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate（AMP）-activated protein kinase，AMPK] 在各种生理和病理条件下，可被上游激酶磷酸化，从而导致其激活。AMPK 激活会抑制由线粒体功能障碍和内质网应激诱导的 ROS 产生；AMPK 激活能减少由血脂异常和高血糖诱导的促炎因子的生成；AMPK 激活还可通过增加一氧化氮（NO）的生物利用度来防止血管内皮功能障碍[24-25]。因此，AMPK 的激活成为预防和治疗 AS 的又一重要靶点。

3.2　Alliin 与 AMPK/SREBP-1c/SREBP-2 的激活

Peng 等[26]发现，allin 可通过激活 AMPK 及调节其下游固醇调节元件结合蛋白 -1c（SREBP-1c）和固醇调节元件结合蛋白 -2（SREBP-2）的表达来降低 1，3- 二氯丙醇（1，3-DCP）诱导的 HepG2 细胞中三酰甘油和胆固醇的积累。SREBP-1c 主要在肝脏、肠道和脂肪组织中表达，参与调控三酰甘油和胆固醇的合成。研究表明，SREBP-1c 的过度激活会导致肥胖和脂肪肝等代谢性疾病的发生。Hartley 等[27]证实，alliin 可以通过抑制 SREBP-1c 的表达减少游离脂肪酸诱导的肝细胞脂质的积累。SREBP-2 是负责调节人体胆固醇合成的关键转录因子。当内质网中胆固醇水平降低时，SREBP-2 将激活，同时增加 LDLR 在高尔基体内的合成，促进循环中的胆固醇摄取入细胞，降低血浆中 LDL-C 含量。研究发现，alliin 通过激活 SREBP-2/LDLR 通路显著降低高脂饮食喂养 SD 大鼠血浆中 LDL-C 含量[28]。

4　Alliin 抑制 ApoB-100 蛋白的表达

载脂蛋白是血浆脂蛋白的重要结构成分，通过调节血浆脂蛋白的代谢影响 AS 过程。载脂蛋白 B-100（ApoB-100）属于载脂蛋白 B（ApoB）家族成员，是 LDL、IDL 和极低密度脂蛋白的重要组成成分。ApoB-100 在结构上成环状包围在 LDL 四周，主要负责 LDL 的转运，同时也是 LDLR 的配体[29]。ApoB-100 抑制剂米泊美生于 2013 年被 FDA 批准上市，通过抑制 mRNA 的表达从而抑制肝脏 ApoB-100 的合成，主要用于降低人体内 LDL-C、ApoB 和总胆固醇的含量[30]。与米泊美生相类似的一项研究表明，alliin 通过抑制 ApoB-100 的表达从而调节胆固醇代谢发挥对 ox-LDL 诱导损伤的 HUVECs 的保护作用[12]。

5　总结和展望

Alliin 抗 AS 机制如图 1 所示[13-30]。目前为止，alliin 尚未被用于治疗 AS。推测其原因主要有两个方面：一是对 alliin 的研究主要停留在细胞和动物层面，没有进入临床试验，这与缺乏标准化的剂量数据和具体的 alliin 衍生化合物上市有关；二是其稳定性和半衰期较差。为了提高其稳定性和半衰期，研究人员将 alliin 和卡托普利结合，产生了 *S*- 烯丙基巯基卡托普利，这种化合物更加稳定，显示出抗高血压、降脂和降低同型半胱氨酸的作用。相信随着更多关于 alliin 和抗 AS 之间关系研究的进展，alliin 抗 AS 的机制会有更新的发现。

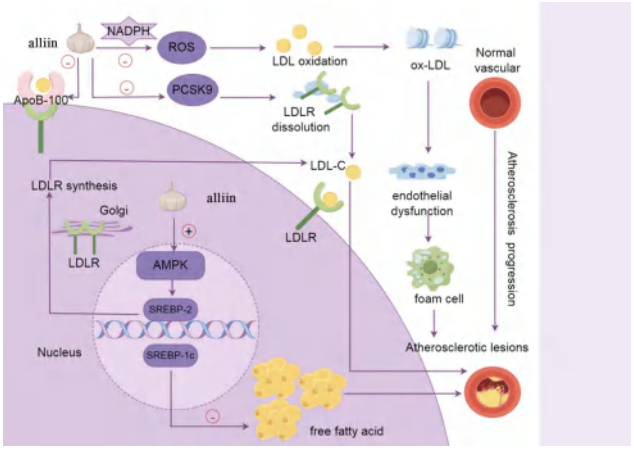


图 1　Alliin 抗 AS 作用机制图

Fig 1　Mechanism diagram of anti-atherosclerosis effect of alliin

参考文献

[1] Goldsborough E，Osuji N，Blaha MJ. Assessment of cardiovascular disease risk：a 2022 update [J]. Endocrinol Metab Clin North Am，2022，51（3）：483-509.

[2] Bayoumi E，Karasik P. Cardiovascular disease in older women [J]. Clin Geriatr Med，2021，37（4）：651-665.

[3] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. Nature，2021，592（7855）：524-533.

[4] Zhang S，Hong FF，Ma C. Hepatic lipid metabolism disorder and atherosclerosis [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets，2022，22（6）：590-600.

[5] Riccardi G，Giosuè A，Calabrese I，et al. Dietary recommendations for prevention of atherosclerosis [J]. Cardiovasc Res，2022，118（5）：1188-1204.

[6] Kattoor AJ，Pothineni NVK，Palagiri D，et al. Oxidative stress in atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep，2017，19（11）：42-52.

[7] Kattoor AJ，Kanuri SH，Mehta JL. Role of ox-LDL and lox-1 in atherogenesis [J]. Curr Med Chem，2019，26（9）：1693-1700.

[8] Khatana C，Saini NK，Chakrabarti S，et al. Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，15（1）：524-530.

[9] Lupo MG，Biancorosso N，Brilli E，et al. Cholesterol-lowering action of a novel nutraceutical combination in uremic rats：insights into the molecular mechanism in a hepatoma cell line [J]. Nutrients，2020，12（2）：436-444.

[10] Li ZL，Zhao P，Zhang YJ，et al. Exosome-based ldlr gene therapy for familial hypercholesterolemia in a mouse model [J]. Theranostics，2021，11（6）：2953-2965.

[11] Shang A，Cao SY，Xu XY，et al. Bioactive compounds and biological functions of garlic（*Allium sativum* L.）[J]. Foods，2019，8（7）：246-255.

[12] 唐媛媛 . 蒜氨酸对 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用研究 [D]. 南充：川北医学院，2020.

[13] Patriki D，Saravi SSS，Camici GG，et al. PCSK9：a link

between inflammation and atherosclerosis [J]. Curr Med Chem，2022，29（2）：251-267.
[14] Nasim SA，Dhir B，Kapoor R，et al. Alliin obtained from leaf extract of garlic grown under in situ conditions possess higher therapeutic potency as analyzed in alloxan-induced diabetic rats [J]. Pharm Biol，2011，49（4）：16-21.
[15] Hwang YP，Kim HG，Choi JH，et al. *S*-allyl cysteine attenuates free fatty acid-induced lipogenesis in human HEPG2 cells through activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway [J]. J Nutr Biochem，2013，24（8）：69-78.
[16] Liu MT，Lu J，Yang ST，et al. Alliin alleviates LPS-induced pyroptosis via promoting mitophagy in THP-1 macrophages and mice [J]. Food Chem Toxicol，2022，160（2）：112-131.
[17] Chen YQ，Sun JJ，Dou C，et al. Alliin attenuated rankl-induced osteoclastogenesis by scavenging reactive oxygen species through inhibiting Nox1 [J]. Int J Mol Sci，2016，17（9）：6-15.
[18] Nadeem MS，Kazmi I，Ullah I. Allicin，an antioxidant and neuroprotective agent，ameliorates cognitive impairment [J]. Antioxidants（Basel），2021，11（1）：87-97.
[19] Ahmad P，Alvi SS，Waiz M，et al. Naturally occurring organosulfur compounds effectively inhibits PCSK-9 activity and restrict PCSK-9-LDL-receptor interaction via in-silico and in-vitroapproach [J]. Nat Prod Res，2023，10（16）：1-10.
[20] Ding Z，Pothineni NVK，Goel A，et al . PCSK9 and inflammation：role of shear stress，pro-inflammatory cytokines，and Lox-1 [J]. Cardiovasc Res，2020，116（5）：908-915.
[21] Lu J，Cheng BJ，Meng ZQ，et al . Alliin attenuates 1，3-dichloro-2-propanol-induced lipogenesis in HEPG2 cells through activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway [J]. Life Sci，2018，195（3）：19-24.
[22] Li N，Chen K，Dong HW. Alliin inhibits adipocyte differentiation by downregulating Akt expression：implications for metabolic disease [J]. Exp Ther Med，2021，21（6）：563-570.
[23] Ben Ammar R，Mohamed ME，Alfwuaires M. Anti-inflammatory activity of geraniol isolated from lemon grass on ox-LDL-stimulated endothelial cells by upregulation of heme oxygenase-1 via PI3K/Akt and Nrf-2 signaling pathways [J]. Nutrients，2022，14（22）：17-28.
[24] Soran H，France MW，Kwok S，et al. Apolipoprotein b100 is a better treatment target than calculated LDL and non-HDL cholesterol in statin-treated patients [J]. Ann Clin Biochem，2011，48（6）：566-571.
[25] Dunér P，Mattisson IY，Fogelstrand P. Antibodies against ApoB100 peptide 210 inhibit atherosclerosis in apoe$^{-/-}$ mice [J]. Sci Rep，2021，11（1）：9-22.
[26] Peng Y，Wang YY，Zhou C. PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics：are we making headway [J]. Front Oncol，2022，12（1）：81-98.
[27] Hartley A，Haskard D，Khamis R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis-novel insights and future directions in diagnosis and therapy [J]. Trends Cardiovasc Med，2019，29（1）：22-26.
[28] Li X，Hu XL，Pan TF，et al. A new anthraquinone compound，attenuates lipid accumulation by activating the AMPK/SREBP-2/PCSK9/LDLR signalling pathway [J]. Bio Pharm，2021，6（2）：110-133.
[29] Chyu KY，Zhao X，Zhou J，et al. Immunization using ApoB-100 peptide-linked nanoparticles reduces atherosclerosis [J]. JCI Insight，2022，7（11）：1-12.
[30] Hovingh K，Besseling J，Kastelein J. Efficacy and safety of mipomersen sodium（Kynamro）[J]. Expert Opin Drug Saf，2013，12（4）：69-79.

（收稿日期：2024-03-29；修回日期：2024-05-29）

中药干预糖尿病血管内皮功能障碍的研究进展

郭万慧[1, 2]，韩超[1, 2]，李小龙[1]，宋蕾[1]，彭雁飞[2]，周昆[1]，王玉环[3]，孙力康[2*]（1.天津中医药大学中医药研究院，天津　301600；2.天津中医药大学中西医结合学院，天津　301600；3.西安交通大学第二附属医院，西安　710004）

摘要：糖尿病血管病变（DA）是糖尿病的主要重症并发症之一，其患病率逐年增长甚至年轻化，已成为亟待解决的全球性健康问题。研究发现，内皮功能障碍是推动糖尿病血管病变发生与发展的重要因素，其诱因众多且发病机制尚不明确。中药化学单体和复方可通过提高一氧化氮生物利用度、抑制血管紧张素Ⅱ合成、抑制氧化应激、抑制炎症因子、调节血管生成因子和抑制血栓形成等药理作用干预糖尿病引起的血管内皮功能障碍。因此，本文基于国内外实验研究，概述中药干预糖尿病血管内皮功能障碍的作用机制及其相关信号通路。

关键词：糖尿病血管病变；内皮功能障碍；一氧化氮；机制；中药
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-3045-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.035

Research progress in traditional Chinese medicine intervention on vascular endothelial dysfunction in diabetes

GUO Wan-hui[1, 2], HAN Chao[1, 2], LI Xiao-long[1], SONG Lei[1], PENG Yan-fei[2], ZHOU Kun[1], WANG Yu-huan[3], SUN Li-kang[2*] (1. *Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin*　301600; 2. *School of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin*　301600; 3. *The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University*, *Xi'an*　710004)

Abstract: Diabetic angiopathy (DA) is a major complication of diabetes mellitus, which has become an urgent global health issue due to its increasing prevalence among the youth. It has been found that endothelial dysfunction is an important factor for the occurrence and development of diabetis angiopathy, but its causative factors vary and its pathogenesis remains unclear. Chinese herbal chemical monomers and combinations can intervene in diabetes-induced vascular endothelial dysfunction through pharmacological effects such as increasing the nitric oxide bioavailability, inhibiting angiotensin Ⅱ synthesis, suppressing oxidative stress, inhibiting inflammatory factors, regulating angiogenic factors, and inhibiting thrombosis. Therefore, based on domestic and international experimental studies, this paper outlined the mechanism of action of traditional Chinese medicine in intervening diabetic vascular endothelial dysfunction and its related signaling pathways.

Key words: diabetis angiopathy; endothelial dysfunction; nitric oxide; mechanism; traditional Chinese medicine

糖尿病血管病变（diabetic angiopathy，DA）是糖尿病（diabetes mellitus，DM）最常见且严重的并发症之一[1]。DA 根据病变血管的不同分为大血管病变与微血管病变。大血管发生病变会造成外周血管病变、糖尿病性心脑血管病和动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）等；微血管出现病变会引发糖尿病视网膜病变（diabetic retinopathy，DR）和糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）等。

内皮功能障碍是发生在 DA 早期的病理状态，其发病机制复杂，可能与 DA 患者血液中血

基金项目：校企合作项目“通脉降糖胶囊治疗二型糖尿病的机理及其血管保护作用研究”（No.TM01）。
作者简介：郭万慧，女，硕士研究生，主要从事糖尿病药理学方面的研究，email：1457871628@qq.com　*通信作者：孙力康，男，教授，主要从事糖尿病及胰腺相关疾病方面的研究，email：likang.sun@bluewin.ch

糖、氧化型低密度脂蛋白、胰岛素等水平异常[2]，进而打破血管内皮细胞（vascular endothelial cell，VEC）微环境中血管舒张因子与血管收缩因子、促炎因子与抑炎因子、促凝血因子与抗凝血因子之间的平衡稳态有关[3-4]，治疗内皮功能障碍有望成为防治 DA 的主要途径。

1 中药干预糖尿病内皮功能障碍的主要机制

1.1 提高一氧化氮（nitric oxide，NO）生物利用度

NO 作为血管舒张因子，具有抗血栓、抗氧化、抗炎的作用[5-6]。研究发现，60 g·kg^{-1} 黄芪桂枝五物汤灌胃给药两周可通过抑制 DM 小鼠主动脉精氨酸酶活性，使 NO 合成增多，从而降低下肢脚掌反应性充血时间，提高主动脉血管内皮依赖性舒张功能[7]。梓醇是从地黄根中提取的主要有效成分，Sun 等[8]通过晚期糖基化终末产物（advanced glycation end products，AGEs）诱导肾小球内皮细胞进行体外实验，证实梓醇可以通过抑制诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）的表达，增加 eNOS-Ser1177 的磷酸化来提高 NO 合成水平，恢复内皮舒张功能，并且增加内皮紧密间隙连接蛋白表达水平恢复肾小球内皮屏障的完整性。此外，有研究结果表明，丹参 - 葛根药对灌胃给药 70 d 可显著降低 DA 大鼠血浆中内皮素（endothelin-1，ET-1）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量，升高 NO 和一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）水平，维持内皮细胞 ET-NO 系统的平衡，从而减轻冠状动脉组织内膜增厚、管腔狭窄、纤维组织增生和炎细胞浸润的病变程度[9]。

1.2 抑制血管紧张素Ⅱ（angiotensinⅡ，AngⅡ）合成

肾素 - 血管紧张素系统可维持机体血压稳定和水钠、电解质平衡的体液循环。AngⅡ作为肾素 - 血管紧张素系统中的主要活性成分之一，其过度分泌可激活血管内皮细胞丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、抑制胰岛素受体底物（IRS-1）/ 磷脂酰肌醇 3- 激酶（PI3K）信号通路，减少 NO 分泌，刺激活性氧（reactive oxygen species，ROS）生成，造成内皮功能障碍[10]。有研究表明，21 g·kg^{-1} 六味地黄汤给药 8 周可通过抑制 DN 模型大鼠血清肾素、AngⅡ水平，降低肾组织血管紧张素转化酶（ACE）/AngⅡ / AngⅡ 1 型受体（AT1R）通路相关蛋白表达水平，减轻肾小球基底膜增厚和肾脏纤维化的病理程度[11]。此外，刘薇等[12]的研究证实，给予活血化瘀方进行为期 16 周的治疗干预不仅可显著降低 DM 大鼠总胆固醇（total cholesterol，TC）、三酰甘油（triglyceride，TG）、低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein，LDL-C）水平来改善脂质代谢，还可降低血清中 AngⅡ、ROS 水平，抑制 DM 大鼠腹主动脉组织血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）和 AT1R 蛋白表达水平，改善血管内皮舒张功能，延缓 AS 的发生发展。

1.3 抑制氧化应激

氧化应激在 DA 的发展中起着关键作用，甚至可能是高血糖相关疾病的共同上游机制。通过氧化性低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，ox-LDL）诱导人脐静脉内皮细胞（HUVECs）的体外实验发现，丹参的有效成分丹酚酸 A 可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ- 辅激活因子 -1α（PGC-1α）/ 线粒体转录因子 A（TFAM）信号通路，增加 HUVECs 中线粒体数量，抑制氧化应激及其产物的生成[13]。许笑雯等[14]的研究发现抵当陷胸汤含药血清可显著抑制高糖诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞晚期糖基化终末产物受体（receptor for advanced glycation end products，RAGE）蛋白表达水平，降低 AGEs、ROS 含量及甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）氧化酶活性，恢复细胞氧化还原平衡，增强大鼠心肌微血管内皮细胞抗氧化作用。还有研究发现黄芪多糖可以显著上调 DN 大鼠血清中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）水平，抑制氧化应激，改善肾小球系膜增生、肾小管扩张及上皮细胞气球样变等病理变化[15]。

1.4 抑制炎症因子表达

炎症反应以血液中炎症介质水平升高为基本特征，可激活核转录因子 -κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）、C- 反应蛋白（C-reaction protein，CRP）、NLRP3 炎症小体等信号通路，造成血管壁及其周围出现大量炎细胞浸润，导致内皮细胞损伤或坏死[16]。Li 等[17]通过体内实验发现，中药复方生蒲黄汤给药 4 周可降低 NF-κB 的下游肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、NF-κB 激酶亚基β抑制因子（inhibitor of NF-κB subunit beta，IKKβ）的表达，抑制 DR 大鼠视网膜血管炎症，降低血管通透性。活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1（cysteinyl aspartate specific proteinase 1，caspase1）是 NLRP3 炎症小

体的功能效应单元，可调节促炎性细胞因子的生成继而引发细胞焦亡、血管内皮功能障碍和纤维化损伤。有研究表明，2.4 g·kg^{-1} 糖肾方灌胃给药 10 周可以抑制 2 型糖尿病（T2DM）大鼠肾组织中 NLRP3、caspase1 及其下游白细胞介素（IL）-1β、IL-18 的表达，缓解肾小管间质纤维化、系膜基质增生的病理损伤[18-19]。抵当汤是破血逐瘀的经典方剂，有研究表明 2.05 g·kg^{-1} 抵当汤灌胃给药 4 周可显著降低 DM 大鼠腹主动脉 CD68、TNF-α、E-选择素表达，抑制炎症反应损伤，有效增强 VEC 黏附连接，提高血管结构稳定性[20]。

1.5 调节血管生成因子表达

DM 患者常出现不同程度的血管生成失控。一方面，血管生成过度激活出现血管增生；另一方面，血管生成受到抑制则导致血管密度下降、伤口愈合缓慢[21]。黄芩苷作为中药黄芩中一种黄酮类有效成分，有研究表明其可有效抑制 DR 大鼠视网膜组织 IL-33/ 致癌抑制因子 2（ST2）信号通路相关蛋白的表达，改善视网膜血管基底膜增厚[22]。Pang 等[23]通过对 DN 大鼠皮下注射 100 mg·kg^{-1} 水蛭素 15 周进行体内实验，结果发现水蛭素可显著降低 DN 大鼠肾组织中 VEGF 和血栓调节蛋白的表达，抑制肾小球增生。此外，张梦笛等[24]通过建立 DM 合并心肌梗死大鼠模型，发现中药复方麝香通心滴丸灌胃给药 28 d 可提高模型大鼠心脏组织 VEGF、磷酸化血管内皮生长因子受体 2（phospho-VEGF receptor 2，p-VEGFR2）、促血管生成素 -1（angiopoietin-1，Ang-1）和酪氨酸激酶受体 -2 蛋白表达，增加微血管密度，促进 DM 合并心肌梗死大鼠血管新生，改善心肌微循环障碍。

1.6 抑制血栓形成

血管内皮受到损伤使其抗血栓功能紊乱或丧失，导致 NO、前列腺素 I_2（prostacyclin I_2，PGI_2）、血栓调理蛋白等抗凝血因子分泌减少。通过对 86 例 T2DM 合并 AS 患者进行临床试验，发现服用复方丹参滴丸 3 个月可显著增加 T2DM 患者血清中 PGI_2 水平，降低凝血酶时间、活化部分凝血活酶时间和纤维蛋白原水平，改善其抗凝血功能[25]。受损的 VEC 通过 P 选择素（P-selectin，Ps）介导血小板聚集并释放出多种促凝血因子，导致其血液处于高凝状态[26]。有研究表明，0.6 g·kg^{-1} 水蛭冻干粉给药 16 周可以降低 DN 大鼠血清中 Ps 和血管性血友病因子（von Willebrand factor，vWF）的表达水平，呈剂量依赖性降低全血黏度、血浆黏度及红细胞聚集指数，改善肾功能[27]。还有研究通过链脲佐菌素诱导载脂蛋白敲除小鼠建立 DM-AS 体内模型并皮下注射金合欢素 12 周，发现金合欢素可恢复模型小鼠血管壁弹性，缓解血管内膜增生、管周纤维化的病理变化，并通过调节血小板聚集和脂质代谢异常改善血管硬化及脂质斑块数量，保护血管内皮功能，抑制 AS 发展。

上述研究表明中药干预 DM 血管内皮细胞功能障碍，主要体现在提高 NO 生物利用度、抑制 AngⅡ合成来维持血管内皮舒缩功能；降低 ROS、炎症因子水平来恢复 VEC 抗氧化、抗炎功能；调节血管生成因子和抑制促凝血因子等来改善 VEC 调控血管通透性和抗血栓功能等。中药成分复杂，可一定程度上实现多成分协同作用，改善 VEC 功能，延缓 DA 的发生发展。

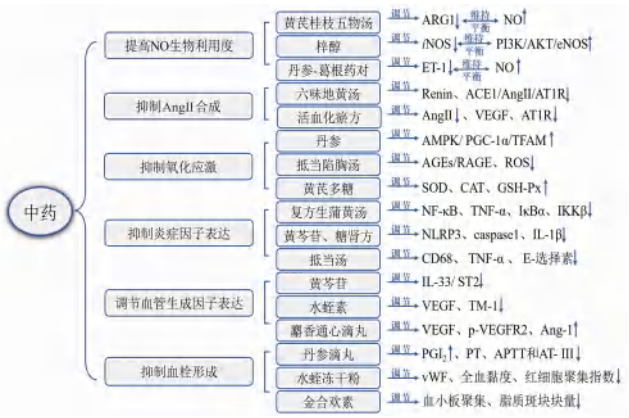


图 1 中药干预糖尿病内皮功能障碍机制图

Fig 1 Diagram of the mechanism of traditional Chinese medicine intervention in diabetic endothelial dysfunction

2 中药干预糖尿病血管内皮功能障碍相关信号通路

2.1 AGE/RAGE 信号通路

AGEs 是脂质、蛋白质、核酸、乙二醛和脱氧葡萄糖酮等 AGE 前体在高血糖状态下进行非酶促糖化反应的不可逆终末产物。AGEs 可与各种 RAGE 结合，并激活 NF-κB 信号通路，使其下游的炎症因子和黏附因子过表达[28]。Shu 等[29]通过灌胃给予 DN 小鼠 100 mg·kg^{-1} 梓醇 8 周发现，梓醇可显著抑制 AGE/RAGE/Rho 相关激酶（ROCK）通路，减少 DN 小鼠肾小球内膜 AGEs 的积聚，降低肾脏组织的巨噬细胞浸润量，恢复肾小球内皮细胞抗炎功能。此外，石香膏是治疗慢性难愈合创面的经典外用膏药，有研究表明石香膏用药 14 d 可抑制 DM 溃疡大鼠创面肉芽组织 AGE/RAGE 通路活性，增加 eNOS 表达水平，促进模型大鼠创面新血管生成和伤口愈合[30]。

2.2 PI3K/AKT 信号通路

PI3K/AKT 信号通路作为胰岛素传导信号的主要途径之一，在调节糖脂代谢、增强胰岛素敏感性过程中发挥重要作用。PI3K/AKT 信号通路还可调控下游哺乳动物雷帕霉素靶点（mammalian target of rapamycin，mTOR）、NF-κB、糖原合酶激酶（glycogen synthase kinase3β，GSK-3β）等通路，调节炎症反应。此外，PI3K/AKT 是血管保护的重要信号通路，AKT 激活下游蛋白 eNOS 发生磷酸化，调节血管舒张功能 [31]。李晓文等 [32] 通过建立 T2DM 大鼠模型，发现 0.84 g • kg^{-1} 糖心平胶囊用药 6 周可显著提高模型大鼠 SOD 水平，降低 MDA 水平，并通过调节 PI3K/AKT 通路抑制下游蛋白 GSK-3β 的表达，改善氧化应激，对 T2DM 大鼠心血管内皮功能具有保护作用。有研究证明，100 mg • kg^{-1} 柚皮苷给药 8 周可显著上调 T2DM 大鼠脑血管 PI3K/AKT/eNOS 信号通路，增加 NO 的合成和活性，抑制脑血管内皮功能紊乱 [33]。

2.3 NF-κB 信号通路

T2DM 患者血液处于高糖状态能够激活 VEC 多种非免疫炎症信号通路，进而提高内皮细胞炎症因子分泌水平，加剧原始血管损伤。NF-κB 信号通路是介导炎症的经典信号通路，参与细胞凋亡、免疫应答、应激反应等过程，细胞核中 NF-κB 被激活后，促进下游促炎因子的大量释放，推动 DA 的发生发展 [34]。Hu 等 [35] 的研究发现 20 μmol • L^{-1} 红景天苷可降低 ox-LDL 诱导 HUVEC 细胞中 TNF-α、IL-6、单核细胞趋化因子 -1（monocyte chemo tactic factor，MCP-1）表达水平，抑制 NLRP3 炎症小体的表达，缓解内皮细胞凋亡和炎症反应。有研究表明，8.1 g • kg^{-1} 抵当陷胸汤给药 8 周可通过抑制 RAGE/NOX4/NF-κB 信号通路，下调 VEGF、细胞间黏附分子（intercellular cell adhesion molecule-1，ICAM-1）表达水平，缓解肾小球系膜、基底膜增生，改善大鼠肾功能 [36]。

2.4 Nrf2 信号通路

核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）是细胞氧化应激中的主要转录因子之一，可通过与氧化反应元件（antioxidant response element，ARE）结合，调节下游血红素氧合酶 1（heme oxygenase-1，HO-1）、NADPH 和谷氨酸 - 半胱氨酸连接酶催化亚基（glutamate-cysteine ligase，GCLC）的表达水平，起到抗氧化作用，是治疗 DA 的重要靶点 [37]。地红方是滋阴活血的中药方剂，通过高糖诱导 HUVECs 进行体外研究证实，地红方含药血清可通过激活 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1（Keap-1）/Nrf2 信号通路，上调 SOD、CAT、谷胱甘肽硫转移酶（glutathione *S*-transferase，GST）mRNA 的表达水平，缓解氧化应激对 DM 血管内皮细胞的损伤 [38]。此外，通过临床研究发现，给予脾肾阳虚兼瘀阻目络型的 DR 患者消肿颗粒 24 周，可激活 Nrf2/ARE 信号通路，上调内皮细胞抗氧化反应蛋白表达水平，显著降低患者黄斑水肿体积，缓解 DR 病变损伤 [39]。

2.5 LOX-1 信号通路

氧化型低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，ox-LDL）作为 AS 的重要标志物，与内皮细胞上凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 -1（lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1，LOX-1）相结合，可激活下游炎症因子和黏附分子表达，促进炎症细胞聚集至内膜下空间，介导泡沫细胞的形成，造成内皮细胞功能障碍并促进脂质积聚形成脂质斑块。有研究表明，进行为期 12 周的血府逐瘀汤治疗干预可显著减少 AS 模型小鼠主动脉斑块面积，促进抗炎 M2 型巨噬细胞极化，降低 TNF-α、IL-1β 和 iNOS 蛋白表达水平，有效抑制炎症反应 [40]。此外，ox-LDL/LOX-1 信号通路还诱导 VEC 过度凋亡，蔡鑫桂等 [41] 的研究发现疏肝温胆汤可显著降低 AS 大鼠血管内皮细胞 caspase-3 蛋白表达水平，提高 Bcl-2 蛋白表达水平，抑制 VEC 过度凋亡起到保护 VEC 的作用。

上述研究表明中药主要通过调控 AGE/RAGE、LOX-1 及其下游信号通路有效抵抗高糖、AGEs 和 ox-LDL 对 VEC 的损伤；通过激活 PI3K/AKT 信号通路提高恢复 VECs 舒张功能；还通过抑制 NF-κB、Nrf2 等信号通路增强 VEC 的抗炎、抗氧化功能（见图 2）。然而，目前相关信号通路研究尚处于基础实验研究阶段，中药临床药效研究仍需进一步挖掘。

3 讨论

DM 引起的 AS、糖尿病性心脑血管病、DN、DR 等血管并发症给 DM 患者带来了极高的截肢、失明、心肾不良事件的发生风险和巨大的经济负担。DA 发病机制复杂，近年来血管内皮功能障碍受到广泛关注。内皮细胞作为重要的人体内分泌器官，极易受环境的影响，高血糖、AGEs、ox-LDL 以及胰岛素的异常表达对 VEC 产生直接或间接刺激，引起血管内皮功能障碍。中药因其多成分、多靶点的特点在临床治疗 DA 中具有重要的

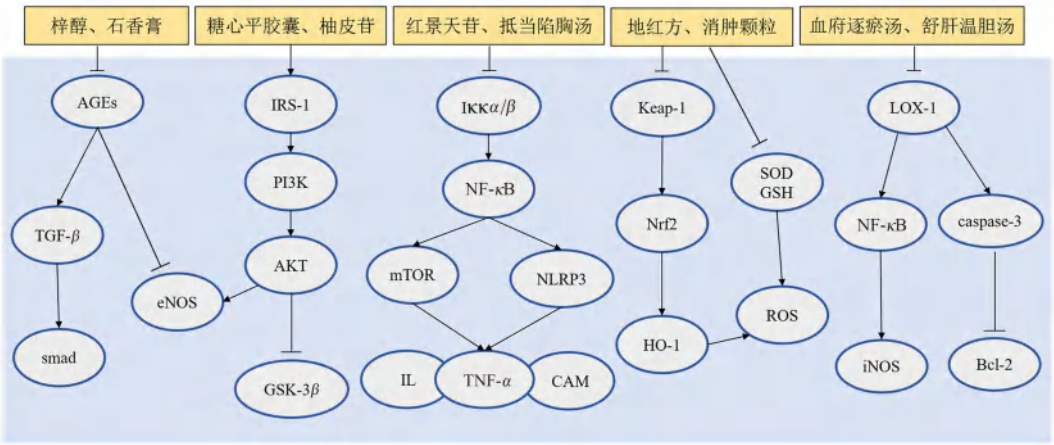


图 2　中药干预糖尿病内皮功能障碍相关信号通路图

Fig 2　Diagram of signaling pathways associated with traditional Chinese medicine intervention in diabetic endothelial dysfunction

药用价值，其中黄芪桂枝五物汤、复方生蒲黄汤、糖肾方、丹参滴丸、抵当汤等中药复方，以及丹参、葛根、黄芪、黄芩、水蛭等中药单体及其主要化学成分在治疗糖尿病血管内皮功能障碍中得到药物研究者的广泛认同。近年来，大量研究发现中药化学单体和复方主要通过调控 AGE/RAGE、PI3K/AKT、NF-κB、Nrf2、LOX-1 等相关信号通路，提高 NO 生物利用度、抑制 AngⅡ合成、抑制氧化应激、调节炎症因子、调节血管生成因子和抑制血栓形成，有效恢复 VEC，延缓 DA 发生发展进程。中药成分复杂且靶点众多，研究其改善糖尿病血管内皮功能障碍的作用机制及相关信号通路具有难度，可结合网络药理学分析和蛋白组学，筛选出主要基因信息和信号通路。目前，相关信号通路研究主要以离体培养的细胞和模型大鼠为研究对象，缺乏相关临床试验研究。因此，在中药的疗效和安全性方面，亟待更全面、更深入的实验研究，充分发挥中药多成分、多途径的特性。

参考文献

[1] Cole JB，Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications [J]. Nat Rev Nephrol，2020，16（7）：377-390.

[2] Trimm E，Red-horse K. Vascular endothelial cell development and diversity [J]. Nat Rev Cardiol，2023，20（3）：197-210.

[3] Li XR，Sun XD，Carmeliet P. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease [J]. Cell Metab，2019，30（3）：414-433.

[4] Liu B，Dai ZY. Fatty acid metabolism in endothelial cell [J]. Genes（Basel），2022，6（12）：2301.

[5] Bahadoran Z，Mirmiran P，Kashfi K，et al. Vascular nitric oxide resistance in type 2 diabetes [J]. Cell Death Dis，2023，14（7）：410.

[6] Liu C，Lei SJ，Cai TY，et al. Inducible nitric oxide synthase activity mediates TNF-α-induced endothelial cell dysfunction [J]. Am J Physiol Cell Physiol，2023，325（3）：C780-C795.

[7] 程红 . 黄芪桂枝五物汤通过 ARG1-NO 通路治疗糖尿病血管损伤 [D]. 广州：广州中医药大学，2021.

[8] Sun WX，Gao YY，Ding YS，et al. Catalpol ameliorates advanced glycation end product-induced dysfunction of glomerular endothelial cells via regulating nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase [J]. IUBMB Life，2019，71（9）：1268-1283.

[9] 李恒华，杨炀，黄文涛，等 . 丹参 - 葛根药对对糖尿病大鼠血管内皮保护作用及机制研究 [J]. 时珍国医国药，2020，31（4）：851-855.

[10] Ribeiro-oliveira AJ，Nogueira AI，Pereira RM，et al. The renin-angiotensin system and diabetes：an update [J]. Vasc Health Risk Manag，2008，4（4）：787-803.

[11] 杨超茅，张顺宵，李园园，等 . 六味地黄汤加减联合氯沙坦钾对糖尿病肾病大鼠 ACE1/Ang Ⅱ/AT1R 轴及肠道菌群的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2024，30（6）：1-9.

[12] 刘薇，朱平，赖美铮，等 . 活血化瘀方对糖尿病模型大鼠糖脂代谢、血管内皮生长因子和血管紧张素Ⅱ1 型受体表达的影响 [J]. 现代生物医学进展，2018，18（15）：2847-2850.

[13] 王雪莲 . 基于 AMPK-PGC-1α 通路探讨丹酚酸 A 对血管内皮细胞线粒体生物发生和功能的调节作用及相关机制 [D]. 青岛：青岛大学，2022.

[14] 许笑雯，储全根，储俊，等 . 痰瘀同治法对糖尿病大鼠心肌微血管病变 AGEs/RAGE 轴及氧化应激的影响 [J]. 南方医科大学学报，2021，41（10）：1527-1533.

[15] 刘旭峰，冯佳，王述进，等 . 黄芪多糖对糖尿病肾病大鼠氧化应激和自噬的影响及机制 [J]. 山西医科大学学报，2023，54（3）：343-351.

[16] Li YW，Liu YF，Liu SW，et al. Diabetic vascular diseases：molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. Signal Transduct Target Ther，2023，8（1）：152.

[17] Li WC，Shen XH，Wang YP，et al. The effect of Shengpuhuang-tang on retinal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats by NF-κB pathway [J]. J Ethnopharmacol，2020，247（1）：112275.
[18] Zhao JF，Wang ZT，Yuan ZL，et al. Baicalin ameliorates atherosclerosis by inhibiting NLRP3 inflammasome in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Diab Vasc Dis Res，2020，17（6）：1479164120977441.
[19] 李囡 . 糖肾方通过调节 NLRP3 炎症小体经典途径改善糖尿病肾损伤的机制研究 [D]. 北京：北京协和医学院，2020.
[20] 张英俊，常柏，谭力子 . 抵当汤早期干预对 2 型糖尿病大鼠血管内皮细胞黏附连接的影响 [J]. 西部中医药，2021，34（9）：18-22.
[21] Potente M，Carmeliet P. The link between angiogenesis and endothelial metabolism [J]. Annu Rev Physiol，2017，79：43-66.
[22] 帅天姣，王彤彤，谢伟，等 . 黄芩苷调节 IL-33/ST2 信号通路对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜新生血管生成的影响 [J]. 眼科新进展，2022，42（9）：685-689.
[23] Pang XX，Zhang YG，Peng ZN，et al. Hirudin reduces nephropathy microangiopathy in STZ-induced diabetes rats by inhibiting endothelial cell migration and angiogenesis [J]. Life Sci，2020，255：117779.
[24] 张梦笛，崔鑫钰，袁悦莹，等 . 麝香通心滴丸通过促血管新生改善糖尿病合并心肌梗死大鼠心功能的作用机制研究 [J]. 天津中医药，2022，39（8）：1043-1051.
[25] 王金华，潘建新，倪晓容，等 . 复方丹参滴丸对 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化患者炎症及凝血功能的影响 [J]. 海南医学，2020，31（12）：1507-1509.
[26] Kaur R，Kaur M，Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus：molecular insights and therapeutic strategies [J]. Cardiovasc Diabetol，2018，17（1）：121.
[27] 杨帆，李雅纯，郭帅，等 . 水蛭冻干粉对糖尿病肾病大鼠瘀血阻络证相关指标的干预作用 [J]. 中成药，2022，44（9）：3017-3022.
[28] Khalid M，Petroianu G，Adem A. Advanced glycation end products and diabetes mellitus：mechanisms and perspectives [J]. Biomolecules，2022，12（4）：542.
[29] Shu AM，Du Q，Chen J，et al. Catalpol ameliorates endothelial dysfunction and inflammation in diabetic nephropathy via suppression of RAGE/RhoA/ROCK signaling pathway [J]. Chem Biol Interact，2021，348：109625.
[30] 费冀，张开伟，周一夫，等 . 石香膏干预糖尿病溃疡创面模型大鼠创面组织晚期糖基化终产物及其受体与内皮型一氧化氮合成酶表达的变化 [J]. 中国组织工程研究，2022，26（20）：3196-3201.
[31] Tang GY，Li S，Zhang C，et al. Clinical efficacies，underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management [J]. Acta Pharm Sin B，2021，11（9）：2749-2767.
[32] 李晓文 . 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨糖心平胶囊治疗糖尿病心肌病药效及机制 [D]. 青岛：中国中医科学院，2021.
[33] 郭芬，王晓雪 . 柚皮苷调控 PI3K/Akt/eNOS 通路控制 2 型糖尿病大鼠脑血管内皮氧化损伤的作用探讨 [J]. 安徽医药，2021，25（4）：645-649.
[34] Chen JJ，Tan WY. Platelet activation and immune response in diabetic microangiopathy [J]. Clin Chim Acta，2020，507：242-247.
[35] Hu R，Wang MQ，Ni SH，et al. Salidroside ameliorates endothelial inflammation and oxidative stress by regulating the AMPK/NF-κB/NLRP3 signaling pathway in AGEs-induced HUVECs [J]. Eur J Pharmacol，2020，867：172797.
[36] 罗宝璐 . 基于 RAGE/NOX4/NF-κB 通路探讨抵当陷胸汤对糖尿病肾脏微血管病变的防治作用 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2023.
[37] Love KM，Barrett EJ，Malin SK，et al. Diabetes pathogenesis and management：the endothelium comes of age [J]. J Mol Cell Biol，2021，13（7）：500-512.
[38] 何卫东，杨柳清，林姿，等 . 地红方调控 Keap1/Nrf2 信号通路干预糖尿病血管内皮细胞氧化应激损伤的研究 [J]. 福建中医药，2022，53（3）：42-45.
[39] 蔡文静 . 基于 PI3K/Akt 和 Nrf2/ARE 信号通路探讨消肿颗粒改善糖尿病黄斑水肿的机制研究及临床疗效观察 [D]. 青岛：中国中医科学院，2023.
[40] 洪甜影 . 血府逐瘀汤通过 Piezo1/NLRP3 信号通路调控动脉粥样硬化血管钙化的作用与机制研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2024.
[41] 蔡鑫桂，蔡海荣，赵帅，等 . 疏肝温胆汤对动脉粥样硬化大鼠内皮功能、自噬及凋亡的影响 [J]. 时珍国医国药，2023，34（5）：1033-1036.

（收稿日期：2024-03-11；修回日期：2024-04-23）

兰尼碱受体在阿尔茨海默病中作用机制的研究进展

史婷，尹莉芳，秦超*（中国药科大学药学院药剂系，南京　211198）

摘要：Ca^{2+}作为细胞内重要的调节信号，是维持机体正常生理功能的基础。当Ca^{2+}平衡被打破时，将会导致一系列严重的后果。研究表明，Ca^{2+}在阿尔茨海默病中扮演着至关重要的角色，很可能是造成发病的深层原因。其中，兰尼碱受体（Ryanodine receptors，RyRs）是主要调节Ca^{2+}释放的离子通道。因此，阐明RyRs在阿尔茨海默病中发挥的作用对于寻找合适的治疗方法至关重要。本文从RyRs特征出发，介绍其介导的Ca^{2+}释放与阿尔茨海默病的关系，为将来阿尔茨海默病的药物治疗方案提供思路。

关键词：兰尼碱受体；阿尔茨海默病；Ca^{2+}

中图分类号：R341　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-3051-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.036

Research progress in the mechanism of Ryanodine receptors in Alzheimer’s disease

SHI Ting, YIN Li-fang, QIN Chao* (*Department of Pharmaceutics*, *School of Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198)

Abstract: As an important regulatory signal in cells, Ca^{2+} is important in maintaining normal physiological function. When the Ca^{2+} balance is broken, many consequences follow. Studies have shown that Ca^{2+} is the likely underlying cause of Alzheimer’s disease. Ryanodine receptors (RyRs) serve as the ion channel that mainly regulate Ca^{2+} release. Elucidating the role that RyRs play in Alzheimer’s disease is critical to finding suitable treatments. Based on the characteristics of RyRs, this paper discussed the relationship between RyRs mediated Ca^{2+} release and Alzheimer’s disease to provide ideas for future treatment.

Key words: Ryanodine receptor; Alzheimer’s disease; Ca^{2+}

阿尔茨海默病是最常见的痴呆症，其特征是记忆丧失、思维和推理能力受损等。根据世界卫生组织统计，随着社会老龄化的发展，全球痴呆症患者人数将从2019年的5500万增加到2050年的1.39亿[1]，说明治疗阿尔茨海默病迫在眉睫。阿尔茨海默病主要分为：散发性阿尔茨海默病（sporadic Alzheimer’s disease，SAD）和家族性阿尔茨海默病（familial Alzheimer’s disease，FAD），其中SAD占95%，特征是发病年龄较晚，发病原因尚不明确，为多种遗传易感性和环境危险因素共同作用导致[2]。阿尔茨海默病主要的诊察手段是对β淀粉样斑块及Tau蛋白的过度磷酸化纤维缠结水平进行考察。目前研究的主流假说有β淀粉样斑块堆积学说[3]、Tau蛋白异常学说[4]及胆碱能神经损伤学说等[5]。但随着研究的进一步深入，人们发现很多病理现象无法用上述已有的学说内容解释。而在过去几十年中，FDA批准的主要治疗药物为胆碱酯酶抑制剂和非竞争性*N*-甲基D-天冬氨酸拮抗剂（*N*-methyl-D-aspartate，NMDA）受体调节剂，尽管近些年来，美国食品药品监督管理局（FDA）相继批准了相关单克隆抗体用于治疗阿尔茨海默病[6-8]。但是这些治疗手段依旧有限，目前上市的药物仅可暂时改善记忆和思维问题，不能有效延缓疾病的进程[9]。

有研究学者发现，阿尔茨海默病发病期间内质网中的兰尼碱受体（RyRs）功能发生改变。在阿尔

作者简介：史婷，女，硕士研究生，主要从事纳米给药系统研究，email：1103494217@qq.com　*通信作者：秦超，男，副教授，主要从事口服固体制剂、缓控释制剂、智能纳米微粒给药系统及产业化研究，email：nada77@163.com

茨海默病患者和小鼠模型的脑组织中都显示出脑区 RyRs 表达增加[10]，RyRs 中过量的 Ca^{2+} 释放与神经生理学和突触信号事件受损有关，从而进一步加剧了阿尔茨海默病患者的记忆障碍[11]。这一发现为阿尔茨海默病提供了新的探索方向。因此，本文将对 RyRs 在阿尔茨海默病中的作用机制进行论述，为将来阿尔茨海默病的治疗提供参考。

1 RyRs 的生物学特性

RyRs 是由四种 560 kDa 多肽组成的同源四聚体蛋白构成（见图 1）[12-14]，位于肌浆和内质网膜上，是内质网中最大的一组 Ca^{2+} 受体。RyRs 主要负责从内质网中释放 Ca^{2+}，以维持细胞的正常生理功能。其自身能够被细胞内 Ca^{2+} 激活，从而导致内质网储存的 Ca^{2+} 快速释放[12]。RyRs 上富含巯基，能够被氧化形成二硫键，因此其自身活性受到许多因素的调节，如咖啡因能够激活 RyRs 从而将内质网中的 Ca^{2+} 释放到细胞质中，而丹曲林则能够抑制这一现象的发生[15-16]。RyRs 分布于骨骼肌、心脏和大脑中，与各种肌肉病变、心律失常、心力衰竭和阿尔茨海默病等有关。目前已知 RyRs 有三种不同亚型：RyR1、RyR2 和 RyR3[17]，在哺乳动物大脑中，神经元细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞中都发现了 RyRs 的表达[18]。研究表示，RyRs 水平并不是恒定不变的，最初，低水平的 RyR2 分布在间脑和脑干，随着胚胎的不断发育，RyR2 逐渐成为大脑许多区域的主要亚型，RyR3 则在海马中被限制表达[19]，造成这种选择性的分布与海马神经元的记忆功能密不可分，见表 1。

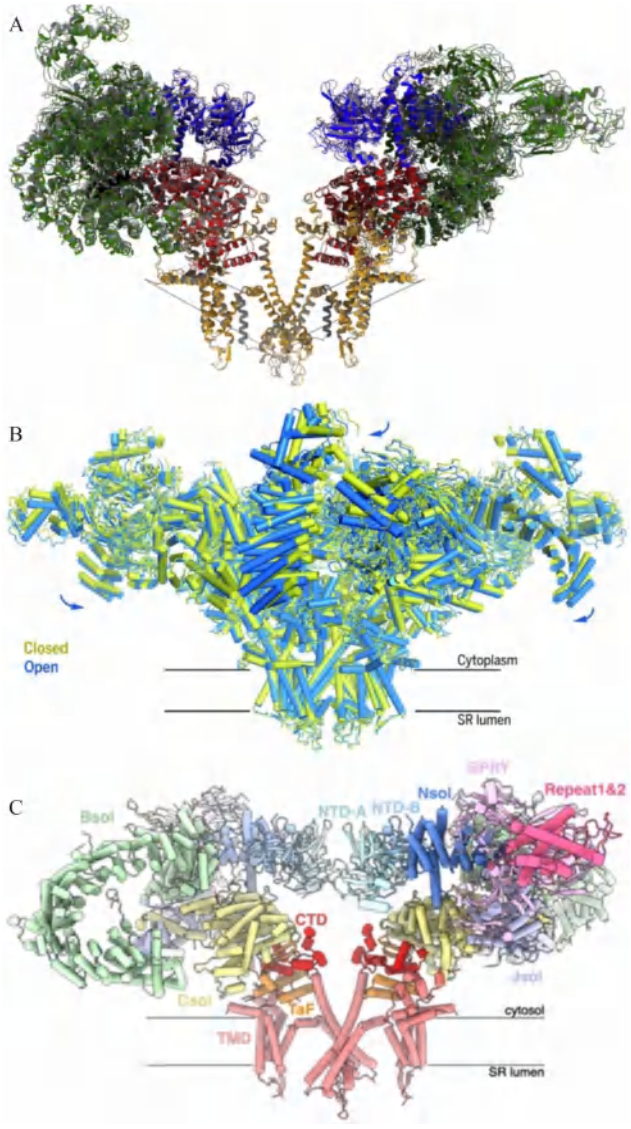


图 1 RyR1（A）、RyR2（B）和 RyR3（C）的结构图[12-14]

Fig 1 Structure diagram of RyR1 (A), RyR2 (B), and RyR3 (C)[12-14]

表 1 脑内 RyRs 主要分布及功能[18, 20]

Tab 1 Main distribution and function of RyRs in brain[18, 20]

分类	分布	功能
RyR1	海马齿状回和浦肯野细胞层	基因突变导致部分恶性高热发生；可被一氧化氮（NO）诱导参与神经性病变
RyR2	海马初级神经元的神经元体和神经突	阻止脑源性神经营养因子诱导的初级海马神经元树突棘结构重构；与原代海马神经元结构可塑性受损有关
RyR3	尾侧大脑皮层和海马树突棘	长时程增强作用，不易诱导长期抑郁；可能在学习和记忆等高级认知功能中发挥关键作用

2 Ca^{2+} 紊乱与阿尔茨海默病

迄今为止，阿尔茨海默病的发病机制尚未确定。但是随着研究的深入，更多人不再认为 β-淀粉样肽（amyloid-β，Aβ）是造成阿尔茨海默病的主要原因，而是疾病形成的结果[21-22]。Ca^{2+} 作为细胞内调节功能重要的信使，在生理环境中起着至关重要的作用。生理环境下，神经元内 Ca^{2+} 水平受到严格调控，内质网作为细胞内主要的 Ca^{2+} 储存细胞器，其内部 Ca^{2+} 水平远高于细胞质水平[23]。

越来越多的证据表明，Ca^{2+} 失调在疾病过程上游，可能先于淀粉样蛋白疾病的发生。在 β 淀粉样斑块或神经原纤维缠结形成之前，早老蛋白（presenilin，PS）突变的阿尔茨海默病脑组织中存在显著的 Ca^{2+} 代谢紊乱，这一观察结果在不同的阿尔茨海默病动物模型中得到进一步证实[24-25]。在细胞膜中，电压门控钙通道（voltage-gated

calcium channel，VGCC）和受体操控式钙通道分别允许 Ca^{2+} 在去极化或与配体结合后流入神经元。内质网 Ca^{2+} 通过 RyRs 和肌醇 1，4，5- 三磷酸受体（inositol 1，4，5-trisphosphate receptors，IP_3Rs）介导释放，当 Ca^{2+} 耗尽时，存储操作式钙离子通道（store-operated calcium entry，SOCE）介导的 Ca^{2+} 途径被激活，存储损耗触发了内质网 Ca^{2+} 传感器基质相互作用分子 1，从而刺激 Orai 通道的开放 [26]，导致 Ca^{2+} 的进一步积累，最终降低脑组织突触密度，造成学习和记忆障碍 [27-28]。根据这一现象，研究者们提出了钙假说，该假说表明，Ca^{2+} 水平的变化是导致后续一系列病理变化的导火索，是造成疾病发展的根本原因。

此外，神经元并不是唯一表现出 Ca^{2+} 紊乱的细胞，在阿尔茨海默病患者大脑的胶质细胞中也观察到这种现象的发生。其中，小胶质细胞是先天免疫细胞，在免疫刺激下被激活，释放细胞促炎因子，帮助细胞自身清除积累的 Aβ 斑块 [29]。星形胶质细胞也是大脑中重要的组成成分之一，大脑通过星形细胞降解脂肪酸从而维持脑内脂质稳态 [30]。然而，随着细胞内 Ca^{2+} 稳态被打破，小胶质细胞被过度激活，极化的小胶质细胞加剧了炎症的发生，星形胶质细胞从稳态转变成为反应性星形胶质细胞，加重病程的进展 [31-32]。由此可以发现，小胶质细胞和星形胶质细胞过度激活皆是阿尔茨海默病发病的显著标志之一。

3 RyRs 在阿尔茨海默病中的作用机制

神经元中的 RyRs 通道经历了翻译后重构，如蛋白激酶 A 的磷酸化、氧化和亚硝基化等，从而导致内质网 Ca^{2+} 的泄漏，而 RyRs 介导的内质网 Ca^{2+} 泄漏促进了阿尔茨海默病的进一步发展 [33]。因此，对 RyRs 作用机制的研究（见图 2），能够进一步帮助阿尔茨海默病药物的研发，促进疾病的治疗。

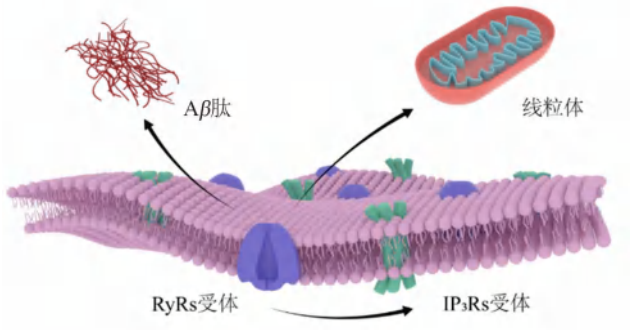


图 2 RyRs 在阿尔茨海默病中的作用机制

Fig 2 Mechanism of RyRs in Alzheimer’s disease

3.1 IP_3Rs 与 RyRs 介导的 Ca^{2+} 释放

IP_3Rs 和 RyRs 共同位于内质网上，介导内质网中的 Ca^{2+} 释放。目前已知 IP_3Rs 有三种不同的亚型：IP_3R1、IP_3R2 和 IP_3R3，能够选择性调节 SOCE 受体 [34]。IP_3Rs 具有重叠的表达谱，但它们在不同组织中的表达水平存在明显差异，IP_3R1 在神经元中高表达，IP_3R2 在肝细胞中高表达，IP_3R3 在快速增殖的细胞类型中高表达，其失调可能导致突触的高兴奋性和早期阿尔茨海默病的发展 [35]。作为 IP_3Rs 的配体，三磷酸肌醇（inositol triphosphate，IP_3）对脂质的影响涉及 Ca^{2+} 信号的改变，因此 IP_3Rs 很可能影响线粒体相关内质网膜（mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes，MAMs）连接的稳定性，进一步加剧细胞的损伤 [36]。同时，星形胶质细胞在阿尔茨海默病中发生极化，加剧病理的发展，而有研究者认为通过 IP_3Rs 从内质网释放 Ca^{2+} 是星形胶质细胞中 Ca^{2+} 信号传导的主要过程，即使在没有外部刺激的情况下，星形胶质细胞中的 Ca^{2+} 也经常通过 IP_3Rs 从内质网自发释放 [34]。因此，IP_3Rs 是影响星形胶质细胞病理发展的重要因素。

相关研究表示，IP_3Rs 不仅受细胞质 Ca^{2+} 的调节，还受内质网 Ca^{2+} 的调节。但在关于是低水平还是高水平 Ca^{2+} 抑制 IP_3Rs 这一点上似乎未达到统一 [37]。最近的一项研究显示，在海马 CA1 锥体神经元中，当 Ca^{2+} 结合到一个保守的激活位点时，IP_3Rs 和 RyRs 的 Ca^{2+} 双向调节通道被打开 [38-39]。将 RyRs 和 IP_3Rs 进行体外模拟，发现 IP_3Rs 与 RyRs 的共定位增加了 RyRs 介导的 Ca^{2+} 释放的倾向 [40]，可以看出 IP_3Rs 能够促进 RyRs 介导 Ca^{2+} 释放的功能。加入 IP_3Rs 抑制剂可能会提高 RyRs 抑制剂的治疗效果。但在脊髓损伤模型中，联合治疗的效果与单独使用任意受体抑制剂相似 [41]。因此，在阿尔茨海默病的治疗中，如果同时使用 IP_3Rs 抑制剂和 RyRs 抑制剂进行治疗，很可能达不到 1 ＋ 1 ＞ 2 的预期效果，但是这一点还有待在阿尔茨海默病的疾病模型中验证。

3.2 线粒体与 RyRs 介导的 Ca^{2+} 释放

线粒体是细胞有氧呼吸的主要场所，线粒体通过 Ca^{2+} 传递细胞信号并维持能量代谢。有研究发现，线粒体功能障碍和氧化应激是阿尔茨海默病患者大脑神经元的早期疾病特征 [42-43]。生理条件下，线粒体是动态的，在形状、大小、数量和位置上经常发生变化，其主要包括两个过程，即裂变和融合。既往研究表明，线粒体融合对神经元具有保护作用，可导致线粒体 DNA 交换，保护细胞免于凋亡，而线粒体裂变则是细胞凋亡和断裂的标志。在阿尔茨海默病等神经退行性疾病中都发现了线粒体裂变 / 融合过程的破坏 [44]。MAMs 是内质网与线粒体之间的生化和物理接触位点，这种脂质筏结构是

动态的，由于这一组特殊蛋白质的存在，能够调节许多细胞过程[45-46]。因此，当细胞质 Ca^{2+} 浓度升高时，线粒体通过 MAMs 作为额外的 Ca^{2+} 缓冲环境，通过摄取部分 Ca^{2+} 避免细胞损伤[47]。但当线粒体中 Ca^{2+} 水平超过其自身负荷时，线粒体功能受损。同时，线粒体 Ca^{2+} 超载会诱导线粒体通透性转换孔（mitochondrial permeability transition pore，mPTP）过度开放，mPTP 的持续开放伴随着 Ca^{2+} 释放的去极化、氧化磷酸化的停止，最终导致线粒体膜破裂，线粒体释放细胞色素 C 和其他凋亡蛋白等[48]。有研究显示，RyRs 通道激活的改变是线粒体功能障碍的标志，值得注意的是，其中 IP_3Rs 诱导的 Ca^{2+} 释放在线粒体应激细胞中显著减少[49]。

3.2.1 线粒体活性氧（ROS） 当线粒体 Ca^{2+} 水平升高后，线粒体内 ROS 的水平逐步升高[50]，ROS 能够破坏细胞的内部结构，导致细胞凋亡。在阿尔茨海默病中，线粒体功能的进行性损伤是 ROS 产生的主要原因，而 ROS 水平的持续升高会导致线粒体功能恶化，从而加剧阿尔茨海默病病理的进一步发展[51]。研究发现，SAD 患者成纤维细胞中许多线粒体调节相关蛋白质水平降低。此外，实验结果显示 SAD 成纤维细胞中线粒体超氧化物水平升高，抗氧化防御受损[52]。由于神经元的活动高度依赖能量代谢，因此对线粒体功能的破坏特别敏感，研究表明，神经元产生的 Ca^{2+} 信号内流在海马突触可塑性、空间学习和记忆中发挥重要作用[53]。RyRs 通道作为海马中表达的主要 Ca^{2+} 释放通道，其特征之一是对氧化还原敏感。有研究者提出，海马神经元过度氧化导致 RyRs 介导的 Ca^{2+} 释放被激活，这个过程是一个高度氧化还原敏感的过程[54]，细胞内的 ROS 和 Ca^{2+} 形成一个自我放大的循环，加剧神经毒性和 Ca^{2+} 失衡，最终造成阿尔茨海默病的进一步发展[55]。丹曲林是常用的 RyRs 抑制剂，它的主要作用是抑制内质网 Ca^{2+} 释放，相关文献报道显示，丹曲林能够减少 ROS 的产生，从而减少细胞氧化应激水平的升高[56-57]。同时，研究人员使用人参皂苷 Rg_1 抑制 NLRP1 炎性小体的激活，从而减少 ROS 的生成，通过钙成像结果表明，药物显著减少了 Ca^{2+} 超载并维持细胞稳态[58]。

3.2.2 线粒体自噬 自噬是细胞自我降解和循环利用细胞内组分的过程，细胞通过自噬实现细胞器的内部更新。细胞通过选择性降解受损线粒体维持其功能的完整性和细胞稳态，而线粒体自噬对保护神经元及记忆改善有着重要的作用。阿尔茨海默病中，线粒体自噬过程被抑制，导致受损的线粒体不能被及时清除更新[59]。研究显示，自噬失调很可能发生在发病之前，而在 AD 小鼠模型的研究中，线粒体自噬能够减少神经炎症，恢复神经元功能[60]。有研究发现 RyR3 参与人神经元海马干细胞的自噬[61]。同时，RyRs 介导的 Ca^{2+} 释放抑制了溶酶体的自噬通量，而丹曲林抑制 RyRs，通过增强自噬通量改善阿尔茨海默病的病理发展[62]。

3.3 Aβ 肽与 RyRs 介导的 Ca^{2+} 释放

Aβ 肽是淀粉样前体蛋白经 β- 分泌酶和 γ- 分泌酶水解后产生的一种多肽，其代谢异常是阿尔茨海默病的重要病理过程。Aβ 肽倾向于以原纤维的形式聚集成斑块，其中，$Aβ_{42}$ 具有更大的聚集倾向[63]。Aβ 肽通过增强神经元活动分泌到间质液中，分泌后，聚集形成的斑块破坏了细胞正常的生理功能[64]。研究显示当 Aβ 浓度轻微升高时，神经元的转录水平发生变化，进一步导致神经元网络活动的早期改变[65]，但亦有研究认为 $Aβ_{42}$ 对神经元中动作电位生成短期没有直接的负面影响，而是通过长期接触导致神经元功能障碍[66]。星形胶质细胞是中枢神经系统中主要参与神经元功能调节的细胞，研究者通过使用一种膜标记的 Ca^{2+} 指示剂标记细胞内 Ca^{2+} 水平，结果显示在阿尔茨海默病小鼠模型中发现强烈的 Ca^{2+} 超载信号[67]。在小胶质细胞中，细胞内 Ca^{2+} 的变化与炎症激活和吞噬作用有关，当小胶质细胞接近 Aβ 斑块时，小胶质细胞中自发的 Ca^{2+} 释放瞬时速率增加[68]。大脑积累的 Aβ 斑块靶向海马神经元 RyRs 受体，从而增加内质网释放 Ca^{2+} 的功能，不断增加细胞质内 Ca^{2+} 的浓度，进一步导致相关细胞兴奋性和突触功能障碍，削弱突触的可塑性[69-70]。而限制 RyRs 的开放时间，可以预防和挽救阿尔茨海默病晚期的记忆障碍和神经元丧失，即使 Aβ 淀粉样蛋白持续积累，但通过降低 RyRs 的表达能够改善阿尔茨海默病的病情，恢复相关的记忆功能，预防相关缺陷[71-72]。

4 RyRs 相关治疗药物

丹曲林是 FDA 批准的治疗恶性高热症的唯一药物，通过抑制骨骼肌 RyRs 从而抑制内质网 Ca^{2+} 释放，使骨骼肌松弛[73]。但血脑屏障的存在，使丹曲林很难进入脑部病理部位发挥药效。如果采用传统口服给药的形式，通常需要提高剂量才能达到治疗中枢神经系统的浓度阈值，但过高的给药剂量往往会造成蓄积毒性。因此，为了达到更好的治疗效果，需要选择其他的给药途径。鼻内给药作为治疗中枢神经系统疾病的良好方法，能够通过鼻腔内部的黏膜，使药物快速进入大脑中枢神经系统。实验证明，与其他的给药方式相比，鼻内给药显著增加了大脑中丹曲林的浓度和持续时间[74]，为丹曲林发挥药效提供了基本条件。同时，丹曲林还可以改

善阿尔茨海默病患者的神经突触损伤，恢复细胞内 Ca^{2+} 稳态 [75]。阿尔茨海默病患者中 SAD 占大多数，且发病原因更加复杂多变。研究发现，丹曲林对 SAD 也有神经保护作用。更有研究表示，丹曲林能够竞争性抑制人 B 型单胺氧化酶，同时作为乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase，AChE）抑制剂发挥药效，进一步阻碍 $A\beta_{40}$ 和 Tau 蛋白六肽 VQIVYK（简称 PHF6）的聚集，减少病理过程 [76]。除丹曲林外，S107 是一种新型的 RyRs 稳定剂，但目前有关 S107 与阿尔茨海默病的研究还较少，但在已有的研究中，S107 能够恢复突触的正常生理功能，对于阿尔茨海默病的治疗有着积极的效果 [77]，见表 2。

表 2 RyRs 相关治疗药物

Tab 2 RyRs related therapeutic drugs

药物名称	机制	模型	功能
丹曲林	抑制 RyRs	Tg2576 小鼠	减少 Aβ 负荷及相关的组织学病变，减缓 Tg2576 小鼠的学习和记忆缺陷 [78]
		3xTg-AD 小鼠	降低 13 月龄 3xTg-AD 小鼠的记忆缺陷和海马体淀粉样斑块负荷 [79]
		5XFAD 小鼠	改善早期海马依赖性和非依赖性记忆，鼻用丹曲林可改善晚期认知 [80]
S107	增强 Calstabin2 对突变和 / 或 PKA 磷酸化通道结合的亲和力稳定 RyR2 通道	C57BL6 小鼠海马神经元	恢复 γ- 氨基丁酸（gamma-aminobutyric acid，GABA）突触特性，治疗早期损伤 [77]

5 展望

RyRs 是 Ca^{2+} 主要的释放通道，其释放过程受到病理环境如 ROS 等多种因素的影响，而 RyRs 介导的 Ca^{2+} 过度释放，会进一步加剧线粒体功能的受损，造成 Aβ 蛋白的持续积累，最终造成阿尔茨海默病病理的恶性发展。而通过抑制和稳定 RyRs 通道能够改善神经元的功能，恢复正常的学习和记忆能力。尽管有研究显示，丹曲林需要 Mg^{2+} 存在才能够发挥治疗效果，而对于 RyRs 自身功能是否受到相关金属离子影响尚不明确。因此对于阿尔茨海默病中 RyRs 的作用机制仍需进一步探索。通过对 RyRs 介导的 Ca^{2+} 释放的研究促进相关药物靶点的发现，从而为找到更好治疗阿尔茨海默病的策略和方法提供参考。

参考文献

[1] Meyers EAA，Sexton C，Snyder HMM，et al. Impact of Alzheimer’s association support and engagement in the AD/ADRD research community through the COVID-19 pandemic and beyond [J]. Alzheimers Dement，2023，19（7）：3222-3225.

[2] Ulaganathan S，Pitchaimani A. Spontaneous and familial models of Alzheimer’s disease：challenges and advances in preclinical research [J]. Life Sci，2023，328：121918.

[3] Hardy JA，Higgins GA. Alzheimer’s disease：the amyloid cascade hypothesis [J]. Science，1992，256（5054）：184-185.

[4] DeVos SL，Corjuc BT，Oakley DH，et al. Synaptic Tau seeding precedes Tau pathology in human Alzheimer’s disease brain [J]. Front Neurosci-Switz，2018，12：267.

[5] Chen ZR，Huang JB，Yang SL，et al. Role of cholinergic signaling in Alzheimer’s disease [J]. Molecules，2022，27（6）：1816.

[6] Gunawardena IPC，Retinasamy T，Shaikh MF. Is aducanumab for LMICs? promises and challenges [J]. Brain Sci，2021，11（11）：1547.

[7] Cummings J，Apostolova L，Rabinovici GD，et al. Lecanemab：appropriate use recommendations [J]. Prev Alzheimers Dis，2023，10（3）：362-377.

[8] Dhillon S. Aducanumab：first approval [J]. Drugs，2021，81（12）：1437-1443.

[9] Asher S，Priefer R. Alzheimer’s disease failed clinical trials [J]. Life Sci，2022，306：120861.

[10] Bruno AM，Huang JY，Bennett DA，et al. Altered Ryanodine receptor expression in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease [J]. Neurobiol Aging，2012，33（5）：1001.e1.

[11] Zhang H，Liu J，Sun SY，et al. Calcium signaling，excitability，and synaptic plasticity defects in a mouse model of Alzheimer’s disease [J]. J Alzheimers Dis，2015，45（2）：561-580.

[12] Melville Z，Kim K，Clarke OB，et al. High-resolution structure of the membrane-embedded skeletal muscle Ryanodine receptor [J]. Structure，2022，30（1）：172-180.

[13] Peng W，Shen HZ，Wu JP，et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2 [J]. Science，2016，354（6310）：aah5324.

[14] Chen YS，Garcia-Castañeda M，Charalambous M，et al. Cryo-EM investigation of Ryanodine receptor type 3 [J]. Nat Commun，2024，15（1）：8630.

[15] Liu BW，Zhu XR，Zhou QY，et al. Activating ryanodine receptor improves isoflurane-induced cognitive dysfunction [J]. Brain Res Bull，2023，204：110790.

[16] Sarbjit-Singh SS，Matthews HR，Huang CLH. Ryanodine receptor modulation by caffeine challenge modifies Na^{+} current properties in intact murine skeletal muscle fibres [J]. Sci Rep-Uk，2020，10（1）：2199.

[17] Shirokova N，Niggli E. Studies of RyR function in situ [J]. Methods，2008，46（3）：183-193.

[18] Torres R，Hidalgo C. Subcellular localization and transcriptional regulation of brain Ryanodine receptors. Functional implications [J]. Cell Calcium，2023，116：102821.

[19] Mori F，Fukaya M，Abe H，et al. Developmental changes in expression of the three Ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain [J]. Neurosci Lett，2000，285（1）：57-60.

[20] Vega-Vásquez I，Lobos P，Toledo J，et al. Hippocampal den-

dritic spines express the RyR3 but not the RyR2 ryanodine receptor isoform [J]. Biochem Bioph Res Co，2022，633：96-103.
[21] Li ST，Ji XY，Gao M，et al. Endogenous amyloid-formed Ca^{2+}-permeable channels in aged 3xTg AD mice [J]. Function，2023，4（4）：zqad025.
[22] Jekabsone A，Jankeviciute S，Pampuscenko K，et al. The role of intracellular Ca^{2+} and mitochondrial ROS in small $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced microglial death [J]. Int J Mol Sci，2023，24（15）：12315.
[23] Shi Y，Wang Y，Wei HF. Dantrolene：from malignant hyperthermia to Alzheimer's disease [J]. Cns Neurol Disord-Dr，18（9）：668-676.
[24] Lee SH，Bolshakov VY，Shen J. Presenilins regulate synaptic plasticity in the perforant pathways of the hippocampus [J]. Mol Brain，2023，16（1）：17.
[25] Lee SH，Bolshakov VY，Shen J. Inactivation of presenilin in inhibitory neurons results in decreased GABAergic responses and enhanced synaptic plasticity [J]. Mol Brain，2021，14（1）：85.
[26] Park CY，Hoover PJ，Mullins FM，et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1 [J]. Cell，2009，136（5）：876-890.
[27] Guan PP，Cao LL，Wang P. Elevating the levels of calcium ions exacerbate Alzheimer's disease via inducing the production and aggregation of β-amyloid protein and phosphorylated Tau [J]. Int J Mol Sci，2021，22（11）：5900.
[28] McDaid J，Mustaly-Kalimi S，Stutzmann GE. Ca^{2+} dyshomeostasis disrupts neuronal and synaptic function in Alzheimer's disease [J]. Cells-Basel，2020，9（12）：2655.
[29] Huang YT，Happonen KE，Burrola PG，et al. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques [J]. Nat Immunol，2021，22（5）：586-594.
[30] Bonvento G，Bolaños JP. Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity [J]. Cell Metab，2021，33（8）：1546-1564.
[31] Di Benedetto G，Burgaletto C，Bellanca CM，et al. Role of microglia and astrocytes in Alzheimer's disease：from neuroinflammation to Ca^{2+} homeostasis dysregulation [J]. Cells-Basel，2022，11（17）：2728.
[32] Lee SI，Jeong W，Lim H，et al. APOE4-carrying human astrocytes oversupply cholesterol to promote neuronal lipid raft expansion and Aβ generation [J]. Stem Cell Rep，2021，16（9）：2128-2137.
[33] Lacampagne A，Liu XP，Reiken S，et al. Post-translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits [J]. Acta Neuropathol，2017，134（5）：749-767.
[34] Gambardella J，Lombardi A，Morelli MB，et al. Inositol 1，4，5-trisphosphate receptors in human disease：a comprehensive update [J]. J Clin Med，2020，9（4）：1096.
[35] Shao LZ，Zhang Y，Hao YP，et al. Upregulation of IP3 receptor mediates APP-induced defects in synaptic downscaling and sleep homeostasis [J]. Cell Rep，2022，38（13）：110594.
[36] Malek M，Wawrzyniak AM，Koch P，et al. Inositol triphosphate-triggered calcium release blocks lipid exchange at endoplasmic reticulum-Golgi contact sites [J]. Nat Commun，2021，12（1）：2673.
[37] Parys JB，Lemos FO. The interplay between associated proteins，redox state and Ca^{2+} in the intraluminal ER compartment regulates the IP3 receptor [J]. Cell Calcium，2024，117：102823.
[38] Arige V，Terry LE，Wagner LE，et al. Functional determination of calcium-binding sites required for the activation of inositol 1，4，5-trisphosphate receptors [J]. P Natl Acad Sci Usa，2022（39）：e2209267119.
[39] Chen-Engerer HJ，Hartmann J，Karl RM，et al. Two types of functionally distinct Ca^{2+} stores in hippocampal neurons [J]. Nat Commun，2019，10（1）：3223.
[40] Chung JS，Tilūnaitė A，Ladd D，et al. IP_3R activity increases propensity of RyR-mediated sparks by elevating dyadic $[Ca^{2+}]$ [J]. Math Biosci，2023，355：108923.
[41] Orem BC，Pelisch N，Williams J，et al. Intracellular calcium release through IP_3R or RyR contributes to secondary axonal degeneration [J]. Neurobiol Dis，2017，106：235-243.
[42] Bera A，Lavanya G，Reshmi R，et al. Mechanistic and therapeutic role of Drp1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Eur J Neurosci，2022，56（9）：5516-5531.
[43] Bhatti JS，Kaur S，Mishra J，et al. Targeting dynamin-related protein-1 as a potential therapeutic approach for mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Bba-Mol Basis Dis，2023，1869（7）：166798.
[44] Stanga S，Caretto A，Boido M，et al. Mitochondrial dysfunctions：a red thread across neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci，2020，21（10）：3719.
[45] Wilson EL，Metzakopian E. ER-mitochondria contact sites in neurodegeneration：genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms [J]. Cell Death Differ，2021，28（6）：1804-1821.
[46] Rossi A，Pizzo P，Filadi R. Calcium，mitochondria and cell metabolism：a functional triangle in bioenergetics [J]. Bba-Mol Cell Res，2019，1866（7）：1068-1078.
[47] Bootman MD，Bultynck G. Fundamentals of cellular calcium signaling：a primer [J]. Csh Perspect Biol，2020，12（1）：a038802.
[48] Llanos-González E，Henares-Chavarino ÁA，Pedrero-Prieto CM，et al. Interplay between mitochondrial oxidative disorders and proteostasis in Alzheimer's disease [J]. Front Neurosci-Switz，2020，13：1444.
[49] Chowdhury AR，Srinivasan S，Csordás G，et al. Dysregulation of RyR calcium channel causes the onset of mitochondrial retrograde signaling [J]. Iscience，2020，23（8）：101370.
[50] Ryan KC，Laboy JT，Norman KR. Deregulation of mitochondrial calcium handling due to presenilin loss disrupts redox homeostasis and promotes neuronal dysfunction [J]. Antioxidants-Basel，2022，11（9）：1642.
[51] Misrani A，Tabassum S，Yang L. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. Front Aging Neurosci，2021，13：617588.

[52] Drabik K，Mali ń ska D，Piecyk K，et al. Effect of chronic stress present in fibroblasts derived from patients with a sporadic form of AD on mitochondrial function and mitochondrial turnover [J]. Antioxidants-Basel，2021，10（6）：938.
[53] Valdés-Undurraga I，Lobos P，Sánchez-Robledo V，et al. Long-term potentiation and spatial memory training stimulate the hippocampal expression of RyR2 calcium release channels [J]. Front Cell Neurosci，2023，17：1132121.
[54] Hidalgo C，Paula-Lima A. RyR-mediated calcium release in hippocampal health and disease [J]. Trends Mol Med，2024，30（1）：25-36.
[55] SanMartín CD，Veloso P，Adasme T，et al. RyR2-mediated Ca^{2+} release and mitochondrial ROS generation partake in the synaptic dysfunction caused by amyloid β peptide oligomers [J]. Front Mol Neurosci，2017，10：115.
[56] Bolognino I，Giangregorio N，Tonazzi A，et al. Synthesis and biological evaluation of dantrolene-like hydrazide and hydrazone analogues as multitarget agents for neurodegenerative diseases [J]. Chemmedchem，2021，16（18）：2807-2816.
[57] Yang F，Zhao JA，Chen G，et al. Design，synthesis，and evaluation of hydrazones as dual inhibitors of ryanodine receptors and acetylcholinesterases for Alzheimer’s disease [J]. Bioorg Chem，2023，133：106432.
[58] Dong XN，Li L，Zhang DD，et al. Ginsenoside Rg_1 attenuates LPS-induced cognitive impairments and neuroinflammation by inhibiting NOX2 and Ca^{2+}-CN-NFAT1 signaling in mice [J]. J Funct Foods，2021，87：104791.
[59] Wang WW，Han RY，He HJ，et al. Delineating the role of mitophagy inducers for Alzheimer disease patients [J]. Aging Dis，2021，12（3）：852-867.
[60] Xu F，Wu Y，Yang QY，et al. Engineered extracellular vesicles with SHP2 high expression promote mitophagy for Alzheimer’s disease treatment [J]. Adv Mater，2022，34（49）：e2207107.
[61] Chung KM，Jeong EJ，Park H，et al. Mediation of autophagic cell death by type 3 ryanodine receptor（RyR3）in adult hippocampal neural stem cells [J]. Front Cell Neurosci，2016，10：116.
[62] Vervliet T，Pintelon I，Welkenhuyzen K，et al. Basal ryanodine receptor activity suppresses autophagic flux [J]. Biochem Pharmacol，2017，132：133-142.
[63] Long JM，Holtzman DM. Alzheimer disease：an update on pathobiology and treatment strategies [J]. Cell，2019，179（2）：312-339.
[64] Zheng YY，Zheng C，Tu WZ，et al. Danshensu inhibits Aβ aggregation and neurotoxicity as one of the main prominent features of Alzheimer’s disease [J]. Int J Biol Macromol，2023，245：125294.
[65] de Farias ARM，Pelletier A，Iohan LCC，et al. Amyloid-beta peptides trigger premature functional and gene expression alterations in human-induced neurons [J]. Biomedicines，2023，11（9）：2564.
[66] Yavorsky VA，Rozumna NM，Lukyanetz EA. Influence of amyloid beta on impulse spiking of isolated hippocampal neurons [J]. Front Cell Neurosci，2023，17：1132092.
[67] Montagna E，Crux S，Luckner M，et al. In vivo Ca^{2+} imaging of astrocytic microdomains reveals a critical role of the amyloid precursor protein for mitochondria [J]. Glia，2019，67（5）：985-998.
[68] Izquierdo P，Jolivet RB，Attwell D，et al. Amyloid plaques and normal ageing have differential effects on microglial Ca^{2+} activity in the mouse brain [J]. Pflug Arch Eur J Phy，2024，476（2）：257-270.
[69] Paula-Lima AC，Adasme T，SanMartín C，et al. Amyloid β-peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca^{2+} release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF [J]. Antioxid Redox Sign，2011，14（7）：1209-1223.
[70] Chiantia G，Hidisoglu E，Marcantoni A. The role of ryanodine receptors in regulating neuronal activity and its connection to the development of Alzheimer’s disease [J]. Cells-Basel，2023，12（9）：1236.
[71] Yao JJ，Sun B，Institoris A，et al. Limiting RyR2 open time prevents Alzheimer’s disease-related neuronal hyperactivity and memory loss but not β-amyloid accumulation [J]. Cell Rep，2020，32（12）：108169.
[72] Ali H，Tofrizal T，Tjong DH，et al. The RYR3 gene is involved in Wharton’s jelly derived mesenchymal stem cell treatment of Alzheimer’s disease in rats [J]. Arch Med Sci，2023，19（3）：820-824.
[73] Hopkins PM，Girard T，Dalay S，et al. Malignant hyperthermia 2020 Guideline from the association of anaesthetists [J]. Anaesthesia，2021，76（5）：655-664.
[74] Wang JT，Shi Y，Yu SC，et al. Intranasal administration of dantrolene increased brain concentration and duration [J]. PLoS One，2020，15（3）：e0229156.
[75] Wang Y，Liang G，Liang SQ，et al. Dantrolene ameliorates impaired neurogenesis and synaptogenesis in induced pluripotent stem cell lines derived from patients with Alzheimer’s disease [J]. Anesthesiology，2020，132（5）：1062-1079.
[76] Bolognino I，Giangregorio N，Pisani L，et al. A prospective repurposing of dantrolene as a multitarget agent for Alzheimer’s disease [J]. Molecules，2019，24（23）：4298.
[77] Hidisoglu E，Chiantia G，Franchino C，et al. The ryanodine receptor-calstabin interaction stabilizer S107 protects hippocampal neurons from GABAergic synaptic alterations induced by Abeta42 oligomers [J]. J Phys，2022，600（24）：5295-5309.
[78] Oulès B，Prete DD，Greco B，et al. Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-β load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease [J]. J Neurosci，2012，32（34）：11820-11834.
[79] Peng J，Liang G，Inan S，et al. Dantrolene ameliorates cognitive decline and neuropathology in Alzheimer triple transgenic mice [J]. Neurosci Lett，2012，516（2）：274-279.
[80] Shi Y，Zhang L，Gao X，et al. Intranasal dantrolene as a disease-modifying drug in Alzheimer 5XFAD mice [J]. J Alzheimers Dis，2020，76（4）：1375-1389.

（收稿日期：2024-03-25；修回日期：2024-05-02）

炎症性肠病合并微量营养素缺乏的支持治疗的研究进展

王佳惠[1]，李佳桦[1]，徐佳强[2*]（1. 北大医疗鲁中医院药剂科，山东 淄博 255400；2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院药学部，武汉 430030）

摘要：炎症性肠病（IBD）是一种慢性非特异性肠道疾病，其主要临床表现为腹痛、腹泻和黏液脓血便，且常伴随出现营养不良和特定营养缺乏。同时，人体所需的微量营养素的缺失也可能是 IBD 的触发因素。本文就 IBD 合并微量营养素缺乏及其补充治疗进行综述，为 IBD 患者的营养治疗提供参考。

关键词：炎症性肠病；微量营养素缺乏；营养支持治疗
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3058-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.037

Supportive treatment for inflammatory bowel disease combined with micronutrient deficiency

WANG Jia-hui[1], LI Jia-hua[1], XU Jia-qiang[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *PKU Care Luzhong Hospital*, *Zibo Shandong* 255400; 2. *Department of Pharmacy*, *Union Hospital*, *Tongji Medical College*, *Huazhong University of Science and Technology*, *Wuhan* 430030)

Abstract: Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic non-specific intestinal disease characterized by abdominal pain, diarrhea, and mucopurulent bloody stools, often accompanied by malnutrition and specific nutritional deficiencies. Meanwhile, the lack of micronutrients required by the human body may also be a triggering factor for the onset of IBD. This article reviewed micronutrients deficiencies related to IBD and their supplementaly treatments, providing reference for nutritional treatment of IBD patients.
Key words: inflammatory bowel disease; micronutrient deficiency; nutritional support

炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）是一种由肠道菌群紊乱、宿主免疫、遗传易感性、环境等多种因素导致的慢性非特异性肠道炎症性疾病，包括溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）和克罗恩病（Crohn's disease，CD），具有慢性、终身性和反复性等特点[1-2]。其确切病因尚不明确，单个或者重叠多个致病因素可共同导致 IBD 的发生。目前，IBD 治疗的主要目标均为缓解患者临床症状的和促进内镜下的黏膜愈合[3]。常用的治疗药物包括氨基水杨酸类、激素、免疫抑制剂和生物制剂等，但研究发现单药治愈率低且不良反应多，联合药物治疗及营养补充治疗可延缓病情的发展[4]。

营养治疗分为宏量营养素治疗（蛋白质、碳水化合物和脂肪）和微量营养素治疗（微量元素和维生素）。目前宏量营养素的补充在 IBD 临床辅助治疗中研究较为成熟[5]；微量营养素的缺乏对 IBD 病情影响的研究较少[6]。研究显示，IBD 导致微量营养素缺乏患病率较高的元素有铁（27%）、维生素 D（13%）、维生素 A（25%）和维生素 B_{12}（5%）以及红细胞叶酸（17%），这些微量营养素的缺乏又会进一步导致 IBD 患者病情的加重[7]。因此本文着重从这几种微量营养素缺乏情况进行阐述，探讨 IBD 合并微量营养素缺乏的治疗策略。

1 IBD 合并微量营养素的缺乏

1.1 IBD 合并缺铁性贫血

贫血是 IBD 患者最常见的肠外表现，IBD 患者发病率最高的贫血类型为缺铁性贫血（iron deficiency anemia，IDA）。CD 患者缺铁性贫血的发生率高于 UC[7]，IBD 患者疾病活动度、病变位置、年龄、性别等都是造成贫血的危险因素[8]。IBD 患者发生贫血的原因包括摄入不足、黏膜溃疡引起的慢性失血及慢性炎症导致肝脏铁调素表达水平升高，从而抑制肠道铁的吸收和单核巨噬细胞系统中铁的释放。IDA 会严重影响 IBD 患者的生活质量，增加住

作者简介：王佳惠，女，主管药师，主要从事心血管专业临床药学工作，email：18830269619@163.com *通信作者：徐佳强，男，主管药师，主要从事肠内外营养工作，email：jiaqiang_xu@hust.edu.cn

院次数和死亡风险。因此关注 IBD 患者早期营养健康非常重要。

1.2 IBD 合并维生素 D 缺乏

维生素 D 的主要作用为调节钙磷稳态、维持骨骼健康，除此之外，在感染性疾病、自身免疫性疾病和 IBD 等中发挥着重要作用[5]。人体中的维生素 D 水平主要来源于阳光照射、口服摄入及肠道吸收。而 IBD 患者肠道黏膜炎症会导致维生素 D 吸收不良，且糖皮质激素等 IBD 常见治疗药物也可阻碍维生素 D 的吸收代谢，从而导致机体维生素 D 含量下降。此外，有研究将 IBD 患者（CD 患者及 UC 患者）与肠易激综合征（IBS）患者进行比较，发现 CD 患者的维生素 D 水平低于 IBS 患者，但 UC 患者中无此发现，考虑 CD 患者发生维生素 D 缺乏的概率高于 UC 患者[9]。

IBD 患者的免疫耐受会被破坏，而维生素 D 可通过特定的维生素 D 受体对 T 细胞、抗原呈递细胞等靶细胞发挥效应，从而诱导免疫耐受。因此，适量补充维生素 D 可以减轻 IBD 患者的免疫系统紊乱。有研究对初发 UC 的维生素 D 水平进行分析，发现初始维生素 D 正常的 UC 患者经过规范化治疗后，疗效较初始维生素 D 缺乏的 UC 患者更好[10]。因此建议治疗 IBD 患者时监测患者的维生素 D 水平，尤其是重症患者、肤色较暗的患者以及营养不良或超重的患者。

1.3 IBD 合并维生素 A 缺乏

维生素 A 是机体生长发育重要的微量营养素，具有促进人体生长及骨骼发育，维持视网膜功能，参与新陈代谢、免疫等多种生理功能[11]。维生素 A 及其衍生物（视黄醇、视黄酸等）对脊椎动物的组织发育和稳态起着重要作用[12]，主要储存在肝脏中，其血清监测水平一般用于反映身体储备情况。Soares-Mota 等[13]研究发现 IBD 患者中 29% 的患者血清视黄醇浓度较低，37% 的患者相对剂量反应检测呈阳性，均明显高于对照组，这表明 IBD 患者肝脏维生素 A 储存不足。但目前尚无研究分析维生素 A 缺乏在 UC 与 CD 患者间的差异。除此之外，IBD 治疗过程中也存在潜在的维生素 A 缺乏风险：2014 年发表的一份患有 IBD 并伴有夜盲症患者的病例报告显示[14]，患者因 CD 伴狭窄和瘘管多次行切除后导致短肠综合征，随后继发夜盲症；在定期注射维生素 A 后夜盲症得到了好转，并恢复了正常视力。从侧面证明 IBD 患者肠内吸收功能的下降和治疗时持续性肠道丢失会造成维生素 A 的缺乏；因此，对于 CD 患者应询问其夜视问题，测量维生素 A 水平，必要时转诊眼科以进一步评估。

1.4 IBD 合并维生素 B_{12} 和叶酸缺乏

维生素 B_{12} 和叶酸对于人体正常的生理功能有重要的调节作用，其吸收部位一般在小肠。而 IBD 可能累及小肠而造成患者血清叶酸和维生素 B_{12} 浓度降低。Bermejo 等[15]研究发现 CD 患者和 UC 患者伴有维生素 B_{12} 缺乏症的发生率分别为 15.6%、22.2%，伴有叶酸缺乏症的发生率分别为 2.8%、4.3%。考虑回肠切除是维生素 B_{12} 缺乏的危险因素，而叶酸缺乏与疾病严重程度相关，Battat 等[16]总结了 IBD 患者缺乏叶酸的原因，可能包括远端回肠受累、节段手术切除引起的吸收区长期炎症或纤维化或狭窄、瘘管和肠道细菌过度生长；疾病活动期维生素摄入减少、肠道吸收不良和需求增加；回肠远端的炎症和肠肝循环紊乱引起吸收不良等。也有研究表明患者诊断为 IBD 后会改用无麸质饮食、治疗过程中服用柳氮磺胺吡啶和甲氨蝶呤等药物同样会增加叶酸和维生素 B_{12} 缺乏的风险[17-18]。

2 IBD 患者微量营养素的补充

2.1 铁剂的补充

IDA 是指机体内铁元素供需失衡，体内铁元素耗尽，血红蛋白合成减少而引起的贫血。铁剂是治疗此病的常用药物，临床上常用铁剂虽功能相同，但各有其特点。目前常见补铁药物见表 1。

口服补铁是预防因失血或摄入不足而继发的 IDA 的主要方式。中国专家共识[19]建议轻度 IDA 患者可隔日服用中等剂量的铁，以减少对铁调素的影响；严重 IDA 患者可增加口服铁剂量。对于 IBD 患者，ECCO 指南建议[20]每日铁剂摄入不超过 100 mg，同服维生素 C 可促进铁剂吸收。在口服铁剂时部分患者会发生腹痛、恶心、胀气和腹泻；过量服铁可出现消化道狭窄、便血或肝肾功能损害等不良反应而导致治疗依从性差。因此，口服补铁被认为对静止期或轻度 IBD 患者更安全有效。胃肠道不能耐受或想快速补铁的患者可选用静脉补铁治疗。同时，ECCO 指南[20]指出对于临床活动性 IBD、既往口服铁不耐受、血红蛋白＜ 10 $g \cdot dL^{-1}$ 及需要使用促红细胞生成药物的患者，静脉补铁可作为一线治疗方案。且应在矫正后 6～12 个月内，每 3 个月监测一次，预防复发性缺铁。

2.2 维生素 D 的补充

维生素 D 是一种脂溶性维生素，存在于胆钙化醇（维生素 D_3）或麦角钙化醇（维生素 D_2）中。可通过将皮肤暴露在太阳下获得，也可通过食用一些油性鱼类、钙强化食品（主要是乳制品），或者通过维生素 D 补充剂获得[21]。临床上常见的维生素 D 补充制剂包括普通维生素 D（维生素 D_2、维生素 D_3）、活性维生素 D 及其类似物（阿法骨化醇和骨化三醇）。由于麦角钙化醇的总体生物活性不超过胆钙化醇的 30%。胆钙化醇或维生素 D_3 的天然来源（特别是油性鱼类）是目前首选的补充形式。无论服用哪种补充剂都建议定期监测患者血清

表 1 常见铁制剂及其特点

Tab 1 Common iron agents and their characteristics

给药途径		代表药物	含铁量	特点	用法用量（以铁剂量计算）
口服给药	第一代	硫酸亚铁	20%	含铁量较高、价格便宜，性质不稳定，生物利用度差，胃肠道刺激显著，游离的亚铁离子会产生内源性自由基，造成细胞膜损伤	60 mg/ 次，tid
	第二代	富马酸亚铁	33%	含铁量和生物利用度均高于硫酸亚铁，胃肠不良反应减轻，仍以离子形式吸收	60 ～ 120 mg/ 次，tid
		琥珀酸亚铁	35%		100 ～ 200 mg/ 次，bid
		枸橼酸铁铵	10 mL：43 mg		43 ～ 86 mg/ 次，tid
	第三代	多糖铁复合物	46%	无游离铁离子，因此不良反应更少，吸收效果更好	300 mg/ 次，qd
		右旋糖酐铁口服液	5 mL：25 mg		50 ～ 100 mg/ 次，bid
静脉给药	第一代	高分子右旋糖酐铁	2 mL：100 mg	需深部肌内注射，易发生过敏反应，现已停用	—
	第二代	低分子右旋糖酐铁	2 mL：100 mg	优于一代，但铁分子不稳定，游离铁易释放入血	100 ～ 200 mg/ 次，2 ～ 3 次 / 周
		蔗糖铁	5 mL：100 mg		100 ～ 200 mg/ 次，1 ～ 3 次 / 周
	第三代	羧基麦芽糖铁	1 mL：50 mg	分子结构稳定，超敏、铁过载等风险低，安全性高，可快速大剂量输注补铁	单次剂量＜ 15 mg • kg^{-1}（静脉推注）；＜ 20 mg • kg^{-1}（静脉滴注）

钙浓度，并根据其水平调整给药剂量，以避免高钙血症的发生，保证治疗安全性。

中国专家共识建议特殊人群，如婴儿、孕妇及老年人，应据情况予以维生素 D 制剂 400 ～ 800 U • d^{-1}。虽然 IBD 患者维生素 D 补充剂量无明确的指南支持，但 Ghishan 等 [22] 建议 1 ～ 70 岁和 70 岁以上的维生素 D_3 水平正常的 IBD 患者，分别摄入维生素 D 制剂 600 U • d^{-1} 和 800 U • d^{-1}；对于有维生素 D_3 缺乏风险的成年人，建议摄入量为 1000 U • d^{-1}；已确定维生素 D_3 缺乏的患者，建议每日摄入量为 6000 U 或 5 万 U，每周一次。存在影响胃肠道吸收维生素 D 情况时，可肌内注射维生素 D 制剂 15 万～ 30 万 U/ 次，并根据需要结合口服补充剂治疗。用药两个月左右后对 25（OH）D_3 水平随访监测，尤其是对正在接受类固醇治疗的患者。

2.3 维生素 A 的补充

维生素 A 是人体必需的一种微量营养素，防治维生素 A 缺乏的主要措施是平衡膳食。日常富含维生素 A 的食物，对于大多数的人来说极易获得且非常安全，合理膳食不能满足维生素 A 需要的人群，则需要启动药物治疗。世界卫生组织建议维生素 A 缺乏症的患者口服 20 万 U 维生素 A，第二日重复服用一次，两周后再服用一次。对于患 IBD 等慢性吸收不良的患者，建议肌内注射维生素 A，而非口服 [11, 23]。而维生素 A 补充剂会存在过量的安全风险。长期每日摄取剂量≥ 5 万 U 维生素 A 或有肝脏疾病的患者可能诱发维生素 A 毒性 [24]，如头昏、嗜睡、呕吐、腹泻等，严重者可致死亡。

2.4 维生素 B_{12} 和叶酸的补充

维生素 B_{12} 是唯一含金属元素的维生素。食补主要来源为动物性食物，如牛肉、动物肝脏、海鲜、乳制品和鸡蛋。英国血液学委员会 [25] 建议对无神经系统受累患者的初始治疗为 1 mg 肌内注射，每周 3 次，持续两周。出现神经系统症状的患者隔日肌内注射 1 mg，直至没有进一步进展。且推荐肌内注射治疗重症缺乏和吸收不良综合征；对于没有吸收或依从性问题的无症状、轻度疾病的患者，可以考虑口服补充。大部分维生素 B_{12} 缺乏治疗试验都排除了 IBD 患者，几项随机试验针对萎缩性胃炎、回肠或胃手术患者高剂量口服（1 ～ 2 mg • d^{-1}）给药与肠外给药进行了比较，结果表明，高剂量口服给药在维生素 B_{12} 水平和症状缓解方面的短期改善与肠外给予相似或更好 [26-27]。对于 CD 患者，口服治疗可能与胃肠外治疗一样有效，但目前尚未得到充分的探索 [28]。远端回肠或末端回肠是特异性吸收维生素 B_{12} 的区域。因此 IBD 患者在治疗时回肠末端切除＞ 20 cm 的患者，可能需要加大维生素 B_{12} 的补充剂量；切除＞ 60 cm 的患者需终身补充 [6, 16]。

叶酸与维生素 B_{12} 同属水溶性维生素，为人体细胞生长和繁殖的必需元素。对于叶酸缺乏的人首先推荐平衡饮食来改善，如蔬菜、豆制品、动物肝脏等。但食物获取的叶酸稳定性相对较弱、生物利用度低，因此常需要服用药物进行补充。普通患者叶酸补充的安全有效剂量为 0.4 ～ 1 mg • d^{-1}[29-30]，IBD 患者建议每日最多服用 15 mg，持续 4 个月 [25]。长期大量补充叶酸可能会引起结直肠癌、掩盖维生素 B_{12} 缺乏的早期表现、降低叶酸吸收率等不良反应，因此不建议长期服用叶酸补充剂。

3 讨论

有报道指出，IBD 患者还可引起维生素 B_1、维生素 K、钙和锌等微量营养素的缺乏，原因可能与 IBD 患者肠道受损、肠内菌群紊乱及维生素 D 缺乏导致钙合成的减少有关 [22, 31]。在给予对应补充剂治疗后，IBD 症状也随着微量营养素水平的正常化而改善。但需注意的是：锌会干扰铁和铜的吸收，并加剧其潜在的不足；补充大剂量钙或叶酸也会减少锌的吸收。

综上所述，大部分 IBD 患者在诊断和治疗时

常伴有维生素、铁缺乏等问题，且均与疾病活动程度密切相关。有研究表明，早期和持续的营养补充可能使 IBD 患者降低炎症发生率、缩短病程，对患者心理健康产生积极影响[32]。因此，应尽早对确诊 IBD 的患者进行营养不良风险评估、监测各种微量营养素的含量情况，并及时进行营养调控，对患者病情治疗是有益的。IBD 患者微量营养素缺乏症恢复正常水平所需的剂量与健康个体的营养建议不一致，IBD 患者微量营养素补充剂选择方面可能需要更早启动注射剂剂型且给药剂量加大、给药持续时间也更长。

目前，由于临床试验样本量少、患者个体差异等因素，对 IBD 患者微量营养素缺乏的危害及确切的推荐补充剂量等研究有限，导致缺乏微量营养素筛查目的及治疗管理的医学证据，因此呼吁更多医疗机构能意识到 IBD 患者进行完善营养研究的重要性。

参考文献

[1] 陆世珉，魏舒纯，董卫国 . 具核梭杆菌与炎症性肠病相关性的研究进展 [J]. 临床内科杂志，2021，38（4）：217-219.

[2] Lee HS，Vancamelbeke M，Verstockt S，et al. Molecular changes in the non-inflamed terminal ileum of patients with ulcerative colitis [J]. MDPI，2020，9（8）：1793.

[3] Nugent FW，Roy MA. Duodenal Crohn’s disease：an analysis of 89 cases [J]. Am J Gastroenterol，1989，84（3）：249-254.

[4] Seyedian SS，Nokhostin F，Malamir MD. A review of the diagnosis，prevention，and treatment methods of inflammatory bowel disease [J]. J Med Life，2019，12（2）：113-122.

[5] 荀锋，杨嘉诚，王宏刚 . 维生素 D 在炎性肠病中作用的研究进展 [J]. 肠外与肠内营养，2023，30（2）：121-125.

[6] 周丹丽，林琼，倪竹梦，等 . 儿童炎症性肠病微量营养素缺乏研究进展及治疗建议 [J]. 药学与临床研究，2022，30（6）：536-540.

[7] 王陆军，吴正祥 . 克罗恩病初诊患者贫血的临床特点 [J]. 临床医学研究与实践，2019，4（5）：17-19，22.

[8] 雷鑫明，路亮 . 炎症性肠病并发贫血的临床特点及蔗糖铁治疗疗效评估 [J]. 安徽医药，2017，21（10）：1854-1857.

[9] Caviezel D，Maissen S，Niess JH，et al. High prevalence of vitamin D deficiency among patients with inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Intest Dis，2018，2（4）：200-210.

[10] 何东东，崔旻，姚萍 . 初始维生素 D 水平与初发溃疡性结肠炎患者病情及疗效的相关性研究 [J]. 国际消化病杂志，2021，41（5）：342-384.

[11] 无，戴耀华，王琳，等 . 中国儿童维生素 A、维生素 D 临床应用专家共识 [J]. 中国儿童保健杂志，2021，29（1）：110-116.

[12] 贺彩梅 . 维生素 A 影响紧密连接蛋白表达及其抑制肠道炎症的作用研究 [D]. 长沙：湖南师范大学，2019.

[13] Soares-Mota M，Silva TA，Gomes LM，et al. High prevalence of vitamin A deficiency in Crohn’s disease patients according to serum retinol levels and the relative dose-response test [J]. World J Gastroenterol，2015，21：1614-1620.

[14] Breno DRL，Pichi F，Lowder CY. Night blindness and Crohn’s disease [J]. Int Ophthalmol，2014，34（5）：1141-1144.

[15] Bermejo F，Algaba A，Guerra I，et al. Should we monitor vitamin B_{12} and folate levels in Crohn’s disease patients? [J]. Scand J Gastroentero，2013，48（11）：1272-1277.

[16] Battat R，Kopylov U，Szilagyi A，et al. Vitamin B_{12} deficiency in inflammatory bowel disease：prevalence，risk factors，evaluation，and management [J]. Inflamm Bowel Dis，2014，20：1120-1128.

[17] Martín-Masot R，Nestares MT，Diaz-Castro J，et al. Multifactorial etiology of anemia in celiac disease and effect of gluten-free diet：a comprehensive review [J]. Nutrients，2019，11（11）：2557.

[18] Dibb M，Subramanian S. Anaemia in inflammatory bowel disease [J]. Frontline Gastroenterol，2014，5（3）：190-196.

[19] 中华医学会血液学分会红细胞疾病（贫血）学组 . 铁缺乏症和缺铁性贫血诊治和预防的多学科专家共识（2022 年版）[J]. 中华医学杂志，2022，102（41）：11.

[20] Dignass AU，Gasche C，Bettenworth D，et al. European consensus on the diagnosis and management of iron deficiency and anaemia in inflammatory bowel diseases [J]. J Crohns Colitis，2015，9（3）：211-222.

[21] Battistini C，Ballan R，Herkenhoff ME，et al. Vitamin D modulates intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases [J]. Preprints，2020（1）：2-22.

[22] Ghishan FK，Kiela PR. Vitamins and minerals in IBD [J]. Gastroenterol Clin North Am，2017，46（4）：797-808.

[23] Feroze KB，Kaufman EJ. Xerophthalmia [M]. Treasure Island（FL）：StatPearls Publishing，2023.

[24] 周建烈 . 维生素 A 的缺乏、补充与中毒 [J]. 中华临床营养杂志，2000，8（4）：262-265.

[25] Devalia V，Hamilton MS，Molloy AM. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders [J]. Br J Haematol，2014，166（4）：496-513.

[26] Bolaman Z，Kadikoylu G，Yukselen V，et al. Oral versus intramuscular cobalamin treatment in megaloblastic anemia：a single-center，prospective，randomized，open-label study-Science Direct [J]. Clin Ther，2003，25（12）：3124-3134.

[27] Castelli MC，Friedman K，Sherry J，et al. Comparing the efficacy and tolerability of a new daily oral vitamin B_{12} formulation and intermittent intramuscular vitamin B_{12} in normalizing low cobalamin levels：a randomized，open-label，parallel-group study [J]. Clin Ther，2011，33（3）：358-371.

[28] Gomollón F，Carla G，Jose M，et al. Oral cyanocobalamin is effective in the treatment of vitamin B_{12} deficiency in Crohn’s disease [J]. Nutrients，2017，9（3）：308.

[29] Naderi N，House JD. Recent developments in folate nutrition [J]. Adv Food Nutr Res，2018，83：195-213.

[30] 中国医药教育协会临床合理用药专业委员会，中国医疗保健国际交流促进会高血压分会，中国妇幼保健协会围产营养与代谢专业委员会，等 . 中国临床合理补充叶酸多学科专家共识 [J]. 医药导报，2021，40（1）：1-10.

[31] 刘雪纯，荆雪 . 炎症性肠病与常见微量元素缺乏的研究进展 [J]. 医学临床研究，2023，40（5）：641-644.

[32] Guzek D. Vitamin D supplementation and mental health in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome patients：a systematic review [J]. Nutrients，2021，13（10）：3662.

（收稿日期：2024-03-06；修回日期：2024-06-28）

基于中西医临床病证特点的乳腺增生动物模型研究进展

王召，曹利华，贺红娟，苗明三*，王笑雨（河南中医药大学，郑州 450046）

摘要：目的 总结分析目前乳腺增生动物模型的特点，促进其发病机制和临床新药的深入研究。**方法** 挖掘与乳腺增生相关的所有动物模型，将其录入 Excel 中，并基于乳腺增生的中医证候特点和现代医学诊断标准，分析其造模方法、动物类别、动物体重及年龄、作用机制、模型的优点和缺点以及与临床症状的吻合度。**结果** 目前乳腺增生动物模型以化学药物单因素诱导为主，其次是化学药物和物理刺激多因素诱导，最后是体内外结合造模方法。**结论** 完善现有含中医证候的乳腺增生动物模型，改进乳腺增生动物模型的造模方法、模型缺点、作用机制以及与中西医临床吻合度，为临床治疗和预防乳腺增生奠定基础。

关键词：乳腺增生；病证特点；动物模型；中西医吻合度

中图分类号：R283 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3062-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.038

Animal model of hyperplasia of mammary glands based on clinical characteristics of traditional Chinese medicine and Western medicine

WANG Zhao, CAO Li-hua, HE Hong-juan, MIAO Ming-san*, WANG Xiao-yu (*Henan University of Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450046)

Abstract: Objective To summarize the characteristics of animal models of hyperplasia of mammary glands to further the study of its pathogenesis and new drugs. **Methods** All animal models related to the hyperplasia of mammary glands were collected and recorded into Excel. Based on the characteristics of traditional Chinese medicine syndromes and modern medical diagnostic standards of breast hyperplasia, the modeling methods, animal categories, animal body mass and age, mechanism of action, advantages and disadvantages of the model, and the consistency with clinical symptoms were analyzed. **Results** The animal models were mainly induced by single chemical drugs, followed by combination of chemical drugs and physical stimulation. Finally, the single factor molding method. **Conclusion** To improve the existing animal models of hyperplasia of mammary gland with traditional Chinese medicine syndromes, improve the modeling method, model shortcomings, mechanism of action and clinical consistency with traditional Chinese and Western medicine.

Key words: hyperplasia of mammary gland; characteristics of disease and syndrome; animal model; Chinese medicine and Western medicine anastomosis

乳腺增生（hyperplasia of mammary glands，HMG），又称慢性囊性乳腺病，是因雌、孕激素比例失调而引起乳腺实质性过度增生和复旧不全的乳腺疾病之一[1]，好发于 30 ～ 50 岁妇女，临床以乳房出现肿块和疼痛（刺痛或牵拉痛）为主要症状，且疼痛常与情绪变化和经期紊乱有关。西医认为乳腺增生的发生与下丘脑 - 垂体 - 卵巢 - 乳腺内分泌轴紊乱密切相关，中医认为乳腺增生的病因主要与肝气不舒、冲任失调有关。乳腺增生致癌率达 1.25% ～ 50%，是乳腺癌的高危因素之一，可为中医治未病提供依据[2-3]。

目前，现代医学以调节性激素和受体为治疗

基金项目：河南省重大专项（No.221100310400）；豫药全产业链研发河南省协同创新中心（No. 豫科技（2023）175 号）；河南省国际合作重点项目（No. 豫财科〔2023〕16 号）；河南省高等学校重点科研项目（No.23A360016）；河南省博士后科研项目（No.202103093）。

作者简介：王召，女，硕士，主要从事中药药理学研究，email：wz15029824504@163.com *通信作者：苗明三，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药学研究，email：miaomingsan@163.com

乳腺增生的主要方式[4]，临床以药物疗法与手术切除为主，此外，还有调节内分泌系统、血液系统以及调节情绪等干预方法。但现代医学存在肝损伤、骨髓抑制等不良反应和手术创伤大、治疗费用昂贵等缺点，难以达到临床预期目标；中医在治疗乳腺增生方式有口服中药、针灸等多种方法，疗效突出、不良反应小、标本兼治，已成为目前治疗该病的主要手段[5-7]。目前，对乳腺增生发病机制尚未有明确认识，故本文结合乳腺增生的中医证候特点和西医诊断标准，对乳腺增生的动物模型的造模方式、模型特征、作用机制以及临床吻合度进行评价，旨在建立与临床症状更贴近的乳腺增生动物模型，为临床干预药物的研究奠定基础。

1 病因病机

1.1 西医病因病机

目前，西医认为乳腺增生的发病与卵巢功能紊乱有关，症状多与经期密切相关，其常见致病因素有患者自身雌孕激素紊乱、药物干预、情志失调等[8-10]。多数学者认为乳腺增生的发生可能与患者体内雌孕激素比例失调、经前乳腺疼痛有关。其病理改变以乳腺导管、腺泡以及间质不同程度的增生为主。迄今为止，乳腺增生有乳痛症型、纤维腺病型、普通型腺病小叶增生症型、囊肿性乳腺上皮增生症四种病理类型，各型之间的病理改变均有不同程度的移行。

1.2 中医病因病机

《诸病源候论》载“癖者，癖侧在于两胁之间，时而痛事也”，故乳腺增生属中医“乳癖”范畴，冲任二脉所行气血上灌乳房，下注胞宫[11]。病属本虚标实，冲任失调、肝郁脾虚、为本；标实以气滞、血瘀、痰凝为主[12]。根据《外科正宗》记载：“乳癖乃乳中结核，形如丸卵，或重坠作痛，或不痛，皮色不变，其核随喜怒消长，多由思虑伤脾，恼怒伤肝，郁结而成”。可知该病的发生与肝、脾、肾三脏密切相关，其病机为肝郁脾虚[13]，病因与情志不畅、禀赋不足、七情劳倦等致病因素有关，久之致乳房气滞血瘀、痰瘀凝结而成。

2 乳腺增生的中、西医诊断标准

2.1 乳腺增生的西医诊断标准

乳腺组织作为性激素的靶器官，对体内性腺激素的变化颇为敏感。目前针对乳腺增生的检查有超声检查、钼靶 X 线检查、病理学检查等多种方式，其中超声检查对致密腺体的结节和囊实性肿物有较高分辨率，故常将其作为小于 35 岁患者的首选检查，此外，病理学检查是诊断乳腺良恶性疾病的金标准。

本文参照 2012 年《中医外科常见病诊疗指南》[14]、《乳腺增生症诊治专家共识》[15] 和《中医外科学》[16] 以及评价动物模型的方法[17]，进一步拟订乳腺增生的诊断标准，其可分为主要指标 4 条（每项赋值 20%）、辅助检查指标（次要指标）5 条（每项赋值 5%），总计 100%。详见表 1。

表 1 乳腺增生的西医诊断标准

Tab 1 Western diagnostic criteria for hyperplasia of mammary glands

指标		诊断标准	赋值 /%
主要指标	临床表现	① 乳腺疼痛，随情绪和月经的变化而改变	20
		② 乳房常出现多个结节，并累及单侧或双侧乳腺	20
		③ 乳腺肿块痛感与经期有关，肿块可推动有触痛感	20
		④ 部分患者出现乳头溢液	20
辅助检查指标	乳腺超声检查[18]	⑤ 实质性病变呈低回声，结节边界不规则；囊肿边界光滑锐利，有明显病变会出现回声增强效应。典型患者出现“豹纹征”改变	5
	钼靶 X 线检查[19]	⑥ 无明显边界的片状高密度影，并伴乳腺局部钙化灶	5
	病理学检查[20]	⑦ 采用针穿刺、手术等方式活检可疑病灶，并取出组织进行病理检查	5
	核磁共振（MRI）	⑧ 精确度最高，适合乳腺超声和 X 线无法判断结节的情况	5

2.2 乳腺增生的中医诊断标准及证候分型

虽然中医治疗乳腺增生运用了“辨证论治”的思维，但证候分型尚未统一，干预方法也不尽相同。本文参照苗明三等[21]拟订的《乳腺增生动物模型制备规范》以及 2016 年《乳腺增生症诊治专家共识》[22] 临床诊断，总结目前乳腺增生的临床证型，主要有肝气郁结证、肝郁脾虚证、痰瘀凝结证等证型，结合临床症状与动物模型的表观指标，对下列证型的主症和次症进行赋值。

主症包括：① 乳腺肿块；② 乳房疼痛；③ 肿块随情志喜怒消长，善太息；④ 腰酸腿软；⑤ 乳头溢液、痰涎。符合以上任何一项赋值 14%；次症包括：① 纳呆；② 便溏，泻后痛减；③ 胸闷；④ 胁肋胀痛；⑤ 易怒；⑥ 神疲乏力；因次症表现不突出且与模型动物的行为学指标吻合度较低，故每一项赋值 5%。详见表 2。

表 2 乳腺增生的中医证候分型

Tab 2 Classification of traditional Chinese medicine syndromes of hyperplasia of mammary glands

证型	主症	次症	舌象和脉象	所用药物
肝郁脾虚型 [23]	①乳腺肿块；③胁部胀痛，易怒，善太息	①纳呆；②便溏不爽，泻后痛减	舌苔白，脉弦或细	自拟消癖散结汤
肝郁气滞型 [24]	①乳房肿块；②触之胀痛；③与情绪有关	③胸闷；④易怒；⑤口苦咽干	舌苔白，脉弦	逍遥蒌贝散
气滞血瘀型 [25]	②乳房刺痛、胀痛；①可触及肿块	③胸胁胀满；⑤易怒	舌质暗，苔薄白、脉弦或涩	化瘀散结方
痰瘀互结型 [26]	①乳房肿块；②乳房胀痛；⑤乳头溢液	③胸脘满闷；⑤易怒	舌苔白腻、舌暗红，脉沉滑	小金丸
肝郁痰凝型 [27]	①乳房肿块；②胀痛；③善郁易怒	③胸闷胁；⑤失眠多梦，心烦口苦	苔薄黄，脉弦滑	逍遥散
冲任失调型 [28]	①乳房肿块经前加重，经后缓解；②乳房疼痛；④腰酸	⑥神疲倦怠	舌淡，苔白，脉沉弦	二仙汤 [29]
气滞血瘀痰凝证 [30]	①乳房肿块；②乳房疼痛；③易怒	①纳呆；③胸闷；②便溏；⑥乏力	舌黯红，苔白腻，脉弦或涩	消癥丸
肾虚痰凝型 [31]	①乳房肿块；②疼痛，④腰酸腿软	①肥胖；②便溏；⑥肢困乏力	舌体胖，苔白腻，脉沉细	补肾化痰方
肝郁肾虚型 [32]	①乳房肿块；②胀痛；③善太息；④腰膝酸软	⑥神疲乏力；⑤少腹发凉，易怒	舌淡红，苔薄白，脉弦细	贝蒌开郁丸
血瘀痰凝型 [33]	①乳房胀痛；②乳房肿块质韧，边界不清	④腹痛、色黯有块	舌有瘀斑，苔白或腻脉涩、弦或滑	自拟乳癖祛瘀汤
脾虚痰瘀型 [34]	①乳房有活动肿块；②乳腺刺痛	①纳呆；⑥气短，头晕乏力	舌苔滑腻，脉滑或细涩	橘核丸
肝郁血瘀型 [35]	①乳头肿胀充血；②乳房疼痛；③急躁易怒	①纳呆；⑥神疲乏力；⑤心烦易怒	舌黯红，脉弦涩	乳宁汤

3 乳腺增生动物模型分析

3.1 模型动物的选择依据

目前科研人员已在动物实验中证实动物体内含有大量雌激素水平可诱导乳腺增生发生。实验常用 SD 大鼠、BALB/c 小鼠、长爪沙鼠等动物制备乳腺增生动物模型。因鼠类动物具有饲养简单、性情稳定以及遗传学与人类相近等优势，不仅满足临床病理学、药代动力学等科研要求，还是乳腺增生甚至整个临床研究中应用最广泛的实验动物 [36]。早在 1974 年 Rowe 等 [37] 报道老年长爪沙鼠可自发发生乳腺癌以及用于男性乳腺增生动物模型的建立，但由于体内血液和雌激素含量低，致乳腺发育迟缓，不适合临床广泛应用。研究发现 SD 大鼠抗病能力优于 Wistar 大鼠，故临床研究首选 SD 大鼠 [38]。虽 BALB/c 小鼠的病理改变与人类临床表现高度吻合、对手术的耐受性好、价格便宜，但因小鼠体积小，血流量较少，存在一定的弊端，介入治疗难度大，故在临床较少使用。虽然选择兔作为研究对象，有取材简便、成模率高等优点，但模型的制备周期长，故临床较少采用。

3.2 模型动物与临床症状特点的吻合度分析

迄今为止，通过查阅与乳腺增生动物模型有关的文献，发现乳腺增生动物模型常见的造模方式有：单因素造模法（有 9 种诱导方式）、多因素造模法（6 种诱导方式）以及体内外结合造模方式（3 种）；现代医学的吻合度是根据表 1 的诊断标准对模型动物的表现和检测指标进行计算得出；中医的吻合度是依据表 2 中各证型的主次症的赋值，并通过计算模型动物的行为学和检测指标的赋值得出。吻合度较高：西医≥ 65%、中医≥ 50%；吻合度中等：西医≥ 42%、中医≥ 45%；吻合度较低：西医≥ 20%、中医≥ 30%。结果见表 3。

4 讨论

乳腺增生是由遗传、情绪变化、雌孕激素紊乱等致病因素引起的以乳腺肿胀和疼痛为主要症状的良性乳腺疾病，但目前该病的发病机制尚未明确 [60]，有待进一步研究。故本文总结目前所有的乳腺增生动物模型，并对其造模方法、模型动物年龄和性别、机制、优缺点以及与临床的吻合度展开了讨论。

通过分析表 3，发现乳腺增生动物模型常选用 8 ～ 12 周龄的雌性 SD 大鼠，造模方法以雌孕激素混合诱导为主。首先乳腺增生动物模型与临床中、西医吻合度较高的模型有：① 口服与肌内注射混合模型，该模型具有模型动物与临床患者的发病过程相似的症状，便于其机制的研究；② 理化共同刺激模型，该模型充分展示了病证结合的思想，但造模过程烦琐，有待进一步改进；③ 激素和束缚诱导肝郁血瘀证模型，该模型的行为学变化、血液流变学变化明显，但存在操作复杂的缺点，不能满足其他证型乳腺增生研究；④ 药物联合诱导模型，存在模型动物体积大操作不便、价格昂贵的缺点，不利于长久研究；⑤ 敏感乳腺增生模型，该模型动物对造模药物敏感，易成模，但存在价格昂贵和饲养环境要求高等缺点，不适合长期研究。

其次乳腺增生动物模型与临床中、西医吻合度中等的模型有：

① 手术和药物联合诱导模型：该模型造模时间短，行为学症状明显等优势，但存在手术切除卵巢对动物有创伤，易引起其他感染性疾病，该方法需进一步在临床验证。

表 3 乳腺增生动物模型与中、西医临床诊断的吻合度分析

Tab 3 Coincidence between animal model of hyperplasia of mammary glands and clinical diagnosis of Chinese and Western medicine

模型类别	动物种类	年龄 / 体重	造模方法	机制	模型优缺点	吻合度评价
单因素诱导 慢性 HMG 模型	雌性 C3H/HeJ 小鼠 [39]	15 周龄，体重 20 ～ 25 g	连续 10 周采用禁食、夹尾、行为束缚等应激方式干预	反复刺激小鼠中枢神经系统致雌激素紊乱，引起慢性心理应激反应和乳腺增生症状	优点：方便观察小鼠乳头肿胀、发炎等情况；缺点：造模方法烦琐且周期长	符合西医主要指标①②，次要指标⑦，吻合度 45%。与肝郁气滞型相吻合，主症①②③，次症③④⑤，吻合度为 57%
	雌性 SD 大鼠 [40]	体重 160 ～ 204 g	间隔腹腔注射苯甲酸雌二醇 60 d	调节雌、孕激素，使其性腺激素和促性腺激素分泌节律消失引起乳腺增生	优点：模型动物行为学表现突出；缺点：造模时间久，饲养烦琐	符合西医主要指标①③，次要指标⑥，吻合度为 45%。与肝郁脾虚型相吻合，主症①③，次症①②，吻合度为 38%
化学药物诱导模型 [41]	雌性 ICR 小鼠	7 ～ 8 周龄；体重 20 ～ 25 g	连续 30 d 隔日腹腔注射苯甲酸雌二醇，继续注射黄体酮 3 d	间断致敏药刺激，引起小鼠体内雌激素水平升高和代谢紊乱，致乳腺增生疾病的发生	优点：操作简单，因模型动物较小便于观察和饲养；缺点：造模周期长	符合西医主要指标①②③，次要指标⑤，吻合度为 65%。与肝郁脾虚型相吻合，主症①③，次症①②，吻合度为 38%
雌雄对照模型 [42]	ICR 小鼠、Wistar 大鼠、长爪沙鼠	体重分别为：30 ～ 40 g、180 ～ 220 g、40 ～ 50 g	连续 20 d 腹腔注射苯甲酸雌二醇注射液，与停药 5 d 相结合模型	腹腔注射雌激素使内分泌紊乱，停药加重其乳腺增生的症状	优点：造模简单，造模过程可观察乳汁潴留、炎症细胞浸润等症状；缺点：模型动物血液少，不便检测多项生化指标	符合西医主要指标①②④，次要指标⑦，吻合度为 65%。与冲任失调证相吻合，主症①②④，次症⑥，吻合度为 47%
单一药物模型 [43]	雌性昆明小鼠	6 ～ 9 周龄，体重 18 ～ 20 g	连续 30 d 隔日腹腔注射苯甲酸雌激素建模	使用雌激素刺激，引起小鼠乳头出现红、肿、增大、乳晕等症状	优点：造模方式简单，便于操作；缺点：造模时间长，致敏因子单一	符合西医主要指标①②④，吻合度为 60%。与肝郁痰凝型相吻合，主症①②③，次症③⑤，吻合度 52%
男性 HMG 模型 [44]	雄性 Wistar 大鼠	8 周龄，体重 240 ～ 260 g	连续 20 d 腹腔注射苯甲酸雌二醇诱导模型	腹腔注射雌激素刺激雄性小鼠，致小鼠雌、雄激素紊乱，引起乳房肿胀、堵塞等症状	优点：复制模型新颖，有利于研发新药物；缺点：造模药物单一，模型研究不深入，须不断完善	符合西医主要指标①②，次要指标⑤⑧，吻合度为 50%。与肾虚痰瘀型相吻合，主症①②④，次症①②⑥，吻合度 57%
急性 HMG 模型 [45]	雌性 SD 大鼠	体重 170 ～ 180 g	大鼠间隔在前腋下交替注射苯甲酸雌二醇 10 次	皮下注射雌激素，经毛细血管和淋巴管吸收至血液循环，使致敏药迅速发挥药效引起乳腺增生的发生	优点：造模方法简单易行、周期短、成功率高，重复性好；缺点：饲养复杂	符合西医主要指标①②④，次要指标⑤，吻合度为 65%。与脾虚痰瘀型相吻合，主症①②，次症①⑥，吻合度为 38%
并发症 HMG 模型 [46]	雌性 Wistar 大鼠	体重 200 ～ 220 g	连续 5 d 背部注射盐酸甲氧氯普胺注射液，每日 2 次	通过皮下注射甲氧氯普胺阻断大鼠下丘脑多巴胺受体，抑制催乳素因子，促进乳腺增生发生	优点：造模时间短、易成模，操作简单；缺点：乳腺增生的机制未明确阐述，易引起乳腺增生其他并发症的发生	符合西医主要指标①④，次要指标⑤，吻合度 45%。与气滞血瘀痰凝型相吻合，主症①②，次症①②⑥，吻合度 43%
敏感 HMG 模型 [47]	雌性 成年未孕豚鼠	体重 350 ～ 500 g	隔日肌内注射乙烯雌二醇	隔日肌内注射乙烯雌二醇诱导乳腺增生的形成	优点：豚鼠敏感性强，行为学改变明显；缺点：模型动物价格昂贵，不适合长期研究	符合西医主要指标①②④，次要指标⑤，吻合度为 65%。与肝郁血瘀型相吻合，主症①②③，次症①⑤⑥，吻合度 57%
不典型 HMG 模型 [48]	雌性 SD 大鼠	6 周龄，体重 100 ～ 120 g	一次性灌胃 10 mg • mL^{-1} DMBA（7，12-二甲基苯并蒽）油液，完成造模	灌胃 DMBA 芝麻溶液诱导大鼠，致其乳腺发生肿胀、疼痛以及炎症浸润等症状	优点：造模周期短，操作简单，症状与临床高度吻合；缺点：该模型不能全面阐述乳腺增生的发病机制	符合西医主要指标②，次要指标⑤，吻合度为 25%。与气滞痰凝血瘀型相吻合，主症①②③，次症①②③⑥，吻合度为 62%

续表 3

模型类别		动物种类	年龄 / 体重	造模方法	机制	模型优缺点	吻合度评价
多因素诱导	理化联合模型 [49-50]	雌性 SD 大鼠	12 周，160 ～ 180 g	化学药物与夹尾刺激肌内注射雌孕激素完成和饮食调控共同诱导肝郁脾虚乳腺增生模型	基础造模；反复夹尾激怒动物，久刺激则出现抑郁症状；单双禁食损伤脾胃，出现脾虚症状，共奏肝郁脾虚模型	优点：在实验过程中可通过观察大鼠乳腺导管、乳腺腺泡、乳头颜色的变化判断造模的成功与否；缺点：模型动物大，操作复杂，造模烦琐，须进一步优化造模方式	符合西医主要指标②④，次要指标⑤，吻合度 45%。与肝郁脾虚型相吻合，主症①③，次症①②，吻合度为 38%
		雌性 SD 大鼠	10 ～ 12 周龄，体重 180 ～ 230 g	连续 25 d 肌内注射苯甲酸雌二醇，接着持续 5 d 肌内注射黄体酮，每日夹尾刺激 30 min	雌孕激素疗法以及夹尾刺激大鼠性情改变、体重下降等方式，复制乳腺增生模型	优点：模型动物行为学症状明显，乳腺组织病理切片清晰便于观察模型的成功；缺点：造模过程烦琐，周期长	符合西医主要指标①②③，次要指标⑤⑦，吻合度为 70%，与肝郁痰凝型相吻合，主症①②③，次症③⑤，吻合度 52%
	药物和束缚模型 [35，51]	雌性 SD 大鼠	10 周龄，体重 200 ～ 240 g	连续隔日腹腔注射雌激素 5 次和连续 5 d 注射孕激，大鼠颈部佩戴铁环束缚	腹腔注射雌孕激素建立乳腺增生基础模型，通过对束缚刺激，使其发怒，久之产生肝郁血瘀证的模型	优点：模型动物体积大，便于观察行学变化，其血液流变学变化明显；缺点：造模复杂，模型动物不易抓取	符合西医主要指标①②④，次要指标⑤⑦，吻合度为 70%。与肝郁血瘀型相吻合，主症①②③，次症①⑤⑥，吻合度 57%
	多因素刺激 HMG 模型 [52]	雌性 SD 大鼠	体重 180 ～ 200 g	大鼠后腿交替肌内注射 30 d 苯甲酸雌二醇＋ 5 d 黄体酮＋第 21 日开始慢性刺激 15 d。重复 3 个周期	雌孕激素通过肌肉间的毛细血管进入血液循环；继通过昼夜颠倒、冷泳、加热等方式长期刺激致慢性乳腺增生模型建立	优点：成模率高，造模机制与临床症状高度吻合；缺点：造模周期长，造模操作复杂	符合西医主要指标①③，次要指标⑦，吻合度 45%。与气滞血瘀型相吻合，主症①②，次症④⑤，吻合度为 38%
	常规 HMG 模型 [53-54]	雌性 SD 大鼠	39 ～ 78 周，体重 300 ～ 400 g	雌、孕激素联合序贯给药法	肌内注射苯甲酸雌二醇和黄体酮造模，致雌孕激素分泌紊乱，致乳腺增生模型的形成	优点：造模时间短，成模概率高；缺点：因动物大，饲养操作烦琐，且乳腺组织取材难度较高	符合西医主要指标②③④，次要指标⑤，吻合度为 65%。与气滞血瘀型相吻合，主症①②，次症③⑤，吻合度为 38%
	多药物诱导模型 [55]	雌性日本大耳白家兔	体重（2.22±0.09）kg	于家兔臀部交替肌内注射苯甲酸雌二醇 25 d ＋黄体酮注射液 5 d	腹腔注射雌孕激素刺激家兔腺泡腔和腺导管扩张，引起乳癖的发生	优点：便于观察行为学变化；缺点：动物体积大操作难，价格昂贵不利于长期研究	符合西医主要指标②③④，次要指标⑤，吻合度为 65%。与肝郁气滞型相吻合主症①②③，次症③④⑤，吻合度 57%
	体内外联合诱导模型 [56]	雌性昆明小鼠	18 ～ 20 g	灌胃戊酸雌二醇 25 d ＋腹腔注射黄体酮 5 d	使用外源性激素刺激小鼠乳腺，使其代谢紊乱，出现乳腺增生症状	优点：小鼠成本低、生理和解剖学与临床乳腺增生高度吻合，适合临床研究；缺点：取材过程复杂	符合西医主要指标③④，次要指标⑤，吻合度为 45%。与肝郁血瘀型相吻合，主症①②③，次症①⑤⑥，吻合度为 57%
体内外结合模型	手术＋药物模型 [57]	雌性 SD 大鼠	体重 234 ～ 266 g	手术摘除两侧卵巢联合隔日腹腔注射苯甲酸雌二醇 15 次	切除卵巢使大鼠体内雌激素水平下降，孕激素含量增加，两者含量差异诱导乳腺增生发生	优点：周期短成模快；缺点：操作过程烦琐，卵巢切除对实验动物有一定的创伤，易引起其他感染性疾病	符合西医主要指标②③，次要指标⑤，吻合度为 45%。与肝郁血瘀型相吻合，主症①②③，次症①⑤⑥，吻合度为 57%
	药物联合模型 [58]	雌性 Wistar 大鼠	12 周龄，体重 220 ～ 250 g	肌内注射己烯雌酚注射液 25 d ＋黄体酮 5 d	长期肌内注射己烯雌酚增加大鼠体内雌激素，使雌孕激素紊乱，引起乳腺增生的发生	优点：血液多，可检测多个指标；缺点：造模周期长，饲养复杂，造模药长期使用会引起肝功能、高脂血症及心功能异常等不良反应	符合西医主要指标①②④，次要指标⑤，吻合度为 65%。与肝郁脾虚型相吻合，主症①②③，次症①②③⑥，吻合度 62%
	肌内注射药物模型 [59]	雌性 SD 大鼠	8 周龄，体重 180 ～ 200 g	肌内注射己烯雌酚 25 d ＋黄体酮 5 d ＋实验第 41 日药物干预 30 d ＋肌内注射己烯雌酚 30 d	肌内注射雌孕激素刺激大鼠乳腺，使其腺泡融合成团、排列紧密、腺泡腔扩大，致乳腺增生模型形成	优点：可见乳腺小叶和腺泡数量增多、腺泡上皮为立方上皮等典型乳腺增生症状；缺点：模型周期长，不便长期研究	符合西医主要指标①②④，次要指标⑤，吻合度为 65%。与肝郁肾虚型相吻合，主症①②③④，次症⑤⑥⑥，吻合度 66%

② 体内外模型：该模型的发病与临床乳腺增生临床机制一致。

③ 慢性乳腺增生模型：该模型动物的行为学变化与临床肝气郁滞证患者的症状高度吻合，便于临床广泛研究。

④ 雌雄对照模型：该模型动物通过生化指标监测，发现炎症因子明显增加，这将便于临床区别乳腺炎和男性乳腺增生[63]，但饲养方式和造模太复杂，须改进后再进行临床验证。

⑤ 单因素诱导模型：具有造模方式简单，便于操作优点。但造模周期和致敏因子较单一。

⑥ 男性模型：该模型造模方式新颖，可为临床提供治疗男性乳腺增生治疗思路。但存在造模药物单一、临床研究较少等缺点，有待进一步改善。

最后乳腺增生动物模型与临床、中西医吻合度较低的模型有：慢性乳腺增生模型、多因素诱导模型、常规乳腺增生模型、单因素诱导法、急性乳腺增生模型、并发乳腺增生模型以及不典型增生模型，以上模型存在模型动物太大、价格昂贵、造模方式单一、模型动物行为学变化不明显等缺点，这导致模型不能同时满足乳腺增生西医诊断和中医证候特点，存在一定的歧义，若后续研究能对模型的不足进行完善，这将增加乳腺增生动物模型的类型。

综上，目前乳腺增生动物模型的建立已经有一定的结果，包括雌孕激素皮下或腹腔注射法、灌胃法、手术和药物联合诱导法、夹尾和冷水热水等物理刺激方法，以上方法均取得了一定的成果，但造模药物大多类似，造成模型动物的西医症状很相似，虽然中医根据乳腺增生肝郁、血瘀、气滞痰凝等病因已建立部分证候模型，但目前鲜有乳腺增生模型的直接报道，有待进一步改进。迄今为止，制备标准而理想的动物模型是疾病研究的基础，中医在乳腺增生的预防和治疗起关键作用，故选择构建一种稳定、可靠、模拟性强的与人类乳腺疾病相似的乳腺增生动物模型，不仅是研究乳腺增生发病机制的重要基础，也是临床评价乳腺增生诊断和治疗的有效手段。例如：可建立热消融中医药造模方法，进一步改善临床患者术后并发症等不良反应[61]。

参考文献

[1] 邓卫芳，裴晓华.经典方剂逍遥丸临床应用及其质量分析研究进展[J].中国实验方剂学杂志，2024，30（5）：272-281.

[2] 张明，李湘奇，王莹.红金消结胶囊治疗乳腺增生症临床观察[J].光明中医，2024，39（6）：1049-1052.

[3] Wei S，Zhou X，Niu M，et al.Network pharmacology exploration reveals the bioactive compounds and molecular mechanisms of Li-Ru-Kang against hyperplasia of mammary gland[J]. Mol Genet Genomics，2019，294（5）：1159.

[4] 童玉春，宋捷，江一鸣，等.乳腺增生病药物治疗机制研究进展[J].药物评价研究，2019，42（10）：2106-2110.

[5] 牛聪慧，熊明亮.柴胡疏肝散联合耳针治疗乳腺增生症的临床效果研究[J].医学理论与实践，2024，37（2）：239-242.

[6] 周伊宁，解红霞，赵炳聪，等.中药治疗乳腺增生机制研究进展[J].中国中医药信息杂志，2021，28（3）：141-144.

[7] 邵海洋，金根标.小金丸联合祛瘀化痰消症汤治疗乳腺增生痰瘀互结证的临床效果[J].中国中西医结合外科杂志，2023，29（6）：771-776.

[8] 肖兴平，杨稣浩，张心晓，等.针灸治疗乳腺增生症研究进展[J].山西中医，2023，39（10）：66-68.

[9] 厉志莲，张毅.逍遥散加味治疗肝郁痰凝型乳腺增生的疗效观察及对性激素水平的影响[J].中国中医药科技，2023，30（6）：1161-1163.

[10] Sciarra A，Lopez G，Corti C，et al. Columnar cell lesion and apocrine hyperplasia of the breast：is there a common origin? therole of prolactin-induced protein[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol，2019，27（7）：508-514.

[11] 徐留燕，程旭锋，刘琦，等.“经乳气血同轴”理论初探[J].时珍国医国药，2019，30（6）：1445-1446.

[12] 张伟英，高远，林梦婷，等.乳腺增生病机和辨证分型研究现状[J].实用中医内科杂志，2021，35（11）：112-115.

[13] 张银艳，戴子晴，钱江，等.杨德钱应用逍遥散加减治疗乳癖验案一则[J].实用中医药杂志，2023，39（1）：172-173.

[14] 王艺同，张赛，齐蕊.《中医外科学常见病诊疗指南》制定的方法学研究[J].标准科学，2016（4）：67-69.

[15] 中华预防医学会妇女保健分会乳腺保健与乳腺疾病防治学.乳腺增生症诊治专家共识[J].中国实用外科杂志，2016，36（7）：759-762.

[16] 陈孝平.外科学[M].北京：人民卫生出版社，2014：131-133.

[17] 田硕，曹利华，苗明三，等.基于临床中西医病症特点的中医药动物模型评价新方法[J].中药药理与临床，2017，33（6）：165-169.

[18] 张建兴.乳腺超声诊断学[M].北京：人民卫生出版社，2012：51-56.

[19] 杜红文，乳腺增生症的影像学诊断[J].中国医学影像学杂志，2007，15（4）：270-273.

[20] 刘胜，王怡，吴春宇，等.中西医结合临床诊疗乳腺增生专家共识[J].中华中医药杂志，2023，38（3）：1159-1164.

[21] 苗明三，温亚娟，白明，等.乳腺增生动物模型制备规范（草案）[J].中国实验方剂学杂志，2017，23（24）：17-22.

[22] 马薇，金泉秀，吴云飞，等.乳腺增生症诊治专家共识[J].中国实用外科杂志，2016，36（7）：759-762.

[23] 邵玥.中药塌渍配合红外线对肝郁脾虚型乳腺增生病的疗效观察[J].世界最新医学信息文摘，2016，16（32）：169-170.

[24] 林森，廖美容，杜小雪.逍遥萎贝散加减对肝郁气滞型乳腺增生患者临床症状及激素水平的影响[J].长春中医药大学学报，2023，39（11）：1242-1245.

[25] 赖珊珊.乳块消颗粒治疗气滞血瘀证乳腺增生的临床疗

效 [J]. 内蒙古中医药，2023，42（7）：34-36.
[26] 邵海洋，金根标 . 小金丸联合祛瘀化痰消症汤治疗乳腺增生痰瘀互结证的临床效果 [J]. 中国中西医结合外科杂志，2023，29（6）：771-776.
[27] 厉志莲，张毅 . 逍遥散加味治疗肝郁痰凝型乳腺增生的疗效观察及对性激素水平的影响 [J]. 中国中医药科技，2023，30（6）：1161-1163.
[28] 徐留燕，程旭锋，王蓓蓓，等 . 散结消痛膏外敷治疗乳腺增生症冲任失调证 61 例随机对照研究 [J]. 中医杂志，2022，63（17）：1647-1653.
[29] 孙百全 . 二仙汤加减治疗冲任失调型乳腺增生症的临床观察 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2023.
[30] 余红，樊英怡，刘宇飞，等 . 消癥丸治疗气滞血瘀痰凝型乳腺增生病的临床研究 [J]. 辽宁中医杂志，2022，49（8）：136-139.
[31] 沈君敏，杨毅沁，徐笑飞 . 补肾化痰中药治疗肾虚痰凝型男性乳房异常发育症的临床研究 [J]. 河北中医，2021，43（1）：69-71，75.
[32] 周云，邵迎新 . 贝蒌开郁丸治疗肝郁肾虚型乳腺增生症的临床观察 [J]. 基层医学论坛，2021，25（1）：111-113.
[33] 杜一鸣，杜旭，楚王冲，等 . 针药结合治疗血瘀痰凝型乳腺增生临床观察 [J]. 辽宁中医药大学学报，2020，22（1）：174-177.
[34] 朱方勇，杨成爱 . 采用中医辨证分型治疗 93 例乳腺增生病的效果观察 [J]. 中国社区医师，2015，31（34）：81-82.
[35] 沈爱玲，丁优，罗小光 . 通络刮痧法对肝郁血瘀型乳腺增生大鼠乳房微循环及血管生成的影响 [J]. 中华中医药杂志，2015，30（7）：2521-2524.
[36] 赵梦洁，赵琼，胡天成，等 . 基于中西医临床病证特点的抽动障碍动物模型评价分析 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2022，24（7）：2562-2569.
[37] Rowe SE，Simmons JL，Ringler DH，et al. Spontaneous-neoplasms in aging Gerbillinae. A summary of forty-four neo plassms [J].Vet Pthol，1974，11（1）：38-51.
[38] 留甜甜，苗明三 . 基于中西医临床病证特点的慢性肾衰竭动物模型分析 [J]. 中药药理与临床，2023，39（7）：81-85.
[39] 辛悦，于博文，郭鱼波，等 . 舒肝颗粒对肝郁气滞型乳腺增生症小鼠的治疗作用及机制研究 [J]. 北京中医药，2021，40（10）：1077-1082.
[40] 刘柏年，康爱仙 . 乳癖灵治疗乳腺增生作用的研究 [J]. 上海中医药杂志，2005，39（6）：59-61.
[41] 张弦，赵强，徐巧玲，等 . 乳疾康纳米微乳制剂治疗乳腺增生小鼠的药效学研究 [J]. 中国医院用药评价与分析，2021，21（11）：1286-1290，1297.
[42] 王存龙，杜小燕，刘欣，等 . 雌二醇诱导雄性长爪沙鼠乳腺增生模型的初探 [J]. 实验动物与比较医学，2017，37（5）：352-356.
[43] 王丽，田美娟，张佳，等 . 外用中药制剂对小鼠乳腺增生的治疗作用及对激素水平的影响 [J]. 现代肿瘤医学，2017，25（9）：1350-1353.
[44] 李春甫，齐山，王长宏，等 . 自拟消癖汤治疗雄性大鼠乳腺增生实验研究 [J]. 长春中医药大学学报，2016，32（6）：1126-1128.
[45] 李璘，陆茵，李峰 . 乳增平康对雌激素造成大鼠乳腺增生模型的作用 [J]. 中药药理与临床，2004，20（5）：42-43.
[46] 王雄，陈永刚，刘新国，等 . 回乳抑增一号对高催乳素血症大鼠血清催乳素水平和乳腺组织形态学的实验观察 [J]. 中成药，2013，35（9）：2019-2022.
[47] 纪福，郑陆辛，陈华元，等 . 系列乳癖合剂治疗乳腺增生病的实验和临床研究 [J]. 江苏临床医学杂志，1999，3（6）：528-530.
[48] 刘华，宋兴华，韦永芳，等 . 健乳灵对乳腺不典型增生大鼠乳腺组织学及血清性激素的影响 [J]. 中国中医药科技，2014，21（1）：28-30.
[49] 刘慧，李松莲，谭程丹，等 . 乳痛软坚片对肝郁痰凝型乳腺增生大鼠 E2、P、PRL 水平的影响 [J]. 中西医结合研究，2019，11（6）：289-292.
[50] 郑君，王煜，屈红，等 . 归芍运脾汤对肝郁脾虚型乳腺增生大鼠的干预作用 [J]. 中国临床药理学杂志，2023，39（21）：3149-3153.
[51] 孙喜波 . 乳宁汤对大鼠肝郁血瘀型乳腺非典型增生 VEGF-A、bFGF、MVD 表达的影响 [D]. 济南：山东中医药大学，2004.
[52] 郭娜 . 夏枯草颗粒对气滞血瘀证乳腺增生模型大鼠下丘脑 - 垂体 - 性腺相关激素分泌和单胺类神经递质含量的影响 [J]. 中医临床研究，2017，9（36）：97-100.
[53] 蔡萌娜，滕红丽，赵湘培，等 . 国医大师班秀文欢草汤对乳癖模型大鼠性激素及其受体表达的影响 [J/OL]. 中药药理与临床，2023，doi：10.13412/j.cnki.zyyl.20230920.007.
[54] 李丽，纪宁，阮迪，等 . 循经通络推拿手法结合药物对乳腺增生大鼠雌孕激素及其受体水平的调节作用 [J]. 吉林中医药，2023，43（9）：1078-1083.
[55] 李军梅，刘建勋，邢泽田，等 . 乳结消颗粒对家兔乳腺增生的影响 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（9）：4626-4630.
[56] 黄思萦，吴勇，田先翔，等 . 火炭母治疗乳腺增生的活性部位研究 [J]. 中药药理与临床，2016，32（6）：158-161.
[57] 周会，汪天明，王靓，等 . 抗乳增片对乳腺增生症大鼠 T 细胞亚群及免疫分子的影响 [J]. 中成药，2013，35（9）：2001-2003.
[58] 荆荣霞，梁立红，李霞，等 . 围刺配合电针对乳腺增生大鼠血清激素水平和乳腺组织形态、ER 表达的影响 [J]. 河北医药，2014，36（7）：965-968.
[59] 巩文娟，韩淑俊，贾颖 . 他莫西芬片联合乳癖消片对乳腺增生病大鼠乳腺组织影响的动物实验 [J]. 山西中医学院学报，2013，14（6）：29-31.
[60] 王维帅，王虎城，冯巍 . 乳腺良性结节的中西医治疗研究进展 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志，2023，7（5）：26-29.
[61] 谌章庆，唐朝晖，黄宇烽 . 男性乳腺增生 [J]. 中华男科学，2000，6（3）：184-187.

（收稿日期：2024-03-07；修回日期：2024-05-07）

核孔复合物在肿瘤发生发展中的作用研究现状

余思琪，袁胜涛*（中国药科大学，多靶标天然药物全国重点实验室，新药筛选与药效评价中心，南京 210009）

摘要：核孔复合物由核孔蛋白组成，位于细胞核膜上，为细胞质与细胞核之间的关键物质输送通道，介导小分子物质、大分子蛋白、mRNA 等物质的输送。现有研究表明，部分核孔蛋白在肿瘤中表达异常，通过影响 PI3K/AKT/mTOR、TGF-β/SMAD 信号通路，YAP、β-catenin 核转位，调节肿瘤的增殖、凋亡、细胞周期、迁移、侵袭等，影响肿瘤的进展。核孔蛋白 Nup98 的融合表达与其他基因的突变联合导致癌症的发生。本文主要阐述了组成核孔复合物的关键核孔蛋白分布，核孔蛋白调控细胞核与细胞质之间的物质转运，以及核孔蛋白与肿瘤发生发展之间的关系。

关键词：核孔复合物；核孔蛋白；肿瘤进展；研究现状

中图分类号：R730 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3069-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.039

Research status of the role of nuclear pore complexes in tumor occurrence and development

YU Si-qi, YUAN Sheng-tao* (*China Pharmaceutical University*, *State Key Laboratory of Natural Medicines*, *New Drug Screening and Pharmacodynamics Evaluation Center*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Nuclear pore complex, located on the nuclear membrane, is a key material transport channel between the cytoplasm and the nucleus. It mediates the entry and exit of small molecular substances, macromolecular proteins, mRNA, and other substances. According to recent research, several nucleoporins were abnormally expressed in tumors and regulate tumor progression by affecting the PI3K/AKT/mTOR and TGF-β/SMAD signaling pathways, YAP and β-catenin nuclear translocation. Nucleoporins regulate tumor proliferation, apoptosis, cell cycle, migration, and invasion through these pathways. Nucleoporins fusion expression of the Nup98 combined with mutations of other genes may lead to cancer occurrence. This article primarily reviewed the distribution of key nucleoporins that constitute the nuclear pore complex. Nucleoporins regulated the transport of substances between the nucleus and the cytoplasm. Furthermore, the relationship between nucleoporins and tumorigenesis and tumor progression was also discussed.

Key words: nuclear pore complex; nucleoporin; tumor progression; research status

癌症是全世界范围内的公共卫生问题，中国癌症总体的发病率及死亡率呈现逐年攀升的趋势[1-2]。深入了解癌症的发病机制寻找潜在的治疗靶点具有重要意义。核孔复合物（nuclear pore complex，NPC）作为细胞核膜上物质运输通道，控制物质进出细胞核。随着不断深入研究 NPC 及其组成蛋白，核孔蛋白在各类疾病发展中的作用也逐步清晰。核孔蛋白与神经系统疾病[3]、抗病毒免疫[4]、心血管疾病[5]、衰老[6]等之间的关系都有研究论述，核孔蛋白在肿瘤发生发展过程中发挥的作用亦有相关研究，本文主要叙述核孔蛋白在肿瘤发生发展过程中发挥的作用。1999 年，有研究首次发现 Nup88 在卵巢癌组织中过表达[7]，开展了核孔蛋白与肿瘤之间关系研究的先河。核孔蛋白参与肿瘤进展的方式主要有染色体易位产生融合蛋白、蛋白表达水平发生变化（过表达或低表达）或单点突变[8]。其中核孔蛋白融合表达与肿瘤的发生相关，核孔蛋白表达水平变化主要

作者简介：余思琪，女，硕士研究生，主要从事肿瘤药理学研究，email：yusiqi815@163.com *通信作者：袁胜涛，男，研究员，主要从事肿瘤药理学研究，email：13914798635@163.com

与肿瘤的进展相关，包括肿瘤的增殖、迁移、侵袭、肿瘤细胞凋亡、细胞周期等。本文主要从NPC 的结构组成、NPC 控制物质运输的功能以及核孔蛋白在肿瘤进展过程中的作用展开叙述。

1 NPC 的结构

人源的 NPCs 的分子量大约为 110 MDa，大约有 30 种不同的核孔蛋白，每个核孔蛋白大约有 8 ～ 64 个拷贝，总共大约有 1000 个蛋白亚单位，核孔蛋白以及 NPC 的组成在真核生物中普遍保守 [9]。人源的 NPC 细胞质环直径大约 120 nm，内环直径大约 42.5 nm，高度大约 80 nm[10-11]。核孔蛋白名称中的数字代表分子量大小，不同物种之间同一功能的核孔蛋白分子量不同，命名存在差异。

NPCs 结构为八重旋转对称，构成 NPC 的基础结构元件有细胞质环、细胞核环、内环、细胞核内篮筐以及细胞质纤毛。内环贯穿细胞核双层膜，细胞质环靠近细胞质，细胞核环为靠近细胞核的部分，细胞核内篮筐以及细胞质纤毛分别为在细胞核以及细胞质的延伸部分 [11]。这些支撑 NPC 主要结构的核孔蛋白之间具有强相互作用力，共同维持 NPC 的结构稳定性。依据核孔蛋白的功能组成可以简单地概括成两类：支架核孔蛋白和 FG- 核孔蛋白（含有苯丙氨酸 - 甘氨酸重复序列的核孔蛋白）。支架核孔蛋白组装成稳定的亚复合体结构，代表性的复合体有 Y- 复合体（Nup207 复合体）、Nup214 复合体、Nup62 复合体、内环复合体（Nup93 复合体）等 [12-14]，共同维持 NPC 结构的稳定性。FG- 核孔蛋白具有与其他蛋白相互作用的结构域，大部分的 FG- 核孔蛋白位于 NPC 的中央孔道，主要调控物质进出 [15-16]。人源 NPC 的组成与分布如表 1 所示 [17-22]。

2 NPC 的功能

2.1 控制蛋白进出细胞核

细胞核的双层膜隔绝基因组 DNA 与细胞质，保证基因组 DNA 的稳定性。NPC 为细胞核与细胞质之间的物质转运通道，小于 40 kDa 的物质通过被动扩散进出细胞核，大分子蛋白进出细胞核称为核质转运 [23]。大分子蛋白质通过 NPC 有两种方式：与转运蛋白结合或直接与 FG- 核孔蛋白相互作用 [24]。其中主要的转运蛋白为 Ran 蛋白 [25]，主要的 FG- 核孔蛋白有 Nup98、Nup214、Nup153、Nup50 等 [26-28]。进出细胞核的大分子蛋白具有核定位序列（NLS）或核输出序列（NES）。蛋白入核过程如下：输入蛋白 α/β（importin α/β）识别货物蛋白的 NLS 形成，输入蛋白 - 货物蛋白复合体，并与 Ran 蛋白结合或者直接与上述 FG- 核孔蛋白进行序列识别进入细胞核，核内 Ran GTP 酶水解 Ran GTP，释放货物蛋白。在核输出过程中，Ran 与输出蛋白（exportin α/β）- 货物蛋白形成复合物，与 FG- 核孔蛋白相互作用通过孔道到达细胞质，在细胞质内的 Ran GTP 酶激活蛋白以及 Ran 结合蛋白的作用下分离，完成蛋白运输过程。

表 1 人源 NPC 的组成与分布

Tab 1 Composition and distribution of NPC (*Homo sapiens*)

NPC 结构	名称	文献	NPC 结构	名称	文献
细胞质纤毛	DDx19	[17]	内环	Nup58	[18]
	Gle1	[19]		Nup62	[20]
	Rae1	[20]		Nup98	[20]
	Nup98	[20]		NDC1	[18]
	Nup214	[21]		POM210	[18]
	Nup88	[21]		POM121	[21]
	Nup385	[22]		Nup160	[22]
细胞质环	Nup85	[22]	细胞核环	Nup75	[22]
	Nup107	[22]		Seh1	[22]
	Nup133	[22]		Nup96	[22]
	Nup96	[22]		Sec13	[22]
	Nup43	[22]		Nup107	[22]
内环	Nup205	[18]	细胞核内篮筐	Nup133	[22]
	Nup188	[21]		Nup43	[22]
	Nup93	[21]		Nup37	[22]
	Nup155	[20]		Nup153	[22]
	Nup53	[18]		Nup50	[21]
	Nup54	[18]		Tpr	[22]

2.2 调控 mRNA 的输出

真核生物细胞核中的 mRNA 输出：经过 5' 加帽，去除内含子，3' 多聚腺苷酸化，mRNA 输出因子包装，形成 mRNA- 蛋白颗粒（mRNP）。mRNP 输出细胞核的步骤为：对接到细胞核内篮筐，通过 NPC 的中央通道，与 NPC 的细胞质纤维相互作用，mRNP 解构释放 mRNA。其中，细胞核内篮筐的 Nup153、Tpr 与 mRNP 相互作用并将 mRNP 转到 NPC 中央孔道内 [29]。mRNP 与 FG- 核孔蛋白相互作用，通过 NPC 孔道到达细胞质 [30]。mRNP 与 RNA 依赖性的 ATP 酶（DDX19）、GLE1、Nup42 结合，刺激 DDX19 的 ATP 酶活性，去除 mRNP 输出因子，mRNA 释放到细胞质中，完成运输过程 [31]。

3 核孔蛋白与肿瘤进展的关系

原癌基因、抑癌基因的突变导致肿瘤的发生，突变恶性肿瘤发展的过程中主要有以下几个特征：细胞无限增殖、促血管形成、迁移、侵袭与转移、改变肿瘤免疫微环境、免疫逃逸、细胞代谢途径的改变等 [32]。核孔蛋白基因染色体异位产

生融合蛋白、基因单点突变或基因表达水平改变（过表达或低表达），这些改变导致核孔蛋白功能失调，促进肿瘤的发生发展。关于核孔蛋白如何影响肿瘤的进展，我们对几种最近研究的核孔蛋白进行展开叙述。

3.1 POM121

POM121 蛋白位于 NPC 的内环上，以 NLS 依赖性的方式与输入蛋白 *α*/*β* 相互作用，与其他的 NPC 内环上的 FG- 核孔蛋白调控物质的进出 [33]。在结直肠癌（colorectal cancer，CRC）中，POM121 的过表达与其不良预后相关 [34]。此外，POM121 临床免疫组化分析，POM121 的表达与前列腺癌（prostatic carcinoma，PCa）的恶性程度成正比，可作为 PCa 的潜在生物标志物 [35]。在 PCa 中，POM121 通过增强致癌转录因子（E2F1、MYC）和 PCa 特异性转录因子（AR-GATA2）的核转运，促进下游基因的表达，增强 PCa 的侵袭性 [36]。在胃癌（gastric carcinoma，GC）中，POM121 的过表达与 GC 深度浸润、晚期转移和肿瘤淋巴结转移分期（TNMC）以及人表皮生长因子受体 2（$HER2^+$）相关，患者的总体生存期（overall survival，OS）较低，并且在 GC 组织中 POM121 的 mRNA 以及蛋白的表达均高于正常的胃组织；在 GC 细胞中沉默 POM121 能够抑制 GC 细胞的增殖、迁移和侵袭，作用机制为在 GC 细胞中沉默 *POM121* 能够降低 MYC 的表达并且抑制磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B（PI3K/AKT）信号通路的磷酸化 [37]。在三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer，TNBC）细胞中，*circINTS4* 通过 miR-129-5p/POM121 信号轴影响 TNBC 细胞的增殖、迁移、侵袭和自噬，沉默 *miR-129-5p* 或者过表达 *POM121* 能够逆转沉默 circINTS4 对 TNBC 细胞增殖的抑制作用 [38]。在非小细胞肺癌（non-small cell lung cancers，NSCLC）中，POM121 在 NSCLC 组织中 mRNA 以及蛋白的表达明显高于癌旁组织，并且过表达 *POM121* 的 NSCLC 患者 OS 较低；在 NSCLC 细胞中沉默 POM121 能够抑制转化生长因子 *β*/SMAD（TGF-*β*/SMAD）和 PI3K/AKT 信号通路 [39]。

3.2 Nup37

Nup37 蛋白位于 NPC 的细胞核内篮筐上，可激活 YAP/TEAD 信号传导，对早期胚胎发育至关重要 [40]。生物信息学数据预测分析能够为后续的研究提供有效的参考。在 GEO 数据库中对乳腺癌（breast cancer，BC）样本中过表达的差异基因进行筛选，发现 *Nup37* 过表达且 BC 患者具有较低的生存率，并且沉默 BC 细胞中 *Nup37* 能够抑制 BC 细胞的增殖、迁移以及细胞干性 [41]，作用机制还有待进一步研究。在神经胶质瘤中，*Nup37* 过表达诱导免疫抑制微环境的形成，可作为神经胶质瘤潜在的抗癌基因和预后生物标志物 [42]。Liu 等 [43] 证明在神经胶质瘤细胞中沉默 *Nup37* 能够抑制细胞的迁移和侵袭能力。

在 CRC 细胞系中，沉默 *Nup37* 能够抑制 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，并且诱导细胞凋亡与细胞周期阻滞，作用机制为 DEPDC1B 与 Nup37 结合促进 CRC 细胞和组织中 PI3K/AKT 信号相关蛋白的表达 [44]。在肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）中，*Nup37* 的过表达与其不良预后成正相关，*Nup37* 的过表达能够促进 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭，反之，沉默 *Nup37* 产生抑制作用，机制上 Nup37 可以通过增强 Yes 相关蛋白（YAP）与转录增强相关基序（TEAD）之间的相互作用，激活 YAP 下游的信号转导 [45]；Chen 等 [46] 研究发现过表达低密度脂蛋白相关受体 5（LRP5）能够恢复沉默 *Nup37* 对 HCC 细胞增殖的抑制作用，机制上，LRP5 通过与 Nup37 直接相互作用维持 Nup37 蛋白的稳定性从而促进 YAP/TEAD 下游信号转导。通过筛选公共数据库中的批量 RNA seq 数据集以及蛋白质组学数据库，在人源 HCC 组织和 HCC 细胞系中，微小染色体维持蛋白 2（MCM2）与 Nup37 的表达呈现显著的正相关性，且两者过表达均与 HCC 不良预后成正相关 [47]。在 NSCLC 中，Nup37 在晚期 NSCLC 样本中过表达，并且过表达 Nup37 的患者 OS 较低，在 A549 和 H1299 细胞中沉默 *Nup37* 能够抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡、G_1 期细胞周期阻滞 [48]。TCGA 数据库分析得出 *Nup37* 在 GC 组织和细胞系中过表达，并且过表达与较低的存活率相关，在 NCI-N87 细胞中构建沉默 *Nup37* 模型，发现沉默 *Nup37* 能够抑制 GC 细胞增殖、迁移和侵袭，并促进细胞凋亡，过表达 *Nup37* 则出现相反的结果，机制上，Nup37 上调能够激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路进而促进 GC 的恶性进展 [49]。

3.3 Nup93

Nup93 蛋白是 NPC 内环的一个组成元件，Nup93 在 HCC 组织中过表达，尤其是在 HCC 转移患者中，并且与不良预后相关，在 HCC 细胞中沉默 *Nup93* 可以抑制 HCC 细胞的增殖和转移，过表达 *Nup93* 则有促进作用，作用机制为 Nup93 直接与 *β*-catenin 相互作用促进 *β*-catenin 的核转位，促进

β-catenin 下游基因转录，*β*-catenin 和 LEF1 则通过正反馈回路促进 Nup93 的功能，从而促进 HCC 的进展[50]。在食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma，ESCC）中，Nup37 过表达，并且在 ESCC 细胞中沉默 *Nup93* 能够抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭，并造成细胞周期阻滞，过表达 *Nup93* 则具有相反的作用；机制上，Nup93 正向调节 ESCC 细胞中的上皮 - 间充质转化（EMT）和 AKT 信号转导、增加 ESCC 细胞中程序性死亡配体 1（PD-L1）的表达，HECT 结构域 E3 泛素连接蛋白酶 1（HECTD1）可作为 Nup93 上游的调节因子，促进 Nup93 的泛素化蛋白降解，抑制 Nup93 蛋白的生物学作用[51]。Nup93 在 TNBC 中过表达，Nup93 直接调控与细胞外基质、细胞骨架重塑和细胞迁移相关的基因，影响肌动蛋白细胞骨架重塑从而调节 TNBC 细胞迁移[52]。在宫颈癌（cervical cancer，CC）中，Nup93 在肿瘤组织中的表达明显增高，沉默 *Nup93* 能够明显抑制 CC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，小鼠体内沉默 *Nup93* 抑制了肿瘤的形成，机制上，Nup93 参与调节 CC 细胞的白细胞介素 6/ 信号转导及转录因子激活受体 3（IL-6/STAT3）炎症信号通路[53]。

3.4 Nup62

Nup62 蛋白位于 NPC 的内环中，富含 FG 重复序列。在 GC 中，Kaplan-Meier 分析得出，Nup62 的过表达且 GC 患者 OS 较低。此外，在 GC 细胞中沉默 *Nup62* 能够抑制细胞迁移，作用机制为 Nup62 通过 Wnt/*β*-catenin 和转化生长因子 *β*（TGF-*β*）信号通路调节细胞的迁移[54]。Nup62CL 在肺腺癌（lung adenocarcinoma，LUAD）中过表达并且患者具有较差的预后，其中浸润 B 淋巴细胞和记忆 $CD4^+$ T 细胞浸润水平与 LUAD 中 Nup62CL 表达成正相关[55]。在头颈癌（head and neck squamous cell carcinoma，HNSC）中，Nup62 与 Nup88 过表达，且在头颈癌的细胞中过表达 *Nup62* 和 *Nup88* 能够促进细胞增殖和迁移活力，作用机制为 Nup62 和 Nup88 能够通过末端羧基发生相互作用抑制 Nup88 泛素化降解，增强 Nup88 的稳定性，Nup88 直接与下游的 p65 相互作用，激活 NF-*κ*B 通路，促进细胞增殖[56]。

3.5 Nup98

Nup98 蛋白位于 NPC 内环，调控 DExH/D-box 解旋酶 DHX9 的定位和活性[57]。*Nup98* 是血液系统恶性肿瘤中易混杂的基因，最常见的是在急性髓系白血病（acute myeloid leukemia，AML）中 *Nup98* 基因融合表达。与白血病相关的 Nup98 融合表达蛋白有：Nup98-HOXA9、Nup98-KDM5A、Nup98-LNP1 等[58]。Du 等[59]发现 *RUNX1/ZNF423* 基因融合表达能够诱导 *Nup98* 的重排，促进白血病的恶性表型。Matsukawa 等[60]构建 *Nup98*：*Nsd1* 基因融合表达和 *FLT3-ITD* 突变的双转基因小鼠，82.4% 小鼠发生 AML，表明 *Nup98* 基因融合表达与 AML 的发生相关。*Nup96* 与 *Nup98* 编码在同一个 mRNA 阅读框，容易发生易位突变，*Nup98* 与 *Nup96* 易位导致功能丧失，在模型生物果蝇中构建 *Nup98-Nup96* 缺失模型，触发 JNK 信号通路的传导，细胞周期紊乱并抑制细胞的凋亡[61]。在小儿 AML 中，*Nup98-KDM5A* 基因融合表达导致基因组不稳定促使疾病恶性转化[62]。在携带 AML1-ETO 和 *Nup98* 与 *PMX1* 融合蛋白诱导的白血病中发现 ABL1 激酶（抑癌因子）的缺失，抑制 ABL1 激酶的抑癌活性[63]。Nup98 蛋白与其他的蛋白融合表达导致原有的蛋白质功能发生紊乱，促进白血病的发生发展。

核孔蛋白在肿瘤中的进展总结如表 2 所示[34-74]。

4 总结与展望

NPC 作为细胞核双层膜上物质的主要运输通道，由核孔蛋白构成八重螺旋对称的孔型通道，调控小分子物质大分子蛋白的转运以及 mRNA 的输出，核孔蛋白在不同物质运输的阶段发挥不同的作用。本文主要探讨了 POM121、Nup37、Nup93、Nup62、Nup98 等核孔蛋白在肿瘤进展中发挥的作用。这些核孔蛋白大部分在癌症中过表达促进癌症的发展，但是，Nup153 在 CRC 中表达下调，可作为潜在的肿瘤抑制因子。*Nup98* 与其他基因融合表达导致蛋白功能紊乱促进癌症的发展，与其他基因突变联合作用可导致 AML 的发生，这一发现有助于了解 AML 的发病机制。其他的核孔蛋白在癌症中表达发生变化，影响肿瘤的增殖、凋亡、细胞周期、迁移、侵袭、转移；生物信息数据分析表明部分核孔蛋白影响肿瘤的免疫微环境中免疫细胞的浸润水平，但是这些变化是参与癌症发生的主要原因还是次要结果仍不清楚，需要进一步研究佐证。主要机制上为 Nup37 与 Nup93 分别影响 YAP、*β*-catenin 转录因子的核转位，部分核孔蛋白影响 PI3K/AKT/mTOR、TGF-*β*/SMAD、IL-6/STAT3 信号通路。而其他在肿瘤研究中尚未有过报道的核孔蛋白，还需要更多后续的研究，有助于了解肿瘤发展过程的全貌，为进一步了解肿瘤的发生发展提供基础。

表 2 核孔蛋白在肿瘤中的进展总结

Tab 2 Summary of advances of nucleoporins in tumors

核孔蛋白	作用及作用机制	参考文献
POM121	POM121 在 CRC、PCa、GC、TNBC、NSCLC 肿瘤组织过表达，且与不良预后相关，能够从肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等多方面影响肿瘤的进展，作用机制为影响 MYC、PI3K/AKT 通路、TGF-β/SMAD 通路以及部分转录因子的表达	[34-39]
Nup37	Nup37 在 BC、神经胶质瘤、CRC、HCC、NSCLC、GC 肿瘤组织中过表达，且与临床不良预后相关。Nup37 影响肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭、细胞凋亡和细胞周期。作用机制为过表达的 Nup37 可以激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路、促进 YAP/TEAD 下游信号转导影响肿瘤的进展	[41-49]
Nup93	Nup93 在 HCC、ESCC、TNBC、CC 中过表达，能够影响肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。作用机制为 Nup93 能够促进 β-catenin 的核转位，调节 EMT、AKT 信号通路、IL-6/STAT3 信号通路影响肿瘤的进展	[50-53]
Nup62	Nup62 在 GC、LUAD 及 HNSC 中呈现出过表达的状态，影响肿瘤细胞的增殖、迁移和微环境中的免疫浸润水平。作用机制为 Nup62 调节 Wnt/β-catenin 和 TGF-β 信号通路、与 Nup88 相互作用激活 NF-κB 通路影响肿瘤的进展	[54-56]
Nup98	Nup98 融合表达蛋白，Nup98-HOXA9、Nup98-KDM5A、Nup98-LNP1、Nup98-PMX1、Nup98 与 Nup96 的易位突变，促进白血病的发生发展	[57-63]
Gle1	在骨巨细胞瘤中，*miR-376a-3p* 靶向性抑制 *GLE1* mRNA，影响 *GLE1* 基因表达，抑制骨巨细胞瘤细胞的增殖和迁移	[64]
Nup88	在 HeLa 细胞中沉默 *Nup88*，上调基质金属蛋白酶 -12 表达，促进 HeLa 细胞的迁移和侵袭	[65]
Nup85	靶向 *Nup85* mRNA 的小干扰 RNA 可以有效抑制 PCa 的侵袭和转移	[66]
Nup210	生物信息数据分析，Nup210 与 AML 的不良预后相关	[67]
Nup107	*Nup107* 单核苷酸突变能预测卵巢癌患者对顺铂的敏感性	[68]
Nup205	生物信息学分析，Nup205 在低级胶质瘤中过表达	[69]
Nup155	生物信息学分析，在 BC 中，Nup155 过表达且与免疫调节通路，尤其是抗原加工和呈递具有很强的相关性	[70]
Nup54	在 GC 中，Nup54 辅助精氨酸甲基转移酶 1 入核，并细胞核中激活 Notch2 信号通路，从而促进 GC 的进展	[71]
Nup43	在 GC 中，*LncRNA NCK1-AS1* 通过调节 *miR-137*/Nup43 轴发挥致癌作用	[72]
Nup153	在 CRC 中，Nup153 低表达，CRC 细胞中过表达 Nup153 抑制 β- 连环蛋白的转录活性，并下调 Wnt 下游蛋白的 mRNA 水平上的表达，可作为潜在的肿瘤抑制因子	[73]
Tpr	在肺癌中，促进肺癌细胞的 tRNA 核输出和蛋白质合成	[74]

参考文献

[1] Zheng RS，Chen R，Han BF，et al. Cancer incidence and mortality in China，2022 [J]. Chin J Oncol，2024，46（3）：221-231.

[2] Cao W，Chen HD，Yu YW，et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China：a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J，2021，134（7）：783-791.

[3] Grima JC，Daigle JG，Arbez N，et al. Mutant huntingtin disrupts the nuclear pore complex [J]. Neuron，2017，94（1）：93-107.

[4] Gagné B，Trenblay N，Park AY，et al. Importin β1 targeting by hepatitis C virus NS3/4A protein restricts IRF3 and NF-κB signaling of IFNB1 antiviral response [J]. Traffic，2017，18（6）：362-377.

[5] Tarazón E，Rivera M，Roselló-Lletí E，et al. Heart failure induces significant changes in nuclear pore complex of human cardiomyocytes [J]. PLoS One，2012，7（11）：e48957.

[6] Sakuma S，D'angelo MA. The roles of the nuclear pore complex in cellular dysfunction，aging and disease [J]. Semin Cell Dev Biol，2017，68：72-84.

[7] Martínez N，Alonso A，Moragues MD，et al. The nuclear pore complex protein Nup88 is overexpressed in tumor cells [J]. Cancer Res，1999，59（21）：5408-5411.

[8] Simon DN，Rout MP. Cancer and the nuclear pore complex [J]. Adv Exp Med Biol，2014，773：285-307.

[9] Hampoelz B，Andres-Pons A，Kastritis P，et al. Structure and assembly of the nuclear pore complex [J]. Annu Rev Biophys，2019，48：515-536.

[10] Lin DH，Stuwe T，Schilbach S，et al. Architecture of the symmetric core of the nuclear pore [J]. Science，2016，352（6283）：aaf1015.

[11] Beck M，Hurt E. The nuclear pore complex：understanding its function through structural insight [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2017，18（2）：73-89.

[12] Ulrich A，Partridge JR，Schwartz TU. The stoichiometry of the nucleoporin 62 subcomplex of the nuclear pore in solution [J]. Mol Biol Cell，2014，25（9）：1484-1492.

[13] Amlacher S，Sarges P，Flemming D，et al. Insight into structure and assembly of the nuclear pore complex by utilizing the genome of a eukaryotic thermophile [J]. Cell，2011，146（2）：277-289.

[14] Kelley K，Knockenhauer KE，Kabachinski G，et al. Atomic structure of the Y complex of the nuclear pore [J]. Nat Struct Mol Biol，2015，22（5）：425-431.

[15] Andersen KR，Onischenko E，Tang JH，et al. Scaffold nucleoporins Nup188 and Nup192 share structural and functional properties with nuclear transport receptors [J]. eLife，2013，2：e00745.

[16] Yoshida K，Seo HS，Debler EW，et al. Structural and functional analysis of an essential nucleoporin heterotrimer on the cytoplasmic face of the nuclear pore complex [J]. Proc Natl Acad Sci，2011，108（40）：16571-16576.

[17] Hodge CA，Tran EJ，Noble KN，et al. The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export I：Dbp5 mutants with defects in RNA binding and ATP hydrolysis define key

steps for Nup159 and Gle1 [J]. Genes Dev，2011，25（10）：1052-1064.
[18] Beck M，Förster F，Ecke M，et al. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography [J]. Science，2004，306（5700）：1387-1390.
[19] Sharma M，Mason AC，Dawson TR，et al. Phosphorylation impacts GLE1 nuclear localization and association with DDX1 [J]. Adv Biol Regul，2023，90：100990.
[20] Alber F，Dokudovskaya S，Veenhoff LM，et al. Determining the architectures of macromolecular assemblies [J]. Nature，2007，450（7170）：683-694.
[21] Pumroy RA，Cingolani G. Diversification of importin-α isoforms in cellular trafficking and disease states [J]. Biochem J，2015，466（1）：13-28.
[22] Maimon T，Elad N，Dahan I，et al. The human nuclear pore complex as revealed by cryo-electron tomography [J]. Structure，2012，20（6）：998-1006.
[23] Timney BL，Raveh B，Mironska R，et al. Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex [J]. J Cell Biol，2016，215（1）：57-76.
[24] Jovanovic-Talisman T，Zilman A. Protein transport by the nuclear pore complex：simple biophysics of a complex biomachine [J]. Biophys J，2017，113（1）：6-14.
[25] El-Tanani M，Nsairat H，Mishra V，et al. Ran GTPase and its importance in cellular signaling and malignant phenotype [J]. Int J Mol Sci，2023，24（4）：3065.
[26] Makise M，Mackay DR，Elgort S，et al. The Nup153-Nup50 protein interface and its role in nuclear import [J]. J Biol Chem，2012，287（46）：38515-38522.
[27] Sabri N，Roth P，Xylourgidis N，et al. Distinct functions of the drosophila Nup153 and Nup214 FG domains in nuclear protein transport [J]. J Cell Biol，2007，178（4）：557-565.
[28] Ren Y，Seo HS，Blobel G，et al. Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup98 and the mRNA export factor Rae1 [J]. Proc Natl Acad Sci，2010，107（23）：10406-10411.
[29] Soop T，Ivarsson B，Björkroth B，et al. Nup153 affects entry of messenger and ribosomal ribonucleoproteins into the nuclear basket during export [J]. Mol Biol Cell，2005，16（12）：5610-5620.
[30] Oeffinger M，Zenklusen D. To the pore and through the pore：a story of mRNA export kinetics [J]. Biochim Biophys Acta，2012，1819（6）：494-506.
[31] Folkmann AW，Noble KN，Cole CN，et al. Dbp5，Gle1-IP6 and Nup159：a working model for mRNP export [J]. Nucleus，2011，2（6）：540-548.
[32] Hanahan D. Hallmarks of cancer：new dimensions [J]. Cancer Discov，2022，12（1）：31-46.
[33] Yavuz S，Santarella-Mellwig R，Koch B，et al. NLS-mediated NPC functions of the nucleoporin Pom121 [J]. FEBS Lett，2010，584（15）：3292-3298.
[34] Yu YX，Farooq MS，Eberhart MS，et al. Nuclear pore protein POM121 regulates subcellular localization and transcriptional activity of PPARγ [J]. Cell Death Dis，2024，15（1）：7.
[35] Becker F，Offermann A，Roesch MC，et al. Up-regulation of POM121 is linked to prostate cancer aggressiveness and serves as a prognostic biomarker [J]. Urol Oncol，2022，40（8）：380.
[36] Rodriguez-Bravo V，Pippa R，Song WM，et al. Nuclear pores promote lethal prostate cancer by increasing POM121-Driven E2F1，MYC，and AR nuclear import [J]. Cell，2018，174（5）：1200-1215.
[37] Kang CY，Jia LZ，Hao L，et al. POM121 promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer via PI3K/AKT/MYC pathway [J]. Am J Cancer Res，2023，13（2）：485-497.
[38] Tang Q，Zhou FD，Yang CG，et al. CircINTS4 facilitates chemoresistance of TNBC by competitively binding miR-129-5p/POM121 axis [J]. J Oncol，2022，2022：2630864.
[39] Guan LR，Zhang LL，Wang TQ，et al. POM121 promotes proliferation and metastasis in non-small-cell lung cancer through TGF-β/SMAD and PI3K/AKT pathways [J]. Cancer Biomark，2021，32（3）：293-302.
[40] Guo QY，Liu Q，Wang N，et al. The function of nucleoporin 37 on mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development [J]. J Assist Reprod Genet，2022，39（1）：107-116.
[41] Li KD，Liu T. Evaluation of oncogene NUP37 as a potential novel biomarker in breast cancer [J]. Front Oncol，2021，11：669655.
[42] He Y，Li JG，Shen L，et al. Pan-cancer analysis reveals NUP37 as a prognostic biomarker correlated with the immunosuppressive microenvironment in glioma [J]. Aging，2022，14（2）：1033-1047.
[43] Liu ZD，Wang HB，Jia YL，et al. Significantly high expression of NUP37 leads to poor prognosis of glioma patients by promoting the proliferation of glioma cells [J]. Cancer Med，2021，10（15）：5218-5234.
[44] Xiong H，Li Y，Liu MH. DEPDC1B is involved in the proliferation，metastasis，cell cycle arrest and apoptosis of colon cancer cells by regulating NUP37 [J]. Mol Med Rep，2023，27（6）：126.
[45] Luo XL，Liu YT，Feng WG，et al. NUP37，a positive regulator of YAP/TEAD signaling，promotes the progression of hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget，2017，8（58）：98004-98013.
[46] Chen JX，Wo D，Ma E，et al. Deletion of low-density lipoprotein-related receptor 5 inhibits liver cancer cell proliferation via destabilizing Nucleoporin 37 [J]. Cell Commun Signal，2019，17（1）：174.
[47] Tang ZW，Yang Y，Chen W，et al. Demethylation at enhancer upregulates MCM2 and NUP37 expression predicting poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. J Transl Med，2022，20（1）：49.
[48] Huang LL，Wang T，Wang FM，et al. NUP37 silencing induces inhibition of cell proliferation，G_1 phase cell cycle arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. Pathol Res Pract，2020，216（3）：152836.
[49] Zhang JS，Lv WH，Liu YG，et al. Nucleoporin 37 promotes the cell proliferation，migration，and invasion of gastric cancer through activating the PI3K/AKT/mTOR signaling

pathway [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim，2021，57（10）：987-997.
[50] Lin CS，Liang YY，Su SG，et al. Nucleoporin 93 mediates β-catenin nuclear import to promote hepatocellular carcinoma progression and metastasis [J]. Cancer Lett，2022，526：236-247.
[51] Zhang JF，Xin YZ，Ling XD，et al. Nucleoporin 93，a new substrate of the E3 ubiquitin protein ligase HECTD1，promotes esophageal squamous cell carcinoma progression [J]. Human Cell，2024，37（1）：245-257.
[52] Bersini S，Lytle NK，Schulte R，et al. Nup93 regulates breast tumor growth by modulating cell proliferation and actin cytoskeleton remodeling [J]. Life Sci Alliance，2020，3（1）：e201900623.
[53] Ouyang XL，Hao XM，Liu SB，et al. Expression of Nup93 is associated with the proliferation，migration and invasion capacity of cervical cancer cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin，2019，51（12）：1276-1285.
[54] Wang H，Lin YJ，Jin JP，et al. Nuclear pore complex 62 promotes metastasis of gastric cancer by regulating Wnt/β-catenin and TGF-β signaling pathways [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol，2021，40（2）：81-87.
[55] Ren SQ，Wang W，Zhang CL，et al. The low expression of NUP62CL indicates good prognosis and high level of immune infiltration in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Med，2021，10（10）：3403-3412.
[56] Singh U，Bindra D，Samaiya A，et al. Overexpressed Nup88 stabilized through interaction with Nup62 promotes NF-κB dependent pathways in cancer [J]. Front Oncol，2023，13：1095046.
[57] Capitanio JS，Montpetit B，Wozniak RW. Human Nup98 regulates the localization and activity of DExH/D-box helicase DHX9 [J]. eLife，2017，6：e18825.
[58] Chandra B，Michmerhuizen NL，Shirnekhi HK，et al. Phase separation mediates NUP98 fusion oncoprotein leukemic transformation [J]. Cancer Discov，2022，12（4）：1152-1169.
[59] Du WX，Xia ZM，Luo ZB，et al. A novel gene fusion RUNX1/ZNF423 promotes leukemic relapse of NUP98-rearranged AML [J]. Leukemia，2023，37（11）：2286-2291.
[60] Matsukawa T，Yin M，Nigam N，et al. NUP98：Nsd1 and FLT3-ITD collaborate to generate acute myeloid leukemia [J]. Leukemia，2023，37（7）：1545-1548.
[61] Pulianmackal AJ，Kanakousaki K，Flegel K，et al. Misregulation of Nucleoporins 98 and 96 leads to defects in protein synthesis that promote hallmarks of tumorigenesis [J]. Dis Model Mech，2022，15（3）：dmm049234.
[62] Domingo-Reinés J，Montes R，Garcia-Moreno A，et al. The pediatric leukemia oncoprotein NUP98-KDM5A induces genomic instability that may facilitate malignant transformation [J]. Cell Death Dis，2023，14（6）：357.
[63] Golovine K，Abalakov G，Lian ZR，et al. ABL1 kinase as a tumor suppressor in AML1-ETO and NUP98-PMX1 leukemias [J]. Blood Cancer J，2023，13（1）：42.
[64] Fellenberg J，Sähr H，Kunz P，et al. Restoration of miR-127-3p and miR-376a-3p counteracts the neoplastic phenotype of giant cell tumor of bone derived stromal cells by targeting COA1，GLE1 and PDIA6 [J]. Cancer Lett，2016，371（1）：134-141.
[65] Makise M，Uchimura R，Higashi K，et al. Overexpression of the nucleoporin Nup88 stimulates migration and invasion of HeLa cells [J]. Histochem Cell Biol，2021，156（5）：409-421.
[66] Taniuchi K，Yawata T，Tsuboi M，et al. Efficient delivery of small interfering RNAs targeting particular mRNAs into pancreatic cancer cells inhibits invasiveness and metastasis of pancreatic tumors [J]. Oncotarget，2019，10（30）：2869-1886.
[67] Li MQ，Zhao H. Bioinformatics analysis of the expression and clinical significance of the NUP210 gene in acute myeloid leukaemia [J]. Hematology，2022，27（1）：456-462.
[68] Alanee S，Delfino K，Wilber A，et al. Single nucleotide variant in Nucleoporin 107 may be predictive of sensitivity to chemotherapy in patients with ovarian cancer [J]. Pharmacogenet Genomics，2017，27（7）：264-269.
[69] Liang WJ，Hu CC，Zhu QY，et al. Exploring the relationship between abnormally high expression of NUP205 and the clinicopathological characteristics，immune microenvironment，and prognostic value of lower-grade glioma [J]. Front Oncol，2023，13：1007198.
[70] Wang ZQ，Wu ZX，Wang ZP，et al. Pan-cancer analysis of NUP155 and validation of its role in breast cancer cell proliferation，migration，and apoptosis [J]. BMC Cancer，2024，24（1）：353.
[71] Wang F，Zhang JY，Tang HY，et al. Nup54-induced CARM1 nuclear importation promotes gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis through transcriptional activation and methylation of Notch2 [J]. Oncogene，2022，41（2）：246-259.
[72] Li WX，Duan JM，Shi WB，et al. Long non-coding RNA NCK1-AS1 serves an oncogenic role in gastric cancer by regulating miR-137/NUP43 axis [J]. Onco Targets Ther，2020，13：9929-9939.
[73] Wu YB，Fang GJ，Wang X，et al. NUP153 overexpression suppresses the proliferation of colorectal cancer by negatively regulating Wnt/β-catenin signaling pathway and predicts good prognosis [J]. Cancer Biomark，2019，24（1）：61-70.
[74] Chen M，Long Q，Borrie MS，et al. Nucleoporin TPR promotes tRNA nuclear export and protein synthesis in lung cancer cells [J]. PLoS Genet，2021，17（11）：e1009899.

（收稿日期：2024-03-29；修回日期：2024-06-14）

医院药学

ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌内分泌治疗联合靶向治疗方案的定量评估：基于模型的 meta 分析

潘美羽[1]，林妍[2]，杨劲[1*]（1. 中国药科大学药学院药理系，南京 210009；2. 中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京 210009）

摘要：目的 定量比较 CDK4/6 抑制剂与 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂治疗 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌的疗效和安全性。**方法** 采用参数化生存函数模型分析总生存期（OS）和无进展生存期（PFS）的时间进程，在单臂 meta 分析中使用随机效应模型汇总任意级别和 3 ～ 5 级不良事件发生率。**结果** 本研究纳入 48 篇文献，包括 7881 例患者。结果显示，CDK4/6 抑制剂的中位 OS 为 40.7 个月，中位 PFS 为 14.8 个月；而 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂的中位 OS 为 29.8 个月，中位 PFS 为 8.3 个月。此外，内脏转移患者的比例和联合使用的内分泌治疗药物类型显著影响疗效。在不良事件方面，CDK4/6 抑制剂表现出相对较高的血液学不良事件发生率。**结论** CDK4/6 抑制剂的疗效显著优于 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂。本研究为 CDK4/6 抑制剂在 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌临床诊疗指南中的一线推荐使用提供了可靠的定量证据。

关键词：ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌；基于模型的 meta 分析；CDK4/6 抑制剂；PI3K/AKT/mTOR 抑制剂

中图分类号：R95，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3076-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.040

Quantitative evaluation of combination of targeted therapy regimens and endocrine therapy for ER ＋ /HER2 － metastatic breast cancer: a model-based meta-analysis

PAN Mei-yu[1], LIN Yan[2], YANG Jin[1*] (1. *Department of Pharmacology*, *School of Pharmaceutical Sciences*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009; 2. *School of Basic Medical Sciences and Clinical Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Objective To quantitatively compare the efficacy and safety of CDK4/6 inhibitors and PI3K/AKT/mTOR inhibitors for ER ＋ /HER2 － metastatic breast cancer. **Methods** A parametric survival function was used to analyze the temporal progression of overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). The incidence of adverse events, both any grade and grade 3 ～ 5, was summarized with the random-effect model in a single-arm meta-analysis. **Results** This study included 48 publications, with a total of 7881 patients. CDK4/6 inhibitors had a median OS of 40.7 months, a median PFS of 14.8 months, contrasting with PI3K/AKT/mTOR inhibitors with a median OS of 29.8 months and a median PFS of 8.3 months. The proportion of patients with visceral metastases and specific combinations of endocrine therapies obviously impacted the treatment efficacy. In terms of safety profiles, CDK4/6 inhibitors were associated with a notably elevated incidence of hematological adverse events. **Conclusion** CDK4/6 inhibitors demonstrate a superior therapeutic advantage over PI3K/AKT/mTOR inhibitors. Our study furnishes robust quantitative evidence for the choice of combining CDK4/6 inhibitors with endocrine therapy for ER ＋ /HER2 － metastatic breast cancer in clinical guidelines.

作者简介：潘美羽，女，硕士研究生，主要从事基于模型的 meta 分析的研究，email：pmy19981126@gmail.com *通信作者：杨劲，男，博士研究生导师，主要从事建模仿真引导下的创新药、改良型药物开发研究，email：cpu_yj@163.com

Key words: ER ＋ /HER2 － metastatic breast cancer; model-based meta-analysis; CDK4/6 inhibitor; PI3K/AKT/mTOR inhibitor

女性乳腺癌已成为全球诊断最多的癌症类型，2020 年约有 230 万女性被诊断患有乳腺癌，首次超过肺癌新发病例的数量[1]。早期乳腺癌初步诊断后，患者接受辅助治疗，然而，30% 的患者最终会发展为复发性或转移性乳腺癌。根据激素受体状态，包括雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）和人类表皮生长因子受体 2（HER2），乳腺癌被分为不同的分子亚型，其中占比较大的乳腺癌亚型为 ER 阳性 /HER2 阴性（ER ＋ /HER2 －）乳腺癌，芳香化酶抑制剂（AIs）、选择性 ER 调节剂（SERMs）和选择性 ER 下调剂（SERDs）等内分泌治疗是其基础治疗。

细胞周期蛋白依赖性激酶 4 和 6（CDK4/6）是包括 ER ＋乳腺癌细胞在内的多种细胞类型中细胞周期进程的重要调节因子。CDK4/6 抑制剂不同于既往作用于信号传导上游分子的靶向抗肿瘤药物，其能够从源头位置调控细胞周期，将细胞增殖阻滞于 G_1 期，从而达到抑制肿瘤增殖的目的。随机对照试验结果显示，在晚期 ER ＋ /HER2 －乳腺癌的一线治疗中将 CDK4/6 抑制剂与 AIs 联用，或在二线治疗中与氟维司群联用，均可改善患者的无进展生存期（PFS）和总生存期（OS）[2-5]；PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 ER ＋乳腺癌细胞的增殖和代谢中同样扮演着重要角色，30% ～ 40% 的 ER ＋乳腺癌肿瘤中存在 PI3Kα 异构体（PIK3CA）的激活突变，同时，高达 70% 的乳腺癌显示了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活，这与内分泌治疗耐药密切相关[6]。对于 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌患者，CDK4/6 抑制剂预处理后出现进展的患者，PI3K/AKT/mTOR 抑制剂被认为是很有前景的治疗药物。

目前为止，尚没有头对头的临床试验比较 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂之间的疗效和安全性。已有多项研究就两类靶向抑制剂的疗效和安全性进行了 meta 分析，但得出的结论仍存在争议[6-9]。

基于模型的荟萃分析（model-based meta-analysis，MBMA）将药理学知识、meta 分析和数学建模有效结合，可将多种来源的数据和多个维度的信息进行整合，充分挖掘各类数据所蕴藏的信息以形成强大的证据集成，进而辅助新药研发人员进行科学决策，是模型引导的药物研发（model-informed drug development，MIDD）策略中的重要方法之一[10-11]。通过建立参数生存模型，可以预测 6 个月、1 年、2 年以及任何不限于中位生存时间的任意时间点的 PFS 和 OS。此外，通过建立协变量模型，可以同时对各种影响因素进行定量分析，评估这些因素对疗效的影响。本研究采用 MBMA，旨在汇总比较 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂联合内分泌治疗方案在 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌患者中的疗效和安全性。

1 资料与方法

1.1 文献检索策略和纳排标准

在 PubMed、Embase、Cochrane Library 三个公共数据库中进行文献检索，语言限制为英文，收集数据，并根据 PRISMA 报告指南对文献进行整理。检索截止日期为 2023 年 8 月 23 日，主要检索词为：“breast cancer”“HER2”“hormone receptor”“metastasis”“CDK4/6 inhibitors”“PI3K inhibitors”“AKT inhibitors”“mTOR inhibitors”“endocrine therapy”。同一类别的条目用逻辑运算符“OR”连接，不同类别的条目用逻辑运算符“AND”连接。此外，根据相关 meta 分析和综述的参考文献进行手动搜索，以添加缺失的文献。

纳入标准：① 单臂、安慰剂对照或阳性药物对照的临床试验；② 受试者为 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌患者；③ 受试者使用含有 CDK4/6 抑制剂或 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂的方案进行治疗；④ 研究中报道了至少一项评估疗效的生存指标（OS、PFS）。

排除标准：① 非相关研究（研究药物非 CDK4/6 抑制剂或 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂或者研究适应证非 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌）；② 试验设计类型不符（如案例报道、观察性研究等）；③ 无相关分析数据指标（无主要疗效指标或安全性分析指标）；④ 文献类型为会议摘要、meta 分析、描述性综述、Pooled study 文献；⑤ 重复发表（如二次分析发表的文献等）。

1.2 数据提取与质量评价

采用 Microsoft Excel（Version 2021）提取以下数据：① 文献特征（文献 DOI、作者、发表年份、临床试验注册号等）；② 试验设计（样本量、给药方案、靶向药物类型等）；③ 患者特征（中位年龄、性别比例、内脏转移人群比例、仅骨转移人群比例、初始治疗人群比例、美国东部肿瘤协作组（ECOG）评分、联用内分泌治疗药物等）；④ 结局指标（OS、PFS、不良事件发生率、≥ 3 级不良事件发生率）。若结局指标在文献

中以图形化方式呈现，则使用 Engauge Digitizer（Version 12.1）进行数据提取，两位研究者独立从符合纳入标准的文献中提取数据，不一致的内容由第三位研究者确认。读图时，数据提取误差不应超过 2%，若超过 2% 须重新读图，最终取两者均值。

本研究采用 Cochrane risk of bias table 对文献的质量进行评价，主要从随机序列的产生、分配隐藏、实施者与参与者双盲、结局评估中的盲法、不全的结局数据、选择性发表和其他偏倚共七项条目评价文献的发表偏倚，每项条目根据实际情况将文献判为低风险、高风险和无法确定。

1.3 模型搭建

本研究使用参数化生存期模型来描述 OS 和 PFS 数据。相较于非参数法和半参数法，参数法能提供更多的信息，可以预测不同场景下的生存曲线和风险。生存模型与风险函数 [h（t）] 相关联，后者即 t 时刻（如患者入组至随访时间为 t）的瞬时结局事件发生率。生存模型与危险函数之间的关系如下所示：

$$S(t)=\exp(-\int_0^t h(t)dt) \quad (1)$$

评估 4 种不同的风险函数，即指数分布、Weibull 分布、Gompertz 分布和对数正态分布：

指数分布：$h(t)=\lambda$ (2)

Weibull 分布：$h(t)=\lambda\bullet\exp(\beta\bullet\ln(t))$ (3)

Gompertz 分布：$h(t)=\lambda\bullet\exp(\beta\bullet t)$ (4)

对数正态分布：$h(t)=\frac{(\sigma t\sqrt{2\pi})^{-1}}{1-\phi(z)}e^{(-\frac{1}{2}z^2)}$，

$$Z=\frac{\ln(t)-\mu}{\sigma} \quad (5)$$

式 2 ～ 4 中，λ 和 β 分别表示 0 时刻的风险率和风险率的回归系数随时间的变化，式 5 中的 h（t）服从对数正态分布，其中 μ 和 σ 分别为对数正态分布的算术平均值和标准差。根据目标函数值（OFV）的最小值、模型参数估计的标准误差（RSE）和模型的拟合优度选择最佳模型。

在模型参数中增加了研究间变异（式 6）和残差变异（式 7）以考虑观测值和模型预测值之间的差异。研究间变异（η）以指数形式引入，残差变异（ε）由加和型模型引入：

$$P_i=P_{pop}\times e^{\eta_i} \quad (6)$$

$$Obs_{j,i}=Pred_{j,i}+SE_{j,i}\times\varepsilon_{j,i} \quad (7)$$

$$SE_{j,i}=\sqrt{\frac{Obs_{j,i}\times(1-Obs_{j,i})}{N_{j,i}}} \quad (8)$$

式 6 中，P_i 为研究 i 模型参数的个体值，P_{pop} 为模型参数的群体典型值，η_i 为模型参数的研究间变异性，符合均值为 0，方差为 ω^2 的正态分布。式 7 中，$Obs_{j,i}$ 为研究 i 中第 j 个时间点的观测生存数据；$Pred_{j,i}$ 为研究 i 中第 j 时刻的预测生存数据；其中 $\varepsilon_{j,i}$ 是研究 i 中 j 时刻的残差，服从均值为 0，方差为 σ^2 的正态分布，$\varepsilon_{j,i}$ 是由研究 i 中 j 时刻生存数据的标准误差（$SE_{j,i}$）加权得到的。式 8 中 $N_{j,i}$ 为研究 i 中时间 j 的样本量。

使用协变量模型考察影响模型参数的潜在因素。选择年龄、内分泌治疗类型、内脏转移患者比例、ECOG 评分、初治人群比例、仅骨转移患者比例作为候选协变量进行筛选。缺失的协变量信息使用整个研究人群的中位值进行填补，缺失协变量比例＞ 30% 则未进行评估。采用式 9 ～ 10 引入连续型协变量，采用式 10 引入分类型协变量：

$$P_{pop}=P_{typical}+(COV-COV_{median})\times\theta_{cov} \quad (9)$$

$$P_{pop}=P_{typical}\times(\frac{COV}{COV_{median}})^{\theta_{cov}} \quad (10)$$

$$P_{pop}=P_{typical}+COV\times\theta_{cov} \quad (11)$$

式 9 ～ 11 中，P_{pop} 为不同协变量水平下的模型参数，$P_{typical}$ 为分类协变量等于 0 或连续协变量等于 COV_{median} 时模型参数的群体典型值。COV 为协变量值，COV_{median} 为该协变量在分析数据集中的中位值，θ_{cov} 为该协变量对模型参数的修正系数。

采用向前纳入法和向后剔除法进行协变量筛选。在向前纳入法中，OFV 下降的界限值设为 3.84（P ＜ 0.05），而在向后剔除法中，OFV 下降的界限值设置为 6.63（P ＜ 0.01）。

1.4 模型评价

最终模型采用拟合优度（goodness of fit，GOF）图进行综合评价，包括个体估计值 - 观察值（IPRED *vs* OBS）图、群体估计值 - 观察值（PRED *vs* OBS）图、群体估计值 - 条件加权残差（PRED *vs* CWRES）图、条件加权残差 - 时间（CWRES *vs* TIME）图，观察散点图是否分布均匀及是否呈现一定的趋势性；采用可视化预测检验（VPC）图以评估模型的预测效能；采用自举法进行 1000 次自举拟合，获得模型参数分布的中位数及其 95% 置信区间（*CI*），并将其与从原始数据集中获得的模型参数估算值进行比较，以评估模型的稳健性。

1.5 模型模拟

在建立最终模型后，通过贝叶斯反馈获得每

个试验的模型参数及其标准误差，单臂 meta 分析采用随机效应模型，汇总不同治疗方案下的模型参数。最后通过蒙特卡罗模拟（10 000 次）得到两类靶向抑制剂联合内分泌治疗的 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌患者 OS 和 PFS 的群体典型值和 95%*CI*。

1.6　3 ～ 5 级不良事件发生率

在单臂 meta 分析中采用随机效应模型合并分析 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂常见的任意级别及 3 ～ 5 级不良事件发生率。

1.7　分析软件

使用 NONMEM（Version 7.5.0）建立参数化生存期模型和模型模拟；使用 R（Version 4.3.2）进行 meta 分析和图形可视化。

2　结果

2.1　文献与数据特征

共检索得到 910 篇文献，经纳排标准筛选后纳入文献 48 篇[4-6，12-56]，包含 7881 例患者，其中使用 CDK4/6 抑制剂 26 篇（n ＝ 4750），PI3K/AKT/mTOR 抑制剂 22 篇（n ＝ 3131）。

纳入研究的人群基线特征如表 1 所示：患者平均年龄为 62 岁（43 ～ 64 岁）；内脏转移患者比例为 59%（40% ～ 84%）；仅骨转移人群比例为 21%（5% ～ 30%）；初始治疗人群比例为 43%（0 ～ 100%）。

表 1　两种靶向抑制剂治疗 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌患者的基线特征

Tab 1　Baseline characteristics of patients with ER ＋ /HER2 － metastatic breast cancer treated with two types of targeted inhibitors

	CDK4/6 抑制剂	PI3K/AKT/mTOR 抑制剂	总体人群
试验组数量	21	23	44
总样本量	4750	3131	7881
中位年龄 / 岁	60（43 ～ 64）	62（43.9 ～ 64）	62（43 ～ 64）
亚洲人口比例 /%	26（0 ～ 100）	11（0 ～ 23）	15（0 ～ 100）
内脏转移患者比例 /%	59（40 ～ 67）	60.9（49 ～ 84）	59（40 ～ 84）
ECOG/%			
0	58（36 ～ 73）	60（51 ～ 100）	59（36 ～ 100）
1	41（26 ～ 53）	37.5（0 ～ 45）	40（0 ～ 53）
初治人群比例 /%	100（0 ～ 100）	32.5（0 ～ 100）	43（0 ～ 100）
仅骨转移人群比例 /%	21（8 ～ 28）	18.8（5 ～ 30）	21（5 ～ 30）

2.2　模型构建

在评估的 4 种风险函数中，对数正态模型相比其他 3 种风险函数能更好地描述 PFS 和 OS 数据的特征，该模型的 OFV 最小，模型参数的相对标准误差也较小，因此选择对数正态模型对 OS 和 PFS 数据进行拟合，最终模型的估计值见表 2。协变量分析显示，内脏转移患者比例和联用的内分泌治疗药物类型对 OS 和 PFS 模型有显著影响。最终模型可表示为以下形式：

OS 模型：

$$h(t)_{final} = h(t)_{base} \times e^{(\theta_{ET_OS} + (VISCERAL - 0.59) \times 0.557)} \quad (12)$$

$$\theta_{ET_OS} = \begin{cases} 0 \\ 0.442 \\ 0.297 \end{cases}$$

PFS 模型：

$$h(t)_{final} = h(t)_{base} \times e^{(\theta_{ET_PFS} + (VISCERAL - 0.59) \times 2.23)} \quad (13)$$

$$\theta_{ET_PFS} = \begin{cases} 0 \\ 0.421 \\ 0.377 \end{cases}$$

在式 12 ～ 13 中，*VISCERAL* 代表内脏转移患者的比例，0.59 为纳入分析的内脏转移患者比例中位值。θ_{ET} 为内分泌治疗类型这一分类协变量对初始死亡风险函数的校正系数。内脏转移患者比例每增加 10%，患者死亡和疾病进展风险将分别增加 6% 和 25%；与使用 AIs 相比，靶向抑制剂联合氟维司群（fulvestrant），将使死亡风险增加 56%，疾病进展风险增加 52%，靶向抑制剂联合他莫昔芬（tamoxifen），将使死亡风险增加 35%，疾病进展风险增加 25%。

2.3　模型评价

OS 和 PFS 最终模型的 GOF 图分别如图 1 和图 2 所示，PRED *vs* OBS 图和 IPRED *vs* OBS 图中的拟合线与对角线基本重合，PRED *vs* OBS 图中实测值均匀分布在对角线两侧。PRED *vs* CWRES 图和 CWRES *vs* TIME 图中的拟合线几乎与对角线重合，大多数 CWRES 值在参考线附近近似均匀分布。这些结果表明，OS 和 PFS 模型拟合良好，没有明显的偏差；VPC 结果如图 3 所示，观测数据总体落在模型预测的 95%*CI* 范围内，表明模型具有较好的可预测性；自举法结果如表 2 所示，所有参数的中位值均包含在 95%*CI* 内，且与最终模型的参数估算值相近，表明模型具有较好的稳健性。

2.4　模型模拟

基于最终模型，本研究模拟了内分泌治疗联合 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂的典型 OS 和 PFS 曲线及其 95%*CI*。如图 4 和表 3 所示，内分泌治疗联合 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂治疗的典型中位 OS 分别为 40.7 个月（95%*CI*，33.3 ～ 48.2）和 29.8 个月（95%*CI*，23.8 ～ 36.6），前者比后者长 10.9 个月，且置信区间部分重叠，1 年 OS 率分别为 91.8%（95%*CI*，87.5% ～ 95.2%）和 83.8%（95%*CI*，76.3% ～ 90.4%），前者比后者高 8.0%；内

表 2 最终模型参数估计值

Tab 2 Parameter estimates of the final model

参数	PFS 模型				OS 模型			
	最终模型估计值		自举法（n = 1000）		最终模型估计值		自举法（n = 1000）	
	参数值（RSE%）	收缩值 /%	中位值	95%*CI*	参数值（RSE%）	收缩值 /%	中位值	95%*CI*
结构模型参数								
σ（ET）	1.24（6）		1.22	1.07 ～ 1.40	0.951（4）		0.953	0.889 ～ 1.056
σ（PAMi）	1.17（4）		1.17	1.07 ～ 1.35	1.03（7）		1.064	0.844 ～ 1.260
σ（CDK4/6i）	1.21（4）		1.20	1.11 ～ 1.29	0.973（6）		0.976	0.889 ～ 1.112
μ（ET）	2.44（9）		2.38	1.96 ～ 2.82	3.77（3）		3.807	3.598 ～ 4.115
μ（PAMi）	2.57（6）		2.53	2.17 ～ 2.87	3.76（4）		3.766	3.389 ～ 4.203
μ（CDK4/6i）	3.07（6）		3.04	2.71 ～ 3.40	4.06（3）		4.051	3.783 ～ 4.358
θ（fulvestrant）	0.421（41）		0.41	0.08 ～ 0.74	0.442（36）		0.432	0.160 ～ 0.712
θ（tamoxifen）	0.377（56）		0.35	0.02 ～ 0.71	0.297（71）		0.370	0.076 ～ 0.690
θ（visceral metastases）	2.23（33）		2.15	0.57 ～ 3.51	0.557（330）		1.424	－ 0.002 ～ 4.012
试验间变异								
ω（σ）	0.0286（19）	5	0.0278	0.0152 ～ 0.0410	0.0318（41）	3	0.0363	0.0117 ～ 0.0595
ω（μ）	0.0441（31）	0	0.0504	0.0231 ～ 0.0860	0.006 61（18）	1	0.0056	0.001 32 ～ 0.007 93
ε	0.001 04（14）	5	0.001 17	0.000 85 ～ 0.001 74	0.0006（18）	5	0.000 61	0.000 456 ～ 0.000 844

注：ET. 内分泌治疗；PAMi. PI3K/AKT/mTOR 抑制剂；CDK4/6i. CDK4/6 抑制剂。

Note：ET. endocrine therapy；PAMi. PI3K/AKT/mTOR inhibitors；CDK4/6i. CDK4/6 inhibitors.

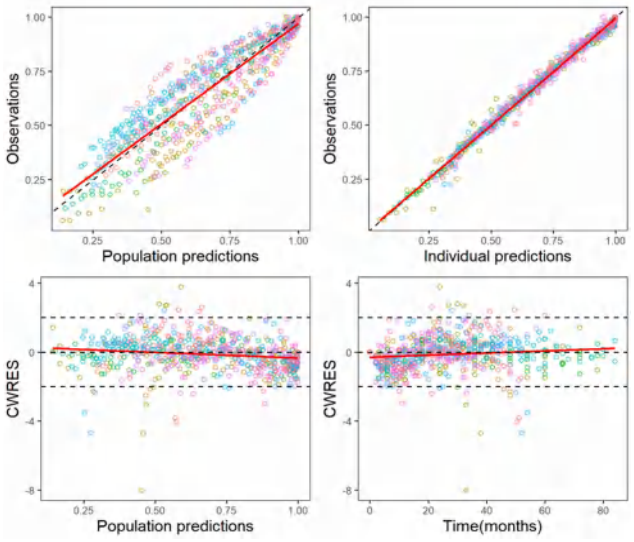


图 1 OS 最终模型的 GOF 图

Fig 1 GOF plots of OS model

注：图中的点为不同研究的 OS 观测值，黑色虚线为参考线，红色实线为回归趋势线，点的颜色为不同治疗臂。

Note：Points are the observed OS data from different studies，the black dotted line is the reference line，the red solid line is the regression trend line，and the color of the points represents the different treatment arms.

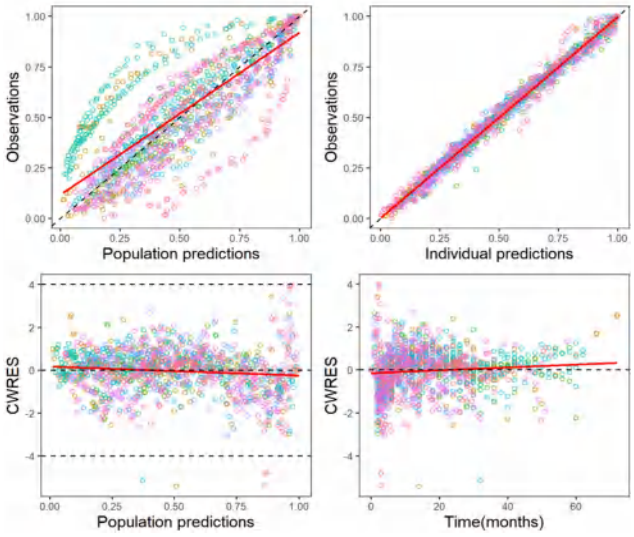


图 2 PFS 最终模型的 GOF 图

Fig 2 GOF plots of PFS model

注：图中的点为不同研究的 PFS 观测值，黑色虚线为参考线，红色实线为回归趋势线，点的颜色为不同治疗臂。

Note：Points are the observed PFS data from different studies，the black dotted line is the reference line，the red solid line is the regression trend line，and the color of the points represents the different treatment arms.

分泌治疗联合 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂治疗的典型中位 PFS 分别为 14.8 个月（95%*CI*，11.3 ～ 18.7）和 8.3 个月（95%*CI*，7.1 ～ 9.9），1 年 PFS 率分别为 57.6%（95%*CI*，47.8% ～ 66.2%）和 36.0%（95%*CI*，30.2% ～ 42.4%）。

本研究发现不同内分泌治疗药物的联合使用会对两类靶向抑制剂的疗效产生显著影响，因此模拟了 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂联合 3 种内分泌治疗药物情况下的 OS 和 PFS。当模拟一个协变量对疗效的影响时，其他协变量固定为中位值，即内脏转移患者的比例固定为 59%。模拟结果如图 5 所示，CDK4/6 抑制剂或 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂联合 AIs 的疗效，显著优于联合氟维司群或他莫昔芬。但是，需要注意的是，由于 CDK4/6 抑制剂 / 他莫昔芬（n = 3）和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂 / 他莫昔芬（n = 1）纳入的临

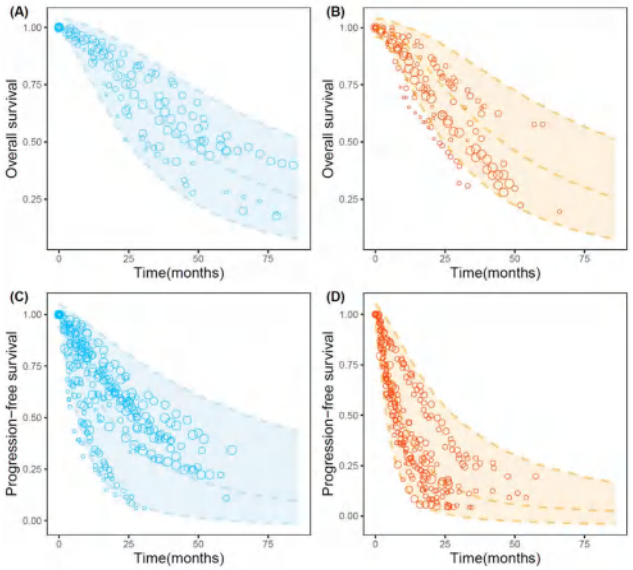


图 3　OS（A，B）和 PFS（C，D）最终模型的可视化检验图

Fig 3　Visual predictive check of the final model of OS（A，B）and PFS（C，D）

注：点为 OS 和 PFS 的观测值，点的大小与样本量成正比，阴影区域为模型预测曲线的 95%*CI*，虚线为模型预测的第 2.5%、50% 和 97.5% 的生存率。左侧两图为 CDK4/6 抑制剂，右侧两图为 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂。

Note：The points represent observed efficacy data，and symbol size is proportional to sample size. The shaded area is the model predicted 95%*CI* of the curve. The dashed lines are the model-predicted 2.5th，50th，and 97.5th percentile of survival. The two figures on the left side represent CDK4/6 inhibitors，and the two figures on the right side represent PI3K/AKT/mTOR inhibitors.

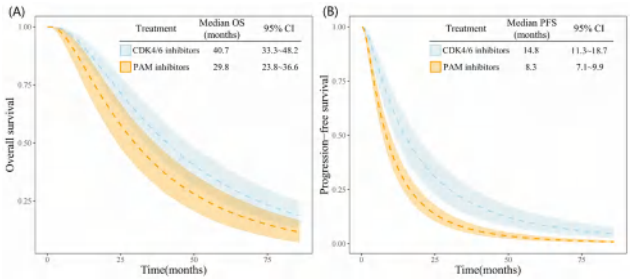


图 4　CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂的典型 PFS（A）和 OS（B）时间曲线

Fig 4　Simulation of typical response distributions of PFS（A）and OS（B）for CDK4/6 inhibitors and PI3K/AKT/mTOR inhibitors

注：虚线为中位值，阴影为 95%*CI*。

Note：The dashed line represents the median value，the shaded area represents 95%*CI*.

床试验数量较少，其典型疗效的估计可能存在抽样误差，应谨慎分析该模拟结果。

此外，本研究同时发现，内脏转移患者的比例也会对模型参数产生显著影响，因此模拟了不同内脏转移患者比例情况下的 PFS 和 OS。如图 6 所示，当发生内脏转移患者的比例从 40% 调整到 84% 时，

表 3　CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂的 OS 和 PFS 预测值及其 95%*CI*

Tab 3　Predicted values and 95%*CI* of OS and PFS for CDK4/6 inhibitors and PI3K/AKT/mTOR inhibitors

	CDK4/6 抑制剂	PI3K/AKT/mTOR 抑制剂
OS		
中位 OS/ 月	40.7（33.3 ～ 48.2）	29.8（23.8 ～ 36.6）
1 年 OS 率 /%	91.8（87.5 ～ 95.2）	83.8（76.3 ～ 90.4）
2 年 OS 率 /%	73.0（64.8 ～ 80.1）	59.4（49.5 ～ 68.6）
5 年 OS 率 /%	32.2（24.1 ～ 40.0）	21.4（14.9 ～ 28.9）
PFS		
中位 PFS/ 月	14.8（11.3 ～ 18.7）	8.3（7.1 ～ 9.9）
1 年 PFS 率 /%	57.6（47.8 ～ 66.2）	36.0（30.2 ～ 42.4）
2 年 PFS 率 /%	32.3（23.8 ～ 40.7）	14.6（11.3 ～ 19.0）
5 年 PFS 率 /%	9.1（5.7 ～ 13.7）	2.4（1.5 ～ 3.6）

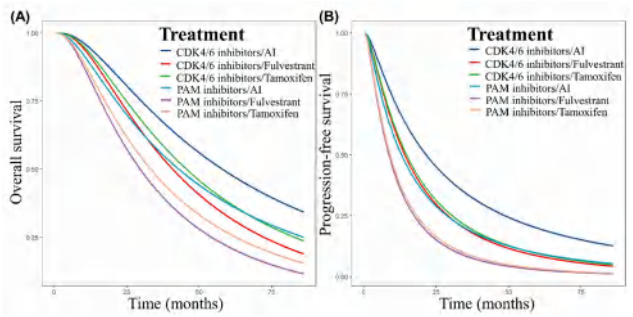


图 5　CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂不同联用方案下的模拟 OS（A）和 PFS（B）

Fig 5　Predicted typical time course of OS（A）and PFS（B）of different combination regimens

CDK4/6抑制剂的中位 OS 从 63.5 个月降至 51.6 个月，PFS 从 34.6 个月降至 12.5 个月；PI3K/AKT/mTOR 抑制剂中位 OS 从 47.3 个月下降到 38.0 个月，中位 PFS 从 20.6 个月下降到 7.7 个月。

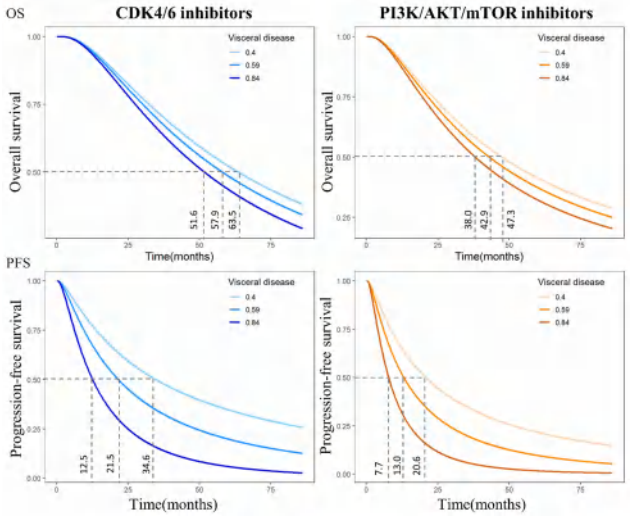


图 6　CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂在不同内脏转移患者比例下的模拟 OS 和 PFS

Fig 6　Simulated OS and PFS for CDK4/6 inhibitors and PI3K/AKT/mTOR inhibitors at different levels of proportion of patients with visceral metastases

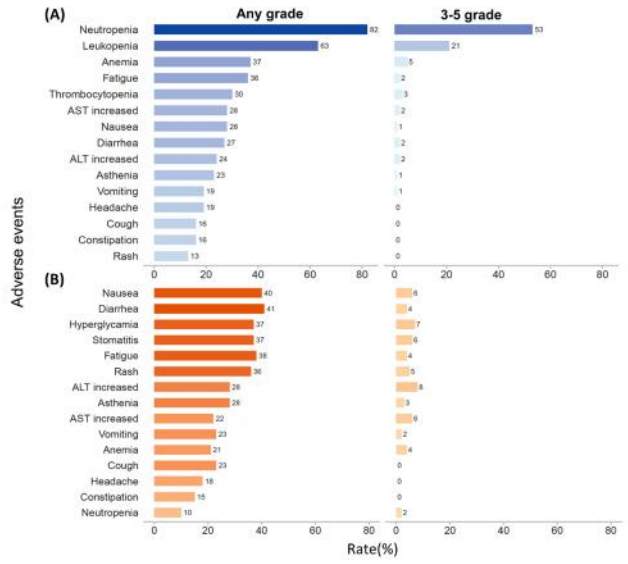


图 7 CDK4/6 抑制剂（A）和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂（B）的任意级别和 3 ～ 5 级不良事件发生率

Fig 7 Incidence of any grade or grade 3 ～ 5 adverse events of CDK4/6 inhibitors（A）and PI3K/AKT/mTOR inhibitors（B）

2.5 安全性分析

对于 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂的不良反应，单臂 meta 分析的研究结果如图 7 所示。CDK4/6 抑制剂的血液学毒性较大，中性粒细胞减少症、贫血、白细胞降低、血小板降低是 CDK4/6 抑制剂常见的血液学不良反应，发生率均大于 30%，其中中性粒细胞减少症是最常见的血液学不良反应；对于 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂，高血糖、恶心、腹泻、乏力、口腔炎、皮疹的发生率较高。

3 讨论

本研究首次采用 MBMA 的方法，以 OS 和 PFS 为疗效指标，对 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂联合内分泌治疗方案的疗效进行综合分析，旨在确定疗效最好的治疗方案和影响其疗效的潜在因素，从而为临床诊疗指南提供重要的定量信息。

研究结果表明，相比于内分泌单药治疗，CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂都获得了更长的 PFS 和 OS，支持了内分泌治疗与靶向治疗联合使用的治疗策略。考虑到临床上 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂的治疗时间通常晚于 CDK4/6 抑制剂，过去的研究在对两者的疗效进行比较时，通常会按治疗线进行分层，而本研究中，我们收集了患者在临床试验中的既往治疗信息，并将其作为协变量纳入模型中，以消除潜在的偏倚。本研究发现，CDK4/6 抑制剂与 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂相比，无论是作为一线治疗还是作为后线治疗，在 PFS 和 OS 方面均具有显著优势。在安全性方面，中性粒细胞减少是 CDK4/6 抑制剂最常见的不良反应，在 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂中，由葡萄糖代谢失调引起的高血糖发生率较高，这两种不良反应均被认为是这些药物的靶向治疗相关不良反应，因此需要采取预防、密切监测和治疗等措施。

此外，研究结果表明，内脏转移患者的比例会显著影响 PFS 和 OS。许多绝经后 ER ＋ / HER2 －转移性乳腺癌患者存在内脏转移，内脏转移是乳腺癌晚期的特征，意味着疾病进展到更具侵袭性的阶段和更高的疾病负担，而且显著影响治疗选择、预后评估和患者生活质量 [57-59]。本研究显示，发生内脏转移的患者比例越低，中位 OS 和 PFS 越长。这一结论证实了以往的研究结果，提示对于 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌患者，内脏转移是该人群的重要独立预后因素，在选择治疗方案时，应根据患者内脏转移的程度，谨慎选择治疗方案；同时，在交叉研究比较中和临床试验设计的样本量估计中，应考虑内脏转移患者比例的异质性。

对于 AIs 辅助治疗后未复发的患者，临床诊疗指南通常推荐一线治疗使用 AIs，二线治疗使用氟维司群，但是现有的一些临床研究结果 [4，39，48-49] 更倾向于一线治疗使用氟维司群，关于靶向抑制剂联用哪一个内分泌治疗药物疗效最佳，这一问题仍存在争议。本研究结果表明，无论是 CDK4/6 抑制剂还是 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂，联合使用 AIs 具有显著的疗效优势。然而，有研究表明，对于 *ESR1* 突变人群，氟维司群治疗获益可能更大 [60-61]，*ESR1* 的检测结果可能对于 CDK4/6 抑制剂联合哪种内分泌药物的选择具有指导意义，这一点还需要结合临床实际情况具体分析。

与以往的研究相比，本研究通过 MBMA 对现有临床数据进行了更深刻的挖掘，通过建模来估计任意时间点的生存率，而不局限于中位生存时间的汇总比较，从而可以定量分析 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂在整个时间进程中的疗效差异。本研究也存在一定的局限性。首先，纳入研究的患者主要是绝经后患者，而对于绝经前女性患者的数据尚不足，由于原始临床试验纳入标准的限制，这一问题还无法得到充分解决；其次，本研究的数据完全依赖于已发表的文献，这些数据大多呈现为群体水平，无法得到个体受试者水平的数据，限制了研究对个体层面信息的分析，缩小了协变量分布的范围，降低了探索影响疗效的潜在因素的能力，无法对一些关键协变量，如种族、既往治疗情况和仅骨转移患者的比例（在超过 30% 的纳入研究中缺失）等进行充分考察，这可能会使研究结果产生偏差；最后，

由于缺乏已发表文献的临床试验原始数据，以及可用报道只选择特定结果，即只关注阳性结果，都有可能使得结果存在偏倚风险[62]。

综上所述，本研究系统评价了 CDK4/6 抑制剂和 PI3K/AKT/mTOR 抑制剂联合内分泌治疗对 ER ＋ /HER2 －转移性乳腺癌患者的疗效和安全性，为 CDK4/6 抑制剂在临床诊疗指南中的一线推荐使用提供了有力的定量证据。建议未来研究可从目前已上市的 4 种 CDK4/6 抑制剂的药物不良反应、用药剂量等角度开展大样本、多中心的临床研究，更全面地评估不同患者群体对治疗的响应，并结合成本效益进一步进行验证。受纳入研究数量和质量限制，上述结论尚需开展更多高质量研究予以验证。

参考文献

[1] Arnold M，Morgan E，Rumgay H，et al. Current and future burden of breast cancer：global statistics for 2020 and 2040 [J]. Breast，2022，66（12）：15-23.

[2] Spring LM，Wander SA，Andre F，et al. Cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors for hormone receptor-positive breast cancer：past，present，and future [J]. Lancet，2020，395（10226）：817-827.

[3] Turner NC，Slamon DJ，Ro J，et al. Overall survival with palbociclib and fulvestrant in advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2018，379（20）：1926-1936.

[4] Slamon DJ，Neven P，Chia S，et al. Overall survival with ribociclib plus fulvestrant in advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2020，382（6）：514-524.

[5] Sledge GW，Toi M，Neven P，et al. The effect of abemaciclib plus fulvestrant on overall survival in hormone receptor-positive，ERBB2-negative breast cancer that progressed on endocrine therapy-MONARCH 2：a randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol，2020，6（1）：116-124.

[6] André F，Ciruelos E，Rubovszky G，et al. Alpelisib for PIK-3CA-mutated，hormone receptor-positive advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2019，380（20）：1929-1940.

[7] Leung JH，Leung HWC，Wang SY，et al. Efficacy and safety of CDK4/6 and PI3K/AKT/mTOR inhibitors as second-line treatment in postmenopausal patients with hormone receptor-positive，HER-2-negative metastatic breast cancer：a network meta-analysis [J]. Expert Opin Drug Saf，2021，20（8）：949-957.

[8] Wang LD，Da H，Li XL，et al. Comparison of CD4/6 inhibitors，PI3K inhibitors，and mTOR inhibitors for patients with advanced HR ＋ /HER2 － breast cancer：a network meta-analysis of 19 RCTs [J]. Breast J，2020，26（9）：1862-1866.

[9] Xu HC，Wang Y，Han YQ，et al. CDK4/6 inhibitors versus PI3K/AKT/mTOR inhibitors in women with hormone receptor-positive，HER2-negative metastatic breast cancer：an updated systematic review and network meta-analysis of 28 randomized controlled trials [J]. Front Oncol，2022，12：956464.

[10] Marshall SF，Burghaus R，Cosson V，et al. Good practices in model-informed drug discovery and development：practice，application，and documentation [J]. CPT：Pharmacometrics Syst Pharmacol，2016，5（3）：93-122.

[11] Mould DR. Model-based meta-analysis：an important tool for making quantitative decisions during drug development [J]. Clin Pharmacol Ther，2012，92（3）：283-286.

[12] Albanell J，Martínez MT，Ramos M，et al. Randomized phase Ⅱ study of fulvestrant plus palbociclib or placebo in endocrine-sensitive，hormone receptor-positive/HER2-advanced breast cancer：GEICAM/2014-12（FLIPPER）[J]. Eur J Cancer，2022，161：26-37.

[13] André F，Ciruelos EM，Juric D，et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated，hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer：final overall survival results from SOLAR-1 [J]. Ann Oncol，2021，32（2）：208-217.

[14] Bachelot T，Bourgier C，Cropet C，et al. Randomized phase Ⅱ trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors：a GINECO study [J]. J Clin Oncol，2012，30（22）：2718-2724.

[15] Baselga J，Campone M，Piccart M，et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2012，366（6）：520-529.

[16] Baselga J，Im SA，Iwata H，et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal，hormone receptor-positive，HER2-negative，advanced breast cancer（BELLE-2）：a randomised，double-blind，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2017，18（7）：904-916.

[17] Campone M，Im SA，Iwata H，et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant for postmenopausal，hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative，advanced breast cancer：overall survival results from BELLE-2 [J]. Eur J Cancer，2018，103：147-154.

[18] Cristofanilli M，Rugo HS，Im SA，et al. Overall survival with palbociclib and fulvestrant in women with HR ＋ /HER2 － ABC：updated exploratory analyses of PALOMA-3，a double-blind，phase Ⅲ randomized study [J]. Clin Cancer Res，2022，28（16）：3433-3442.

[19] Dent S，Cortés J，Im YH，et al. Phase Ⅲ randomized study of taselisib or placebo with fulvestrant in estrogen receptor-positive，PIK3CA-mutant，HER2-negative，advanced breast cancer：the SANDPIPER trial [J]. Ann Oncol，2021，32（2）：197-207.

[20] Di Leo A，Johnston S，Lee KS，et al. Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive，HER2-negative，advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition（BELLE-3）：a randomised，double-blind，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2018，19（1）：87-100.

[21] Dickler MN，Saura C，Richards DA，et al. Phase Ⅱ study of taselisib（GDC-0032）in combination with fulvestrant in patients with HER2-negative，hormone receptor-positive advanced breast cancer [J]. Clin Cancer Res，2018，24（18）：

4380-4387.

[22] Fan Y，Sun T，Shao ZM，et al. Effectiveness of adding everolimus to the first-line treatment of advanced breast cancer in premenopausal women who experienced disease progression while receiving selective estrogen receptor modulators：a phase 2 randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol，2021，7（10）：e213428.

[23] Fernández-Cuerva C，Del Rio Valencia JC，Bermejo RT. Effectiveness and safety of palbociclib plus endocrine therapy in hormone receptor-positive，HER2-negative metastatic breast cancer：real-world results [J]. Can J Hosp Pharm，2022，75（1）：26-33.

[24] Finn RS. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive，HER2-negative，advanced breast cancer（PALOMA-1/TRIO-18）：a randomised phase 2 study [J]. Lancet Oncol，2015，16（1）：25-35.

[25] Finn RS，Boer K，Bondarenko I，et al. Overall survival results from the randomized phase 2 study of palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone for first-line treatment of ER ＋ /HER2 － advanced breast cancer（PALOMA-1，TRIO-18）[J]. Breast Cancer Res Treat，2020，183（2）：419-428.

[26] Finn RS，Martin M，Rugo HS，et al. Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2016，375（20）：1925-1936.

[27] García-Sáenz J，Martínez-Jáñez N，Cubedo R，et al. Sapanisertib plus fulvestrant in postmenopausal women with estrogen receptor-positive/HER2-negative advanced breast cancer after progression on aromatase inhibitor [J]. Clin Cancer Res，2022，28（6）：1107-1116.

[28] Hamilton E，Cortes J，Ozyilkan O，et al. nextMONARCH phase 2 randomized clinical trial：overall survival analysis of abemaciclib monotherapy or in combination with tamoxifen in patients with endocrine-refractory HR ＋，HER2 － metastatic breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat，2022，195（1）：55-64.

[29] Hortobagyi GN，Stemmer SM，Burris HA，et al. Overall survival with ribociclib plus letrozole in advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2022，386（10）：942-950.

[30] Hortobagyi GN，Stemmer SM，Burris HA，et al. Ribociclib as first-line therapy for HR-positive，advanced breast cancer [J]. N Engl J Med，2016，375（18）：1738-1748.

[31] Hortobagyi GN，Stemmer SM，Burris HA，et al. Updated results from MONALEESA-2，a phase Ⅲ trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive，HER2-negative advanced breast cancer [J]. Ann Oncol，2018，29（7）：1541-1547.

[32] Howell SJ，Casbard A，Carucci M，et al. Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic，oestrogen receptor-positive，HER2-negative breast cancer（FAKTION）：overall survival，updated progression-free survival，and expanded biomarker analysis from a randomised，phase 2 trial [J]. Lancet Oncol，2022，23（7）：851-864.

[33] Jeong H，Jeong JH，Kim JE，et al. Long-term results and bone-protective effect of everolimus added to letrozole and ovarian function suppression for premenopausal women with hormone receptor-positive，HER2-negative metastatic breast cancer：an updated analysis of the LEO study [J]. Ann Oncol，2021，32：S67.

[34] Jerusalem G，De Boer RH，Hurvitz S，et al. Everolimus plus exemestane *vs* everolimus or capecitabine monotherapy for estrogen receptor-positive，HER2-negative advanced breast cancer：the BOLERO-6 randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol，2018，4（10）：1367-1374.

[35] Johnston S，O'shaughnessy J，Martin M，et al. Abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer：MONARCH 3 updated results in prognostic subgroups [J]. NPJ Breast Cancer，2021，7（1）：80.

[36] Kalinsky K，Accordino MK，Chiuzan C，et al. Randomized phase Ⅱ trial of endocrine therapy with or without ribociclib after progression on cyclin-dependent kinase 4/6 inhibition in hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer：MAINTAIN trial [J]. J Clin Oncol，2023，41（24）：4004-4013.

[37] Kornblum N，Zhao F，Manola J，et al. Randomized phase Ⅱ trial of fulvestrant plus everolimus or placebo in postmenopausal women with hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer resistant to aromatase inhibitor therapy：results of PrE0102 [J]. J Clin Oncol，2018，36（16）：1556-1563.

[38] Krop IE，Mayer IA，Ganju V，et al. Pictilisib for oestrogen receptor-positive，aromatase inhibitor-resistant，advanced or metastatic breast cancer（FERGI）：a randomised，double-blind，placebo-controlled，phase 2 trial [J]. Lancet Oncol，2016，17（6）：811-821.

[39] Llombart-Cussac A，Pérez-García JM，Bellet M，et al. Fulvestrant-palbociclib *vs* letrozole-palbociclib as initial therapy for endocrine-sensitive，hormone receptor-positive，ERBB2-negative advanced breast cancer：a randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol，2021，7（12）：1791-1799.

[40] Loibl S，Turner NC，Ro J，et al. Palbociclib combined with fulvestrant in premenopausal women with advanced breast cancer and prior progression on endocrine therapy：PALOMA-3 results [J]. Oncologist，2017，22（9）：1028-1038.

[41] Lu YS，Im SA，Colleoni M，et al. Updated overall survival of ribociclib plus endocrine therapy versus endocrine therapy alone in pre-and perimenopausal patients with HR ＋ /HER2 － advanced breast cancer in MONALEESA-7：a phase Ⅲ randomized clinical trial [J]. Clin Cancer Res，2022，28（5）：851-859.

[42] Martín M，Zielinski C，Ruiz-Borrego M，et al. Overall survival with palbociclib plus endocrine therapy versus capecitabine in postmenopausal patients with hormone receptor-positive，HER2-negative metastatic breast cancer in the PEARL study [J]. Eur J Cancer，2022，168：12-24.

[43] Martin M，Zielinski C，Ruiz-Borrego M，et al. Palbociclib in combination with endocrine therapy versus capecitabine in hormonal receptor-positive，human epidermal growth factor 2-negative，aromatase inhibitor-resistant metastatic breast cancer：a phase Ⅲ randomised controlled trial-PEARL [J]. Ann Oncol，2021，32（4）：488-499.

[44] Piccart M，Hortobagyi GN，Campone M，et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive，human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer：overall survival results from BOLERO-2 [J]. Ann Oncol，2014，25（12）：2357-2362.

[45] Royce M，Bachelot T，Villanueva C，et al. Everolimus plus endocrine therapy for postmenopausal women with estrogen receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer：a clinical trial [J]. JAMA Oncol，2018，4（7）：977-984.

[46] Rugo HS，Finn RS，Diéras V，et al. Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up [J]. Breast Cancer Res Treat，2019，174（3）：719-729.

[47] Schmid P，Zaiss M，Harper-Wynne C，et al. Fulvestrant plus vistusertib vs fulvestrant plus everolimus *vs* fulvestrant alone for women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer [J]. JAMA Oncol，2019，5（11）：1556-1564.

[48] Slamon DJ，Neven P，Chia S，et al. Phase Ⅲ randomized study of ribociclib and fulvestrant in hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer：MONALEESA-3 [J]. J Clin Oncol，2018，36（24）：2465-2472.

[49] Slamon DJ，Neven P，Chia S，et al. Ribociclib plus fulvestrant for postmenopausal women with hormone receptor-positive，human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer in the phase Ⅲ randomized MONALEESA-3 trial：updated overall survival [J]. Ann Oncol，2021，32（8）：1015-1024.

[50] Tripathy D，Im SA，Colleoni M，et al. Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive，advanced breast cancer（MONALEESA-7）：a randomised phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2018，19（7）：904-915.

[51] Welt A，Wiesweg M，Theurer S，et al. Buparlisib in combination with tamoxifen in pretreated patients with hormone receptor-positive，HER2-negative advanced breast cancer molecularly stratified for PIK3CA mutations and loss of PTEN expression [J]. Cancer Med，2020，9（13）：4527-4539.

[52] Xu BH，Hu XC，Li W，et al. Palbociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in Asian postmenopausal women with oestrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer：primary results from PALOMA-4 [J]. Eur J Cancer，2022，175：236-245.

[53] Xu BH，Zhang QY，Zhang P，et al. Dalpiciclib or placebo plus fulvestrant in hormone receptor-positive and HER2-negative advanced breast cancer：a randomized，phase 3 trial [J]. Nat Med，2021，27（11）：1904-1909.

[54] Yardley DA，Liggett W，Mainwaring M，et al. A phase Ⅱ open label study of everolimus in combination with endocrine therapy in resistant hormone receptor-positive HER2-negative advanced breast cancer [J]. Clin Breast Cancer，2020，20（2）：89-97.

[55] Zhang P，Zhang QY，Tong ZS，et al. Dalpiciclib plus letrozole or anastrozole versus placebo plus letrozole or anastrozole as first-line treatment in patients with hormone receptor-positive，HER2-negative advanced breast cancer（DAWNA-2）：a multicentre，randomised，double-blind，placebo-controlled，phase 3 trial [J]. Lancet Oncol，2023，24（6）：646-657.

[56] Zhang QY，Sun T，Yin YM，et al. MONARCH plus：abemaciclib plus endocrine therapy in women with HR ＋ / HER2 － advanced breast cancer：the multinational randomized phase Ⅲ study [J]. Ther Adv Med Oncol，2020，12：p1758835920963925.

[57] Harb WA. Management of patients with hormone receptor-positive breast cancer with visceral disease：challenges and treatment options [J]. Cancer Manag Res，2015，7（1）：37-46.

[58] Robertson JFR，Leo A，Johnston S，et al. meta-analyses of visceral versus non-visceral metastatic hormone receptor-positive breast cancer treated by endocrine monotherapies [J]. NPJ Breast Cancer，2021，7（1）：11.

[59] Rosa ES，Moreno E，Caguioa PB. Predictors of early distant metastasis in women with breast cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2013，139（4）：645-652.

[60] Fribbens C，O’leary B，Kilburn L，et al. Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer [J]. J Clin Oncol，2016，34（25）：2961-2968.

[61] Brett JO，Spring LM，Bardia A，et al. ESR1 mutation as an emerging clinical biomarker in metastatic hormone receptor-positive breast cancer [J]. Breast Cancer Res，2021，23（1）：85.

[62] Boucher M，Bennetts M. The many flavors of model-based meta-analysis：part Ⅰ-introduction and landmark data [J]. CPT-Pharmacomet Syst，2016，5（2）：54-64.

（收稿日期：2024-03-22；修回日期：2024-05-14）

我院妇科抗肿瘤药物超说明书用药分析及循证评价

张芸婷[1]，郭静[2]，沈甫明[1]，李冬洁[1]，黄芳[1*]（1. 同济大学附属第十人民医院药学部，上海 200072；2. 同济大学附属第十人民医院妇产科，上海 200072）

摘要：目的 调查分析本院妇科抗肿瘤药物超说明书用药情况，并进行循证评价，为临床合理用药提供参考依据。**方法** 提取我院 2022 年 7 月—2023 年 6 月妇科住院患者使用抗肿瘤药物的医嘱，整理所有超说明书用药信息并记录，包括适应证、用法用量等。根据我院循证评价标准对相关循证证据进行评价。**结果** 共纳入患者 218 人次，涉及抗肿瘤药物 21 种，相关医嘱 1417 条。超说明书用药 169 人次（占 77.53%），符合超说明书用药的抗肿瘤药物 19 种，相关医嘱 658 条（占 46.43%），超说明书用药类型以超适应证用药为主（占 94.98%）。循证评价分析显示证据强度多为中等强度及以上（占 88.15%）。**结论** 妇科抗肿瘤药物超说明书用药情况普遍，均有循证医学证据支持，但个别用法证据等级较低，需加强管理，保障用药安全。

关键词：超说明书用药；抗肿瘤药物；妇科肿瘤；循证评价标准；药事管理
中图分类号：R95，R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3086-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.041

Evidence-based evaluation of off-label use of antineoplastic drugs in the Gynecology Department in a hospital

ZHANG Yun-ting[1], GUO Jing[2], SHEN Fu-ming[1], LI Dong-jie[1], HUANG Fang[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Shanghai Tenth People's Hospital*, *Tongji University*, *Shanghai* 200072; 2. *Department of Obstetrics and Gynecology*, *Shanghai Tenth People's Hospital*, *Tongji University*, *Shanghai* 200072)

Abstract: Objective To analyze the off-label use of antineoplastic drugs in the Gynecology Department in our hospital and perform evidence-based evaluation to provide a reference for rational drug use. **Methods** Antineoplastic drugs orders for inpatients from July 2022 to June 2023 were collected, and evaluated according to the evidence-based criteria. **Results** Totally 218 patients were included and 21 antineoplastic drugs with 1417 medical orders involved. Totally 169 (77.53%) patients had off-label drug use concerning 19 antineoplastic drugs in 658 (46.43%) medical orders. Off-label indication, accounted for 94.98%. The evidence was mostly moderate or strong in the review, reaching 88.15%. **Conclusion** Off-label use of antineoplastic drugs in Gynecology Department is common in this hospital. Standardized management is needed to ensure safe and rational drug use.

Key words: off-label drug use; antineoplastic drug; gynecological oncology; evidence-based evaluation standard; pharmaceutical administration

药品说明书是经国家药品监督管理部门审核通过，判断临床医师用药行为是否得当的最具法律效力的文书，也是医师开具处方及药师审核处方的主要依据。但是，因药品说明书更新慢，使得说明书中的适应证、用法用量等远远落后于实际临床需求，尤其在抗肿瘤药物治疗领域，超药品说明书用药（下文简称“超说明书用药”）是普遍现象[1]。卵巢癌、宫颈癌和子宫内膜癌是最常见的三大妇科恶性肿瘤，根据 2024 年国家癌症中心发布的最新数据显示，我国新发妇科恶性肿瘤近 24.7 万例，其中宫颈癌 15.07 万例、子宫体癌 7.77 万例、卵巢癌 6.11 万例，妇科肿瘤的发病率呈上升趋势，严重威胁着女性的身心健康[2]。妇科肿瘤有较高的复发率和耐药率[3]，面对患者强烈的治疗意愿时，超说明

基金项目：上海市医院协会临床药事管理专委会 2021 年抗肿瘤药物临床应用管理项目（No.YS2021002）。
作者简介：张芸婷，女，主管药师，主要从事临床药学方面的研究，email：pharmacy2010@163.com *通信作者：黄芳，女，主任药师，主要从事临床药学方面的研究，email：hazel_huang@126.com

书用药不可避免。既往一些研究显示妇科肿瘤治疗发生超说明书用药的现象比例较高[4-5]，本文通过回顾性调查本院妇科抗肿瘤药物超说明书用药的使用情况，对超说明书用药进行汇总分析，随后根据我院制订的超说明书用药循证评价标准进行循证评价，为临床合理用药提供参考依据。

1　资料与方法

1.1　资料

采用回顾性分析方法，通过医院临床药师工作站和 HIS 电子病历系统提取我院 2022 年 7 月至 2023 年 6 月妇科使用抗肿瘤药物的住院患者医嘱信息。

1.2　方法

依据国家药品监督管理局批准的药品说明书对抗肿瘤药物用药医嘱判定是否超说明书用药，并记录患者的基本情况、临床诊断、药品名称及用法用量、超说明书用药类型等。按照世界卫生组织的 ATC（Anatomical Therapeutic Chemical）系统对药物进行分类。所有数据采用 Microsoft Excel 2019 软件进行汇总分析处理。然后，查询同通用名药品的国外或国内药品说明书、Micromedex 的 Thomson 分级系统、指南、Meta 分析等医学文献[6]，结合我院制订的超说明书用药循证评价标准对其有效性、证据等级和安全性进行评价并记录。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，计数资料以构成比（%）表示。

1.3　我院超说明书用药循证证据评价标准

依据《超说明书用药循证评价规范（2021 版）》[6]和《中国超药品说明书用药管理指南（2021）》[7]等制订我院超说明书用药循证证据评价标准（见表 1）。评价内容包括有效性、证据等级及推荐等级，医学文献进一步记录及评估安全性，参考我国《药品不良反应报告和监测办法》，根据上市时间、药品严重不良反应发生频率等进行安全性评估[8]。综合评价后，符合高证据等级的超说明书用药强推荐备案，推荐临床使用；中证据等级的超说明书用药中等强度推荐备案，建议临床使用；弱推荐为低证据等级的超说明书用药，经专家讨论后部分可通过备案；对极低循证等级的超说明书用药，不同意备案。

表 1　超说明书用药循证证据评价标准

Tab 1　Evaluation criteria of evidence-based medicine for off-label drug use

评价项目	评价标准	证据等级	推荐等级
用药指征及有效性	① 美国、欧洲、日本等国家或地区药品说明书已标注的适应证；② Micromedex 数据库 Thomson 分级系统推荐等级Ⅰ级；③ NCCN 指南推荐等级Ⅰ级，CSCO 指南推荐等级Ⅰ级、证据等级Ⅰ级	高	强推荐
	① 国内外权威医药学著作已经收载的超说明书用药；② Micromedex 数据库 Thomson 分级系统推荐等级Ⅱa；③ NCCN 指南推荐等级 2A 级或以上，CSCO 指南推荐等级Ⅱ级、证据等级 2A 级；④ 经系统评价或 Meta 分析、多中心大样本随机对照试验证实的适应证	中	中等推荐
	① NCCN 指南推荐等级 2B 级，CSCO 指南推荐等级Ⅲ级、证据等级 2B 级；② Micromedex 数据库 Thomson 分级系统推荐等级Ⅱb级；③ 专家意见或共识；④ 非随机对照试验、病例对照研究	低	弱推荐
	个案报道或系列报道	极低	不推荐
安全性	① 药物上市 5 年以上，药品说明书记载严重药品不良反应罕见及十分罕见；② 超说明书用药相关循证证据未见严重不良反应	1 级	安全
	① 药物上市 5 年以上，药品说明书记载严重药品不良反应偶见；② 超说明书用药相关文献描述该药安全性存在争议	2 级	一般
	① 药物上市 5 年以内；② 药品说明书存在致死黑框警告；③ 医学文献资料提示严重不良反应常见或十分常见	3 级	差

注（Note）：NCCN. 美国国立综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network）；CSCO. 中国临床肿瘤学会（Chinese Society of Clinical Oncology）。

2　结果

2.1　一般情况

本研究共纳入患者 218 例，均为女性，患者年龄为 14 ～ 88 岁，平均年龄（55.94±11.64）岁。调查发现涉及抗肿瘤药物 21 种，其中传统细胞毒性药物 12 种，新型抗肿瘤药物 9 种（见表 2）。

2.2　妇科抗肿瘤药物超说明书用药调查情况

218 人次涉及医嘱 1467 条，排除不合理医嘱 50 条（包括给药频次或给药途径缺失、单次剂量为整盒剂量）后，合理医嘱共 1417 条。存在超说明书用药 169 人次，占全部人数的 77.53%。21 种抗肿瘤药物中，超说明书用药涉及医嘱 658 条，占全部抗肿瘤药物的 46.43%。紫杉醇（白蛋白结合型）、贝伐珠单抗和奈达铂的超说明书用药占总医嘱数前三位。超说明书用药类型包括超适应证用药 625 条，占 94.98%，超给药途径用药 33 条，占 5.02%，未发现剂量和疗程、适用人群这两项超说明书用药类型。给药途径与超适应证大部分为重叠医嘱。我院妇科抗肿瘤药物超说明书用药情况见表 3。

表 2 妇科抗肿瘤药物

Tab 2 Antineoplastic drugs in Gynecology Department

药品类别	药品分类	药品名称
传统细胞毒性药物	烷化剂	环磷酰胺
	铂类配合物	卡铂、顺铂、奥沙利铂、奈达铂、洛铂
	抗代谢药	培美曲塞、甲氨蝶呤
	植物生物碱及其他天然药物	紫杉醇、紫杉醇（白蛋白结合型）、多西他赛、伊立替康
新型抗肿瘤药物	大分子单克隆抗体类	贝伐珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗
	小分子靶向药物	安罗替尼、阿帕替尼、仑伐替尼、奥拉帕利、尼拉帕利
	其他	重组人血管内皮抑制素

表 3 妇科抗肿瘤药物超说明书用药类型分布

Tab 3 Types and compositions of off-label use of antineoplastic drugs in Gynecology Department

药品名称	超说明书用药类型（*n*）		
	超适应证	超给药途径	合计
紫杉醇（白蛋白结合型）	175	—	175
奈达铂	78	—	78
贝伐珠单抗	70	6	76
吉西他滨	73	—	73
卡铂	72	—	72
紫杉醇	45	—	45
安罗替尼	33	—	33
伊立替康	30	—	30
顺铂	—	18	18
信迪利单抗	15	—	15
重组人血管内皮抑制素	—	9	9
甲氨蝶呤	8	—	8
洛铂	5	—	5
多西他赛	5	—	5
阿帕替尼	5	—	5
仑伐替尼	4	—	4
奥沙利铂	4	—	4
卡瑞利珠单抗	2	—	2
培美曲塞	1	—	1
总计 [*n*（%）]	625（94.98）	33（5.02）	658（100）

2.3 抗肿瘤药物超说明书用药循证评价分析

根据表 1 对超说明书用药证据进行循证评价，结果显示超说明书用药均有医学证据支持。超说明书用药共 32 项，其中高证据等级 12 项，相关医嘱共 328条（占 49.85%）；中证据等级 11 项，相关医嘱共 252 条（占 38.30%），低证据等级共 9 项，相关医嘱共 78 条（占 11.85%）。安全性方面，安全性一般共 26 项（占 81.25%），安全性低共 6 项（占 18.75%）且均为低证据等级。抗肿瘤药物方面，除了洛铂治疗复发性卵巢癌、奈达铂治疗子宫内膜癌是低证据等级，其余传统化疗药物的超说明书用药均为中证据等级及以上，而新型抗肿瘤药物的超说明书用药多为低证据等级。本院制订的妇科抗肿瘤药物超说明书用药循证医学证据见表 4。

3 讨论

3.1 循证评价标准及我院妇科抗肿瘤药物超说明书用药情况

明确的循证医学证据是超说明书用药的前提，也是各医疗机构超说明书用药管理的基础，但是目前暂没有统一的证据分级标准。Micromedex 的 Thomson 分级系统是超说明书用药管理的重要依据，亦存在其局限性，比如，个案报道和专家共识的推荐等级一致 [24]。经过我院专家组讨论，根据循证证据的有效性、推荐强度和安全性，结合 GRADE 分级系统和 OCEM 系统 [7] 将循证医学证据分级，制订我院超说明书用药循证证据评价标准，为抗肿瘤药物的管理提供依据。

研究显示，我院妇科肿瘤治疗过程中超药品说明书的现象较为普遍，治疗方案中广泛使用的铂类和紫杉醇等传统化疗药物同样存在超说明书用药的情况。妇科抗肿瘤药物超说明书用药均有明确的循证医学证据。相比于传统化疗药物超说明书用药的循证证据级别较高，新型抗肿瘤药物在妇科肿瘤中的循证依据多为低证据等级，这与陈慧等 [25] 分析的新型抗肿瘤药物超说明书循证依据多为弱推荐的情况类似。本研究发现超药品说明书主要发生在妇科肿瘤的晚期或复发阶段，肿瘤患者的疾病阶段是超说明书用药合理性评价需要关注的方面。

3.2 妇科新型抗肿瘤药物超说明书低证据等级用药分析

研究表明免疫检查点抑制剂对于妇科肿瘤显示出一定的疗效，通常用于晚期 / 复发性妇科肿瘤，免疫检查点抑制剂单药治疗疗效有限，与化疗药物、抗血管生成、靶向治疗等的联合治疗有望提高疗效，以子宫内膜癌疗效最佳，其次是宫颈癌、卵巢癌疗效较差 [26]。我院妇科新型抗肿瘤药物超说明书用药基于免疫检查点抑制剂联合抗血管生成药物的方案，用于复发性宫颈癌和复发性子宫内膜癌。但是相关的循证医学证据是多中心、单臂的Ⅱ期临床研究，为低证据级别，并不能作为超说明书用药的可靠依据，仅可作为探索性治疗 [27-28]。免疫检查点抑制剂的疗效与生物标志物包括 PD-L1、肿瘤突变负荷、错配修复等的表达密切相关 [26]。卡瑞利珠单抗联合阿帕替尼用于复发性宫颈癌的多中心Ⅱ期临床研究表明，PD-L1 阳性与 PD-L1 阴性患者相比，客观缓解率（ORR）无明显差异（69.0% *vs* 50.0%，

表 4 妇科抗肿瘤药物超说明书用药的主要证据类型及证据等级

Tab 4 Evidence types and levels of off-label use of antineoplastic drugs in Gynecology Department

药品名称	超说明书用法内容	依据	证据等级	安全性	医嘱条数 / [*n*（%）]
卡铂	复发性宫颈癌	① NCCN 指南 2A 类[9]；② CSCO 指南Ⅰ级推荐[10]	高	一般	21（3.19）
	子宫内膜癌	① NCCN 指南 2A 类[11]；② CSCO 指南Ⅰ级推荐[12]	高	一般	51（7.75）
洛铂	复发性卵巢癌	卵巢恶性肿瘤诊断与治疗指南（2021）[13]	低	一般	5（0.76）
奈达铂	复发性卵巢癌	PMDA 批准	高	/	31（4.71）
	宫颈癌*	PMDA 批准	高	/	39（5.93）
	子宫内膜癌	《妇科肿瘤铂类药物临床应用指南》[14]	低	一般	8（1.22）
奥沙利铂	晚期卵巢癌（黏液癌）	① NCCN 指南 2A 类[15]；② CSCO 指南Ⅰ级推荐[16]	高	一般	4（0.61）
紫杉醇	宫颈癌*	① Micromedex 分级：有效性Ⅱa；证据等级Ⅱb；推荐等级 B 级；② NCCN 指南 2A 类[9]；③ CSCO 指南Ⅰ级推荐[10]	高	/	22（3.34）
	子宫内膜癌	① NCCN 指南 2A 类[11]；② CSCO 指南Ⅰ级推荐[12]	高	一般	23（3.5）
紫杉醇（白蛋白结合型）	复发性卵巢癌*	① Micromedex 分级：有效性Ⅱa；证据等级Ⅱb；推荐等级 B 级；② NCCN 指南 2A[15]；③ CSCO 指南Ⅲ级推荐[16]	中	/	109（16.57）
	复发性宫颈癌	① NCCN 指南 2B 类[9]；② CSCO 指南Ⅱ级推荐[10]	中	一般	25（3.8）
	复发性子宫内膜癌	① NCCN 指南 2A 类[11]；② CSCO 指南Ⅲ级推荐[12]	中	一般	41（6.23）
多西他赛	复发性卵巢癌*	① Micromedex 分级：有效性Ⅱa；证据等级Ⅱb；推荐等级 B 级；② NCCN 指南 2A[15]；③ CSCO 指南 1A 类[16]	高	/	3（0.46）
	复发性宫颈癌	CSCO 指南Ⅱ级推荐[10]	中	一般	2（0.3）
吉西他滨	复发性卵巢癌*	FDA 批准	高	一般	61（9.27）
	复发子宫内膜癌	NCCN 指南 2A 类[11]	中	一般	12（1.82）
伊立替康	复发性卵巢癌	① NCCN 指南 2A 类[15]；② CSCO 指南 2A 类（铂敏感）；2B 类（铂耐药）[16]	中	一般	26（3.95）
	复发性宫颈癌	① NCCN 指南 2A 类[9]；② CSCO 指南Ⅲ级推荐[10]	中	一般	4（0.61）
培美曲塞	复发性卵巢癌*	① Micromedex 分级：有效性Ⅱa；证据等级Ⅱb；推荐等级 B 级；② NCCN 指南 2A 类[15]；③ CSCO 指南：Ⅲ级推荐[16]	中	一般	1（0.15）
甲氨蝶呤	异位妊娠*	Micromedex 分级：有效性Ⅱa；证据等级Ⅱa；推荐等级 B 级	中	/	8（1.22）
卡瑞利珠单抗	复发性宫颈癌	参考文献[17]	低	差	2（0.3）
信迪利单抗	复发性宫颈癌	参考文献[18]	低	差	12（1.82）
	复发性子宫内膜癌	参考文献[19]	低	差	3（0.46）
贝伐珠单抗	复发性卵巢癌*	FDA 批准	高	/	51（7.75）
	复发性子宫内膜癌	① NCCN 指南 2A 类[11]；② CSCO 指南Ⅲ级推荐[12]	中	一般	19（2.89）
安罗替尼	卵巢癌后线治疗	参考文献[20]	低	差	20（3.04）
	复发或转移性宫颈癌	《安罗替尼超说明书用药专家共识》[21]	低	差	13（1.98）
阿帕替尼	卵巢癌后线治疗	CSCO 指南Ⅱ级推荐[16]	中	差	5（0.76）
仑伐替尼	晚期子宫内膜癌	FDA 批准	高	/	4（0.61）
顺铂	腹腔灌注	① NCCN 指南 2A[15]；② CSCO 指南Ⅰ级[16]	高	一般	18（2.74）
贝伐珠单抗	腹腔灌注	《妇科肿瘤抗血管内皮生长因子单克隆抗体临床应用指南》[22]	低	一般	6（0.91）
重组人血管内皮抑制素	腹腔灌注	《重组人血管内皮抑制素治疗恶性浆膜腔积液临床应用专家共识》[23]	低	一般	9（1.37）

注（Note）：PMDA. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（日本药品和医疗器械管理局）；FDA. Food and Drug Administration（美国食品药品监督管理局）；*超说明书用药已收录于广东省药学会发布的《超药品说明书用药目录（2023 年版）》（PMDA refers to Pharmaceuticals and Medical Devices Agency，FDA refers to Food and Drug Administration；Off-label drug use remarked with "*" has been included in the "Off-label Drug Use Catalog（2023 edition）" issued by Guangdong Pharmaceutical Society）。

$P = 0.281$），但具有更长的无进展生存期（PFS）（not reached *vs* 5.2 个月，$P = 0.034$）。与腺癌患者相比，鳞状细胞癌患者具有更高的 ORR（77.8% *vs* 28.6%，$P = 0.002$）和延长的 PFS（not reached *vs* 4.0 个月，$P = 0.008$）[17]。因此，低证据等级级别下的超说明书用药，优势人群的筛查对于提高疗效和合理性至关重要。

3.3 抗肿瘤药物超说明书用药的管理

为了保障患者用药安全，规范抗肿瘤药物的使用，医院应制订符合本院实际情况的超药品说明书用药制度：

① 超说明书审批上，我院由临床提出超说明书用药申请，临床药师进行超说明书类型及循证评价，经药事管理与药物治疗学委员会及伦理委员会共同批准的用药方案可纳入超药品说明书目录，并在医务处和药学部备案。② 超说明书用药应用时，临床医师在用药前需向患者充分说明和告知用药方案及可能的获益和风险，并取得书面同意。超说明书用药过程中密切监测患者情况，发生不良反应及时上报并分析追踪，避免不良反应重复发生。超说明书用药后的有效性，临床同样需要进行评估并记录。③ 超说明书用药管理持续改进上，我院药学部定期进行超说明书用

药的处方和医嘱点评，特别是证据级别低、弱推荐的超说明书用药。对于不合理的超说明书用药进行临床告知及通报。并且，药学部定期梳理超说明书用药的不良反应并集中上报。面对肿瘤治疗的复杂性和不断更新的治疗方案，临床药师应注意收集最新的循证证据，提升自身的专业素养，为临床提供超说明书用药的建议。医院层面，抗肿瘤药物管理小组应定期召开小组会对超说明书用药安全性及有效性进行评估。对于疗效不佳或发生严重不良反应的超说明书用药不再纳入超说明书用药目录。

4 结论

本研究反映了妇科抗肿瘤药物超说明书用药的现状，参考依据涉及国内外药品说明书、指南、诊疗规范等循证医学证据，适用广泛且版本较新，可反映最新的研究成果，可作为妇科抗肿瘤超说明书用药参考。局限性方面，本研究仅分析了一家医院的数据，缺乏广泛代表性。下一步可收集多家医疗机构的数据，为临床决策提供更全面、更可靠的依据。

本研究发现妇科抗肿瘤药物超说明书用药情况普遍，妇科抗肿瘤药物超说明书均有明确的循证医学证据，但证据强度级别不一，其评价标准可为医疗机构超说明书用药的管理提供参考，从而规范超说明书用药的使用，提高合理性和安全性。

参考文献

[1] Aronson JK，Ferner RE. Unlicensed and off-label uses of medicines：definitions and clarification of terminology [J]. Br J Clin Pharmacol，2017，83（12）：2615-2625.

[2] 郑荣寿，陈茹，韩冰峰，等 . 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志，2024，46（3）：221-231.

[3] 夏玲芳，朱俊，吴小华 . 2023 年 ESMO妇科肿瘤治疗最新进展及展望 [J]. 中国癌症杂志，2023，33（11）：969-980.

[4] Herrero M，Molina VR，Arroyo YM，et al. The off-label use of antineoplastics in oncology is limited but has notable scientific support in a university hospital setting [J]. Front Pharmacol，2019，10：1210.

[5] 田云，尤海生，曹舫 . 两家住院患者抗肿瘤药物超说明书使用分析 [J]. 中国药师，2019，22（6）：1102-1105.

[6] 邱凯锋，何志超，陈泽鹏，等 .《超说明书用药循证评价规范》团体标准解读 [J]. 今日药学，2021，31（11）：811-814.

[7] 左玮，刘容吉，孙雅佳，等 .《中国超药品说明书用药管理指南（2021）》推荐意见及要点解读 [J]. 协和医学杂志，2023，14（1）：86-93.

[8] 李兴德，赵玉林，包金颖，等 . 云南省医疗机构超药品说明书适应证用药专家共识 [J]. 医药导报，2023，42（9）：1265-1269.

[9] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Cervical Cancer [EB/OL].（2024-02-23）[2024-03-12]. https：//www. nccn. org/professionals/physician_gls/pdf/cervical. pdf.

[10] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 宫颈癌诊疗指南 2023 [M]. 北京：人民卫生出版社，2023.

[11] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Treatment of Uterine Neoplasms [EB/OL].（2024-03-06）[2024-03-12]. https：//www. nccn. org/professionals/physician_gls/pdf/uterine. pdf.

[12] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 子宫内膜癌诊疗指南 2023 [M]. 北京：人民卫生出版社，2023.

[13] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会 . 卵巢恶性肿瘤诊断与治疗指南（2021 年版）[J]. 中国癌症杂志，2021，31（6）：490-500.

[14] 中华医学会妇科肿瘤学分会 . 妇科肿瘤铂类药物临床应用指南 [J]. 协和医学杂志，2021，12（6）：881-901.

[15] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Treatment of Ovarian Cancer/Fallopian Tube Cancer/Primary Peritoneal Cancer [EB/OL].（2024-01-17）[2024-03-12]. https：//www. nccn. org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian. pdf.

[16] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 卵巢癌诊疗指南 2023 [M]. 北京：人民卫生出版社，2023.

[17] 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）：4095-4106.

[18] Xu Q，Wang J，Sun Y，et al. Efficacy and safety of sintilimab plus anlotinib for PD-L1-positive recurrent or metastatic cervical cancer：a multicenter，single-arm，prospective phase Ⅱ trial [J]. J Clin Oncol，2022，40（16）：1795-1805.

[19] Wei W，Ban XH，Yang F，et al. phase Ⅱ trial of efficacy，safety and biomarker analysis of sintilimab plus anlotinib for patients with recurrent or advanced endometrial cancer [J]. J Immunother Cancer，2022，10（5）：e004338.

[20] Liu GC，Feng YL，Li J，et al. A novel combination of niraparib and anlotinib in platinum-resistant ovarian cancer：efficacy and safety results from the phase Ⅱ，multi-center ANNIE study [J]. EClinicalMedicine，2022，54：101767.

[21] 葛明华，黄萍，卢丽琴，等 . 安罗替尼超说明书用药专家共识 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（24）：3102-3107.

[22] 李晓，姜洁，尹如铁，等 . 妇科肿瘤抗血管内皮生长因子单克隆抗体临床应用指南 [J]. 中国医学前沿杂志（电子版），2020，12（1）：27-34.

[23] 秦叔逵，李进，韩宝惠，等 . 重组人血管内皮抑制素治疗恶性浆膜腔积液临床应用专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志，2020，25（9）：849-856.

[24] 李伟，郑丽丽，罗晓红 . 临床药师干预妇产科超说明书用药实践 [J]. 医药导报，2021，40（10）：1435-1438.

[25] 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.

[26] 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.

[27] 孙艳艳，孙一鸣，夏一淼，等 . 某院卡瑞利珠单抗应用的合理性与安全性分析 [J]. 中南药学，2023，21（10）：2761-2765.

[28] 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.

（收稿日期：2024-03-13；修回日期：2024-04-17）

奥美拉唑原研组和带量采购组在幽门螺杆菌感染根治中疗效、安全性及经济性分析

钱巧[1, 2]，张宁[1]，朱恒波[3]，方丹君[2*]（1. 南京医科大学第四附属医院药剂科，南京　210031；2. 南京医科大学药学院，南京　211166；3. 南京医科大学第四附属医院消化内科，南京　210031）

摘要：目的　评价带量采购奥美拉唑在幽门螺杆菌感染根治中的有效性、安全性以及经济性。**方法**　通过询问患者信息和 HIS 系统查找相结合的方式收集临床资料及数据，收集 2022 年 1 月至 2023 年 6 月在我院行碳 13 检查阳性且首次进行幽门螺杆菌治疗的患者，分为带量采购组和原研组，比较两组经过 14 d 治疗后的疗效。**结果**　共收集 316 例患者，带量采购组和原研组各 158 例，经过 14 d 的规范化治疗后，带量采购组的根除率是 88.61%，原研组的根除率是 93.04%，两组间的根除率差异无统计学意义。带量采购组不良反应发生 11 例，原研组不良反应发生 9 例，两组间的不良反应发生率差异无统计学意义。带量采购组治疗费用为 441.65 元，原研组治疗费用为 535.87 元，最小成本分析结果显示带量采购组的治疗费用低于原研组。**结论**　带量采购组与原研组在有效性与安全性方面差异无统计学意义，但带量采购组治疗成本低，性价比高。

关键词：带量采购；奥美拉唑；幽门螺杆菌
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-3091-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.042

Efficacy, safety and economic analysis of omeprazole original drug and the volume-based procurement drug in the eradication of *Helicobacter pylori* infection

QIAN Qiao[1, 2], ZHANG Ning[1], ZHU Heng-bo[3], FANG Dan-jun[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210031; 2. *College of Pharmacy*, *Nanjing Medical University*, *Nanjing* 211166; 3. *Department of Gastroenterology*, *The Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210031)

Abstract: Objective　To evaluate the efficacy, safety, and economics of volume-based procurement of omeprazole in the eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Methods**　Clinical information and patients' data were collected from the hospital information system. Patients who underwent Carbon 13 test with positive results and received *Helicobacter pylori* treatment for the first time in our hospital from January 2022 to June 2023 were divided into a volume-based procurement group and an original group. The efficacy of treatment after 14 days was compared between both groups. **Results**　Totally 316 patients were collected, 158 in the volume-based procurement group and 158 in the original group. After 14 days of standardised treatment, the eradication rate was 88.61% in the volume-based procurement group and 93.04% in the original group, without significant difference between both groups. There were 11 cases of adverse reactions in the volume-based procurement group and 9 in the original group, and the difference in the incidence of adverse reactions between both groups was not statistically significant. The cost of treatment in the volume-based procurement group was 441.65 yuan and that in the original group was 535.87 yuan, obviously higher in the original group. **Conclusion**　There is no significant difference between the volume-based procurement group and the original group in terms of effectiveness

基金项目：江苏省药学会 - 奥赛康医院药学科研基金（No. A202112）。
作者简介：钱巧，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：605382857@qq.com　*通信作者：方丹君，女，教授，博士研究生导师，主要从事临床药学研究，email：djf@njmu.edu.cn

and safety, but the former had low treatment costs and is cost-effective.

Key words: volume-based procurement; omeprazole; *Helicobacter pylori*

幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，Hp）感染会对人体健康造成破坏，除了会引发胃炎、胃溃疡、胃癌等疾病，同时也是心血管疾病、神经疾病、肝胆疾病及口腔疾病的部分病因[1]。幽门螺杆菌感染率在儿童时期较高，中国地区感染率高达57.6%～63.4%。然而，幽门螺杆菌感染难以自行清除，根除治疗被认为是最有效的方法[2]。但现今全球范围内幽门螺杆菌耐药问题日益严重[3]，导致标准三联疗法的根除率下降至80%以下，其中抗菌药物耐药尤为突出。面对这一挑战，在我国含铋的四联疗法作为根除治疗的主要方案备受推崇[4]。质子泵抑制剂（PPI）的使用在根除治疗中起着关键作用[5]，其通过抑制幽门螺杆菌的尿素酶活性和提高胃内pH水平，增强了抗菌药物的杀菌效果[6]。为贯彻落实国家文件精神[7]，在江苏省第三批的4＋7带量采购中，奥美拉唑被纳入采购范围，引发了有关低价药品疗效和质量的讨论。这促使对带量采购奥美拉唑与原研奥美拉唑在幽门螺杆菌感染治疗中的临床疗效、不良反应发生率和药物经济学等方面进行比较的实验研究刻不容缓。本研究纳入符合条件的幽门螺杆菌感染患者，根据使用的奥美拉唑，将其分为带量采购组和原研组，并接受相应的根除治疗方案。在治疗过程中，我们将监测两组患者的临床疗效、不良反应发生情况以及治疗成本等指标，并对结果进行统计学分析，并对其最终治疗效果得出实践结论。这将有助于医务人员在临床实践中选择更合适的药物治疗幽门螺杆菌感染，提高治疗效果，减少不良反应的发生，并优化医疗资源的利用。同时，本研究也将为未来类似研究提供参考，推动相关领域的进一步发展。

1 资料与方法

1.1 资料来源

通过询问患者信息和HIS系统查找相结合的方式收集临床资料及数据，回顾性地将2022年1月至2023年6月在南京医科大学第四附属医院胃镜室行^{13}C-尿素呼气试验阳性的患者作为研究对象。本研究已通过伦理委员会批准（批件号：20211220-K033）。纳入标准：年龄＞18岁；首次行^{13}C-尿素呼气试验结果显示幽门螺杆菌为阳性；近一个月内未服用抗菌药物、铋剂、质子泵抑制剂和某些具有抗菌作用的中药；无青霉素及其他药物过敏史；自愿接受幽门螺杆菌根除治疗。

排除标准：疗程结束后未复诊的；既往根除过幽门螺杆菌；近一个月内服用过抗菌药物、铋剂、质子泵抑制剂和某些具有抗菌作用的中药；对相关药物过敏；合并有心、肝、肾、肺等恶性疾病；妊娠或哺乳期；有其他危重疾病或并发症。

根据四联方案中奥美拉唑生产厂家（生产厂家已做去敏感化处理）的不同，将最终纳入的病例分为带量采购组和原研组，详细药品信息见表1。

表1 两组治疗方案药品信息

Tab 1 Drug information between both groups

组别	药品名称	厂家	规格	批准文号	价格/元	用法
带量采购组	奥美拉唑肠溶胶囊	山东A公司	20 mg×28粒	H20033444	8.19	20 mg，1次·d^{-1}
	阿莫西林胶囊	浙江C公司	0.25 g×24粒	H33021381	1.90	1.0 g，2次·d^{-1}
	克拉霉素片	上海D公司	0.25 g×8片	H20073784	2.55	0.5 g，2次·d^{-1}
	胶体果胶铋颗粒	山西E公司	0.15 g×28袋	H20052560	41.78	0.15 g，4次·d^{-1}
原研组	奥美拉唑肠溶胶囊	英国B公司	20 mg×7粒	H20046379	51.93	20 mg，1次·d^{-1}
	阿莫西林胶囊	浙江C公司	0.25 g×24粒	H33021381	1.90	1.0 g，2次·d^{-1}
	克拉霉素片	上海D公司	0.25 g×8片	H20073784	2.55	0.5 g，2次·d^{-1}
	胶体果胶铋颗粒	山西E公司	0.15 g×28袋	H20052560	41.78	0.15 g，4次·d^{-1}

1.2 仪器与试剂

碳13呼气检测仪型号:HY-IREXBplus;尿素[^{13}C]呼气试验诊断试剂盒（国药准字H20061169），以及配套的集气袋。当检测值≥4.0时，可判定受试者为幽门螺杆菌阳性。

1.3 评价指标

疗效与安全性指标：幽门螺杆菌感染根除治疗完成后4周复查^{13}C-尿素呼气试验，如^{13}C-尿素呼气试验阴性即为幽门螺杆菌根除成功；阳性即为根除失败。收集治疗过程中出现的药品不良反应，作为安全性评价指标。比较两组之间的根除率和不良反应发生率。

药物经济学指标：计算患者在治疗期间的直接医疗成本，其中包括挂号费、碳 13 呼气检测费和药品费用。根据 2023 年江苏省阳光采购平台上的药品价格计算患者药品费用成本。根据疗效评价结果选择适当的药物经济学方法，对带量采购组与原研组的疗效差异进行统计学分析，进而进行成本效果分析，以计算增量成本效果比判断方案的经济性。若两组疗效差异无统计学意义，则采用最小成本分析法评估，选取成本最低的方案作为最优选择[8]。此外，敏感性分析考虑药品价格波动情况，假设其余价格不变，药品价格可上下浮动 ±15%。通过这些步骤，可以从药物经济学的角度全面评估治疗方案的经济效益，为合理的治疗选择提供支持。

1.4　统计方法

采用 SPSS 27.0 软件进行统计学处理，对于计量资料，若符合正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验；若不符合正态分布，则采用中位数和四分位数间距描述，组间比较采用秩和检验。计数资料用（%）表示，采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法，分析各组之间是否存在差异，如 $P < 0.05$ 则表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　患者的一般资料

本次研究共纳入 316 名患者，分成带量采购组和原研组各 158 例，其中带量采购组男性 69 例，女性 89 例，平均年龄在（38.47±11.41）岁；原研组男性 72 例，女性 86 例，平均年龄在（39.60±11.33）岁，两组在性别、年龄、是否有症状、是否合并疾病等差异无统计学意义，具体情况见表 2。

表 2　两组患者的一般资料

Tab 2　General information between both groups

组别	带量采购组（n = 158）	原研组（n = 158）	P
年龄 / 岁	38.47±11.41	39.60±11.33	0.362
性别 [n（%）]			0.821
男	69（43.67）	72（45.57）	
女	89（56.33）	86（54.43）	
症状 [n（%）]			0.228
有	30（18.98）	24（15.19）	
无	128（81.02）	134（84.81）	
合并疾病 [n（%）]			0.375
有	4（2.53）	6（3.78）	
无	154（97.47）	152（96.22）	

2.2　根除成功率与不良反应发生率

经过 14 d 治疗后带量采购组复查阴性有 140 例，根除成功率为 88.61%，原研组复查阴性的有 147 例，根除成功率为 93.04%，原研组根除率高于带量采购组，但两组间的差异无统计学意义；带量采购组 11 例出现不良反应，原研组 9 例出现不良反应，均为轻度不良反应，患者能耐受，且两组间的不良反应发生率差异无统计学意义，具体情况见表 3。

表 3　两组 Hp 根除率与不良反应发生率对比 [n(%)]

Tab 3　Hp eradication rate and incidence of adverse reactions between both groups [n(%)]

研究结局	带量采购组	原研组	χ^2	P
有效性指标			1.270	0.260
碳 13 复查阴性 / 例	140（88.61）	147（93.04）		
不良反应指标	11（6.97）	9（5.70）	0.214	0.644
头痛	2（1.27）	3（1.90）		
腹痛	4（2.53）	3（1.90）		
恶心 / 呕吐	2（1.27）	1（0.63）		
便秘	3（1.90）	2（1.27）		

2.3　药物经济学比较

由表 3 可知，两组在疗效和安全性方面相当，故采用最小成本分析法进行比较。如表 4 所示，将两组患者的直接医疗成本进行比较，带量采购组低于原研组，故带量采购组经济性更好。

表 4　两组患者成本比较 (元)

Tab 4　Costs between both groups (yuan)

组别	药品费用	碳 13 检测费用	挂号费	总费用
带量采购组	117.65	300	24	441.65
原研组	211.87	300	24	535.87

2.4　敏感度分析

随着国家医药体制改革，药品价格的不断变化对医疗费用产生了直接的影响。在假定检查成本不变的情况下，对带量采购组和原研组进行波动范围为 ±15% 的药品价格敏感度比较。结果显示，带量采购组在药品费用方面表现出更好的稳定性，总费用范围仅为 424.00 元到 459.30 元，而原研组总费用范围为 504.09 元到 567.65 元。这暗示着带量采购组在药品价格波动下能够更好地控制成本，显示出其采购模式和管理策略的有效性。同时，碳 13 呼气检测费用和挂号费保持稳定，对总费用的影响较小。因此，综合考虑这些因素，带量采购组相对于原研组具有更强的成本优势和稳定性，这进一步展示了医药体制改革的显著成果和为患者提供更可靠、经济实惠的医疗服务的目标，结果见表 5。

表 5　两组敏感度分析 (元)

Tab 5　Sensitivity analysis between both groups (yuan)

组别	药品费用	碳 13 检测费用	挂号费	总费用
带量采购组 ×85%	100.00	300.00	24.00	424.00
原研组 ×85%	180.09	300.00	24.00	504.09
带量采购组 ×115%	135.30	300.00	24.00	459.30
原研组 ×115%	243.65	300.00	24.00	567.65

3 讨论

自 1988 年上市以来，奥美拉唑成为主要治疗酸相关疾病的药物，其广泛运用于治疗消化道疾病，包括胃溃疡、十二指肠溃疡、胃食管反流和卓艾综合征。其抑酸机制主要基于结构中含有的苯并咪唑母核，这种结构能在胃黏膜壁细胞上转化为次磺酰胺衍生物，该衍生物通过与 H^+，K^+-ATP 酶 α- 亚基上的半胱氨酸残基结合形成二硫共价键，阻断胃酸分泌的最终环节，从而不可逆地抑制胃酸分泌 [9]。

研究表明，幽门螺杆菌在胃内 pH 值为 6 ～ 7 的时候最活跃，对抗菌药物的敏感性最强。因此通过奥美拉唑的抑酸机制，可以将胃内 pH 值保持在 6 以上，达到最有效的根除效果。作为根治幽门螺杆菌必不可少的药物，奥美拉唑在执行带量采购前每年都需要耗费巨大资金。然而，自执行带量采购后，原研奥美拉唑的价格有所下降。根据表 1，集采后的奥美拉唑价格仅为原始研发价格的 3.94%，这显著降低了治疗费用。

本研究剔除不符合条件人群后共纳入 316 例患者，其中主要以中青年健康体检为主。随着互联网医药科普的普及，人们对幽门螺杆菌的关注度越来越高。许多医院将幽门螺杆菌感染检测纳入体检的常规项目之中。在这项研究中，具有症状的患者在带量采购组和原研组中分别占比为 18.98% 和 15.19%。这些症状主要包括腹胀、腹痛、嗳气和口臭等，这是由于幽门螺杆菌侵袭胃黏膜，释放其代谢产物和蛋白溶解酶等炎症因子，从而激发免疫反应，导致胃炎和消化不良症状的发生。

本次研究的对象中合并有高血压、高血脂和糖尿病等慢性疾病的人较少，带量采购组中合并高血压、高血脂各 2 例；原研组中合并高血压、高血脂和高血糖各 2 例，均接受正规治疗，未见明显不适。研究表明，幽门螺杆菌感染与高血压、高血脂和糖尿病等慢性病之间存在关联。研究显示，糖尿病组幽门螺杆菌的患病率（54.9%）显著高于非糖尿病组（47.5%）（$OR=1.69$，$P<0.001$），且高血压与幽门螺杆菌感染之间也存在显著正相关 [10-11]。另有研究表明，幽门螺杆菌感染是三酰甘油升高的独立危险因素，且会影响脂质代谢 [12]。因此，综合以上研究结果，奥美拉唑作为一种重要的药物，在治疗消化道疾病和根除幽门螺杆菌感染中发挥着重要作用。执行带量采购政策有助于降低治疗费用，同时，研究还强调了幽门螺杆菌感染与慢疾病之间的潜在关联，为进一步的临床实践提供了重要参考。

老百姓普遍认为国产药品不如进口药品，而国家选择带量采购的仿制药是经过质量和疗效一致性检验的。在质量一致性评价方面考虑肠溶胶囊的特殊性，刘曼等 [13] 针对纳入一致性评价的奥美拉唑肠溶制剂的七个品种（包含本次研究的品种）进行生物等效性的分析，利用已知的生物等效性数据估算个体内变异系数（CV%），说明试验数据可信且七个品种在空腹和高脂饮食条件下均等效。在疗效一致性评价方面，本次研究对带量采购奥美拉唑与原研药在疗效、安全性与效果 / 成本等方面进行了比较，根除成功率方面，带量采购组为 88.61%，原研组为 93.04%，两组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。按照 Graham 疗效分级，带量采购组为 C 级，原研组为 B 级，均符合指南四联方案推荐的疗效评级。在安全性方面，奥美拉唑主要不良反应包括腹痛、腹胀、恶心 / 呕吐和腹泻，两组患者在 14 d 治疗中主要出现胃肠道反应，其中腹痛发生率分别为 2.53% 和 1.90%，不良反应发生率差异无统计学意义。研究期间两组患者的不良反应均属于一般程度，在安全性方面两组无显著差异。药品的成本直接影响患者的治疗依从性，而依从性又与治疗效果密切相关，研究发现依从性好是根除幽门杆菌感染的保护性因素 [14]。因此，在幽门螺杆菌治疗方案的选择中，需要综合考虑经济性以确保合理用药 [15]。基于疗效和不良反应率相当的情况下，采用最小成本分析法比较两组，结果显示带量采购组的花费更低、更有利于患者，具有更高的经济学价值。然而，这项研究存在样本量有限、观察时间短暂，并且仅集中在奥美拉唑对幽门螺杆菌的疗效分析上。未来的研究可以扩大范围，对奥美拉唑在治疗其他酸相关疾病时的疗效一致性进行深入分析，以验证结果的外推性。

综上所述，虽然该研究初步支持了带量采购的仿制药在特定条件下与原研药的一致性，但其局限性需要更广泛和深入的研究来加以验证。通过进一步扩展研究范围、增加样本数量、延长观察时间等方法，可以更全面地评估仿制药的疗效一致性和经济性，为临床实践提供更为可靠的依据。

本研究证实，在幽门螺杆菌的根除过程中，带量采购奥美拉唑与原研药在疗效与安全性方面没有显著差异，在经济性方面带量采购组更有优势。带量采购通过以价换量，由国家直接拟定供应厂家，减少药品流通的中间环节，节省交易成

本，切实降低药价，降低老百姓的医疗费用。随着国家带量采购的一批批进行，会有更多的品种进入采购目录，医疗机构需加大宣传力度，重视对带量采购药品的知识普及；针对患者和医师对于带量采购药品的质疑，作为药师，需要发挥主观能动性，加强自身专业素质的培训，能够从专业药学角度进行讲解，打消他们对带量采购药品的疑虑。国家鼓励积极开展药学咨询、药学门诊等药学服务加强对中选品种的合理使用，通过处方医嘱审核点评、药学查房、药学监护等方式与临床实时沟通，收集药品不良反应及反馈意见，整合数据，为临床合理用药提供支持。

参考文献

[1] Ansari S，Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory [J]. Helicobacter，2017，doi：10.1111/hel.12386.

[2] 刘文忠 . “幽门螺杆菌胃炎京都全球共识” 解读 [J]. 胃肠病学，2015，20（8）：449-454.

[3] Zhou JJ，Shi X，Zheng SP，et al. Efficacy of bismuth-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection based on previous antibiotic exposure：a large-scale prospective，single-center clinical trial in China [J]. Helicobacter，2020，25：e12755.

[4] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组 . 2022 中国幽门螺杆菌感染治疗指南 [J]. 中华消化杂志，2022，42（11）：745-756.

[5] 于泉，蔡照华，刘洁 . 质子泵抑制剂在幽门螺杆菌感染根除疗法中的作用研究 [J]. 实用药物与临床，2020，23（11）：981-984.

[6] 周雪亮，周渊，朱强，等 . 幽门螺旋杆菌的研究进展 [J]. 中国继续医学教育，2018，10（33）：101-104.

[7] 国务院办公厅 . 国务院办公厅关于印发国家组织药品集中采购和使用试点方案的通知 [EB/OL].（2019-01-17）[2019-03-24]. http：//www. nhsa. gov. cn/art/2019/1/17/ art-37-482. html.

[8] 中国药学会 . 中国药物经济学评价指南 2020. Available at：https：//www. cpa. org. cn/cpadmn/attached/file/20201203/16069773 80634185. pdf.

[9] 林晓冬，韩娟，马玉奎，等 . 质子泵抑制剂的药理毒理作用研究进展 [J]. 医学综述，2021，27（15）：3061-3066.

[10] Li JZ，Li JY，Wu TF，et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with type 2 diabetes，not type 1 diabetes：an updated metaanalysis [J]. Gastroenterol Res Pract，2017，2017：5715403.

[11] Yue L，Zhang R，Chen S，et al. Relationship between *Helicobacter pylori* and incident hypertension as well as blood pressure：a systematic review and meta-analysis [J]. Dig Dis，2023，41（1）：124-137.

[12] 古再丽阿依·阿不力孜 . 幽门螺杆菌感染与血脂、颈部血管斑块形成的关系 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2018.

[13] 刘曼，刘会臣 . 对国内奥美拉唑肠溶制剂生物等效性试验的分析 [J]. 中国新药杂志，2023，32（6）：605-609.

[14] 樊彦卿 . 幽门螺杆菌根除失败的相关因素分析 [D]. 张家口：河北北方学院，2021.

[15] 黄元龙，左后东，毛本红，等 . 伏诺拉生与阿莫西林二联方案根除幽门螺杆菌的真实世界研究 [J]. 中国药房，2023，34（22）：2775-2779.

（收稿日期：2024-03-02；修回日期：2024-06-18）

多黏菌素 B 相关急性肾损伤的危险因素分析

王清[1, 2]，李颖[1, 2]，唐甜甜[1, 2]，颜晗[1, 2]，蔡骅琳[1, 2]，向大雄[1, 2]，张毕奎[1, 2]，周艳钢[1, 2*]，徐萍[1, 2*]
（1. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；2. 中南大学临床药学研究所，长沙 410011）

摘要：目的 探讨多黏菌素 B 相关急性肾损伤（AKI）的危险因素，为多黏菌素 B 的安全应用提供参考。**方法** 收集 2017 年 12 月至 2022 年 4 月住院患者中静脉用多黏菌素 B 治疗≥ 3 d 的病例，采用 RIFLE 标准判断 AKI 及严重程度分级，Logistic 回归分析多黏菌素 B 相关 AKI 的危险因素。**结果** 研究期间共纳入 441 例患者，其中，111 例（25.2%）患者发生 AKI，67 例（60.4%）为危险分级，28 例（25.2%）为损伤分级，16 例（14.4%）为衰竭分级。合并慢性肾病（*OR* 2.13，95%*CI* 1.16 ～ 3.90，$P = 0.014$）、合用血管活性药物（*OR* 2.59，95%*CI* 1.59 ～ 4.20，$P < 0.001$）或替加环素（*OR* 2.02，95%*CI* 1.26 ～ 3.25，$P = 0.004$）与 AKI 的发生显著相关。多黏菌素 B 血药浓度指标中，仅 C_{min} 是 AKI 发生的独立危险因素（*OR* 2.09，95%*CI* 1.38 ～ 3.19，$P = 0.001$），当 $C_{min} \geq 4.07\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时，AKI 发生的预测概率＞ 50%。**结论** 合并慢性肾病、合用血管活性药物或替加环素、多黏菌素 B 的 C_{min} 与 AKI 发生密切相关。多黏菌素 B 的 C_{min} 对其相关 AKI 具有较好的预测价值，阈值为 $4.07\ \mu g \cdot mL^{-1}$。

关键词：多黏菌素 B；急性肾损伤；危险因素；谷浓度
中图分类号：R969 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3096-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.043

Risk factors for polymyxin B related acute kidney injury

WANG Qing[1, 2], LI Ying[1, 2], TANG Tian-tian[1, 2], YAN Han[1, 2], CAI Hua-lin[1, 2], XIANG Da-xiong[1, 2], ZHANG Bi-kui[1, 2], ZHOU Yan-gang[1, 2*], XU Ping[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011; 2. *Institute of Clinical Pharmacy*, *Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective To determine the risk factors of polymyxin B related acute kidney injury (AKI). **Methods** Patients receiving ≥ 3 days of polymyxin B treatment from December 2017 to April 2022 were included. AKI and AKI severity were evaluated with RIFLE criteria. Logistic regression analysis was performed to identify the risk factors of polymyxin B related AKI. **Results** Totally 441 patients were included. Among them, 111 patients (25.2%) developed AKI, 67 (60.4%) patients were classified as having risks, 28 (25.2%) injury and 16 (14.4%) failure. The co-morbidity of chronic renal disease (*OR* 2.13, 95%*CI* 1.16 ～ 3.90, $P = 0.014$), combination with vasoactive agents (*OR* 2.59, 95%*CI* 1.59 ～ 4.20, $P < 0.001$), and tigecycline (*OR* 2.02, 95%*CI* 1.26 ～ 3.25, $P = 0.004$) was obviously related with AKI. C_{min} was the independent risk factor of AKI among exposure indicators (*OR* 2.09, 95%*CI* 1.38 ～ 3.19, $P = 0.001$). The estimated probability of AKI was higher than 50% when C_{min} was higher than $4.07\ \mu g \cdot mL^{-1}$. **Conclusion** Co-morbidity of chronic renal disease, combination with vasoactive agents or tigecycline, C_{min} of polymyxin B are closely related to polymyxin B induced AKI. C_{min} has good predictive value, with the threshold of $4.07\ \mu g \cdot mL^{-1}$.

Key words: polymyxin B; acute kidney injury; risk factor; trough concentration

作者简介：王清，女，硕士，主要从事临床药学工作，email：wangqing940317@csu.edu.cn *通信作者：周艳钢，女，副教授，副主任药师，主要从事临床药学研究，email：zhouyangang@csu.edu.cn；徐萍，女，教授，主任药师，主要从事临床药学与临床药理学研究，email：xuping1109@csu.edu.cn

近年来，多重耐药革兰氏阴性菌尤其是碳青霉烯类耐药菌引起的感染持续增多[1]。由于这些“超级细菌”对大多数抗菌药物耐药，治疗选择有限，多黏菌素类药物（包括多黏菌素 B 和多黏菌素 E）成为最后的选择之一被重新应用于临床[1-2]。尽管多黏菌素类药物对多重耐药革兰氏阴性菌具有很强的抗菌活性，但其肾毒性亦不容忽视，是限制其临床应用的重要因素[3]。多黏菌素类药物引起急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）的机制为药物经肾小球滤过后由 Megalin 内吞受体介导重吸收进入肾小管细胞从而导致肾损伤[4-5]，硫酸多黏菌素 B 主要经非肾途径清除，与前药甲磺酸多黏菌素 E（CMS）相比肾毒性较小[6-10]，因此更被推荐用于治疗侵袭性多重耐药革兰氏阴性菌感染[11]。

研究表明，不同患者群体中多黏菌素 B 相关 AKI 的发生率差异较大（25.9% ～ 60.0%）[6，12-18]，已报道的危险因素包括高剂量、高龄（≥ 60 岁）、男性、高体重、高基线血清肌酐值、合用其他肾毒性药物（如万古霉素、利尿剂等）、合并脓毒性休克、糖尿病等[15-17，19]，其中，多黏菌素 B 剂量被认为是最重要的危险因素[20]。然而，既往研究并未寻找到多黏菌素 B 剂量与 AKI 之间较为明确的毒量关系[15-16，18-21]：一方面，可能是由于不同患者群体对药物毒性反应的敏感性不同；另一方面，由于多黏菌素 B 在不同患者尤其是重症患者中的药动学参数个体差异大，给药剂量可能无法完全反映患者体内的药物暴露量。近年来，随着多黏菌素类药物治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM）的开展，研究发现多黏菌素 B 药物浓度 [谷浓度（C_{min}）、峰浓度（C_{max}）、24 h 内稳态血药浓度 - 时间曲线下面积（$AUC_{ss，24\,h}$）] 与 AKI 存在明显相关性[12-14，18]，但由于不同研究中患者的疾病生理状态及 AKI 定义不同，导致其结果相差较大，主要体现为最终确定的多黏菌素 B 相关 AKI 预测指标及阈值（如 C_{min} 阈值为 3.13 μg • mL^{-1} 或 2.23 μg • mL^{-1}）均有所不同。上述结果提示，患者的病理生理特征及药物浓度都可能与多黏菌素 B 相关 AKI 的发生风险相关，在寻找危险因素及毒 - 量关系时应综合考虑患者病理生理情况及药物体内暴露量。由于既往研究大多单独考察患者病理生理特征或药物浓度对 AKI 的影响，因此，本研究将综合分析患者临床特征、多黏菌素 B 血药浓度对 AKI 的影响，明确多黏菌素 B 相关 AKI 的浓度阈值，以期为多黏菌素 B 的安全应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料收集

本研究已获得中南大学湘雅二医院伦理委员会批准（No. ChiCTR1900022231）。收集 2017 年 12 月至 2022 年 4 月期间入住中南大学湘雅二医院，年龄≥ 18 岁且接受静脉滴注多黏菌素 B 治疗≥ 3 d 的患者。符合以下任一标准的患者均被排除：实体器官移植；在多黏菌素 B 治疗前接受持续性肾脏替代治疗（continuous renal replacement therapy，CRRT）、血液透析或血液滤过；重要临床资料缺乏（如肾功能等）。

所有临床资料从电子病历系统中提取，收集的资料包括人口学资料（性别、年龄、体重）、住院时长、用药科室、急性生理与慢性健康评分（acute physiology and chronic health evaluation Ⅱ，APACHE Ⅱ）、呼吸支持治疗、并发症、感染部位、病原微生物、多黏菌素 B 给药方案、给药时间、合用肾毒性药物、肾功能指标（基线、治疗过程中及治疗结束后）等。

1.2 多黏菌素 B 给药方案及药物浓度测定

所有患者参照多黏菌素 B 药品说明书（50 ～ 100 mg • d^{-1}，分两次给药）或指南（负荷剂量为 2.0 ～ 2.5 mg • kg^{-1}，维持剂量 1.25 ～ 1.5 mg • kg^{-1}，q12h）进行给药[20]。患者接受静脉滴注多黏菌素 B 治疗 3 d 后，于给药前 30 min（C_{min}）、给药结束后 5 min（C_{max}）、给药结束后 2 h（$C_{2\,h}$）取外周血 2 mL，3400 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液于－ 80 ℃保存。通过高效液相色谱 - 串联质谱（HPLC-MS/MS）检测多黏菌素 B 主要成分 B1 及 B2 的药物浓度[22]。多黏菌素 B 总浓度按以下公式计算：

$$C_B = (C_{B1}/M_{B1} + C_{B2}/M_{B2}) \times M_B$$

式中，C 代表浓度，M 代表摩尔质量。

通过梯形法计算给药间隔的药时曲线下面积（$AUC_{ss，12\,h}$）[23-24]，$AUC_{ss，12\,h}$ 乘以 2 即得到 $AUC_{ss，24\,h}$。$AUC_{ss，24\,h}$ 除以 24 h 即为平均稳态药物浓度（$C_{ss，avg}$）。

1.3 AKI 及其严重程度评估

本研究根据 RIFLE 标准评估 AKI 及其严重程度[25]。AKI 定义为：血清肌酐（SCr）较基线升高≥ 1.5 倍或肾小球滤过率（GFR）下降≥ 25% 或连续 6 h 尿量 < 0.5 mL/（kg • h）。AKI 严重程度分为危险（risk）、损伤（injury）、衰竭（failure）、肾功能丧失（loss）、终末期肾病（end stage renal disease，ESRD）。危险、损伤和衰竭分别定义为 SCr 较基线升高＞ 1.5 倍、＞ 2 倍、＞ 3 倍。肾功能丧失定义为持续性急性肾衰竭或肾功能丧失超过 4 周。ESRD 定义为持续性肾衰竭＞ 3 个月。

本研究同时评估了患者 AKI 恢复程度和 30 d 全因死亡率。由于本研究为回顾性研究，患者的肾功能仅能被追踪至出院时。根据开始使用多黏菌素 B 治疗 30 d 内发生的死亡例数统计患者 30 d 全因死亡率。

1.4 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics v.25.0（IBM Corp.，Armonk，NY，USA）软件分析数据。正态分布资料采用 $\bar{x}\pm s$ 进行统计描述，并通过 t 检验比较均值。非正态分布资料采用中位数与四分位数间距（inter quartile range，IQR）进行统计描述，并通过 Mann-Whitney U 检验进行比较。分类变量采用百分比进行统计描述，并通过卡方检验或 *Fisher* 确切概率法进行比较。单因素分析比较发生 AKI 与未发生 AKI 患者的临床资料、多黏菌素 B 血药浓度及 $AUC_{ss,\ 24\,h}$，并将 $P<0.05$ 的自变量纳入多因素 Logistic 回归分析，从而确定 AKI 的独立危险因素（$\alpha_{入}=0.10$，$\alpha_{出}=0.15$）。此外，采用 Kruskal-Wallis H 检验分析危险因素与 AKI 严重程度的相关性。通过受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线分析，评估各指标的预测能力，$P\leqslant 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基线特征

研究期间共 579 例患者接受多黏菌素 B 治疗，根据纳排标准剔除 138 例患者，最终纳入 441 例患者（见图 1）。患者基线特征见表 1，276 例（62.6%）患者入住重症监护病房（ICU），303 例（68.7%）患者接受机械通气治疗，65 例（14.7%）患者合并慢性肾病。所有患者基线 SCr 中位值为 67.4（IQR：46.5 ～ 109.0）μmol • L^{-1}。患者主要感染部位为肺部（63.0%），最常见的病原菌为鲍曼不动杆菌（21.5%），215 例（48.8%）患者同时感染多种病原菌。

313 例（71.0%）患者给予多黏菌素 B 负荷剂量治疗，91 例（20.6%）患者联合雾化吸入治疗。多黏菌素 B 静脉平均日剂量为（123.8±34.57）mg，中位治疗时间为 10（IQR：7 ～ 14）d。

2.2 AKI 的发生率及肾功能恢复情况

多黏菌素 B 治疗期间共 111 例（25.2%）患者发生 AKI，根据 RIFLE 分级，67 例（60.4%）为危险分级，28（25.2%）例为损伤分级，16 例（14.4%）为衰竭分级。

患者停用多黏菌素 B 至出院的中位时间为 3 d（IQR：1 ～ 12 d）。出院时，50 例（45.1%）患者肾功能恢复至基线水平，14 例（12.6%）患者肾功能好转但未恢复至基线水平，22 例（19.8%）患者肾功能进一步恶化，25 例（22.5%）患者因出院时没有复查肾功能而无法评估其肾功能恢复情况。所有患者中 30 d 全因死亡率为 32.0%（141/441）。

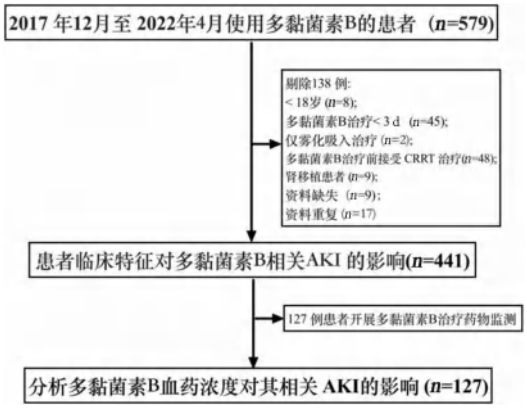


图 1 患者纳入排除流程图

Fig 1 Flow chart of eligible and excluded patients

2.3 全体患者 AKI 危险因素分析

发生 AKI 与未发生 AKI 患者的临床资料比较见表 1。与未发生 AKI 的患者相比，发生 AKI 组患者接受机械通气治疗、合并慢性肾病、多器官功能障碍综合征（multiple organ dysfunction syndrome，MODS）或脓毒症、合用血管活性药物、替加环素或利奈唑胺的比例更高，同时，发生 AKI 的患者接受更高的静脉用多黏菌素 B 日剂量，且基线 SCr 值更高。

Logistic 回归分析发现，合并慢性肾病、合用血管活性药物、替加环素或利奈唑胺是多黏菌素 B 相关 AKI 的独立危险因素（见表 2），但未发现这 4 项独立危险因素与 AKI 严重程度存在明显相关性（合并慢性肾病：$P=0.571$；合用血管活性药物：$P=0.689$；合用替加环素：$P=0.436$；合用利奈唑胺：$P=0.714$）。

2.4 多黏菌素 B 血药浓度与 AKI 相关性及浓度阈值的确定

因本院于 2021 年 2 月开始进行多黏菌素 B 的 TDM，关于多黏菌素 B 血药浓度与 AKI 相关性分析仅在 2021 年 2 月及之后使用多黏菌素 B 的患者中进行，共 127 例。在该部分患者中，31 例（24.4%）患者发生 AKI，根据 RIFLE 分级，18 例（58.1%）为危险分级，8 例（25.8%）为损伤分级，5 例（16.1%）为衰竭分级。

127 例患者的 C_{min}、$C_{2\,h}$、C_{max}、$C_{ss,\ avg}$ 及 $AUC_{ss,\ 24\,h}$ 平均值分别为（2.35±1.44）μg • mL^{-1}、（4.46±2.07）μg • mL^{-1}、（6.22±2.97）μg • mL^{-1}、（3.07±1.40）μg • mL^{-1}、（73.75±33.53）μg • h • mL^{-1}。与未发生 AKI 的患者相比，发生 AKI 的患者 C_{min}、$C_{2\,h}$、$C_{ss,\ avg}$

表 1 发生 AKI 与未发生 AKI 患者的临床资料比较

Tab 1 Characteristics between patients with and without AKI

临床特征	总体（n = 441）	发生 AKI（n = 111）	未发生 AKI（n = 330）	P
性别（男 / 女）	309/132	80/31	229/101	0.594
年龄 / 岁	60.5±16.87	61.5±16.51	60.2±17.00	0.477
体重 /kg	60.0（50.0 ～ 68.4）	58.0（50.0 ～ 67.0）	60.0（50.0 ～ 70.0）	0.379
住院时长 / d	30（21 ～ 48）	31（21 ～ 52）	30（21 ～ 48）	0.946
疗程 / d	10（7 ～ 14）	9（5 ～ 14）	10（7 ～ 14）	0.364
基线 SCr/（μmol • L^{-1}）	67.4（46.5 ～ 109.0）	75.4（50.8 ～ 130.5）	60.3（43.3 ～ 91.5）	0.002
入住 ICU[n（%）]	276（62.6）	78（70.3）	198（60.0）	0.053
机械通气治疗 [n（%）]	303（68.7）	90（81.1）	213（64.6）	0.001
并发症 [n（%）]				
心脑血管疾病	220（49.9）	59（53.2）	161（48.8）	0.426
呼吸系统疾病	116（26.3）	25（22.5）	91（27.6）	0.296
消化系统疾病	89（20.2）	28（25.2）	61（18.5）	0.126
慢性肝病	93（21.1）	22（19.8）	71（21.5）	0.705
慢性肾病	65（14.7）	26（23.4）	39（11.8）	0.003
实体器官肿瘤	45（10.2）	12（10.8）	33（10.0）	0.807
血液系统肿瘤	42（9.5）	9（8.1）	33（10.0）	0.557
糖尿病	73（16.6）	17（15.3）	56（17.0）	0.685
低蛋白血症	81（18.4）	19（17.1）	62（18.8）	0.694
MODS	41（9.3）	19（17.1）	22（6.7）	0.001
脓毒症	143（32.4）	51（46.0）	92（27.9）	＜ 0.001
感染部位 [n（%）]				
多部位感染	102（23.1）	22（19.8）	80（24.2）	0.524
肺部感染	278（63.0）	73（65.8）	205（62.1）	
胸膜感染	2（0.5）	1（0.9）	1（0.3）	
腹腔感染	5（1.1）	2（1.8）	3（0.9）	
血流感染	14（3.2）	2（1.8）	12（3.6）	
泌尿系统感染	7（1.6）	1（0.9）	6（1.8）	
中枢神经系统感染	2（0.5）	1（0.9）	1（0.3）	
病原菌 [n（%）]				
多种病原菌	215（48.8）	50（45.0）	165（50.0）	0.868
鲍曼不动杆菌	95（21.5）	24（21.6）	71（21.5）	
肺炎克雷伯菌	32（7.3）	8（7.2）	24（7.3）	
铜绿假单胞菌	21（4.8）	5（4.5）	16（4.8）	
大肠埃希菌	2（0.5）	1（0.9）	1（0.3）	
合用药物 [n（%）]				
造影剂	81（18.4）	16（14.4）	65（19.7）	0.214
利尿剂	305（69.2）	79（71.2）	226（68.5）	0.596
血管活性药物	197（44.7）	73（65.8）	124（37.6）	＜ 0.001
非甾体抗炎药	127（28.8）	28（25.2）	99（30.0）	0.337
免疫抑制剂	11（2.5）	3（2.7）	8（2.4）	0.871
激素类	170（38.6）	39（35.1）	131（39.7）	0.393
ACEI/ARB	12（2.7）	1（0.9）	11（3.3）	0.305
碳青霉烯类	223（50.6）	50（45.1）	173（52.4）	0.179
其他 β- 内酰胺类 [n（%）]	205（46.5）	49（44.1）	156（47.3）	0.568
替加环素	159（36.1）	55（49.6）	104（31.5）	0.001
万古霉素	69（15.7）	17（15.3）	52（15.8）	0.912
替考拉宁	60（13.6）	15（13.5）	45（13.6）	0.974
达托霉素	17（3.9）	5（4.5）	12（3.6）	0.900
利奈唑胺	68（15.4）	26（23.4）	42（12.7）	0.007
氨基糖苷类	26（5.9）	5（4.5）	21（6.4）	0.472
喹诺酮类	97（22.0）	23（20.7）	74（22.4）	0.708
复方磺胺甲噁唑	63（14.3）	20（18.0）	43（13.0）	0.194
两性霉素 B	14（3.2）	4（3.6）	10（3.0）	1.000
氟胞嘧啶	1（0.2）	0（0.0）	1（0.3）	1.000
氟康唑	126（28.6）	29（26.1）	97（29.4）	0.510
其他唑类	58（13.2）	11（9.9）	47（14.2）	0.598
卡泊芬净	96（21.8）	30（27.0）	66（20.0）	0.121
抗病毒药物	46（10.4）	14（12.6）	32（9.7）	0.385

续表 1

临床特征	总体（n = 441）	发生 AKI（n = 111）	未发生 AKI（n = 330）	P
多黏菌素 B 日剂量（静脉用）				
日剂量 /mg	123.8±34.57	130.2±37.69	121.6±33.28	0.033
＜ 150 mg	286	49	106	0.022
≥ 150 mg	155	62	224	

表 2 所有患者多黏菌素 B 相关 AKI 危险因素的 Logistic 回归分析

Tab 2 Logistic regression analysis of risk factors for polymyxin B related AKI in all patients

危险因素	优势比（OR）	95% 置信区间（CI）	P
慢性肾病	2.13	1.16 ～ 3.90	0.014
血管活性药物	2.59	1.59 ～ 4.20	＜ 0.001
替加环素	2.02	1.26 ～ 3.25	0.004
利奈唑胺	2.03	1.12 ～ 3.67	0.019

及 $AUC_{ss,\ 24\,h}$ 更高（见表 3），但未发现这 4 项指标与 AKI 严重程度存在明显相关性（C_{min}：P = 0.076；$C_{2\,h}$：P = 0.064；$C_{ss,\ avg}$：P = 0.068；$AUC_{ss,\ 24\,h}$：P = 0.068）。

表 3 多黏菌素 B 药动学参数在发生 AKI 与未发生 AKI 患者的比较

Tab 3 Polymyxin B pharmacokinetic parameters between patients with and without AKI

参数	发生 AKI（n = 31）	未发生 AKI（n = 96）	P
C_{min}/（μg • mL^{-1}）	3.48±1.30	1.98±1.29	＜ 0.001
$C_{2\,h}$/（μg • mL^{-1}）	5.59±1.79	4.07±2.03	＜ 0.001
C_{max}/（μg • mL^{-1}）	6.73±2.46	6.06±3.11	0.287
$C_{ss,\ avg}$/（μg • mL^{-1}）	3.84±1.16	2.82±1.38	＜ 0.001
$AUC_{ss,\ 24\,h}$/（μg • h • mL^{-1}）	92.25±27.88	67.65±33.12	＜ 0.001

通过 Logistic 回归分析综合考察患者病理生理因素及多黏菌素 B 药物浓度对 AKI 的影响，结果表明合并慢性肾病、合用血管活性药物或替加环素及 C_{min} 是多黏菌素 B 相关 AKI 的独立危险因素（见表 4）。

表 4 127 例患者（测定药物浓度）多黏菌素 B 相关 AKI 危险因素的 Logistic 回归分析

Tab 4 Logistic regression analysis of risk factors for polymyxin B related AKI in 127 patients who obtained polymyxin B concentrations

危险因素	优势比（OR）	95% 置信区间（CI）	P
慢性肾病	3.88	1.21 ～ 12.43	0.023
血管活性药物	2.98	1.03 ～ 8.59	0.043
替加环素	5.00	1.70 ～ 14.68	0.003
C_{min}/（μg • mL^{-1}）	2.09	1.38 ～ 3.19	0.001

127 例患者中建立的逻辑回归模型、C_{min}、$C_{2\,h}$ 及 $AUC_{ss,\ 24\,h}$ 预测 AKI 的 ROC 曲线下面积分别为 0.88（95%CI 0.81 ～ 0.94，P ＜ 0.001），0.82（95%CI 0.73 ～ 0.91，P ＜ 0.001），0.75（95%CI 0.66 ～ 0.85，P ＜ 0.001），0.76（95%CI 0.67 ～ 0.86，P ＜ 0.001）（见图 2）。C_{min}、$C_{2\,h}$、$AUC_{ss,\ 24\,h}$ 的灵敏度分别为 90.0%、86.7%、90.0%，特异度分别为 67.8%、55.2%、55.2%，提示 C_{min} 具有更好的预测价值。C_{min} ≥ 4.07 μg•mL^{-1} 时，AKI 发生的预测概率＞ 50%（见图 3）。

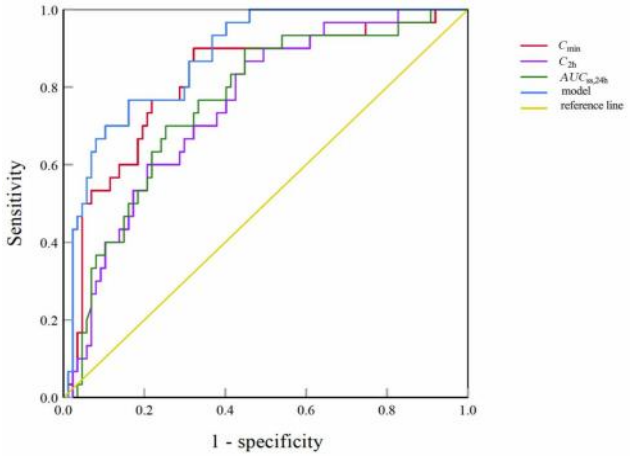


图 2 逻辑回归模型、C_{min}、$C_{2\,h}$ 及 $AUC_{ss,\ 24\,h}$ 预测多黏菌素 B 相关急性肾损伤的 ROC 曲线

Fig 2 ROC curves of the final multivariate Logistic regression model and C_{min}, $C_{2\,h}$, and $AUC_{ss,\ 24\,h}$ for predicting polymyxin B related acute kidney injury

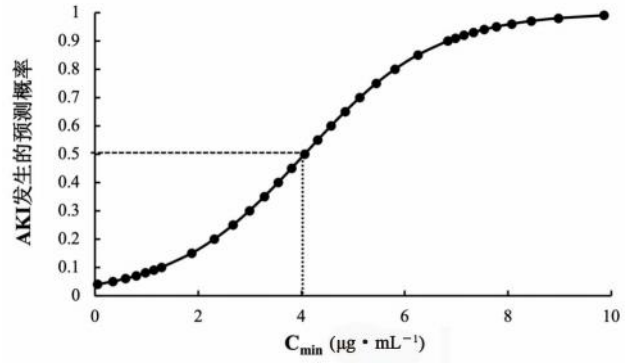


图 3 多黏菌素 B 谷浓度与急性肾损伤发生的预测概率

Fig 3 Polymyxin B C_{min} and the probability of acute kidney injury

3 讨论

本研究中，多黏菌素 B 相关 AKI 的发生率为 25.2%，与既往中国人群中的研究报道相近（25.9% ～ 33.5%）[12-14, 17, 26]，但低于其他人群中的研究报道（46.1% ～ 60.0%）[6, 15]，这可能是本研究中的患者接受较低剂量的多黏菌素 B 治疗 [100（IQR：100 ～ 150）mg • d^{-1} *vs* 150（IQR：140 ～ 180）mg • d^{-1}]，合用肾毒性药物万古霉素的比例更低（15.7% *vs* 48.3%）[15]。

研究发现，剂量、基线 SCr、合用肾毒性药物、合并糖尿病、脓毒性是多黏菌素 B 相关 AKI

的危险因素[15-17, 19]，但不同研究结果不一致，这可能与不同研究中的患者存在异质性、对 AKI 的定义不同有关。本研究中，合并慢性肾病、合用血管活性药物或替加环素、利奈唑胺是多黏菌素 B 相关 AKI 的独立危险因素。慢性肾病与 AKI 是相互关联的疾病状态[27]，与未合并慢性肾病的患者相比，合并慢性肾病的患者发生 AKI 的风险高 10 倍[27]。与本研究结果相似，既往研究也发现合用血管活性药物是多黏菌素 B 相关 AKI 的独立危险因素[28-29]。这可能是由于使用血管活性药物的患者大多合并血流动力学不稳定，肾灌注减少而加重肾功能不全。此外，血管活性药物可能对肾功能造成间接损害，如大剂量的儿茶酚胺类引起免疫介导的肾损害[30-31]。本研究中，合用替加环素或利奈唑胺的患者发生 AKI 的风险更高，这两种药物本身诱发 AKI 的风险并不高，但合用该药物的患者中近半数合并脓毒症（41.2% ～ 44.0%），大多数患者接受机械通气治疗（74.8% ～ 76.5%），因此，可能是重症感染，尤其脓毒症引起的炎症级联反应、免疫及凝血途径紊乱的相互作用共同诱发或加重 AKI[32]。值得注意的是，本研究未发现合用其他肾毒性药物如万古霉素、氨基糖苷类药物等与 AKI 存在明显相关性，可能是由于本研究中合用这些药物的患者较少（5.9% ～ 15.7%）。

除患者疾病状态、合用其他肾毒性药物与多黏菌素 B 相关 AKI 发生风险密切相关外，多黏菌素 B 体内暴露量也被认为是其重要危险因素[20]。本研究结果表明，多黏菌素 B 的体内药物浓度而非剂量与 AKI 的发生密切相关，再次证明药物浓度比剂量能更好地预测药物效应。与未发生 AKI 的患者相比，发生 AKI 的患者中 C_{min}、$C_{2\,h}$、$C_{ss,\,avg}$ 及 $AUC_{ss,\,24\,h}$ 更高，但多因素 Logistic 回归分析发现仅 C_{min} 是 AKI 发生的独立危险因素，当 $C_{min} \geq 4.07\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时，AKI 发生的预测概率＞ 50%。与此同时，ROC 曲线分析比较不同时间点的血药浓度和 $AUC_{ss,\,24\,h}$ 发现，C_{min} 的曲线下面积最大，提示 C_{min} 具有更好的预测价值。既往研究同样发现，多黏菌素 B 的 C_{min} 与其 AKI 存在明显相关性[12-13]。考虑到临床实践中监测 C_{min} 具有较好的可操作性，因此，通过监测多黏菌素 B 的 C_{min} 指导用药以降低 AKI 发生风险似乎是可行的。此外，有两项研究发现 $AUC_{ss,\,24\,h}$ 对于多黏菌素 B 相关 AKI 具有较好的预测价值[12, 18]，但本研究并未发现 $AUC_{ss,\,24\,h}$ 是多黏菌素 B 相关 AKI 的独立危险因素，这可能是由于 $AUC_{ss,\,24\,h}$ 与 C_{min} 之间存在共线性（$P < 0.001$，$r = 0.86$）。

值得注意的是，既往研究（2.23 μg • mL^{-1} 或 3.13 μg • mL^{-1}）与本研究（4.07 μg • mL^{-1}）中的 C_{min} 阈值存在差异[12-13]，这可能是由于不同生理病理状态的患者对多黏菌素 B 肾毒性的敏感性不同，从而影响多黏菌素 B 相关 AKI 的浓度阈值。例如，C_{min} 阈值 2.23 μg • mL^{-1} 的研究中，合并脓毒症患者的比例明显高于本研究（47.1% *vs* 32.4%）[12]，C_{min} 阈值 3.13 μg • mL^{-1} 的研究中未分析合并脓毒症患者的比例，但该研究中合并低蛋白血症患者的比例明显高于本研究（67.3% *vs* 18.4%）[13]，提示相较于本研究，既往两项研究中重症患者比例可能更高，患者群体的差异可能对多黏菌素 B 的 C_{min} 阈值产生重要影响。本研究 ROC 曲线分析发现，包含多因素的逻辑回归模型较单因素 C_{min} 的曲线下面积更大，表明同时结合患者病理生理特征及血药浓度对多黏菌素 B 相关 AKI 的预测性能更好。在今后的临床实践中，应用多黏菌素 B 药物浓度预测 AKI 发生风险时，应充分考虑患者的病理生理情况。此外，后续仍需更大样本的研究，进一步探讨不同患者群体尤其是特殊患者（如高龄患者、儿童）中多黏菌素 B 相关 AKI 的毒量关系，并对相应阈值加以验证。

综上所述，本研究回顾性分析了多黏菌素 B 相关 AKI 的危险因素，结果显示，合并慢性肾病、合用血管活性药物或替加环素、多黏菌素 B 稳态谷浓度与 AKI 的发生风险密切相关。多黏菌素 B 谷浓度对其相关 AKI 有较好的预测价值，阈值为 4.07 μg • mL^{-1}。

参考文献

[1] Falagas ME，Kasiakou SK. Colistin：the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections [J]. Clin Infect Dis，2005，40（9）：1333-1341.

[2] Karaiskos I，Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant gram-negative pathogens：current and emerging therapeutic approaches [J]. Expert Opin Pharmacother，2014，15（10）：1351-1370.

[3] Soman R，Bakthavatchalam YD，Nadarajan A，et al. Is it time to move away from polymyxins?：evidence and alternatives [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis，2021，40（3）：461-475.

[4] Abdelraouf K，Chang KT，Yin TJ，et al. Uptake of polymyxin B into renal cells [J]. Antimicrob Agents Chemother，2014，58（7）：4200-4202.

[5] Manchandani P，Zhou J，Babic JT，et al. Role of renal drug exposure in polymyxin B-induced nephrotoxicity [J]. Antimicrob Agents Chemother，2017，61（4）：e02391-16.

[6] Kubin CJ，Ellman TM，Phadke V，et al. Incidence and predictors of acute kidney injury associated with intravenous poly-

myxin B therapy [J]. J Infect，2012，65（1）：80-87.
[7] Tuon FF，Rigatto MH，Lopes CK，et al. Risk factors for acute kidney injury in patients treated with polymyxin B or colistin methanesulfonate sodium [J]. Int J Antimicrob Agents，2014，43（4）：349-352.
[8] Phe K，Lee Y，McDaneld PM，et al. In vitro assessment and multicenter cohort study of comparative nephrotoxicity rates associated with colistimethate versus polymyxin B therapy [J]. Antimicrob Agents Chemother，2014，58（5）：2740-2746.
[9] Zavascki AP，Goldani LZ，Li J，et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens：a critical review [J]. J Antimicrob Chemother，2007，60（6）：1206-1215.
[10] Nation RL，Garonzik SM，Thamlikitkul V，et al. Dosing guidance for intravenous colistin in critically-ill patients [J]. Clin Infect Dis，2017，64（5）：565-571.
[11] Avedissian SN，Scheetz MH. Does renal function matter for polymyxin B? [J]. Br J Clin Pharmacol，2021，87（7）：2629-2632.
[12] Wang PL，Zhang QW，Zhu ZF，et al. Comparing the population pharmacokinetics of and acute kidney injury due to polymyxin B in Chinese patients with or without renal insufficiency [J]. Antimicrob Agents Chemother，2021，65（2）：e01900-20.
[13] Han L，Xu FM，Zhang XS，et al. Trough polymyxin B plasma concentration is an independent risk factor for its nephrotoxicity [J]. Br J Clin Pharmacol，2022，88（3）：1202-1210.
[14] Deng Y，Gu JY，Li X，et al. Does monitoring total and free polymyxin B1 plasma concentrations predict polymyxin B-induced nephrotoxicity? A retrospective study in critically Ill patients [J]. Infect Dis Ther，2022，11（4）：1591-1608.
[15] Rigatto MH，Behle TF，Falci DR，et al. Risk factors for acute kidney injury（AKI）in patients treated with polymyxin B and influence of AKI on mortality：a multicentre prospective cohort study [J]. J Antimicrob Chemother，2015，70（5）：1552-1557.
[16] Sisay M，Hagos B，Edessa D，et al. Polymyxin-induced nephrotoxicity and its predictors：a systematic review and meta-analysis of studies conducted using RIFLE criteria of acute kidney injury [J]. Pharmacol Res，2021，163：105328.
[17] Wu XL，Long WM，Lu Q，et al. Polymyxin B-associated nephrotoxicity and its predictors：a retrospective study in carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections [J]. Front Pharmacol，2022，13：672543.
[18] Xu Y，Liang P，Liu N，et al. Correlation between the drug concentration of polymyxin B and polymyxin B-associated acute kidney injury in critically ill patients：a prospective study [J]. Pharmacol Res Perspect，2022，10（5）：e01010.
[19] Jia XD，Guo CH，Yin Z，et al. Risk factors for acute kidney injury induced by intravenous polymyxin B in Chinese patients with severe infection [J]. Infect Drug Resist，2022，15：1957-1965.
[20] Tsuji BT，Pogue JM，Zavascki AP，et al. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins：endorsed by the American College of Clinical Pharmacy（ACCP），European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases（ESCMID），Infectious Diseases Society of America（IDSA），International Society for Anti-infective Pharmacology（ISAP），Society of Critical Care Medicine（SCCM），and Society of Infectious Diseases Pharmacists（SIDP）[J]. Pharmacotherapy，2019，39（1）：10-39.
[21] Soares DS，Reis AF，Junior GBS，et al. Polymyxin-B and vancomycin-associated acute kidney injury in critically ill patients [J]. Pathog Glob Health，2017，111（3）：137-142.
[22] Thomas TA，Broun EC，Abildskov KM，et al. High performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for polymyxin B1 and B2 in human plasma [J]. Ther Drug Monit，2012，34（4）：398-405.
[23] Chen WQ，Liu HF，Wang QL，et al. Estimation of the area under concentration-time curve of polymyxin B based on limited sampling concentrations in Chinese patients with severe pneumonia [J]. Eur J Clin Pharmacol，2021，77（1）：95-105.
[24] Li XY，Zhang BQ，Cheng Y，et al. Evaluation and validation of the limited sampling strategy of polymyxin B in patients with multidrug-resistant gram-negative infection [J]. Pharmaceutics，2022，14（11）：2323.
[25] Kellum JA，Lameire N，KDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis，evaluation，and management of acute kidney injury：a KDIGO summary（Part 1）[J]. Crit Care，2013，17（1）：204.
[26] Chang K，Wang HB，Zhao JP，et al. Risk factors for polymyxin B-associated acute kidney injury [J]. Int J Infect Dis，2022，117：37-44.
[27] Chawla LS，Eggers PW，Star RA，et al. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes [J]. N Engl J Med，2014，371（1）：58-66.
[28] Wang Y，Chen XC，Guo XF，et al. Analysis of risk factors of polymyxin B-associated acute kidney injury in intensive care unit patients with severe infection [J]. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2020，32（6）：716-720.
[29] Osorio J，Barreto J，Samboni CF，et al. Risk factors for acute kidney injury in patients treated with polymyxin B experience from 139 cases at a tertiary university hospital in Colombia [J]. Rev Chil Infectol，2017，34（1）：7-13.
[30] Garcia RU，Walters HL，Delius RE，et al. Vasoactive inotropic score（VIS）as biomarker of short-term outcomes in adolescents after cardiothoracic surgery [J]. Pediatr Cardiol，2016，37（2）：271-277.
[31] Stamm C，Friehs I，Cowan DB，et al. Dopamine treatment of postischemic contractile dysfunction rapidly induces calcium-dependent pro-apoptotic signaling [J]. Circulation，2002，106（12 Suppl 1）：I290-1298.
[32] Fani F，Regolisti G，Delsante M，et al. Recent advances in the pathogenetic mechanisms of sepsis-associated acute kidney injury [J]. J Nephrol，2018，31（3）：351-359.

（收稿日期：2024-03-11；修回日期：2024-04-08）

门诊癌痛患者止痛药服药依从性影响因素探究及预测模型构建

陆维[1]，宋沧桑[1*]，孙蕾[2]，李兴德[1]，方甜甜[1]，华敏凡[1]（1.昆明市第一人民医院药学部，昆明　650000；2.昆明市第一人民医院疼痛科，昆明　650000）

摘要：目的　探究门诊癌痛患者止痛药服药依从性的影响因素，构建服药依从性预测模型，提高患者的服药依从性。**方法**　采用便利抽样的方法，以 2023 年 1—12 月在我院疼痛科门诊就诊癌痛患者为研究对象。采用一般资料调查表、服药依从性量表、自编服药依从性影响因素问卷，收集患者的临床资料，分别使用单因素、相关分析以及多元线性回归分析，探究门诊癌痛患者止痛药服药依从性影响因素，从而构建服药依从性预测模型。**结果**　本研究纳入 120 例研究对象，43.33% 门诊癌痛患者依从性良好。多元线性回归分析结果显示：门诊癌痛患者止痛药服药依从性预测模型公式为 $r = 2.871 + 0.995\times$ 文化程度 $- 1.703\times$ 医疗付费方式 $+ 0.806\times$ 家人提醒 $+ 0.938\times$ 疼痛控制效果 $- 0.566\times$ 饮食和运动 $- 0.380\times$ 不良反应 $- 1.458\times$ 服药信念 $+ 1.628\times$ 对疾病的信心。**结论**　文化程度、医疗付费方式、家人提醒、疼痛控制效果、饮食和运动、不良反应、服药信念、对疾病的信心为门诊癌痛患者止痛药服药依从性的影响因素。

关键词：癌痛；服药依从性；影响因素；预测模型
中图分类号：R730，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-3103-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.044

Factors influencing analgesic compliance of outpatients with cancer pain and construction of prediction model

LU Wei[1], SONG Cang-sang[1*], SUN Lei[2], LI Xing-de[1], FANG Tian-tian[1], HUA Min-fan[1] (1. *Department of Pharmacy*, *the First People's Hospital of Kunming*, *Kunming*　650000; 2. *Department of Pain*, *the First People's Hospital of Kunming*, *Kunming*　650000)

Abstract: Objective　To determine the influencing factors of analgesic compliance in outpatients with cancer pain, and to establish a prediction model of analgesic compliance, so as to improve patient compliance. **Methods**　By convenience sampling method, patients with cancer pain treated in the Pain Department of a hospital from January to December 2023 were selected as research objects. General data questionnaire, medication compliance scale and self-designed medication compliance influencing factors questionnaire were used to collect clinical data of the patients. Single factor analysis, correlation analysis and multiple linear regression analysis were used to determine the influencing factors of analgesic medication compliance in outpatients with cancer pain to construct a prediction model. **Results**　Among the 120 study subjects, 43.33% had good compliance. The multiple linear regression analysis showed that the prediction model of analgesic compliance in cancer outpatients was $r = 2.871 + 0.995\times$education level $- 1.703\times$medical payment mode $+ 0.806\times$family reminder $+ 0.938\times$pain control effect $- 0.566\times$diet and exercise $- 0.380\times$adverse reactions $- 1.458\times$medication belief $+ 1.628\times$confidence in fight against disease. **Conclusion**　The education level, medical payment mode, family reminder, pain control effect, diet and exercise, adverse reactions, medication belief and confidence in fight against disease are the influencing factors of analgesic medication compliance in outpatients with cancer pain.

Key words: cancer pain; medication compliance; influencing factor; prediction model

基金项目：昆明市卫生健康委员会卫生科研课题项目（No. 2022-13-01-014）；“春城计划”高层次创新创业团队专项（No. 2022SCP002）；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：陆维，女，主管药师，主要从事医院药学、临床药学研究，email：472101317@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研究，email：songcs163@163.com

据世界卫生组织统计，一半以上的癌症患者，在疾病后期均出现不同程度的癌痛，癌痛已经成为影响晚期癌症患者生活质量的主要影响因素之一[1]。目前，癌痛的治疗主要依据美国国立综合癌症网络（national comprehensive cancer network，NCCN）指南推荐的“三阶梯”疗法，首选口服用药[2]。如果止痛药物能正确使用，90% 的疼痛都能得到有效缓解，但大量研究显示：癌痛的控制效果并不理想，许多患者仍在遭受着疼痛的折磨[3-4]。癌痛不能很好地控制的主要原因是患者缺乏规范的癌痛治疗。癌痛门诊对癌痛患者实施规范化的镇痛治疗，可以提高患者的服药依从性，疗效肯定，能最大限度地改善患者生存质量，有效缓解患者焦虑、抑郁等不良情绪，并且用药安全性高，不良反应可控，可以成为晚期癌痛患者居家的主要治疗方式[5]。

止痛药依从性差是疼痛控制最常见的障碍之一，患者癌痛认知的缺乏、担心成瘾而忍痛、不痛不用药、担心阿片类药物的不良反应，这些都是影响疼痛治疗服药依从性的主要因素。既往研究主要集中在癌痛的发病机制、症状管理、医疗干预、癌痛控制现状的探讨[6-8]，多从单一因素或单类因素，或者基于某一理论框架去验证某一（类）影响因素对服药依从性的影响，所得影响因素涵盖的领域就显得不全面，无法全面分析或者干预影响患者依从性的因素，不利于全面提升患者的依从性。目前，服药不依从行为普遍，直接影响患者的预后以及疾病的管理。如果医护人员能早期识别患者的服药依从性情况，针对服药依从性差的患者早期进行个体化的干预，则可能纠正患者的服药不依从行为，从而提高患者的服药依从性，改善患者的预后。

早在 2003 年，世界卫生组织在大量循证依据的基础上，将患者服药依从性的影响因素从五个维度进行概括：社会经济相关因素、医疗照护相关因素、疾病相关因素、治疗相关因素、患者相关因素[9]。已报道的模型整合了哮喘、癌症、抑郁症、糖尿病、高血压、艾滋病等资料，暂未有关于门诊癌痛患者服药依从性预测模型构建的报道。在国内，已有报道也局限于冠心病[10]、高血压[11]等心血管疾病药物依从性模型建立。

本研究拟采用八项 Morisky 服药依从性量表（8-item Morisky medication adherence scale，MMAS-8）评价患者对止痛药的依从性，采用多因素回归分析可能与止痛药依从性相关的临床因素，系统、多因素、多维度分析影响癌痛患者止痛药服药依从性的危险因素，构建门诊癌痛患者止痛药服药依从性预测模型，早期识别患者服药依从性，筛选出服药依从性差的患者对其实施个体化干预，提高癌痛患者服药依从性和疼痛缓解程度，减少不良反应的发生，提高患者疼痛控制的质量，间接改善癌痛患者生活质量，现报道如下。

1 资料

本研究获得我院伦理委员会的批准（伦理批件号：YLS2022-42），研究对象参加本研究前均知情同意并签署知情同意书。

1.1 研究对象

采用便利抽样的方法，纳入 2023 年 1—12 月于我院疼痛科门诊就诊的 120 例癌痛患者。

纳入标准：① 符合癌性疼痛诊断标准的患者；② 服用止痛药进行止痛的门诊癌痛患者；③ 距离首次服用止痛药至少 15 d；④ 具有独立思考的能力；⑤ 表达和理解能力正常，在知情同意的原则下自愿参加本研究。排除标准：① 合并严重精神障碍；② 抗拒此次研究者。

1.2 样本量估计

样本量根据 Logistic 回归分析中样本量是自变量的 5 ～ 10 倍进行计算[8]。本研究自变量个数为 20 个（一般资料调查表有 15 项，服药依从性影响因素有五个维度），再考虑到 20% 的失访率，所需样本量为 120 ～ 240 例。本次调查最终确定的样本量为 120 例。

2 方法

2.1 研究工具

2.1.1 自制一般资料调查表 患者的社会人口学资料：姓名、年龄、性别、婚姻状况、文化程度、职业类别、职业状况、居住情况、医疗付费方式。

疾病相关资料：确诊癌症类型、疼痛程度、遗传病史、合并疾病种类。

2.1.2 服药依从性量表 本研究选择司在霞等[12]修订版 MMAS-8 量表评估患者依从性。MMAS-8 量表满分为 8 分：得分 8 分为依从性良好、6 ≤得分＜ 8 分为依从性中等、得分＜ 6 分为依从性差。

2.1.3 自制门诊癌痛患者止痛药服药依从性影响因素调查表 采用自编问卷，该问卷依据 WHO 依从性影响因素框架[13]，包含社会经济相关因素、医疗照护相关因素、疾病相关因素、治疗相关因素和疾病相关因素，共 60 个条目，答案为“是”“一般”“否”，分别记为 2、1、0 分。

2.2 调查方法

由 2 名熟知调查目的、经过培训的研究者负责资料收集工作，问卷调查前使用统一指导语向患者讲解调查的目的、内容及填写要求，取得知情同意后发放问卷。填写过程中若患者存在疑问及时予以解答。所有问卷均当场填写、收回，并检查问卷内容的完整性和逻辑性，如有缺项或前

后答案矛盾等问题，请患者及时补充或更正。

2.3　统计学方法

应用 Epidata 3.1 软件录入并检验所有数据资料，采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。具体包括描述性统计、单因素分析、相关分析以及多元线性逐步回归。检测水准为双侧，$\alpha = 0.05$。

2.3.1　描述性分析　描述患者的社会人口学资料、疾病相关资料和 MMAS-8 得分、非药物依从行为得分。

2.3.2　单因素分析　不同人口社会学资料、疾病相关资料、MMAS-8 得分、自编问卷的条目比较采用单因素分析。经正态性检验，MMAS-8 总分不符合正态分布（Kolmogorov-Smirnov Z 值为 0.122，$d_f = 240$，$P < 0.05$），因此，进行单因素分析时采用非参数秩和检验。

两独立样本之间的比较采用 Mann-Whitney U 检验（统计值为 Z），多组独立样本之间的比较采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验（统计值为 H）。

2.3.3　相关分析　采用 Spearman 相关系数分析社会人口学资料、疾病相关资料、MMAS-8 总分与门诊癌痛患者止痛药依从性影响因素问卷中各影响因素的相关程度。

2.3.4　多元线性逐步回归　以 MMAS-8 总分、药物依从行为得分为因变量，以单因素分析、相关因素分析中有统计学差异的因素为自变量进行多元线性逐步回归分析，分析预测因素，构建预测模型。

3　结果

3.1　依从性现状

本研究纳入的 120 例癌痛患者平均依从性得分为（5.21±2.42）分，其中只有 43.33% 患者依从性良好。MMAS-8 总分及各条目得分见表 1。

表 1　MMAS-8 总分及各条目得分 ($n = 120$)

Tab 1　MMAS-8 total score and individual item score ($n = 120$)

条目	得分范围	得分（$\bar{x}\pm s$）
1. 您有时会忘记服用止痛药吗?	0 ～ 1	0.28±0.45
2. 在过去的两周内，您有出现过漏服药物的情况吗?	0 ～ 1	0.58±0.49
3. 服药期间，当觉得疼痛加重或出现其他症状时，是否未告知医师而自行减少药量或停止服用药物?	0 ～ 1	0.56±0.50
4. 当外出或不在家时，是否有时忘记随身携带药物?	0 ～ 1	0.93±0.25
5. 昨天您是否服用了您应该服用的全部药物?	0 ～ 1	0.82±0.39
6. 当您感觉疼痛已得到控制时，是否有时停止服用药物?	0 ～ 1	0.58±0.49
7. 您是否认为坚持按医师治疗方案进行服药很麻烦?	0 ～ 1	0.81±0.39
8. 您多久会有一次忘记服用止痛药物?	0 ～ 1	0.62±0.27
总分	0 ～ 8	5.21±2.42

3.2　门诊癌痛止痛药患者服药依从性单因素分析

一般社会人口学作为自变量，服药依从性作为因变量，进行单因素分析，连续型变量采用四分位数进行分类。结果显示，年龄、文化程度、家庭月收入、职业类别、职业状态、医保付费方式差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 2。

表 2　一般资料对癌痛患者止痛药服药依从性影响的单因素分析结果

Tab 2　General data of univariate analysis of compliance of analgesic in patients with cancer pain

项目	类别	例数	服药依从性		
			秩均值	Z/H	P
年龄 / 岁	≤ 25	1	77.50	11.550	0.009
	26 ～ 49	5	63.30		
	50 ～ 74	77	52.79		
	≥ 75	37	75.72		
性别	女	45	57.73	0.472	0.492
	男	75	62.16		
婚姻状况	有配偶	113	59.84	0.722	0.396
	无配偶	7	71.14		
文化程度	小学及以下	60	48.87	14.111	0.001
	初中	4	79.38		
	高中及以上	56	71.62		
家庭月收入 / 元	＜ 1000	31	23.65	68.040	＜ 0.001
	1000 ～ 2000	30	63.83		
	2000 ～ 3000	34	62.25		
	3000 以上	24	98.98		
职业类别	农民	41	56.11	11.755	0.003
	工人	54	71.34		
	其他	25	44.28		
职业状态	无业	62	51.76	10.856	0.004
	退休	47	73.24		
	在职	11	55.32		
居住情况	独居	4	68.75	0.241	0.623
	非独居	116	60.22		
医疗付费方式	自费	64	51.48	9.553	0.002
	职工医保	56	70.80		

疾病资料作为自变量，服药依从性作为因变量，进行单因素分析。结果显示疼痛程度差异有统计学意义（$P < 0.05$），详见表 3。

3.3　不同影响因素与癌痛患者止痛药服药依从性的相关性

调查结果表明，家人提醒、家人关心、家庭职责、家庭责任感、交通便利程度、治疗方案了解程度、疼痛控制效果、饮食和运动、不良反应、不良反应的认知程度、健忘、服药信念、生活习惯的改变、对疾病的信心等与患者服药依从性相关（$P < 0.05$），见表 4。

3.4　癌痛患者止痛药服药依从性预测模型构建

以服药依从性得分为因变量，以单因素分析中有统计学意义的变量为自变量，进行多元线性逐步回归。多元线性回归显示，文化程度、医疗付费方式、家人提醒、疼痛控制效果、饮食和运动、不良反应、服药信念、对疾病的信心为影

表 3 疾病相关资料对癌痛患者服药依从性影响的单因素分析

Tab 3 Single factor analysis of compliance of patients with cancer pain

项目	类别	例数	服药依从性		
			秩均值	*Z*/*H*	*P*
疾病类型	白血病	1	21.50	30.769	0.058
	胆管恶性肿瘤	5	35.70		
	胆囊恶性肿瘤	3	88.83		
	肺恶性肿瘤	27	56.81		
	肝恶性肿瘤	22	51.48		
	宫颈恶性肿瘤	4	104.00		
	骨恶性肿瘤	4	79.38		
	喉恶性肿瘤	2	47.25		
	结肠恶性肿瘤	7	39.64		
	淋巴恶性肿瘤	2	56.75		
	卵巢恶性肿瘤	1	87.00		
	皮肤恶性肿瘤	1	8.50		
	前列腺恶性肿瘤	6	76.08		
	乳腺恶性肿瘤	9	49.17		
	肾恶性肿瘤	1	58.50		
	十二指肠恶性肿瘤	1	104.00		
	胃恶性肿瘤	1	47.00		
	咽恶性肿瘤	1	104.00		
	胰腺恶性肿瘤	10	72.20		
	直肠恶性肿瘤	11	70.36		
	子宫内膜恶性肿瘤	1	104.00		
疼痛程度	1 ～ 3 轻度疼痛	15	22.97	38.495	＜ 0.001
	4 ～ 6 中度疼痛	80	58.00		
	7 ～ 9 重度疼痛	25	91.02		
遗传病史	无	118	60.29	0.262	0.609
	有	2	72.75		
其他慢性疾病	无	64	58.09	0.997	0.607
	1 种	31	65.55		
	≥ 2 种	25	60.42		

表 4 不同影响因素与癌痛患者服药依从性的相关性

Tab 4 Correlation between different influencing factors and drug compliance of patients with cancer pain

	变量	*R* 值	*P* 值
社会经济相关因素	家人提醒	0.467	＜ 0.001
	家人关心	－ 0.467	＜ 0.001
	家庭职责	－ 0.206	0.024
	家庭责任感	－ 0.298	0.001
	交通便利程度	0.616	＜ 0.001
医疗照护相关因素	治疗方案了解程度	－ 0.198	0.030
治疗相关因素	疼痛控制效果	－ 0.902	＜ 0.001
	饮食和运动	－ 0.781	＜ 0.001
	不良反应	－ 0.831	＜ 0.001
患者相关因素	不良反应的认知程度	－ 0.225	0.013
	健忘	－ 0.846	0.000
	服药信念	－ 0.918	0.000
	生活习惯的改变	－ 0.206	0.024
	对疾病的信心	0.845	0.000

响门诊癌痛患者止痛药服药依从性的重要因素（$P < 0.05$），见表 5。采用 SPSS 软件，将有影响的因素导入，由此得到门诊癌痛患者止痛药服药依从性预测模型公式为 $r = 2.871 + 0.995\times$ 文化程度 $- 1.703\times$ 医疗付费方式 $+ 0.806\times$ 家人提醒 $+ 0.938\times$ 疼痛控制效果 $- 0.566\times$ 饮食和运动 $- 0.380\times$ 不良反应 $- 1.458\times$ 服药信念 $+ 1.628\times$ 对疾病的信心。

4 讨论

药师通过对本医疗机构就诊的门诊癌痛患者服药依从性相关影响因素的收集，初步构建了门诊癌痛患者服药依从性预测模型。利用该模型，有助于药师在疼痛药物治疗管理门诊服务患者时，早期预测患者止痛药服药依从性，识别依从性差的高危群体，并针对性地实施干预，从而提高门诊癌痛患者止痛药服药依从性。

本研究中，癌痛患者依从性得分为（5.21±2.42）分，其中只有 43.33% 的患者依从性良好。高茜 [14] 研究结果显示，新入院癌症疼痛患者治疗依从性较差，其中未按时用药占比最高达 100.00%；其次为减量用药占比 58.67%，不服药占比 46.67%，漏服药物占比 40.00%，癌痛时才用药占比 36.00%。耿雅琼 [15] 采用中文 MMAS-8 对肿瘤科住院肺癌患者进行问卷调查后得出，33.3% 的患者服药依从性差，均低于本地调查中癌痛患者的服药依从性，说明纳入本研究的研究对象癌痛止痛药的服药依从性较已发表研究患者服药依从性高。

本研究发现，文化程度、医疗付费方式、家人提醒、疼痛控制效果、饮食和运动、不良反应、服药信念、对疾病的信心等都是影响患者服药依从性的影响因素。

① 患者的文化程度越高，患者的服药依从性越好：这可能是因为文化程度较高的患者对疾病的认识程度较高，能够更清楚地认识到规律性治疗的重要性，因此服药依从性也较高。

② 医保付费方式也会影响患者的服药依从性：不同的付费方式可能间接影响患者的经济负担和心理状态，进而影响服药依从性，本研究中职工医保付费的患者服药依从性更高。

③ 家人提醒服药与服药依从性之间存在正相关关系：当家人能够定期、准时地提醒患者服药时，患者的服药依从性会显著提高。这是因为家人的提醒能够帮助患者养成良好的服药习惯，减少因遗忘或疏忽而导致的漏服、错服现象。

④ 患者疼痛控制的效果越好，服药依从性越好，这可能因为效果好间接地增加了患者对疾病治疗的信心。

⑤ 患者饮食和运动控制的效果越好，患者的服药依从性更好，这可能与患者积极的生活态度以及战胜疾病的信心有关。

⑥ 不良反应的存在和严重程度可能会直接影响患者的服药体验和意愿，进而对服药依从性产生负面影响。当癌痛患者遭受严重的不良反应时，可

表 5 服药依从性影响因素的多元逐步线性回归

Tab 5 Multiple stepwise linear regression analysis of influencing factors of medication compliance

预测变量	偏回归系数	标准误	标准化偏回归系数	t 值	P 值	R^2	F 值	P 值
						0.936	88.684	＜ 0.001
常数项	2.871	1.168		2.458	0.016			
文化程度	0.995	0.285	0.388	3.350	0.001			
医疗付费方式	－ 1.703	0.563	－ 0.352	－ 3.022	0.003			
家人提醒	0.806	0.302	0.088	2.671	0.009			
疼痛控制效果	0.938	0.392	0.307	2.393	0.019			
饮食和运动	－ 0.566	0.178	－ 0.143	－ 3.170	0.002			
不良反应	－ 0.380	0.158	－ 0.131	－ 2.407	0.018			
服药信念	－ 1.458	0.373	－ 0.483	－ 3.911	0.000			
对疾病的信心	1.628	0.212	0.334	7.680	0.000			

能会感到身体极度不适，甚至对药物产生恐惧和抵触情绪。这些负面情绪和体验可能导致患者对服药产生抗拒心理，从而降低服药依从性[16-18]。

⑦ 患者对疾病信心程度越高，依从性越好，与已报道的研究结果[19]相似。疼痛药物治疗管理门诊药师在接诊患者的时候，可以根据预测模型早期识别患者的服药依从性，并针对性地实施宣教、随访等，帮助患者增强药物治疗的信心，从而提高依从性。

综上所述，癌痛患者坚持服用止痛药对于疼痛治疗的成功至关重要。通过门诊癌痛患者止痛药服药依从性预测模型的构建，我们可以早期识别服药不依从的高危人群，通过教育、提醒、随访等多种方式来提高患者的服药行为。

但本研究仍然存在一定的局限性：① 研究时间较短，导致纳入的样本量较少；② 研究对象来自昆明市某三甲医院，采用便利抽样方法，限制了结果的普遍性。未来可开展随机、大样本、多中心调查，进而丰富研究结果，可对模型进行内部和外部验证，以验证预测模型对改善患者依从性的指导作用。

参考文献

[1] Varghese C，Oyere O，Cowan M，et al. World health organization [J]. Stroke，2016，47（8）：e210.

[2] Swarm RA，Paice JA，Anghelescu DL，et al. Adult Cancer Pain，Version 3.2019，NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw，2019，17（8）：977-1007.

[3] 张晨宇，刘波，孙长亮，等 . 多角度药学服务对癌痛患者口服阿片类药物服药依从性、镇痛效果及不良反应的影响 [J]. 实用癌症杂志，2020，35（12）：2077-2079.

[4] 宋健，陈道菊，黄玉玲，等 . 服药依从性与癌痛患者疼痛控制效果的相关性研究 [J]. 中国疼痛医学杂志，2017，23（8）：630-633.

[5] 王迪，王凌珊 . 门诊癌痛患者规范化镇痛治疗的疗效分析 [A]// 中华医学会疼痛学分会第十九届学术年会 [C]. 武汉，2023.

[6] Chou WC，Chen JS，Hung CY，et al. A nationwide survey of adherence to analgesic drugs among cancer patients in Taiwan：prevalence，determinants，and impact on quality of life [J]. Support Care Cancer，2019，27（8）：2857-2867.

[7] Seangrung R，Ahuja M，Pasutharnchat K，et al. Factors influencing non-adherence to opioids in cancer patients：a mixed-methods cross-sectional study [J]. F1000Res，2020，9：1471.

[8] Chou PL，Fang SY，Sun JL，et al. Gender difference in cancer patients’ adherence to analgesics and related outcomes of pain management [J]. Cancer Nurs，2018，41（6）：E11-E18.

[9] De Geest S，Sabate E. Adherence to long-term therapies：evidence for action [J]. Eur J Cardiovasc Nurs，2003，2（4）：323.

[10] 杨慧 . 冠心病二级预防依从性预测模型的构建 [D]. 保定：河北大学，2016.

[11] 梁汝江，井明霞，张梅，等 . 社区管理高血压患者的服药依从性预测模型构建 [J]. 石河子大学学报（自然科学版），2021，39（1）：121-125.

[12] 司在霞，郭灵霞，周敏，等 . 修订版 Morisky 服药依从性量表用于抗凝治疗患者的信效度检测 [J]. 护理学杂志，2012，27（22）：23-26.

[13] De Geest S，Sabate E. Adherence to long-term therapies：evidence for action [J]. Eur J Cardiovasc Nurs，2003，2（4）：323.

[14] 高茜 . 癌症疼痛患者止痛治疗依从性的影响因素分析 [J]. 中国社区医师，2022，38（32）：146-148.

[15] 耿雅琼 . 基于格林模式的健康教育对肺癌疼痛患者口服止痛药依从性的应用研究 [D]. 赣州：赣南医学院，2022.

[16] Vanneste L，Lefebvre T，Tack L，et al. Pain medication adherence in patients with cancer：a pragmatic review [J]. Pain Med，2022，23（4）：782-798.

[17] 高茜 . 癌症疼痛患者止痛治疗依从性的影响因素分析 [J]. 中国社区医师，2022，38（32）：146-148.

[18] Makhlouf S M，Pini S，Ahmed S，et al. Managing pain in people with cancer——a systematic review of the attitudes and knowledge of professionals，patients，caregivers and public [J]. J Cancer Educ，2020，35（2）：214-240.

[19] Mercadante S，Adile C，Tirelli W，et al. Barriers and adherence to pain management in advanced cancer patients [J]. Pain Pract，2021，21（4）：388-393.

（收稿日期：2024-04-18；修回日期：2024-07-29）

临床药师在临床

临床药师参与 1 例全胃切除术后吸收及消化不良患者的药学实践

高雯雯，尹雁惠，张翔*（济南市中心医院，济南 250013）

摘要：临床药师参与 1 例全胃切除术后吸收及消化不良患者的药物治疗，通过对疾病相关文献、国内外药品说明书等资料的查阅对患者进行用药评估及监护。在整个治疗过程中，临床药师从维生素 B_{12} 及消化酶制剂的选择、用法用量、患者用药教育等方面实施全程药学监护，提出药学建议，协助医师为患者制订合理的用药方案，提高患者的用药依从性和有效性。

关键词：临床药师；全胃切除；贫血；消化不良；药学实践

中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3108-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.045

全胃切除术后，胃酸缺乏会导致维生素 B_{12} 和铁剂吸收减少，其中维生素 B_{12} 缺乏的中位时间为 15 个月，术后 4 年可达到 100%，进而出现贫血[1]。同时，因为机械性和化学性消化的不足，会出现消化不良，比如腹胀、腹泻等[2]。消化不良和贫血是全胃切除术后患者的常见并发症，消化酶制剂、维生素 B_{12}、铁剂等是该类患者的必备药物。但作为全胃切除这一类特殊人群，消化酶制剂与抗贫血药物的选择与普通的消化不良及贫血患者有所差异。目前并无统一的指南或规范为胃切除术后患者消化酶的补充及贫血的治疗提供指导依据，临床药师结合患者病情，通过查阅相关指南、文献及国内外说明书等协助医师选择合适的药物及剂量，进行消化不良及贫血的治疗，为这类特殊人群的用药提供依据。

1 病历摘要

患者，男，57 岁，体重 55 kg，身高 175 cm，腰围 76 cm，臀围 82 cm。2 月余前无明显诱因出现大便次数增多，每日大便 5 ～ 6 次，不成形，伴腹胀，偶有下腹部隐痛，无黑便、便血，无恶心、呕吐。2023 年 2 月 21 日院外复查癌胚抗原：6.62 ng • mL^{-1}，CA199：105 U • mL^{-1}↑，CA724：7.24 U • mL^{-1}↑，铁蛋白 11.9 ng • mL^{-1}，血常规：红细胞（RBC）3.77×10^{12} • L^{-1}↓，血红蛋白（Hb）96 g • L^{-1}↓，胃肠镜：全胃切除术后改变，横结肠黏膜组织轻度慢性炎。自发病以来体重下降 2 kg，饮食无明显变化。为求进一步治疗于 2023 年 3 月 7 日入住本院消化科，临床药师在患者入院后对其进行药学问诊，得知患者 2019 年因胃恶性肿瘤行全胃切除术，既往无高血压、糖尿病等疾病史，院外也未服用其他药物。吸烟 30 余年，1 盒•d^{-1}，偶尔饮酒，现已戒烟戒酒 4 年余。

患者入院时体温（T）：36.3 ℃，脉率（P）：70 次 • min^{-1}，呼吸（R）：20 次 • min^{-1}，血压（BP）：111/71 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），神志清楚，回答切题，贫血貌，腹部平坦、无腹壁静脉曲张及胃肠蠕动波。腹软，无压痛及反跳痛。未触及肝、脾、肾及其他包块，无移动性浊音，肠鸣音正常，肌力正常。入院当日血常规：RBC 3.05×10^{12} • L^{-1}↓，Hb 80 g • L^{-1}↓，平均红细胞体积 80.3 fL↓，平均红细胞 Hb 含量 26.2 pg↓，平均 Hb 浓度 327 g • L^{-1}；贫血三项：维生素 B_{12} 151.9 pg • mL^{-1}↓，叶酸 11.05 ng • mL^{-1}，铁蛋白 9.21 ng • mL^{-1}↓；肝功能：白蛋白 30.4 g • L^{-1}↓，前白蛋白 77.54 mg • L^{-1}↓；血生化：钾 1.99 mmol • L^{-1}↓，钙 1.84 mmol • L^{-1}↓；大便隐血试验弱阳性；CA199：96.81 U • mL^{-1}↑、甲胎蛋白：4.21 ng • mL^{-1}，癌胚抗原：4.93 ng • mL^{-1}，其他化验检查无异常。根据患者疾病史、临床症状及相关检查，入院诊断为消化不良、贫血、低钾血症、胃癌全胃切除术后。

患者入院后给予蒙脱石散 3 g po tid 止泻、维生素 B_{12} 注射液 0.5 mg im qd 及多糖铁复合物胶囊

基金项目：济南市卫生健康委员会科技发展计划项目（No.2022-2-04）。

作者简介：高雯雯，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：gaowwen@163.com *通信作者：张翔，女，主任药师，主要从事临床药学工作，email：2506610420@qq.com

0.15 g po qd治疗贫血、米曲菌胰酶片 2 片 po tid 补充消化酶、补钾及维持电解质平衡。患者因白蛋白较低，住院期间自行购买乳清蛋白粉，每日的用量折合蛋白质约 13 g。入院第 3 日，血钾 3.81 mmol • L^{-1}，患者大便次数较前略有减少，3 ～ 4 次 • d^{-1}，但仍不成形，饭后腹胀。临床药师建议停用米曲菌胰酶片，调整为胰酶肠溶胶囊，医师采纳。入院第6日，患者大便次数较前减少，2～3 次 • d^{-1}，入院第 7 日，Hb 87 g • L^{-1}，血钾 3.93 mmol • L^{-1}，患者病情稳定，大便 2 ～ 3 次 /d，住院期间体重无明显变化，于 3 月 14 日出院。临床药师建议使用甲钴胺片补充维生素 B_{12}，医师采纳。3 月 23 日，患者门诊复查 Hb 升至 101 g•L^{-1}，白蛋白 32.6 g • L^{-1}，大便 1 ～ 2 次 • d^{-1}，腹胀较前减轻。住院过程中的主要治疗药物见表 1。

表 1 主要治疗药物

药品名称	用法用量	起止时间
蒙脱石散	3 g po tid	3 月 7 日—出院带药
枯草杆菌二联活菌肠溶胶囊	0.5 g po tid	3 月 7 日—出院带药
酪酸梭菌活菌胶囊	1.26 g po tid	3 月 9 日—出院带药
维生素 B_{12} 注射液	0.5 mg im qd	3 月 9 日—3 月 14 日
多糖铁复合物胶囊	0.15 g po qd	3 月 9 日—出院带药
米曲菌胰酶片	2 片 po tid	3 月 7 日—3 月 9 日
胰酶肠溶胶囊	0.45 g po tid	3 月 10 日—出院带药
氯化钾缓释片	1 g po tid	3 月 7 日—出院带药
甲钴胺片	0.5 mg po tid	出院带药

2 讨论

2.1 全胃切除术后贫血的治疗

2.1.1 胃肠外维生素 B_{12} 的补充 贫血是全胃切除术后常见的并发症，术后铁、维生素 B_{12} 或叶酸缺乏（单独或联合）十分常见[3]。患者入院时 Hb 80 g • L^{-1}，维生素 B_{12} 和铁蛋白都低于正常下限，因此存在维生素 B_{12} 和铁缺乏。

维生素 B_{12} 通常有两种吸收途径，内因子依赖途径（吸收率 60%）和非内因子依赖途径（吸收率 1%）[4-5]。食物中的维生素 B_{12} 与蛋白质结合，进入人体消化道内，在胃酸、胃蛋白酶等作用下，维生素 B_{12} 被释放出来，并与胃黏膜分泌的一种糖蛋白内因子（intrinsic factor，IF）结合，VB_{12}-IF 复合物在回肠被吸收[6]。维生素 B_{12} 缺乏是胃切除术后常见的长期后遗症，其主要原因就是维生素 B_{12} 的吸收始于胃壁细胞释放的内因子，胃切除患者缺失或减少了内因子的来源，从而影响维生素 B_{12} 的吸收[4]。

胃切除术后患者维生素 B_{12} 补充原则，包括用法用量、用药疗程等，目前尚无统一的指南或规范。维生素 B_{12} 注射液说明书中巨幼细胞性贫血的推荐剂量为一日 0.025 ～ 0.1 mg 或隔日 0.05 ～ 0.2 mg，该患者的用量为 0.5 mg qd，超出了说明书推荐的剂量。查阅国内相关指南[7-8]，大部分对维生素 B_{12} 的使用剂量未做推荐。2019 年《中国骨科手术围手术期贫血诊疗指南》[8] 中巨幼细胞性贫血推荐维生素 B_{12} 注射液，0.5 mg 每周 3 次。美国 FDA 说明书[9] 中对于恶性贫血推荐维生素 B_{12} 注射液初始剂量为 1 mg 肌内注射，每日一次，连用 6 ～ 7 d，如治疗有效，每日 0.1 mg，连用 7 d，然后隔 3 ～ 4 d 用 0.1 mg，维持 2 ～ 3 周；维持剂量：0.1 ～ 1 mg 一个月一次，终身治疗。Green 等[10] 建议对于存在吸收障碍的患者，维生素 B_{12} 注射液 1 mg 肌内注射每日或隔日一次，连续 1 周，之后每周 1 次，最多持续 8 周，然后每 3 ～ 4 周注射一次。因此，维生素 B_{12} 注射液在不同指南、文献、说明书中的推荐剂量各不相同，国外说明书、权威文献及国内相关指南中推荐的剂量均大于国内说明书，一般先大剂量，再小剂量维持治疗。因此，该患者初始使用剂量不超过国外说明书及文献推荐的最大推荐剂量，故认为是合理的。

2.1.2 胃肠内维生素 B_{12} 的补充 口服维生素 B_{12} 的吸收主要依赖内因子，全胃切除术后，由于内因子的缺乏，人们普遍认为，唯一合适和有效的治疗方法是肌内注射。然而，这不仅增加了治疗成本，也降低了患者的依从性[11]。但目前已有研究表明，口服维生素 B_{12} 可以成功治疗内因子缺乏引起的贫血[12-13]。Moleiro 等[12] 探讨肠内补充维生素 B_{12} 对全胃切除术患者维生素 B_{12} 缺乏症的疗效，结果表明每日口服 1 mg 的维生素 B_{12} 治疗 6、12、18、24 个月，体内维生素 B_{12} 水平进行性升高，并且也没有患者出现维生素 B_{12} 缺乏相关的症状。Green 等[10] 也指出对于吸收障碍患者每日可口服 2 mg 高剂量片剂补充，直至缓解，然后每日 1 ～ 2 mg 维持治疗。造成这种差异的原因可能与其非内因子依赖途径有关。非内因子依赖途径是一种通过肠屏障的被动扩散，被动扩散仅发生在 100 ～ 1000 μg 的超生理剂量，并随着摄入剂量的增加而增加[14]，大剂量口服维生素 B_{12}，虽然吸收率低，仍然可以满足每日所需的维生素 B_{12}[12]。然而，我国维生素 B_{12} 口服剂型的规格为 25 μg，如果服用高剂量（1 ～ 2 mg），一日需要服用 40 ～ 80 片，一方面属于超说明书用药，另一方面也大大降低了患者的依从性。因此，在我国对于全胃切除术后维生素 B_{12} 缺乏的患者胃肠内补充维生素 B_{12} 可能合适。

患者出院带甲钴胺片，甲钴胺是维生素 B_{12}

家族的一员，可直接参与体内的生化反应。日本的一项研究表明，对于全胃切除术后维生素 B_{12} 缺乏的患者，每日口服甲钴胺 500 μg 治疗 3、6、12 个月均可以显著升高血清维生素 B_{12} 水平[15]。但甲钴胺片的适应证仅有周围神经病，因此用于贫血的治疗也属于超说明书用药，临床药师将查阅的文献和医师进行交流，同时和医师一起与患者进行了沟通，征求了患者的同意，最后出院带药选择了甲钴胺片。

2.1.3 铁剂的选择 铁元素以 Fe^{2+} 的形式吸收、Fe^{3+} 的形式运输，最后以 Fe^{2+} 的形式被利用[16]。药物中的铁比如硫酸亚铁、富马酸亚铁等无机铁，琥珀酸亚铁、富马酸亚铁等有机铁都是二价铁，进入体内后也容易被氧化成三价铁，而胃酸环境可促 Fe^{3+} 转变为 Fe^{2+}，且酸性环境有利于铁的溶解而有助于吸收，因此胃酸缺乏的患者会影响铁的吸收[17-18]。多糖铁复合物为螯合铁，以完整分子形式被胃肠道吸收，不含游离铁离子，且对铁的吸收不受胃酸和食物成分的影响[19]。因此，对于该患者，在全胃切除的情况下选择多糖铁复合物更合适。

2.2 全胃切除术后消化酶制剂的选择

全胃切除术后消化酶制剂的补充原则，包括药物的选择、用量等也没有统一的指南或规范，2018 年《胰腺外分泌功能不全诊治规范》可以给我们提供一定的参考[20]。胃部分切除患者胰腺外分泌功能不全（PEI）的发生率约为 70%，全胃切除患者 PEI 发生率高达 100%[21]。胃切除患者体内脂肪酶分泌显著降低，并且脂肪消化吸收不良较蛋白质或糖类出现得早且较明显[22]。因此无论何种原因导致的 PEI，胰酶替代治疗均是首选治疗方法。胰酶制剂的选择及用量主要取决于其所含的脂肪酶量，成人推荐初始剂量为每餐 25 000 ～ 40 000 U 脂肪酶，如疗效不佳，可依个体增加剂量，最大剂量可用至每餐 75 000 ～ 80 000 U 脂肪酶。

临床常用的消化酶制剂包括米曲菌胰酶片、胰酶肠溶胶囊及复方消化酶胶囊等。米曲菌胰酶片在制作工艺上采用 pH 值敏感的复合包衣，外层胃溶衣在胃内溶解，迅速释放出米曲菌酶，对胃内的蛋白质、淀粉和纤维素进行分解；内层肠溶衣可保护核心的胰酶免受胃液破坏，保证胰酶在肠道释放，在肠道内发挥消化作用。但是，对于全胃切除的患者，一方面胃溶衣的溶解会受到影响，另一方面肠溶衣的溶解可能也不完全，因此会影响药物的治疗效果。复方消化酶胶囊内含橙、白、绿三种颜色的相互独立的膜衣片，可分别于胃底、胃窦及十二指肠三个不同部位（不同 pH 环境）中崩解释放并发挥作用，对于全胃切除的患者同样存在释放不充分的问题，因此也不适用于该患者。胰酶肠溶胶囊在胃内崩解释放超微微粒，与食物混合并分布于食糜中，当微粒到达小肠时，其微粒包衣迅速崩解，释放出脂肪、淀粉和蛋白酶促进食物的消化。对于全胃切除的患者，建议患者把胶囊打开，将胰酶微粒与食物混合后服用，这样可以避免胶囊的崩解受到胃的影响。胰酶肠溶胶囊中胰脂肪酶含量是最高的，根据诊治规范推荐的脂肪酶的用量，在说明书推荐剂量范围内，只有胰酶肠溶胶囊能满足患者对于脂肪酶的需求，其他的几种消化酶制剂的用量均超过说明书推荐剂量，因此该患者选择胰酶肠溶胶囊更合适。

3 小结

贫血及消化不良是胃癌胃切除术后的长期并发症，维生素 B_{12}、铁剂及消化酶制剂是这类患者需要长期甚至终身服用的药物。当没有相关的指南或专家共识可以参考时，临床药师通过查阅文献、国内外说明书，对药物的药理作用及药代动力学进行全面研究，结合患者自身情况，协助医师选择合适的治疗药物。对患者的消化酶制剂进行用药指导，帮助患者更好地配合治疗，提高依从性，同时追踪患者的治疗效果，关注相关疾病，总结临床经验，更好地促进临床合理用药。

参考文献

[1] Kim JH，Bae YJ，Jun KH，et al. Long-term trends in hematological and nutritional status after gastrectomy for gastric cancer [J]. J Gastrointest Surg，2017，21（8）：1212-1219.

[2] Hu Y，Zaydfudim VM. Quality of life after curative resection for gastric cancer：survey metrics and implications of surgical technique [J]. J Surg Res，2020，251：168-179.

[3] Lim CH，Kim SW，Kim WC，et al. Anemia after gastrectomy for early gastric cancer：long-term follow-up observational study [J]. World J Gastroenterol，2012，18（42）：6114-6119.

[4] Langan RC，Goodbred AJ. Vitamin B_{12} deficiency：recognition and management [J]. Am Fam Physician，2017，96（6）：384-389.

[5] Guéant JL，Guéant-Rodriguez RM，Alpers DH. Vitamin B_{12} absorption and malabsorption [J]. Vitam Horm，2022，119：241-274.

[6] Oh R，Brown DL. Vitamin B_{12} deficiency [J]. Am Fam Physician，2003，67（5）：979-986.

[7] 中华医学会外科学分会，中华外科杂志编辑委员会 . 普通外科围手术期缺铁性贫血管理多学科专家共识 [J]. 中华外科杂志，2020，58（4）：252-256.

[8] 康鹏德，黄强，沈慧勇，等 . 中国骨科手术围手术期贫血诊疗指南 [J]. 中华骨与关节外科杂志，2019，12（11）：833-840.

[9] Cyanocobalamin [EB/OL].（2023-10-03）[2024-4-2]. https：//www. drugs. com/dosage/cyanocobalamin. html.

[10] Green R，Allen LH，Bjørke-Monsen AL，et al. Vitamin B（12）deficiency [J]. Nat Rev Dis Primers，2017，3：1-19.
[11] Kolber MR，Houle SK. Oral vitamin B_{12}：a cost-effective alternative [J]. Can Fam Physician，2014，60（2）：111-112.
[12] Moleiro J，Mão de Ferro S，Ferreira S，et al. Efficacy of long-term oral vitamin B_{12} supplementation after total gastrectomy：results from a prospective study [J]. GE Port J Gastroenterol，2018，25（3）：117-122.
[13] Andrès E，Henoun Loukili N，Noel E，et al. Effects of oral crystalline cyanocobalamin 1000 μg/d in the treatment of pernicious anemia：an open-label，prospective study in ten patients [J]. Curr Ther Res Clin Exp，2005，66（1）：13-22.
[14] Berlin H，Berlin R，Brante G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B_{12} without intrinsic factor [J]. Acta Med Scand，1968，184（4）：247-258.
[15] Namikawa T，Maeda M，Yokota K，et al. Enteral vitamin B_{12} supplementation is effective for improving anemia in patients who underwent total gastrectomy [J]. Oncology，2021，99（4）：225-233.
[16] 中华医学会血液学分会红细胞疾病（贫血）学组 . 铁缺乏症和缺铁性贫血诊治和预防的多学科专家共识 [J]. 中华医学杂志，2022，102（41）：3246-3256.
[17] 徐秀丽，李元梓 . 补铁剂及铁剂的临床应用 [J]. 社区医学杂志，2009，7（8）：3-4.
[18] 陈和生，孙振亚，刘巧玲，等 . 模拟生物矿化制备多糖铁的新方法 [J]. 中南药学，2005，3（1）：3-4.
[19] 孙丙政，王云峰，黄聪，等 . 口服补铁剂及多糖铁络合物的研究进展 [J]. 微量元素与健康研究，2009，26（5）：64-67.
[20] 中国医师协会胰腺病专业委员会慢性胰腺炎专委会 . 胰腺外分泌功能不全诊治规范（2018，广州）[J]. 临床肝胆病杂志，2019，35（2）：294-298.
[21] Pezzilli R，Andriulli A，Bassi C，et al. Exocrine pancreatic insufficiency in adults：a shared position statement of the Italian association for the study of the pancreas [J]. World J Gastroenterol，2013，19（44）：7930-7946.
[22] 翟力新 . 胰酶肠溶胶囊和复方阿嗪米特肠溶片治疗酒精性脂肪肝合并消化不良的疗效 [J]. 江苏医药，2011，37（17）：2038-2040.

（收稿日期：2024-04-02；修回日期：2024-06-08）

临床药师参与肿瘤患者围手术期全营养混合液中脂肪乳诱导血小板减少伴血栓的药学监护

周琴[1]，潘晓锋[2]（1. 上饶市人民医院药学部，江西 上饶 334000；2. 温州医科大学附属第一医院药学部，浙江 温州 325000）

摘要：临床药师参与肿瘤患者围手术期全营养混合液中脂肪乳诱导血小板减少伴血栓的诊疗过程，提出治疗与监护建议，给予个体化无脂肪乳、无脂溶性维生素的营养液配方，并参与治疗方案的制订，患者血小板计数、肝功能、凝血功能逐渐恢复正常且没有新发和进展性血栓形成。

关键词：临床药师；围手术期；全营养混合液；脂肪乳；血小板减少伴血栓；药学监护
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2024)11-3111-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.046

全营养混合液（TNA）是将七大营养物质混合，TNA 主要引起代谢性、感染和机械相关并发症，在没有营养支持小组时以代谢性并发症为主[1]。但随着 TNA 规范配制和营养支持小组的成立，代谢性并发症显著减少，肿瘤患者围手术期使用 TNA 时出现血小板（PLT）减少伴血栓的报道更是罕见，现以临床药师参与 1 例 TNA 诱导 PLT 减少伴血栓的围手术期营养支持为例，通过脂肪乳的代谢特点及文献报道，提出个体化的肠外营养（PN）方案并参与治疗方案制订，为临床安全、合理地使用 TNA 提供参考。

1 病历摘要

患者，男，66 岁，体质量指数（BMI）24.84 $kg \cdot m^{-2}$。诊断为“胃窦腺癌、2 型糖尿病”。无食物药物过敏史。完善相关检查后，于 9 月 7 日行“腹腔镜下胃大部切除术、D2 淋巴结切除术”。术后给予 TNA（含长链脂肪乳）营养支持，9 月 18 日：PLT $45\times10^9 \cdot L^{-1}\downarrow$、D- 二聚体 > 20 $mg \cdot L^{-1}\uparrow$，CT 示门静脉血栓，给予依诺肝素钠 0.4 mL 抗凝，并暂停 TNA。9 月 19 日：PLT $22\times10^9 \cdot L^{-1}\downarrow$，结合有门静脉血栓，医师首先考

基金项目：江西省卫生健康委科技计划（No.202212754）。
作者简介：周琴，女，副主任药师，主要从事肠外肠内营养方面的研究，email：zhouqin200508@126.com *通信作者：潘晓锋，男，主管药师，主要从事营养药学方面的研究，email：pxfwzmc@163.com

虑为肝素诱导性血小板减少，停用一切肝素及低分子量肝素，改为利伐沙班片（10 mg bid）抗凝。9 月 20 日 PLT 短暂上升，伴随嗜酸性粒细胞、谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）升高，凝血功能异常，再次使用 TNA（含结构脂肪乳），9 月 21 日患者 PLT 再次下降，停 TNA。临床药师详细问诊，发现肝素使用在 PLT 降低之后，时间上缺乏关联性，停用 TNA 后 PLT 有短暂上升，再次使用又下降，可能是 TNA 引起的 PLT 减少伴血栓，重点怀疑脂肪乳，建议配制无脂肪乳、脂溶性维生素的 PN，临床医师采纳建议，同时给予双环醇、复方甘草酸苷护肝，考虑出血风险，利伐沙班减量为 10 mg qd 抗凝。9 月 25 日患者 PLT 恢复正常，9 月 27 日 AST 26 $U•L^{-1}$、ALT 93 $U•L^{-1}$，凝血功能好转。

10 月 4 日患者 PLT $232\times10^{9}•L^{-1}$，10 月 6 日在患者知情同意并严密监控情况下使用结构脂肪乳，再次出现 PLT 下降趋势，遂急停脂肪乳，测免疫球蛋白 E（IgE）402.7 $IU•mL^{-1}$↑，10 月 10 日患者进食可、血栓未进展、无新发血栓，病情好转，予以出院。继续使用利伐沙班片（10 mg qd）抗凝，建议疗程一般至少 3 个月，3 个月后再评估。患者住院期间 PLT、凝血酶原的活动度（PTA）、纤维蛋白原（FIB）、活化部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原国际标准化比值（INR）、凝血酶原时间（PT）、凝血酶时间（TT）、D- 二聚体、嗜酸性粒细胞、ALT、AST 变化见表 1。患者住院期间营养支持治疗方案及氨基酸、葡萄糖、离子浓度监护见表 2。

表 1 患者住院期间生理指标变化表

时间	PLT/（$\times10^{9}•L^{-1}$）	PTA /%	FIB/（$g•L^{-1}$）	APTT/s	INR	PT/s	D- 二聚体 /（$mg•L^{-1}$）	TT/s	嗜酸性粒细胞 /（$\times10^{9}•L^{-1}$）	ALT/（$U•L^{-1}$）	AST/（$U•L^{-1}$）
8 月 29 日	123	112	3.79	39.6	0.93	12.4	0.33	15.5	0.20	54↑	34
9 月 8 日							1.93↑		0.09	46	31
9 月 11 日									0.28	50	20
9 月 16 日										22	19
9 月 18 日	45↓	80	4.83↑	42.7	1.15	14.6	＞ 20.00↑	14.7	0.63↑		
9 月 20 日	20↓	45↓	4.02↑	46.9↑	1.77↑	20.5↑	＞ 20.00↑	14.9	0.92↑	854↑	270↑
9 月 21 日	25↓	44↓	4.15↑	46.3↑	1.84↑	21.1↑	12.73↑	14.7	1.31↑		
9 月 22 日	40↓	72	4.55↑	41.6	1.23↑	15.4↑	10.46↑	14.6	1.71↑	447↑	77↑
9 月 23 日	54↓	87	4.5↑	40.9	1.09	14.0	15.41↑	14.8	0.57↑	305↑	50↑
9 月 25 日	128	80	4.81↑	44.2↑	1.15	14.6	8.46↑	14.6	0.08		
9 月 26 日	166	81	5.03↑	42.0	1.14	14.5	6.73↑	14.7	0.04		
9 月 27 日	165	76	4.93↑	44.6↑	1.19↑	15↑	5.96↑	14.7	0.06	93↑	26
9 月 29 日	232	95	4.62↑	40.7	1.03	13.4	6.10↑	16.1	0.04	62↑	26
10 月 4 日	232	91	4.29↑	40.0	1.06	13.7	2.02↑	16.3	0.03		
10 月 7 日	166	70	3.51	43.5↑	1.26↑	15.7↑	1.54↑	16.0	0.21	44	27
10 月 8 日	128	86	3.95	38.7	1.10	14.1	1.31↑	17.0	0.18		
10 月 16 日	136	84	4.37↑	44.6↑	1.12	14.3	0.87↑	16.3	0.09	27	31

2 讨论

2.1 全营养混合液中脂肪乳导致不良反应（ADR）的关联性分析

围手术期可引起药源性 PLT 减少症的药物有抗菌药物、5-HT3 受体拮抗剂、解热镇痛药等，能引起 PLT 减少伴血栓的药物有肝素、血小板糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 抑制剂、疫苗等 [2]。TNA 里成分较多，最常见过敏原为脂肪乳（48.4%）、复合维生素（33.3%）和氨基酸（9%）[3]，主要引起全身性及给药部位、胃肠系统、速发过敏反应等 [4]，脂肪乳导致的 ADR 可在输液后几分钟，也可延迟至数年（长期 PN）发生 [5]，与Ⅰ型过敏反应相关 [6]，与原患疾病虽然无特异性相关性，但 34%ADR 是发生在肿瘤和肿瘤术后患者中 [7]。脂肪乳代谢产生的白三烯、前列腺素、花生四烯酸及血栓素 A_2 等物质，参与炎症细胞的再聚集、血管通透性的调节及 PLT 的聚集 [8]，可导致 PLT 减少、PLT 功能障碍、高凝、出血、血栓栓塞事件等 [9]。

该患者围手术期使用的头孢美唑、帕洛诺司琼、依诺肝素都可引起 PLT 减少，根据药品不良反应因果关联评定依据，头孢美唑、帕洛诺司琼已停用 6 d，PLT 仍持续在下降，所以不考虑这两种药物。依诺肝素是 PLT 减少后使用的，时间上缺乏关联性。从时间关联性、停药好转、再激发再出现，可以肯定为脂肪乳诱导所致血小板减少。APTT 和 PT 可用于判断凝血功能障碍 [9]。术前、9 月 18 日（术后 11 d）APTT、PT 正常，FIB 轻微升高，9 月 20 日凝血功能、AST、ALT 异常，指标异常是 PLT 减少之后，所以认为血栓是伴随脂肪乳诱导的 PLT 减少所产生。

2.2 TNA 中脂肪乳 PLT 减少伴血栓机制讨论

David 等 [10] 认为游离脂肪酸对内皮细胞有毒性，导致促炎因子（肿瘤坏死因子 -α、IL-1、IL-6）释放，使血液中的脂质凝集到其他分子中，从而阻塞血管，并提出组织和内皮细胞损伤启动凝血系统的凝结理

表 2 患者肠内肠外营养支持治疗方案及氨基酸、葡萄糖、离子浓度

时间	蛋白量 /[g/（kg·d）]	总能量 /kJ	EN 方案	PN 方案	PN 离子浓度 /（mmol·L^{-1}）	氨基酸浓度 /%	葡萄糖浓度 /%
8 月 30 日—9 月 6 日	1.20 ～ 1.40	7116	糖尿病半流质饮食	复方氨基酸 18AA 21.25 g ＋丙氨酰谷氨酰胺 10 g	—	—	—
9 月 7 日—9 月 10 日	0.82	5023	禁食（少量饮水 50 mL）	脂肪乳氨基酸（17）葡萄糖（11%）注射液 1440 mL ＋氯化钾（10%）10 mL ＋丙氨酰谷氨酰胺 100 mL ＋ ω-3 鱼油脂肪乳 100 mL ＋胰岛素 24 IU	单价阳离子 42.05，二价阳离子 3.64	3.27	6.91
9 月 11 日—9 月 12 日	1.10	7409	糖尿病清流质饮食				
9 月 13 日—9 月 14 日	1.60 ～ 1.70	11 720	糖尿病半流质饮食（进食后不适）				
9 月 15 日—9 月 17 日	0.52	4604	禁食（腹痛）	脂肪乳氨基酸（17）葡萄糖（11%）注射液 1440 mL ＋氯化钾（10%）10 mL ＋ ω-3 鱼油脂肪乳 100 mL ＋胰岛素 24 IU	单价阳离子 44.77，二价阳离子 3.87	2.19	7.35
9 月 18 日—9 月 19 日			清流质饮食（少）	暂停			
9 月 20 日—9 月 21 日	0.95	4604	禁食	维生素 B_6 注射液 200 mg ＋ 10% 葡萄糖 500 mL ＋结构脂肪乳（C6 ～ 24）250 mL ＋胰岛素 16 IU ＋维生素 C 注射液 2 g ＋氯化钾（10%）30 mL ＋ 10% 浓氯化钠 40 mL ＋硫酸镁 5 mL ＋葡萄糖酸钙 10 mL ＋脂溶性维生素 10 mL ＋多种微量元素 10 mL ＋ 8.5% 复方氨基酸 18AA 500 mL ＋ 50% 葡萄糖注射液 100 mL ＋丙氨酰谷氨酰胺 100 mL	单价阳离子 70.09，二价阳离子 7.25	4.03	6.45
9 月 22 日—9 月 23 日	0.64	3223	禁食	维生素 B_6 注射液 200 mg ＋ 5% 葡萄糖注射液 500 mL ＋ 5% 葡萄糖氯化钠注射液 500 mL ＋胰岛素 18 IU ＋维生素 C 注射液 2 g ＋硫酸镁 5 mL ＋葡萄糖酸钙 10 mL ＋多种微量元素 10 mL ＋ 8.5% 复方氨基酸 18AA 500 mL ＋ 50% 葡萄糖注射液 200 mL	单价阳离子 34.37，二价阳离子 7.25	2.82	9.11
9 月 24 日—9 月 25 日	0.80	4604	全流质饮食				
9 月 26 日—10 月 10 日	1.0 ～ 1.4	8371	糖尿病饮食	暂停	—	—	—
10 月 6 日			糖尿病饮食	结构脂肪乳（C6 ～ 24）250 mL	—	—	—

论。脂肪栓塞也可引起 PLT 进行性减少[11-12]。外源性脂肪乳由于缺乏胆固醇，肝脏的脂肪分解作用降低，可引起脂肪聚集进而引起肝损伤[13-14]。

本例患者脂肪乳诱导的 PLT 减少伴血栓可能与 IgE 介导的过敏反应、脂肪酸损害组织和内皮细胞启动凝血系统、肝损伤有关。

2.3 临床药师监护要点

2.3.1 围手术期营养筛查与评估 推荐围手术使用营养风险筛查（NRS-2002）、患者主观整体评估（PG-SGA）进行筛查与评估。入院对患者进行 NRS-2002 评分为 3 分，患者 PG-SGA 评估为 B 级，存在营养不良。

2.3.2 营养方案调整 围手术期首选经口 / 肠内营养支持，当从正常的食物中获能不能满足需求，经口摄入或摄入不足（＜ 50%）超过 7 d 应尽早管饲；肠内摄入能量需求（＜ 50%）超过 7 d，建议肠内联合 PN[15]。该患者术后 2 d 少量饮水后无不适，且胃肠引流管无引流液，拔除胃管，开始经口进食，半流质饮食后出现胃胀不耐受（5 分），遂禁食，同时给予甲氧氯普胺、西甲硅油乳剂治疗，鼓励患者腹胀好转后经口进食，后因无明显诱因出现 PLT 减少伴血栓停用所有可疑治疗与饮食。9 月 24 日确认脂肪乳诱导 ADR 后开始半流质饮食。

患者术后使用 TNA，可使营养物质更好地被利用、减少静脉输注管道、减少污染风险，减少代谢性并发症，且便于管理、节省费用。其中脂肪乳提供高能量，可减少碳水化合物的摄入量，减少高糖输注引起的 ADR；同时可降低渗透压减少对静脉刺激。脂溶性维生素是重要的有机微量营养素，根据时间相关的降解动力学原理，应加入至含脂的混合液或脂肪中输注，患者脂肪乳诱导 PLT 减少伴血栓，停脂肪乳同时停脂溶性维生素，配制无脂肪乳、脂溶性维生素的“二合一”PN[16]，只能提高葡萄糖量保证最低能量供应，患者又患有糖尿病，所以使用胰岛素用量控制围手术期血糖在 10 mmol·L^{-1} 左右。同时鼓励患者多经口进食，使用甲氧氯普胺、西甲硅油乳剂积极改善胃肠不耐受情况，保证能量尽早达标，9 月 26 日肠内能摄入 60% 以上，停用 PN。

2.3.3 监护 TNA 使用过程中脂肪乳稳定性和相容性、输注速率和剂量带来的影响 TNA 中氨基酸浓度、阳离子浓度、葡萄糖浓度等较易影响脂肪乳的稳定性，导致脂肪乳破乳，形成栓塞。输

注速度过快也可增加 ADR 风险，不推荐脂肪乳输液速度快于估算的最大氧化率 1.2 ～ 1.7 mg/（kg • min）[9]。临床药师监护该患者围手术期 TNA 的各浓度在合理范围内，配制过程中脂肪乳无破乳现象。50 g 脂肪乳输注了 16 h，因此脂肪乳稳定性和相容性、输注速率和剂量均合理，所以不考虑栓塞为脂肪乳破乳导致。

2.3.4 ADR 及相关问题的处理 急性药物性肝损伤推荐使用异甘草酸镁、双环醇治疗。患者使用 TNA 13 d 后出现了肝损伤及嗜酸性粒细胞升高，使用复方甘草酸苷、双环醇片保肝，复方甘草酸苷同时也有抗过敏、选择性阻碍花生四烯酸代谢酶的作用。

对急性血栓形成患者，通常首先使用静脉抗凝药，以便尽快达到全剂量治疗性抗凝。尚不清楚能否使用肝素对脂肪乳诱导的 PLT 减少伴血栓的患者治疗，建议选快速起效的新型口服抗凝药 [17]。存在出血危险因素可减低抗凝剂的剂量（预防剂量或剂量减半）、暂停抗凝剂等措施 [18]。对于首次发生急性静脉血栓的活动性肿瘤患者，抗凝治疗应至少持续 3 ～ 6 个月。该患者存在 PLT 计数＜ $50\times10^{9}\cdot L^{-1}$、凝血异常、肿瘤等出血高风险，所以利伐沙班 10 mg bid 抗凝治疗 3 d 后建议改为 10 mg qd 进行抗凝，血栓稳定未进展，抗凝 3 个月。

该患者后续的营养治疗贯穿整个抗肿瘤过程，所以在严密的监测下进行了再激发试验。最后确保患者知晓，避免使用该药物。

3 小结

临床营养药师在围手术期监护肿瘤患者安全、合理地使用 TNA 直接关系到患者的预后，在 TNA 营养支持时应严格监测 TNA 的稳定性、相容性、控制用药剂量和输注速率，密切监测 PLT 计数，一旦发生 PLT 减少伴血栓应警惕是由脂肪乳引起的，及时停药，治疗、评估、记录、监护患者的症状或体征。脂肪乳诱导 PLT 减少伴血栓的具体机制尚不清楚，可能与 IgE 介导的过敏反应、脂肪酸损伤组织和内皮细胞启动凝血系统、肝损伤有关。临床药师作为营养支持小组中的一员，应结合患者的具体情况从药师的角度协助医师做好用药监护。

参考文献

[1] Staun M，Pironi L，Bozzetti F，et al. ESPEN guidelines on parenteral nutrition：home parenteral nutrition（HPN）in adult patients [J]. Clin Nutr，2009，28（4）：467-479.

[2] Arnold DM，Kukaswadia S，Nazi I.A systematic evaluation of laboratory testing for drug-induced immune thrombocytopenia [J]. J Thromb Haemost，2013，11（1）：169-176.

[3] Christian VJ，Tallar M，wilia CLS，et a1. Systematic review of hypersensitivity to parenteral nutrition [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr，2018，42（8）：1222-1229.

[4] 李晓琳，张凡，胡扬，等 . 基于美国 FAERS 数据库的静脉注射用脂肪乳剂不良反应的药物警戒研究 [J]. 肠外与肠内营养，2022，29（4）：193-200.

[5] Hayes BD，Gosselin S，Calello DP，et al. Systematic review of clinical adverse eventsreported after acute intravenous lipid emulsion administration [J]. Clin Toxicol，2016：54（5）：365-404.

[6] Franz N，Pleva M，Nordbeck S. Lipid emulsion therapies and type 1 hypersensitivity reactions：risk assessment and management [J]. Nutr Clin Pract，2021，36（2）：398-405.

[7] 杨英，董莉蓉，柯英，等 . 50 例脂肪乳注射液致药物不良反应调查分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2009，25（2）：167-168.

[8] Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes：effects，mechanisms and clinical relevance [J]. Biochim Biophys Acta，2015，1851（4）：469-484.

[9] Kisioglu B，Tamer F. Impact of lipid emulsions in parenteral nutrition on platelets：a literature review [J]. J Nutr Sci，2024，13（18）：1-17.

[10] David LR，Christopher AM. Fat embolism and fat embolism syndrome [J]. J Am Acad Orthop Surg，2019，27（8）：E346-E355.

[11] 张群，张伯勋，刘郑生，等 . 血小板在脂肪栓塞综合征发病及诊断中的作用 [J]. 中华创伤杂志，2000，16（3）：160-162.

[12] 涂永久，郑维锋，刘冬，等 . 胃癌手术中并发肺脂肪栓塞综合征死亡 1 例并文献复习 [J]. 重庆医学，2012，41（30）：3177-3179.

[13] Nandivada P，Carlson SJ，Chang MI，et al. Treatment of parenteral nutrition-associated liver disease：the role of lipid emulsions [J]. Adv Nutr，2013，4（6）：711-717.

[14] 游利江，唐密密，邓晟 . 肠外营养致肝功能异常的主动监测和危险因素分析 [J]. 中南药学，2024，22（3）：575-579.

[15] Weimann A，Braga M，Carli F，et al. ESPEN guideline：clinical nutrition in surgery [J]. Clin Nutr，2021，40（7）：4745-4761.

[16] 顾融融，陈玲，吉顺莉，等 . 1 例重症急性胰腺炎继发 ICU 获得性衰弱的营养治疗分析 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2454-2457.

[17] Arnold DM，Nazi I，Warkentin TE，et al. Approach to the diagnosis and management of drug-induced immune thrombocytopenia [J]. Transfus Med Rev，2013，27（3）：137-145.

[18] Nishimoto Y，Yamashita Y，Kim K，et al. Risk factors for major bleeding during anticoagulation therapy in cancer-associated venous thromboembolism-from the command VTE registry [J]. Circ J，2020，84（11）：2006-2014.

（收稿日期：2024-03-27；修回日期：2024-05-23）

中药与临床

基于方证相应理论探讨四逆散现代临床应用

宋姗姗，黄博臻，王亮，姜敏*（首都医科大学附属北京世纪坛医院，北京　100038）

摘要：四逆散是《伤寒论》中治疗阳郁厥逆的经典名方，由柴胡、芍药、枳实、炙甘草四味药组成，后世的临床应用范围扩展到治疗肝郁气滞、肝脾不调证，其配伍精妙，多法兼具，是后世诸多方剂的基础方剂。四逆散的临床应用在守正中不断丰富和发展，本文基于方证相应总结了四逆散在现代临床应用上的丰富与创新。守正与创新是中医发展的基石，方证相应研究是中医现代化研究的重要内容，是经方创新应用范围的关键，研读以四逆散为代表的经方新的适应证，有助于理解经方取效的基础，开阔经方临床应用的视野。

关键词：方证相应；四逆散；伤寒论；临床应用

中图分类号：R249，R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-3115-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.047

“方证”是以方为名的证，是用方的指征与证据，“方证相应”强调方与证的对应性，证以方名，方为证立，方随证转。临床上重视抓主证，有是证则用是方，用是方而治是证，而不受病名的约束。四逆散出自张仲景的《伤寒论》，方中柴胡、芍药、枳实、炙甘草各十分，主治阳郁厥逆证，后世已将其扩展应用于肝郁气滞、肝脾不调证。四逆散证是人体无阳气不足，乃阳气得不到正常输布，气机不畅所致，其现代临床应用范围包括抑郁性疾病、失眠、炎症性疾病、胃肠道疾病、妇科疾病、肝脏疾病、心血管疾病等众多疾病，临床实用价值颇高。基于“方证相应”应用经方是疗效的保障，已成为中医临床的核心思维方式，本文通过查阅资料，梳理归纳经方四逆散的配伍规律、总结四逆散常用类方及现代临床应用范围，基于“方证相应”古方新病新用，可挖掘拓展经方的应用广度，对中医的守正创新有着重要的意义。

1　四逆散的组方配伍分析

《神农本草经》言：“枳实，气味苦寒 ..... 除寒热结”“芍药，味苦平 ..... 破坚积寒热”“柴胡，味苦 ..... 破坚积寒热”“甘草，味甘平，主五脏六腑寒热邪气”，四药寒热并进，柴胡疏肝行气，透泄郁热，《医学正传》云：“柴胡能令清气从左而上达，”故其又能生发清阳之气。枳实行气导滞，泻热破结，《本草新编》云：“枳实性速而治下，”故其又能降逆胃胆浊气。芍药养血敛阴，使得郁热外透而不伤阴，且酸敛以补肝体，正切肝之特性，方后注曰白饮和服，与炙甘草一起补益中土之气以资阴阳之气自相顺接，使邪去郁解，清升浊降。四药组方严谨，配伍精当，宗其立方之意，后世医家在临床应用方面多有发挥，充分理解四逆散的药物组合的配伍特点对掌握四逆散的辨证要点至关重要，具体见表 1。

表 1　四逆散药物组合特点及主症

组合	配伍特点	病机	主症
柴胡 - 枳实	升降气机，疏肝理脾	阳郁厥逆，肝郁脾滞	四肢不温，胸胁苦满，情绪低落，腹中痛，小便不利，泄利下重，咳嗽，心悸，脉弦
柴胡 - 芍药	气血兼调，散中有收		
枳实 - 芍药	补泻兼顾，动静结合		
芍药 - 炙甘草	守而不走，体用兼顾		

2　基于协同增效之常用类方

许多经典方剂如逍遥散、柴胡疏肝散、血府逐瘀汤、疏肝散等均是脱胎于四逆散，方中均体现了“调气为要”。《素问·至真要大论》云：“疏

基金项目：国家中医药管理局基本中医药循证能力建设项目（No.2019XZZX-JB004）；中国铁路总公司专项课题（No.J2020Z606）；北京市中医药科技发展资金项目（No.JJ-2020-57）。

作者简介：宋姗姗，女，硕士研究生，主要从事中医药防治肿瘤研究，email：1242263541@qq.com　*通信作者：姜敏，女，主任医师，教授，博士研究生导师，主要从事中医体质学、中医肿瘤学研究，email：jiangm1965@sina.com

其血气，令其条达，而致和平”，正切“所以病之生也，不离乎气；而医之治病也，亦不离乎气”，故以四逆散为核心加减可扩大主治范围，提高治疗效果。常用类方见表 2。

表 2 四逆散常用类方

合方	出处	组成	功能主治
逍遥散	《太平惠民和剂局方》	四逆散去枳实，加白术、茯苓、当归、煨姜、薄荷	肝郁脾虚血弱之头痛、目眩、纳少乏力等
柴胡疏肝散	《医学统旨》	四逆散去枳实，加陈皮、枳壳、川芎、香附	肝郁气滞引起的胁肋疼痛为主
血府逐瘀汤	《医林改错》	四逆散加桃仁、红花、当归、生地、川芎、芍药、桔梗、牛膝	肝郁气滞，胸中血瘀之胸痛、头痛等
疏肝散	《症因脉治》	四逆散去枳实，加苏梗、青皮、陈皮、钩藤、栀子	原方治疗“肝火不得卧”

3 基于方证相应谈临床应用

四逆散方证是一种以四肢厥冷、心情抑郁、失眠、胃肠功能紊乱等为主要表现的肝郁气滞、肝胃不和证，以“方证相应”理论为指导思想，充分发挥中医“异病同治”及“整体观念”的优势，谨守病机，据证验方，即方用药，临证加减化裁应用。

3.1 四逆散在抑郁症中的应用

《医方论·越鞠丸》说：“凡郁病必先气病，气得流通，郁于何有？”抑郁是一种常见的情感障碍类精神疾病，其核心病机被普遍认为是肝气郁滞、气机不畅，故临床见到情绪低落、胸部满闷、善太息、纳呆腹胀等症状皆可选用四逆散以诓其气机。基于方证相应，四逆散加减可应用于抑郁状态及原发性、继发性的抑郁症等精神性疾病。

黄元御云[1]“凡病皆‘肝’郁”，四逆散乃“郁”证之祖方，临床被广泛应用于多种类型的抑郁症。临床研究表明，四逆散加减联合米氮平治疗抑郁症在效果及安全性上均比单独口服米氮平更优[1]。在功能性消化不良伴抑郁的治疗上，有临床研究表明，与对照组马来酸多潘立酮片及氟哌噻吨美利曲辛片相比，治疗组加味四逆散治疗功能性消化不良伴抑郁的总体疗效更优[2]。产后抑郁症的发病率不断升高，不仅损害产妇的身心健康，还会危害婴儿的成长发育及家庭和社会的和谐[3-4]，在治疗产后抑郁方面，四逆散同样具有优势，有研究表明，逍遥丸中成药合四逆散煎剂的抗抑郁效果优于单用逍遥丸，且不良反应更少[5]。卒中后抑郁是卒中患者自然原因和非自然原因死亡的独立危险因素[6]，因此卒中后抑郁的防治显得尤为重要。在缺血性卒中后抑郁症的治疗中，对照组使用帕罗西汀治疗缺血性卒中后抑郁症，观察组给予加味四逆散，结果发现，联合四逆散加味组有效率优于单用西药组[7]，由此可以看出采用四逆散加味治疗可以有效改善患者的抑郁情况，稳定患者的心理状态。在冠心病患者伴抑郁症者，四逆散加味在改善焦虑、抑郁、心绞痛症状等方面均优于氟哌噻吨美利曲辛片，且外周血内皮祖细胞数量上升更高[8]。在中医辨证方面，四逆散加味方治疗辨证为肝郁脾虚型抑郁症效果优于单用西药抗抑郁治疗，加味四逆散联合草酸艾司西酞普兰治疗抑郁症的疗效显著，优于单用口服草酸艾司西酞普兰[9]。基于抑郁症用药规律数据挖掘中，柴胡、白芍使用频次排名位于前列，柴胡 - 白芍在关联规则分析中亦位列首位[10]，可见抑郁症的本质病机是肝气郁滞，抓住疾病本质准确辨证，寻求方证高度一致性，这是四逆散临床应用之精要。

3.2 四逆散在失眠中的应用

《素问·阴阳离合论》云：“太阳为开，阳明为阖，少阳为枢”，少阳主枢机功能正常，则全身气机调畅；若疏泄不及，则升降失序，阴阳不合。阳入于阴则眠，阳不入阴，枢机不利，则阴阳气不能自相顺接以维持睡眠，故基于方证相应，临床出现失眠伴善太息，性急易怒或情绪低落，手足凉、脉弦等属气郁导致气机失调、营卫受阻者皆可选用四逆散加减以调理枢机、调顺阳气。

失眠是中医药治疗的优势病种，临床效果突出且不良反应少。研究显示，接受针灸联合四逆散治疗的失眠患者，其慢波睡眠时间、快眼动睡眠时间明显延长，睡眠治疗及临床有效率明显提升[11]。也有研究表明，与对照组艾司唑仑治疗相比，观察组用四逆散加减结合针灸治疗更显著改善肝郁脾虚型失眠患者的睡眠质量，且不良反应少[12]。除了单独应用外，四逆散联合西药治疗也取得了显著的临床疗效。已有临床报道显示，四逆散联合马来酸咪达唑仑片治疗失眠比单独应用马来酸咪达唑仑片临床疗效更好，可更有效改善患者的睡眠质量及生活质量[13]。在治疗更年期失眠中，西医治疗多以劳拉西泮等镇静药为主，长期服用出现诸多不良反应，还会产生耐药，有研究表明，与服用劳拉西泮片相比，服用四逆散加味方改善失眠症状的效果理想，睡眠质量显著提高，且不易复发[14]。

3.3 在胃肠疾病的应用

《临证指南医案》曰：“肝为起病之源，胃为传病之所”，肝气郁结，疏泄失职，横逆犯胃。四逆散调和脾胃、透达气机，体现了“见肝之病，知肝传脾，当先实脾”的理论。基于方证相应，可应用于胃脘胀痛、泄利下重或便秘、嗳气、反酸、食欲减退、弦脉等症，临床多见于功能性消化不良、慢性胃炎、胃食管反流病、消化道溃疡、溃疡性结肠炎等多种胃肠疾病。四逆散临床可单独应用，亦可合方兼顾多个病机。

在治疗功能性消化不良方面，目前多项临床试验证明在西医治疗的基础上加用四逆散可以提高患者的临床治愈率，有效改善功能性消化不良患者胃脘疼痛、餐后饱胀、恶心、食少纳呆等多种消化不良症状，并在一定程度上减少患者不良反应的发生率，改善心理健康和生活质量[16-18]。在慢性萎缩性胃炎的治疗中，西医治疗的效果固然明显，但会出现患者依从性差以及滥用抗菌药物导致幽门螺杆菌（Hp）的耐药性等问题[19]。采用四联疗法联合四逆散加味治疗，比单独应用四联疗法临床疗效改善更显著，减轻胃黏膜炎症反应及病理改变，且具有较高的用药安全性[20]。中西医结合治疗优势明显，目前已有很多临床报道证明四逆散加味联合西医治疗有效率高，可以显著缓解腹痛、胁胀、恶心等症状，降低复发率，甚至在一定程度上可以逆转胃黏膜的病理变化，延缓或者逆转胃黏膜的萎缩、肠上皮化生和典型增生，降低胃癌的发病率，且不良反应少[21-23]。在治疗溃疡性结肠炎方面，对照组给予柳氮磺吡啶治疗，观察组给予左金丸合四逆散联合柳氮磺吡啶治疗，结果表明观察组的干预措施可减轻溃疡性结肠炎患者炎症反应，降低炎症因子的表达水平，提高治疗效果，且不增加不良反应[24]。四逆散治疗西医疾病以消化系统疾病最多，除此之外，多项临床试验结果报道四逆散加减在治疗胃食管反流病、溃疡性结肠炎、消化道溃疡、肠易激综合征等多种胃肠疾病中均临床效果显著[25-28]。

3.4 四逆散在妇科疾病的应用

《黄帝内经》曰：“妇人之生，有余于气 .....”《圣济总录》亦有云：“矧妇人纯阴，以血为本，以气为用 .....”均旨在说明了妇科疾病调气的重要性。妇科疾病的治在于疏，贵在于调，故四逆散在妇科疾病应用中较为广泛。基于方证相应，可应用于出现情绪低落、胸闷叹息、胸胁胀痛、乳房胀痛、痛经闭经、产后缺乳、月经先后无定期、脉弦等多种妇科疾病。

临床研究报道，四逆散合金铃子散加减治疗气滞血瘀型子宫内膜异位症致不孕症的临床疗效良好，与皮下注射醋酸曲普瑞林注射液、口服给药戊酸雌二醇片及黄体酮胶囊的单纯西医治疗相比，中西医结合治疗提升了患者妊娠率，调节患者的性激素水平[29]。在治疗月经病方面，有临床病例系列报道，用四逆散合参苓白术散加减治疗少女月经不调患者 11 例，观察 1 ～ 2 个月后，原有月经经期紊乱、月经经量异常、经行腹痛乏力等症状均消失[30]。在治疗慢性盆腔炎方面，中药组四逆散合五味消毒饮加味与西药组青霉素及甲硝唑注射液相比，结果显示中药组治愈率高于西药组，下腹胀痛、腰骶部疼痛等临床症状的缓解时间亦优于西药组，差异均有统计学意义[31]。另有研究证明，与单用西医治疗注射用头孢曲松钠加甲硝唑注射液治疗相比，联合四逆散加味治疗慢性盆腔炎的临床疗效确切，能明显改善中医症状，并有助于降低炎性因子水平，减轻炎症反应[32]。高催乳素血症是女性常见的内分泌疾病，西医治疗的短期疗效可，但停药易复发，且不良反应多，有临床研究报道显示西药联合四逆散加减治疗高催乳素血症，有效率高于单纯应用溴隐亭治疗，且复发率低，不良反应少，安全可靠[33]。

3.5 四逆散在肝病的应用

现代药理研究证明，四逆散通过多靶点、多信号通路发挥抗炎、抗氧化应激、抑制细胞凋亡等功能以抗肝脏损伤作用。肝胆经脉皆循胁肋，故胁肋部不适主要责之于肝胆，以气机郁滞证多见。基于方证相应，慢性肝炎、肝纤维化、脂肪肝、肝硬化腹水、慢性胆囊炎等多种肝胆疾病出现胁肋胀痛、肝区疼痛、胁下堵塞、胸闷、不思饮食、情绪低落、小便不利、手足不温、脉弦等症者皆可选用四逆散加味。

在传染性肝病的治疗中，有临床研究龙胆泻肝汤合四逆散对乙型肝炎慢加急性肝衰竭患者的疗效，对照组采用注射用还原型谷胱甘肽、异甘草酸镁注射液、注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸、前列地尔注射液、促肝细胞生长素、恩替卡韦分散片等西药治疗，试验组在此基础上加用龙胆泻肝汤合四逆散，治疗 4 周后结果显示在西医常规治疗基础上加龙胆泻肝汤合四逆散的治疗效果更优，在肝功能及中医证候评分方面均降低得更显著[34]。在代谢性脂肪肝治疗中，四逆散加味亦取得满意疗效。有临床随机平行对照试验观察四逆

散加味治疗 2 型糖尿病非酒精性脂肪性肝病疗效，对照组干预措施为血脂康，治疗组干预措施是四逆散加味，连续治疗 16 周后结果显示，加味四逆散组的总有效率高于血脂康组，加味四逆散显著改善了血脂和肝功能，抑制了氧化应激反应，且无严重不良反应 [35]。四逆散亦应用于肝纤维化的治疗，临床研究报道，在治疗慢性乙型肝炎肝纤维化患者中，对照组应用甘草酸二铵肠溶胶囊加恩替卡韦分散片口服治疗，治疗组在对照组基础上加用四逆散合四君子汤，治疗 6 个月后，在肝纤维化改善方面，治疗组患者Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原、层粘连蛋白、透明质酸水平均明显低于对照组，且治疗组肝纤维化分期构成比在治疗前后明显不同，表明四逆散合四君子汤加味方联合西药在减轻肝纤维化程度甚至逆转进程中的作用明显优于单用恩替卡韦、甘草酸二铵 [36]。

3.6 四逆散在心血管疾病的应用

《医学入门·厥》云：“气逆而不下行，则血积于心胸”，故以四逆散理气宽胸，疏利气血可以治疗胸闷气短、心悸或心胸胁痛、四肢欠温、失眠、咳嗽、情志抑郁、脉弦等症，基于方证相应，可灵活应用于心绞痛、心脏神经官能症、心律失常、急性心肌梗死、雷诺氏综合征等多种心脏及周围血管疾病。

在治疗稳定型心绞痛方面，有临床研究报道，与单纯西药常规治疗组相比，四逆散加味联合西药常规可明显改善心功能和血脂水平，并提高生活质量 [37]。在心律失常方面，有研究证明四逆汤合生脉散可以通过增强窦房结自律性、减少心肌耗氧量来治疗缓慢性心律失常 [38]。在治疗心脏神经官能症方面，四逆散合黄芪汤加减联合酒石酸美托洛尔注射液治疗，与单纯西药治疗相比，临床疗效更佳，更有效地缓解患者的抑郁与焦虑状态，且不良反应发生率更低 [39]。另外有研究证明，在急性心肌梗死方面，四逆散联合桃红四物汤及西药治疗急性心肌梗死，在心功能分级、心律失常、心电图和血清酶等方面均存在明显差异，临床效果明显优于单纯西药治疗 [40]。除了心脏常见疾病外，四逆散条达肝气，伸展郁阳，可以用来辨证治疗外周血管病变。多项临床研究结果显示四逆散合真武汤或四逆汤或阳和汤等 [41-43]，治疗雷诺氏综合征临床疗效明显，可以缩短肢端痉挛症状时间，降低病情复发率。

3.7 在炎症性疾病的应用

现代药理研究发现，四逆散中四味药均具有抗炎的作用，其发挥抗炎作用是通过多通路、多靶点降低炎症因子水平、调节细胞免疫等途径实现。“炎症”并不完全等同于“热证”，尤其是慢性炎症，以气滞血瘀型多见，治疗时必须谨遵辨证论治的法则。基于方证相应，以四逆散加味化裁梳理气机，可应用于急、慢性炎症，尤以慢性炎症出现渗出或增生、炎性粘连等见症者为主。

现代临床中，四逆散的抗炎效果受到广泛重视。除了上述治疗慢性妇科炎症及慢性胃肠道炎症性疾病外，在治疗慢性前列腺炎中亦多有报道。有研究显示，四逆散加减方可以明显改善慢性前列腺炎患者的临床症状，并显著降低患者前列腺液中炎症因子水平 [44]。在治疗急性炎症中，四逆散加味配合外敷消肿解毒膏治疗哺乳期急性乳腺炎与单独应用头孢唑啉钠相比，可降低相关免疫因子及炎症因子水平，且更有效安全 [45]。

4 小结与展望

“出入废则神机化灭，升降息则气立孤危”，气的升降出入运动是人体生命活动的根本，“气血冲和，万病不生，一有怫郁，诸病生焉”，临床治疗当以调理气机为先。四逆散配伍精妙，调畅气机，在抑郁、失眠、炎症性疾病、胃肠疾病、妇科疾病、肝病、心血管疾病等方面得到广泛应用，其临床应用之广泛皆不离乎“病皆与方相应者，乃服之”的方证相应思想。立足于方证相应，继续深入挖掘四逆散方与证稳定而规范的相应关系，可为其进一步规范化研究提供理论基础，同时，亦为临床准确辨证施治提供了科学理论依据。

参考文献

[1] 黄元御 . 四圣心源：黄元御医书精华 [M]. 孙恰熙，校注 . 北京：中国中医药出版社，2009：11.
[2] 吴利利，吴阿莉 . 四逆散联合米氮平治疗抑郁症 40 例疗效观察 [J]. 国医论坛，2019，34（5）：31-33.
[3] 席玉红，党中勤，张莉莉，等 . 加味四逆散对功能性消化不良伴抑郁状态的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（3）：202-204.
[4] Howard LM，Molyneaux E，Dennis CL，et al. Non-psychotic mental disorders in the perinatal period [J]. Lancet，2014，384（9956）：1775-1788.
[5] Liu XY，Wang SH，Wang GP. Prevalence and risk factors of postpartum depression in women：a systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Nurs，2022，31（19-20）：2665-2677.
[6] 储成俭 . 逍遥丸联合四逆散治疗产后抑郁临床观察 [J]. 新中医，2015，47（10）：120-122.
[7] 张志勇 . 四逆散加味治疗缺血性中风后抑郁症的临床分析 [J]. 实用中西医结合临床，2020，20（15）：90-92.

[8] 李亮，张元贵，林丰夏，等 . 中西医结合治疗冠心病伴抑郁 30 例临床观察 [J]. 中国民族民间医药，2018，27（18）：79-82.
[9] Cai W，Mueller C，Li YJ，et al. Post stroke depression and risk of stroke recurrence and mortality：a systematic review and meta-analysis [J]. Ageing Res Rev，2019，50：102-109.
[10] 姚春栉，颜凡棋，覃燕琼，等 . 加味四逆散联合草酸艾司西酞普兰治疗肝郁脾虚型抑郁症 [J]. 中药临床杂志，2020，32（2）：303-306.
[11] 王梓安，刘超群，张嘉宁，等 . 基于数据挖掘探究芳香中药治疗抑郁症的用药规律 [J]. 中南药学，2023，21（6）：1664-1669.
[12] 龙迪和，刚丽丽，崔晓，等 . 针灸对肝郁脾虚型失眠患者慢波睡眠时间与快动眼睡眠时间的影响 [J]. 重庆医学，2021，50（15）：2579-2582.
[13] 姬霞，张翊一 . 针刺联合四逆散治疗肝郁脾虚型失眠患者临床疗效分析 [J]. 贵州医药，2023，47（6）：878-879.
[14] 郭孟凡，刘爱红，李瑞艳，等 . 四逆散联合马来酸咪达唑仑片治疗睡眠障碍临床研究 [J]. 新中医，2023，55（2）：10-13.
[15] 章敬芳，黄伟明 . 四逆散加味治疗更年期失眠的临床观察 [J]. 光明中医，2018，33（14）：2037-2039.
[16] 韩陈香 . 四逆散加味治疗功能性消化不良的临床疗效 [J]. 内蒙古中医药，2023，42（9）：21-22.
[17] 王府存，李朋娟 . 四逆散加减联合多潘立酮治疗老年消化不良的疗效 [J]. 贵州医药，2023，47（7）：1105-1106.
[18] 李智丹 . 四逆散方加减改善功能性消化不良胃肠动力及心理状态的临床研究 [J]. 光明中医，2019，34（13）：2009-2011.
[19] 杨露，龚佳，陈薇，等 . 中医治疗慢性萎缩性胃炎的研究进展 [J]. 中医临床研究，2023，15（3）：65-68.
[20] 郗洋，王圆明 . 四逆散加减联合四联疗法治疗慢性非萎缩性胃炎临床疗效及对炎症反应的影响 [J]. 湖北中医药大学学报，2020，22（4）：67-69.
[21] 白春颖，陈新祥，陈影，等 . 加味四逆散治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究 [Z]. 吉林省中医药科学院，2021-12-03.
[22] 谢伟，吕春姬，吴莉芳 . 四逆散治疗慢性非萎缩性胃炎临床观察 [J]. 光明中医，2023，38（19）：3783-3786.
[23] 王静 . 加味四逆散治疗慢性萎缩性胃炎的疗效分析 [J]. 中国现代药物应用，2023，17（16）：144-147.
[24] 易文，覃鹏飞，石孟琼，等 . 左金丸合四逆散治疗肝郁脾虚型溃疡性结肠炎疗效及其对血清促炎因子和抗炎因子水平的影响 [J]. 中药药理与临床，2017，33（2）：165-167.
[25] 田红霞，傅小燕 . 左金丸合四逆散加减辅治反流性食管炎肝胃郁热证临床观察 [J]. 实用中医药杂志，2024，40（1）：116-118.
[26] 翁学运，陈克山，林书仲，等 . 左金丸合四逆散对溃疡性结肠炎炎症因子、YKL-40 的影响研究 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（6）：165-168.
[27] 黄俊城，黄紫锋，陈江海 . 四逆散加味治疗消化性溃疡的临床效果 [J]. 内蒙古中医药，2019，38（10）：30-31.
[28] 李力强，张贵锋，曾艺文，等 . 左金丸合四逆散辨证治疗腹泻型肠易激综合征 72 例临床观察 [J]. 中医杂志，2016，57（14）：1214-1217.
[29] 黄花朋，郭明月 . 金铃子散合四逆散加减联合西药治疗子宫内膜异位症致不孕临床研究 [J]. 光明中医，2019，34（11）：1740-1742.
[30] 贾沄 . 四逆散合参苓白术散化裁治疗少女月经不调 11 例 [J]. 甘肃中医学院学报，2003，20（3）：40-41.
[31] 张翠英 . 四逆散合五味消毒饮加味治疗慢性盆腔炎临床研究 [J]. 河南中医学院学报，2008，23（1）：50-51.
[32] 吴洋洋，梁佳，王帅，等 . 四逆散加味治疗慢性盆腔炎疗效及对血清炎症因子的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2022，31（19）：2706-2709.
[33] 郭姗珊，朱芝玲，汤倩珏，等 . 疏肝补肾方结合溴隐亭治疗肝郁肾虚型高泌乳素血症的临床观察 [J]. 上海中医药杂志，2015，49（4）：68-69，90.
[34] 吴舒怡，朱小区，董小洁 . 龙胆泻肝汤合四逆散治疗乙型肝炎慢加急性肝衰竭（湿热蕴结证）患者的疗效观察 [J]. 中国中医急症，2023，32（4）：675-677.
[35] 张丽丽，陈桃红，叶丽丽 . 加味四逆散治疗 2 型糖尿病非酒精性脂肪性肝病（肝郁气滞）随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志，2019，33（5）：13-17.
[36] 张家炎 . 四逆散合四君子汤联合西药治疗慢性乙肝肝纤维化随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志，2013，27（4）：81-82.
[37] 王芙蓉 . 四逆散加味联合西医常规治疗慢性稳定性冠心病气滞血瘀证 41 例临床观察 [J]. 甘肃中医药大学学报，2022，39（5）：35-40.
[38] 张望，宁小康，郑刚 . 生脉散合四逆汤治疗缓慢性心律失常 46 列 [J]. 实用中医药杂志，2016，32（11）：1067-1068.
[39] 蔡伟才，黄汉超，林剑良，等 . 四逆散合黄芽汤加减联合倍他乐克治疗肝郁脾虚型心脏神经官能症临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志，2023，32（16）：2268-2272.
[40] 高昕 . 桃红四物汤和四逆散配合西药治疗急性心肌梗塞患者 40 例 [J]. 陕西中医，2014，35（6）：655-656.
[41] 赵知荣 . 四逆散联合四逆汤治疗雷诺病的临床价值分析 [J]. 中医临床研究，2013，5（20）：73-74.
[42] 秦绍林，蔡增强，刘少河，等 . 四逆散合真武汤治疗雷诺病 2 例 [J]. 中医杂志，2002，43（9）：689.
[43] 毛长岭 . 阳和汤合四逆散治疗雷诺氏征 30 例 [J]. 四川中医，1997，15（8）：31.
[44] 易军，王万春，李颖 . 加味四逆散治疗Ⅲ a 型前列腺炎（气滞血瘀型）的临床研究及对 TNF-α 和 IL-10 的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘，2015，15（36）：4-5.
[45] 周毅，徐苗苗，林祥，等 . 四逆散加味配合外敷消肿解毒膏治疗哺乳期急性乳腺炎的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志，2018，38（11）：1316-1319.

（收稿日期：2024-05-07；修回日期：2024-07-02）

药品不良反应

1 例尿毒清颗粒致肝功能损伤的病例分析

梅玲，周后凤*（成都市第五人民医院药剂科，成都 611130）

关键词：尿毒清颗粒；肝功能损伤；病例分析；药物不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2024)11-3120-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.048

药物性肝损伤（drug-induced liver injury，DILI）是指由化学药品、生物制品、中成药等按处方药或非处方药管理的药品，以及中药材、天然药物、保健品、膳食补充剂等产品，或其代谢产物乃至其辅料、污染物、杂质等所导致的肝损伤[1]。DILI是最常见和最严重的药品不良反应之一，重者可致急性肝衰竭甚至死亡[2]。随着中药、中成药在全球的广泛应用，相关报道呈升高趋势并越来越受到关注[3]。本文对1例尿毒清颗粒导致肝损伤的病例进行讨论，旨在为临床安全用药提供参考。

1 病历资料

患者，女，56岁，体重58 kg，因“发现肝功能异常3 d”于2023年6月17日入院。10年前诊断为自身免疫性肝病，入院前3 d患者常规复查发现肝功能异常，谷草转氨酶（AST）1494 U·L^{-1}↑，有尿黄，其余无特殊。院外输液3 d治疗后转入我院。患病以来，患者精神可、睡眠差，饮食欠佳，尿黄症状好转，偶有便秘，近期体重未见明显增减。患者既往有慢性肾脏病，长期服用肾衰宁、药用炭、阿魏酸哌嗪等药物，自诉阿魏酸哌嗪调整至尿毒清后出现肝功能异常。

追问患者疾病史及用药史，患者10年前曾服用何首乌中药制剂后出现肝功能损伤，住院后好转。病历资料显示2023年3月2日检验指标：谷丙转氨酶（ALT）37 U·L^{-1}，AST 44 U·L^{-1}，完善相关检查后排除病毒性肝炎、自身免疫肝病等疾病所致。患者自诉因“慢性肾脏病”，长期服用肾衰宁、药用炭、阿魏酸哌嗪等药物。2023年5月24日遵医嘱将阿魏酸哌嗪片更换为尿毒清颗粒5 g tid po（规格：5 g/袋，康臣药业有限公司），十余天后开始出现尿黄，逐渐出现皮肤巩膜黄染并加重，根据肝功能损伤出现时间及用药时间，考虑DILI可能性大。入院后复查肝功能：AST 747 U·L^{-1}↑，ALT 1228 U·L^{-1}↑，乳酸脱氢酶409 U·L^{-1}↑，碱性磷酸酶（ALP）277 U·L^{-1}↑，谷氨酰转移酶（GGT）225 U·L^{-1}↑，总胆红素（TBIL）25.4 μmo1·L^{-1}↑，直接胆红素（DBIL）16.1 μmol·L^{-1}↑，总胆汁酸（TBA）288 μmol·L^{-1}↑，尿素8.10 mmol·L^{-1}↑，肌酐130.4 μmol·L^{-1}↑，估算肾小球滤过率39.46 mL·min^{-1}↓，尿酸480 μmo1·L^{-1}↑。

入院后立即停用尿毒清，予多烯磷脂酰胆碱20 mL ivgtt qd、甘草酸二铵胶囊150 mg po tid保肝治疗。住院第7日（D7）患者诉皮肤瘙痒，实验室检查：ALT 843 U·L^{-1}↑，AST 759 U·L^{-1}↑，ALP 334 U·L^{-1}↑，GGT 204 U·L^{-1}↑，TBA 291.5 μmol·L^{-1}↑，TBIL 78.2 μmol·L^{-1}↑，DBIL 65.3 μmol·L^{-1}↑，因ALP、TBIL、DBIL较前升高，加用丁二磺酸腺苷蛋氨酸1 g po qd、熊去氧胆酸250 mg po bid利胆保肝治疗。住院D11复查肝功能：ALT 718 U·L^{-1}↑，AST 649 U·L^{-1}↑，ALP 363 U·L^{-1}↑，GGT 185 U·L^{-1}↑，TBIL 76.6 μmol·L^{-1}↑，DBIL 65.6 μmol·L^{-1}↑，因各指标下降不明显，停用甘草酸二铵，加用异甘草酸镁注射液200 mg ivgtt qd。经上述保肝治疗后，患者ALT、AST、ALP、GGT、TBIL、DBIL逐渐下降，肝功能明显好转，于D16出院，出院时ALT 494 U·L^{-1}↑，AST 476 U·L^{-1}↑，ALP 272 U·L^{-1}↑，GGT 115 U·L^{-1}↑，TBIL 46.4 μmol·L^{-1}↑，DBIL 42.2 μmol·L^{-1}↑。交代患者继续口服保肝药物治疗，并于出院2周及6周后复查肝功能。其间，患者肝功能指标变化见图1。

基金项目：成都市卫生健康委员会医学科研课题（No.2022540；No.2022506）；四川省卫生和计划生育委员会项目（No.17PJ572）。
作者简介：梅玲，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：314048194@qq.com *通信作者：周后凤，女，主任药师，主要从事药事管理、临床药学研究，email：510823751@qq. com

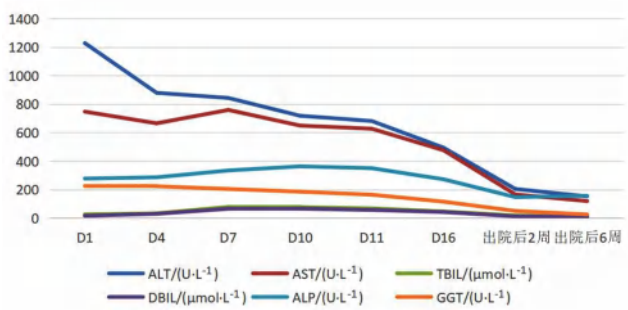


图 1 肝功能指标变化

2 分析与讨论

2.1 肝功能异常的原因

DILI 的诊断评估方案主要有 Roussel Uclaf 因果关系评估法（RUCAM），RUCAM 可对疑似患者提供系统性、框架性评估指导意见，是所有 DILI 因果关系评估方法中应用最广泛的工具 [3-6]。该患者入院时肝功能 ALT、AST、ALP、GGT、TBIL、DBIL 明显升高，且未见明显引起肝功能异常的疾病，结合用药史，考虑 DILI 由尿毒清颗粒引起的可能性大。采用 RUCAM 量表对尿毒清颗粒与肝损伤的因果关系进行综合评估：该患者 5 月 24 日遵医嘱将长期服用药物“阿魏酸哌嗪”更换为“尿毒清颗粒 5 g tid po”，十余天后开始出现尿黄，6 月 11 日逐渐出现皮肤巩膜黄染并加重，6 月 14 日查肝功能 AST 1494 U • L $^{-1}$，推测肝功能损伤出现时间在 10 ～ 20 d；停药后 ALT、AST 均明显下降；患者年龄≥ 55 岁，无饮酒或妊娠；该患者使用尿毒清颗粒同时合并使用慢性肾病相关用药，但患者慢性肾病多年，慢性肾病相关用药为长期用药，尿毒清颗粒用药时间提示相关性可能大；入院后完善相关检查，排除急性甲型肝炎、乙型肝炎感染、丙型肝炎感染、胆道梗阻、酒精中毒等非药物性因素引起。尿毒清颗粒主要成分有制何首乌，药品说明书提示长期服药患者定期检查肝功能；患者诉 10 年前服用中药何首乌导致肝功能异常而住院，与本次肝功能异常存在间接药物再激发反应的可能性。综上所述，RUCAM 量表得分为 7 分，评价为很可能。根据 R 值判断该患者的肝损伤的类型主要为肝细胞型，与 Dong 等 [7] 报道的结果相近。因此，该患者肝功能异常很可能和尿毒清颗粒使用有关。根据《中国药物性肝损伤诊治指南》[1] 评估该患者 DILI 严重程度属于 2 级（中度）。

2.2 尿毒清颗粒导致 DILI 机制

尿毒清颗粒是临床上用于治疗慢性肾衰竭的中药复方制剂的代表，主要成分有大黄、黄芪、桑白皮、车前草、白术、茯苓、制何首乌、苦参、白芍、丹参、半夏等，具有通腑降浊、健脾利湿、活血化瘀等功效，用于脾肾亏损，湿浊内停，瘀血阻滞所致的少气乏力，腰膝酸软，恶心呕吐，肢体浮肿，面色萎黄；慢性肾衰竭（氮质血症期或尿毒症早期）；可降低肌酐、尿素氮，稳定肾功能，延缓透析时间。对改善肾性贫血，提高血钙、降低血磷也有一定的作用。两项随机双盲、多中心试验表明尿毒清颗粒对慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）患者安全有效，可延缓 CKD 3b-4 期的进展 [8-9]；对中、重度肾功能不全患者具有长期疗效，早期使用尿毒清颗粒似乎可以改善肾功能的恶化。尿毒清颗粒上市以来安全性好，不良反应轻微，最常见的不良反应包括腹胀、腹泻，尚未有肝损伤报道。

DILI 的发病机制较复杂，涉及药物、人体和环境等多种因素。当前研究认为 DILI 分 3 种类型：固有型、特异质型和间接型，其发生机制研究学说主要涉及氧化应激、脂质过氧化、肝转运蛋白抑制剂、胆盐输出泵抑制、线粒体功能障碍、反应性代谢产物形成、炎性反应、疾病特异质等 [10-13]。经对 11 味中药查阅比对，何首乌及其制品相关肝毒性的报道最多，其他药物尚未查阅到。目前何首乌致肝损伤可能观点如下：

① 何首乌具有固有毒性，即使在正常剂量下服用仍可致易感人群肝损伤。何首乌致肝毒性的物质基础有二苯乙烯苷类、蒽醌类化合物和没食子酸等成分 [14]。② 基于各种研究，有学者提出何首乌肝损伤免疫应激“三因致毒”机制假说，即易感人群、免疫促进物质、肝损伤免疫易感物质的综合作用导致免疫炎症因子过表达导致肝损伤结果 [15]。③ 何首乌致肝损伤的机制尚不明确，目前研究有代谢酶改变、诱导肝细胞凋亡、胆汁酸稳态破坏、炎性损伤等学说 [14]。细胞色素 P450（CYP）和 UDP 葡糖醛酸基转移酶（UGT）酶系为与肝损伤密切相关的代谢酶。死亡受体依赖途径、线粒体依赖途径为肝细胞凋亡相关 [16]。组织代谢学研究结果显示主要与细胞线粒体功能相关的氧化磷酸化、三羧酸循环信号通路传导异常相关 [17]。④ 基因学研究提示何首乌中大黄素对肝脏多种 *CYP450* 代谢酶基因（如 *CYP2E1*、*CYP2B6*、*CYP1A2* 等基因）具有明显诱导作用 [18]，可导致血管内皮生长因子 *mRNA* 表达明显受到抑制 [19]。还可能与何首乌肝损伤风险相关的人类白细胞抗原 *HLA-B*35：01*、免疫细胞因子 [如肿瘤坏死因子 -*α*（TNF-*α*）、单核细胞趋化蛋白 1（MCP-1）、血管内皮生长因子（VEGF）等] 及代谢标志物等 [20-22]。⑤ 信号通路研究显示参与调控多条信号通路，多靶点、多途径、多层次诱导 DILI 的发生发展 [23]。

2.3 DILI 治疗

2.3.1 停药 《中国药物性肝损伤诊治指南》[1] 中指出实验室指标如超过上限，和 / 或伴随症状者，应及时停用可疑的肝损伤药物，尽量避免再次使用可疑或同类药物是最主要的治疗措施，停药后肝细胞损伤型恢复时间（3.3±3.1）周。该患者入院后复查肝功能 ALT、AST 均远大于 8×ULN，有立即停药指征，停药后经过保肝治疗 18 d 肝功能明显好转。

2.3.2 药物治疗 《中国药物性肝损伤诊治指南》[1] 中提到异甘草酸镁可用于治疗 ALT 明显升高的急性肝细胞型或混合型 DILI。对于不伴黄疸的轻 - 中度肝细胞损伤型和混合型 DILI 患者，可合理使用甘草酸二铵、复方甘草酸苷等其他甘草酸类、水飞蓟素类、谷胱甘肽、多烯磷脂酰胆碱等药物，以及国内广泛应用的中成药。但不推荐两种或以上都以降低 ALT 为主的肝损伤治疗药物联合应用。该患者初始使用甘草酸二铵和多烯磷脂酰胆碱治疗，后停用甘草酸二铵，加用异甘草酸镁保肝治疗，肝细胞损伤恢复时间在指南中平均时间范围内，药物治疗方案较为合理。

3 总结

本例患者因中度（2 级）肝功能损伤入院，临床药师依据 Roussel Uclaf 因果关系评估法，认为尿毒清颗粒与该患者的 DILI 可能存在一定的相关性，同时查阅文献，分析尿毒清颗粒中的制何首乌与肝损伤的相关性大。通过此例 DILI 病例分析，提示临床药师应多关注中成药导致的肝损伤，同时建议厂家也应进一步开展相关研究，完善药品说明书，从而在最大程度上保证患者的用药安全。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学分会药物性肝病学组 . 中国药物性肝损伤诊治指南 [J]. 中华肝脏病杂志，2023，31（4）：335-384.

[2] Li L，Wei J，Wang JY. Clinical analysis of 275 cases of acute drug-induced liver disease [J]. Front Med China，2007，1（1）：58-61.

[3] Chalasani NP，Maddur H，Russo MW，et al. ACG clinical guideline：diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. Am J Gastroenterol，2021，116（5）：878-898.

[4] Fontana RJ，Liou I，Reuben A，et al. AASLD practice guidance on drug，herbal，and dietary supplement-induced liver injury [J]. Hepatology，2023，77（3）：1036-1065.

[5] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines：drug-induced liver injury [J]. J Hepatol，2019，70（6）：1222-1261.

[6] Danan G，Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs Ⅰ. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings：application to drug induced liver injuries [J]. J Clin Epidemiol，1993，46（11）：1323-1330.

[7] Dong HH，Slain D，Cheng JC，et al. Eighteen cases of liver injury following ingestion of *Polygonum multiflorum* [J]. Complement Ther Med，2014，22（1）：70-74.

[8] Zheng Y，Cai GY，He LQ，et al. Efficacy and safety of Niaoduqing Particles for delaying moderate-to-severe renal dysfunction：a randomized，double-blind，placebo-controlled，multicenter clinical study [J]. Chin Med J，2017，130（20）：2402-2409.

[9] Zheng Y，Wang NS，Liu YN，et al. Effects of Niaoduqing particles on delaying progression of renal dysfunction：a post-trial，open-label，follow-up study [J]. Chin J Integr Med，2019，25（3）：168-174.

[10] Allison R，Guraka A，Shawa IT，et al. Drug induced liver injury-a 2023 update [J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev，2023，26（8）：442-467.

[11] Norman BH. Drug induced liver injury（DILI）. Mechanisms and medicinal chemistry avoidance/mitigation strategies [J]. J Med Chem，2020，63（20）：11397-11419.

[12] Björnsson HK，Björnsson ES. Drug-induced liver injury：pathogenesis，epidemiology，clinical features，and practical management [J]. Eur J Intern Med，2022，97：26-31.

[13] Malhi H，Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury [J]. Gastroenterology，2008，134（6）：1641-1654.

[14] 刘思雨，李敏，唐瑜，等 . 何首乌肝损伤机制及减毒方法研究进展 [J]. 中南药学，2024，22（4）：1008-1015.

[15] 沈洁，杨凯，孙彩华，等 . 含何首乌的中成药致肝损伤的临床分析 [J]. 中国药学（英文版），2022，31（4）：289-297.

[16] Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis [J]. Cell Death Dis，2014，5（1）：e996.

[17] 方国璋，王红星，魏岚，等 . 心元胶囊对大鼠肠系膜微循环的作用 [J]. 中国中医急症，2002，11（4）：287.

[18] 汪美汐，王宇光，徐焕华，等 . 何首乌中大黄素对 L02 肝细胞 CYP 亚酶表达及细胞毒性的影响 [J]. 中国药理学通报，2016，32（11）：1543-1548.

[19] 曹明雪，刘淼，吴荣荣，等 . 制何首乌致肝损害 1 例 [J]. 中国药物警戒，2011，8（8）：510.

[20] Li CP，Rao T，Chen XP，et al. *HLA-B*35：01* allele is a potential biomarker for predicting polygonum multiflorum-induced liver injury in humans [J]. Hepatology，2019，70（1）：346-357.

[21] Tu C，Niu M，Wei AW，et al. Susceptibility-related cytokine panel for prediction of polygonum multiflorum-induced hepatotoxicity in humans [J]. J Inflamm Res，2021，14：645-655.

[22] Zhang L，Niu M，Wei AW，et al. Risk profiling using metabolomic characteristics for susceptible individuals of drug-induced liver injury caused by *Polygonum multiflorum* [J]. Arch Toxicol，2020，94（1）：245-256.

[23] 梁子晗，李佳辉，程爽，等 . 何首乌致肝损伤的信号通路及其作用机制 [J]. 临床肝胆病杂志，2024，40（3）：626-632.

（收稿日期：2024-04-22；修回日期：2024-07-01）

β- 内酰胺类抗菌药物交叉过敏致药物超敏反应综合征 1 例

龙靓，刘湘*，胡毅翔（湘潭市中心医院临床药学科，湖南　湘潭　411100）

关键词：青霉素类；碳青霉烯类；交叉过敏；横纹肌溶解；药物超敏反应综合征
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2024)11-3123-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.11.049

1　临床资料

患者，男，38 岁，体重 90 kg。既往糖耐量异常，未服用降糖药。无药物、食物过敏史，无家族过敏史。2024 年 1 月 30 日（D1）12：50 因“咳嗽、咳痰并气促 1 d，加重伴胸闷、发热 3 h”入住呼吸与危重症医学科。14：15 左右，患者咳黄脓痰伴腥臭味，端坐呼吸，气促明显，大汗淋漓。查体：体温（T）36.6 ℃，心率 150 次•min^{-1}，血压（BP）80/47 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），血氧饱和度（SpO_2）70%（面罩吸氧下），唇发绀，精神差，双肺呼吸音粗，双肺闻及明显湿啰音，左肺明显。辅助检查：血常规示白细胞计数（WBC）30.02×10^9 • L^{-1}↑，中性粒细胞百分比（NE%）92.8%↑，嗜酸性粒细胞计数（EOS）0.02×10^9 • L^{-1}，嗜酸性粒细胞百分比（EO%）0.1%；降钙素原（PCT）4.98 μg • L^{-1}↑；白细胞介素 -6（IL-6）3552 pg • mL^{-1}↑；C 反应蛋白（CRP）233.68 mg • L^{-1}↑；床旁胸片示左侧大量胸腔积液，双肺炎症或肺水肿。诊断：① 重症肺炎并脓胸、脓毒症、急性呼吸窘迫综合征；② 糖耐量异常。

入院当日，予鼻气管插管辅助通气＋肺泡灌洗、静脉 - 静脉体外膜肺氧合（V-V ECMO）支持和左侧胸腔闭式引流术，初始经验性予美罗培南（D1 ～ D15，1.0 g ivgtt q8h）、莫西沙星（D1 ～ D3，0.4 g ivgtt qd）和玛巴洛沙韦（80 mg po st）抗感染，泮托拉唑（D1 ～ D15，40 mg ivgtt qd）抑酸、甲泼尼龙琥珀酸钠（D1 ～ D3，40 mg ivgtt qd）抗炎及镇静升压等处理。D3，胸水和肺泡灌洗液 NGS 均示咽峡炎链球菌和星座链球菌，序列数菌 ＞ 3×10^5 条，PCT ＞ 100 μg • L^{-1}↑，停甲泼尼龙琥珀酸钠和莫西沙星，加利奈唑胺（D3 ～ D15，0.6 g ivgtt q12h）。D4，胸水培养咽峡炎链球菌（多种药物敏感，且青霉素 *MIC* 为 0.064）和口普雷沃菌（无药敏），联合青霉素钠（D4 ～ D12，480 万 U ivgtt q6h），此后病情较前控制。D8，病情好转撤除 V-V ECMO。D12 起患者再次发热，查新型冠状病毒、流感病毒及肺炎支原体菌阴性，复查感染指标（较前下降，见表 1）和肺部 CT（双肺感染病变较前有吸收，右肺空洞样病变可能），临床药师考虑药物热可能，建议停用青霉素钠，临床医师采纳。D15，患者反复高热，血培养阴性，血常规示 EOS 及 EO% 呈上升趋势，肌酶谱如肌红蛋白（MYO）、肌酸激酶（CK）、乳酸脱氢酶（LDH）及肝肾功能均显著升高，肝炎病毒检测阴性，考虑药物不良反应（ADR）可能大，临床药师建议停泮托拉唑、利奈唑胺及美罗培南，改用苹果酸奈诺沙星抗感染，但临床最终予以哌拉西林他唑巴坦（D15 ～ D18，4.5 g ivgtt q8h）抗感染，同时予生理盐水补液、呋塞米利尿、碳酸氢钠片碱化尿液及血液滤过（RRT）等对症处理。D18 凌晨，患者体温 39.8 ℃，且后背可见散在皮疹伴瘙痒，当日上午，患者胸部、腹部、后背、大腿及颈部多处丘疹性荨麻疹，相关指标进行性上升（见表 2），考虑 β- 内酰胺类抗菌药物交叉过敏，采纳临床药师建议停用哌拉西林他唑巴坦改用苹果酸奈诺沙星（D18 ～ D27，0.5 g ivgtt qd）抗感染，予甲泼尼龙琥珀酸钠（40 mg ivgtt q12h）抗炎抗过敏，继续补液利尿和碱化尿液处理。D21 皮疹较前消退，甲泼尼龙琥珀酸钠减量（40 mg ivgtt qd）。D22 患者体温正常 2 d，皮疹基本消失，停甲泼尼龙琥珀酸钠。此后患者血常规示 EOS 及 EO% 下降至正常范围，肌酶谱和肝肾功能指标呈下降趋势并恢复正常。

2　讨论

2.1　*病例特点与药物超敏反应综合征（DIHS）诊断*

DIHS 是一种临床少见且可危及生命的严重

基金项目：中华国际医学交流基金会青年基金（No. Z-2021-46-2101）。
作者简介：龙靓，女，主任药师，主要从事临床药学研究，email：123131609@qq.com　*通信作者：刘湘，女，主任药师，主要从事临床药学研究，email：13975224413@qq.com

表 1 住院期间肌酶、肝肾功能和血乳酸变化情况

日期	肌红蛋白（MYO）/（μg·L^{-1}）	肌酸激酶（CK）/（U·L^{-1}）	乳酸脱氢酶（LDH）/（U·L^{-1}）	肌酐（Cr）/（μmol·L^{-1}）	尿素（Urea）/（mmol·L^{-1}）	谷草转氨酶（AST）/（U·L^{-1}）	谷丙转氨酶（ALT）/（U·L^{-1}）	乳酸（Lac）/（mmol·L^{-1}）
D1	205.0↑	309.0↑	347.0↑	76.0	5.9	73.1↑	73.6↑	5.3↑
D6	209.0↑	156.0	625.0↑	77.0	14.8↑	29.7	48.2↑	2.2
D8	173.0↑	73.0	368.0↑	62.0	12.3↑	24.3	35.4	1.7
D9	404.0↑	161.0	437.0↑	171.0↑	21.6↑	27.4	30.4	2.1
D12	956.0↑	455.0↑	327.0↑	268.0↑	35.4↑	41.2	62.8↑	2.2
D15	8521.0↑	4869.0↑	406.0↑	189.0↑	21.4↑	48.5↑	113.4↑	2.4↑
D16	11 863.0↑	5867.0↑	385.0↑	207.0↑	21.3↑	72.1↑	153.2↑	1.3
D17	10 723.0↑	4461.0↑	351.0↑	236.0↑	22.1↑	76.8↑	120.4↑	2.3↑
D18	20 537.0↑	6917.0↑	456.0↑	221.0↑	19.6↑	114↑	204.7↑	2.2
D19	22 304.0↑	9215.0↑	711.0↑	223.0↑	20.2↑	229↑	276.1↑	2.7↑
D20	12 544.0↑	6149.0↑	651.0↑	266.0↑	24.2↑	258↑	212.2↑	2.2
D21	2454.0↑	1905.0↑	460.0↑	187.0↑	19.9↑	188.9↑	101.9↑	1.1
D23	372.0↑	348.0↑	379.0↑	177.0↑	14.1↑	119.6↑	33.6	1.3
D26	167.0↑	97.0	274.0↑	164.0↑	10.4↑	59.3↑	20.7	1.0

表 2 住院期间感染指标变化情况

日期	WBC/（×10^{9}·L^{-1}）	NE/%	EOS（×10^{9}·L^{-1}）	EO/%	CRP/（mg·L^{-1}）	PCT/（μg·L^{-1}）	IL-6/（pg·mL^{-1}）
D1	30.0↑	92.8↑	0.02	0.1	205.6↑	4.98↑	3552↑
D2	15.1↑	89.1↑	0.02	0.1	312.2↑	＞100↑	4001↑
D3	33.2↑	94.4↑	0.04	0.1	380.9↑	＞100↑	
D7	16.2↑	84.9↑	0.11	0.7	90.4↑	8.58↑	99.5↑
D8	16.8↑	85.7↑	0.25	1.5	105.3↑	5.44↑	
D12	16.3↑	82.8↑	0.18	1.1	87.1↑	2.58↑	
D15	10.3↑	81.2↑	0.17	1.6	53.4↑		
D16	10.8↑	78.4↑	0.33	3.1	44.4↑		
D17	9.1	79.1↑	0.31	3.4	49.8↑		
D18	7.4	76.6↑	0.34	4.6	54.1↑	1.41↑	35.1↑
D19	7.1	72.1↑	0.73↑	10.2↑	22.5↑		
D21	10.7↑	76.4↑	0.01	0.1	11.7↑	0.93↑	20.5↑
D22	10.2↑	75.4↑	0.51↑	5.0	5.8↑		
D27	14.1↑	84.5↑	0.21	1.6	7.3↑		

ADR，病死率约 10%，通常以发热和全身皮疹为前期症状，伴有血液系统异常、淋巴结病、脏器受累（肝、肾、肺等），也可能出现肌炎、心肌炎等[1]。目前国际上尚无统一的 DIHS 诊断标准，不同国家对部分 DIHS 的诊断可能存在差异。我国 DIHS 诊断标准[1]：当患者出现以下临床表现或实验室指标异常，应考虑 DIHS 可能，满足①～⑤可确诊，即：① 迟发性皮疹（开始用药到出现皮疹时间 2 ～ 6 周，平均 3 周）；②≥ 2 个部位的淋巴结肿大；③ 发热（体温＞ 38 ℃）；④ 内脏损害（ALT ＞正常上限值 2 倍、间质性肾炎、间质性肺炎或心肌炎）；⑤ 血液异常：WBC 升高或降低，EOS ≥ 1.5×10^{9}·L^{-1} 或不典型淋巴细胞百分比（LYM）% ＞ 5%；⑥ 复发（停用诱发药物并给予治疗疾病仍出现病情复发或加重）；而欧洲诊断标准主要基于症状和实验室结果分类评分，也是目前临床上应用相对较广的评价方法[2]。然而，由于 DIHS 临床表现的非特异性、可变性和不可预测性[3]，常导致诊断滞后或误诊。回顾本病例，该患者具有以下特点：① 自入院开始使用了多种抗菌药物如美罗培南（D1 ～ D15）、利奈唑胺（D3 ～ D15）、青霉素钠（D4 ～ D12）和哌拉西林他唑巴坦（D15 ～ D18）以及质子泵抑制剂泮托拉唑（D1 ～ D15），D18 开始，胸部、腹部、后背、大腿及颈部多处出现丘疹性荨麻疹（面积达 50% 以上）；② 治疗期间，体温正常 4 d 后再次发热（高达 39.8 ℃），完善血培养、呼吸道病毒及其他感染相关检查后，排除感染所致；③ 治疗中出现肝功能受损（ALT ＞正常上限值 6 倍），并出现肾功能受损和肌酶升高；④ 血常规示 EOS 和 EO% 缓慢上升并高于正常值；⑤ 停用诱发药物，给予 RRT、抗炎抗过敏、补液利尿及碱化尿液等对症治疗 4 d 后 EOS 和 EO% 继续升高，但其他指标及临床表现均好转，10 d 后 EOS 和 EO% 均恢复正常。参考我国诊断标准，该患者符合①③④⑤⑥（其中⑤⑥不典型），考虑 β- 内酰胺类抗菌药物交

叉过敏致 DIHS 可能；而根据欧洲 DIHS 诊断评分[2]，该患者综合评分为 6 分（见表 3），可确诊为 DIHS。

表 3　RegiSCAR 诊断 DIHS 评分

因素	是	否	未知	评分
发热≥ 38.5 ℃	0	－1	－1	＋1
淋巴结肿大（＞ 1 cm，至少 2 个部位）	＋1	0	0	0
EOS：≥ 0.7×10^9 • L^{-1} 或≥ 10%；≥ 1.5×10^9 • L^{-1} 或≥ 20%	＋1；＋2	0	0	＋1
异型淋巴细胞	＋1	0	0	0
皮疹面积≥体表面积的 50%	＋1	0	0	＋1
典型 DRESS 疹（≥ 2 项，颜面部水肿、紫癜、浸润、脱屑）	＋1	－1	0	0
活检 DRESS 疹	0	－1	0	0
脏器累及：1 个；≥ 2 个	＋1；＋2	0	0	＋2
病程＞ 15 d	0	－1	0	0
排除其他原因（血培养、抗核抗体、肝炎病毒、支原体、衣原体，所做项目≥ 3 项且阴性）	＋1	0	0	＋1
总分				＋6

注：总分＜ 2 分，除外；2 ～ 3 分，可能；4 ～ 5 分，很可能；≥ 6 分，明确诊断。

2.2　DIHS 关联性评价

抗菌药物、解热镇痛药及质子泵抑制剂等药物均可诱发 DIHS，但其临床表现及发生的严重程度各有差异，且以横纹肌溶解为主要表现则相对罕见。研究发现，DIHS 致敏药物中抗菌药物发生率为 11% ～ 37%，其中 β- 内酰胺类抗菌药物位居前位[4-5]。早在 2016 年，加拿大卫生部已发文警示哌拉西林单药及其复方制剂与 DIHS 存在相关性[6]。2021 年，Sharifzadeh 等[7] 分析了 254 例抗菌药物相关 DIHS 病例，其中 22 例与青霉素类相关（占比 8.6%），3 例与碳青霉烯类相关（占比 1.18%），1 例与利奈唑胺相关（占比 0.39%）。2024 年，Kanokkarn 等[8] 总结了 21 例质子泵抑制剂相关 DIHS 病例，4 例与泮托拉唑相关（占比 19.1%）。回顾本案例病史，患者先后使用 β- 内酰胺类药物如美罗培南、青霉素及哌拉西林他唑巴坦发生 DIHS，停药和好转时间与文献报道相符；且青霉素类药物之间交叉过敏概率较高[9]，而青霉素类与碳青霉烯类也有交叉过敏报道[10-13]，两者交叉过敏反应发生率在 0% ～ 0.9%，表现形式多样，如皮疹、药物热、呼吸窘迫、急性肾衰竭、多部位肿胀等；尽管该病例也使用了利奈唑胺和泮托拉唑，但其停药及对症处理后好转时间与文献不符。同时，根据药物关联性评价诺氏药品不良反应评估量表评分[14]，β- 内酰胺类抗菌药物如美罗培南、青霉素和哌拉西林他唑巴坦得分分别为 7 分、7 分和 8 分，与 DIHS 关联性为“很可能”；利奈唑胺和泮托拉唑得分均为 3 分，与 DIHS 关联性为“可能有关”，见表 4。

表 4　诺氏药物不良反应评估量表评分

相关问题	问题分值			得分				
	是	否	未知	美罗培南	青霉素	哌拉西林他唑巴坦	利奈唑胺	泮托拉唑
该 ADR 先前是否有结论性报告？	＋1	0	0	＋1	＋1	＋1	＋1	＋1
该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的？	＋2	－1	0	＋2	＋2	＋2	＋2	＋2
该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解？	＋1	0	0	0	0	＋1	0	0
该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现？	＋2	－1	0	0	0	0	0	0
是否存在其他原因能单独引起该 ADR?	－1	＋2	0	＋2	＋2	＋2	－1	－1
该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现？	－1	＋1	0	0	0	0	0	0
药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度？	＋1	0	0	0	0	0	0	0
该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解？	＋1	0	0	0	0	0	0	0
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应？	＋1	0	0	＋1	＋1	＋1	0	0
是否存在任何客观证据证实该反应？	＋1	0	0	＋1	＋1	＋1	＋1	＋1
总分				7	7	8	3	3

注：总分≤ 0 分，可疑；1 ～ 4 分，可能有关；5 ～ 8 分，很可能有关；≥ 9 分，肯定。

2.3　以横纹肌溶解为主要表现的 DIHS 相关处理

早期诊断和停用致敏药物对改善 DIHS 患者的预后至关重要，同时还应避免使用同类药物或结构类似的其他药物以免交叉过敏。系统应用糖皮质激素是目前 DIHS 的主要治疗手段，0.5 ～ 1 mg/（kg • d）的泼尼松或其等效药物通常是有效

的，具体应根据病情轻重程度和病程选择相应的剂型（口服或静脉）、剂量以及使用疗程，但需警惕部分患者使用糖皮质激素后可能会导致病毒再激活而加重病情；当患者对糖皮质激素不敏感或不耐受，还可考虑糖皮质激素联合免疫球蛋白 [一般剂量为 0.2 ～ 0.4 mg/（kg • d）]、或联合免疫抑制剂进行治疗；还可结合 DIHS 多样化的临床表现予以相应的对症支持处理 [15]。通常情况下，多数 DIHS 患者停用致敏药物可完全康复，但临床病程和预后存在个体差异。

本案例以发热为首发症状，后相继出现横纹肌溶解并肝肾功能损伤和 EOS 升高、全身多处皮疹，没有及时停用致敏药物，且继续使用结构类似的药物是导致病情快速进展的主要原因。文献报道，药源性横纹肌溶解并肝肾功能受损是肌红蛋白及其代谢产物直接或间接作用的结果，可以通过碱化尿液来增加肌红蛋白和尿酸的溶解度、阻碍肌红蛋白降解，或生理盐水补液以增加肾脏血流灌注及肾小球滤过和排尿，或 RRT 肾替代治疗以清除 CK、LDH 及 MYO 等致病物质，以达到可能恢复横纹肌溶解继发的急性肾损害患者的肾功能 [16-17]。本例患者通过以上对症处理可能在一定程度上延缓了对肝肾功能的进一步损伤，但整体而言病情仍在进展，最终在停用致敏药物（包括所有 β- 内酰胺类抗菌药物），结合药敏改用无类似结构的奈诺沙星抗感染，使用甲泼尼龙琥珀酸钠抗炎，及补液利尿、碱化尿液等对症处理后，患者 DIHS 转危为安，感染亦得到有效控制。

3 结论

DIHS 是一种少见但可危及生命的严重 ADR，病死率较高。临床实践中，一旦出现与 DIHS 相关的可疑症状及异常实验室指标，临床药师应重视对患者的药学监护，协助医师及时发现 DIHS 并尽早干预。准确识别及时停用致敏药物至关重要，但因 DIHS 临床变异大，治疗需个体化，可根据内脏器官受累程度使用糖皮质激素以及相应的对症支持处理。β- 内酰胺类抗菌药物作为感染性疾病治疗药物中的主力军，也是诱发 DIHS 的主要药物之一，但青霉素类与碳青霉烯类交叉过敏导致的 DIHS 报道罕见，当发生或可疑 DIHS 时应避免继续使用结构类似的药物以免交叉过敏。

参考文献

[1] 中国医师协会皮肤科医师分会变态反应性疾病专业委员会 . 药物超敏反应综合征诊治专家共识 [J]. 中华皮肤科杂志，2018，51（11）：787-790.

[2] Kardaun Sh，Sidoroff A，Valeyrie-Allanove L，et al. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms：does a DRESS ayndrome really exist? [J]. Br J Dermatol，2007，156（3）：609-611.

[3] 梁源，马琳 . 儿童药物反应伴嗜酸性粒细胞增多和全身症状的临床特征及诊疗进展 [J]. 中华实用儿科临床杂志，2021，36（12）：915-920.

[4] Teng C，Baus C，Wilson JP，et al. Rhabdomyolysis associations with antibiotics：a pharmacovigilance study of the FDA adverse event reporting system（FAERS）[J]. Int J Med Sci，2019，16（11）：1504-1509.

[5] 杨娈，温禾，孙青 . 药物超敏反应综合征的发病机制及治疗进展 [J]. 中国麻风皮肤病杂志，2023，39（7）：538-542.

[6] 本刊讯 . 加拿大警示哌拉西林的药物超敏反应综合征 [J]. 中国药房，2016，27（16）：2275.

[7] Sharifzadeh S，Mohammadpour AH，Tavanaee A，et al. Antibacterial antibiotic-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）syndrome：a literature review [J]. Eur J Clin Pharmacol，2021，77（3）：275-289.

[8] Kanokkarn P，Kanokporn P，Kanokwan P，et al. Omeprazole induced rapid drug reaction with eosinophilia，systemic symptoms，and cross-reactivity in delayed-type hypersensitivity associated with proton-pump inhibitors：a case report and literature review [J]. Case Reports Immunol，2024，doi：10.1155/2024/1317971.

[9] 周法庭，朱晓丹，波顺庆，等 .β- 内酰胺环和侧链结构诱导青霉素类抗菌药物过敏的研究进展 [J]. 医学综述，2018，24（3）：444-448.

[10] 马丽萍，陈灿，张蕾，等 . 美罗培南与哌拉西林他唑巴坦交叉过敏反应一例并文献分析 [J]. 实用药物与临床，2016，19（1）：81-84.

[11] Romano A，Viola M，Guéant-Rodriguez RM，et al. Brief communication：tolerability of meropenem in patients with IgE-mediated hypersensitivity to penicillins [J]. Ann Intern Med，2007，146（4）：266-269.

[12] Cunha BA，Hamid NS，Krol V，et al. Safety of meropenem inpatients reporting penicillin allergy：lack of allergic cross reac-tions [J]. J Chemother，2008，20（2）：233-237.

[13] Atanaskovié-Markovié M，Gaeta F，Medjo B，et al. Tolerability of meropenem in children with IgE-mediated hypersensitivity to penicillins [J]. Allergy，2008，63（2）：237-240.

[14] 郑飞跃，吴燕，饶岳峰，等 . 诺氏评估量表在药物不良反应评价中的作用及案例分析 [J]. 中国药学杂志，2012，47（8）：650-652.

[15] 雷海波，刘湘 . 哌拉西林他唑巴坦致药物超敏反应综合征 1 例 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1748-1750.

[16] Kodadek L，Carmichael Ii SP，Seshadri A，et al. Rhabdomyolysis：an American Association for the Surgery of Trauma Critical Care Committee Clinical Consensus Document [J]. Trauma Surg Acute Care Open，2022，7（1）：e000836.

[17] 李国刚，杨林，朱平 . 横纹肌溶解症发病机制研究进展 [J]. 中华灾害救援医学，2019，7（10）：596-600.

（收稿日期：2024-05-02；修回日期：2024-07-05）